

# 2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060010

參展科別 植物學

作品名稱 地錢熱逆境記憶元件 HSA32 及 HSP101 之  
功能探討

得獎獎項 大會獎：四等獎

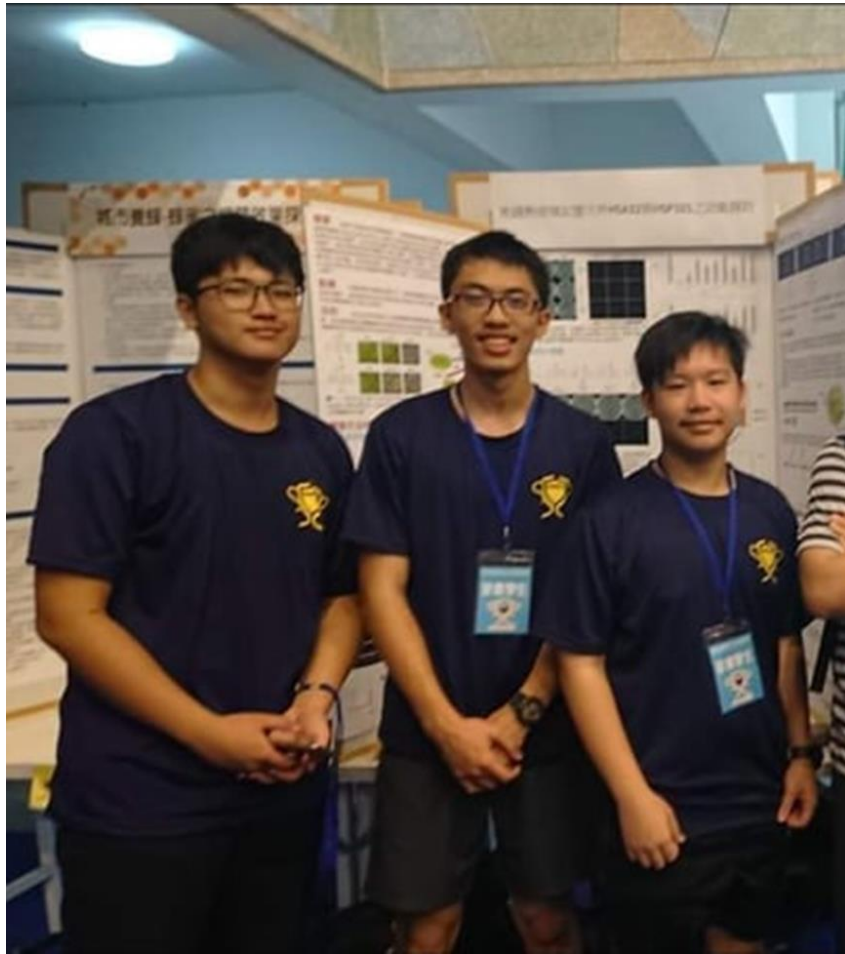
就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學

指導教師 羅尹廷

作者姓名 蘇韋丞、林泊里、陳允平

關鍵詞 地錢、耐熱、熱逆境

## 作者簡介



大家好，我是林泊里，我從國小開始就對生物感到濃厚的興趣，而我的父母也很支持我，時常鼓勵我接觸我的興趣，閱讀相關書籍。童年的經驗使我期待能在高中後有真正實作的經驗，成功加入科博館青年培訓計畫，經過學長姐和指導教授的督促及督導，真的進步良多，希望能在國際科展中過關斬將，展現實力。

我是陳允平，早在國中時就跟著導師和同學做過科展的研究，其中在不斷實驗探討答案的過程中我學到了許多，這也讓我升高中時希望能再繼續做研究，很慶幸後來加入了青年培訓計畫，使我們擁有了最頂尖的資源，用著最先進的技術探索更深入的答案，讓我進一步了解實驗的精神和態度，希望往後的國際科展能展現實力，讓大家了解地錢熱記憶的秘密。

## 摘要

為減少高溫造成的農業損失，了解植物耐熱機制成為重要的研究課題。其中植物熱逆境記憶受兩個熱誘導蛋白 HSA32 和 HSP101 之調控已在阿拉伯芥與水稻中被揭露，HSP101 除了幫助蛋白質摺疊外，也可促進 HSA32 的累積，HSA32 則延緩 HSP101 降解的速度而延長植物的熱逆境記憶。本研究以低等植物地錢作為為模式，探討植物熱逆境記憶機制之演化過程。生理實驗結果顯示地錢同樣具有熱逆境記憶現象；氨基酸序列的親緣樹表明高等植物與低等植物的 HSA32 明顯分成兩群，呼應先前互補實驗的結果，指出這兩群 HSA32 結構功能上的差異；如同高等植物，地錢 *HSA32* 和 *HSP101* 的表現均受熱誘導而活化。然而，初步結果顯示，不同於高等植物，地錢 *hsa32* 剔除突變株有更強的熱逆境記憶，顯示地錢 HSA32 的功能可能是抑制地錢的熱逆境記憶，未來需要進一步驗證。

## 壹、研究動機

在作物無法移動的前提之下，作物將會遭受許多逆境，包括寒冷、炎熱、鹽害、乾旱等，對植物的生長及繁殖造成影響(Satake and Yoshida, 1978)，近年來的地球暖化使得平均溫度快速上升，溫度的巨變很有可能導致農作物的產量下降，因此，了解植物耐熱的機制成為重要的研究課題。

熱逆境的定義為在一段時間內植物遭受到高於最佳生長條件的溫度 10 - 15°C 而使植物遭受不可回復的傷害(Wahid *et al.*, 2007)。在熱逆境下，植物會快速啟動熱休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)及抗氧化酵素(antioxidant enzymes)表現，此過程稱為熱休克反應(heat shock response, HSR) (Qu *et al.*,2013)。

在自然環境中，熱逆境會以各種形式呈現，熱逆境可能會持續很長的一段時間，或者在數天內循環，為了防止循環高溫傷害，植物需要在一段時間內維持對熱的耐性。熱逆境記憶為近年來新的研究主題，在高等植物中，如阿拉伯芥，若先施以非致命的高溫，則可在之後來臨的原先致命的高溫中存活；非致命的高溫我們稱之為熱馴化，熱馴化就像是一種訓練或經驗學習，使植物獲得更強且持久的耐熱能力。如同動物的學習行為，記憶作用同樣對植物的學習行為扮演重要的功能，藉由研究熱馴化所產生的後天耐熱性(acquired thermotolerance)

現象，熱逆境記憶的分子機制逐漸被揭露。目前已知植物熱逆境記憶的分子調控機制發生在許多層次，例如：組蛋白修飾、miRNA 的作用與蛋白質之間的交互作用等(Bäurle, 2016)。植物的熱逆境記憶是靠著這些基因及其進行調控，使得植物能在重複發生熱逆境的環境下存活。其中 HSP101 與 HSA32 為參與此機制調控的蛋白質。

先前研究使用剔除(knockout, KO) *HSA32* 的阿拉伯芥突變株(*hsa32-1*)進行熱處理，在正常生長環境下，*hsa32-1* 與野生型阿拉伯芥沒有明顯的差異，且 *hsa32-1* 也可在短期後天耐熱性(short-term acquired thermotolerance, SAT)實驗中存活，但 *hsa32-1* 無法在長期後天耐熱性(long-term acquired thermotolerance, LAT)實驗中存活，顯示 *hsa32-1* 後天耐熱性的形成未受影響，但其消退較野生型快，顯示 HSA32 參與阿拉伯芥熱逆境記憶的維持(Chang *et al.*, 2006)。

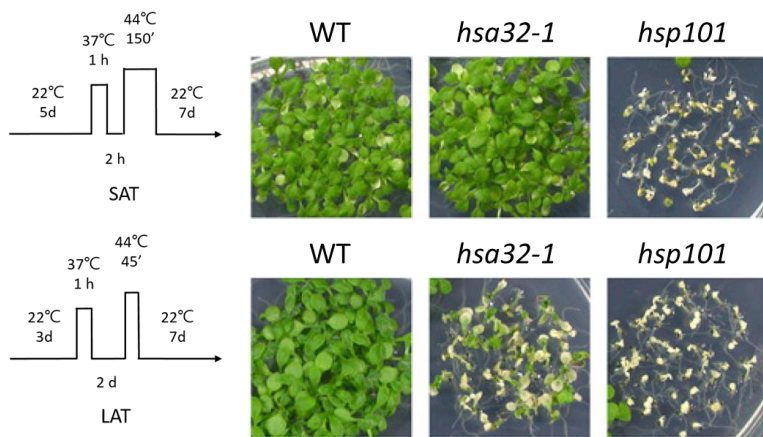


圖 1. 阿拉伯芥野生型(WT)與剔除 *HSA32* (*hsa32-1*)和 *HSP101* (*hsp101*)的突變株在 SAT 和 LAT 實驗後的外觀。引用自 Hu *et al.* (2012)。

在熱逆境下，HSP101 會逐漸被降解，HSA32 可以減慢 HSP101 被降解的速度，因此在缺乏 HSA32 的阿拉伯芥中，HSP101 降解較快，導致 *hsa32-1* 無法在 LAT 條件下存活，除此之外，HSP101 會促進 HSA32 的累積，剔除 *HSP101* 的突變株(*hsp101*)的 HSA32 含量比野生型少(Wu *et al.*, 2013)。隨後在水稻中也證實 HSA32 與 HSP101 正向回饋調控機制的存在 (Lin *et al.*, 2014)。

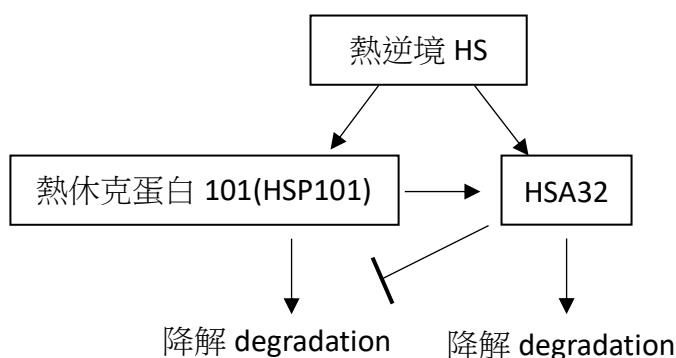


圖 2. 植物在熱逆境之下表現 HSP101 和 HSA32，HSP101 促進 HSA32 的累積，HSA32 減慢 HSP101 的降解。修改自 Wu et al. (2013)。

Yu (2017)將阿拉伯芥、番茄、水稻、地錢和苔蘚的 *HSA32* 轉入阿拉伯芥 *hsa32-1* 中大量表現，發現只有高等植物的 HSA32 可以減慢 HSP101 的降解，彌補 *hsa32-1* LAT 的缺失，而低等植物的 HSA32 則不行，顯示高等植物與低等植物的 HSA32 有功能上的差異。

