

臺灣二〇〇六年國際科學展覽會

科 別：植物學

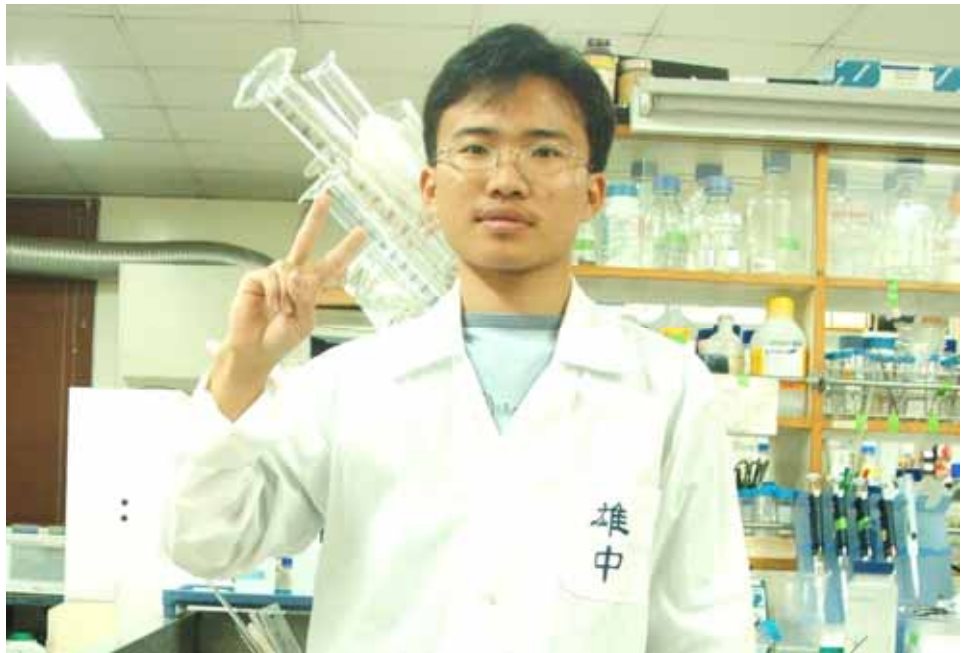
作 品 名 稱：銅影響大豆及田菁根部生長、細胞死亡和訊息傳遞

得 獎 獎 項：佳作

學校 / 作者：高雄市立高雄高級中學 蔡逸文

作者姓名：蔡逸文
就讀學校：高雄中學
作者簡介

我是蔡逸文，從小對自然科學，尤其是化學、生物，有著濃厚的興趣，加上父母的鼓勵，常閱讀書籍和科普雜誌，廣闊的學習，吸收新知，培養求知求真的精神。未來，期望自己繼續在學術研究方面發展，造福人類。承蒙在指導教授及許



多老師的諄諄教誨與不辭辛勞的引領下，完成了這件作品，在實驗其間，訓練許多的實驗技巧、培養科學態度、科學邏輯，還有接觸更深的理論，大膽假設小心求證、鍥而不捨的精神磨練，使我受益良多。

最後，由衷感謝不厭其煩地教導我的教授，深深感謝一路陪伴我，幫助我、鼓勵我的同儕、朋友、師長及實驗儀器！

My name is Yi-wen Tsai. I study in Kaohsiung senior high school. Though not a genius, I have tried my best to improve myself. Since my childhood, I have been enthusiastic about nature. After entering senior high school, I have had a deep interest in natural science, especially in chemistry and biology. I keep reading magazines and popular science books as to obtain the latest scientific knowledge. By carrying out this project, I have gained much knowledge, sharpened my English ability, refined my experimental ability, and so on. I made up my mind to be dedicated to academic research.

I am glad to have the chance to take part in this science fair. I express an immense gratitude to my advisor, teachers, friends who helped me, and most importantly.

摘要

隨著迅速的工業化，重金屬汙染已是嚴重的環境問題。在植物中，當植物體內累積過量的重金屬，對於植物根部、葉部等器官的生長與發育有嚴重的影響或傷害。銅離子為植物生長所必須之重金屬，但是過量銅離子會導致細胞死亡，生長受到抑制。

本實驗以大豆(*Glycine max*)及田菁(*Sesbania roxburghii*)為植物材料，藉由 Evans blue 染色法、螢光染色、西方墨點法、反轉錄聚合酶鏈鎖反應等，觀察過量銅離子影響植物根部生長、細胞死亡和細胞訊息傳遞物質變化之情形，並探討過量銅離子影響大豆根部細胞死亡的訊息傳遞路徑。

過量銅離子會限制植物根部的生長及造成根部細胞死亡。以螢光染色觀察根尖(ROS, reactive oxygen species)、 Ca^{2+} 累積情形，根尖細胞 Ca^{2+} 、ROS 累積隨處理銅濃度的增加而上升，可能影響細胞死亡程度。以 Ca^{2+} 螯合劑 EGTA 和 W-7(CDPK(calcium-dependent protein kinase)、Calmodulin 抑制劑)前處理發現可以降低過量銅離子對大豆根部的細胞死亡程度，推測 Ca^{2+} 、CDPK 參與銅引發大豆根部細胞死亡的途徑。

為檢驗 MAPK 參與根部細胞死亡的途徑，以西方墨點法偵測根部細胞 MAPK 的 TEY 或 TDY 磷酸化，實驗結果發現，隨著過量銅離子濃度的升高，田菁、大豆根部 42-kDa MAPK 磷酸化情形有上升之趨勢。以 RT-PCR 分析大豆 MAPK1 及 MAPK2 基因之表現量，發現在銅處理時大豆之 MAPK1 和 MAPK2 基因的轉錄情形增加。

大豆(*Glycine max*)及田菁(*Sesbania roxburghii*)皆屬於豆科植物，可作為綠肥植物。探討銅影響大豆、田菁細胞死亡之訊息傳遞路徑，希望進而控制生物體所受的毒害情形及訊息傳遞途徑，加強生物體對重金屬的防禦機制，未來可以以基因轉殖等基因工程技術，轉入抗重金屬基因或增強植物體對抗重金屬的能力等，作為綠肥植物、抗重金屬植物吸附重金屬來復育土地達綠色淨化等用途。

Abstract

Many heavy metals are necessary for plants, but excessive quantities directly affect plant growth and survival of organisms, cause cell death, or even affect human life indirectly. Cu (copper ion) is a heavy metal, which is one of micronutrients essential for normal growth and development of plants.

The purpose of this experiment is to study the effect of excessive copper on *Glycine max* and *Sesbania roxburghii* root tips. I conducted some experiments by means of Evans blue staining (analysis of cell death), western blot analyses, and fluorescence microscope in order to examine the way copper results in plant death.

Measurement of root length and analysis of cell death showed that excessive copper could bring about the inhibition of plant growth as well as cell death. With fluorescence microscope, I found that excessive copper might increase the level of copper-caused reactive oxygen species (ROS) in both the root tips of *Glycine max* and *Sesbania roxburghii*. In addition, I used Oregon Green 488 BAPTA-1 so as to assess the accumulation of calcium ions in root tips and found that the exposure of root tips to excessive copper results in the accumulation of calcium ions. To investigate whether calcium ions and calcium-dependent protein kinase (CDPK) play a role in the cell death caused by excessive copper, I tested W-7, calmodulin and CDPK inhibitors, and EGTA, Ca^{2+} chelating agents, before copper treatment – immersing copper in CuCl_2 . In this way, plant cells would be effectively prevented from copper-caused death.

