



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201210471 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：099130236

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 09 月 07 日

(51)Int. Cl.：

A01H1/00 (2006.01)

C12N15/82 (2006.01)

(71)申請人：國立中央大學(中華民國) NATIONAL CENTRAL UNIVERSITY (TW)

桃園縣中壢市中大路 300 號

(72)發明人：吳少傑 WU, SHAWJYE (TW)；王亮晴 WANG, LIANCHIH (TW)；吳欣潔 WU, SHINJYE (TW)；葉靖輝 YEH, CHINGHUI (TW)；陸重安 LU, CHUNAN (TW)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：7 共 65 頁

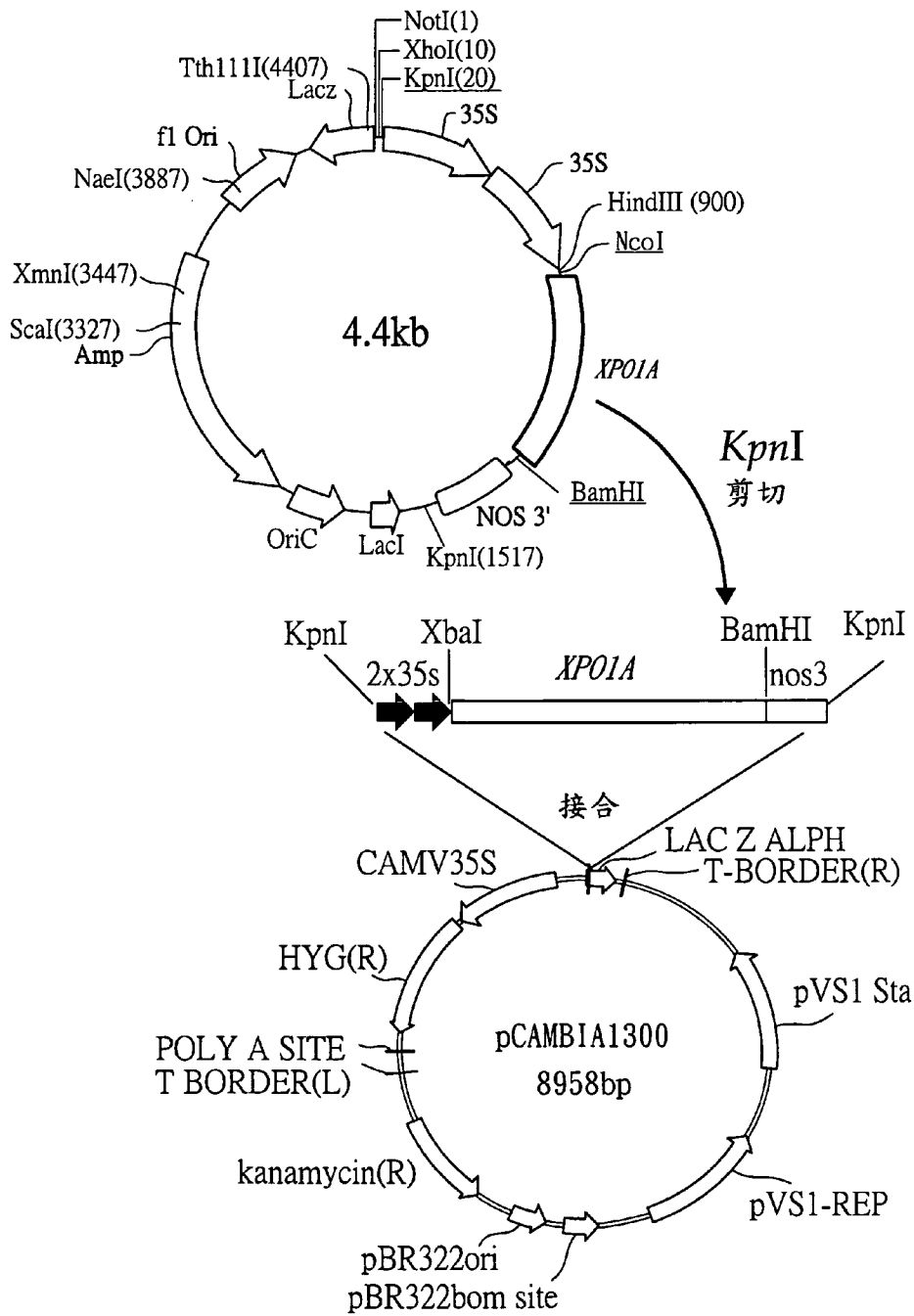
(54)名稱

使植物表現後天性高溫逆境耐受性狀的方法及其應用

METHOD FOR ENHANCING THERMOTOLERANCE OF PLANT AND APPLICATIBILITY OF TRANSGENIC PLANT

(57)摘要

一種使植物表現後天性高溫逆境耐受性狀的方法及其應用，包含將一段可轉譯出 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸片段轉殖入一不具耐受高溫逆境性狀或高溫耐受性不佳的植物細胞中，使含此去氧核糖核酸片段的轉殖株表現出可耐受高溫逆境的單一性狀。此單一性狀表現可應用於轉基因植物之選殖。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於一種使植物表現高溫逆境耐受性的方法，特別是有關於一種使轉基因植物表現出具有後天性高溫逆境耐受單一性狀的方法及其應用。

【先前技術】

當植物生長在最適合的環境下，其生長繁殖為最旺盛，但因為植物不能自由改變生長的位置，外在環境的變化會直接影響植物的生長發育而造成損傷。環境中非生物性的逆境，如水分的逆境有乾旱或水災、溫度的逆境有高溫或寒冷、另外還有化學藥劑、重金屬、過氧化物等也會對植物造成傷害，這些傷害會抑制植物的生長，甚至使植物死亡。因此了解植物如何對抗對環境逆境，有助於農作物品種改良，增加農作物產量及品質（Wang et al. 2003）。

當前全球氣候異常改變，許多地區的溫度較之以往明顯上升或下降。例如在溫室效應的情況下，高溫逆境為主要影響植物生長的因素，且氣候暖化直接影響到的就是生態及糧食問題。過去對於植物抵抗高溫逆境的研究，主要集中在熱休克蛋白（Heat shock protein；HSP）；當植物處在比最適生長溫度高但非致死的高溫中，植物組織細胞會產生熱休克反應（Heat shock response），使植物細胞產生大量熱休克蛋白，扮演分子伴侶（molecular chaperon）的角色，幫助細胞將因高溫而產生變性（denature）的蛋白質重新折疊（refolding），並預防新合成的蛋白質錯誤折疊

(misfolding) 或聚集 (aggregating)，使細胞維持正常的生理功能 (Sun et al. 2002, Charng YY 2006, Banu EFGÖĞLU 2009)。藉由上述機制，可幫助植物在面對短時間致死性的高溫逆境後繼續生存。

然而環境中除了短時間的高溫逆境，還有持續性的長時間高溫逆境，而植物如何在持續的長時間高溫逆境下生存與面對此種逆境的調控機制，目前尚未有完整的研究。由於環境逆境會影響植物生長，造成農作物的損傷，了解植物如何對抗持續性長時間高溫逆境的機制有助於農作物品種改良，增加農作物產量及品質 (Wang et al. 2003)。

一般而言，欲提升植物後天的高溫逆境耐受能力可從兩種方法做起，一是以雜交及自然突變的方式篩選具有耐受高溫逆境能力性狀的植物；或是以分生技術異源或同源表達多個熱耐受相關蛋白來達成。

【發明內容】

本發明之一態樣是在提供一種使植物表現後天性高溫逆境耐受性狀的方法，包含將一段可編碼產生細胞核輸出受體蛋白1A(nuclear export receptor 1A; 簡稱EXPORTIN1A或XPO1A蛋白)的去氧核糖核酸片段，轉殖入一不具耐受高溫逆境性狀或耐高溫性不佳的植物細胞中，藉由表達外源性XPO1A蛋白，使轉植株表現出可耐受高溫逆境的單一性狀，在面對高溫逆境後維持生長。

本發明之另一態樣是提供一種選殖轉基因植物的方法，利用可編碼產生 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸片段作為

選擇性標幟 (selection marker) 構築於載體上並導入植物組織細胞，即可配合預馴化 (pre-acclimation) 處理及熱休克 (heat shock) 處理，選殖轉基因植物細胞。

依照本發明實施方式之一或多個實施例，可轉譯出 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸序列包含 *XPO1A* 基因或與其同源且可編碼為 XPO1A 蛋白之序列；或與阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 *XPO1A* 同源且可編碼為 XPO1A 蛋白之序列。其中可轉譯出 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸片段係來自於阿拉伯芥的染色體 DNA 或人工合成。

依據本實施方式之一實施例，可編碼產生 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸可為具有序列編號：1 (SEQ ID. NO:1)、序列編號：2 之或序列編號：3 之去氧核糖核酸序列的片段。

依據本實施方式之一實施例，選殖轉基因植物之預馴化處理為將植物幼苗培養於預馴化溫度中，再將該植物幼苗移至該植物幼苗之最適生長之溫度中培養。其中預馴化溫度係高於植物幼苗之最適生長溫度。

依據本實施方式之一實施例，選殖轉基因植物的方法之熱休克處理溫度為大於等於預馴化溫度，並且可使未成功轉殖之植株細胞死亡的最低溫度以上的溫度。

根據上述可知，本發明實施例之方法的特點在於僅需於轉基因植物組織細胞中表達外源性 XPO1A 蛋白，即可使植物產生後天耐受高溫逆境性狀，不需以人為方式額外表達其他熱耐受性相關蛋白，更非應用表達習知的高溫逆境蛋白來達成使植物具有高溫逆境性耐受的目的。

更特別的是，含有可編碼產生 XPO1A 蛋白的去氧核糖

核酸片段、或含有序列編號：1、序列編號：2 或序列編號：3 所示序列之去氧核糖核酸片段的轉植株，只表現出可耐受高溫逆境之單一性狀，而不影響植物在正常生理條件下的生長。

因此，利用在植物組織細胞中表達外源性 XPO1A 蛋白，可使轉基因植物產生耐受高溫逆境之單一性狀的特性，應用於選殖轉基因植物，配合本發明提出之預馴化處理及熱休克處理，具有取代抗藥基因等傳統選擇性標幟的潛力。

【實施方式】

以下將分為兩大部分闡述本發明實施態樣之應用基礎及可行性：

第一部分為揭示阿拉伯芥突變株之高溫逆境耐受性等生理試驗測試，以建立XPO1A蛋白可使植物表現後天性高溫逆境耐受性之應用基礎；

第二部分則應用第一部分之測試結果，以實施例佐證可編碼產生XPO1A蛋白的去氧核糖核酸片段轉殖入植物細胞中對使轉植株之耐受高溫逆境的效應，並提供可行之誘導轉植株表現出可耐受高溫逆境的性狀的方法，以供產業應用。

第一部分：XPO1A蛋白功能分析

（一）、喪失熱耐受性之阿拉伯芥突變株之取得

阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的基因體在西元 2000

年已被定序完成，係由五對染色體所組成，總共有 114.5 Mb。阿拉伯芥的生命週期短、體積小且產生子代數目大，因此被廣泛應用在遺傳學、分子生物學實驗上。此外由於阿拉伯芥容易以農桿菌進行轉殖，目前也累積了相當數量的突變株以及基因體資源 (Gepstein et al. 1995)。關於阿拉伯芥的生態型 (ecotypes) 如 Columbia (Col)、Landsberg erecta (Ler)、Wassilewska (Ws) 及不同的生態型的基因體之間的多型性 (polymorphism) 等相關資訊，所屬技術領域具有通常知識者均可在許多相關的網路或圖書館資源中取得；例如網站：<http://www.arabidopsis.org>。

為了找出植物耐受高溫逆境之必要基因，以期運用於農作改良，本發明實施方式係利用前向式遺傳學 (forward genetics) 的策略，從阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia; Col-0) 篩選出一株對高溫逆境失去耐受性之突變株 (heat intolerant, *hit2*)。藉由遺傳定位的方式，確認其性狀是因為編碼為 XPO1A 蛋白的基因 (*XPO1A*, At5g17020) 發生由 G 變 A 之點突變，造成其所編碼之蛋白質的第 364 個胺基酸，由原先之色胺酸 (tryptophan) 的編碼 (TGG) 變為不成熟之終止點 (TGA)，從而使此阿拉伯芥突變株對高溫逆境失去耐受性。

根據阿拉伯芥之基因體分析，阿拉伯芥具有兩個 *XPO1* 基因，*XPO1A* 及 *XPO1B* 基因。一般咸認為兩個 *XPO1* 基因的功能應為相同，可彼此 (或與其他相關基因) 產生互補或協同功能之性狀表現。

從基因序列的在遺傳上的保留性來推測基因產物的功

能，*XPO1A*基因之產物XPO1A蛋白為一細胞核轉運接受器（nuclear transport receptor），負責將核內物質轉運至核外，然而其在阿拉伯芥等植物細胞中的真實功能，目前仍未有全面的瞭解，亦從未有XPO1A蛋白與植物細胞可專一性對抗高溫逆境的認識或發現。

以目前對細胞核轉運接受器功能的研究顯示，細胞核轉運接受器通常藉由辨認某些蛋白質的特定胺基酸序列來轉運目標蛋白質。因此，一個細胞核轉運接受器一般可辨認具有某些特定胺基酸序列的多個蛋白質，因而負責一個以上物質之轉運；相對的，同一個物質也可以經由一個以上可辨認相同特定胺基酸序列的不同細胞核轉運接受器來運輸，故通常一個細胞核轉運接受器的基因發生突變，可能會被具有相同功能之細胞核轉運接受器產生功能上的互補，而不會表現出特殊性狀；另一方面，則可能一個細胞核轉運接受器的基因發生突變，而影響到多種物質的運輸，造成突變株表現出多重性狀改變的情況。

以下將藉由下列之方法，來分析XPO1A蛋白之耐熱機制，包括：

- 1、鑑定阿拉伯芥突變株之遺傳特性；
- 2、阿拉伯芥突變株之高溫耐受性的生理試驗；以及
- 3、阿拉伯芥XPO1A蛋白於植物組織中的表現。

（二）突變株之顯隱性及單一突變鑑定

喪失高溫耐受性的阿拉伯芥突變株之遺傳特性分析，可包含利用突變株與不同品系的阿拉伯芥野生株雜交及突

變株之突變點的定位選殖等方法來鑑定突變株為顯性或隱性突變、突變株之突變點所在之位址。

為了確認喪失高溫耐受性的阿拉伯芥突變株為顯性或是隱性的突變、以及突變株為單一或是多點的突變，可利用 *hit2* 突變株（來自 Col-0 背景）為雄配子，與 Col-5（葉面上無毛的 Columbia 品系）為雌配子雜交，由於葉面上有無長毛為隱性的突變，如果雜交成功，從 Col-5 收到的種子植株應為葉面上長毛，且收到的 F_1 種子之染色體為一股帶有 *hit2* 突變株染色體，另一股帶有 Col-5 染色體，可藉以鑑定 *hit2* 突變株為顯性或是隱性的突變、以及突變株為單一或是多點的突變。

表一為阿拉伯芥突變株及 *exportin 1b* (*xpolb-1*) 突變株之基因分析，鑑定喪失高溫耐受性之阿拉伯芥 *hit2* 突變株之顯隱性。鑑定方法為將野生株與 *hit2* 突變株雜交之 F_1 、Col 與 *hit2* 的種子消毒後播種於 MS 培養基上並於 22°C 環境培養。之後取 10 日齡的植株，以 37°C 處理 3 天後觀察其表現型。另外留下一些 F_1 的種子，種植在土裡收 F_2 的種子，接下來以相同的方法處理 F_2 後觀察表現型變化。以 143 株野生株、140 株 *hit2* 突變株、57 株 *hit2* 與 Col-5 F_1 雜交 (*hit2*×Col-5 F_1)、以及 440 株 *hit2* 與 Col-5 F_2 雜交 (*hit2*×Col-5 F_2) 的植株進行分析。

由表一可看出，10 日齡的植株以 37°C 處理 3 天後於 22°C 培養約 5-6 天後，143 株野生株 (Col-0) 全數持續生長，*hit2* 突變株則全數白化死亡 (140 株植株之高溫耐受度為 0)，而 *hit2*×Col-5 F_1 為異合子，具有一股帶有野生株的

染色體及一股帶有 *hit2* 突變株的染色體，則全數持續生長（57 株植株，存活 57 株）。而 F_2 之表現型（*hit2*×Col-5 F_2 ）在 440 株測試的植株中，其中有 327 株可以持續生長，133 株呈現對長時間的熱處理敏感而產生白化死亡。由於 F_2 之表現型持續生長與白化死亡的比率為 2.89:1，根據孟德爾遺傳學定律，可確認 *hit2* 突變株為單一隱性突變。

表一、喪失高溫耐受性之阿拉伯芥突變株及 *exportin 1b* (*xpolb-1*) 突變株之基因分析

雜交植株 (♂×♀)	世代 (Generation)	植株數 (Total)	對長時間熱 處理耐受株 數 (Tolerant) ^a	對長時間熱 處理敏感株 數 (Sensitive) ^a	χ^2 ^b
野生株 (Col-0)		143	143	0	
突變株/突變株		140	0	140	
野生株×突變株/突變株	F_1	57	57	0	
	F_2	440	327	113 (34.6%)	0.109 ^b
<i>xpolb-1/xpolb-1</i>		45	45	0	