在分子層次上，高等植物的 HSP101 如何促進 HSA32 累積，以及 HSA32 如何減緩 HSP101 的降解目前尚不清楚，或許可以透過低等植物的研究獲得相關的線索；在演化上，我們也想知道高等植物與低等植物 HSA32 功能上的異同。在低等植物中，地錢是常用的模式植物，地錢的體積小、生長週期短，容易在實驗室培養操作，且地錢的基因組已完全定序完成，也已建立許多研究方法，如高效率的基因轉殖等，因此我們選擇地錢做為本研究的材料。

地錢的生活週期內主要以配子體狀態存在，配子體依性別可分為雄配子體與雌配子體，本研究使用的地錢(*Marchantia polymorpha*)雄、雌配子體分別為 Takaragaike-1 (Tak-1)與 Takaragaike-2 (Tak-2)，地錢配子體由單細胞的孢子萌發長成假根(rhizoid)與葉狀體(thallus)，在遠紅光的照射下，葉狀體會長出雄托與雌托，內有精子與卵子，卵子受精後則為孢子體，形成孢子母細胞，孢子母細胞經減數分裂產生 4 個孢子，孢子發育為新的葉狀體與假根，一個有性繁殖週期約為 1 個月。地錢亦會進行無性繁殖，3 週大的葉狀體會長出胞芽杯(gemma cup)，胞芽杯內有多細胞的胞芽(gemma)，胞芽可以長成新的葉狀體與假根，由胞芽長成的葉狀體是本研究的主要材料(Shimamura, 2016)。

## 貳、研究目的

### 一、研究目標

- (一) 高等與低等植物 HSA32 序列與功能上的差異
- (二) 地錢是否具有熱逆境記憶
- (三) 地錢 HSA32 在熱逆境之下的生理功能

## 參、研究設備及器材

### 一、生物資訊分析

- (一) 多重序列比對軟體：BioEdit (7.0.5.3)
- (二) 親緣關係分析軟體：MEGA (10.0.5)

### 二、地錢與培養條件

- (一) 地錢：*Marchantia polymorpha* Takaragaike-1 (Tak-1, male accession)、Takaragaike-2 (Tak-2, female accession)和 Tak-1 *hsa32* 剔除突變株
- (二) 培養皿：直徑 9 公分、高 1.5 公分的塑膠培養皿
- (三) 培養基：1/2 Gamborg B-5 (Sigma)培養基，含有 1%蔗糖(Merck)與 1.3% Difco™ agar (Becton, Dickinson and Co.)，pH=5.7
- (四) 培養室：溫度維持 22°C，光照 16 小時/天（光照強度為 120  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）

### 三、RNA 萃取、cDNA 合成與 RT-PCR

- (一) 植物組織均質機(SH-48, J&H Technology)
- (二) 鎢鋼珠(Kurabo)
- (三) 超微量分光光度計 NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)
- (四) 引子：RT-PCR 所需之正、反引子皆設計在不同的外顯子上，用以區分 gDNA 與 cDNA。引子由基隆米克斯公司合成，序列如表 1。

表 1. RT-PCR 所需引子

引子名稱	引子序列(5 端到 3 端)	引子位置
MpActin-2F	GCGATGTACGTGGCCATCCA	外顯子 2
MpActin-2R	GCTCGGCGATACCTGGGAAC	外顯子 3
MpHsa32-5F	TTGGGCGGAGCACATGCTTA	外顯子 2
MpHsa32-5R	TCTAGCCCAAGCCGACCGAT	外顯子 4
MpHsp101-3F	GTGGCCAAGGACCAAGTGCT	外顯子 3
MpHsp101-3R	CCGACACACCTTCCGCAGTT	外顯子 4

- (五) 核酸增殖儀：T3 Thermocycler (Biometra)
- (六) 電泳膠片：3% agarose gel (Lonza)
- (七) 電泳槽：Mupid-2plus (ADVANCE)
- (八) 核酸偵測暨影像擷取整合系統：Molecular Imager Gel Doc XR System (BP170-8170, Bio-Rad)

#### 四、葉綠素螢光分析

- (一) 葉綠素螢光影像分析：IMAG-MAX/K (WALZ)

#### 五、蛋白質萃取與西方墨點

- (一) 植物組織均質機(SH-48, J&H Technology)
- (二) 鎢鋼珠 (Kurabo)
- (三) 乾浴器：Thermomixer comfort (Eppendorf)
- (四) 電泳膠片：NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen)
- (五) 轉印膜：硝化纖維膜(Millipore)
- (六) 電泳槽：Novex Mini-cell (Invitrogen)
- (七) 抗體：
1. Mouse anti- $\alpha$ -Tubulin (Sigma, catalog number: T5168)
  2. Rabbit anti-Arabidopsis HSP101 由 Chi et al. (2009)製備

3. Rabbit anti-Histone H3 (Abcam, catalog number: ab1791)
4. Goat anti-rabbit IgG (Thermo, catalog number: 31462)
5. Goat anti-mouse IgG (Thermo, catalog number: 31432)

(八) 冷光攝像機：FlourChemHD2 (Alpha Innotech)

## 六、地錢基因轉殖

(一) 質體與農桿菌：質體構築與含有所需質體之農桿菌由中央研究院農業生物科技研究中心常怡雍研究員的研究助理游適駿製備。

(二) 培養基：

1. Luria-Bertani (LB)培養基：1% Bacto™ tryptone (Becton, Dickinson and Co.)、0.5% yeast extract granulated (Merck)、1% NaCl (Avantor)，pH7.0
2. 0-M51C 培養基：配方參照 Ono et al. (1979)
3. 含有 2%蔗糖(Merck)的 0-M51C 培養基：配方參照 Ono et al. (1979)

(三) 地錢與農桿菌共培養之生長箱：溫度維持 22°C，以 120 RPM 轉速搖晃，光照 24 小時/天（光照強度為 120  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）

## 七、基因體 DNA (genomic DNA, gDNA)萃取、PCR 反應與定序

(一) gDNA 萃取：

1. 植物組織均質機(SH-48, J&H Technology)
2. 鎢鋼珠 (Kurabo)
3. 超微量分光光度計 NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

(二) PCR 反應：

1. 引子：引子設計考量到 PCR 產物需包含 gRNA targets。引子由基隆米克斯公司合成，序列如表 2。



表 2. RT-PCR 所需引子

引子名稱	引子序列(5 端到 3 端)	引子位置
MpHsa32-6F	TGTTGTTGACATAAAGGCTGCTGGC	內含子 3
MpHsa32-6R	ACACAAGGCCTCAGTTCTAACACAAGA	內含子 5

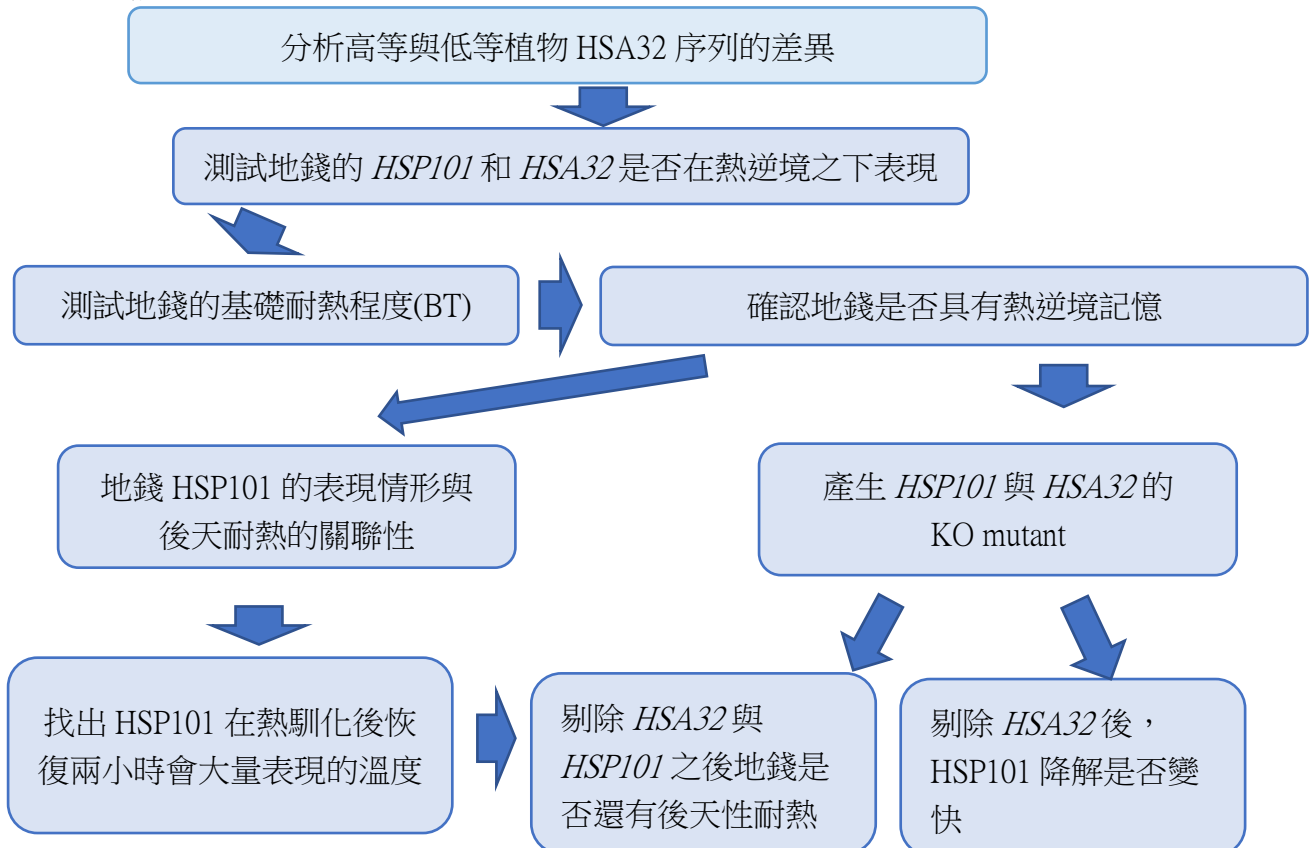
2. 核酸增殖儀：T3 Thermocycler (Biometra)
3. 電泳膠片：1% agarose gel (Lonza)
4. 電泳槽：Mupid-2plus (ADVANCE)
5. PCR 產物純化試劑組：FB PCR Clean Up/ Gel Extraction Kit (Fair Biotech)
6. 核酸偵測暨影像擷取整合系統：Molecular Imager Gel Doc XR System (BP170-8170, Bio-Rad)