Besides, to find out whether copper activates MAPKs in plant cells, I took advantage of western blot analysis with Phosphor-Map kinase Antibody and Map kinase Antibody. The results revealed that excessive copper might lead to TEY or TDY motif phosphorylation of approximate 42- and 64-kDa MAPKs in the cells of *Glycine max* root-tip and approximate 42-kDa MAPKs in the cells of *Sesbania roxburghii* root-tip. Furthermore, with RT-PCR, I found that the transcription of *Glycine max* MAPK1 and MAPK2 mRNA happens more frequently in root cells after copper treatment. In addition, this study suggested that the MAPK cascade CDPK pathway may function in the heavy-metal-signaling pathway in plant, and that calcium ions and ROS might get involved in the copper-caused death of plant cells.

By studying signal transduction against heavy-metal toxicity in the plants, we can know how the organisms protect themselves. *Sesbania roxburghii* (or *Glycine max*), as green manure, could be used for metal-hyper-accumulator with the help of genetic engineering in the future.

壹、前言

一、研究動機及目的

隨著工業的進步，不少工業用地受到重金屬的汙染，甚至影響到農業用地，而限制了農作物的產量，且直接或間接地嚴重影響到生態環境及人體的健康。

因此，選用大豆(*Glycine max*)，日常生活常見食品的來源，以及田菁(*Sesbania roxburghii*)，南台灣常見的綠肥植物，觀察過量重金屬銅影響大豆、田菁根部細胞的情形，探討銅影響大豆、田菁細胞死亡之訊息傳遞路徑。希望藉由了解植物體和重金屬之間的關係，植物體對重金屬的防禦機制及訊息傳遞，未來可利用基因轉殖或增強植物體對抗重金屬的能力等，進而以綠肥植物、抗重金屬植物吸附重金屬來復育土地。

二、文獻探討

銅為生物體內重要之微量元素，為生物體內重要酵素的輔因子，包括許多氧化還原酶。銅亦屬於重金屬，植物以自由態銅離子及鉗合態吸收。高濃度銅離子會造成植物根部細胞死亡。前人研究指出高濃度重金屬會刺激細胞產生活性氧族(ROS, reactive oxygen species)及自由基，而造成細胞處於氧化逆境，進而抑制植物的生長。

蛋白質磷酸化為細胞內重要之訊息傳遞機制，如 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) pathway，在生物細胞中扮演一重要角色，調節細胞對外在或內在刺激的反應過程決定了所有生物的生長和發育，包含了對細胞分裂、分化、細胞週期的調控、代謝、及細胞對生物及非生物逆境刺激的反應。MAPK pathway 主要由三個激酶(MAPKK)組成，含通常位於下游的 MAPK、中游的 MAPKK(MAPK kinase) 和上游的 MAPKKK(MAPK kinase kinase)。以磷酸化連級(phosphorylation cascade)為作用模式，磷酸化相互調控其活性，進而快速放大細胞外之刺激物所要傳遞的訊息，調控細胞的生長和發育，感受外在環境的刺激以適應環境。當細胞受到外界訊息刺激，通常可經由細胞膜上的接受器(receptor)傳到細胞內，再間接的以蛋白質磷酸化的形式先將 MAPKKK 活化，活化的 MAPKKK 可將其下游的 MAPKK 上特定的 threonine 及 serine 磷酸化而使 MAPKK 活化，活化的 MAPKK 可再磷酸化下游 MAPK 第 8 個演化高保守區內之 TEY 和 TDY motif 上的 threonine 及 tyrosine，因而使 MAPK 活化。有研究指出 ROS levels 的提升，會影響到 MAPK 活化。而細胞死亡常以 MAPK 的活化來傳遞訊息。

已知 Ca^{2+} 是細胞內重要的第二訊息傳遞者，調控細胞內基因表現細胞生長等，在逆境中 Ca^{2+} 會由細胞外進入至細胞內，或從胞器釋放，影響下游分子或促使 CDPK (calcium-dependent protein kinase) 活化進而磷酸化不同的下游目標蛋白來傳遞細胞內鈣離子訊號，幫助植物來適應逆境。前人研究指出生物體內之氧化劑會藉由改變細胞內 Ca^{2+} 濃度來刺激 Ca^{2+} 訊息傳遞。

大豆(*Glycine max*)，豆科植物，是重要的蛋白質來源，是世界上使用最多的食用油脂，且藉著在大豆植株根部共生的根瘤菌，從空氣中吸收氮氣而予以固定(Nitrogen Fixation)，產生氮肥，而利於大豆或其他植物的生長。近年來大豆油脂在生質柴油的應用廣被討論。

田菁(*Sesbania roxburghii*)，豆科植物，為南台灣廣被使用的綠肥植物，具以下特性而適合作為實驗對象：一、鄉土性：田菁是田間常見的綠肥植物。二、種間差異性：大豆和田菁皆為豆科植物。

貳、研究方法或過程

一、種子的消毒

- 1、取 2.5% 次氯酸鈉 (sodium hypochloride, NaClO) 30 ml 至 50 ml 塑膠筒 (falcon tube)。
- 2、取適量(約 12 公克)的種子到塑膠筒中。
- 3、以約 50 r.p.m. 搖 15 分鐘，倒掉筒內的液體。
- 4、加入 40 ml 逆滲透二次水(ddH₂O)，以約 50 r.p.m. 搖晃 30 秒，倒掉筒內的水，重複 4 次。

二、種子的萌發

- 1、於已放入濾紙之 9 公分培養皿(Petri dish)，每盤加入 20 ml 欲處理之氯化銅溶液。
- 2、將消毒後的種子每盤移入 10 顆至培養皿中，將培養皿置入 26°C、無光照的生長箱內培養 2 天。
- 3、觀察發芽情形並紀錄之。

三、根長的測量

- 1、每盤培養皿中移入約 6 公克已消毒的種子，各加入 20 ml 的滅菌水。
- 2、移入 26°C、無光照的生長箱內培養 2 天。
- 3、取新的培養皿，在培養皿中放入一張濾紙，加入 10 ml 欲處理之氯化銅溶液。
- 4、從生長箱中取出培養皿，每盤培養皿移入芽長約 0.2 公分的種子 10 顆，再將培養皿放置於 26°C、無光照之生長箱內培養。
- 5、分別於 2 天、3 天後，取出培養皿中的植株來測量並紀錄根長。

四、植物之生長

- 1、每盤培養皿中移入約 6 公克已消毒的種子，各加入 20 ml 的滅菌水。
- 2、移入 26°C、無光照的生長箱內培養 2 天。
- 3、取新的培養皿，在培養皿中放入一張濾紙，加入 10 ml 滅菌水。
- 4、從生長箱中取出培養皿，每盤培養皿移入已發芽長約 0.2 公分的種子 10 顆，將培養皿置入 26°C、無光照的生長箱內培養 2 天。

五、抑制劑之前處理及逆境的處理

- 1、取出上述(4.4)之培養皿，吸乾培養皿內的水。
- 2、加入所欲前處理的溶液 10 ml，再移回 26°C 的生長箱中 1 小時。(若無前處理，則此步驟省略)
- 3、取出培養皿，加入欲處理之逆境溶液，並維持前處理之濃度，總體積 10ml。在放入 26°C、無光照的生長箱中。

六、Evans blue 染色法(Chang, 2005)