^a 存活度分析係利用如本發明實施例材料方法所述之耐受度或敏感度量測得知。

^b χ^2 值係假定此突變株為單一突變(single recessive)，其個別耐受敏感度期望值(expected ratio) 為 3:1 為基礎計算，(p>0.05)。

根據表一，本發明經由前向式遺傳學方式，找出了 *XPO1A* 基因及其產物 XPO1A 蛋白對植物細胞抵抗長期高溫逆境具有專一性的特殊耐熱機制，且亦確認了在 *XPO1A* 單一基因突變下，即可造成植物對高溫敏感的性狀。

（三）突變株之突變點定位及圖譜

由於本發明之突變株是由化學性致突變劑甲基磺酸乙酯 (ethyl methanesulfonate; EMS) 造成的點突變，因此使用以遺傳圖譜為基礎的基因選殖法 (map-based cloning, MBC) 來定位突變點的位置，此法又稱為定位選殖

(positional cloning)。基因選殖法的原理為當細胞進行減數分裂時，姐妹染色體 (sister- chromatin) 之間會產生交叉 (crossing-over)，使染色體產生不均等片段的交換，稱為遺傳重組 (genetic recombination)，藉由計算基因之間染色體交換率 (recombination frequency) 可推測出兩基因間之相對位置；當染色體上的兩基因體位置 (locus) 相近則其共分離率 (co-segregation) 較高，染色體交換率低；而基因體位置相距較遠則共分離率低，染色體交換率較高。藉著在已知基因體位置上設計分子標記 (markers)，並計算其染色體交換率與突變株表現型之間的關係，進而可推算出突變點的位置。即，當分子標記的交換率越大，則其離突變點位置越遠，交換率越小離突變點越近 (Jander et al. 2002, Peters et al. 2003)。

分子標記之選定係以具有生態型專一性的基因標記 (genetic markers) 定位出本發明之突變株 *hit2* 的突變位址。首先分別在5條染色體上各找出2組基因標記，測試突變株 *hit2* 與那一條染色體上的基因標記具有較小之交換率，再於此標記兩側尋找其他標記，逐一將範圍縮小。

物種間生態型的差異可包含但不僅限於利用簡單序列長度多型性 (simple sequence length polymorphism, SSLP) 及限制酵素切割擴增片段多型性 (cleaved amplified polymorphic sequence; CAPS) 來分析。例如簡單序列長度多型性為利用不同生態型的個體間基因體有插入或缺失 (insertion and deletion, InDels) 的基因體多型性，造成不同生態型的同樣基因體位置片段大小不同。實驗上以聚合

酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 將該片段倍增，比較片段大小的不同來分辨生態型的差異。(Ponce MR 1999, Lukowitz W et al. 2000, Peters et al. 2003)。SSLP 與 CAPS 是目前最為廣泛應用的分子標記方法，其共同特點為共顯性 (co-dominant) 的分子標記，可以辨認阿拉伯芥之兩條染色體，因此在進行實驗時可以提供充分的資訊；且 SSLP 與 CAPS 皆為以 PCR 為基礎，只需要使用瓊脂膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 便可進行數據分析 (Lukowitz W. et al. 2000)，操作上十分簡便省時，費用也較低。具有生態型專一性的基因標記可於 TAIR 網站 (<http://www.arabidopsis.org>) 上搜尋、或於 Cereon Arabidopsis Polymorphism Collection 網站 (<http://www.arabidopsis.org>) 下載已建檔之阿拉伯芥之去氧核糖核酸多型性資料庫，挑選出具有插入或刪除區段 (insertion and deletion; InDel) 或單核苷酸變異多型性 (single nucleotide polymorphism; SNP) 者，分別與 Columbia 生態型及 Landsberg 生態型之基因體序列比對，確認具有 InDel 或 SNP 之去氧核糖核酸多型性後，設計適合之引子 (primer) 以供進行 SSLP 或 CAPS 使用。上述之物種間生態型的差異分析及選擇具有生態型專一性基因標記的方法，此領域中具有通常知識者在不需過度實驗的情況下，可利用習知操作程序達成。

根據本發明實施例，定位之結果推知 *hit2* 突變點坐落於阿拉伯芥第五對染色體，與分子標記 so262 有較低的染色體交換率 17.8%，再經過更進一步分子標記染色體交換率分析

後，*hit2*突變位置在*nga151*與Cer456932之間1.3Mb的距離處（Wang, 2006）。本發明選擇*nga 151*作為染色體上之基因標記，接著再將*hit2*突變位置縮小至40kb，並進行基因體定序，找出造成*hit2*突變株表現型的突變基因為*XPO1A*。上述之基因操作方法，此領域中具有通常知識者可根據分子生物學技術操作之慣例，在不需過度實驗的情況下，選擇適當之操作手段即可達成；或根據與具有本發明相同技術內容之並主張新穎性優惠期限之學術論文“Isolation and characterization of the Arabidopsis *heat-intolerant 2 (hit2)* mutant reveal the essential role of the nuclear export receptor EXPORTIN1A (XPO1A) in plant heat tolerance”（New Phytologist (2010) 186:833-842 或 網址 www.newphytologist.com），此論文之所有內容亦全部併入於本說明書中。

請參照第 1 圖，為喪失高溫耐受性的阿拉伯芥突變株（*hit2*）所在之去氧核糖核酸重組圖譜。其中，（A）部分標示 *hit2* 突變株之突變位置，並以與突變位置相鄰的 *nga 151* 作為染色體上之 SSLP Marker；（B）部分為（A）部分所涵蓋之 *HIT2* 區域之放大圖，其中 *HIT2* 涵蓋之區域約為 20 kb 之片段大小，共有 5 個部分重疊（overlapping）的片段所組成，並於相對位置上標示其分子量（垂直線部分）之大小，括號中表示的數字則為其實際位於第 5 條染色體上之位置號碼；（C）部分為（B）部分所涵蓋的片段中，介於第 5 條染色體上標示 CER483173 與 CER483157 之間的約 5 Kb 大小的片段，以黑色顯示之區域為阿拉伯芥第 5

條染色體之 At5g17020 基因，其含有單一鹼基發生突變；

(D) 部分為突變株之 At5g17020 基因的外顯子-內含子結構 (Exon-intron structure)，於 At5g17020 有一額外的 T-DNA 插入的對偶基因 (alleles) 片段，此外，亦標示了與 At5g17020 相鄰的 *xpola-1* 及 *xpola-3*；(E) 部分為 (D) 部分所示之突變株之第 1092 鹼基處由 G 置換為 A 的單點突變情形。

根據第 1 圖 (A) 部分圖式所示，*hit2* 突變株之突變位置坐落於阿拉伯芥第 5 條染色體上一段 3MB 之區域中，與染色體上之 *ngal51* 相近。

(B) 部分係繪示 (A) 部分所涵蓋之 HIT2 區域之放大圖，其中 HIT2 涵蓋之區域約為 20 kb 之片段大小，可再進一步定位出一段含有 HIT2 之突變區域之約 5 Kb 大小的片段。

(C) 部分係顯示 (B) 部分所涵蓋的 5 Kb 片段為介於第 5 條染色體上標示 CER483173 與 CER483157 之間，經過解序並與野生株進行比對，發現位於阿拉伯芥第 5 條染色體之 At5g17020 位置 (以黑色顯示) 上有單一鹼基發生突變，經比對確認為 *XPO1A* 基因。

(D) 部分為 (C) 部分所示之阿拉伯芥突變株的 At5g17020 (約 0.5Kb) 基因放大圖，所含的外顯子-內含子結構以黑色方塊表示，阿拉伯芥高溫耐受性突變株在第 13 個 exon 處具有一由 G 置換為 A 的單點突變。

(E) 部分為 (D) 部分所示之阿拉伯芥突變株之基因 At5g17020 於第 1092 鹼基處的由 G 置換為 A 的單點突變情

形，顯示喪失高溫耐受性的阿拉伯芥突變株是由於 *XPO1A* 基因突變，在其所編碼的第 364 個胺基酸處由 G 置換為 A 而產生了終止子，形成長度不完全的截斷 *XPO1A* 蛋白（truncated *XPO1A*）而影響了 *XPO1A* 所負責的生理的功能。

第 1 圖之（F）部分為 *xpola-1* 與 *xpola-3* 突變株之高溫耐受性表現型分析。10 天齡的野生株及阿拉伯芥突變株在 37°C 培養 4 天後，*xpola-1* 與 *xpola-3* 突變株之表現型；（G）部分則為野生株及喪失高溫耐受性的阿拉伯芥突變株經過 44°C、20 分鐘熱休克處理後 8 天的表現型。（F）部分之結果顯示在 37°C 培養 4 天後，只有野生株能存活下來，突變株全數死亡；（G）部分之結果顯示在經過 44°C、20 分鐘熱休克處理後 8 天，只有野生株能存活下來，突變株全數死亡。

（四）阿拉伯芥突變株之生理試驗：

為了揭示 *XPO1A* 基因在植物對抗持續性長時間熱逆境所扮演的角色，以下進行一連串植物生理實驗，以喪失高溫耐受性之阿拉伯芥突變株與野生株比較，以確認 *XPO1A* 基因之真實功能，包括：熱休克處理對突變株與野生株之表現型影響、阿拉伯芥野生株與突變株對持續高溫處理及短時間熱休克處理的敏感度、經歷不同方式的高溫處理後阿拉伯芥野生株及突變株幼苗後續生長情況及存活率、阿拉伯芥野生株及突變株對氧化性壓力之敏感度、高溫逆境所誘導之氧化性壓力及光照對阿拉伯芥野生株及突變株之

影響等各種分析比較。

1、熱休克處理 (Heat Shock) 對突變株與野生株之表現型影響：

當植物處於非致死性的高溫時，會產生熱休克反應 (heat shock response)，而熱休克反應會使細胞產生熱休克蛋白來幫助植物度過致死性的高溫逆境。由於喪失高溫耐受性之阿拉伯芥突變株 *hit2* 是以長時間持續性的高溫為基礎篩選出來的突變株，因此可以藉由熱休克處理，觀察植株是否能產生熱休克反應來幫助植物度過致死性的高溫逆境，可有助了解植株在面對長時間持續性高溫的反應機制與面對短暫的高溫壓力之反應機制之間是否有關聯性。

第2圖為喪失高溫耐受性之阿拉伯芥突變株對於持續高溫處理及短時間熱休克處理的敏感度分析。其中 (A) 部分包含阿拉伯芥野生株 (Wild type) 與喪失高溫耐受性之阿拉伯芥突變株 (*hit2*) 之幼苗，在以 37°C 之長時間熱處理前 (左圖)、及經過 37°C 之長時間熱處理後培養 4 天 (右圖) 的對照照片；(B) 部分為 7 日齡之阿拉伯芥野生株與喪失高溫耐受性之突變株，已具有展開之子葉 (open eudicotyledons) 及真葉 (first pair of leaves) 的植株，於 44°C 熱休克處理 20 分鐘後，植物恢復於室溫培養以恢復其生理運作 (recovery) 後，分別於培養第 0、2、4 及 6 天紀錄之幼苗表現型的演變。

第2圖 (A) 部分顯示，在以 37°C 之長時間熱處理前 (左圖)，阿拉伯芥野生株 (Wild type) 與喪失高溫耐受性之阿

拉伯芥突變株之幼苗生長情況無明顯差異；而經過37°C之長時間熱處理後持續培養4天，其中野生株不受影響持續生長，但對喪失高溫耐受性之突變株會產生致死作用。另外第2圖（B）部分則顯示，於44°C熱休克處理20分鐘，再將植物恢復於室溫培養之後的6天內，可觀察到野生株不受影響持續生長，而喪失高溫耐受性之突變株則無持續生長跡象，並於第4天開始枯黃，第6天即完全白化（bleached）死亡。

2、熱休克處理及預馴化處理（pre-acclimation）對突變株與野生株經歷高溫逆境後的存活率影響：

第3圖為經歷不同方式的高溫處理後，阿拉伯芥野生株及突變株幼苗之後續生長情況及存活率分析結果。第3圖最上方係繪示四種不同處理方式與處理時間（heating regimens）之簡圖，將7日齡的阿拉伯芥野生株及突變株幼苗分為處理（A）、處理（B）、處理（C）及處理（D），各不同處理方式下方則顯示經過處理後的野生株及突變株之照片，最後將存活率分別計算於不同處理方式之最下方。存活率之計算係以經過上述處理後，仍持續生長綠色葉子的植株數量來計算。

其中，處理（A）為植株經過44°C處理30分鐘後，再於室溫持續培養至第8天之生長情況及存活率計算；處理（B）為植株經過44°C處理45分鐘後，再於室溫持續培養至第6天之生長情況及存活率計算；處理（C）為植株先經過37°C、60分鐘之預馴化處理後，於23°C培養60分鐘，再以

44℃處理45分鐘後，於室溫持續培養至第8天之生長情況及存活率計算；處理（D）為植株先經過37℃、60分鐘之預馴化處理後，於23℃培養2天，再以44℃處理90分鐘後，於室溫持續培養至第8天之生長情況及存活率計算。

第3圖之結果顯示，經歷處理（A）之植株於44℃處理30分鐘後，野生株的生長略受熱休克處理的影響，存活率為95%，突變株則全部無法在經歷過處理（A）之熱休克處理後存活；而不論是野生株或突變株，經歷處理（B）之44℃、45分鐘之熱休克處理後，於室溫持續培養時均無法繼續生長，至第6天時已全部死亡。

然而，當野生株或突變株以處理（C）之方式，先將植株以37℃預馴化處理60分鐘後，於23℃培養60分鐘，再以44℃、45分鐘之熱休克處理，可發現喪失高溫耐受性之阿拉伯芥突變株與野生株一樣，可於熱休克處理後繼續存活。同樣的情況亦發生於以處理（D）之方式處理的野生株或突變株，植株先以37℃預馴化處理60分鐘後於23℃培養2天，再給予44℃、90分鐘之持續高溫熱休克處理，結果不論是突變株或野生株，均可於不受影響繼續存活。因此，由第3圖之結果可看出，喪失高溫耐受性之阿拉伯芥突變株的幼苗，其先天抵抗高溫逆境的能力雖然受到影響，但仍可受到後天之預馴化產生對高溫之耐受能力，顯示預馴化處理可扮演使植株產生熱休克反應之環境逆境，使細胞產生熱休克蛋白以因應高溫造成的蛋白質功能不彰或導致生理現象改變，從而可幫助植物度過後續的致死性長時間高溫逆境，大幅提高存活機會。

3、氧化性壓力對突變株與野生株之表現型影響：

第4圖為阿拉伯芥野生株與突變株之種子於23℃持續光照下，於含有可容許種子發芽之不同甲基紫（methyl viologen; MV）濃度的瓊脂培養基上培養之生長發育情況。甲基紫為一種常用的誘導之植物細胞產生氧化性壓力之試劑。第4圖依照數據呈現方式可大致分為兩部分，一部分為（A）-（C），顯示阿拉伯芥野生株與突變株受到甲基紫抑制發芽或生長之曲線分析圖；另一部分為（D），顯示阿拉伯芥野生株與突變株受到甲基紫抑制生長之情況的實際照片。

第4圖之（A）、（B）及（C）中，標示（—●—）之曲線代表阿拉伯芥野生株之種子或幼苗，標示（—○—）之曲線代表喪失高溫耐受性之阿拉伯芥突變株之種子或幼苗，各點之數據計算係以一個培養皿放置60個種子，且每一種處理方式至少進行三重複之結果。校正棒（Error bars）顯示所有實驗的標準偏差；第4圖（D）為阿拉伯芥野生株及突變株的幼苗表現型，於含有 $0.5\mu\text{M}$ 之培養基中生長14天後的實際照片，照片中的所有植株係取自於同一個培養基中。

其中，第4圖之（A）為經過不同濃度（ $0.1-0.6\mu\text{M}$ ）之甲基紫處理後的阿拉伯芥野生株與突變株之種子發芽率的比較圖。種子發芽率（%）之計算，係於種子發芽10天後，計算目視可看到凸出根部（protruding radicals）的數量；（B）為經過不同濃度（ $0.1-0.6\mu\text{M}$ ）之甲基紫處理後的阿拉伯芥野生株與突變株之幼苗成熟率（%），即長出展開綠色子葉（green opened cotyledons）的比率的比較圖。

幼苗成熟率(%)之計算，係於培養14天後，計算長出綠色子葉的種子數量；(C)為阿拉伯芥野生株與突變株幼苗於含有 $0.5\mu\text{M}$ 甲基紫的瓊脂培養基上生長情況之比較圖，其中橫軸為生長天數。

由第4圖(A)的結果可得知，經過不同濃度($0.1-0.6\mu\text{M}$)之甲基紫處理後，阿拉伯芥野生株與突變株之種子發芽率呈現相似的情況，顯示以 $0.1-0.6\mu\text{M}$ 之濃度的甲基紫處理阿拉伯芥野生株與突變株之種子，不會對種子發芽產生明顯影響。

第4圖(B)的結果顯示，隨著甲基紫處理之濃度提高，明顯對阿拉伯芥突變株之幼苗成熟(長出展開的綠色子葉)產生不利影響，相較於阿拉伯芥野生株，突變株對於甲基紫誘導之氧化性壓力(methyl viologen-induced oxidative stress; MV-induced oxidative stress)更為敏感。