### (三) PCR 產物定序

1. 引子：MpHsa32-6F，序列如表 2
2. 定序實驗委託中央研究院核酸定序核心設施執行
3. 定序結果以 BioEdit (7.0.5.3)分析

## 肆、研究過程或方法

### 一、研究結構圖



## 二、研究方法

### (一) 生物資訊分析

#### 1. 多重序列比對(Multiple sequence alignment)

我們使用 National Center for Biotechnology Information (NCBI)的 BLASTP 程式，以阿拉伯芥 HSA32 的胺基酸序列為模板，在 NCBI 的資料庫中尋找其同源蛋白，所得的 32 個同源基因以 BioEdit (Hall, 1999)軟體的 clustalW 程式進行多重序列比對。

#### 2. 親緣關係分析(Phylogenetic analysis)

將多重序列比對的結果匯入 MEGA X (Kumar et al., 2018) 軟體中，利用尋找最適模型(find best model)的功能，計算出 BIC scores (Bayesian Information Criterion)，最後利用最大近似法(Maximum Likelihood method)搭配 BIC score 最低的 JTT 模型 (Jones et al., 1992)並設定 Gamma distribution ((5 categories (+G, parameter = 1.2453))) 參數，將 32 條 HSA32 同源蛋白進行親緣關係分析。

表 3. 前 10 個最適模型

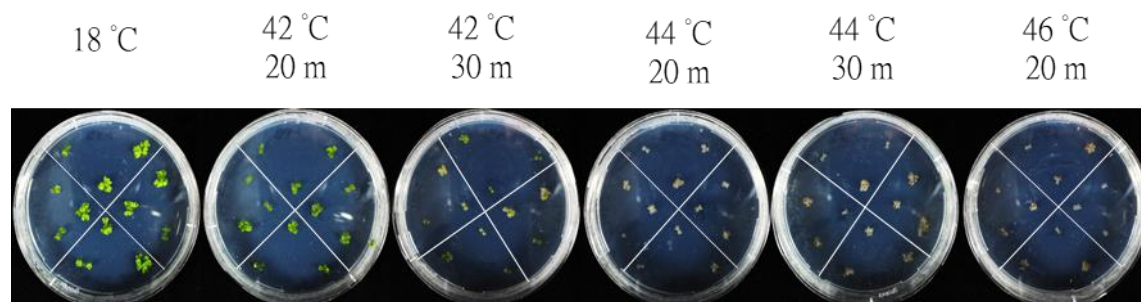
模型	BIC score
JTT+G	13295.4106502701
JTT+G+I	13303.6830898083
LG+G	13335.6230634777
LG+G+I	13344.2907452401
WAG+G	13436.665036192
JTT+G+F	13438.7451688188
WAG+G+I	13444.6962046214
JTT+G+I+F	13447.1241558903
LG+G+F	13480.0960261279
LG+G+I+F	13488.6359500534

### (二) 地錢的培養與繁殖

將地錢胞芽種植在含有 1%蔗糖的 1/2 Gamborg B-5 固態培養基中，培養皿的邊緣以白色透氣膠帶封閉，避免細菌或真菌汙染，將地錢置於培養室中生長，並用溼度計及溫度計監控生長環境。

### (三) 基礎耐熱與後天耐熱處理

將水浴槽的水溫調整至所需的溫度，水溫以 K/J 型雙輸入溫度計（CHY-802U，海基國際企業股份有限公司）測量，用黑色電器膠帶封緊培養皿避免進水，培養皿放進鐵架中，鐵架上放置重物確保培養皿完全浸泡在水中，熱處理時間用計時器計時。在一個星期後拍照記錄地前死亡或受損情形，死亡判訂標準為全株白化且無法繼續生長，受損情形則使用葉綠素螢光分析系統量化。



範例圖

### (四) RNA 萃取、cDNA 合成與 RT-PCR

#### 1. RNA 萃取

- (1). 以 Trizol 試劑(Invitrogen)萃取，方法參照 Invitrogen 公司提供之步驟。
- (2). RNA 以 NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)定量。

#### 2. cDNA 合成

- (1). 將含有 200 ng RNA 的 7  $\mu$ L DEPC 水與 4  $\mu$ L 2.5 mM dNTP 和 1  $\mu$ L 40  $\mu$ M oligo dT 混合，加熱 65°C 5 分鐘後，將其置入碎冰中冷卻。
- (2). 加入 4  $\mu$ L 5X First-strand buffer (Invitrogen)、2  $\mu$ L 0.1M DTT (Invitrogen)、1  $\mu$ L RNaseOUT™ (Invitrogen)和 1  $\mu$ LM-MLV reverse transcriptase (200U/ $\mu$ L) (Promega)，將其混合後在 42°C 下反應 1 小時。
- (3). 置於 70°C 15 分鐘終止反應。

### 3. RT-PCR

- (1). 將 1  $\mu\text{L}$  10 ng/ $\mu\text{L}$  cDNA、10  $\mu\text{M}$  正、反引子各 1  $\mu\text{L}$ 、5  $\mu\text{L}$  2X Redy mix (Zymeset)與 2  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 混合。
- (2). 置於 T3 Thermocycler (Biometra)依表 4 條件反應。

表 4. RT-PCR 反應條件

步驟	溫度	時間
1	94°C	2 分鐘
2	27 次循環	94°C
3		60°C
4		72°C
5	72°C	1 分鐘
6	20°C	7 分鐘
		停止

- (3). 反應後的產物以 3% agarose gel (Lonza)電泳分離。
- (4). Agarose gel 用 EtBr 染色後以 Molecular Imager Gel Doc XR System (BP170-8170, Bio-Rad)偵測訊號。

### (五) 蛋白質萃取與西方墨點

1. 將地錢葉狀體與鎢鋼珠放進 2 mL 的 eppendorf，置入液態氮中冷卻後磨碎。
2. 加入 2 倍體積的萃取緩衝液(extraction buffer)。  
萃取緩衝液成份：600  $\mu\text{L}$  1M Tris-HCl pH8.5 + 2 mL 10% SDS + 250  $\mu\text{L}$  100% glycerol + 2.6  $\mu\text{L}$  0.5M EDTA + 100  $\mu\text{L}$  protease inhibitor
3. 加熱 70°C 10 分鐘後離心 14,000 RPM 15 分鐘。
4. 將上清液移入新的 eppendorf。
5. 利用 Dc Protein assay (Bio-Rad)試劑與蛋白質反應，用 ELISA Reader 測量波長 750 nm 的吸光值，以 0 - 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的牛血清蛋白(Sigma)為標準品，推算樣本蛋白質濃度。
6. 將 50  $\mu\text{g}$  樣本蛋白質與 NuPAGE Sample Buffer (Invitrogen)和 NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen)混合均勻，加熱 70°C 10 分鐘後冷卻至室溫。

7. 將冷卻後的樣本以 NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen)在 200 V 條件下電泳分離 50 分鐘。
8. 將分離後的蛋白質以 20 V 1 小時的條件轉漬(transfer)到硝化纖維膜(Millipore)上。
9. 轉漬後的硝化纖維膜用配於 PBST (25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2, 0.15 M NaCl, and 0.3% (v/v) Tween-20)溶液中的 5% (w/v)脫脂牛奶阻攔(blocking)30 分鐘。
10. 將一級抗體配置於 5% (w/v)脫脂牛奶中，把硝化纖維膜浸泡其中並搖晃 1 小時。
11. 用 PBST 搖晃清洗硝化纖維膜 3 次，每次 10 分鐘。
12. 將二級抗體配置於 5% (w/v)脫脂牛奶中，把硝化纖維膜浸泡其中並搖晃 1 小時。
13. 用 PBST 搖晃清洗硝化纖維膜 3 次，每次 10 分鐘。
14. 將 Western Lighting<sup>TM</sup> Plus-ECL (PerkinElmer)施加在硝化纖維膜上，用 FlourChemHD2 (Alpha Innotech)偵測冷光影像。

#### (六) 地錢基因轉殖

1. 將含有所需質體之農桿菌 GV3101 培養於 5 mL LB 培養基兩天，接著將農桿菌置換於 5 mL 0-M51C 培養基(含有 100  $\mu$ M acetosyringone)並繼續培養 6 小時，供共培養使用。
2. 依 Kubota et al. (2013)圖 1 指示，將兩週大地錢的生長點切除，並將剩餘的部分均分成 4 等分，待其再生 4 天後，與前步驟之農桿菌共培養於裝有 50 mL 的 0-M51C 培養基(含有 100  $\mu$ M acetosyringone 與 2%蔗糖)的錐形瓶中 3 天，接著以滅菌水洗地錢五次後，再加入 1 g/L cefotaxime 以 120 RPM 轉速搖晃 30 分鐘，最後將地錢培養於含有 10mg/L 的 hygromycin 和 100mg/L cefotaxime 的 1/2 Gamborg B-5 固態培養基中。
3. 將轉殖成功的地錢移至新的含有 10mg/L 的 hygromycin 和 100mg/L cefotaxime 的 1/2 Gamborg B-5 固態培養基中供後續分析。

#### (七) gDNA 萃取、PCR 反應與定序

## 1. gDNA 萃取

- (1). 將剪下的約 1 cm<sup>2</sup> 地錢葉狀體與鎢鋼珠放進 2 mL 的 eppendorf，置入液態氮中冷卻後磨碎。
- (2). 加入 400 μL gDNA 萃取緩衝液，用手均勻搖晃。  
萃取緩衝液成份：10 mL 1M Tris-HCl pH7.5 + 2.5 mL 5M NaCl + 2.5 mL 0.5 M EDTA + 32.5 mL ddH<sub>2</sub>O
- (3). 加入 500 μL phenol/chloroform，用手均勻搖晃後，離心 13,000 RPM 10 分鐘。
- (4). 取 300 μL 上清液到新的 1.5 mL eppendorf，再加入 300 μL isopropanol，用手均勻搖晃，放入 -20°C 冰箱 10 分鐘。
- (5). 在 4°C 離心 13,000 RPM 10 分鐘。
- (6). 移除上清液，DNA 沉澱物以 500 μL 70%酒精清洗，離心 13,000 RPM 1 分鐘。
- (7). 風乾 DNA 沉澱物後，加入 50 μL ddH<sub>2</sub>O 回溶。
- (8). DNA 以 NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) 定量。

## 2. PCR 反應

- (1). 將 1 μL 50 ng/μL gDNA、10 μM 正、反引子各 5 μL、25 μL 2X Redy mix (Zymeset) 與 14 μL ddH<sub>2</sub>O 混合。  
置於 T3 Thermocycler (Biometra) 依表 5 條件反應。

