

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060001

參展科別 植物學

作品名稱 探討 SAP5 基因 3 端非轉譯序列對表現量的影響

得獎獎項

就讀學校 臺北市立建國高級中學

指導教師 陳荷明、劉翠華

作者姓名 張詠鈞

關鍵詞 SAP5 基因、3 端非轉譯序列、NMD 機制

作者簡介



我是張詠鈞，就讀建國中學科學班。從小接受多元而啟發式的教育，造就我獨立、積極、勇於挑戰的個性。我喜歡數學，也熱愛觀察自然及實驗。中研院是台灣學術研究的最高殿堂，參與中研院的人才培育計畫，在教授指導下進行專題研究，深入探索生物學的未知領域，在實驗室用科學方法面對挑戰及尋找答案，讓我覺得充滿能量！

摘要

*AtSAP5*是阿拉伯芥中壓力相關蛋白(Stress Associated Protein)的成員之一，其表現與鹽分、乾旱、滲透壓、病毒等壓力相關。已知 SALK053644 突變株的 *SAP5*表現量上升，此突變株的 T-DNA 嵌入於 *SAP5*的3'UTR，我提出的假設是 T-DNA 破壞了他原本長3'UTR 的 NMD 特性，造成 *SAP5*的表現量改變。本研究將 *SAP5*的3'UTR 引入報導基因 *GFP* 中，利用菸草的短暫性表現了解不同3'UTR 對於表現量的影響。本研究定序了 T-DNA 嵌入在 SALK053644的位置，研究結果顯示 *SAP5*的3'UTR 受到 NMD 機制調控，而 SALK053644的 T-DNA 上有一個新的 *SAP5*多腺苷酸化位點，使用此位點的 mRNA 可能不會被 NMD 機制所降解，進而造成 *SAP5*表現量上升。我提出三種可能的模式來解釋這樣的現象，分別是(1)T-DNA 造成 *SAP5*轉錄量上升，(2)T-DNA 改變多腺苷酸化位點的使用，(3)T-DNA 破壞 *SAP5* 3'UTR 後方的 NMD 特徵，相關的研究發現有助於了解可能影響 *SAP5*基因表現之調控因素，也指出未來的研究方向。

Abstract

AtSAP5 is a member of the Stress Associated Protein family in *Arabidopsis thaliana*. Its expression can be in response to changes in salinity, osmotic pressure, drought, cold stress, and even exposure to viruses. It is known that a mutant SALK053644 shows an increased expression of *SAP5*, with T-DNA inserted in *SAP5* 3'UTR. It can assume that T-DNA destroys the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) feature of *SAP5* long 3' untranslated region (3' UTR), leading to changes of the *SAP5* expression. In this research, I fused *SAP5* 3'UTR with *GFP*, a reporter gene, in order to understand the impact of different 3'UTR on gene expression through agroinfiltration of tobacco leaves. This study has documented the position of T-DNA inserted in the *SAP5* gene. The results indicate that *SAP5* 3'UTR is regulated by NMD mechanisms and there is a polyadenylation site found on the T-DNA in SALK053644 line. The mRNA terminated at the new polyadenylation site appears to escape from NMD regulation, which may explain why *SAP5* expression is increased in SALK053644. Three possible models are proposed to explain these results: (1) T-DNA insertion enhances *SAP5* transcription; (2) T-DNA insertion alters the use of polyadenylation sites; and (3) T-DNA insertion destroys the NMD feature at the end of *SAP5* 3'UTR. This study informs further understanding of *SAP5* gene regulation and expression, which can lead to future research.

壹、前言

(一) 研究動機

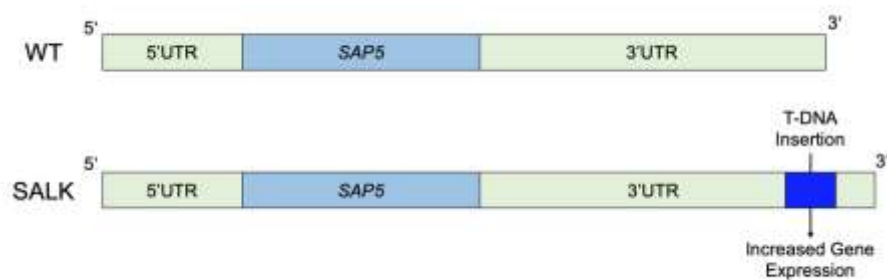
氣候變遷是人類近來遇到最大的問題之一，不論是寒流或是熱浪，對生物的生存都造成極大的影響，每年有無數的人類死於異常的氣候，更不用說無法移動的植物，面對氣候變遷加上人類不斷的砍伐，植物的生存越來越困難，而根據聯合國經濟及社會理事會公佈的資訊，仍有為數不少的國家也還持續面對糧食不足，如何確保足夠的農作物生產一直是各國科學家共同努力的目標 [1]。面對艱難的環境變化，植物是如何生存下來，了解植物內在的應變及調控機制，是我覺得很有興趣而且很有前瞻性的研究主題，因此我去搜尋相關的資料，找到了 *SAP5* 基因，了解 *AtSAP5* 是植物的壓力相關蛋白，其表現量可以影響植物對環境的適應，在乾旱、鹽分高的環境中，*SAP5* 基因可以幫助植物生存在艱困的環境中。在搜尋資料的過程中，我了解到突變有可能影響基因的表現量，與指導教授討論後，我找到 SALK053644 這一個突變株，它是 TDNA 嵌入 *SAP5* 基因的突變，特別的是，一般的 TDNA 嵌入會造成基因的表現量下降，而這一個突變株反而會造成 *SAP5* 基因的表現量上升，目前很少有相關的文獻，且在最新的研究中，*SAP5* 基因與植物對抗外來的病原也有關係，只要未來在其他植物也能找到相關的基因，便可透過這樣的技術讓植物得以生存在較為惡劣的環境，甚至應用在生態中，不論是面對病毒或是氣候變遷的威脅都能藉此去應對壓力，可能可以增加生態的穩定性，達到保育植物的作用，甚至增加農作物生存的機會，而本研究的目的就是了解植物這些應變壓力相關的機制。

(二) 研究背景

AtSAP5 是阿拉伯芥中和壓力相關蛋白的成員之一，其表現與鹽分、乾旱、滲透壓等非生物壓力相關，例如面對熱脅迫時，*SAP5* 基因能支持阿拉伯芥面對這樣的壓力，增加在高溫下的適應性；此外，最近也有研究指出 *AtSAP5* 是抗病毒免疫的樞紐之一，能在 SA 介導的抗病毒免疫途徑中起作用，因此 *SAP5* 基因不只能面對非生物的壓力，也能應對生物相關的壓力 [2]。

由 SALK 提供給 ABRC 的 TDNA 突變株會用 SALK 編號，在 SALK053644 突變株中，

T-DNA 嵌入在 *SAP5* 的 3 端非編碼區中 (3' UTR)。但此突變株的 *SAP5* 表現量卻較野生型增加，推測是因為嵌入性突變讓基因的 3 端非編碼區長度不足，而避免遭到 NMD (Nonsense-mediated mRNA Decay) 機制降解，進而增加 *SAP5* 的表現量。NMD 的功能是可以防止錯誤的 mRNA 選擇性剪接，如果 3'UTR 太長或還有內含子的存在，NMD 就會認為還沒到後面真正的終止密碼子，便降解錯誤的 mRNA，而根據前人研究，在阿拉伯芥中，若 3'UTR 超過 350 個鹼基對，會被 NMD 視為異常的 3'UTR。除此之外，UPF1 是參與 NMD 的蛋白，如果 *SAP5* 基因受到 NMD 機制影響，便會與 3'UTR 上的 UPF1 有關[3, 4]。在查詢過去科學家對植物應變壓力的基因調控機制的相關知識，我希望能在實驗室繼續探索，了解 3'UTR 是如何調控 *SAP5* 基因的表現量以及相關的機制。



圖一：SALK053644 突變株中的，T-DNA 嵌入於 *SAP5* 基因的 3'UTR

(三) 研究目的

1. SALK053644 突變株中的 T-DNA 對 *SAP5* 3'UTR 序列的影響
2. 探討 *SAP5* 3'UTR 調控基因表現量的機制

貳、研究方法或過程

(一) 研究設備及器材

1. 植株

WT 阿拉伯芥	野生型的阿拉伯芥
SALK 阿拉伯芥	阿拉伯芥 SALK053644 T-DNA 突變株
Upf1-1 阿拉伯芥	NMD 突變株
Smg7-1 阿拉伯芥	NMD 突變株
WT 菸草	野生型的煙草
<i>rdr6</i> 菸草	<i>rdr6</i> 突變的煙草，能增強短暫性表現

2. 質體

pCAMBIA1390:35S-GFP-NOS	有 NOS 終結子位在 EcoRI 的後方
pJET	切位是平端(blunt)，利用 T4 噬菌體的酵素可嵌入 DNA 做定序
pCAMBIA1390:35S-GFP-tHSP	終結子位在 BamHI 與 SpeI 之間
GFP-SAP5	在 GFP 後接上 SALK053644 的 3'UTR
GFPabc	接有長 3'UTR，已證明為 NMD 的目標，用來做正對照組
pBIN61	空質體，作為 UPF1DN 的負對照組

3. 菌種

大腸桿菌	用來確認質體是否連接成功
農桿菌	選用 GV3101 農桿菌，用來感染菸草，使菸草行短暫性表現
農桿菌-UPF1DN	含有產生 UPF1DN(UPF1 dominant negative)的基因，能透過競爭型抑制使 NMD 失效

4.試劑

LB(Lysogeny broth)	用於培養大腸桿菌、農桿菌
ddH ₂ O	二次水
TE buffer	用於回溶 PRIMER
10X FastDigest Buffer	用於切割質體時
5X Phusion Green HF	用於 PCR cloning
10uM dNTP	用於 PCR
1% 1X TAE buffer	用於製作電泳膠體、電泳緩衝溶液
DNA 萃取 buffer	80ml 1M Tris-HCl PH9.0 40ml 10%SPs 16ml 10M LiCl 20ml 0.5M EDTA 244ml ddH ₂ O
70%EtOH	用於萃取 DNA 時去除鹽類
液態氮	用於研磨組織
2X PCR Master Mix	用於 PCR
agarose	用於製作電泳膠體
DNA 顯色劑	電泳時使 DNA 有螢光
TPC buffer	用於膠體的回溶
TPW buffer	
TEB buffer	
2X HIFI Assemble buffer	用於 Gibson Assemble
感染液	10mM MgCl ₂ (stock 2M) 400ul 100Uμm Acetosyringone (stock 200mM) 40ul 加水至 80ml
cold isopropanol	沉澱 DNA
PureLink Plant RNA reagent	用於抽 RNA
NaCl	

Isopropyl alcohol	
chloroform	
RNAase-free water	
5X First stand buffer	用於 Reverse transcription
0.1M DTT	
RNase OUT™	

5. 酵素

BAMHI-HF	用來切質體上的 BamHI 切位
EcoRI-HF	用來切質體上的 EcoRI 切位
SpeI-HF	用來切質體上的 SpeI 切位
DNA 聚合酶	在 PCR 中進行複製
T4 DNA 噬菌體酵素	將片段接到 pJET 質體上
SuperScript™ IV RT	用於 Reverse transcription