第4圖(C)的結果顯示，於含有 $0.5\mu\text{M}$ 甲基紫的瓊脂培養基上生長之阿拉伯芥野生株與突變株，從第7-8天開始，阿拉伯芥突變株之幼苗成熟率呈現下降情況，可能由於突變株之展開的綠色子葉已經開始邁向衰老，而阿拉伯芥野生株則維持穩定之生長，並未有明顯下降情況。第4圖(C)的結果亦可佐證先前於第4圖(B)所觀察到的阿拉伯芥突變株對於甲基紫誘導之氧化性壓力較野生株更為敏感的現象。

第4圖(D)之照片可看出阿拉伯芥突變株並未持續長大並呈現白化的現象，而野生株則維持正常之綠色，且植株發育得比較好。

4、高溫逆境誘導之氧化性壓力及光照對阿拉伯芥野生株與突變株存活率之影響：

前述之第4圖已證實了阿拉伯芥突變株對氧化性壓力較野生株敏感，以下則藉由在光照或黑暗條件下，面對高溫逆境後的幼苗存活率來佐證阿拉伯芥突變株之*xpol1a*突變是否與高溫逆境所誘導的氧化壓力敏感有關，並揭示阿拉伯芥突變株幼苗在遭遇高溫逆境之存活率是否會受光照之影響，以確認exportin 1A所參與之耐熱機制與高溫所產生之氧化壓力之間的關係。

第5圖為阿拉伯芥野生株及突變株在光照或黑暗條件下於面對高溫逆境後的幼苗存活率比較圖。其中，高溫逆境之處理方式包括處理方式A：以10日齡的植株，在有光照或黑暗條件下（以鋁箔紙包覆培養基之方式避光），生長於37°C環境並持續培養4天後之存活率分析（圖中左邊部分）；處理方式B：以7日齡的幼苗於44°C處理20分鐘後，將植株移往23°C之培養環境，並在光照或黑暗條件下生長6天之存活率分析（圖中右邊部分）。存活率之計算係以經過上述處理後，仍持續存活的植株數量來計算，每一數據係為6重複實驗之平均值，並以校正棒顯示所有實驗的標準偏差。圖中標示“*”符號係代表植株之存活率為零。

第5圖處理方式A之結果顯示，在避光環境下，可顯著提高阿拉伯芥突變株幼苗在高溫逆境（37°C培養4天）中的存活率達90%以上；而在光照環境下（標示“*”符號處），阿拉伯芥突變株幼苗在高溫逆境中的存活率為零。第5圖處理方式B之結果顯示，當阿拉伯芥突變株幼苗面對熱

休克壓力（44℃處理20分鐘）時，如移至23℃之光照環境下持續培養，阿拉伯芥突變株幼苗的存活率仍為零（標示“*”符號處）；然而如移至23℃之避光環境下培養時，則可恢復部分生理活性，產生存活率略為提昇約10%之現象。

根據第5圖所示之現象，顯示阿拉伯芥突變株幼苗在經歷熱休克時，可能快速地產生比高溫誘導之氧化壓力傷害更為嚴重的生理壓力，使光照培養對幼苗存活率的不利影響更為顯著。綜合上述結果，阿拉伯芥突變株之表現型可至少一部分歸因於欠缺充分之反應能力來對抗氧化傷害，而顯著地影響了幼苗在持續高溫逆境下的存活率，但對於保護植物對抗短時間的高溫熱休克時產生的影響則不大。由於高溫逆境會造成植物細胞活性氧的過度產生，而光照則會加強活性氧的傷害，因此根據第5圖揭示之黑暗中生長之阿拉伯芥突變株比在光照下生長之植株具有更佳之熱逆境耐受性之結果，可說明XPO1A蛋白應具有讓植物耐受因高溫所造成的氧化壓力的作用。

（五）阿拉伯芥XPO1A蛋白於植物組織中的表現及其耐熱機制分析：

根據遺傳序列之保留性，XPO1A蛋白可歸類為輸入蛋白 β -類細胞核轉運蛋白接受體家族（importin β -like nuclear transport receptor super family）之成員，可與一種以上具有富含白胺酸之核輸出訊號胺基序列（leucine-rich nuclear export signals; leu-rich NESs）的蛋白質反應，將蛋白質輸送至細胞核外。此外，XPO1亦負責引導許多種類的RNA通

過核被膜 (nuclear envelope)，以及蛋白質在細胞核與細胞質之間的進出。

由於細胞核轉運接受器具有調節熱休克轉錄因子 (heat shock factor) 在細胞質與細胞核之不同空間中動態濃度平衡之能力，而熱休克因子則會影響抗氧化基因之轉錄，為了確認XPO1A蛋白與細胞熱休克反應之間的關係，可以抽取阿拉伯芥野生株之不同組織細胞的總核糖核酸 (total RNA)，以專一性引子對 (序列編號：4及序列編號：5) 針對XPO1A基因之轉錄作用進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcriptional-polymerase chain reaction；RT-PCR)，並將增幅出之互補去氧核糖核酸 (cDNA) 以凝膠電泳分析之。

第6圖為阿拉伯芥野生株之各組織中XPO1A蛋白的基因表現分析。其中，第6圖之 (A) 部分為於23°C之環境下培養的阿拉伯芥野生株，於不同組織細胞中抽取之總核糖核酸 (total RNA) 並以序列編號：4及序列編號：5之專一性引子對進行反轉錄聚合酶連鎖反應之結果，內控制組 (internal control) 為分別抽取自相對應之組織的聚泛素 (Poly-ubiquitin；UBQ10) RNA，以聚泛素之專一性引子對 (Lee *et al.*, 2006) 進行RT-PCR；其中，凝膠電泳膠片之泳道1-6分別代表的組織為根部 (root)、叢生葉 (rosette leaf)、莖上的葉子 (cauline leaf)、莖 (stem) 及花 (flower)。

第6圖之 (B) 部分為10日齡之阿拉伯芥野生株幼苗於37°C之環境下培養0-48小時後，於不同時間點抽取之總核糖核酸，並以序列編號：4及序列編號：5之專一性引子對

進行反轉錄聚合酶連鎖反應之結果，正控制組（positive control）為於相對應時間點時植株的熱休克蛋白17.6A（*At-HSP17.6A*）表現結果，內控制組為抽取自相對應時間點時植株的聚泛素表現結果。其中，凝膠電泳膠片之泳道上方所示數字分別代表植株被移至37°C後培養的小時數。從第6圖（A）可得知於23°C之培養環境下，阿拉伯芥的 *XPO1A* 基因可於各個不同組織中表現，亦顯示XPO1A蛋白可於孢子體組織（sporophytic tissues）中表現；而第6圖（B）之結果顯示，雖然熱休克蛋白17.6A在經過高溫誘導後第6小時才大量表現，然而XPO1A蛋白之表現則自被移至37°C後開始至第48小時均呈現相對一致的情形，顯示 *XPO1A* 基因對植物所遭遇之長期性高溫逆境具有專一性，*XPO1A* 基因應具傳遞熱逆境訊息因子之能力，且必然負責著某分子於細胞核/質內外之間的動態平衡，而此未知分子對植物耐受高溫亦必有關鍵之作用。根據上述表一及第1-6圖所示之分析結果，意謂著在高溫環境下，阿拉伯芥中的XPO1A蛋白和XPO1B蛋白兩者所負責的生理功能有所不同，且XPO1A對植物之正常生長為非必要，但對植物耐受高溫逆境則為絕對必要。對於相關技術領域之習知常識來說，XPO1A蛋白具有此種功能實為特殊且為一全新的概念。

第二部分：應用及實例

因此，利用此一全新的概念，本發明之一實施方式為將一段可編碼產生XPO1A蛋白的去氧核糖核酸片段轉殖入一植物細胞中，藉由使含此去氧核糖核酸片段的轉植株表達外源性XPO1A蛋白，表現出可耐受高溫逆境的單一性狀。

本文所述「可編碼產生XPO1A蛋白的基因」，為XPO1A基因或與XPO1A基因同源（homology）且同功（analogy）之序列。上述序列可透過轉殖方式由適當的植株中取得，或是可以人工合成DNA方式來獲得此序列。適於本發明之可用以獲取XPO1A基因或與XPO1A基因同源且同功序列的植株，可包含但不僅限於十字花科植物，十字花科植物例如可為阿拉伯芥。此領域中具有通常知識者可在不需過度實驗的情況下，利用已知操作程序，獲取XPO1A基因或與XPO1A基因同源且同功之序列。

上述「XPO1A基因或與XPO1A基因同源且同功之序列」，包括序列編號：1所示的序列、其互補序列（complementary sequences）以及保留性類似物（conservative analogs），例如具有簡併性密碼子取代（degenerative codon substitutions）的同源性序列（homologous sequences）。根據本技術領域之常識，簡併性密碼子取代可以經由在核酸序列中的一或多個被選定的密碼子的第3位置處替換。

在本發明之實施例中，以所獲取之XPO1A基因或與XPO1A基因同源且同功之序列構築可轉譯出EXPOTIN1A的去氧核糖核酸片段，並轉殖入植物組織細胞，成為可於抵抗高溫逆境並維持正常生長之轉基因植物。適用於本發

明之植物組織細胞可包含但不僅限於十字花科植物、蕃茄等植物的之根、莖或葉的組織細胞。

適用於本發明之轉基因方法，包括但不限於利用載體、基因槍、顯微注射法、穿孔處理法或微脂粒融合法，將可編碼產生XPO1A蛋白的去氧核糖核酸片段轉殖入植物組織細胞中。

適用於本發明之載體，包括但不限於將可轉譯出EXPOTIN1A的去氧核糖核酸片段以質體(plasmid)或以可感染植物之植物病毒載體(Viral vectors)轉染於一植物組織細胞。

例如，利用細菌轉形(transformation)方式，將質體轉殖入植物細胞；可包含但不僅限於以土壤農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)，將含有可轉錄轉譯出XPO1A蛋白之基因片段的Ti-plasmid，導入植物宿主細胞；或者，將含可轉譯出EXPOTIN1A的去氧核糖核酸片段構築於病毒載體，感染特定植物宿主細胞。在一實施例中，載體可至少帶有一去氧核糖核酸片段，具有如序列編號：1所示之序列的去氧核糖核酸片段。

具有可編碼產生 XPO1A 蛋白序列之去氧核糖核酸片段，可於 XPO1A 基因、與 XPO1A 基因同源且同功之序列、或序列編號：1 所示之序列上游具有一啟動子區域，啟動子區域可包含持續表現型啟動子或誘導表現型啟動子。例如可為 35S promoter，或 AlcA promoter (ethanol-inducible system)。在一實施例中，包含於序列編號：1 所示之序列上游具有一持續表現型啟動子，此具有可編碼產生 XPO1A

蛋白序列之去氧核糖核酸片段為具有序列編號：2 所示序列的片段。在另一實施例中，包含於序列編號：1 所示之序列上游具有一誘導表現型啟動子，此具有可編碼產生 XPO1A 蛋白序列之去氧核糖核酸片段為具有序列編號：3 所示序列的片段。

除非特別指明，否則本文中所述「啟動子區域」涵蓋 RNA 聚合酶複合物（RNA polymerase）所辨識之啟動子序列、調節蛋白（regulator）所辨識之一或多個調節序列、持續表現型或誘導表現型啟動子序列、轉錄起始點序列。

此外，可根據不同植物種屬，將與 *XPO1A* 基因同源之去氧核糖核酸序列替換為目標宿主之偏好密碼子，或替換宿主偏好之啟動子區域序列，以促進異源 XPO1A 蛋白的表達。

依照本發明之另一實施方式，係利用可編碼產生 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸片段作為選殖轉基因植物的選擇性標幟（selection marker）。將一含有欲轉殖之基因與此選擇性標幟的重組基因片段，轉殖入一植物組織細胞中，並藉由特定之預馴化處理及熱休克處理，選殖出表現可耐受高溫逆境的單一性狀之轉殖株。

以下將提供本發明之一實施例，說明本發明之方法及異源 *XPO1A* 基因於轉基因植物中表現，對於提昇宿主耐受高溫逆境能力的效果。

實施例：（請提供可行之轉殖例）

一、質體 (pCAMBIA1300-*XPO1A*) 之構築

第7圖為質體 (pCAMBIA1300-*XPO1A*) 之構築流程圖。在本實施例中，係以阿拉伯芥之染色體為模版，利用引子對 (序列編號6及序列編號：7) 增幅*XPO1A*基因，得到可編碼產生*XPO1A*蛋白序列之去氧核糖核酸片段，如序列編號：2所示之去氧核糖核酸片段。

增幅出之片段先以*Nco*I及*Bam*HI截切，再與經由同樣限制酶剪切的載體pLOLA利用T₄接合酶 (T₄ DNA ligase) 以適當比例進行接合，得到構築完成的pLOLA-35S-*XPO1A*-nos質體。

以*Kpn*I截切pLOLA-35S-*XPO1A*-nos質體，可得到於*XPO1A*基因上游具有啟動子區域片段 (序列編號：8)、*XPO1A*基因下游加入終止子 (Terminator) 片段 (序列編號：9)，且5'端及3'端具有*Kpn*I切位的去氧核糖核酸片段，將此可編碼產生*XPO1A*蛋白序列之去氧核糖核酸片段再與經由同樣限制酶剪切的Ti-plasmid載體pCAMBIA1300，利用T₄接合酶 (T₄ DNA ligase) 以適當比例進行接合，得到構築完成的pCAMBIA1300-*XPO1A*質體 (序列編號：10) 上述質體選殖操作，可以包含但不限定以下列步驟完成：

首先進行植物組織之訊息核糖核酸 (mRNA) 萃取，可以商品化套組 (Genemark Plant Total RNA Miniprep Purification Kit) 萃取，或以習知的植物mRNA萃取方法進行，萃取到之RNA存放於-70℃保存。接著以反轉錄方式將mRNA合成cDNA模板。利用商品化套組 (SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen) 進行反轉錄反應。反應

物及試劑依下述比例依序進行：第一階段：1 μ l的Oligo dT (500 μ g/ μ l)、5 μ l的RNA (1 ng - 5 μ g)、1 μ l 的dNTP 混合液 (10mM)、5 μ l的DEPC無菌水，反應總體積為12 μ l，反應條件為65°C反應5分鐘後，以4°C終止反應。第二階段：4 μ l的5倍first-strand緩衝液、1 μ l的RNase抑制劑 (40單位/ μ l)、2 μ l 的0.1M DTT，反應條件為42°C反應2分鐘。第三階段：加入1 μ l (200單位) 反轉錄酶 (SuperscriptII Reverse Transcriptase)，於42°C反應50分鐘，之後以70°C處理15分鐘終止反應並保存於4°C，再加入1 μ l (2 單位) 的RNaseH，於37°C處理20分鐘，去除所有未反應的RNA，合成之cDNA模板存放於-20°C保存。

接著以聚合酶連鎖反應擴增*XPO1A*基因。反應物及試劑依下述比例進行：0.5 μ l的cDNA模板，依序加入0.4 μ l 的dNTP溶液 (10 mM)、1 μ l 的10倍濃縮聚合酶緩衝液 (10X-Taq DNA polymerase buffer)、各0.4 μ l 的引子對(序列編號6及序列編號：7)及0.1 μ l的 Taq-聚合酶 (Taq DNA polymerase)，加入6.7 μ l 無菌去離子水，調整總體積為9.5 μ l，置於聚合酶連鎖反應儀中進行聚合酶連鎖反應。反應條件為94°C反應10分鐘，94°C反應30秒、以下進行40個循環：65°C反應30秒、68°C反應1分30秒、68°C反應7分鐘，降溫至25°C終止反應。並以瓊脂糖膠體電泳觀察PCR之結果。

PCR產物回收可以瓊脂糖膠體電泳進行分離。將含有目標片段之膠體切下，並利用本技術領域中常用回收DNA的方法或商品化套組進行回收。回收後的產物即可進行後

續之剪切及接合反應。

DNA分子剪切依照限制酶廠商提供之流程進行。取適量DNA樣品與滅菌去離子水、限制酶緩衝液混合均勻後，再加入適量限制酶混合均勻，於酵素最適反應溫度下反應。

DNA接合反應利用商業化套組（pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems）及依照T₄接合酶廠商提供之流程進行。取質體pGEM[®]-T vector DNA及欲嵌入之DNA片段以適當比例混合後與滅菌去離子水、接合酶緩衝液混合均勻後，再加入適量接合酶混合均勻，於酵素最適反應溫度下反應一段時間再終止反應，即可進行轉形作用，轉形入大腸桿菌之DH5 α 勝任細胞中。

二、由大腸桿菌次選殖至農桿菌

將 pCAMBIA1300-*XPO1A* 質體由大腸桿菌轉形至農桿菌，可參照 Hofgen, R., and Willmitzer, L. (1988). Storage of competent cells for agrobacterium transformation. Nucl. Acids Res. 所提供之方法進行，例如可以包含但不限定以下列步驟完成：

（一）農桿菌勝任細胞之製備：

以 200 毫升含有適當抗生素之 LB 培養基（Luria-Bertani）於 28°C 培養農桿菌（Agrobacterium strain GV3101 PMP90）隔夜，當菌生長至指數期（OD₅₅₀ 約 0.5-0.8），將菌液離心 10 分鐘，以滅菌的 tris-EDTA 緩衝液（TE buffer）清洗 2 次，再以原培養體積之 1/10 重新懸浮於新的 LB 培養基中，分裝成 500 μ l 之冷凍管中，以液態氮冷凍並保存於 -80°C。

(二) 質體轉形：

將農桿菌勝任細胞置於冰上，加入約 $10\ \mu\text{l}$ 欲轉形之質體 DNA，置於冰上 5 分鐘後，放入液態氮中 5 分鐘後，再置於 37°C 水浴 5 分鐘，之後加入 1 毫升之 LB 培養基，於 28°C 震盪培養 2-4 小時，將菌體以離心方式濃縮並塗佈於 LB 平板培養基，於 28°C 培養 2 天。