- 1、拿出新培養皿，在每個培養皿中各加入 1 ml 的 Evans blue。
- 2、取出所有已處理的培養皿。

- 3、移幼芽的根浸泡於 Evans blue 15 分鐘。
- 4、在步驟 2.3 的 15 分鐘內的空閒時間中，加入水到有處理的培養皿蓋子內至 8 分滿。
- 5、15 分鐘到時，將浸於 Evans blue 中的幼芽移至已含水的培養皿蓋子內清洗。
- 6、除去清洗的水，再清洗一次，再加入二次水至八分滿。
- 7、切除根以外部位，留下根部，放置 20 小時。
- 8、經 20 小時，切下 1 公分長的根尖 10 根。
- 9、開啟水浴槽，溫度到 50°C
- 10、取 Evans blue 退染液 0.375 ml，加入到 1.5 ml 之小管子(eppendorf)中。
- 11、將被剪下的根移至小管子中。(移入前，將根沾衛生紙去除表面水)
- 12、小管子插入橡皮圈中，放入 50°C 水浴 1 小時。
- 13、取出小管子，短暫離心 12 秒，將退染後的液體吸取 0.35 ml 至新的小管子中，並作上記號。
- 14、測量吸光值。打開 UV 分光光度計，取 0.3 ml 的 Evans blue 退染液到石英管中，放入儀器中歸零。
- 15、取出石英管，倒掉裡面液體。用逆滲透三次水清洗管內 2 次，再用 95%酒精清洗 2 次，以拭鏡紙拭乾管內外及管口之酒精。
- 16、加 0.3 ml 的樣本液體到石英管內。放入儀器內測試 595 nm 波長的吸光值，記錄下來。
- 17、重複上述步驟，直到樣本測量完畢。

七、螢光染色法(Ryoung Shin and Daniel P. Schachtman, 2004)

- 1、配置染劑。取 Oregon Green 488 BAPTA-1 (或 CM-H₂DCFDA)粉末()加入 39.7 μ l DMSO (Dimethyl sulfoxide, 二甲基亞砜), 均勻混和, 短暫離心。
- 2、染劑前處理(避光處理)。取 0.495 ml PBS(0.1M, pH8.4)加入 5 μ l Oregon Green 488 BAPTA-1 (或 CM-H₂DCFDA)。
- 3、將植物根尖浸泡於染劑 30 分鐘。
- 4、銅逆境處理。將以染劑前處理之植物根尖以逆滲透二次水短暫清洗，迅速置入欲處理之銅處理中 15 分鐘。
- 5、顯維攝影。剪下根尖一公分，放置於已滴上一滴逆滲透二次水的載玻片上，蓋上蓋玻片。置於顯微鏡下觀察。
- 6、調整焦距及光源亮度，調整根尖至視野，以 40 倍物鏡，10 倍目鏡，適當的曝光時間拍攝之。
- 7、改以 495~515nm 的激發光，515~535nm 濾鏡，分別調整不同曝光時間拍攝之。

八、植物根尖蛋白質萃取

- 1、Extraction buffer 預先解溫
- 2、取已前處理的田菁根尖 1 公分，15 顆，收集至含有 70 μ l extraction buffer (4°C) (含 1 %PMSF(儲存在-20°C))的 1.5 ml 離心管。
- 3、研磨約 35-40 秒，放在冰上。
- 4、待全部樣品研磨完畢，將離心管置於室溫 5 分鐘，使 SDS 溶解，並離心 (13200×g，

- 10 分鐘)。
- 5、取上清液，置於冰上或-20℃儲存：為蛋白質樣品。
 - 6、蛋白質定量 (Bio-Rad Dc Protein Assay, Hercules, CA, USA)。取 50 μ l A 溶液加入 1 μ l S 溶液，混合均勻，當作 A' 溶液。
 - 7、吸取 10 μ l 蛋白標準液 (分別為 0, 1, 1.5, 2 μ g/ μ l BSA) 及 10 μ l 蛋白質樣品，至乾淨的 1.5 ml 微量離心管。
 - 8、加入 50 μ l A' 溶液，劇烈震盪。
 - 9、加入 400 μ l B 溶液，快速劇烈震盪。
 - 10、待 15 分鐘後，以 750 nm 波長測吸光值。
 - 11、以 0, 1, 1.5, 2 μ g/ μ l BSA 之吸光值作標準曲線，以求蛋白質樣品之濃度。

九、蛋白質電泳

- 1、將蛋白質樣品(15 μ l)加入 6 倍的 protein sample dye 3 μ l，以 70-75℃加熱 10 分鐘。再放置於冰中冷卻 5 分鐘。
- 2、進行 polyacrylamide gel 電泳分析，電壓 200V，60 分鐘。
- 3、取 NuPAGE Novex Bis-Tris Gel(Invitrogen)，置入電泳槽中。
- 4、配置 running buffer 1 和 running buffer 2(如 Appendix 3.)。
- 5、加入 running buffer 1 至電泳槽外槽，而加入 running buffer 2 至電泳槽內槽。
- 6、蛋白質樣本 Loading。
- 7、電壓 200V，60 分鐘電泳。
- 8、電泳完畢後將膠片以二次水清洗。

十、西方墨點轉印法(Western Blotting)

- 1、取 8 公分乘 7 公分之 PVDF transfer membrane 及兩張 3M paper，用甲醇 (methanol) 潤濕，以(-)3M paper-gel-membrane-3M paper(+)方向放入西方墨點轉印裝置，注入適量 transfer buffer，進行蛋白質轉印，電壓 100V，70 分鐘。
- 2、轉印後的 transfer membrane 置於室溫至入 20 ml blocking solution 搖晃 1 小時，再以 TBST 溶液各 20 ml 洗 2 分鐘 2 次、5 分鐘 3 次。
註：blocking solution (20 ml TBST (20 mM Tris base, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20); 1 克脫脂奶粉(5%))
- 3、接著進行免疫偵測反應，若為偵測 phospho-MAPK 則將 transfer membrane 浸入 10 ml blocking solution (含 0.01 ml phospho-p44/42MAPK antibody(Cell Signaling technology))，置於 4℃，緩慢地搖晃 16 小時；若偵測 MAPK 則取 20 ml blocking solution (含 0.005 ml p44/42MAPK antibody)，置於 4℃，緩慢地搖晃 16 小時。
- 4、取出 transfer membrane，置於 TBST buffer 各 20 ml 洗 5 分鐘 3 次。
- 5、換加入二次抗體 (20 ml TBST、5 μ l 抗體)室溫中，反應 1 小時。之後，再以 TBST 溶液各 20 ml 洗 10 分鐘 3 次。
- 6、進行呈色反應，transfer membrane 置於 ECL(Amersham)中呈色，在 ECL film(Amersham)下直至專一性的反應條帶出現。
- 7、洗去 PVDF transfer membrane 中的抗體 (Stripping)

- 8、stripping buffer: (35.5 μ l 2-mercaptoethano, 10 ml 10% 的 SDS, 3.125 ml 1M Tris-base, 加水到 50 ml)。
- 9、把 membrane 移入 50 ml 的 stripping buffer 中。在 60 °C 中，搖動 20 分鐘。
- 10、到掉 buffer，再 TBST 溶液各 20 ml 洗 2 分鐘 2 次、15 分鐘 1 次、5 分鐘 3 次。
- 11、連續上述 5.3.5 的 blocking 步驟。