表 5. PCR 反應條件

步驟	溫度	時間
1	94°C	2 分鐘
2	36 次循環	94°C
3		60°C
4		72°C
5	72°C	7 分鐘
6	20°C	停止

- (2). 反應後的產物加入 2 μL 100X SyBr green，以 1% agarose gel (Lonza) 電泳分離。

- (3). 在紫外燈箱上切下含有 PCR 產物的 agarose gel，以 FB PCR Clean Up/ Gel Extraction Kit (Fair Biotech) 純化 PCR 產物。
  - (4). 2.5  $\mu\text{L}$  純化後的 PCR 產物與 1  $\mu\text{L}$  6X DNA loading dye 混合後再次以 1% agarose gel (Lonza) 電泳分離。
  - (5). 用 EtBr 染色後以 Molecular Imager Gel Doc XR System (BP170-8170, Bio-Rad) 偵測訊號，確認 PCR 產物為單一產物。
  - (6). 用 ImageJ 軟體定量 DNA 濃度。
3. 定序分析
- (1). 取約 50 ng 的 PCR 產物與 1  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  MpHsa32-6F 引子混合，以 ddH<sub>2</sub>O 將體積補至 10  $\mu\text{L}$ ，委託中央研究院核酸定序核心設施執行定序實驗。
  - (2). 定序結果以 BioEdit (7.0.5.3) 分析，確認轉殖株的 *HSA32* 是否突變。

## 伍、研究結果

### 一、地錢 HSA32 和高等植物的差異

我們已經知道高等植物的 HSA32 和 HSP101 在熱逆境下的進行交互作用，但是目前沒有人研究過高等植物以外的物種，所以我們利用生物資訊分析將 32 種植物的 HSA32 進行多重序列比較（圖 3），發現卷柏、地錢、苔蘚和綠藻的 HSA32 序列在位置 220 到 255 之間並不如高等植物般保守，親緣關係分析（圖 4）的結果也將這四條序列與其他高等植物的分開，我們推測低等植物 HSA32 的生理功能和高等植物的或許有差異，因此我們想知道低等植物的 HSA32 可否減慢 HSP101 的降解，以增加其後天耐熱的能力。

目前已有收錄卷柏、地錢、苔蘚和綠藻基因體序列的資料庫可供使用，考量材料取得的方便性，我們選擇地錢 (*Marchantia polymorpha* Tak-1 和 Tak-2) 作為研究材料，此種地錢的基因體已經定序完成，大部分的基因也已被註解，包括 *HSA32* 和 *HSP101*，方便我們後續研究。

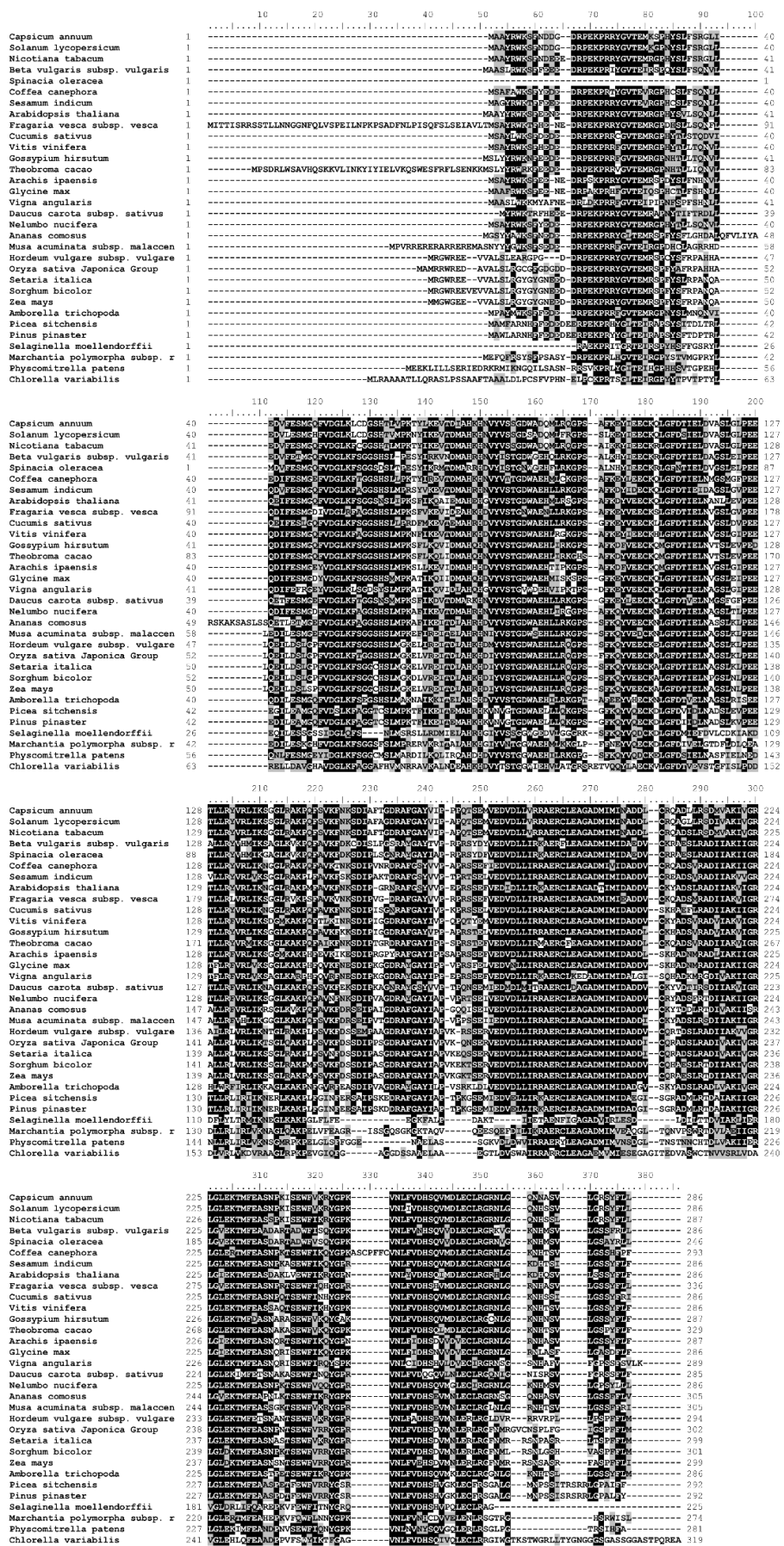


圖 3. 將 32 種植物的 HSA32 同源蛋白進行多重序列比對。



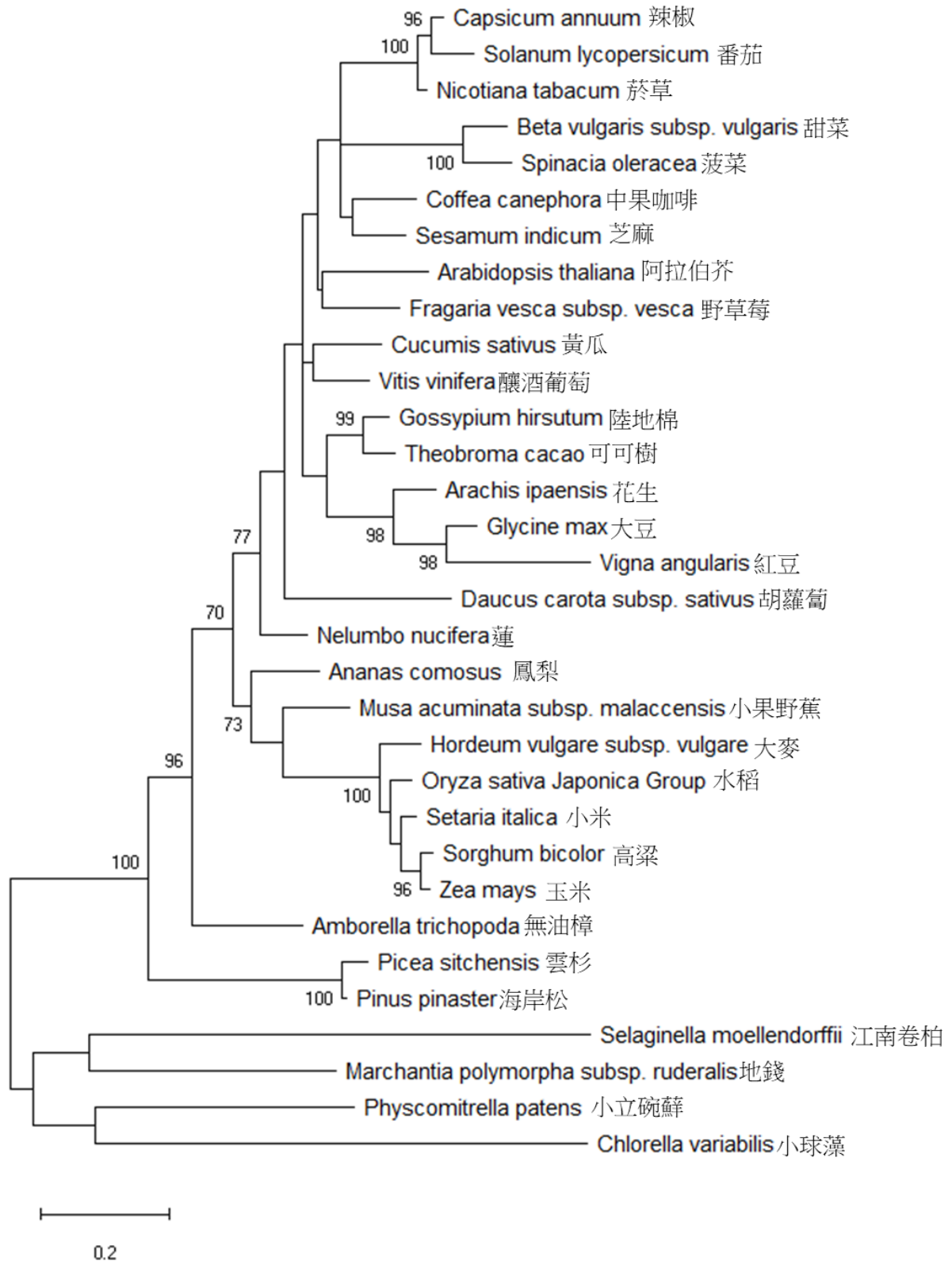


圖 4. 植物 HSA32 親緣關係分析。

## 二、地錢 *HSA32* 和 *HSP101* 基因在熱逆境下的反應

在進行後天耐熱性(acquired thermotolerance, AT)實驗之前，必須先確認地錢的 *HSP101* 和 *HSA32* 會在熱逆境之下表現，並找出適合用來熱馴化的溫度。將地錢以不同的溫度熱馴化 1 小時後，萃取其 RNA 並合成 cDNA，進行 RT-PCR 實驗（圖 5），發現 *HSP101* 及 *HSA32* 的表現量都明顯隨著溫度上升而上升，我們猜測 *HSA32* 的表現量越多，越能幫助我們研究 *HSA32* 在地錢的生理功能，所以往後的 AT 實驗我們使用 36°C 左右的溫度進行熱馴化，詳細的條件會在 AT 實驗結果中提到。而 38°C *HSA32* 及 *HSP101* 的表現量卻沒有最多的狀況我們會再進行討論。