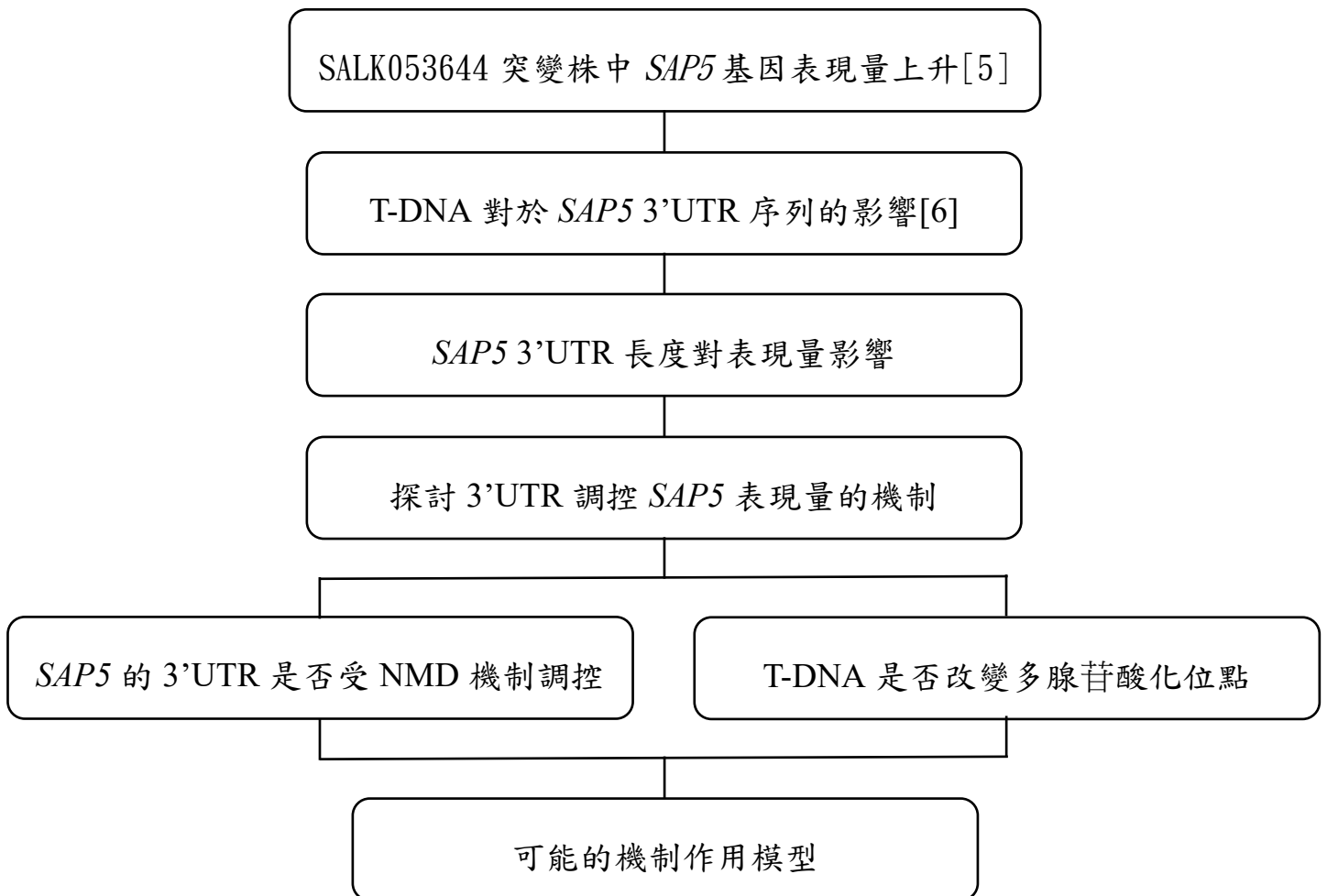
6. 器材與設備

離心機	熱循環儀	PCR 反應管
恆溫生長箱	微量分光光度計	無菌操作台
電子秤	電泳用具	螢光儀
微波爐	電穿孔儀	照膠儀
紫外燈	移液器	保冰桶
恆溫水浴器	廣口瓶	量筒
滴管	花盆	試管震盪器
4 ° C 冰箱	-20 ° C 冰箱	-70 ° C 冰箱

7. 耗材

電穿孔比色管	微量吸管尖	針筒
培養皿	根基旺:珍珠石 3:1 (菸草用)	有機土:珍珠石 4:1 (阿拉伯芥用)
DF column	tube	RNase free tube
Kanamycin 菌盤	在 LB 所製的菌盤加入 Kanamycin 抗生素	
Carbenicillin 菌盤	在 LB 所製的菌盤加入 Carbenicillin 抗生素	

(二) 研究架構圖



圖二 研究流程表

(三) 實驗步驟

1. SALK053644 突變株中的 T-DNA 對 *SAP5* 3'UTR 序列的影響

(1). 種植阿拉伯芥

- a. 取 30 顆種子放入 tube，加入二次水，放在旋轉試管混和器 3 小時，清洗種子。
- b. 將 tube 置於 4° C 的冰箱中，4 天後播種。
- c. 取三個花盆，倒入阿拉伯芥用土，並加水濕潤。
- d. 用移液器吸取種子，一盆種下十顆種子，分散盆中各處。
- e. 在花盆下放置底盤並倒入水，並用保鮮膜包覆植栽，避免水分散失。
- f. 放入 27° C 的生長箱中，光照 16 小時。
- g. 預計一周後發芽。
- h. 約 4-5 個月後可以收其種子。

(2). 粗萃取 DNA

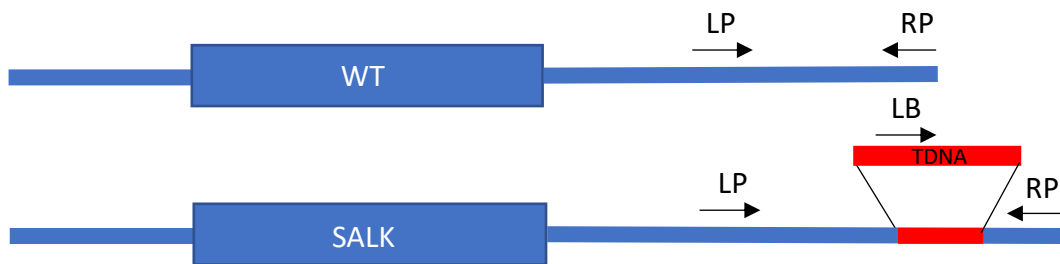
- a. 取 1 至 2 片幼葉放入 1.5ml 的試管中，將試管放入液態氮中搗碎葉子。
- b. 取出試管，加入 500ul 的 DNA 萃取 buffer，搖晃試管至液體呈稠狀。
- c. 在室溫下用 13000 轉離心 10 分鐘。
- d. 取 400ul 的上清液混和 400ul 的 cold isopropanol，混勻後放入 -70° C 的冰箱一小時。
- e. 在室溫下用 13000 轉離心 10 分鐘。
- f. 去除上清液，剩下的殘留物即為 DNA。
- g. 加入 500ul 的 70%EtOH 去除殘留的鹽類。
- h. 加入 20~40ul 的 TE buffer(PH8.0)來回溶 DNA。
- i. 在室溫下用 13000 轉離心 10 分鐘。
- j. 用微量分光光度計(nanodrop)測定濃度，其中吸光值 230 的鹽類濃度不可太高。

(3). 進行 PCR，用於基因型分析

a.設計 LB、LP、RP 三個引子，其中 LB 位在嵌入的基因上，LP 位在原本的 3'UTR 上，因此若有成功嵌入，有 LB 引子訊號代表嵌入成功，同時有 LB、LP 訊號則代表突變為單股嵌入。

表一 基因型分析引子設計

PRIMER	F	R
第一組	LB	RP
第二組	LP	RP



圖三 LP、BP、RP 引子設計示意圖

b.配置溶液做 PCR，每一個模板都做兩組引子(如表一)的 PCR。

表二 PCR 溶液配置表

模板(Template)	WT	SALK	控制組
模板加入的量	0.5ul	0.5ul	0ul
ddH2O	7.5ul	7.5ul	8ul
F primer	1ul	1ul	1ul
R primer	1ul	1ul	1ul
2X PCR Master Mix	10ul	10ul	10ul
Total	20ul	20ul	20ul

(4). 切 pJET 質體，並將有嵌入 SAP5 LB，轉殖到大腸桿菌中

a.取 SALK 突變的阿拉伯芥作為模板、引子為 LB、RP 所複製出的片段，命名為 SAP5 LB，將此片段接入質體中，定序以得到突變位置。

b.配置轉殖(ligation)的 PCR 溶液，做 35 個循環的 PCR。

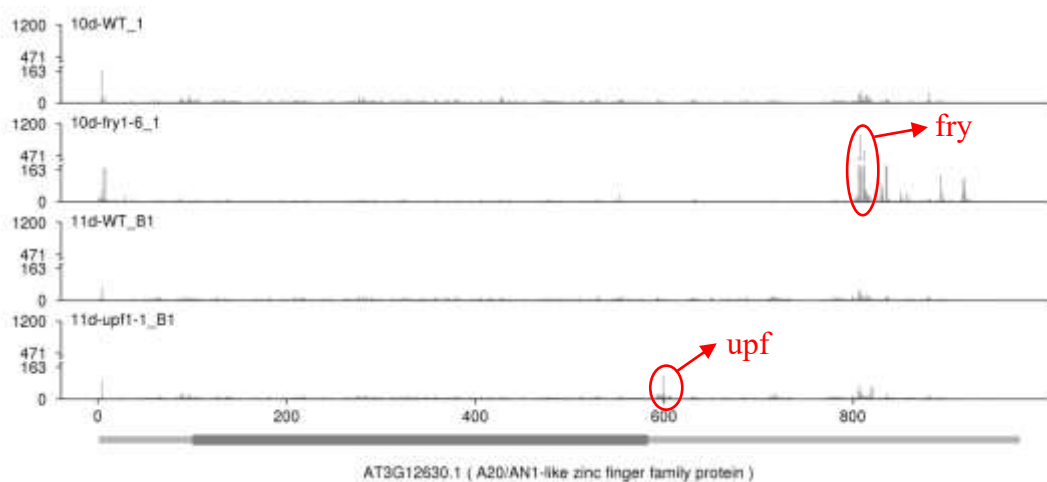
表三 轉殖溶液的配置表

溶液名稱	量
SAP5 LB	3ul
pJET	0.4ul
5X Phusion Green HF	4ul
ddH ₂ O	11.6ul
T4 DNA 噬菌體酵素	1ul
Total	20ul

c.轉殖步驟:

- (a)將上述溶液加入一管大腸桿菌中，並置於冰上 30 分鐘。
 - (b)放入 42 ° C 恆溫水浴槽 1 分鐘進行熱休克(heat shock)。
 - (c)置於冰上 5 分鐘。
 - (d)加入 600ul 的 LB，並在 37 ° C 中用 40rpm 轉 1 小時。
 - (e)用 3500rpm 離心 3 分鐘，移除上清液，僅留 20ul LB 於試管中。
 - (f)將大腸桿菌種到含 Carbenicillin 抗生素的菌盤上，置於 37 ° C 一晚。
 - (g)取一個菌落做 PCR，並跑膠確認是否將 SAP5 LB 接入質體中。
- (5). 送定序對比阿拉伯芥序列，找到突變發生位置

2. 探討 3'UTR 長度對 *SAP5* 表現量的影響



圖四 所取的 UTR 末端

(1) 切質體 pCAMBIA1390:35S-GFP-NOS

a. 配置切質體的溶液。

表四 切質體 pCAMBIA1390:35S-GFP-NOS 的溶液配置表

溶液名稱	量
pCAMBIA1390:35S-GFP-NOS (120ng/ul)	30ul
10X FastDigest Buffer	4ul
ddH ₂ O	4ul
BamHI 切位酵素	1ul
EcoRI 切位酵素	1ul

b. 置於 37 ° C 的恆溫浴水器中 1 小時。

(2) 做 PCR 以得到 GFP、SAP5 UTR 片段

a. 依下列表格配置 PCR 溶液，並進行 35 個循環的 PCR。

表五 PCR 的溶液配置表

溶液名稱	SAP5 UTR FULL	GFP
5X Phusion Green HF	10ul	6ul
10uM dNTP	1ul	0.6ul
Primer A	2.5ul(SAP5 UTR FULL F)	1.5ul(GFP F)
Primer B	2.5ul(SAP5 UTR FULL R)	1.5ul(GFP R)
Template	1ul(WT Arabidopsis)	0.6ul(p355-GFP-p1390)
ddH ₂ O	32.5ul	19.5ul
polymerase	0.5ul	0.3ul
總共	50ul	30ul