十一、退化性引子(degenerate primers)之設計及製備

- 1、搜尋植物界已發表之 MAPK 基因序列，以程式進行核苷酸及氨基酸序列分析比對，截取保留度高之區域作為設計依據。
- 2、引子合成及純化由每得科技有限公司(Medclub Scientific Co. LTD)完成
- 3、置於 4 °C，緩慢地搖晃 16 小時純化後之引子中加入 Rnase-free water 使最後濃度為 0.1mM，混合均勻使之溶解，短暫離心後儲存於-80°C 備用

十二、植物組織 RNA 萃取

- 1、前置作業，研鉢、剪刀、鑷子、刮勺以 160°C 滅菌 16 小時，450 μ l RLT buffer (內含 1% β -mercaptoethanol)預先配置。
- 3、剪取適量植物組織，置入事先經液態氮預冷的研鉢中，將植物組織磨碎。
- 4、迅速取出約 0.1g 粉末置入含有 450 μ l RLT buffer (內含 1% β -mercaptoethanol)的 1.5ml 微量試管中劇烈震盪使粉末
- 5、置於 56°C 水浴 2 分鐘，使細胞裂解。
- 6、將裂解後之溶液全部吸至 QIAshredder spin column，以 8,000g 離心 2 分鐘。
- 7、吸取 Collection tube 中之上清液致另一新的微量試管。
- 8、加入約 225 μ l (約上清液體積的一半)之酒精(96~100%)，快速混合均勻。
- 9、將上清液取入至 Rneasy mini column，以 8,000g 離心 15 秒。
- 10、倒掉濾液，加入 700 μ l RW1 buffer 於 Rneasy mini column，8,000g 離心 15 秒。
- 11、將 Rneasy mini column 移置新的 Collection tube 中，加入 500 μ l RPE buffer 於 tube 中，8000g 離心 15 秒。
- 12、倒掉濾液，加入 500 μ l RPE buffer，13,000g 離心 2 分鐘，使 Rneasy membrane 乾燥。
- 13、將 Rneasy mini column 移至新的微量試管，13,000 g 離心 1 分鐘，以除去殘存的酒精。
- 14、將 Rneasy mini column 移至新的微量試管，加入 30 μ l RNase-free H₂O 溶解 RNA，於室溫下靜置 5 分鐘。
- 15、以 13,000g 離心 1 分鐘。
- 16、重複步驟 11.12.。
- 17、取 1 μ l 稀釋至 100 μ l，以 OD260 測量 RNA 濃度。
- 18、將每管 RNA 濃度調成 1 μ g/ μ l，保存於-70°C。

(十三)、RT-PCR(反轉錄聚合酶鏈鎖反應)

- 1、0.2ml PCR 反應管依序加入反應物(如 Appendix)。

2、充分混和後，設定溫度循環機，進行 RT-PCR：

48°C, 45min, 1cycle, reverse transcription;

94°C, 2min, 1cycle, AMV RT inactivation and RNA/cDNA/primer denaturation;

[94°C, 30sec; 60°C, 1min; 68°C, 2min,], 20cycles, denaturation, annealing, extension;

68°C, 10min, 1cycle, final extention;

4°C, soak

3、取 10µl 所合成之 DNA 片段加入 DNA loading dye 後，於含有 0.05%EtBr 之 1%瓊脂膠體(agarose gel, Promega, USA)中進行電泳。

4、將膠體於 UV 燈下照相並由其分子量確定產物是否正確。

十四、資料分析

1、照片螢光之明度分析，以 Adobe Photoshop 分析之

2、數據資料以 SAS 分析 LSD(least significant)

3、大豆 MAPK 和不同物種之 MAPK 所構築之親源演化樹(family tree)分析。

以 Bio Edit 5.0.6 分析之，各基因之胺基酸序列取自 NCBI (National Center Biotechnology Information) 資料庫

以 Clustal Multiple alignment 後，存成 fasta 格式的檔案。

用 MEGA 2.1 來轉換 fasta 檔至 meg 檔。

利用 MEGA 2.1 中的 UPGMA 的功能排出親緣樹。

4、大豆 MAPK 和不同物種 MAPK 胺基酸序列保留性比較分析，以 Bio Edit 5.06 分析之。

叁、研究結果與討論

- 一、以不同濃度的氯化銅處理田菁及大豆種子二天，觀察其萌芽率。結果發現隨著濃度的升高，種子萌芽率皆下降，在 $1600\ \mu\text{M}$ CuCl_2 ，大豆種子萌芽率已降至低於 50%，而田菁種子萌芽率則高於 60%。(如 Figure 1.)
- 二、取催芽二天後的田菁及大豆幼芽，以不同濃度的氯化銅處理二天，記錄其根長。結果發現隨著處理不同濃度的氯化銅，對田菁及大豆根部生長有顯著的影響，生長受到抑制。(如 Figure 2.)
- 三、取催芽二天後的田菁及大豆幼芽，再於培養皿中生長二天，以不同濃度的氯化銅處理六小時，以 Evans blue 染色法分析根尖細胞死亡之程度，Evans blue 染劑不能染上細胞膜未受損的活細胞，但能染上損壞的細胞膜，可染上死亡的細胞，因此能染上死亡的細胞(Chang, 2005)，結果發現過量銅離子能誘導田菁和大豆的根尖細胞的死亡，死亡程度隨處理的濃度增加而上升。(如 Figure 3.)
- 四、以 ROS 螢光指示劑觀察大豆及田菁根尖細胞的 ROS 累積情形，在顯微鏡下觀察螢光的情形，拍照之(如 Figure 4.和 Figure5.)，並以 Photoshop 分析各個圖片中根尖的螢光亮度值，以對照組之螢光亮度值作為 1，相對螢光亮度值為其他組的螢光亮度值和對照組螢光亮度值的比值(如 Figure 6.)。發現大豆根尖 ROS 隨處理氯化銅濃度的增加而上升，而田菁根尖 ROS 累積情形的趨勢和大豆不相似，於 $25\ \mu\text{M}$ CuCl_2 達到高峰，再隨氯化銅濃度升高而下降。
- 五、鈣離子是細胞內重要的訊息傳遞物質。我們使用鈣離子螢光指示劑，在顯微鏡下觀察螢光的情形，拍照之(如 Figure 7.和 Figure 8.)，並以 Photoshop 分析各個圖片中根尖的螢光亮度值，以對照組之螢光亮度值作為 1，相對螢光亮度值為其他組的螢光亮度值和對照組螢光亮度值的比值(如 Figure 9.)。在實驗結果中，大豆和田菁根尖 Ca^{2+} 累積隨處理氯化銅濃度的增加而上升，可能影響到細胞死亡程度。
- 六、為檢驗鈣離子或其下游分子是否參與過量銅離子導致植物細胞死亡的途徑，故以 W-7(CDPK、Calmodulin 抑制劑)和 Ca^{2+} 螯合劑 EGTA 前處理大豆和田菁根部一小時，再處理氯化銅，發現可以降低過量銅離子對大豆及田菁根部的細胞死亡程度，推測 Ca^{2+} 、CDPK 參與銅引發大豆根部細胞死亡的途徑。(如 Figure 10.和 Figure11.)
- 七、以西方墨點法去偵測大豆及田菁根尖細胞中，銅逆境是否牽涉到 MAPK 的磷酸化，利用動物系統的 phospho-MAPK 抗體和 MAPK 抗體去偵測大豆及田菁根尖細胞 MAPK TEY or TDY motif 磷酸化的情形，其中 MAPK TEY or TDY motif 磷酸化的作用通常代表著 MAPK 被活化而能夠磷酸化下游的分子。實驗結果發現，大豆根尖細胞的蛋白質經西方墨點法分析，底片上在約 38、42、和 64-kDa 附近能發現有條帶出現，且條帶深度隨處理氯化銅濃度升高而加深，代表著在大豆根尖細胞的蛋白質，隨處理銅濃度的升高，約 38-、40-、42-、和 64-kDa MAPKs 被磷酸化之量上升。而在大豆根尖細胞蛋白質的西方墨點法分析，底片上在約 40-和 42-kDa 附近的條帶深度隨處理氯化銅濃度升高而增加，表示約 40-和 42-kDa MAPKs 被磷酸化之量增加。若以 MAPK 抗體去偵測 MAPKs，能發現在田菁根尖細胞蛋白質的西方墨點法，底片上有處理氯化銅的條帶深度皆較對照組的條帶深度深，顯示處理氯化銅之植物根部的 MAPK 量較對照組的 MAPK 量多，可能為處理過量銅離子會誘

導田菁根部提升 MAPKs 蛋白質的轉譯量，增加 MAPKs 的含量。而大豆根部則不明顯。(如 Figure 12 和 Figure 13.)