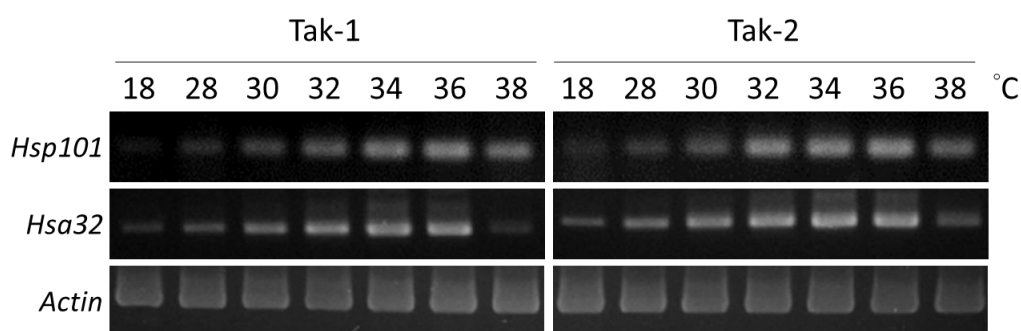


圖 5. 利用 RT-PCR 偵測 *HSP101* 和 *HSA32* 在不同的溫度熱馴化 1 小時後的表現量。

## 三、地錢耐熱程度

### (一) 地錢的基礎耐熱性(Basal thermotolerance, BT)

在進行地錢的 AT 實驗之前，我們首先要測量地錢的基礎耐熱，基礎耐熱就是未經熱馴化的植物最高能承受的熱逆境強度，為了決定往後實驗的熱逆境溫度及時間，我們先以 2 度的溫差為間距進行 42°C、44°C、46°C 20 分鐘以及 30 分鐘的 BT 實驗（表 6），我們發現未經熱馴化的地錢不能耐受超過 44°C 20 分鐘的熱處理，超過這個熱逆境強度的地錢都白化死亡了。

表 6. 地錢不同強度的 BT 實驗下的死亡率。

control	42°C 20 min	42°C 30 min	44°C 20 min	44°C 30 min	46°C 20 min
0%	0%	41%	100%	100%	100%

(死亡率四捨五入至個位數)

所以我們接下來以 5 分鐘為間距進行 42°C 20、25、30、35 分鐘，44°C 10、15 分鐘 BT 實驗（表 7），我們發現 42°C 的地錢均生長良好。

表 7. 地錢不同強度的 BT 實驗下的死亡率。

control	42°C	42°C	42°C	42°C	44°C	44°C
	20 min	25 min	30 min	35 min	10 min	15 min
0%	0%	0%	0%	58%	0%	75%

因為 42°C 的熱處理無法在短時間內造成地錢死亡，因此我們以 5 分鐘為間距進行 44°C 10、15、20 分鐘進行 BT 實驗（表 8），發現 42°C 生長良好，44°C 只有 20 分白化死亡。

表 8. 地錢不同強度的 BT 實驗下的死亡率。

control	44°C 10min	44°C 15min	44°C 20min
0%	0%	0%	100%

為了確認地錢 BT 的極限，我們以 1 分鐘為間距進行 44°C 15、16、17、18、19、20 分鐘進行 BT 實驗（表 9），由實驗結果我們可以觀察出地錢在 15 至 20 分之間有逐漸白化的趨勢，而 44°C 20 分鐘的地錢完全白化死亡，所以我們最終以 44°C 20 分鐘作為我們地錢的基礎耐熱性上限。

表 9. 地錢不同強度的 BT 實驗下的死亡率。

control	44°C	44°C	44°C	44°C	44°C	44°C
	15min	16min	17min	18min	19min	20min
0%	47%	67%	75%	89%	96%	100%

(二) 地錢的後天耐熱性(Acquired thermotolerance, AT)

要進行 AT 實驗前我們必須先確定我們的熱馴化條件，從觀察 HSP101 和 HSA32 的 RT-PCR 實驗中，我們得知熱馴化的溫度大約在 36°C 左右，所以我們接下來用植物生長情形來決定，我們先讓植物進行 35、36、37°C 在 0.5、1、2 小時下的熱馴化，恢復 1 天後以 44°C 處理 20 分鐘，一週後偵測葉綠素螢光的強度，取得 Fv/Fm 值，來表示光系統 II 的活性（圖 6）。數據中我們可以得知不管是 Tak-1 或 Tak-2，未經過熱馴化的地錢生長最好，其次都是 37°C 的 2 個小時，所以我們熱馴化的條件就用 37°C 2 小時。

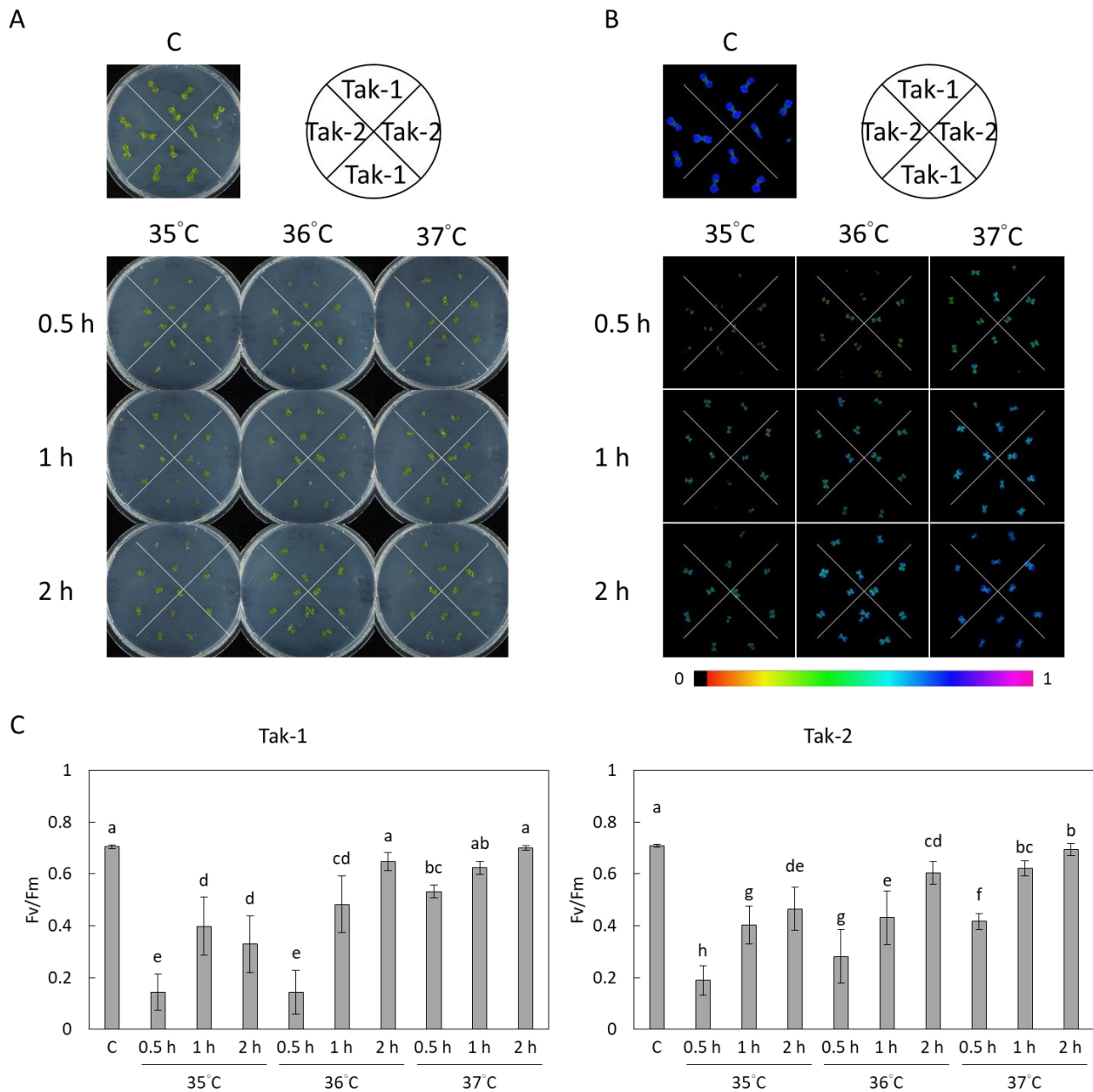


圖 6. 測試熱馴化的條件。(A)地錢經不同溫度及時間的熱馴化後，恢復 1 天，再處理 44°C 20 分鐘，恢復 7 天後的外觀。(B)偵測 Fv/Fm 值。(C)將兩次重複實驗的 Fv/Fm 值以單因子變異數分析(one-way ANOVA)。

我們以 37°C 2 小時為熱馴化條件進行 AT 實驗，地錢在處理 44°C 20 分鐘前 2 小時、1 天和 2 天前進行熱馴化，並統一在第 7 天處理 44°C 20 分鐘，最後偵測葉綠素螢光的強度，取得 Fv/Fm 值，來表示光系統 II 的活性（圖 7），並以 ImageJ 軟體計算地錢葉狀體的面積。