(3) 電泳確認大小正確後，回溶膠體取得 DNA

a. 製作 1%的膠體進行電泳，用 150V 跑 17 分鐘。

b. 將所要的 DNA 從膠體切下，放入 1.5ml 的 tube 中。

c. 加入 500ul 的 TPC buffer 並混勻。

d. 將 tube 放入 60 ° C 的恆溫浴水器中 10~15 分鐘，直到膠體全溶。

e. 取出放到常溫，將液體移置 DF column，用 12000rpm 離心 1 分鐘。

- f.取下方液體倒回 DF column，再用 12000rpm 離心 1 分鐘。
- g.移除下管中液體，加入 750ul TPW buffer 用 12000rpm 離心 1 分鐘。
- h.移除下管中液體，再用 12000rpm 空轉 3 分鐘，徹底去除 TPW buffer。
- i.換新的 tube 置於 DF column 下。
- j.在 DF column 中加入 40ul 的 TEB buffer，用 12000rpm 離心 3 分鐘，將 DNA 溶出來，下方液即為所求，並測量其濃度。

(4) 進行 Gibson Assembly

- a.計算所需量，溶液總體積為 2ul，莫耳數最佳比為 1 : 2.5 : 2.5，然而，移液器最小精確量只到 0.20ul，故調整最後加入的量。

表六 配置 Gibson Assembly 溶液

	pCAM Vector	GFP	SAP5 UTR
莫耳數比	1	2.5	2.5
濃度(ng/ul)	32.1	37.3	22.5
分子量(估計)	9700	717	394
應加入的量	1.53	0.24	0.23
最後加入量	1.6	0.2	0.2

- b.將上述溶液放入熱循環儀中，定溫 50° C，放置 5 分鐘。
- c.取出放至常溫，加入 2ul 的 2X HIFI Assemble，定溫 50° C，放置 1 小時。

- (5) 將質體轉殖到大腸桿菌中，並養在含有 Kanamycin 抗生素的菌盤上。
- (6) 挑選菌落後做 PCR，再做電泳確認質體轉殖成功。
- (7) 將大腸桿菌的菌液送定序，確認質體的序列正確，此質體即為全長 3'UTR 的 Full。
- (8) 設計引子做 PCR，以在質體上接 3 種長度的 3'UTR，其中 upf 的位置在 SAP5 3'UTR 的前段，故正股的引子設計在 GFP 上，才能複製到 upf 的 UTR。

表七 引子設計表

	Forward	Reverse
SALK	SAP5_FULL_F	TDNA_R
fry	SAP5_FULL_F	fry_R
upf	GFP F	upf_R

(9) 轉殖到大腸桿菌中，劃在含 Kanamycin 抗生素的菌盤中，在 37° 中放置一晚。

(10) 電泳確認是否轉殖成功，並將成功的菌落送定序。

(11) 將 SAP5 FULL、upf、fry、SALK 轉殖到農桿菌中

a.各取 1ul 分別加入 50ul 的農桿菌液中，並置於電穿孔比色管中。

b.在室溫靜置 10 分鐘。

c.用電穿孔儀以 25Uf、200 歐姆、2500V 電擊。

d.加入 400ul LB 在 28° C 中養一天。

e.隔日離心將菌劃在含 Kanamycin 抗生素的菌盤上，養在 37° C 中放置一晚。

(12) 種植菸草

a.取 15 顆菸草種子放入 tube 中並加入 ddH₂O，在旋轉試管混和器中旋轉 3 小時，以清洗種子。

b.取花盆種下種子，使用菸草用土壤並放到 28° C 的生長箱中，日照 8 小時。

c.一周後將菸草苗移植，一株生長於一個花盆之中。

(13) 將農桿菌打入菸草中，利用菸草短暫性表現，了解 3'UTR 對基因表現量的影響

a.從菌盤中取一排菌落沾入 5ml 的 LB 當中，至於 28° C 一天。

b.將菌在 4° C 用 5000rpm 離心 10 分鐘後，去除上清液。

c.配置感染液。

d.將 1ml 的感染液加入菌中。

e.測 OD 值後，配置打菸草所需的 OD 值。

f.將菌液置於黑暗中 2~3 小時。

g.用 1ml 的針筒將菌液打在第二對真葉的葉背。

h.在 4 天後照螢光，並分析其亮度。

表八 施打農桿菌進行菸草短暫性表現的概況表

*11/17 時加入兩組僅接 *GFP* 的質體作為對照組

施打日期	照螢光日期	感染液 OD 值	WT 片數	<i>rdr6</i> 片數
2020/10/12	10/19	0.4	7	0
2020/10/19	10/22	1.0	16	0
2020/10/26	10/30	1.0	8	6
2020/11/17	11/20	1.0	0	10

3. 探討 *SAP5* 3'UTR 調控基因表現量的機制

3.1 探討 *SAP5* 3' UTR 是否可以觸發 NMD 機制降解

(1) 設計新的 construct、primer

a. 去除質體上的 NOS 終結子(terminator)，避免影響到轉錄的停止點，將 *GFP*、*SAP5* 3'UTR 接入質體 pCAMBIA1390:35S-*GFP*-tHSP 中，希望能確認 *SAP5* 3'UTR 是否為 NMD 機制的的作用目標。

(2) 切質體 pCAMBIA1390:35S-*GFP*-tHSP，並測其濃度

a. 配置切質體溶液。

表九 切質體 pCAMBIA1390:35S-*GFP*- tHSP 溶液配置表

溶液名稱	量
pCAMBIA1390:35S- <i>GFP</i> -tHSP (120ng/ul)	30ul
10X FastDigest Buffer	4ul
ddH ₂ O	4ul
BamHI 切位酵素	1ul
SpeI 切位酵素	1ul

b. 置於 37 ° C 中 1 小時。

c. 濃度測出為 9.6。

(3) 做 PCR，進行 35 個循環

a. 將 *GFP* 與 *SAP5* 3'UTR 兩個片段 PCR，以取得足夠的基因片段接入切好的質體當中。

(4) 進行電泳以確認分子大小是否正確

(5) 回溶膠體取得 DNA，並測其濃度，以利連接到質體上

表十 各基因片段濃度

名稱	濃度(ng/ul)	名稱	濃度(ng/ul)
GFP Full	24.4	SAP5 Full	74.2

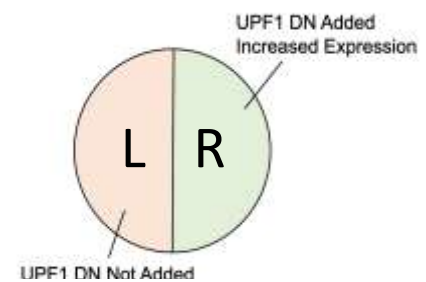
- (6) 進行 Gibson Assembly 連接，將基因片段接到質體上。
- 計算所需量，溶液總體積為 2ul，莫耳數最佳比為 1 : 2.5 : 2.5。
 - 將上述溶液放入熱循環儀中，定溫 50° C，放置 5 分鐘。
 - 取出放至常溫後，加入 2ul 的 2X HIFI Assemble，定溫 50° C，放置 1 小時。
- (7) 轉殖到大腸桿菌中，劃在含 Kanamycin 抗生素的菌盤中，在 37° 中放置一晚。
- (8) 跑 PCR 後電泳確認是否轉殖成功，並將成功的菌落送定序。
- (9) 將現有的 GFPabc 的質體轉入農桿菌 GV3101，以利感染菸草，也避免不同菌種之間的差異。
- (10) 將質體轉殖到農桿菌中
- 取 1ul 加入 50ul 的農桿菌液中，並置於電穿孔比色管中。
 - 在室溫靜置 10 分鐘。
 - 用電穿孔儀以 25Uf、200 歐姆、2500V 電擊。
 - 加入 400ul LB 在 28° C 中養一天。
 - 隔日離心將菌劃在含 Kanamycin 抗生素的菌盤上，養在 37° C 中放置一晚。
- (11) 種植菸草
- 取 15 顆菸草種子放入 tube 中並加入 ddH₂O，在旋轉試管混和器中旋轉 3 小時，以清洗種子。
 - 取花盆種下種子，使用菸草用土壤並放到 28° C 的生長箱中，日照 8 小時。
 - 一周後將菸草苗移植，一株生長於一個花盆之中。
- (12) 將農桿菌打入菸草中，利用菸草短暫性表現，了解 SAP5 3'UTR 是否受到 NMD 機制調控。

- a. 從菌盤中取一排菌落沾入 5ml 的 LB 當中，至於 28 ° C 一天。
- b. 將菌在 4 ° C 用 5000rpm 離心 10 分鐘後，去除上清液。
- c. 配置感染液。
- d. 將 1ml 的感染液加入菌中。
- e. 測 OD 值後，配置打菸草所需的 OD 值。
- f. 將菌液置於黑暗中 2~3 小時。
- g. 用 1ml 的針筒將菌液打在第二對真葉的葉背。
- h. 在 4 天後照螢光，並分析其亮度。

表十一 感染液配置表

(13)

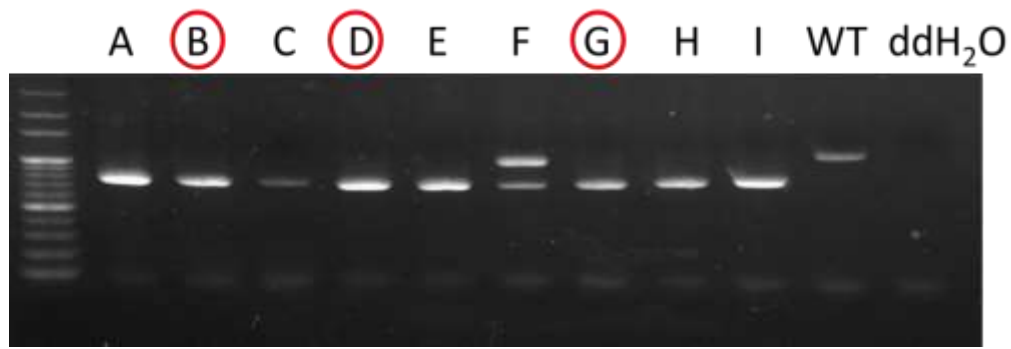
第一組	GFPabc +感染液	GFPabc +UPF1DN
第二組	GFP-SAP5 +感染液	GFP-SAP5 +UPF1DN
施打濃度皆為 0.2 O.D.		