三、植物細胞轉殖

(一) 植物材料以阿拉伯芥為例，將阿拉伯芥種子播於有機培養土中，在 $22^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ ，16hr/8hr 光/暗生長室中培養。待約一週後，第一對真葉長出即可分種至二吋盆中，持續培養 3-4 週後，摘心。

(二) 以農桿菌將質體 pCAMBIA1300-*XPO1A* 轉形入阿拉伯芥組織細胞，以真空滲入轉形法

(*Agrobacterium*-mediated vacuum infiltration transformation) 進行。

挑取 *Agrobacterium* 單一菌落，培養在 5 毫升含適當抗生素之 YEP 中，於 28°C 下培養隔夜。第二天，將菌培養於 250 毫升培養液中，使菌量增加。將菌液離心，去掉上清液，以新鮮配置的 AIM (無血清) 培養基 (配方： $1/2\ \text{MS salt} + \text{維生素 B5} + 0.01\ \text{mg/L BA} + 500\ \text{mg/L MES} + 5\%\ \text{sucrose} + 0.02\%\ \text{silwet-77}$)，重新懸浮細胞 ($\text{OD}_{600} = 0.6-1$)

取花序 15 公分左右的阿拉伯芥植株，剪掉果莢及已開的花，並將花盆開口的部分封住以避免土壤掉落後，將植物倒扣使花序插入菌液中。抽氣 (抽氣幫浦為 GAST

U.S.A. RAA-V 111-EB) 15 分鐘，接著讓植物平躺，置於黑暗中，隔天再立起。於 22°C/18°C，16hr/8hr 之光/暗培養約一個半月後可以收取種子。

雖然本發明已以實施方式揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

為讓本發明之上述和其他目的、特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之說明如下：

第 1 圖為喪失高溫耐受性的阿拉伯芥突變株 (*hit2*) 所在之去氧核糖核酸重組圖譜。。

第 2 圖為喪失高溫耐受性之阿拉伯芥突變株對於持續高溫處理及短時間熱休克處理的敏感度分析。

第 3 圖為經歷不同方式的高溫處理後，阿拉伯芥野生株及突變株幼苗之後續生長情況及存活率分析結果。

第 4 圖為為阿拉伯芥野生株與突變株之種子於 23°C 持續光照下，於含有可容許種子發芽之不同甲基紫濃度的瓊脂培養基上培養之生長發育情況。

第 5 圖為阿拉伯芥野生株及突變株在光照或黑暗條件下於面對高溫逆境後的幼苗存活率比較圖。

第 6 圖為阿拉伯芥野生株之各組織中 XPO1A 蛋白的基因表現分析。

第 7 圖為質體 pCAMBIA1300-*XPO1A* 之構築流程圖。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 國立中央大學
<120> 使植物表現後天性高溫逆境耐受性狀的方法及其應用
<160>
<210> SEQ ID NO: 1
<211> 3228
<212> DNA
<213>

<220> CDS
<223> *XPO1A* 基因序列
<400> 1

ATGGCGGCTGAGAAGTTAAGGGACTTGAGCCAGCCGATTGACGTCGGTGTGCTCGATGCC 60
MetAlaAlaGluLysLeuArgAspLeuSerGlnProIleAspValGlyValLeuAspAla

ACTGTTGCGGCCTTCTTTGTTACCGGATCTAAAGAAGAGAGAGCTGCTGCGGACCAGATT 120
ThrValAlaAlaPhePheValThrGlySerLysGluGluArgAlaAlaAlaAspGlnIle

TTGCGGGATTTGCAGGCTAATCCAGATATGTGGCTTCAAGTTGTCCACATTCTACAAAAT 180
LeuArgAspLeuGlnAlaAsnProAspMetTrpLeuGlnValValHisIleLeuGlnAsn

ACAAACAGCTTGGATACCAAGTTCTTTGCTCTGCAGGTTCTAGAAGGTGTTATAAAGTAT 240
ThrAsnSerLeuAspThrLysPhePheAlaLeuGlnValLeuGluGlyValIleLysTyr

AGATGGAATGCACTGCCTGTTGAACAACGAGATGGAATGAAAAATTACATCTCAGAGGTT 300
ArgTrpAsnAlaLeuProValGluGlnArgAspGlyMetLysAsnTyrIleSerGluVal

ATTGTACAGCTCTCGAGTAATGAAGCATCTTTCAGATCAGAAAGGCTCTATGTCAACAAG 360
IleValGlnLeuSerSerAsnGluAlaSerPheArgSerGluArgLeuTyrValAsnLys

CTAAATGTCATTTTGGTCCAGATCGTGAAACATGATTGGCCGGCAAAGTGGACAAGCTTC 420
LeuAsnValIleLeuValGlnIleValLysHisAspTrpProAlaLysTrpThrSerPhe

ATTCCTGATCTAGTTGCAGCTGCTAAAACTAGCGAAACTATCTGCGAAAAATTGCATGGCC 480
IleProAspLeuValAlaAlaAlaLysThrSerGluThrIleCysGluAsnCysMetAla

ATTTTGAACTCCTAAGTGAAGAGGTTTTTGATTTCTCAAGAGGAGAAATGACTCAGCAG 540
IleLeuLysLeuLeuSerGluGluValPheAspPheSerArgGlyGluMetThrGlnGln

AAGATTAAAGAGCTGAAACAATCTCTAAACAGTGAGTTTAAACTCATTCATGAGTTATGC 600
LysIleLysGluLeuLysGlnSerLeuAsnSerGluPheLysLeuIleHisGluLeuCys

CTATATGTCCTCTCAGCTTCTCAAAGACAGGATCTTATACGTGCAACACTGTCTGCATTG 660
LeuTyrValLeuSerAlaSerGlnArgGlnAspLeuIleArgAlaThrLeuSerAlaLeu

CATGCCTATCTTTCTGGATTCCATTGGGTTACATTTTGTGAGTCTACTTTGCTTGAGACC 720
HisAlaTyrLeuSerTrpIleProLeuGlyTyrIlePheGluSerThrLeuLeuGluThr

CTCCTTAAATTTTTCTGTGCCAGCATATAGGAACCTCACTATTCAATGTCTGACCGAG 780
LeuLeuLysPhePheProValProAlaTyrArgAsnLeuThrIleGlnCysLeuThrGlu

GTCGCAGCTCTTAATTTCTGGGACTTCTACAATGTTCAATATGTCAAAATGTATACCATA 840
ValAlaAlaLeuAsnPheGlyAspPheTyrAsnValGlnTyrValLysMetTyrThrIle

TTTATAGGGCAGCTGCGGATAATTCTCCACCGAGTACAAAGATCCCTGAGGCATATTCC 900
PheIleGlyGlnLeuArgIleIleLeuProProSerThrLysIleProGluAlaTyrSer

AGTGAAGTGGTGAAGAACAAGCATTTATCCAGAACCTGGCACTATTTTCACTTCCTTT 960
SerGlySerGlyGluGluGlnAlaPheIleGlnAsnLeuAlaLeuPhePheThrSerPhe

TTCAAGTTTCATATTCGAGTCCTAGAATCAACGCCAGAAGTTGTCTCTTGTACTCGCT 1020
PheLysPheHisIleArgValLeuGluSerThrProGluValValSerLeuLeuLeuAla

GGTCTAGAATATCTCATTAATATATCTTATGTTGACGACACTGAAGTATTTAAGGTTTGT 1080
GlyLeuGluTyrLeuIleAsnIleSerTyrValAspAspThrGluValPheLysValCys

TTGGACTATTGGAACCTCGTTGGTGTGGAGCTATTTGATGCGCATCATAATTCTGATAAC 1140
LeuAspTyrTrpAsnSerLeuValLeuGluLeuPheAspAlaHisHisAsnSerAspAsn

CCTGCAGTAAGTGCAAGCCTGATGGGTTTGCAGCCTTTCCTTCTGGTATGGTTGATGGC 1200
ProAlaValSerAlaSerLeuMetGlyLeuGlnProPheLeuProGlyMetValAspGly

CTTGGTTCTCAAGTCATGCAGCGGCGTCAACTTTATTCTCACCCAATGTCCAAATTAAGA 1260
LeuGlySerGlnValMetGlnArgArgGlnLeuTyrSerHisProMetSerLysLeuArg

GGGTTAATGATTAACCGCATGGCGAAGCCTGAAGAAGTGCTTATTGTTGAAGATGAAAAT 1320
GlyLeuMetIleAsnArgMetAlaLysProGluGluValLeuIleValGluAspGluAsn

GGGAACATCGTTCGTGAAACCATGAAGGACAATGATGTTCTTGTCCAATATAAGATAATG 1380
GlyAsnIleValArgGluThrMetLysAspAsnAspValLeuValGlnTyrLysIleMet

CGGGAGACATTAATCTACCTCTCACACCTTGACCATGATGATACCGAGAAGCAGATGTTG 1440
ArgGluThrLeuIleTyrLeuSerHisLeuAspHisAspAspThrGluLysGlnMetLeu

AGGAAGCTAAACAAACAATTAAGTGGGGAGGAATGGGCATGGAACAATTTGAACACTTTG 1500
ArgLysLeuAsnLysGlnLeuSerGlyGluGluTrpAlaTrpAsnAsnLeuAsnThrLeu

TGCTGGGCTATTGGGTCTATTTCCGGATCTATGGCAGAAGATCAGGAAAACAGGTTTTTG 1560
CysTrpAlaIleGlySerIleSerGlySerMetAlaGluAspGlnGluAsnArgPheLeu

GTGATGGTCATTCGTGATTTGTTGAATTTATGTGAAATTACCAAGGGAAAAGACAATAAA 1620
ValMetValIleArgAspLeuLeuAsnLeuCysGluIleThrLysGlyLysAspAsnLys

GCCGTTATTGCAAGCAACATCATGTATGTCGTTGGCCAGTATCCAAGATTCTTAAGGGCC 1680
AlaValIleAlaSerAsnIleMetTyrValValGlyGlnTyrProArgPheLeuArgAla

CATTGGAAGTTTTTTGAAGACAGTTGTGAACAAGTTGTTTGAATTCATGCATGAAACACAT 1740
HisTrpLysPheLeuLysThrValValAsnLysLeuPheGluPheMetHisGluThrHis

CCTGGTGTTTCAGGACATGGCCTGTGATACATTCTTGAAAATAGTTCAAAAGTGCAAGCGA 1800
ProGlyValGlnAspMetAlaCysAspThrPheLeuLysIleValGlnLysCysLysArg

AAATTCGTTATTGTACAGGTTGGAGAGAATGAACCATTTGTATCTGAACTTCTAACAGGC 1860
LysPheValIleValGlnValGlyGluAsnGluProPheValSerGluLeuLeuThrGly

CTTGCAACAACACTGTTCAAGATCTTGAGCCTCATCAAATACACTCATTTTATGAATCAGTT 1920
LeuAlaThrThrValGlnAspLeuGluProHisGlnIleHisSerPheTyrGluSerVal

GGTAATATGATCCAAGCAGAATCAGATCCTCAGAAGAGAGATGAATATCTCCAGAGGTTG 1980
GlyAsnMetIleGlnAlaGluSerAspProGlnLysArgAspGluTyrLeuGlnArgLeu

ATGGCACTCCCCAACAGAAATGGGCAGAAATCATAGGACAGGCACGCCACAGTGTAGAA 2040
MetAlaLeuProAsnGlnLysTrpAlaGluIleIleGlyGlnAlaArgHisSerValGlu

TTCCTCAAGGATCAAGTTGTGATACGTACAGTGCTAAACATCCTACAGACTAATACTAGT 2100
PheLeTlysAspGlnValValIleArgThrValLeTAsnIleLeTGlnThrAsnThrSer

GCTGCTACTTCACTGGGAACATACTTCTTATCCCAAATTCCTTGATTTTCTTGATATG 2160
AlaAlaThrSerLeTGlyThrTyrPheLeTSerGlnIleSerLeTllePheLeTAspMet

TTGAATGTATACAGAATGTACAGTGAGCTTGTGTCAACCAACATTACTGAGGGAGGACCA 2220
LeuAsnValTyrArgMetTyrSerGluLeuValSerThrAsnIleThrGluGlyGlyPro

TATGCTTCCAAGACATCTTTTGTAAACTCTTAAGATCGGTTAAGAGGGAAACACTTAAG 2280
TyrAlaSerLysThrSerPheValLysLeuLeuArgSerValLysArgGluThrLeuLys

CTGATAGAAACCTTTTTAGACAAAGCTGAAGACCAGCCACACATAGGGAAACAATTTGTG 2340
LeuIleGluThrPheLeuAspLysAlaGluAspGlnProHisIleGlyLysGlnPheVal

CCGCCAATGATGGAATCAGTACTTGGTGACTATGCGAGGAATGTGCCTGATGCTAGGGAA 2400
ProProMetMetGluSerValLeuGlyAspTyrAlaArgAsnValProAspAlaArgGlu

TCCGAAGTTCTTTCACTCTTTGCAACGATTATAAAACAAGTACAAGGCAACAATGTTAGAC 2460
SerGluValLeuSerLeuPheAlaThrIleIleAsnLysTyrLysAlaThrMetLeuAsp

GACGTGCCTCACATATTTGAAGCTGTATTCCAGTGTTACATTGGAGATGATAACTAAGAAC 2520
AspValProHisIlePheGluAlaValPheGlnCysThrLeuGluMetIleThrLysAsn

TTTGAAGATTATCCAGAACACCGCCTCAAGTTTTTCTCATTACTCCGTGCTATTGCTACG 2580
PheGluAspTyrProGluHisArgLeuLysPhePheSerLeuLeuArgAlaIleAlaThr

TTTTGTTTCCCTGCCTTGATAAAGTTATCAAGTCCGCAACTGAAGCTAGTGATGGATTCA 2640
PheCysPheProAlaLeuIleLysLeuSerSerProGlnLeuLysLeuValMetAspSer

ATTATCTGGGCATTTAGACATACTGAGAGAAAATATTGCTGAAACCGGGCTTAATCTTTTG 2700
IleIleTrpAlaPheArgHisThrGluArgAsnIleAlaGluThrGlyLeuAsnLeuLeu

CTTGAGATGCTGAAAACTTTCAGCAATCTGAATTTTGTAAATCAATTCTACCGGTCATAC 2760
LeuGluMetLeuLysAsnPheGlnGlnSerGluPheCysAsnGlnPheTyrArgSerTyr

TTTATGCAAATCGAGCAAGAAATATTTGCCGTTTTGACCGATACCTTCCATAAGCCTGGC 2820
PheMetGlnIleGluGlnGluIlePheAlaValLeuThrAspThrPheHisLysProGly

TTCAAGCTACATGTGTTGGTGCTGCAGCAACTGTTTTGCCTGCCTGAGAGCGGTGCTTTG 2880
PheLysLeuHisValLeuValLeuGlnGlnLeuPheCysLeuProGluSerGlyAlaLeu

ACAGAACCCTTGTGGGATGCTACAACCGTTCCTTACCCGTATCCGGACAACGTTGCATTT 2940
ThrGluProLeuTrpAspAlaThrThrValProTyrProTyrProAspAsnValAlaPhe

GTTTCGGAATACACCATTAAGCTACTGAGCTCTTCATTCCCAAACATGACTGCAGCAGAG 3000
ValArgGltTyrThrIleLysLeuLeuSerSerSerPheProAsnMetThrAlaAlaGlt

GTCACACAATTTGTGAATGGACTATACGAGTCTAGAAATGACCCGTCTGGATTTAAGAAT 3060
ValThrGlnPheValAsnGlyLeuTyrGluSerArgAsnAspProSerGlyPheLysAsn

AACATTCGTGACTTCCTTGTACAGTCTAAGGAGTTTTCCGCTCAGGATAACAAAGATCTC 3120
AsnIleArgAspPheLeuValGlnSerLysGluPheSerAlaGlnAspAsnLysAspLeu

TATGCTGAGGAAGCAGCTGCACAGAGAGAGAGAGAACGTCAAAGAATGCTTTCAATTCCT 3180

TyrAlaGluGluAlaAlaAlaGlnArgGluArgGluArgGlnArgMetLeuSerIlePro

GGGCTTATTGCTCCTAATGAGATTCAAGACGAGATGGTGGACTCATAA 3228

GlyLeuIleAlaProAsnGluIleGlnAspGluMetValAspSer *

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 3516

<212> DNA

<213> 人工序列

<220> CDS

<223> 可轉錄 XPO1A 的 DNA 片段

<400> 2

tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctctc ggattccatt gccagctat 60
ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaata ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg 120
cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtgggtccca aagatggacc 180
cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt 210
ggattgatgt gatattctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact atccttcgca 240
agacccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttggag agaacacg 288