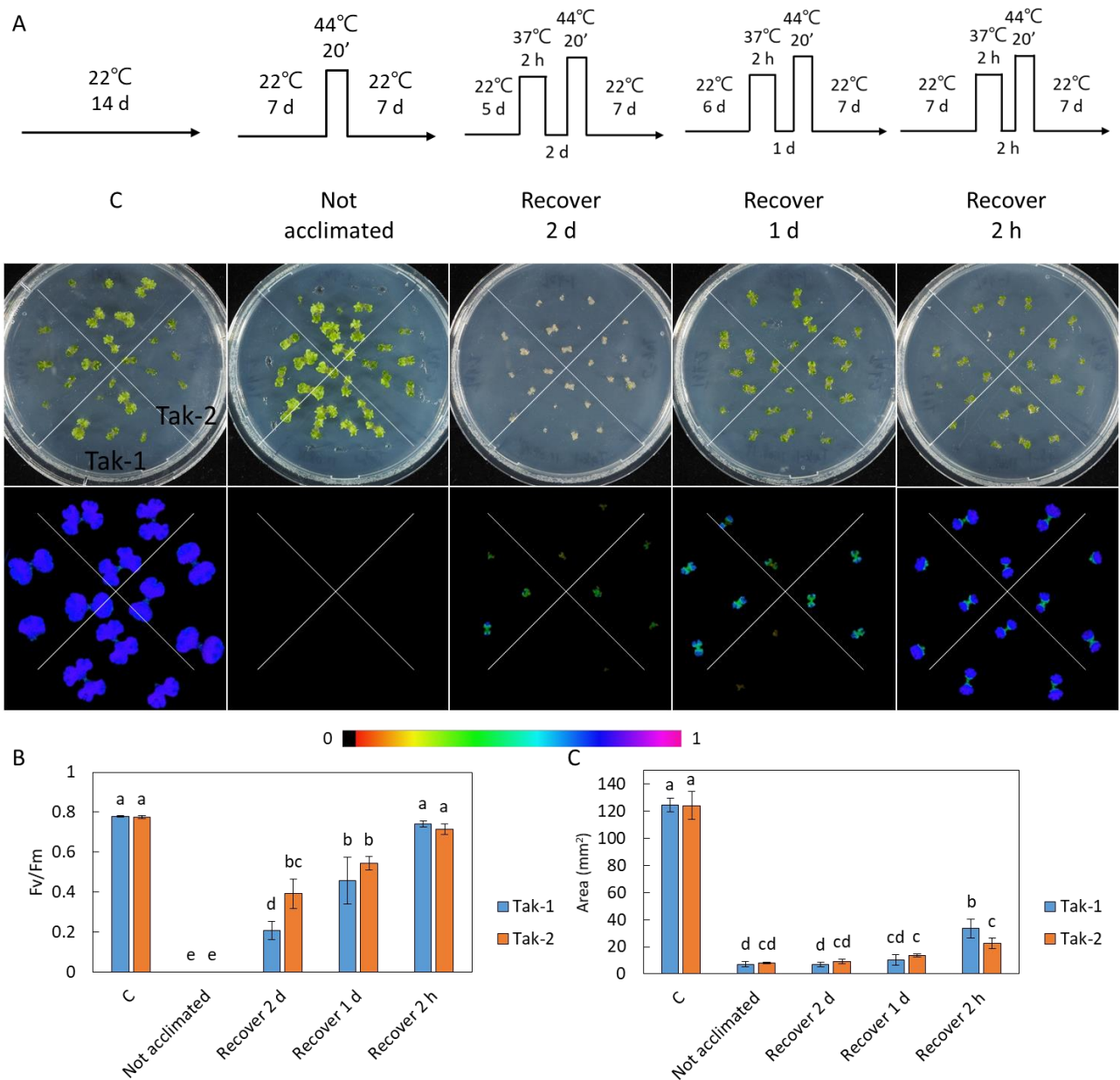


圖 7. 後天耐熱性實驗。(A)地錢經後天耐熱性實驗的外觀並偵測 Fv/Fm 值。每個培養皿均分為四區域，上、下兩區域為 Tak-1，左、右兩區域為 Tak-2。(B)將兩個區域的 Fv/Fm 值以單因子變異數分析。(C)將兩個區域的地錢葉狀體面積以單因子變異數分析。

### (三) HSP101 表現情形

我們使用西方點墨法來偵測 HSP101 是否會隨時間遞減 (圖 8)，根據前面的 AT 實驗推測，熱馴化後的休息時間越短 HSP101 的蛋白質就越多，而 HSP101 蛋白質的量會隨著時間一起遞減，但我們能明顯看出在恢復 2 小時後 HSP101 的量最

少，而恢復 24 小時最多，這和我們的假設不同，顯示在地錢裡 HSP101 含量與耐熱程度不一定是正相關，這點和阿拉伯芥的結果不一樣。

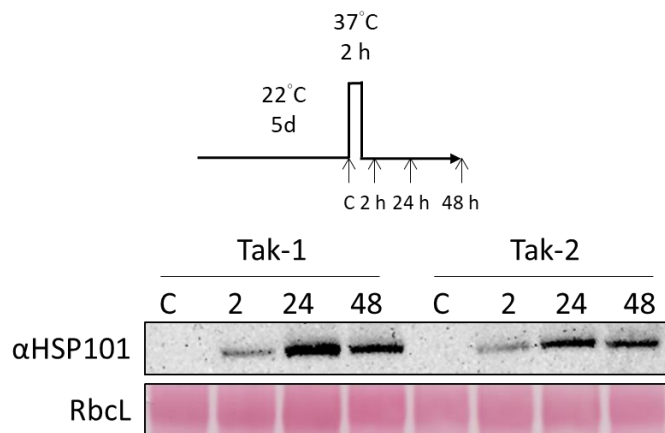


圖 8. HSP101 在 37°C 2 小時熱馴化後的表現情形。

未來我們得到剔除 HAS32 的地錢(hsa32)之後，要確認熱馴化後 HSP101 是否降解較快，因此我們希望找到一個溫度可以在恢復 2 小時後即可誘導地錢大量表現 HSP101，所以我們測試了不同溫度的熱馴化條件（圖 9），進行實驗後發現 38°C 1 小時和 37°C 一樣 2 小時 HSP101 的量最少，而溫度較低的 34°C 和 36°C 1 小時有比較高的表現量，未來可以利用 34°C 或 36°C 1 小時作為熱馴化條件。

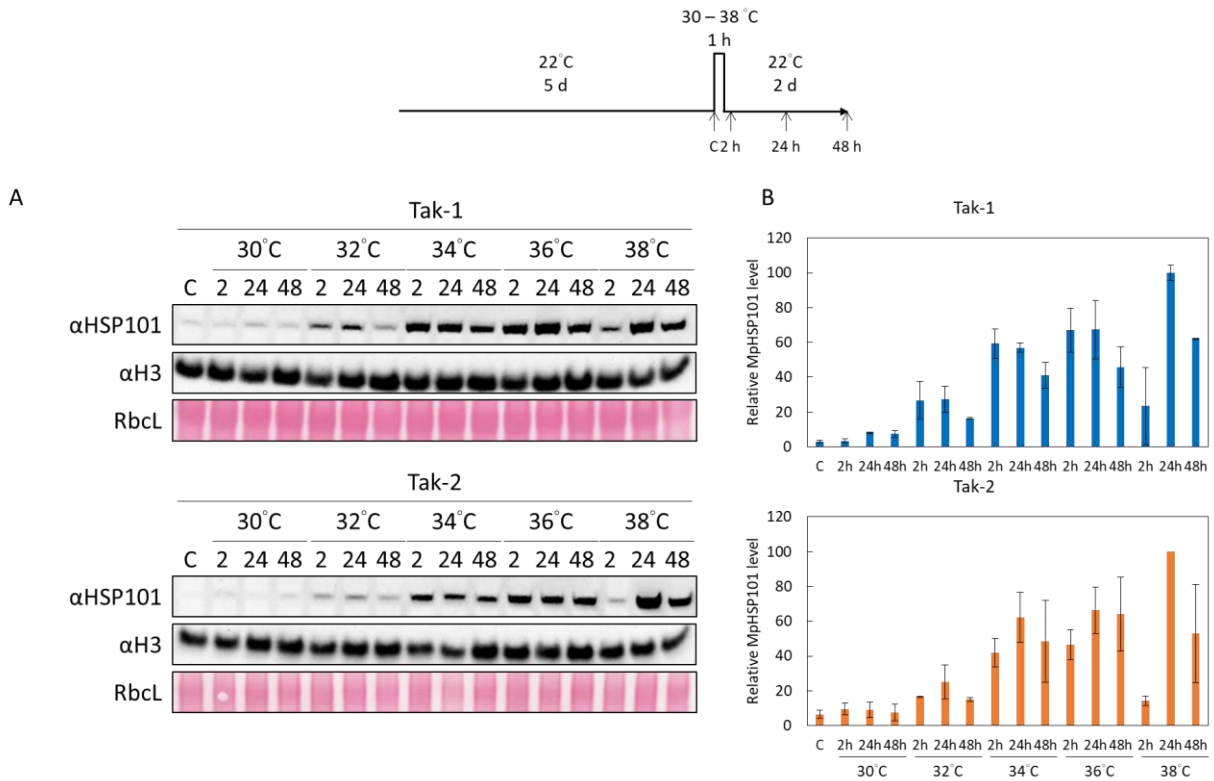


圖 9. HSP101 在不同溫度熱馴化 1 小時後的表現情形。(A)西方墨點結果。(B)將兩次重複的 HSP101 以 ImageJ 定量。

為了觀察 HSP101 的表現情形，和測試 hsa32 是否在 SAT 實驗中存活並在 LAT 實驗中死亡，因此我們測試了地錢的 AT 極限（圖 10），在 SAT 實驗當中，地錢無法在 44°C 40 分鐘的熱處理下存活，在 LAT 實驗當中，地錢無法在 44°C 下存活超過 30 分鐘。



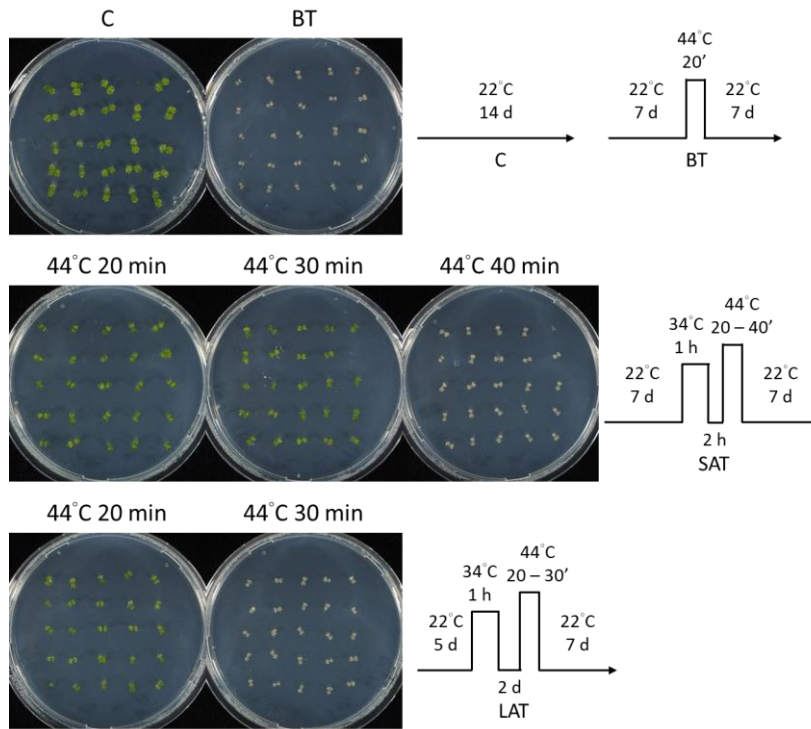
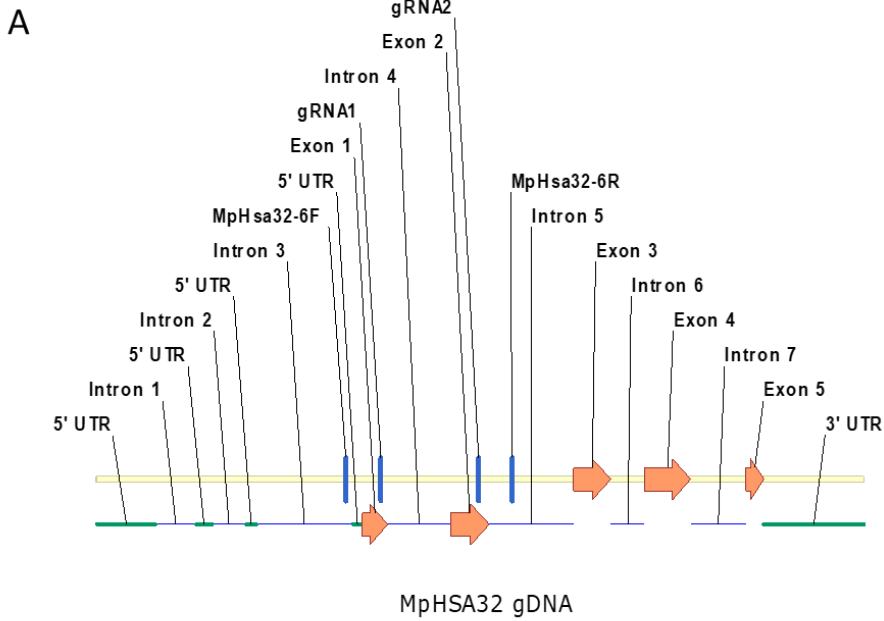