圖五 施打的葉背位置示意圖
在後續的實驗中，加入空的質體 pBIN 作為對照組。

3.2 測試 T-DNA line 和 NMD 突變株多腺苷酸化位點變化

- (1) 種植 NMD 突變株，以測試多腺苷酸化位點的變化。
 - a. 取有培養基的培養皿，種植 WT、SALK053644、upf1-1、smg7-1 四種植物，smg7-1 為 hetero 的突變，為取得 homo 的子代，故種植 480 顆種子，其餘三種各種植 160 顆種子。
 - b. 種植在 22 ° C 的植物培養室中養 14 天。
 - c. WT、SALK、upf1-1 各取 6 株放在 2ml 的管中。
 - d. smg7-1 則取 9 管，每管放入 2 株，用 A~I 命名，並挑選出具有 homo 突變的子代。
 - e. 對 smg7-1 的植株做 genotyping，選出三管 homo 的去抽 RNA。
 - f. 根據電泳結果，將 B、D、G 三管拿去抽 smg7-1 的 RNA。



圖六 smg7-1 的 genotyping 電泳圖

(2) 抽 RNA。

- a. 磨碎植物組織。
- b. 加 500ul PureLink reagent，並在室溫下搖晃 5 分鐘混勻。
- c. 用 12000rpm 在室溫中離心 5 分鐘。
- d. 將上清液移入 RNase free tube。
- e. 加 0.1ml 5M NaCl，輕輕彈試管混勻液體。
- f. 加入 0.3ml chloroform，重複倒轉試管混勻。
- g. 用 12000 轉在 4° C 中離心 10 分鐘。
- h. 上層水層移入新管中。
- i. 加入等量的 isopropyl alcohol 混勻，並置於室溫 10 分鐘。
- j. 用 12000 轉在 4° C 中離心 10 分鐘。
- k. 去除上清液，加入 1ml 75% ethanol。
- l. 用 12000 轉離心在室溫中離心 1 分鐘。
- m. 去除上清液，簡單離心後吸乾。
- n. 加 10~30ul RNAase-free water 回溶，-70° C 中保存。

(3) 利用 reverse transcription 將 RNA 轉為 cDNA。

- a. 依下表配置溶液於 1.5ml 的 PCR 管中。

表十二 RT 溶液配置表 1

溶液名稱	量	溶液名稱	量
Ligated RNA (sample)	10ul	10X dNTP	1ul
ddH ₂ O	1ul	Primer R(with Oligo dT)	1ul

- b.將恆溫水浴器設定 65 ° C，把配置好的溶液放入其中 5 分鐘，以去除二級結構。
- c.置於冰上 1 分鐘，並簡單離心，以免溶液附於管壁上。
- d.依下表配置溶液，再放入定溫 65 ° C 中 30 至 60 分鐘，完成 RT。

表十三 RT 溶液配置表 2

溶液名稱	量	溶液名稱	量
RNA、primer Mixture	13ul	5X First stand buffer	4ul
0.1M DTT	1ul	RNase OUT™ (40U/ul)	1ul
SuperScript™ IV RT (200U/ul)			1ul

(4) 3'RACE PCR

- a.配置下列溶液，模板共四組，WT、SALK053644、upf1-1、smg7-1 加上一組控制組，共五組。

表十四 3'RACE PCR 溶液配置表

溶液名稱	量
5X Phusion Green HF	6ul
10uM dNTP	0.6ul
Primer A	1.5ul(SAP5 3'RACE F)
Primer B	1.5ul(3'RACE R)
Template	0.6ul
ddH ₂ O	19.5ul
polymerase	0.3ul
總共 km	30ul

- b.做 30 個循環的 PCR。

(5) 進行電泳

- a.製作 2.5%的膠體，用 150V 跑 20 分鐘。
- b.照膠紀錄結果。
- c.切下 SAP5 3'UTR 經由 3'RACE 跑出來的片段。

(6) 回溶膠體

- a.切下的膠體分別放入 1.5ml 的 tube 中。
- b.加入 500ul 的 TPC buffer 並混勻。
- c.將 tube 放入 60° C 的恆溫浴水器中 10~15 分鐘，直到膠體全溶。
- d.取出放到常溫，將液體移置 DF column，用 12000rpm 離心 1 分鐘。
- e.取下方液體倒回 DF column，再用 12000rpm 離心 1 分鐘。
- f.移除下管中液體，加入 750ul TPW buffer 用 12000rpm 離心 1 分鐘。
- g.移除下管中液體，再用 12000rpm 空轉 3 分鐘，徹底去除 TPW buffer。
- h.換新的 tube 置於 DF column 下。
- i.在 DF column 中加入 40ul 的 TEB buffer，用 12000rpm 離心 3 分鐘，將 DNA 溶出來，下方液即為所求，並測量其濃度。

(7) 將 DNA 片段接入 pJET 中，再轉入大腸桿菌中，並進行定序。

- a.所測得濃度為 8.6。
- b.配置轉殖(ligation)的溶液，放在 22° C 中 30 分鐘。

表十五 轉殖溶液的配置表

材料	量
SALK 3'RACE	3ul
pJET	0.4ul
5X Phusion Green HF	4ul
ddH2O	11.6ul
T4 DNA 噬菌體酵素	1ul
Total	20ul

c.轉殖步驟:

- (a)將上述溶液加入一管大腸桿菌中，並置於冰上 30 分鐘。
- (b)放入 42 ° C 恆溫水浴槽 1 分鐘進行熱休克(heat shock)。
- (c)置於冰上 5 分鐘。
- (d)加入 600ul 的 LB，並在 37 ° C 中用 40rpm 轉 1 小時。
- (e)用 3500rpm 離心 3 分鐘，移除上清液，僅留 20ul LB 於試管中。
- (f)將大腸桿菌種到含 Carbenicillin 抗生素的菌盤上，置於 37 ° C 一晚。
- (g)取一個菌落做 PCR，並跑膠確認是否將 SALK 3'RACE 接入質體中。

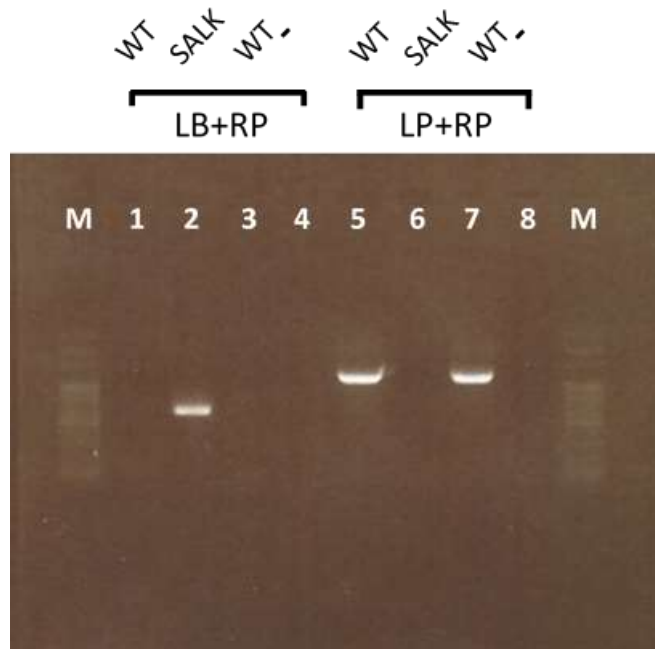
d.送定序以得到多腺苷酸化位點。

參、研究結果與討論

(一) 研究結果

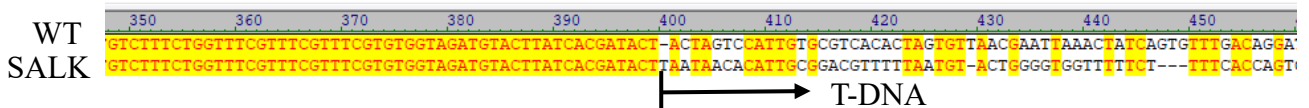
1. SALK053644 突變株中的 T-DNA 對 *SAP5* 3'UTR 序列的影響

(1) 透過 LP、BP、RP 的 PRIMER 設計，由電泳結果可以得知，因為 LB 引子設計在插入的 TDNA 上，LB+RP 組合的引子只有突變阿拉伯芥的組別有訊號，LP+RP 組合的引子則是野生型阿拉伯芥有訊號，突變阿拉伯芥的 LP+RP 因為相距太遠而沒有訊號，可以確認此 TDNA 突變是純合子突變，否則突變阿拉伯芥的組別會有兩組引子的訊號。

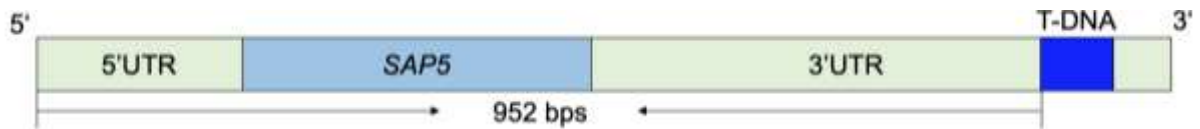


圖七 確認突變形式的電泳圖

(2) 在定序後，比對原本的 3'UTR，可以得知 SALK053644 突變發生在 *SAP5* 基因第 952 個鹼基對後，與預期結果相符，但位在較尾端的位置通常對基因的影響較小。



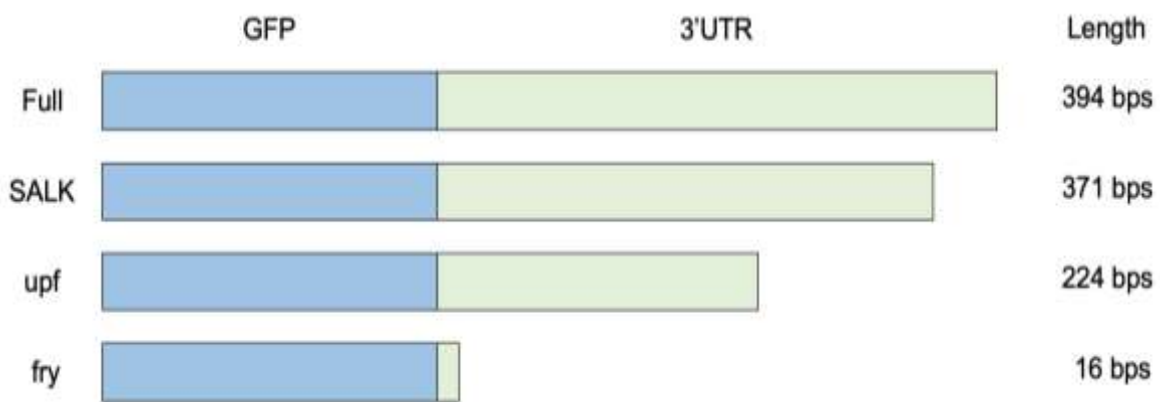
圖八 序列比對



圖九：T-DNA 嵌入於 SAP5 基因 3'UTR 的位置。SAP5 mRNA 全長是 976 個鹼基對，而 T-DNA 嵌入在第 952 個鹼基對之後。

2. 探討 3'UTR 長度對 SAP5 表現量的影響

(1) 四種不同長度的 3'UTR，Full 對應到的是 3'UTR 全長，SALK 則是移除 T-DNA 後方的序列，upf、fry 則是兩個較短 3'UTR 的組別。

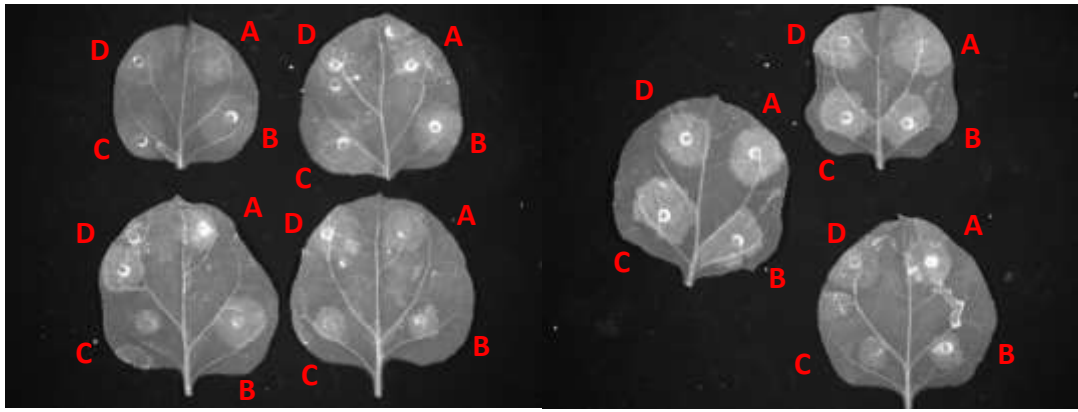


圖十 不同 3'UTR 長度的示意圖

(2) 以 0.4OD 施打帶有不同 3'UTR 的農桿菌在 WT 菸草上，觀察螢光表現量差異。

a. 施打組別: A-SALK B-fry C-Full D-upf

b. 這 7 片是以 0.4OD 的菌液打在 WT 煙草葉片上，從圖中可以看到 Full、SALK、upf、fry 四組的亮度差異不大，且圖中一個個圓圈是用針筒打感染液時使葉子有傷損，這樣的圓圈亮度會特別高，在統計亮度時會造成很大的影響，故這一組數據未被採用，但我也藉此調整 OD 值到 1.0，希望能使亮度的差異變大。