ATGGCGGCTGAGAAAGTTAAGGGACTTGAGCCAGCCGATTGACGTCGGTGTGCTCGATGCC 348

MetAlaAlaGluLysLeuArgAspLeuSerGlnProIleAspValGlyValLeuAspAla

ACTGTTGCGGCCCTTCTTTGTTACCGGATCTAAAGAAGAGAGAGCTGCTGCGGACCAGATT 408

ThrValAlaAlaPhePheValThrGlySerLysGluGluArgAlaAlaAlaAspGlnIle

TTGCGGGATTGTCAGGCTAATCCAGATATGTGGCTTCAAGTTGTCCACATTCTACAAAAT 468

LeuArgAspLeuGlnAlaAsnProAspMetTrpLeuGlnValValHisIleLeuGlnAsn

ACAAACAGCTTGGATACCAAGTTCTTTGCTCTGCAGGTTCTAGAAGGTGTTATAAAGTAT 528

ThrAsnSerLeuAspThrLysPhePheAlaLeuGlnValLeuGluGlyValIleLysTyr

AGATGGAATGCACTGCCTGTTGAACAACGAGATGGAATGAAAAATTACATCTCAGAGGTT 588

ArgTrpAsnAlaLeuProValGluGlnArgAspGlyMetLysAsnTyrIleSerGluVal

ATTGTACAGCTCTCGAGTAATGAAGCATCTTTCAGATCAGAAAGGCTCTATGTCAACAAG 648

IleValGlnLeuSerSerAsnGluAlaSerPheArgSerGluArgLeuTyrValAsnLys

CTAAATGTCATTTTGGTCCAGATCGTGAAACATGATTGGCCGGCAAAGTGGACAAGCTTC 708

LeuAsnValIleLeuValGlnIleValLysHisAspTrpProAlaLysTrpThrSerPhe

ATTCCTGATCTAGTTGCAGCTGCTAAAACTAGCGAAACTATCTGCGAAAATTGCATGGCC 768

IleProAspLeuValAlaAlaAlaLysThrSerGluThrIleCysGluAsnCysMetAla

ATTTTGAACTCCTAAGTGAAGAGGTTTTTGATTCTCAAGAGGAGAAATGACTCAGCAG 828
IleLeuLysLeuLeuSerGluGluValPheAspPheSerArgGlyGluMetThrGlnGln

AAGATTAAAGAGCTGAAACAATCTCTAAACAGTGAGTTTAACTCATTCATGAGTTATGC 808
LysIleLysGluLeuLysGlnSerLeuAsnSerGluPheLysLeuIleHisGluLeuCys

CTATATGTCCTCTCAGCTTCTCAAAGACAGGATCTTATACGTGCAACACTGTCTGCATTG 948
LeuTyrValLeuSerAlaSerGlnArgGlnAspLeuIleArgAlaThrLeuSerAlaLeu

CATGCCTATCTTTCTGGATTCCATTGGGTTACATTTTTGAGTCTACTTTGCTTGAGACC 1008
HisAlaTyrLeuSerTrpIleProLeuGlyTyrIlePheGluSerThrLeuLeuGluThr

CTCCTTAAATTTTTCTGTGCCAGCATATAGGAACCTCACTATTCAATGTCTGACCGAG 1068
LeuLeuLysPhePheProValProAlaTyrArgAsnLeuThrIleGlnCysLeuThrGlu

GTCGCAGCTCTTAATTTCTGGGACTTCTACAATGTTCAATATGTCAAAATGTATACCATA 1128
ValAlaAlaLeuAsnPheGlyAspPheTyrAsnValGlnTyrValLysMetTyrThrIle

TTTATAGGGCAGCTGCGGATAATTCTCCCACCGAGTACAAAGATCCCTGAGGCATATTCC 1188
PheIleGlyGlnLeuArgIleIleLeuProProSerThrLysIleProGluAlaTyrSer

AGTGGAAGTGGTGAAGAACAAGCATTTATCCAGAACCTGGCACTATTTTTCACTTCCTTT 1248
SerGlySerGlyGluGluGlnAlaPheIleGlnAsnLeuAlaLeuPhePheThrSerPhe

TTCAAGTTTCATATTCGAGTCCTAGAATCAACGCCAGAAGTTGTCTCTTTGTTACTCGCT 1308
PheLysPheHisIleArgValLeuGluSerThrProGluValValSerLeuLeuLeuAla

GGTCTAGAATATCTCATTAATATATCTTATGTTGACGACACTGAAGTATTTAAGGTTTGT 1368
GlyLeuGluTyrLeuIleAsnIleSerTyrValAspAspThrGluValPheLysValCys

TTGGACTATTGGAACCTCGTTGGTGTGGAGCTATTTGATGCGCATCATAATTCTGATAAC 1428
LeuAspTyrTrpAsnSerLeuValLeuGluLeuPheAspAlaHisHisAsnSerAspAsn

CCTGCAGTAAGTGCAAGCCTGATGGGTTTGCAGCCTTTCCTTCCTGGTATGGTTGATGGC 1488
ProAlaValSerAlaSerLeuMetGlyLeuGlnProPheLeuProGlyMetValAspGly

CTTGGTTCTCAAGTCATGCAGCGGCGTCAACTTTATTCTACCCAATGTCCAAATTAAGA 1548
LeuGlySerGlnValMetGlnArgArgGlnLeuTyrSerHisProMetSerLysLeuArg

GGGTAAATGATTAACCGCATGGCGAAGCCTGAAGAAGTGCTTATTGTTGAAGATGAAAAT 1608
GlyLeuMetIleAsnArgMetAlaLysProGluGluValLeuIleValGluAspGluAsn

GGGAACATCGTTCTGTGAAACCATGAAGGACAATGATGTTCTTGTCCAATATAAGATAATG 1668
GlyAsnIleValArgGluThrMetLysAspAsnAspValLeuValGlnTyrLysIleMet

CGGGAGACATTAATCTACCTCTCACACCTTGACCATGATGATACCGAGAAGCAGATGTTG 1728
ArgGluThrLeuIleTyrLeuSerHisLeuAspHisAspAspThrGluLysGlnMetLeu

AGGAAGCTAAACAAACAATTAAGTGGGGAGGAATGGGCATGGAACAATTTGAACACTTTG 1788
ArgLysLeuAsnLysGlnLeuSerGlyGluGluTrpAlaTrpAsnAsnLeuAsnThrLeu

TGCTGGGCTATTGGGTCTATTTCCGGATCTATGGCAGAAGATCAGGAAAACAGGTTTTTG 1848
CysTrpAlaIleGlySerIleSerGlySerMetAlaGluAspGlnGluAsnArgPheLeu

GTGATGGTCATTTCGTGATTTGTTGAATTTATGTGAAATTACCAAGGGAAAAGACAATAAA 1908
ValMetValIleArgAspLeuLeuAsnLeuCysGluIleThrLysGlyLysAspAsnLys

GCCGTTATTGCAAGCAACATCATGTATGTCGTTGGCCAGTATCCAAGATTCTTAAGGGCC 1968
AlaValIleAlaSerAsnIleMetTyrValValGlyGlnTyrProArgPheLeuArgAla

CATTGGAAGTTTTTTGAAGACAGTTGTGAACAAGTTGTTTGAATTCATGCATGAAACACAT 2028
HisTrpLysPheLeuLysThrValValAsnLysLeuPheGluPheMetHisGluThrHis

CCTGGTGTTTCAGGACATGGCCTGTGATACATTCTTGAAAATAGTTCAAAAGTGCAAGCGA 2088
ProGlyValGlnAspMetAlaCysAspThrPheLeuLysIleValGlnLysCysLysArg

AAATTCGTTATTGTACAGGTTGGAGAGAATGAACCATTTGTATCTGAACTTCTAACAGGC 2148
LysPheValIleValGlnValGlyGluAsnGluProPheValSerGluLeuLeuThrGly

CTTGCAACAACGTTCAGATCTTGAGCCTCATCAAATACACTCATTTTATGAATCAGTT 2208
LeuAlaThrThrValGlnAspLeuGluProHisGlnIleHisSerPheTyrGluSerVal

GGTAATATGATCCAAGCAGAATCAGATCCTCAGAAGAGAGATGAATATCTCCAGAGGTTG 2268
GlyAsnMetIleGlnAlaGluSerAspProGlnLysArgAspGluTyrLeuGlnArgLeu

ATGGCACTCCCCAACAGAAATGGGCAGAAATCATAGGACAGGCACGCCACAGTGTAGAA 2328
MetAlaLeuProAsnGlnLysTrpAlaGluIleIleGlyGlnAlaArgHisSerValGlu

TTCTCAAGGATCAAGTTGTGATACGTACAGTGCTAAACATCCTACAGACTAATACTAGT 2388
PheLeTlysAspGlnValValIleArgThrValLeTAsnIleLeTGlnThrAsnThrSer

GCTGCTACTTCACTGGGAACATACTTCTTATCCCAAATTCCTTGATTTTCTTGGATATG 2448
AlaAlaThrSerLeTGlyThrTyrPheLeTSerGlnIleSerLeTlePheLeTAspMet

TTGAATGTATACAGAATGTACAGTGAGCTTGTGTCAACCAACATTACTGAGGGAGGACCA 2508
LeuAsnValTyrArgMetTyrSerGluLeuValSerThrAsnIleThrGluGlyGlyPro

TATGCTTCCAAGACATCTTTTGTAAACTCTTAAGATCGGTTAAGAGGGAAACACTTAAG 2568
TyrAlaSerLysThrSerPheValLysLeuLeuArgSerValLysArgGluThrLeuLys

CTGATAGAAACCTTTTTAGACAAAGCTGAAGACCAGCCACACATAGGGAAACAATTTGTG 2628
LeuIleGluThrPheLeuAspLysAlaGluAspGlnProHisIleGlyLysGlnPheVal

CCGCCAATGATGGAATCAGTACTTGGTGACTATGCGAGGAATGTGCCTGATGCTAGGGAA 2688
ProProMetMetGluSerValLeuGlyAspTyrAlaArgAsnValProAspAlaArgGlu

TCCGAAGTTCTTTCACTCTTTGCAACGATTATAACAAGTACAAGGCAACAATGTTAGAC 2748
SerGluValLeuSerLeuPheAlaThrIleIleAsnLysTyrLysAlaThrMetLeuAsp

GACGTGCCTCACATATTTGAAGCTGTATTCCAGTGATGAGATGATAACTAAGAAC 2808
AspValProHisIlePheGluAlaValPheGlnCysThrLeuGluMetIleThrLysAsn

TTTGAAGATTATCCAGAACACCGCCTCAAGTTTTTCTCATTACTCCGTGCTATTGCTACG 2868
PheGluAspTyrProGluHisArgLeuLysPhePheSerLeuLeuArgAlaIleAlaThr

TTTTGTTTCCCTGCCTTGATAAAGTTATCAAGTCCGCAACTGAAGCTAGTGATGGATTCA 2928
PheCysPheProAlaLeuIleLysLeuSerSerProGlnLeuLysLeuValMetAspSer

ATTATCTGGGCATTTAGACATACTGAGAGAAATATTGCTGAAACCGGGCTTAATCTTTTG 2988
IleIleTrpAlaPheArgHisThrGluArgAsnIleAlaGluThrGlyLeuAsnLeuLeu

CTTGAGATGCTGAAAACTTTCAGCAATCTGAATTTTGTAATCAATTCTACCGGTCATAC 3048
LeuGluMetLeuLysAsnPheGlnGlnSerGluPheCysAsnGlnPheTyrArgSerTyr

TTTATGCAAATCGAGCAAGAAATATTTGCCGTTTTGACCGATACCTTCCATAAGCCTGGC 3108
PheMetGlnIleGluGlnGluIlePheAlaValLeuThrAspThrPheHisLysProGly

TTCAAGCTACATGTGTTGGTGCTGCAGCAACTGTTTTGCCTGCCTGAGAGCGGTGCTTTG 3168
PheLysLeuHisValLeuValLeuGlnGlnLeuPheCysLeuProGluSerGlyAlaLeu

ACAGAACCTTGTGGGATGCTACAACCGTTCCTTACCCGTATCCGGACAACGTTGCATTT 3228
ThrGluProLeuTrpAspAlaThrThrValProTyrProTyrProAspAsnValAlaPhe

GTTCGCGAATACACCATTAAGCTACTGAGCTCTTCATTCCCAAACATGACTGCAGCAGAG 3288
ValArgGltTyrThrIleLysLeTLeTSerSerSerPheProAsnMetThrAlaAlaGlt

GTCACACAATTTGTGAATGGACTATACGAGTCTAGAAATGACCCGTCTGGATTTAAGAAT 3348
ValThrGlnPheValAsnGlyLeuTyrGluSerArgAsnAspProSerGlyPheLysAsn

AACATTCGTGACTTCCTTGTACAGTCTAAGGAGTTTTCCGCTCAGGATAACAAAGATCTC 3408
AsnIleArgAspPheLeuValGlnSerLysGluPheSerAlaGlnAspAsnLysAspLeu

TATGCTGAGGAAGCAGCTGCACAGAGAGAGAGAGAACGTCAAAGAATGCTTTCAATTCCT 3468
TyrAlaGluGluAlaAlaAlaGlnArgGluArgGluArgGlnArgMetLeuSerIlePro

GGGCTTATTGCTCCTAATGAGATTCAAGACGAGATGGTGGACTCATAA 35283516
GlyLeuIleAlaProAsnGluIleGlnAspGluMetValAspSer *

<210> SEQ ID NO: 3

<211> 32283453

<212> DNA

<213> 人工序列

<220> CDS

<223> 可轉錄 XPO1A 的 DNA 片段

<400> 3

tatgcgggat agttccgacc taggattgga tgcattgcgga accgcacgag ggcggggcgg 60
aaattgacac accactcctc tccacgcacc gttcaagagg tacgcgtata gagccgtata 120
gagcagagac ggagcacttt ctggtactgt ccgcacggga tgtccgcacg gagagccaca 180
aacgagcggg gccccgtacg tgctctccta cccaggatc gcatccccgc atagctgaac 210
atctatataa ctgca 225

ATGGCGGCTGAGAAAGTTAAGGGACTTGAGCCAGCCGATTGACGTCGGTGTGCTCGATGCC 285
MetAlaAlaGluLysLeuArgAspLeuSerGlnProIleAspValGlyValLeuAspAla

ACTGTTGCGGCCTTCTTTGTTACCGGATCTAAAGAAGAGAGAGCTGCTGCGGACCAGATT 345
ThrValAlaAlaPhePheValThrGlySerLysGluGluArgAlaAlaAlaAspGlnIle

TTGCGGGATTTGCAGGCTAATCCAGATATGTGGCTTCAAGTTGTCCACATTCTACAAAAT 405
LeuArgAspLeuGlnAlaAsnProAspMetTrpLeuGlnValValHisIleLeuGlnAsn

ACAAACAGCTTGGATACCAAGTTCTTTGCTCTGCAGGTTCTAGAAGGTGTTATAAAGTAT 465
ThrAsnSerLeuAspThrLysPhePheAlaLeuGlnValLeuGluGlyValIleLysTyr

AGATGGAATGCACTGCCTGTTGAACAACGAGATGGAATGAAAAATTACATCTCAGAGGTT 525
ArgTrpAsnAlaLeuProValGluGlnArgAspGlyMetLysAsnTyrIleSerGluVal

ATTGTACAGCTCTCGAGTAATGAAGCATCTTTCAGATCAGAAAGGCTCTATGTCAACAAG 585
IleValGlnLeuSerSerAsnGluAlaSerPheArgSerGluArgLeuTyrValAsnLys

CTAAATGTCATTTTGGTCCAGATCGTGAAACATGATTGGCCGGCAAAGTGGACAAGCTTC 645
LeuAsnValIleLeuValGlnIleValLysHisAspTrpProAlaLysTrpThrSerPhe

ATTCCTGATCTAGTTGCAGCTGCTAAAACTAGCGAAACTATCTGCGAAAATTGCATGGCC 705
IleProAspLeuValAlaAlaAlaLysThrSerGluThrIleCysGluAsnCysMetAla

ATTTTGAAACTCCTAAGTGAAGAGGTTTTTGGATTCTCAAGAGGAGAAATGACTCAGCAG 765
IleLeuLysLeuLeuSerGluGluValPheAspPheSerArgGlyGluMetThrGlnGln

AAGATTAAAGAGCTGAAACAATCTCTAAACAGTGAGTTTAACTCATTTCATGAGTTATGC 825
LysIleLysGluLeuLysGlnSerLeuAsnSerGluPheLysLeuIleHisGluLeuCys

CTATATGTCCTCTCAGCTTCTCAAAGACAGGATCTTATACGTGCAACACTGTCTGCATTG 885
LeuTyrValLeuSerAlaSerGlnArgGlnAspLeuIleArgAlaThrLeuSerAlaLeu

CATGCCTATCTTTCCTGGATTCCATTGGGTTACATTTTTGAGTCTACTTTGCTTGAGACC 945
HisAlaTyrLeuSerTrpIleProLeuGlyTyrIlePheGluSerThrLeuLeuGluThr

CTCCTTAAATTTTTTCTGTGCCAGCATATAGGAACCTCACTATTCAATGTCTGACCGAG 1005
LeuLeuLysPhePheProValProAlaTyrArgAsnLeuThrIleGlnCysLeuThrGlu

GTCGCAGCTCTTAATTTTCGGGGACTTCTACAATGTTCAATATGTCAAATGTATACCATA 1065
ValAlaAlaLeuAsnPheGlyAspPheTyrAsnValGlnTyrValLysMetTyrThrIle

TTTATAGGGCAGCTGCGGATAATTCTCCCACCGAGTACAAAGATCCCTGAGGCATATTCC 1125
PheIleGlyGlnLeuArgIleIleLeuProProSerThrLysIleProGluAlaTyrSer

AGTGGAAGTGGTGAAGAACAAGCATTATCCAGAACCTGGCACTATTTTTCACTTCCTTT 1185
SerGlySerGlyGluGluGlnAlaPheIleGlnAsnLeuAlaLeuPhePheThrSerPhe