圖 10. 以 34°C 1 小時為熱馴化條件，測試地錢 Tak-1 耐熱的極限。

#### (四) 轉植株的 *HSA32* 定序結果

我們抽取轉殖成功的地錢的 gDNA，利用 PCR 反應複製 *HSA32* (圖 11A)，將 PCR 產物純化後定序，確認 *HSA32* 是否發生突變。

我們成功得到三個 *hsa32* 剔除突變株，*hsa32-1* 的 gRNA target 1 和 2 之間的序列消失了，*hsa32-2* 的 gRNA target 1 位置多了一小段額外的序列，*hsa32-9* gRNA target 1 和 2 之間的序列與野生型的序列完全不一樣 (圖 11B)，從預測的氨基酸序列發現三個 *hsa32* 突變株都有 premature stop codon (圖 11C)，我們認為這三個突變株的 *HSA32* 都被成功剔除了。



**B**

3829 bp

```

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
WT 1  . . . . .
32-1 1  . . . . .
32-2 1  . . . . .
32-9 1  . . . . .

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
WT 65  ~ ~ ~ ~ ~
32-1 65  ~ ~ ~ ~ ~
32-2 101  ~ ~ ~ ~ ~
32-9 94  ~ ~ ~ ~ ~

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
WT 163  ~ ~ ~ ~ ~
32-1 65  ~ ~ ~ ~ ~
32-2 201  ~ ~ ~ ~ ~
32-9 182  ~ ~ ~ ~ ~

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
WT 263  ~ ~ ~ ~ ~
32-1 65  ~ ~ ~ ~ ~
32-2 301  ~ ~ ~ ~ ~
32-9 281  ~ ~ ~ ~ ~

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
WT 363  ~ ~ ~ ~ ~
32-1 65  ~ ~ ~ ~ ~
32-2 401  ~ ~ ~ ~ ~
32-9 381  ~ ~ ~ ~ ~

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
WT 463  ~ ~ ~ ~ ~
32-1 65  ~ ~ ~ ~ ~
32-2 501  ~ ~ ~ ~ ~
32-9 481  ~ ~ ~ ~ ~

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
WT 563  ~ ~ ~ ~ ~
32-1 65  ~ ~ ~ ~ ~
32-2 601  ~ ~ ~ ~ ~
32-9 559  ~ ~ ~ ~ ~

710 720 730 740 750 760 770
WT 663  ~ ~ ~ ~ ~
32-1 65  ~ ~ ~ ~ ~
32-2 701  ~ ~ ~ ~ ~
32-9 659  ~ ~ ~ ~ ~

```

**C**

```

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
WT 1  MEFQERSYSPFSASYDRPEKPRLLHGVTETGPFHMLRPTISWYIYVYVVS
32-1 1  MEFQERSYSPFSASYDRPEKPRLLHGVTETGPFHMLRPTISWYIYVYVVS
32-2 1  MEFQERSYSPFSASYDRPEKPRLLHGVTETGPFHMLRPTISWYIYVYVVS
32-9 1  MEFQERSYSPFSASYDRPEKPRLLHGVTETGPFHMLRPTISWYIYVYVVS

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
WT 101  FNEYVEQCKDLGDFIVELGDFDLQADLRLRLVKNAGLQAKPLVLFVAGRISSGSGKRGTAQVQESQFDFILIKRAERCLQADAMIMVBAQC
32-1 50  FNEYVEQCKDLGDFIVELGDFDLQADLRLRLVKNAGLQAKPLVLFVAGRISSGSGKRGTAQVQESQFDFILIKRAERCLQADAMIMVBAQC
32-2 54  FNEYVEQCKDLGDFIVELGDFDLQADLRLRLVKNAGLQAKPLVLFVAGRISSGSGKRGTAQVQESQFDFILIKRAERCLQADAMIMVBAQC
32-9 50  FNEYVEQCKDLGDFIVELGDFDLQADLRLRLVKNAGLQAKPLVLFVAGRISSGSGKRGTAQVQESQFDFILIKRAERCLQADAMIMVBAQC

210 220 230 240 250 260 270
WT 201  FQNVPSWRITDVLAEITGRGLERTMFAHSPVFPQWLNNTGPKVNDVFNHCDVVELDNURSGFRHSRWTSI
32-1 50  FQNVPSWRITDVLAEITGRGLERTMFAHSPVFPQWLNNTGPKVNDVFNHCDVVELDNURSGFRHSRWTSI
32-2 54  FQNVPSWRITDVLAEITGRGLERTMFAHSPVFPQWLNNTGPKVNDVFNHCDVVELDNURSGFRHSRWTSI
32-9 50  FQNVPSWRITDVLAEITGRGLERTMFAHSPVFPQWLNNTGPKVNDVFNHCDVVELDNURSGFRHSRWTSI

```

圖 11. *hsa32* 基因剔除株和野生株的 *HSA32* 基因序列比較。(A) MpHsa32-6F 和 MpHsa32-6R 引子與 gRNA target 1 和 2 在 *HSA32* 基因上的相對位置。(B) *hsa32* 剔除突變株的 DNA 定序結果。(C) 預測 *hsa32* 剔除突變株的 HSA32 氨基酸序列。

(五) *hsa32* 剔除突變株的熱逆境記憶實驗

野生株在 LAT 實驗後幾乎全部死亡，而 *hsa32* 剔除突變株大都還活著(圖 12A)，葉綠素螢光測量顯示 *hsa32* 剔除突變株仍然維持較強的光合作用(圖 12B)，這些結果表示 *hsa32* 剔除突變株的熱逆境記憶較野生株強，原本假設剔除 HSA32 後熱逆境記憶現象會如同高等植物一樣衰退，但結果卻相反，低等植物 HSA32 的生理功能似乎與高等植物的不同。

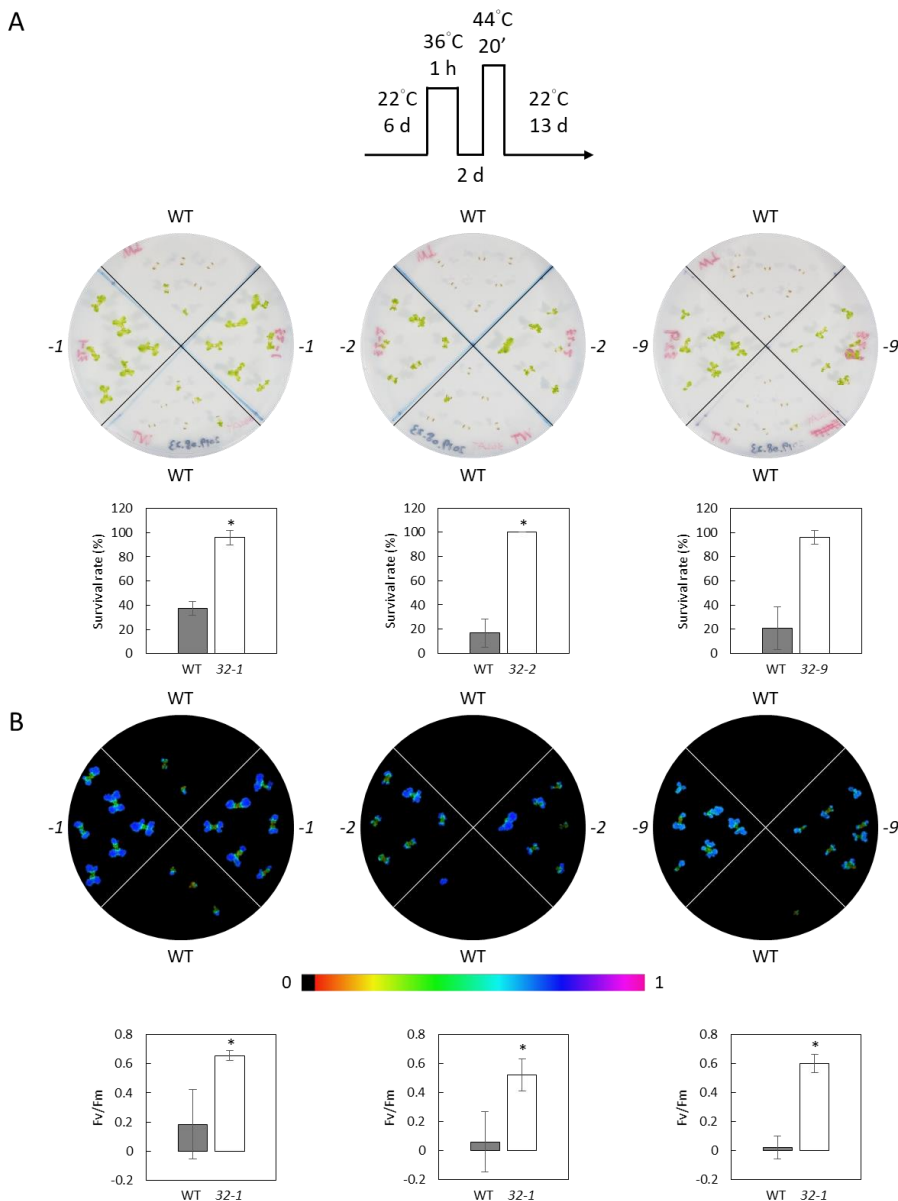


圖 12. *hsa32* 剔除突變株的後天耐熱性實驗。(A)地錢經後天耐熱性實驗後拍照並計算存活率，將兩次重複的存活率以 T test 分析，\*表示 p-value < 0.05。(B)偵測葉綠素螢光的強度，Fv/Fm 值以 T test 分析，\*表示 p-value < 0.05。

(六) 分析 *hsa32* 剔除突變株的 HSP101 表現量

高等植物 *hsa32* 剔除突變株的 HSP101 在熱馴化後恢復 2 天後會大量減少，而地錢 *hsa32* 剔除突變株的 HSP101 的表現並未受到明顯的影響，也許地錢的 HSA32 並不參與 HSP101 的調控。