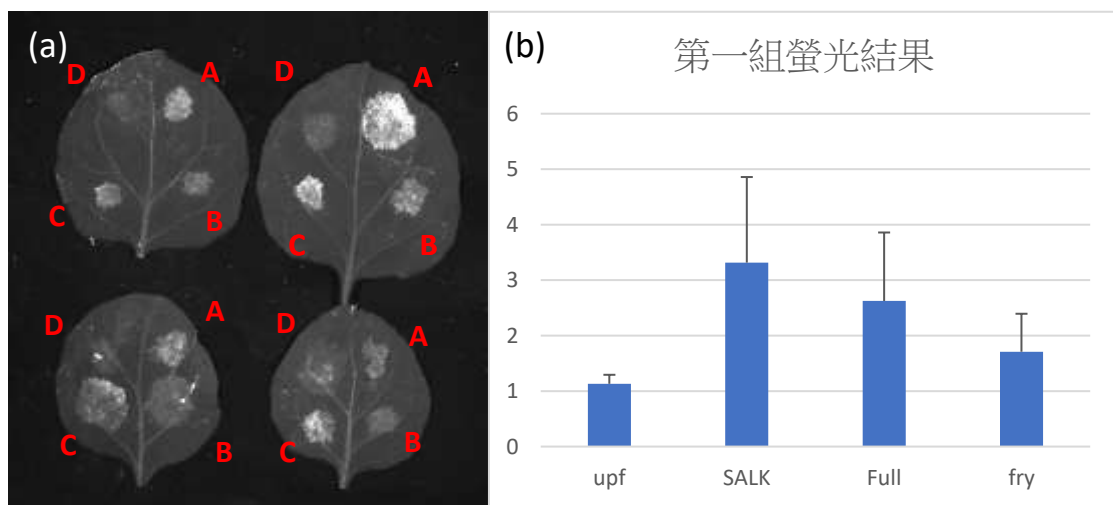
圖十一 0.4OD 打在 WT 菸草上的拍攝結果

(3) 以 1.0OD 施打帶有不同 3'UTR 的農桿菌在 WT 菸草上，觀察螢光表現量差異。

a. 施打組別: A-SALK、B-fry、C-Full、D-upf

b. 此次施打 1.0OD 在 WT 煙草上，從圖中可以觀察到右上角的 SALK 與左上角的 Full 比較亮，由於 TDNA 突變應該造成表現量上升，故 SALK 的亮度應比 Full 還要高，然而，從下列對於亮度的比較可以看出，第二組數據的 Full 比 SALK 還要亮，不僅如此，每一組數字的差距並不大，在統計上也沒有顯著差異，故在下次改用 *rdr6* 的突變菸草，希望能放大亮度的差距，並確認實驗結果，以確認 Full 與 SALK 的亮度關係是否與預期不同。

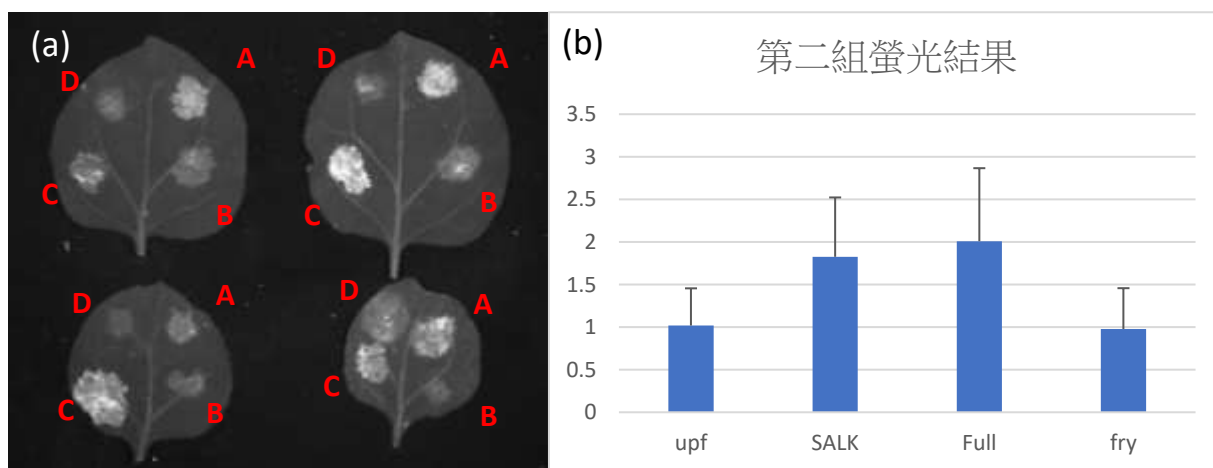
c. 數據為亮度的比值，透過螢光儀及相關程式，能對比同一張圖上的螢光比例，故每張照片的數據分別統計。



圖十二 1.0OD 打在 WT 菸草上的第一組螢光結果

(a) 植物拍攝結果 (b) 螢光結果柱狀圖

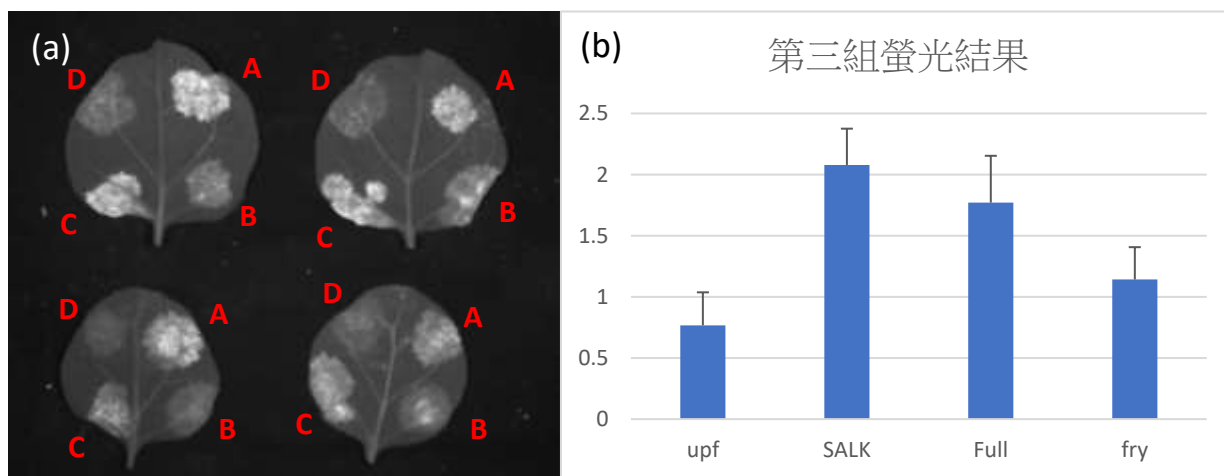
*相比 Full 的 p value 為 upf:0.053、SALK:0.510、fry:0.242



圖十三 1.0OD 打在 WT 菸草上的第二組螢光結果

(a)植物拍攝結果 (b)螢光結果柱狀圖

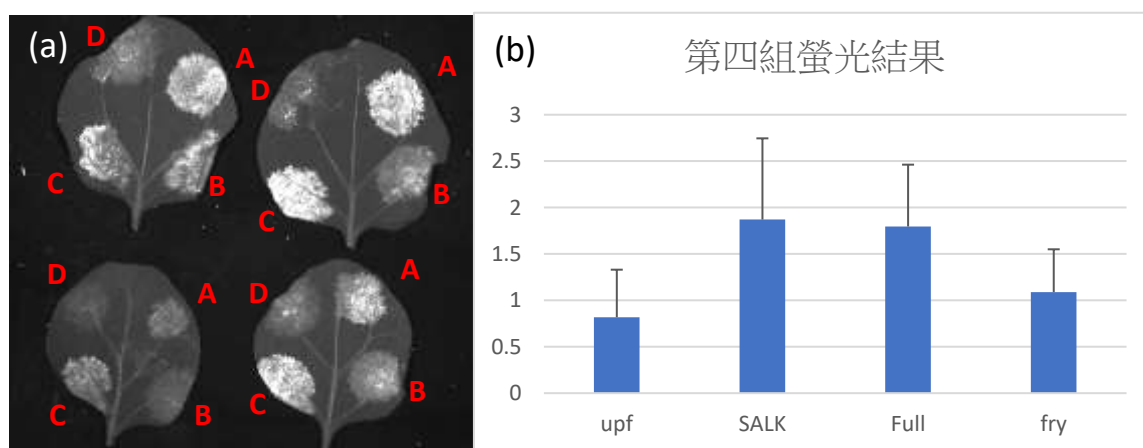
*相比 Full 的 p value 為 upf:0.085、SALK:0.752、fry:0.081



圖十四 1.0OD 打在 WT 菸草上的第三組螢光結果。

(a)植物拍攝結果 (b)螢光結果柱狀圖

*相比 Full 的 p value 為 upf:0.005、SALK:0.250、fry:0.036



圖十五 1.0OD 打在 WT 菸草上的第四組螢光結果

(a)植物拍攝結果 (b)螢光結果柱狀圖

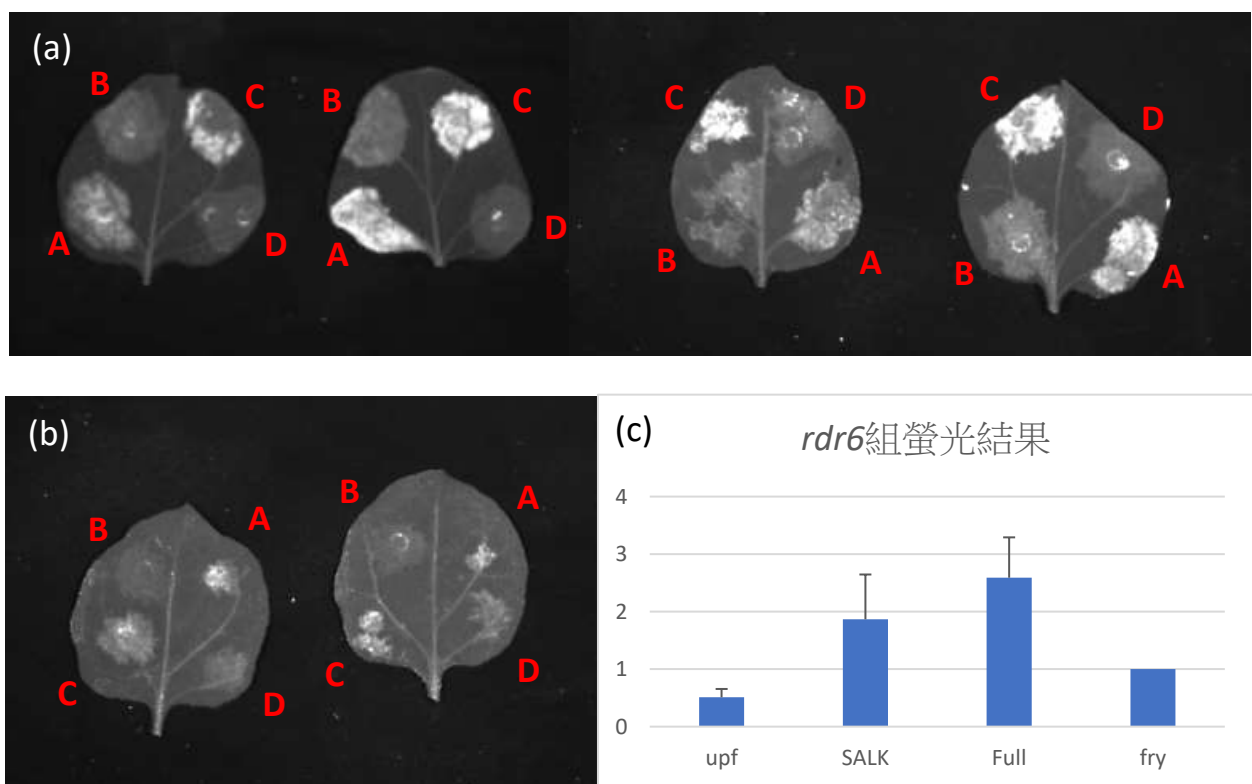
*相比 Full 的 p value 為 upf:0.059、SALK:0.896、fry:0.132