八、從 Gene Bank 搜尋得到大豆之 MAPK1 及 MAPK2 序列，合成引子，再萃取已處理氯化銅之大豆根部細胞的 RNA，以反轉錄酶聚合酶連鎖反應分析大豆 MAPK1 及 MAPK2 之 mRNA 之表現量，結果發現以氯化銅處理大豆根尖細胞，MAPK1 和 MAPK2 基因的 mRNA 之表現量增加，顯示銅會誘發大豆 MAPK1 和 MAPK2 基因進行轉錄。(如 Figure 14.)

九、經過實驗，推測銅引發大豆根部細胞死亡之可能路徑，包含了 Ca^{2+} 、ROS、CDPK pathway、MAPK pathway 等細胞訊息傳遞路徑和訊息傳導物質。(如 Appendix 2)

肆、結論與應用

實驗發現，過量的重金屬會抑制田菁及大豆種子的萌發、根部的生長、及造成根部細胞死亡。其中 Ca^{2+} 、ROS、CDPK pathway、MAPK pathway 等可能參與銅所誘導的大豆、田菁根部尖端細胞死亡之過程。(如 Appendix 2)

重金屬污染的土地限制了農作物的產量，且直接或間接地嚴重影響到生態環境及人體的健康。因此，研究在過量重金屬的環境下，生物體的生理和生化反應，藉此了解生物體和重金屬之間的關係，探討銅影響大豆、田菁細胞死亡之訊息傳遞路徑，希望進而控制生物體所受的毒害情形，生物體對重金屬的防禦機制及訊息傳遞途徑，未來可以以基因轉殖等基因工程技術，轉入抗重金屬基因或增強植物體對抗重金屬的能力等，作為綠肥植物、抗重金屬植物吸附重金屬來復育土地等用途。

伍、參考文獻

1. Chuan-Ming Yeh, Wan-Chi Hung, and Hao-Jen Hung (2003) Copper treatment activates mitogen-activated protein kinase signaling in rice. *Physiol. Plant.* 119:392-399
2. Hsien-Bing Chang (2005) Effect of zinc on cell death and MAPK activation in rice roots
3. Grant M Calder, V. E. Franklin-Tong, Peter J Shaw, and Bjørn K. Drøbak (1997) Ca^{2+} oscillations in plant cells: initiation by rapid elevation in cytosolic free Ca^{2+} levels. *Biochemical and biophysical research communication* 234: 690-694
4. Ryoung Shin and Daniel P. Schachtman (2004) Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:8827-8832
5. 葉顯銘、陳少燕、黃定鼎、黃浩仁 (2004) 清理重金屬污染的植物 科學發展 380: 44-49

陸、結果和圖表

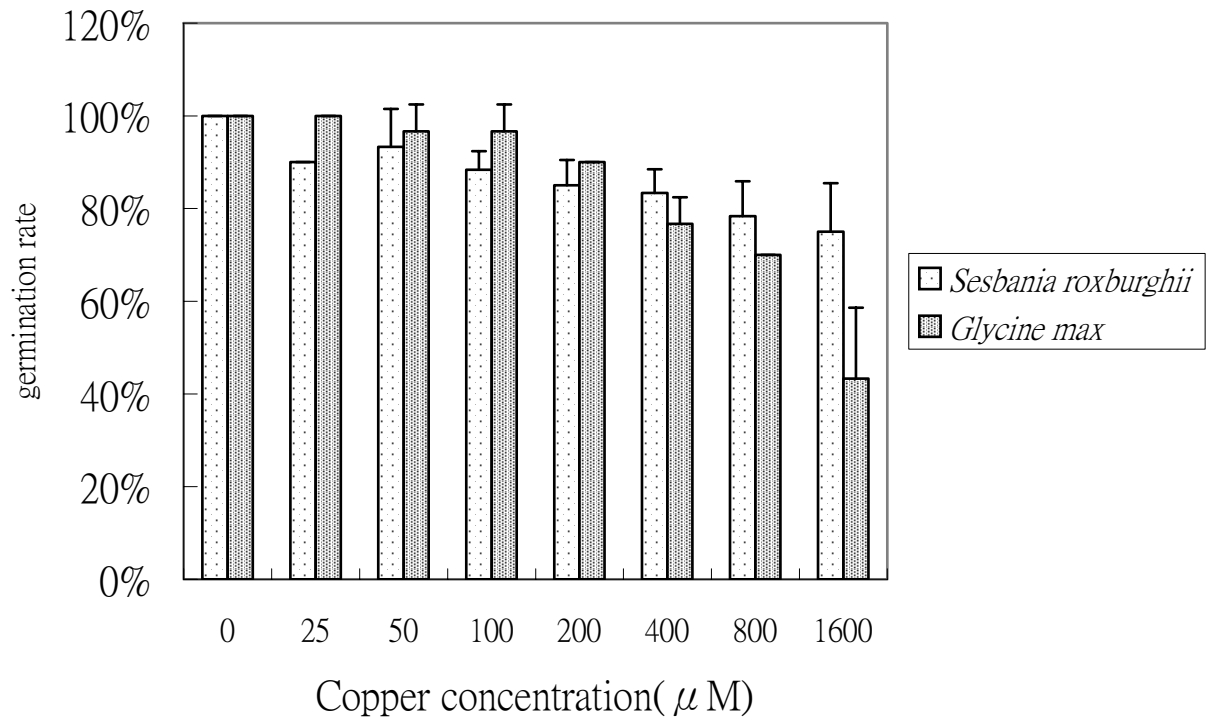
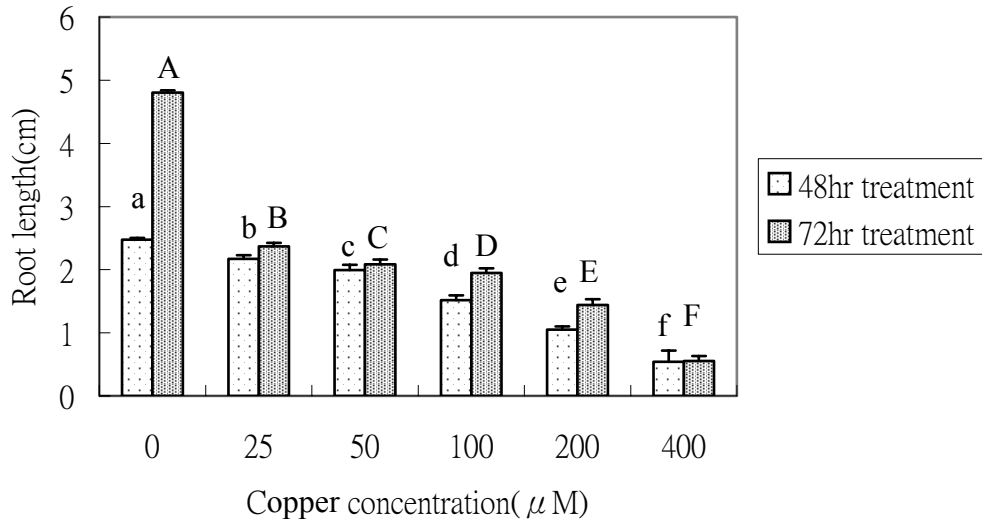


Figure 1. Germination rate of *Sesbania roxburghii* and *Glycine max* seeds in different concentrations of copper

Percentage germination was measured after the seeds were treated with different concentrations of CuCl_2 for 2 days. Result are the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate.