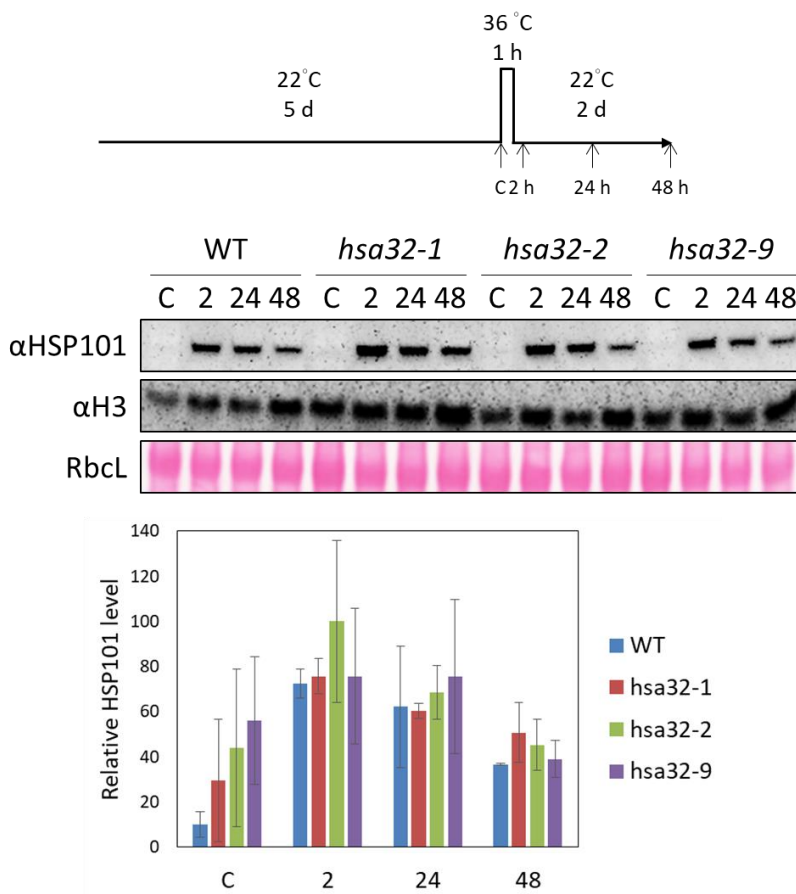


圖 13. *hsa32* 剔除突變株的 HSP101 在熱馴化後的表現情形，將兩次實驗的 HSP101 與 H3 以 ImageJ 定量並用 T test 分析，各個時間點的 *hsa32* 剔除突變株的 HSP101 與 WT 相比，均未有顯著差異。

## 陸、討論

閱讀了文獻資料之後知道高等植物 HSA32 和 HSP101 的交互作用幫助植物延長熱逆境記憶，但是沒有人研究過低等植物是否也有類似的現象，我們透過生物資訊分析發現低等植物的 HSA32 與高等植物的可以區分為不同群（圖 4），於是我們選用已經定序完成的地錢進行實驗，利用 RT-PCR 確認地錢也會在熱逆境下表現 HSA32 和 HSP101（圖 5），後天耐熱性實驗中證實地錢也有熱逆境記憶的現象（圖 6、7）。我們分析不同溫度及時間的熱馴化對地錢後天耐熱性的影響，以 37°C 2 小時熱馴化為熱馴化條件，進行 SAT 和 LAT 實驗（圖 7），發現 SAT 實驗的光系統 II 活性較高，但卻與 HSP101 的含量不呈正相關（圖 8），可能還有其他熱休克蛋白參與在地錢的熱休克反應。我們測試 30 - 38°C 1 小時的熱馴化對 HSP101 表現情形的影響（圖 9），發現 HSP101 在恢復 2 小時的時間點的表現量隨著溫度上升而上升，但 38°C 的熱馴化則延遲了 HSP101 的表現，類似的現象也在水稻中發現，Lin *et al.* (2014)將水稻處理 37 - 46°C 處理水稻 2 小時，在水稻恢復生長後 2 小時萃取蛋白質，發現 HSP101 表現量隨著溫度上升而上升，但在 45°C 開始下降。

我們發現 HSP101 會在 34 - 36°C 1 小時熱馴化後大量表現，且可至少維持 48 小時，這個熱馴化條件適合用於研究剔除 *HSA32* 的地錢的 HSP101 降解速度與野生型地錢的差異，我們原先預期剔除 *HSA32* 的地錢的 HSP101 降解速度較快，但兩者之間並沒有明顯的差異（圖 13），也許地錢的 HSA32 和地錢其他的 HSP101 同源蛋白交互作用。

另一個與高等植物不同的是，地錢 *hsa32* 剔除突變株反而有較強的熱逆境記憶（圖 12），這有可能是因為地錢的 HSA32 抑制了熱逆境記憶，在下此結論之前，我們必須先排除其他可能影響的因素：(1)地錢 *hsa32* 剔除突變株還帶有 T-DNA，T-DNA 插入地錢基因體時可能破壞掉某些基因或影響某些基因的表現，未來可藉由雜交地錢，將 T-DNA 分離開，只保留突變的 *hsa32*；(2)因為 T-DNA 尚未被分離，*hsa32* 剔除突變株會持續表現 Cas9、gRNA 和抗 hygromycin 的基因，這些基因的表現可能會讓地錢更耐熱；(3) Cas9 和 gRNA 的作用可能發生 off target（Cas9 和 gRNA 作用在其他基因上，造成其他基因突變）的現象，雖然我們選擇的 gRNA 經預測不會發生 off target，但實際上還是有可能發生，可以將 *hsa32* 剔除突變株的基因體定序，確認是否有其他基因突變；(4)*hsa32* 剔除突變株可能產生 HSA32 的前 30 個

胺基酸胜肽產物（圖 11C），也許會影響地錢的熱逆境記憶，未來可執行 RT-PCR 實驗，確認突變的 *hsa32* mRNA 是否在熱逆境下表現，或是用 HSA32 前 30 個胺基酸胜肽當作抗原，製作專一性抗體，以西方墨點法確認 *hsa32* 剔除突變株是否會產生突變的 HSA32 蛋白。

就我們所知，目前只在阿拉伯芥中發現了一個間接抑制熱逆境記憶的基因(miR156) (Stief *et al.*, 2014)，但其作用機制還不清楚，如果未來確認地錢的 HSA32 的生理功能是抑制地錢的熱逆境記憶，這會是一個重大發現，其分子機制值得深入探討。

## 柒、結論

- 一、高等植物和低等植物的 HSA32 胺基酸序列有明顯差異，使他們在親緣樹裡分在不同群。
- 二、地錢的 *HSP101* 和 *HSA32* 皆會在熱逆境中表現，且地錢也擁有熱逆境記憶。
- 三、地錢 HSA32 的功能與高等植物不同，初步實驗結果顯示地錢 HSA32 抑制地錢熱逆境記憶，但仍需要更嚴謹的驗證。

## 捌、參考資料及其他

- 四、Bäurle, I. (2016). Plant Heat Adaptation: priming in response to heat stress. *F1000Research* **5**, F1000 Faculty Rev-1694.
- 五、Charng, Y.-y., Liu, H.-c., Liu, N.-y., Hsu, F.-c., and Ko, S.-s. (2006). Arabidopsis Hsa32, a Novel Heat Shock Protein, Is Essential for Acquired Thermotolerance during Long Recovery after Acclimation. *Plant Physiol.* **140**, 1297-1305.
- 六、Charng, Y.-y., Liu, H.-c., Liu, N.-y., Chi, W.-t., Wang, C.-n., Chang, S.-h., and Wang, T.-t. (2007). A Heat-Inducible Transcription Factor, HsfA2, Is Required for Extension of Acquired Thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **143**, 251-262.
- 七、Chi, W.-T., Fung, R.W.M., Liu, H.-C., Hsu, C.-C., and Charng, Y.-Y. (2009). Temperature-induced lipocalin is required for basal and acquired thermotolerance in Arabidopsis. *Plant, Cell Environ.* **32**, 917-927.
- 八、Hu, C., et al. (2012). Recent Gene Duplication and Subfunctionalization Produced a Mitochondrial GrpE, the Nucleotide Exchange Factor of the Hsp70 Complex, Specialized in Thermotolerance to Chronic Heat Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology* **158**(2): 747-758.
- 九、Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M., and Kohchi, T. (2013). Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation of the Liverwort *Marchantia polymorpha* Using Regenerating Thalli. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **77**, 167-172.
- 十、Lin, M.-y., Chai, K.-h., Ko, S.-s., Kuang, L.-y., Lur, H.-S., and Charng, Y.-y. (2014). A Positive Feedback Loop between HEAT SHOCK PROTEIN101 and HEAT STRESS-ASSOCIATED 32-KD PROTEIN Modulates Long-Term Acquired Thermotolerance Illustrating Diverse Heat Stress Responses in Rice Varieties. *Plant Physiol.* **164**, 2045-2053.

- 十一、 **Liu, N.-y., Ko, S.-s., Yeh, K.-C., and Charng, Y.-y.** (2006). Isolation and characterization of tomato Hsa32 encoding a novel heat-shock protein. *Plant Sci.* **170**, 976-985.
- 十二、 **Qu, A.-L., Ding, Y.-F., Jiang, Q., and Zhu, C.** (2013). Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**, 203-207.
- 十三、 **Satake, T., and Yoshida, S.** (1978). High Temperature-Induced Sterility in Indica Rices at Flowering. *Japanese journal of crop science* **47**, 6-17.
- 十四、 **Shimamura, M.** (2016). *Marchantia polymorpha* : Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System. *Plant and Cell Physiology* **57**, 230-256.
- 十五、 **Stief, A., et al.** (2014). "Epigenetic responses to heat stress at different time scales and the involvement of small RNAs." *Plant Signaling & Behavior* **9**(10): e970430.
- 十六、 **Vierling, E.** (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **42**, 579-620.
- 十七、 **Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., and Foolad, M.R.** (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environ. Exp. Bot.* **61**, 199-223.
- 十八、 **Wu, T.-y., Juan, Y.-t., Hsu, Y.-h., Wu, S.-h., Liao, H.-t., Fung, R.W.M., and Charng, Y.-y.** (2013). Interplay between Heat Shock Proteins HSP101 and HSA32 Prolongs Heat Acclimation Memory Posttranscriptionally in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **161**, 2075-2084.
- 十九、 **Yu, S.-J.** (2017). Studies on the mechanism in regulating long-term acquired thermotolerance by HSA32-HSP101 interplay. In Department of Biochemical Science and Technology (National Taiwan University), pp. 1-97.

## 【評語】 060010

本作品探討地錢的兩種熱誘導蛋白 HSA32 和 HSP101 之表現與調控。主題清楚且具科學研究價值。目前已有初步的測定資料，但尚無具體結果，建議可增加 overexpression HSA32 的實驗，以與 knockdown 實驗結果相驗證。