(4) 以 1.0OD 施打帶有不同 3'UTR 的農桿菌在 WT、*rdr6* 菸草上，觀察螢光表現量差異，並比較兩種菸草的螢光效果。

a.施打組別: A-SALK、B-fry、C-Full、D-upf

b.此次用 1.0OD 施打在 WR、*rdr6* 兩種菸草上，可以觀察到 *rdr6* 菸草的亮度差異較明顯，因此後續實驗採用 *rdr6* 菸草，雖然整體的螢光亮度還是偏低，但這兩次實驗的 SALK 相比於 Full 的對照組並沒有造成表現量上升，為了更精確的了解表現量的差異，故在後續施打時加入僅接 *GFP* 的質體作為對照組，以確認實驗結果的正確性。

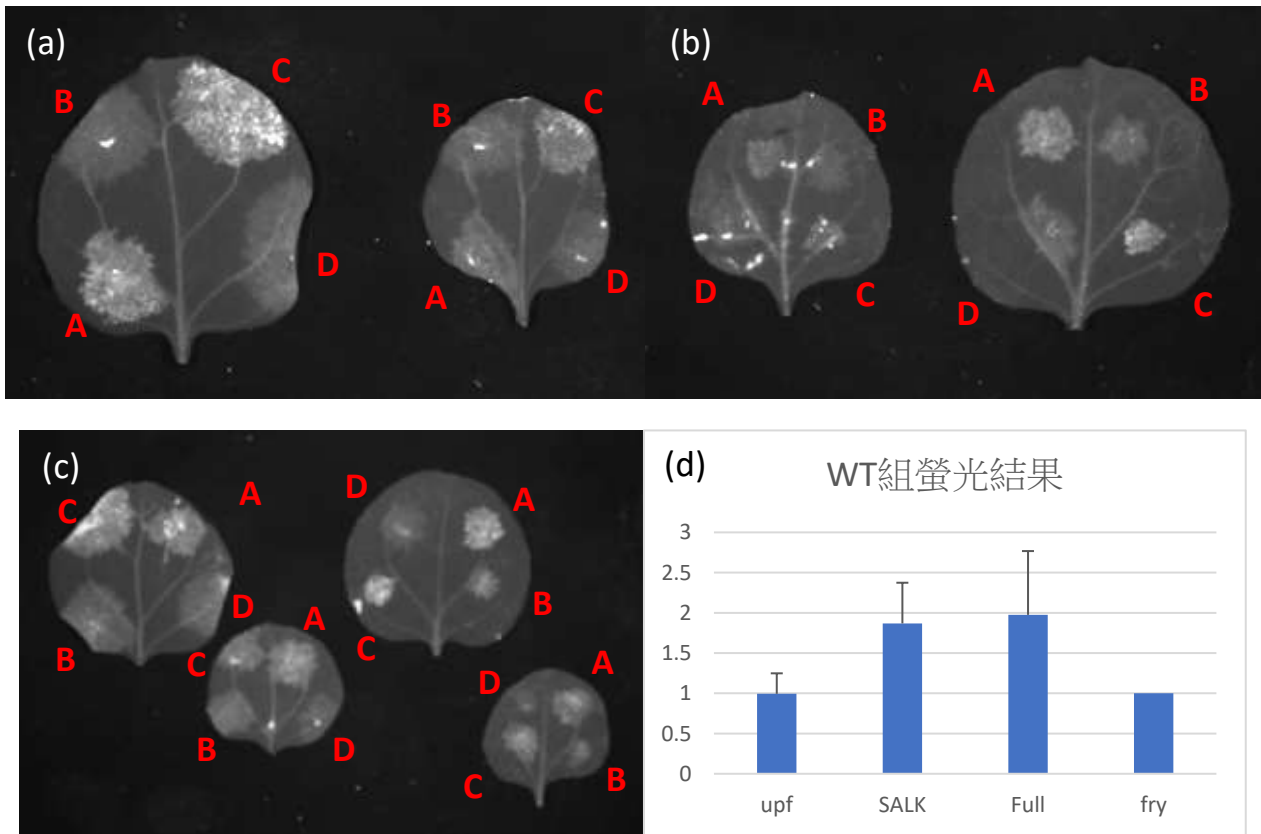
c.亮度統計圖為其餘組別對比 fry 的比值，故 fry 沒有標準差。



圖十六 1.0OD 打在 *rdr6* 菸草上的螢光結果

(a)(b)植物拍攝結果 (c)螢光結果柱狀圖

*相比 Full 的 p value 為 upf:0.000、SALK:0.161、fry:0.001



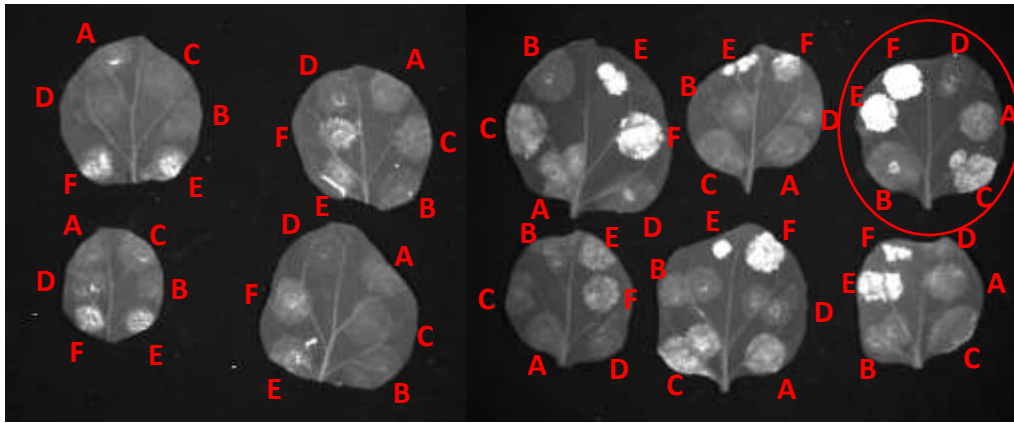
圖十七 1.00D 打在 WT 菸草上的第螢光結果
 (a)(b)(c)植物拍攝結果 (d)螢光結果柱狀圖
 *相比 Full 的 p value 為 upf:0.005、SALK:0.754、fry:0.004

(5) 以 1.00D 施打帶有不同 3'UTR 的農桿菌在 *rdr6* 菸草上，觀察螢光表現量差異

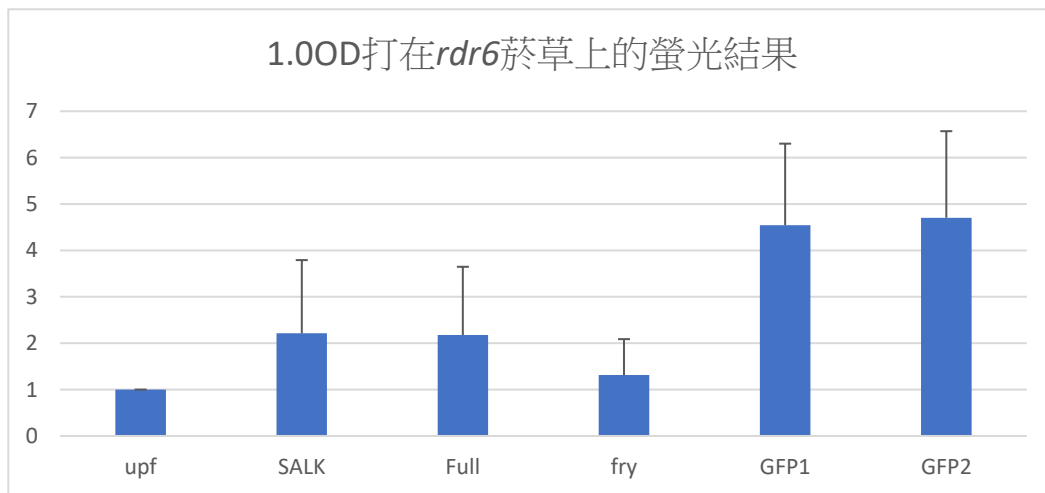
a. 施打組別: A-SALK、B-fry、C-Full、D-upf、E-GFP1、F-GFP2

b. 此次施打的全都是 *rdr6* 的煙草，由於前三次的亮度都不是很高，故加入僅接上 *GFP* 的質體做為對比，其中第九片葉子(如圖十四所示)的 *GFP* 太亮導致統計結果失去意義，鑒於 *GFP* 僅是作為對照，故拿掉這一組數據做統計，實驗結果顯示 SALK 雖然稍亮一點點，仍無法造成顯著差異。

c. 此結果與原本預期的實驗結果有所差異，可能因為質體上 NOS terminator 造成多腺苷酸化位點無法出現在預期的位置，除此之外，由後續 3'RACE 的結果得知 SALK 突變株會多出一個在 T-DNA 上的多腺苷酸化位點，故在此實驗中並不能產生這樣的 mRNA，導致此實驗的結果僅能當作參考，不過這樣的結果也讓我聯想到 NMD 機制可能是 *SAP5* 基因調控的方式，才有後續有關 NMD 機制的研究。



圖十八 1.0OD 打在 *rdr6* 菸草上的植物拍攝結果

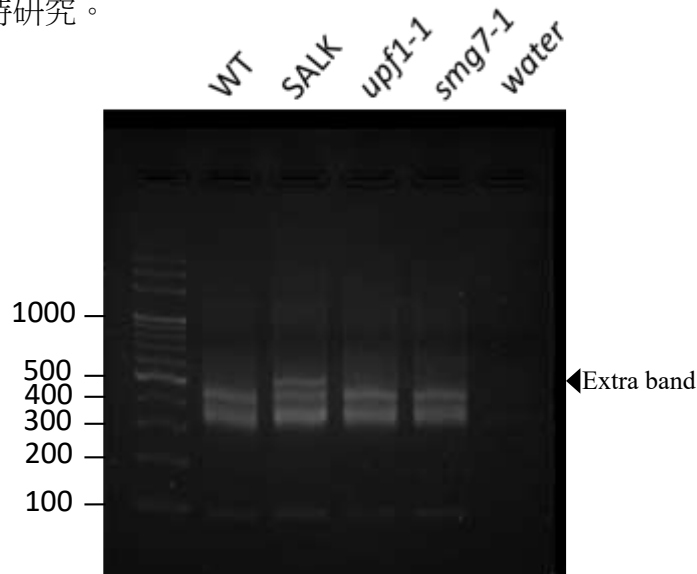


圖十九 1.0OD 打在 *rdr6* 菸草上的螢光結果柱狀圖
*相比 Full 的 p value 為 upf:0.029、SALK:0.961、
fry:0.138、GFP1:0.007、GFP2:0.006