A



B

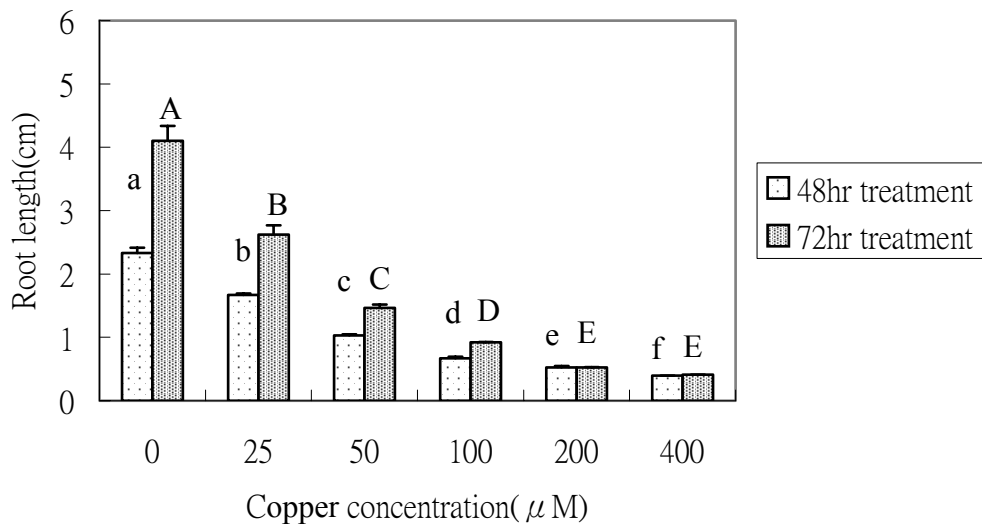


Figure 2. Effects of copper on root growth in *Sesbania roxburghii* (A) and *Glycine max* (B)

Root length was measured at 2 day and 3 day after treated with different concentrations of $CuCl_2$. Result are the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate.

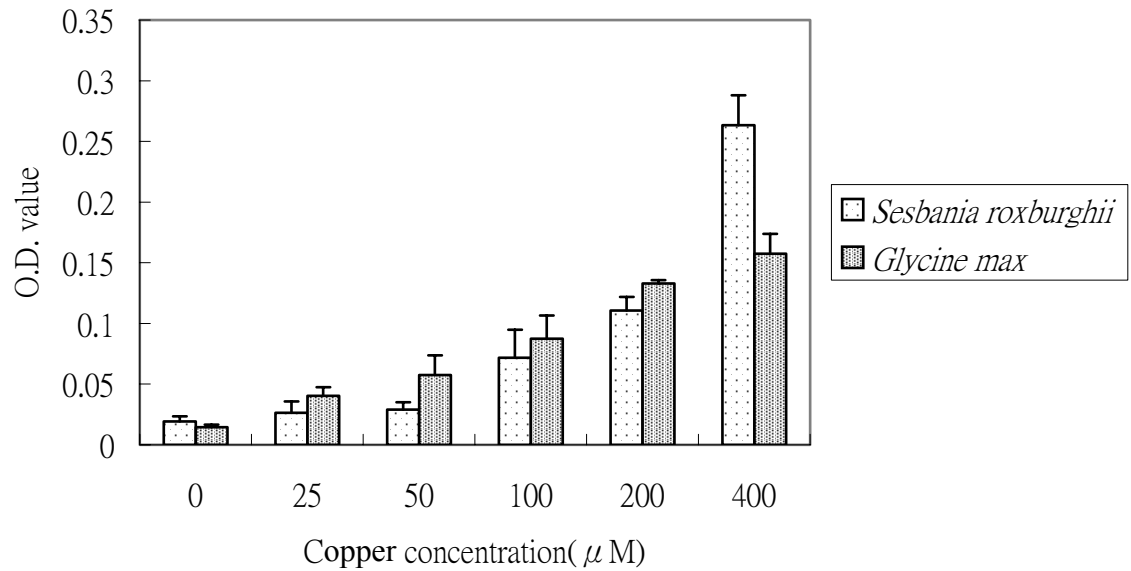


Figure 3. The dosage effect of copper-induced cell death by in *Sesbania roxburghii* roots and *Glycine max* roots

Roots were exposed to different concentrations of CuCl_2 for 6 hours. Cell death was monitored by staining with Evans blue, as described in “Materials and Methods.”

Result are the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate.