TTCAAGTTTCATATTCGAGTCCTAGAATCAACGCCAGAAGTTGTCTCTTTGTTACTCGCT 1245
PheLysPheHisIleArgValLeuGluSerThrProGluValValSerLeuLeuLeuAla

GGTCTAGAATATCTCATTAATATATCTTATGTTGACGACACTGAAGTATTTAAGGTTTGT 1305
GlyLeuGluTyrLeuIleAsnIleSerTyrValAspAspThrGluValPheLysValCys

TTGGACTATTGGAACCTCGTTGGTGTGGAGCTATTTGATGCGCATCATAATTCTGATAAC 1365
LeuAspTyrTrpAsnSerLeuValLeuGluLeuPheAspAlaHisHisAsnSerAspAsn

CCTGCAGTAAGTGCAAGCCTGATGGGTTTGCAGCCTTTCCTTCCTGGTATGGTTGATGGC 1425
ProAlaValSerAlaSerLeuMetGlyLeuGlnProPheLeuProGlyMetValAspGly

CTTGTTCTCAAGTCATGCAGCGGCGTCAACTTTATTCTCACCCAATGTCCAAATTAAGA 1485
LeuGlySerGlnValMetGlnArgArgGlnLeuTyrSerHisProMetSerLysLeuArg

GGGTTAATGATTAAACCGCATGGCGAAGCCTGAAGAAGTGCTTATTGTTGAAGATGAAAAT 1545
GlyLeuMetIleAsnArgMetAlaLysProGluGluValLeuIleValGluAspGluAsn

GGGAACATCGTTCGTGAAACCATGAAGGACAATGATGTTCTTGTCCAATATAAGATAATG 1605
GlyAsnIleValArgGluThrMetLysAspAsnAspValLeuValGlnTyrLysIleMet

CGGGAGACATTAATCTACCTCTCACACCTTGACCATGATGATACCGAGAAGCAGATGTTG 1665
ArgGluThrLeuIleTyrLeuSerHisLeuAspHisAspAspThrGluLysGlnMetLeu

AGGAAGCTAAACAAACAATTAAGTGGGGAGGAATGGGCATGGAACAATTTGAACACTTTG 1725
ArgLysLeuAsnLysGlnLeuSerGlyGluGluTrpAlaTrpAsnAsnLeuAsnThrLeu

TGCTGGGCTATTGGGTCTATTTCCGGATCTATGGCAGAAGATCAGGAAAACAGGTTTTTG 1785
CysTrpAlaIleGlySerIleSerGlySerMetAlaGluAspGlnGluAsnArgPheLeu

GTGATGGTCATTCGTGATTTGTTGAATTTATGTGAAATTACCAAGGGAAAAGACAATAAA 1845
ValMetValIleArgAspLeuLeuAsnLeuCysGluIleThrLysGlyLysAspAsnLys

GCCGTTATTGCAAGCAACATCATGTATGTCGTTGGCCAGTATCCAAGATTCTTAAGGGCC 1905
AlaValIleAlaSerAsnIleMetTyrValValGlyGlnTyrProArgPheLeuArgAla

CATTGGAAGTTTTTTGAAGACAGTTGTGAACAAGTTGTTTGAATTCATGCATGAAACACAT 1965
HisTrpLysPheLeuLysThrValValAsnLysLeuPheGluPheMetHisGluThrHis

CCTGGTGTTCAGGACATGGCCTGTGATACATTCTTGAAAATAGTTCAAAAGTGCAAGCGA 2025
ProGlyValGlnAspMetAlaCysAspThrPheLeuLysIleValGlnLysCysLysArg

AAATTCGTTATTGTACAGGTTGGAGAGAATGAACCATTTGTATCTGAACTTCTAACAGGC 2085
LysPheValIleValGlnValGlyGluAsnGluProPheValSerGluLeuLeuThrGly

CTTGCAACAACCTGTTCAAGATCTTGAGCCTCATCAAATACACTCATTTTATGAATCAGTT 2145
LeuAlaThrThrValGlnAspLeuGluProHisGlnIleHisSerPheTyrGluSerVal

GGTAATATGATCCAAGCAGAATCAGATCCTCAGAAGAGAGATGAATATCTCCAGAGGTTG 2205
GlyAsnMetIleGlnAlaGluSerAspProGlnLysArgAspGluTyrLeuGlnArgLeu

ATGGCACTCCCCAACCCAGAAATGGGCAGAAATCATAGGACAGGCACGCCACAGTGTAGAA 2265
MetAlaLeuProAsnGlnLysTrpAlaGluIleIleGlyGlnAlaArgHisSerValGlu

TTCTCAAGGATCAAGTTGTGATACGTACAGTGCTAAACATCCTACAGACTAATACTAGT 2325
PheLeTLysAspGlnValValIleArgThrValLeTAsnIleLeTGlnThrAsnThrSer

GCTGCTACTTCACTGGGAACATACTTCTTATCCCAAATTTCCCTTGATTTTCTTGGATATG 2385
AlaAlaThrSerLeTGlyThrTyrPheLeTSerGlnIleSerLeTlIlePheLeTAspMet

TTGAATGTATACAGAATGTACAGTGAGCTTGTGTCAACCAACATTACTGAGGGAGGACCA 2445
LeuAsnValTyrArgMetTyrSerGluLeuValSerThrAsnIleThrGluGlyGlyPro

TATGCTTCCAAGACATCTTTTGTAAAACTCTTAAGATCGGTTAAGAGGGAAACACTTAAG 2505
TyrAlaSerLysThrSerPheValLysLeuLeuArgSerValLysArgGluThrLeuLys

CTGATAGAAAACCTTTTGTAGACAAAGCTGAAGACCAGCCACACATAGGGAAACAATTTGTG 2565
LeuIleGluThrPheLeuAspLysAlaGluAspGlnProHisIleGlyLysGlnPheVal

CCGCCAATGATGGAATCAGTACTTGGTGACTATGCGAGGAATGTGCCTGATGCTAGGGAA 2625
ProProMetMetGluSerValLeuGlyAspTyrAlaArgAsnValProAspAlaArgGlu

TCCGAAGTTCTTTCACCTTTTGCAACGATTATAAACAAGTACAAGGCAACAATGTTAGAC 2685
SerGluValLeuSerLeuPheAlaThrIleIleAsnLysTyrLysAlaThrMetLeuAsp

GACGTGCCTCACATATTTGAAGCTGTATTCCAGTGTACATTGGAGATGATAACTAAGAAC 2745
AspValProHisIlePheGluAlaValPheGlnCysThrLeuGluMetIleThrLysAsn

TTTGAAGATTATCCAGAACACCGCCTCAAGTTTTTCTCATTACTCCGTGCTATTGCTACG 2805
PheGluAspTyrProGluHisArgLeuLysPhePheSerLeuLeuArgAlaIleAlaThr

TTTTGTTTCCCTGCCTTGATAAAGTTATCAAGTCCGCAACTGAAGCTAGTGATGGATTCA 2865
PheCysPheProAlaLeuIleLysLeuSerSerProGlnLeuLysLeuValMetAspSer

ATTATCTGGGCATTTAGACATACTGAGAGAAATATTGCTGAAACCGGGCTTAATCTTTTG 2925
IleIleTrpAlaPheArgHisThrGluArgAsnIleAlaGluThrGlyLeuAsnLeuLeu

CTTGAGATGCTGAAAACTTTCAGCAATCTGAATTTTGTAAATCAATTCTACCGGTCATAC 2985
LeuGluMetLeuLysAsnPheGlnGlnSerGluPheCysAsnGlnPheTyrArgSerTyr

TTTATGCAAATCGAGCAAGAAATATTTGCCGTTTTGACCGATACCTTCCATAAGCCTGGC 3045
PheMetGlnIleGluGlnGluIlePheAlaValLeuThrAspThrPheHisLysProGly

TTCAAGCTACATGTGTTGGTGCTGCAGCAACTGTTTTGCCTGCCTGAGAGCGGTGCTTTG 3105
PheLysLeuHisValLeuValLeuGlnGlnLeuPheCysLeuProGluSerGlyAlaLeu

ACAGAACCCTTGTGGGATGCTACAACCGTTCCTTACCCGTATCCGGACAACGTTGCATTT 3165
ThrGluProLeuTrpAspAlaThrThrValProTyrProTyrProAspAsnValAlaPhe

GTTTCGGAATACACCATTAAGCTACTGAGCTCTTCATTCCCAAACATGACTGCAGCAGAG 3225
ValArgGltTyrThrIleLysLeTLeTSerSerSerPheProAsnMetThrAlaAlaGlt

GTCACACAATTTGTGAATGGACTATACGAGTCTAGAAATGACCCGTCTGGATTTAAGAAT 3285
ValThrGlnPheValAsnGlyLeuTyrGluSerArgAsnAspProSerGlyPheLysAsn

AACATTCGTGACTTCCTTGTACAGTCTAAGGAGTTTTCCGCTCAGGATAACAAAGATCTC 3345
AsnIleArgAspPheLeuValGlnSerLysGluPheSerAlaGlnAspAsnLysAspLeu

TATGCTGAGGAAGCAGCTGCACAGAGAGAGAGAGAACGTCAAAGAATGCTTTCAATTCCT 3405
TyrAlaGluGluAlaAlaAlaGlnArgGluArgGluArgGlnArgMetLeuSerIlePro

GGGCTTATTGCTCCTAATGAGATTCAAGACGAGATGGTGGACTCATAA 3453
GlyLeuIleAlaProAsnGluIleGlnAspGluMetValAspSer *

<210> SEQ ID NO: 4
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220> primer
<223> 進行 RT-PCR 反轉錄 增幅部分 *XPO1A* 之 mRNA 片段的引子 (Foward)

<400> 4
gggcagctgc ggataattct cccaccg 27

<210> SEQ ID NO: 5
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220> primer
<223> 進行 RT-PCR 增幅部分 *XPO1A* 之 mRNA 片段的引子 (reversed)

<400> 5
gacgccgctg catgacttga gaacc 25

<210> SEQ ID NO: 6

<211>31
<212>DNA
<213>人工序列

<220>primer
<223>進行 PCR 增幅全長 *XPO1A* 的引子 (Foward)

<400>7
catgccatgg atggcggctg agaagttaag g 31

<210>SEQ ID NO: 7
<211>30
<212>DNA
<213>人工序列

<220>primer
<223>進行 PCR 增幅全長 *XPO1A* 的引子 (reversed)

<400>5
cgggatcctt gatgaggctc aagatcttga 30

<210>SEQ ID NO: 8
<211>348
<212>DNA
<213>人工序列

<220>promoter
<223>35S promoter
<400>8

tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctcctc ggattccatt 50
gcccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa ggaagggtggc 100
tcctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc 150
ctctgccgac agtgggtccca aagatggacc cccacccacg aggagcatcg 200
tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt 250
gatatctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact atccttcgca 300
agacccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttggag agaacacg 348

<210>SEQ ID NO: 9
<211>52
<212>DNA

<213>人工序列

<220>terminater

<223>*XPO1A* 基因下游终止子

<400>9

gatcgttcaa acattttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc 50
cggctcttgcg atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg 100
taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggttttttatg 150
attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata 200
gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct atgttactag 250
atcgaattcg at 265

<210>SEQ ID NO: 10

<211>8956

<212>DNA

<213>人工序列

<220>環狀的核酸序列

<223>可於植物宿主細胞中表現 *XPO1A* 蛋白的質體 pCAMBIA1300 序列

<400>10

aattcgagct cggtacccgg ggatcctcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggca 60
ctggccgctcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccga acttaatcgc 120
cttgccagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc 180
ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatgctaga gcagcttgag cttggatcag 210
attgtggttt cccgccttca gtttaacta tcagtgtttg acaggatata ttggcgggta 270
aacctaagag aaaagagcgt ttattagaat aacggatatt taaaaggcg tgaaaagggt 300
tatccgttcg tccatttgta tgtgcatgcc aaccacaggg ttcccctcgg gatcaaagta 360
ctttgatcca acccctccgc tgctatagtg cagtcggctt ctgacgttca gtgcagccgt 420
cttctgaaaa cgacatgtcg cacaagtcct aagttacgcg acaggctgcc gccctgccct 480
tttcctggcg ttttcttgtc gcgtgtttta gtcgcataaa gtagaatact tgcgactaga 540
accggagaca ttacgccatg aacaagagcg ccgccgctgg cctgctgggc tatgcccgcg 600
tcagcaccga cgaccaggac ttgaccaacc aacgggcca actgcacgcg gccggctgca 660
ccaagctgtt ttccgagaag atcaccggca ccaggcgca ccgccggag ctggccagga 720
tgcttgacca cctacgccct ggcgacgttg tgacagtgc caggctagac cgccctggccc 780
gcagcaccgg cgacctactg gacattgccg agcgcattca ggaggccggc gcgggcctgc 840
gtagcctggc agagccgtgg gccgacacca ccacgcggc cggccgcatg gtgttgaccg 900
tgttcgccgg cattgccgag ttcgagcgtt ccctaatac cgaccgcacc cggagcgggc 960
gcgaggccgc caaggcccga ggcgtgaagt ttggccccc ccctaccctc accccggcac 1020
agatcgcgca cgcccgcgag ctgatcgacc aggaaggccg caccgtgaaa gaggcggctg 1080

cactgcttgg cgtgcatcgc tcgaccctgt accgcgcact tgagcgcagc gaggaagtga 1140
 cgcccaccga ggccaggcgg cgcggtgcct tccgtgagga cgcattgacc gaggccgacg 1200
 ccctggcggc cgccgagaat gaacgccaaag aggaacaagc atgaaaccgc accaggacgg 1260
 ccaggacgaa ccgtttttca ttaccgaaga gatcgaggcg gagatgatcg cggccgggta 1320
 cgtgttcgag ccgcccgcgc acgtctcaac cgtgcggctg catgaaatcc tggccggttt 1380
 gtctgatgcc aagctggcgg cctggccggc cagcttggcc gctgaagaaa ccgagcgccg 1440
 ccgtctaaaa aggtgatgtg tatttgagta aaacagcttg cgtcatgcgg tcgctgcgta 1500
 tatgatgcga tgagtaaata aacaaatacg caagggaac gcatgaaggt tatcgtgta 1560
 ctttaaccaga aaggcgggtc aggcaagacg accatcgcaa cccatctagc ccgcccctg 1620
 caactcgccg gggccgatgt tctgttagtc gattccgatc ccaggggcag tgcccgcat 1680
 tgggcccggc tgcgggaaga tcaaccgcta accgttgctg gcatcgaccg cccgacgatt 1740
 gaccgcgacg tgaaggccat cggccggcgc gacttcgtag tgatcgacgg agcggcccag 1800
 gcggcggact tggctgtgtc cgcgatcaag gcagccgact tcgtgctgat tccggtgcag 1860
 ccaagccctt acgacatatg ggccaccgcc gacctggtgg agctgggtta gcagcgcat 1920
 gaggtcacgg atggaaggct acaagcggcc tttgtcgtgt cgcgggcgat caaaggcagc 2000
 cgcacggcg gtgaggttgc cgaggcgctg gccgggtacg agctgcccac tcttgagtcc 2060
 cgtatcacgc agcgcgtgag ctaccaggc actgccgccg ccggcacaac cgttcttgaa 2120
 tcagaaccgc agggcgacgc tgcccgcgag gtccaggcgc tggccgctga aattaaatca 2180
 aaactcattt gagttaatga ggtaaagaga aaatgagcaa aagcacaac acgctaagt 2240
 ccggccgtcc gagcgacgc agcagcaagg ctgcaacgtt ggccagcctg gcagacacgc 2300
 cagccatgaa gcgggtcaac tttcagttgc cggcgaggga tcacaccaag ctgaagatgt 2360
 acgcggtacg ccaaggcaag accattaccg agctgctatc tgaatacatc gcgcagctac 2420
 cagagtaaat gagcaaatga ataaatgagt agatgaattt tagcggctaa aggaggcggc 2480
 atggaaaatc aagaacaacc aggcaccgac gccgtggaat gcccacgtg tggaggaacg 2540
 ggcggttggc caggcgtaag cggctgggtt gtctgccggc cctgcaatgg cactggaacc 2600
 cccaagccc aggaatcggc gtgacggtc caaacatcc ggcccggtag aaatcggcgc 2660
 ggcgctgggt gatgacctg tggagaagtt gaaggccgcg caggccgcca gcggcaacgc 2720
 atcgaggcaa agcacgccc cgggtgaatc tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaa 2780
 gaatcccggc aaccgcccgc agccggtgc cgcgcgatta ggaagccgc caagggcgac 2840
 gagcaaccag attttttcgt tccgatgctc tatgacgtgg gcacccgcga tagtcgcagc 2960
 atcatggacg tggccgtttt ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc 3020
 cgctacgagc ttccagacgg gcacgtagag gtttccgcag ggccggccgg catggccagt 3080
 gtgtgggatt acgacctgg actgatggcg gtttcccatc taaccgaatc catgaaccga 3140
 taccgggaag ggaagggaga caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggacgta 3200
 ctcaagttct gccggcgagc cgatggcgga aagcagaaag acgacctgg agaaacctgc 3260
 attcgggtta acaccacgca cgttgccatg cagcgtacga agaaggccaa gaacggccgc 3320
 ctggtgacgg tatccgagg tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa 3380
 accgggcggc cggagtacat cgagatcgag ctagctgatt ggatgtaccg cgagatcaca 3440
 gaaggcaaga acccggaagt gctgacggtt caccgccgatt actttttgat cgatcccggc 3500
 atcggccgtt ttctctaccg cctggcacgc cgcgccgcag gcaaggcaga agccagatgg 3560
 ttgttcaaga cgatctacga acgcagtggc agcggccggag agttcaagaa gttctgtttc 3620
 accgtgcgca agctgatcg gtcaaagac ctgccggagt acgatttgaa ggaggaggcg 3680
 gggcaggctg gcccgatcct agtcatgcgc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc 3740

```

gccggttcct aatgtacgga gcagatgcta gggcaaattg ccctagcagg ggaaaaaggt 3800
cgaaaagggtc tctttcctgt ggatagcacg tacattggga acccaaagcc gtacattggg 3860
aaccggaacc cgtacattgg gaacccaaag ccgtacattg ggaaccggtc acacatgtaa 3900
gtgactgata taaaagagaa aaaaggcgat tttccgcct aaaactcttt aaaacttatt 3960
aaaactctta aaacccgcct ggctgtgca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag 4000
ctgcaaaaag cgcctaccct tcggtcgctg cgctccctac gccccgcgc ttcgctcg 4060
cctatcgcg cgctggccg ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccagg 4120
cgcggaaca cgcgcgcgt gccactcgac cgccggcgcc cacatcaagg caccctgcct 4180
cgcgctttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccg agacggtcac 4240
agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgct cagcgggtgt 4300
tggcgggtgt cggggcgag ccatgacca gtcacgtagc gatagcggag tgtatactgg 4360
cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata 4420
ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc ctgctcact 4480
gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta 4540
atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 4600
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt tttccatag gctccgcccc 4660
cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta 4720
taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgctg gctctcctgt tccgacctg 4780
ccgcttaccg gatacctgtc cgctttctc cttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc 4840
tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 4900
gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgc ttatccggt actatcgtct tgagtccaac 4960
ccggtaaagc acgacttatt gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 5020
aggtatgtag gcggtgtac agagtcttg aagtggggc ctaactacgg ctacactaga 5080
aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta cttcggaaa aagagttggt 5140
agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag 5200
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct 5260
gacgctcagt ggaacgaaaa ctacggttaa gggatttttg tcatgcattc taggtactaa 5320
aacaattcat ccagtaaaat ataattttt attttctccc aatcaggctt gatccccagt 5380
aagtcaaaaa atagctcgac atactgttct tccccgat cctccctgat cgaccggacg 5440
cagaaggcaa tgtcatacca cttgtccgcc ctgccgcttc tcccaagatc aataaagcca 5500
cttactttgc catctttcac aaagatgttg ctgtctccca ggctcgccgtg ggaaaagaca 5560
agttcctctt cgggcttttc cgtctttaa aaatcataca gctcgcgcg attttaaatg 5620
gacgtgtctt cttcccagtt ttcgcaatcc acatcgcca gatcgttatt cagtaagtaa 5680
tccaattcgg ctaagcggct gtctaagcta ttcgtatagg gacaatccga tatgtcgatg 5740
gagtgaaga gcctgatgca ctccgcatc agctcgataa tcttttcagg gctttgttca 5800
tcttcatact cttccgagca aaggacgcca tcggcctcac tcatgagcag attgctccag 5860
ccatcatgcc gttcaaagt caggacctt ggaacaggca gctttccttc cagccatagc 5920
atcatgtcct tttccggtc cacatcatag gtggtccctt tataccggct gtccgtcatt 5980
tttaaataa ggttttcatt ttctcccacc agcttatata ccttagcagg agacattcct 6040
tccgtatctt ttacgcagcg gtatttttcg atcagttttt tcaattccgg tgatattctc 6100
attttagcca tttattattt cttcctctt ttctacagta tttaaagata cccaagaag 6160
ctaattataa caagacgaac tccaattcac tgttccttgc attctaaac cttaaatacc 6220
agaaaacagc tttttcaaag ttgttttcaa agttggcgta taacatagta tcgacggagc 6280