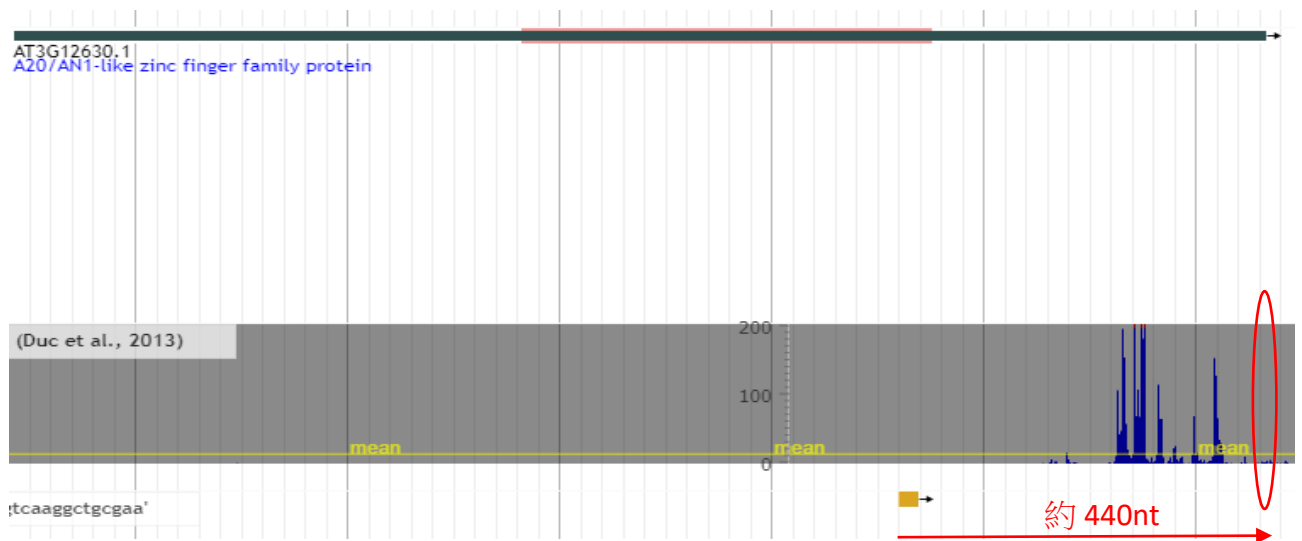
3. 探討 *SAP5* 3'UTR 調控基因表現量的機制

- (1). 為了解 *SAP5* 3'UTR 調控表現量的機制，我分為兩個部分探討，第一個部分是探討 SALK053644 的 T-DNA 是否造成多腺苷酸化位點的改變，故利用 3'RACE 去比較多腺苷酸化位點的差別，第二個部分則探討 *SAP5* 3'UTR 是否受到 NMD 機制的調控，我從這些結果中找出基因調控的機制可能為何，再做進一步的探討。
- (2). 將 WT、SALK053644、*upf1-1*、*smg7-1* 做 3'RACE 後得到多腺苷酸化位點，可以見到圖十七中四種阿拉伯芥都在兩個相同位置有訊號，代表兩個的多腺苷酸化位點存在於這些植株中。不同的是，在 SALK 突變株上有一個約 500nt 的產物，扣除引子後為 440nt 的一段序列，由此結果可以得知在 SALK053644 的 3'UTR 末端有一個新的多腺苷酸化

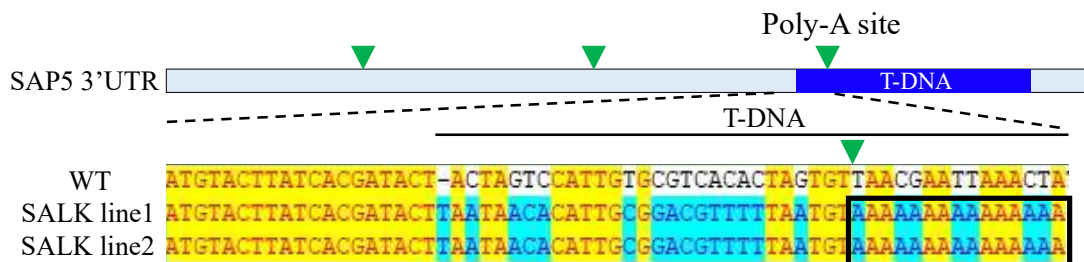
位點，經過定序比對後，確認多腺苷酸化位點在 T-DNA 上，此種 mRNA 可能是造成 SALK053644 中 *SAP5* 基因表現量上升的原因，但它為何能避免 NMD 機制降解長 3 端非轉譯序列仍有待研究。



圖二十 NMD 突變株 3'RACE 結果

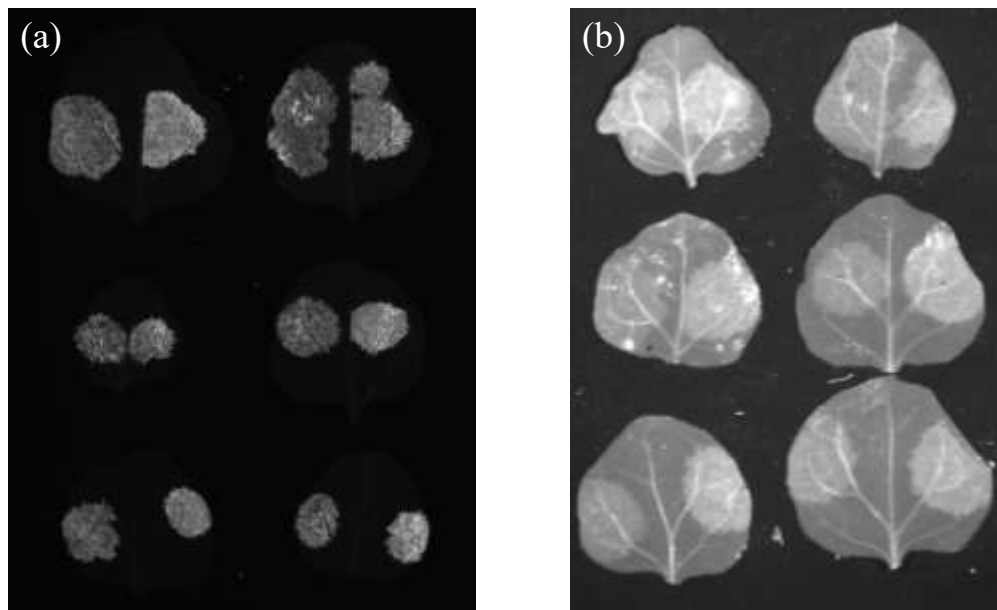


圖二十一 *SAP5* 基因在 WT 中的多腺苷酸化位點統計圖



圖二十二 SALK 多腺苷酸化位點定序結果

(3)利用 UPF1DN 的競爭型抑制 UPF 結合位，讓 NMD 機制無法降解 3 端非轉譯序列，藉此探討 NMD 對 *SAP5* 3'UTR 的影響，而 GFPabc 為一種已知的 NMD 標的，其長 3'UTR 的特性會被 NMD 機制給降解，故用來做對照組，確定 NMD 機制是否作用，從圖二十中可以觀察到利用 UPF1DN 抑制 NMD 機制，能使接上 *SAP5* 3'UTR 的 *GFP* 表現量上升，證實 *SAP5* 3'UTR 受到 NMD 機制的調控。



圖二十三 NMD 機制對表現量的影響

(a)GFPabc 對照組 (b)GFP-SAP5

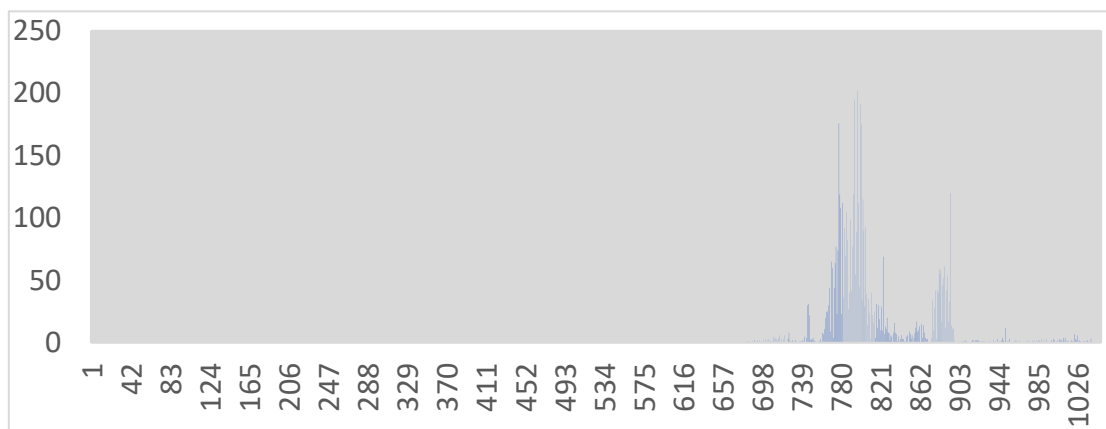
*每片葉子左側是沒有加入 UPF1DN 的，右側則加入 UPD1DN

(二) 討論

1.在探討 *SAP5* 3'UTR 長度對表現量的影響時，一開始的假設是 T-DNA 破壞了 *SAP5* 3'UTR 上的序列，導致後方的序列失去調控的效果，所以在設計質體時並未接入 T-DNA 的序列，而是取 T-DNA 插入的位置進行長度的研究，然而，在進行完有關多腺苷酸化位點的實驗後，我發現 SALK 出現新的一個多腺苷酸化位點，且位在 T-DNA 上，因此原本的實驗沒有辦法代表 SALK 突變株真實的基因表現量，有關 3'UTR 的長度的結果也就無法被證實，未來有機會可以將整段 3'UTR 接入質體中進行比較，所做出來的實驗結果才能確定 3'UTR 長度與 *SAP5* 表現量的關係。

2.由圖二十中可以看到野生型的阿拉伯芥中 *SAP5* 基因的多腺苷酸化位點分布，*SAP5* 基因的 3'UTR 是從第 582 個鹼基對開始算起，其中在大約第 800 個鹼基對有一個峰值，在 890 個鹼基對左右也有一個峰值，這兩個峰值與 3'RACE 較小的兩條訊號相符，然而，其比例是否

在 NMD 突變株中有所差異，還需再做進一步的實驗才能驗證，倘若能完成這項實驗，對於 NMD 機制如何作用於 3'UTR 將有更進一步的了解，找到下列哪個模型較為貼近實際的基因調控情形。