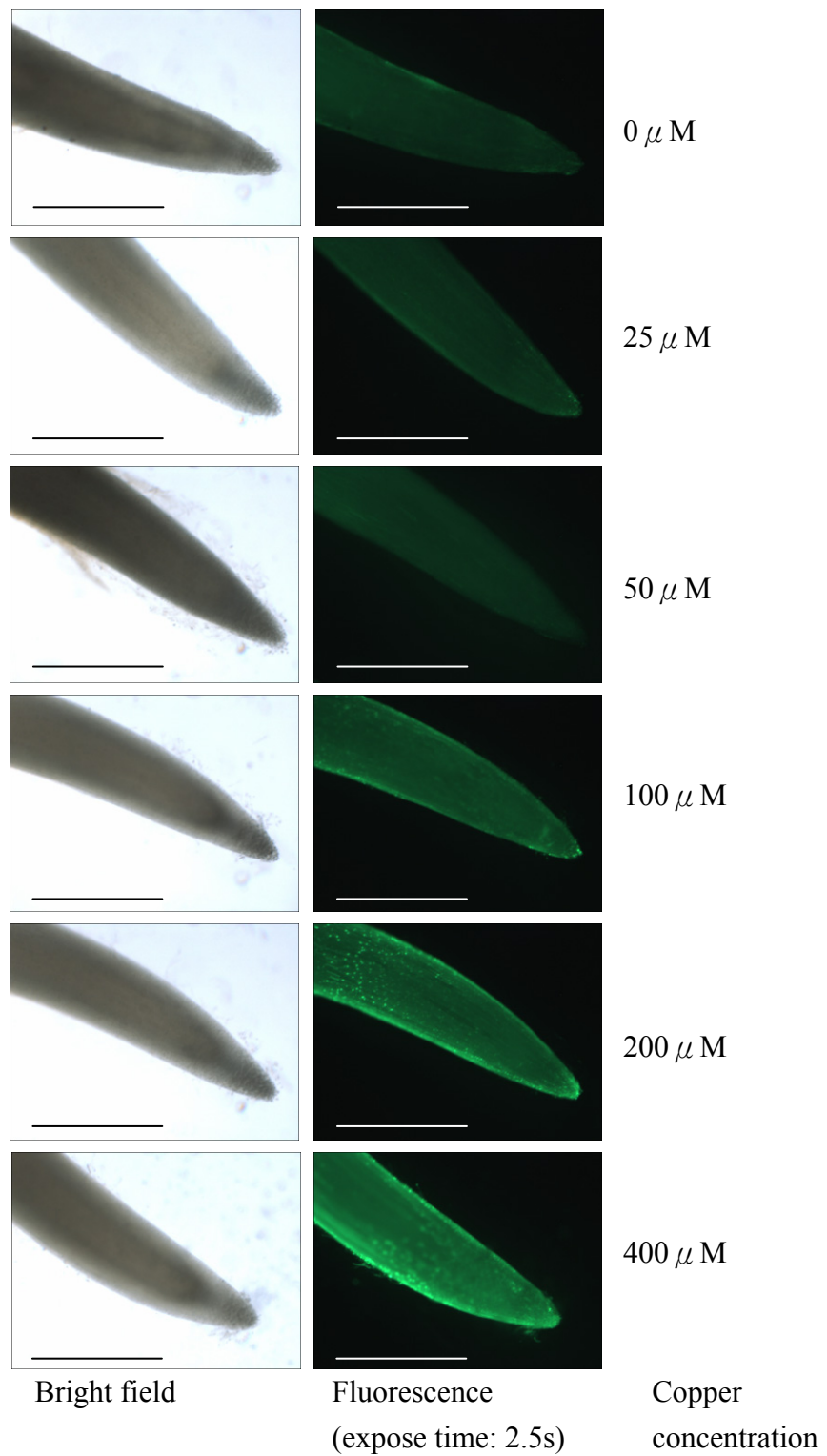


Figure 4. Localization of ROS in *Glycine max* roots during dosage copper treatment for 15 minutes

Fluorescence indicates the presence of ROS. ROS is monitored by CM-H₂DCFDA. Three independent experiments performed in duplicate showed the similar results. (Scale bar, 1 mm)

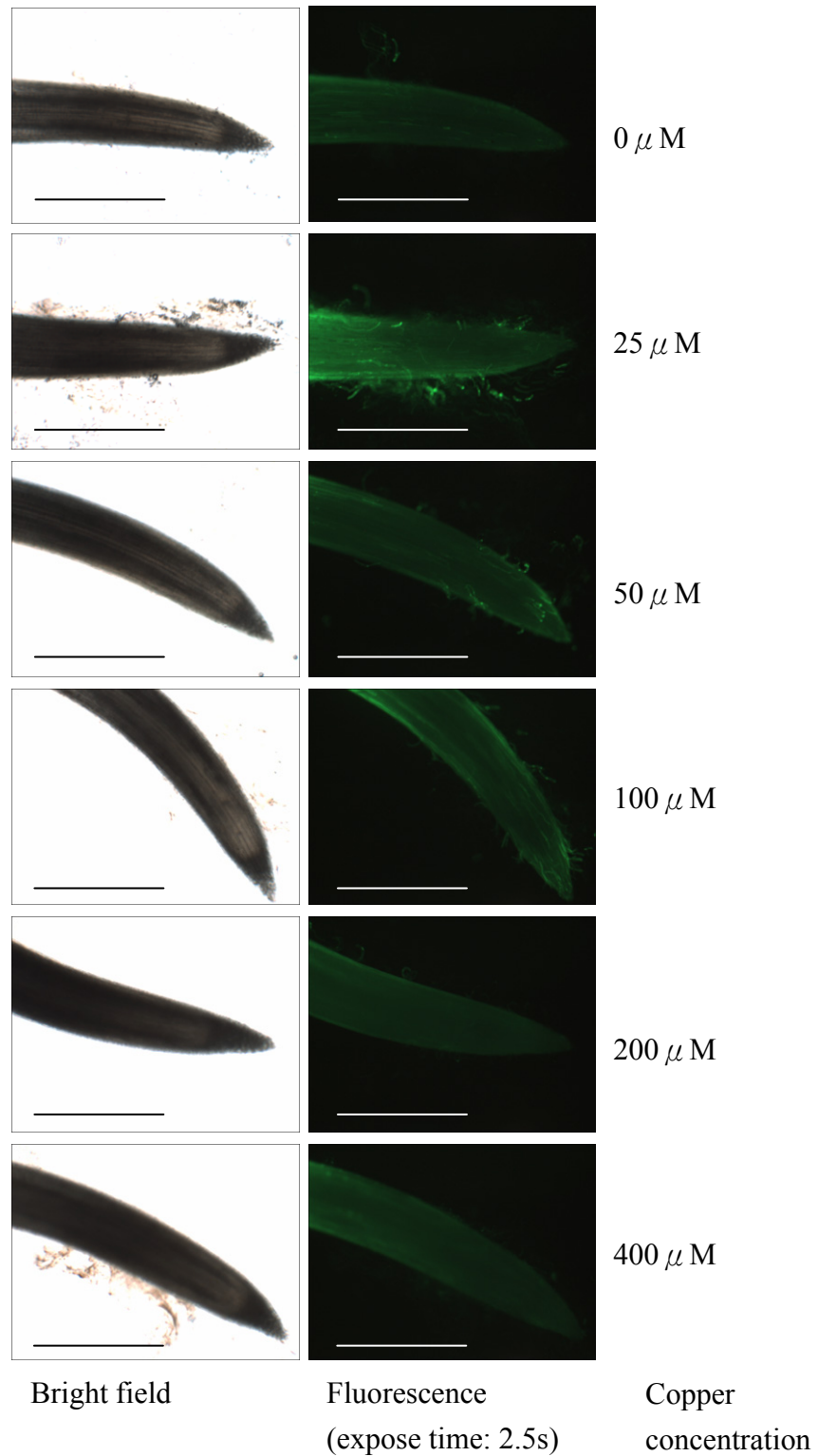
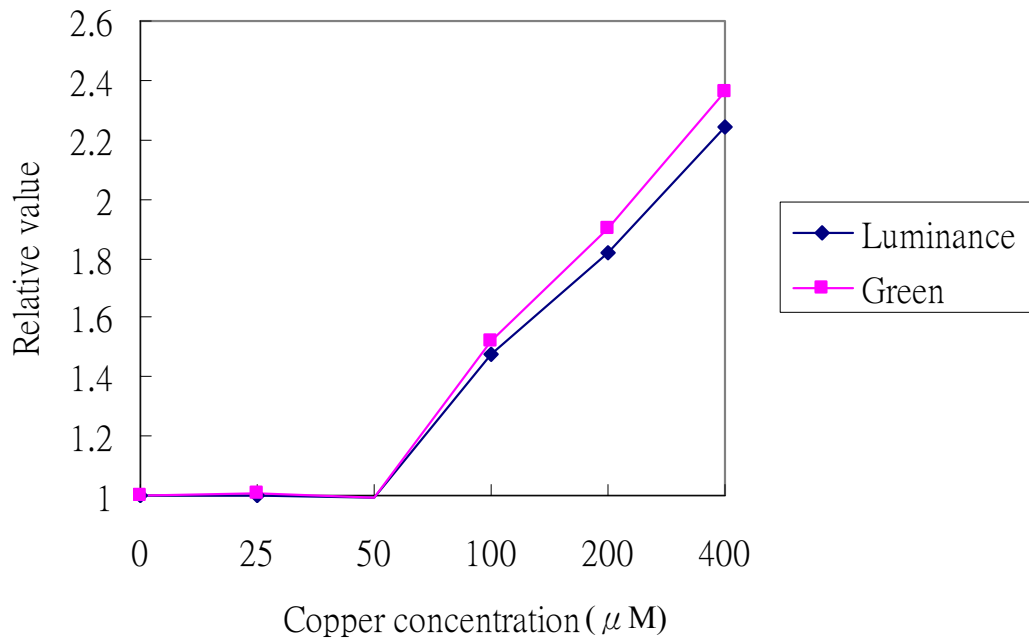


Figure 5. Localization of ROS in *Sesbania roxburghii* roots during dosage copper treatment for 15 minutes

Fluorescence indicates the presence of ROS. ROS is monitored by CM-H₂DCFDA. Three independent experiments performed in duplicate showed the similar results. (Scale bar, 1 mm) Relative luminance of each treatment shows in Figure 6.