```

cgattttgaa accgcggtga tcacaggcag caacgctctg tcacggttac aatcaacatg 6340
 ctaccctccg cgagatcatc cgtgtttcaa acccggcagc ttagttgccg ttcttccgaa 6400
 tagcatcggg aacatgagca aagtctgccg ccttacaacg gctctcccgc tgacgccgtc 6460
 ccggactgat gggctgcctg tatcgagtgg tgattttgtg ccgagctgcc ggtcggggag 6520
 ctggttgctg gctggtggca ggatatattg tgggtgaaac aaattgacgc ttagacaact 6580
 taataacaca ttgcggacgt ttttaatgta ctgaattaac gccgaattaa ttcgggggat 6640
 ctggatttta gtactggatt ttggttttag gaattagaaa ttttattgat agaagtattt 6700
 tacaaataca atacatacta agggtttctt atatgctcaa cacatgagcg aaaccctata 6760
 ggaaccctaa ttcccttata tgggaactac tcacacatta ttatggagaa actcgagctt 6840
 gtcgacgac agatccgggc ggcactctact ctatttcttt gccctcggac gagtgcctggg 6900
 gcgctcgggtt ccactatcgg cgagtacttc tacacagcca tcgggtccaga cggccgcgct 6960
 tctgcgggcg atttgtgtac gcccgcagct cccggctccg gatcggacga ttgcgtcgca 7020
 tcgaccctgc gcccaagctg catcatcgaa attgccgtca accaagctct gatagagttg 7080
 gtcaagacca atgcggagca tatacgcggc gagtcgtggc gatcctgcaa gctccggatg 7140
 cctccgctcg aagtagcgcg tctgctgctc catacaagcc aaccacggcc tccagaagaa 7200
 gatgttggcg acctcgatatt gggaatcccc gaacatcgcc tcgctccagt caatgaccgc 7260
 tgttatgcgg ccattgtccg tcaggacatt gttggagccg aaatccgcgt gcacgaggtg 7320
 ccggacttcg gggcagtcct cggcccaaag catcagctca tcgagagcct gcgcgacgga 7380
 cgcactgacg gtgtcgtcca tcacagtttg ccagtgatac acatggggat cagcaatcgc 7440
 gcatatgaaa tcacgccatg tagtgtattg accgattcct tcggtccga atgggcccga 7500
 cccgctcgtc tggctaagat cggccgcagc gatcgcctcc atagcctccg cgaccgggtg 7560
 tagaacagcg ggcagttcgg tttcaggcag gtcttgcaac gtgacaccct gtgcacggcg 7620
 ggagatgcaa taggtcaggc tctcgctaaa ctccccaatg tcaagcactt ccggaatcgg 7680
 gagcgcggcc gatgcaaagt gccgataaac ataacgatct ttgtagaaac catcggcgca 7740
 gctatttacc cgcaggacat atccacgccc tcctacatcg aagctgaaag cacgagattc 7800
 ttcgccctcc gagagctgca tcaggctcga gacgctgtcg aacttttcga tcagaaactt 7860
 ctgcacagac gtcgcggtga gttcaggctt tttcatatct cattgcccc cgggatctgc 7940
 gaaagctcga gagagataga tttgtagaga gagactggtg atttcagcgt gtcctctcca 8000
 aatgaaatga acttccttat atagaggaag gtcttgcgaa ggatagtggg attgtgcgtc 8060
 atcccttacg tcagtggaga tatcacatca atccacttgc tttgaagacg tgggttgaac 8120
 gtcttctttt tccacgatgc tcctcgtggg tgggggtcca tctttgggac cactgtcggc 8180
 agaggcatct tgaacgatag cttttccttt atcgcaatga tggcatttgt aggtgccacc 8240
 ttccttttct actgtccttt tgatgaagtg acagatagct gggcaatgga atccgaggag 8300
 gtttcccgat attacccttt gttgaaaagt ctcaatagcc ctttgggtct ctgagactgt 8360
 atctttgata ttcttgagat agacgagagt gtcgtgctcc accatgttat cacatcaatc 8420
 cacttgcttt gaagacgtgg ttggaacgct ttctttttcc acgatgctcc tcgtgggtgg 8480
 ggggtccatct ttgggaccac tgcgggcaga ggcacttga acgatagcct ttcctttatc 8520
 gcaatgatgg catttgtagg tgccaccttc cttttctact gtccttttga tgaagtgaca 8580
 gatagctggg caatggaatc cgaggaggtt tcccgatatt accctttgtt gaaaagtctc 8640
 aatagccctt tggcttctg agactgtatc tttgatattc ttggagtaga cgagagtgtc 8700
 gtgctccacc atgttggtgaa gctgctctag ccaatacgca aaccgcctct cccgcgcgct 8760
 tggccgatcc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag 8820
 cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattagggac cccaggcttt acactttatg 8880

cttccggctc gtatgttg tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc 8940
tatgaccatg attacg 8956

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99130236

A01H 1/00 (2006.01)

※申請日：99.9.7

※IPC 分類：

C12N 15/82 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

(中文) 使植物表現後天性高溫逆境耐受性狀的方法及其應用

(英文) METHOD FOR ENHANCING
THERMOTOLERANCE OF PLANT AND
APPLICATIBILITY OF TRANSGENIC
PLANT

二、中文發明摘要：

一種使植物表現後天性高溫逆境耐受性狀的方法及其應用，包含將一段可轉譯出 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸片段轉殖入一不具耐受高溫逆境性狀或高溫耐受性不佳的植物細胞中，使含此去氧核糖核酸片段的轉植株表現出可耐受高溫逆境的單一性狀。此單一性狀表現可應用於轉基因植物之選殖。

三、英文發明摘要：

A method for providing thermotolerance of a plant and the applicability of transgenic plant are disclosed. DNA fragment containing a gene encoded EXPORTIN1A is

transferred into a plant cell to provide or enhance thermotolerance of the plant. The method can be applied in transgenic plant cell cloning.

七、申請專利範圍：

1. 一種使植物表現後天性耐受高溫逆境性狀的方法，包含：

將一段可編碼產生XPO1A蛋白的去氧核糖核酸片段，轉殖入一植物細胞中；以及

表達一外源性XPO1A蛋白，使含此去氧核糖核酸片段的轉殖株表現出可耐受高溫逆境的單一性狀。

2.如請求項 1 所述之使植物表現後天性耐受高溫逆境性狀的方法，其中該可編碼產生 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸片段含有一 *XPO1A* 基因。

3.如請求項 1 所述之使植物表現後天性耐受高溫逆境性狀的方法，其中該可編碼產生 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸片段包含序列編號：1 所示的序列。

4.如請求項 1 所述之使植物表現後天性耐受高溫逆境性狀的方法，其中該包含序列編號：1 所示序列的片段上游具有一持續表現型或誘導表現型啟動子序列。

5.如請求項 4 所述之使植物表現後天性耐受高溫逆境性狀的方法，其中該包含序列編號：1 所示序列的片段為具有序列編號：2 所示序列的片段。

6.如請求項 4 所述之使植物表現後天性耐受高溫逆境性狀的方法，其中該包含序列編號：1 所示序列的片段為具有序列編號：3 所示序列的片段。

7.如請求項 1 所述之使植物表現後天性耐受高溫逆境性狀的方法，其中該植物細胞為十字花科植物或番茄之組織細胞。

8.如請求項 1 所述之使植物表現後天性耐受高溫逆境性狀的方法，其中將該含有可編碼產生 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸片段送入該植物細胞的方法為利用質體或病毒載體轉染。

9.如請求項 8 所述之使植物表現後天性耐受高溫逆境性狀的方法，其中該質體為 Ti-plasmid。

10.一種利用請求項 1 所述之使植物表現後天性耐受高溫逆境性狀來選殖轉基因植物的方法，包含：

構築一重組基因片段，包含一欲轉殖之基因及一選擇性標幟，其中該選擇性標幟為可編碼產生 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸片段；

將該重組基因片段轉殖入一植物組織細胞中；

進行一預馴化處理，包含將該植物組織細胞生長出之植物幼苗培養一預馴化溫度中，其中該預馴化溫度高於該

植物幼苗之最適生長溫度，再將該植物幼苗移至該植物幼苗之最適生長之溫度中培養；

進行一熱休克處理，其中該熱休克處理之溫度為大於等於該預馴化溫度，並且可使未成功轉殖之植株細胞死亡的最低溫度；以及

挑選出可於該熱休克處理後存活之單一性狀的植株，即為轉基因成功之轉植株。

11.如請求項 10 所述之選殖轉基因植物的方法，其中該可編碼產生 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸片段含有一 *XPO1A* 基因。

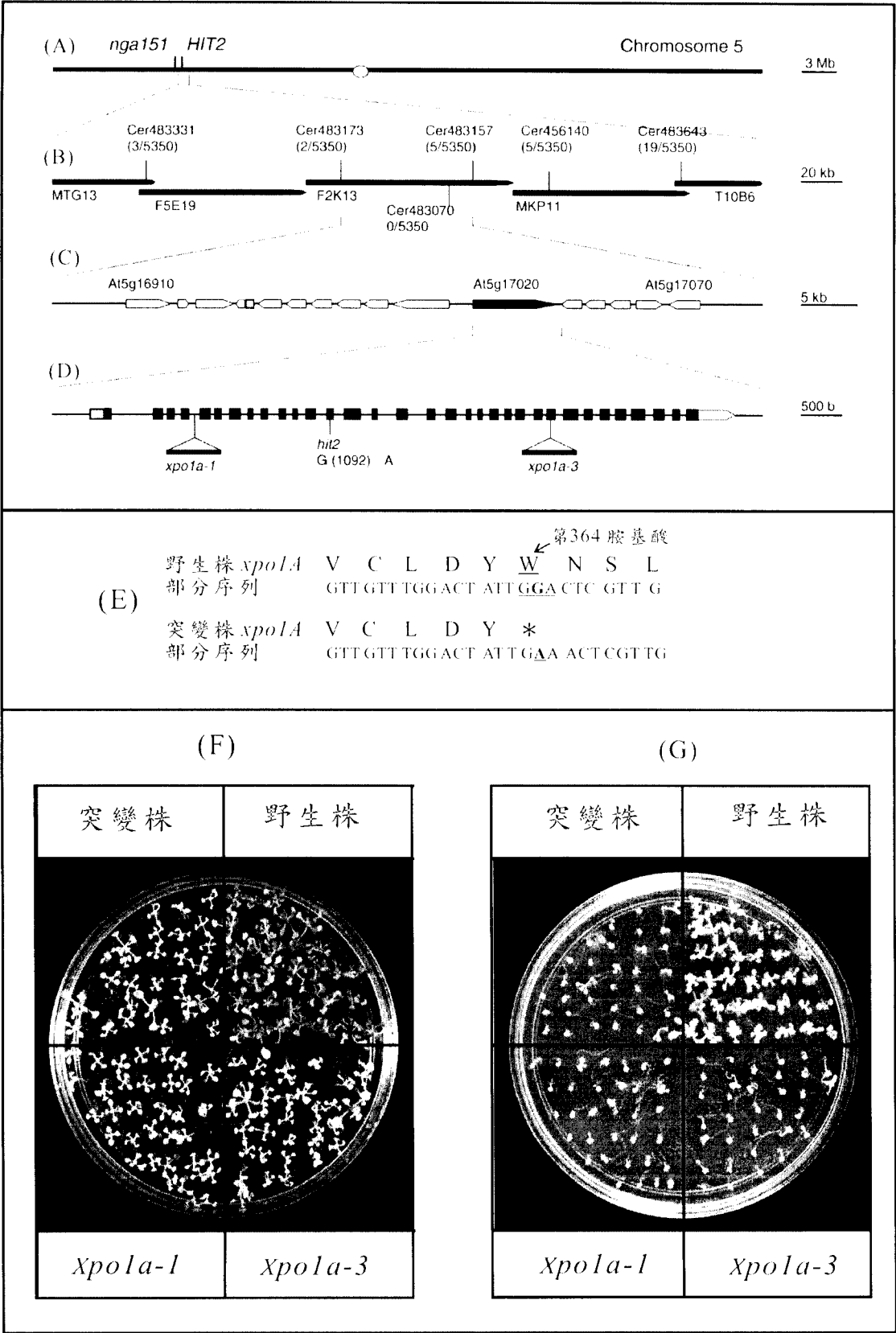
12.如請求項 10 所述之選殖轉基因植物的方法，其中該可編碼產生 XPO1A 蛋白的去氧核糖核酸片段包含序列編號：1 所示的序列。