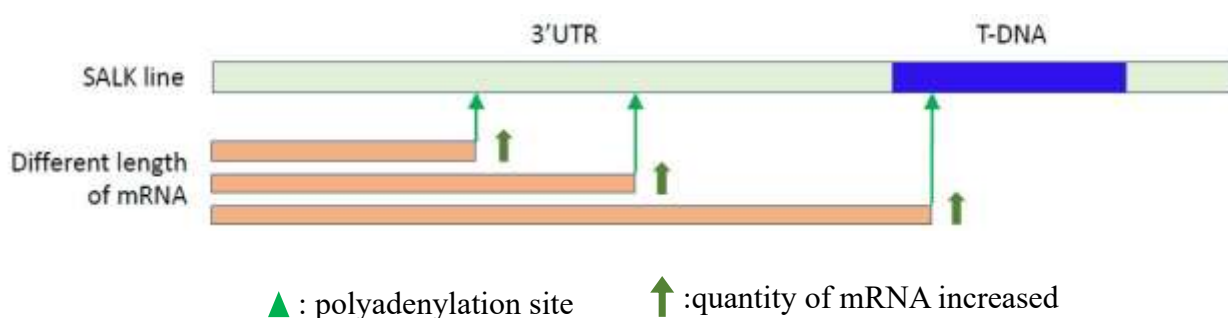


圖二十四 野生型阿拉伯芥的多腺苷酸化位點分布圖。

圖中橫軸為多腺苷酸化位點位於 *SAP5* 基因的序列位置，縱軸為累計數量。

3. 根據結果所提出 T-DNA 使表現量上升的三種模型

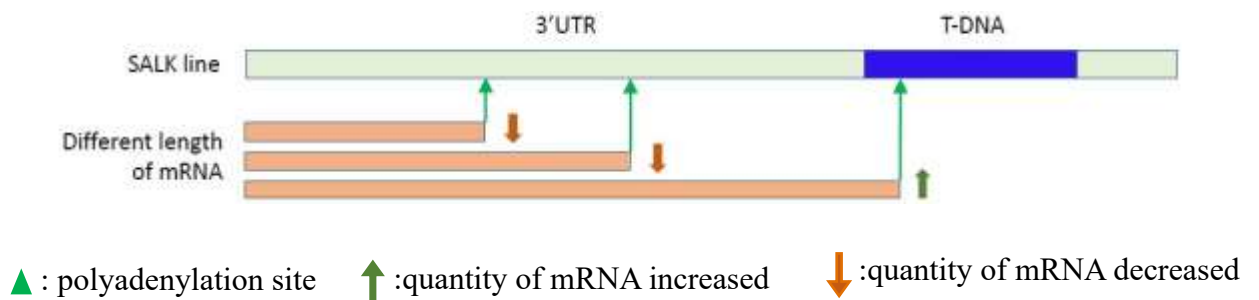
(1) 此模型認為 T-DNA 增強了 *SAP5* 基因的轉錄，故三種不同的 mRNA 的表現量都會增加，若多腺苷酸化位點的比例並未變化，而是 T-DNA 使所有 mRNA 的量都上升了，此模型就有可能是 *SAP5* 3'UTR 的調控方式，但對於 T-DNA 為何能增強轉錄、NMD 機制未能降解較長的 mRNA 仍需再進行研究才可得知。



圖二十五 模型一示意圖

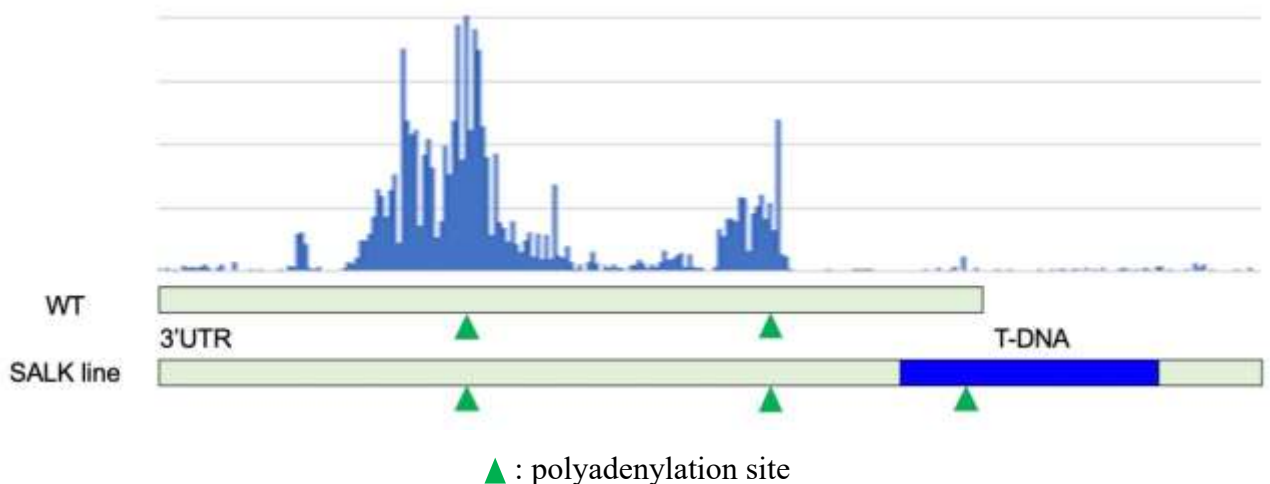
(2) 這個模型認為各多腺苷酸化位點被使用的比率改變了，多了較長的這一種 mRNA，*SAP5* 基因在 SALK053644 中也許是透過這樣的方式提高表現量，如果 SALK053644 較短的兩個 mRNA 的比例因此下降，便能從多腺苷酸化位點比例改變的實驗中得知，然而，倘若

此突變讓 NMD 機制無法啟動進而使較長的 mRNA 能被留下來，為何在 NMD 突變株中不能看見這樣的情形則是仍需進一步研究之處。

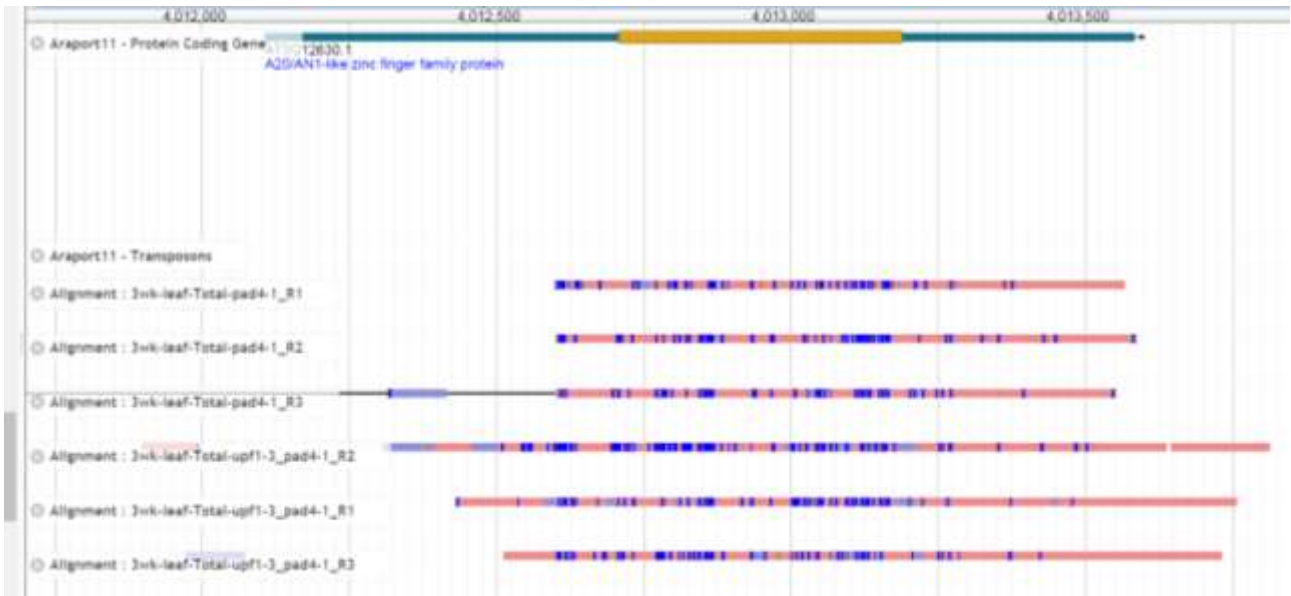


圖二十六 模型二示意圖

(3)第三種模型的想法與前述兩個比較不一樣，認為在野生型的多腺苷酸化位點後的這些多腺苷酸化位點，可能才是 NMD 所辨識的標的，在其他研究中，有像是這樣的例子，比常見的多腺苷酸化位點更長的 mRNA 成為 NMD 機制的的作用對象，而 T-DNA 破壞了這樣的特性，造成這些位點形成了 SALK053644 中出現了第三個多腺苷酸化位點，在 NMD 突變株 UPF1 中，SAP5 基因就存在著較長的 mRNA，因此，這個模型會是調控 3'UTR 機制的機會較高，若上述兩種模型都不符合結果，可能就要透過定序後面的多腺苷酸化位點，找出 NMD 的標的究竟為何。



圖二十七 模型三示意圖



圖二十八 NMD 突變株中存在一些長 3'UTR

4.在未來，我希望能先完成多腺苷酸化位點在 NMD 突變株中是否有改變的實驗，透過減少 3'RACE 後 PCR 的循環數，降低電泳跑出來的訊號亮度，就可以透過儀器得到兩者亮度是否有改變，再從所得到的結果中，就可以得知哪個模型為真正運作機制的機率最大。接著依據所得到的結果，用不同的方式去研究 NMD 實際的作用機制，以模型三為例，透過定序那些較長的 mRNA 可以觀察 NMD 機制的作用，也許能在 3'UTR 上找到與 NMD 機制相關的一些序列，藉此去探討 T-DNA 對於 NMD 機制的調控究竟有什麼樣的影響。最終我希望能建立 NMD 作用在 SAP5 3'UTR 的模型，並能在未來應用在其他地方。

肆、結論與應用

(一)結論

- 1.SALK053644 中的 T-DNA 位在 *SAP5* 基因中第 952 個鹼基對後。
- 2.*SAP5* 基因的 3'UTR 是 NMD 機制的標的。
- 3.在 SALK053644 中存在三個多腺苷酸化位點，比起 WT 中所存在的兩個多腺苷酸化位點，多了一個位在 T-DNA 上的多腺苷酸化位點。
- 4.依據實驗結果，我提出了三個可能的模型，分別是
 - (1)T-DNA 造成 *SAP5* 轉錄量上升。
 - (2)T-DNA 改變多腺苷酸化位點的使用。
 - (3)T-DNA 破壞 *SAP5* 3'UTR 後方的 NMD 特徵。

(二)應用

若能找出 NMD 調控 3'UTR 的標的或是作用機制，便能應用在其他使用到 NMD 機制的 3'UTR 中，可以藉由人工插入 T-DNA 調控基因的表現，如本研究的 *SAP5* 基因，若能增加其表現量，不但可以增加植物對逆境的抗性，也有助於對抗病毒，對於植物的生存將有所幫助，在氣候變遷的影響下，利用這樣的關係也許能增加植物存活的機率。

除此之外，NMD 機制常出現在各種生物中，了解其機制更有助於在各生物中的研究與應用，在不同植物中的 NMD 機制可能有相同之處，透過在不同植物中尋找 NMD 在 3'UTR 調控方式的共同之處，就有可能找到 NMD 的關鍵，人體中也有許多基因由 NMD 機制進行調控，甚至能導致一些疾病的發生，如果能完整了解 NMD 機制的一切，對於許多方面都能有極大的助益。

伍、參考文獻

1. Sustainable Development Goal 2, Zero Hunger: <https://sustainabledevelopment.un.org/sdg2>
2. Kang, M., Fokar, M., Abdelmageed, H., & Allen, R. D. (2011). Arabidopsis SAP5 functions as a positive regulator of stress responses and exhibits E3 ubiquitin ligase activity. *Plant molecular biology*, 75(4-5), 451–466.
3. Jeong, H. J., Kim, Y. J., Kim, S. H., Kim, Y. H., Lee, I. J., Kim, Y. K., & Shin, J. S. (2011). Nonsense-mediated mRNA decay factors, UPF1 and UPF3, contribute to plant defense. *Plant & cell physiology*, 52(12), 2147–2156.
4. Park, Y., Park, J., Hwang, H. J., Kim, B., Jeong, K., Chang, J., Lee, J. B., & Kim, Y. K. (2020). Nonsense-mediated mRNA decay factor UPF1 promotes aggresome formation. *Nature communications*, 11(1), 3106.
5. Joseph Ecker (2013). Germplasm: SALK_053644. Retrieved Jan 10, 2022, from TAIR on-line database
6. O'Malley, R. C., Barragan, C. C., & Ecker, J. R. (2015). A user's guide to the Arabidopsis T-DNA insertion mutant collections. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1284, 323–342.

【評語】 060001

1. 英文流利，presentation 很好，表達甚優。
2. 結論不夠明確。
3. 實驗數據偏差太大，很難下結論。
4. 對研究內容有深入了解，但部分實驗步驟，有待加強。