13.如請求項 12 所述之選殖轉基因植物的方法，其中該包含序列編號：1 所示序列的片段為具有序列編號：2 所示序列的片段。

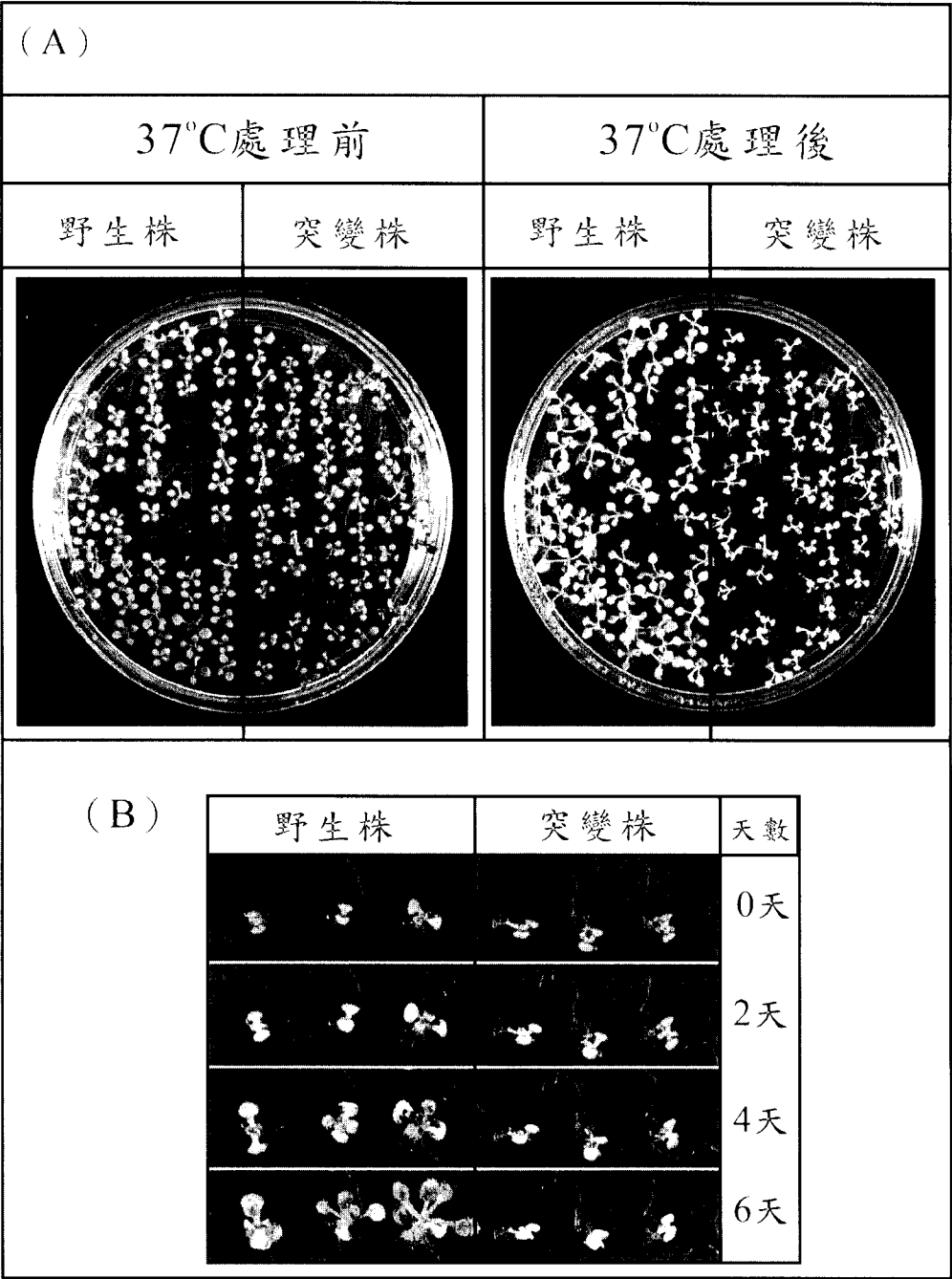
14.如請求項 12 所述之選殖轉基因植物的方法，其中該包含序列編號：1 所示序列的片段為具有序列編號：3 所示序列的片段。

15.如請求項 10 所述之選殖轉基因植物的方法，其中該預馴化處理溫度為 37°C，時間為一小時，將該植物幼苗移至該最適生長溫度中培養之時間大於等於該預馴化處理之時間。

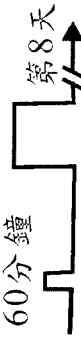
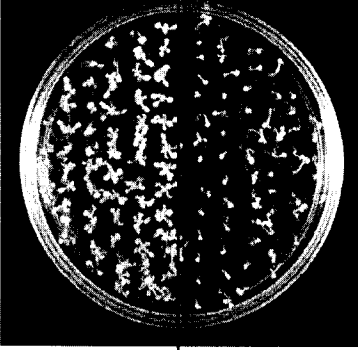
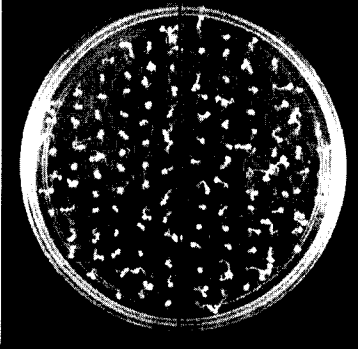
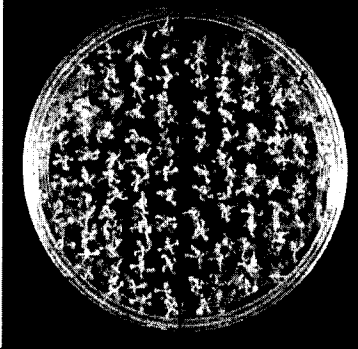
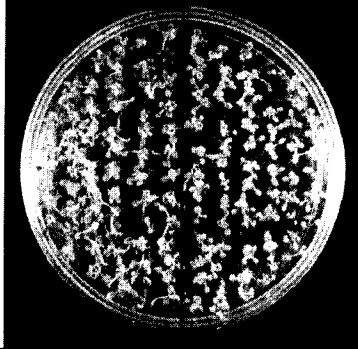
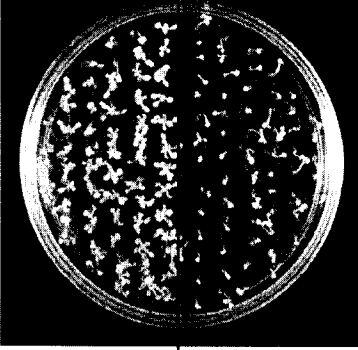
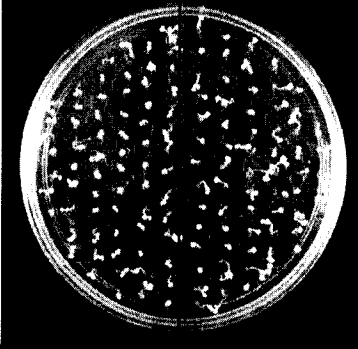
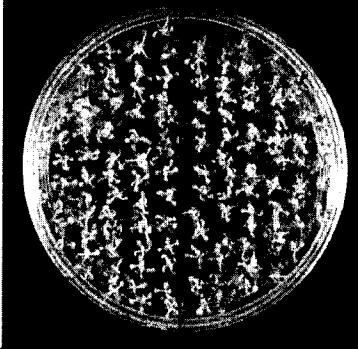
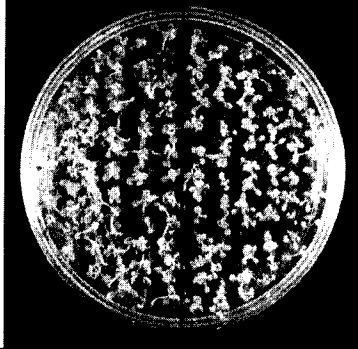
16.一種具有熱耐受性的轉基因植物，包含一段可編碼產生XPO1A蛋白的外源性去氧核糖核酸片段。



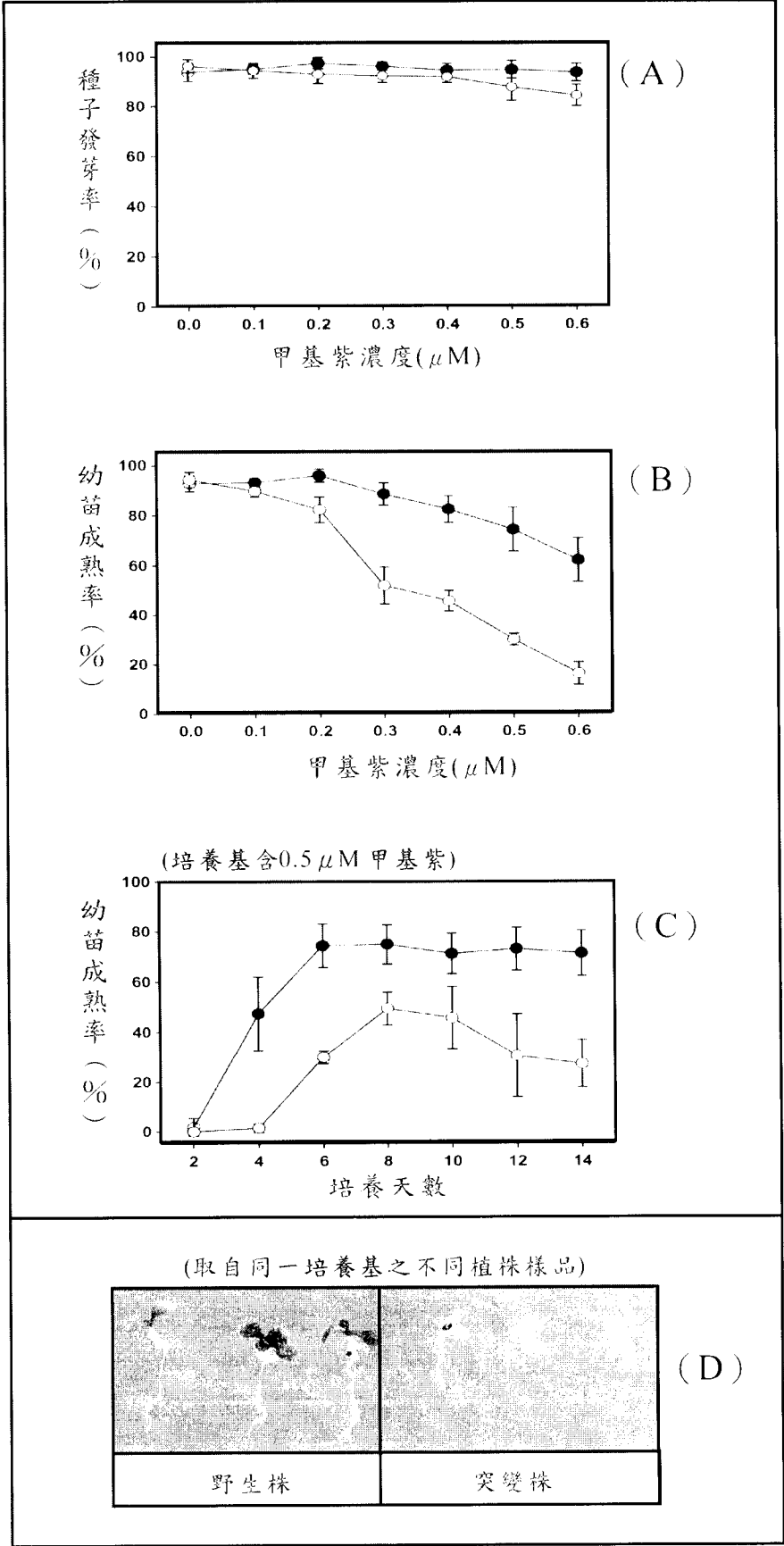
第 1 圖



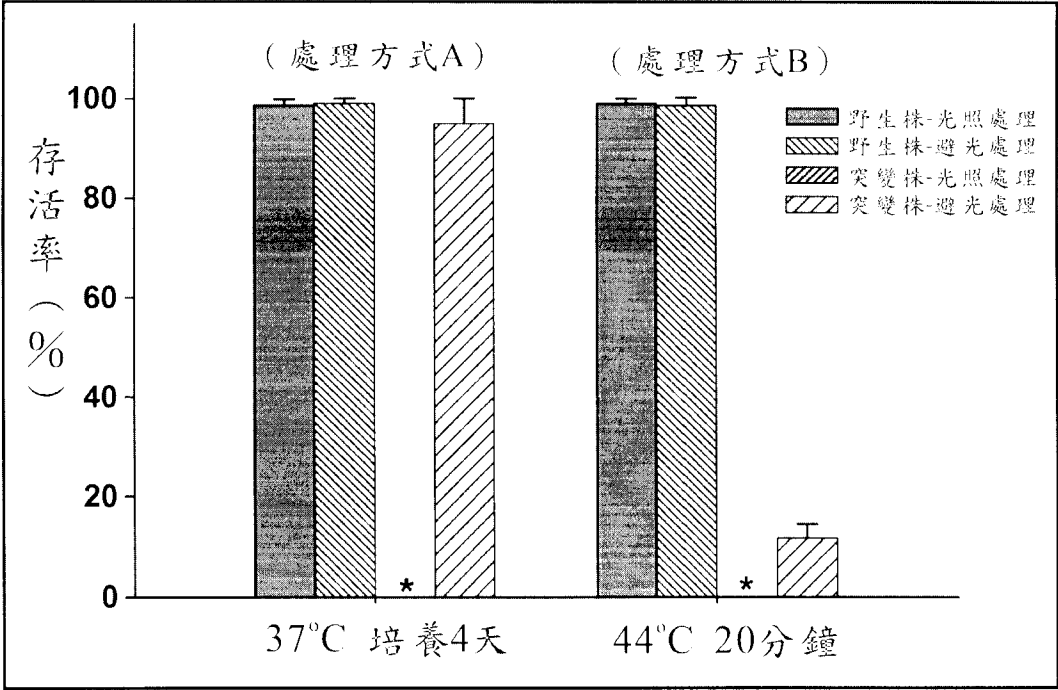
第 2 圖

	處理(A)	處理(B)	處理(C)	處理(D)
處理方式	44°C處理 30分鐘 	44°C處理 45分鐘 	37°C 60分鐘 44°C處理 45分鐘 	37°C 60分鐘 44°C處理 90分鐘 
野生株				
突變株				
存活率(%)	野生株 = 95 突變株 = 0	野生株 = 0 突變株 = 0	野生株 = 100 突變株 = 100	野生株 = 100 突變株 = 96

第 3 圖



第 4 圖

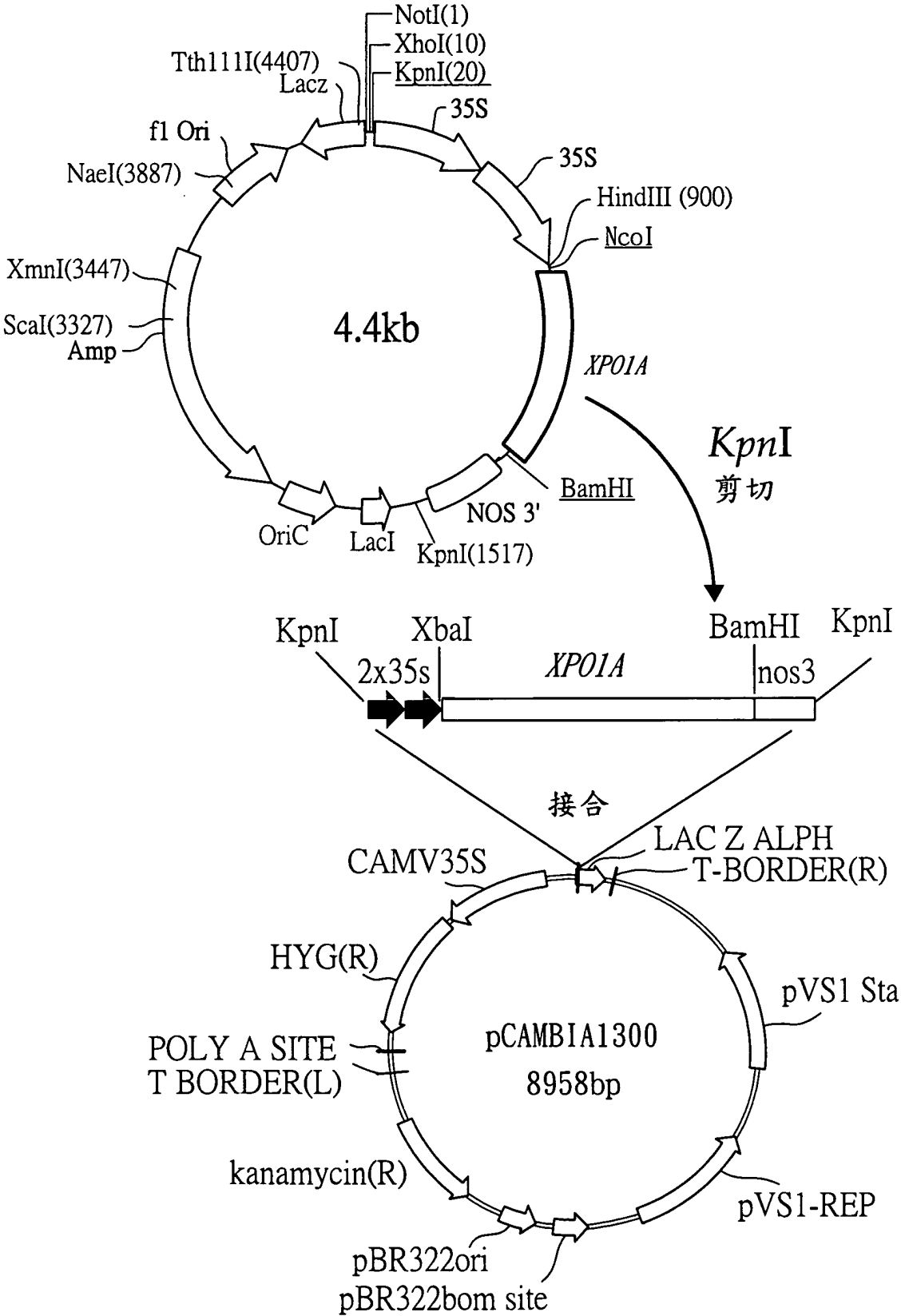


第 5 圖

(A)	組織部位	1	2	3	4	5
	突變株					
	內控制組					

(B)	時間(小時)	0	6	12	24	36	48
	突變株						
	正控制組						
	內控制組						

第 6 圖



第 7 圖

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(7)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：