A



B

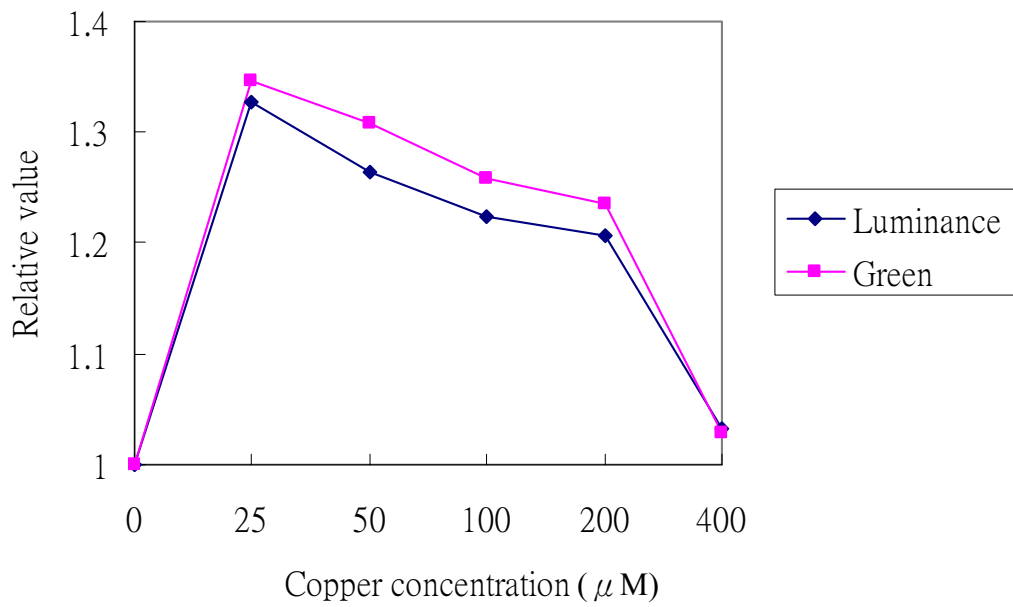


Figure 6. Relative luminance and green of fluorescence of ROS in *Glycine max* (A) and *Sesbania roxburghii* (B) roots during dosage copper treatment for 15 minutes

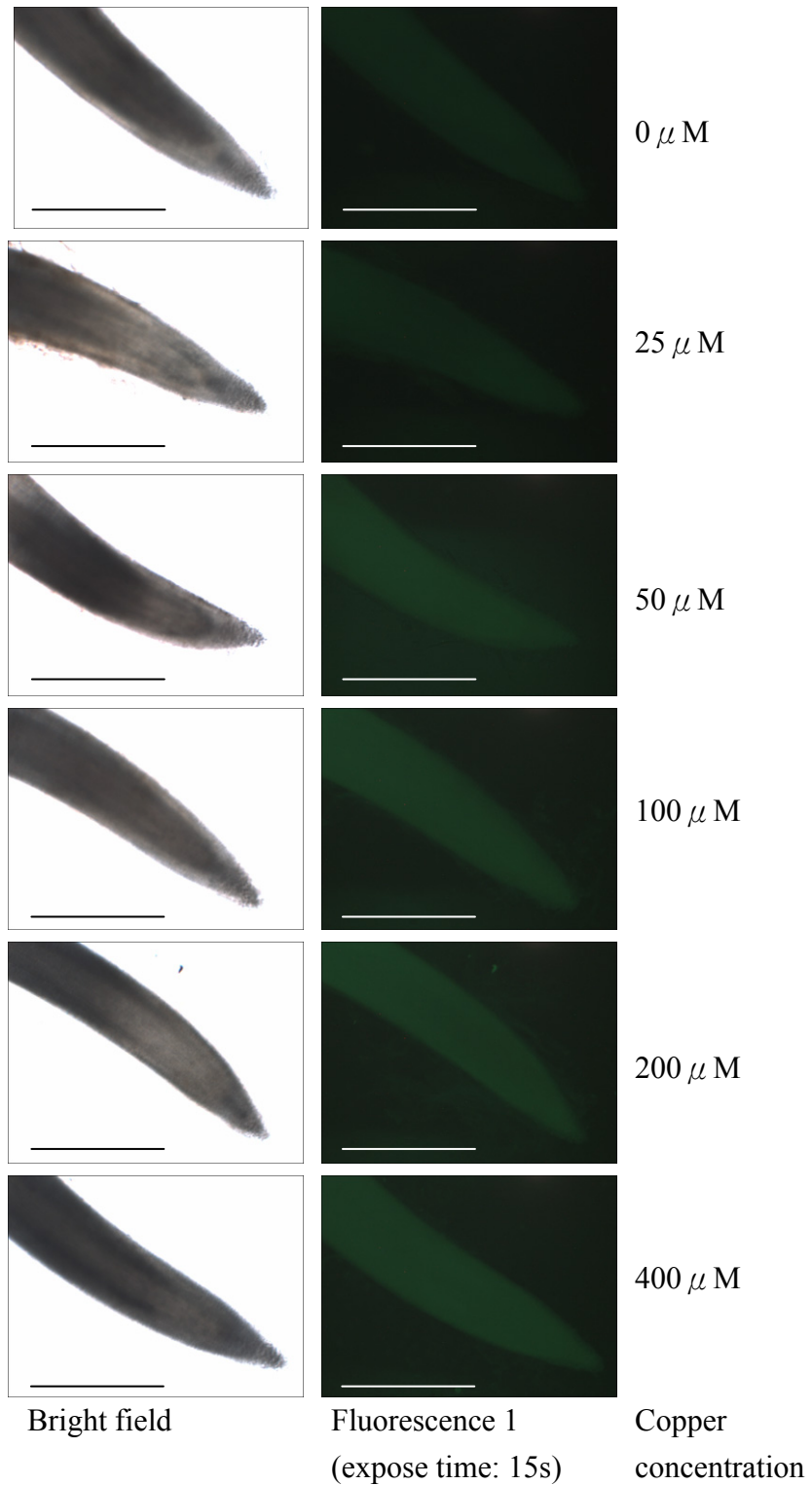


Figure 7. Localization of Ca^{2+} in *Glycine max* roots during dosage copper treatment for 15 minutes

Fluorescence indicates the presence of Ca^{2+} . Ca^{2+} is monitored by Oregon Green 488 BAPTA-2. Three independent experiments performed in duplicate showed the similar results. (Scale bar, 1 mm)

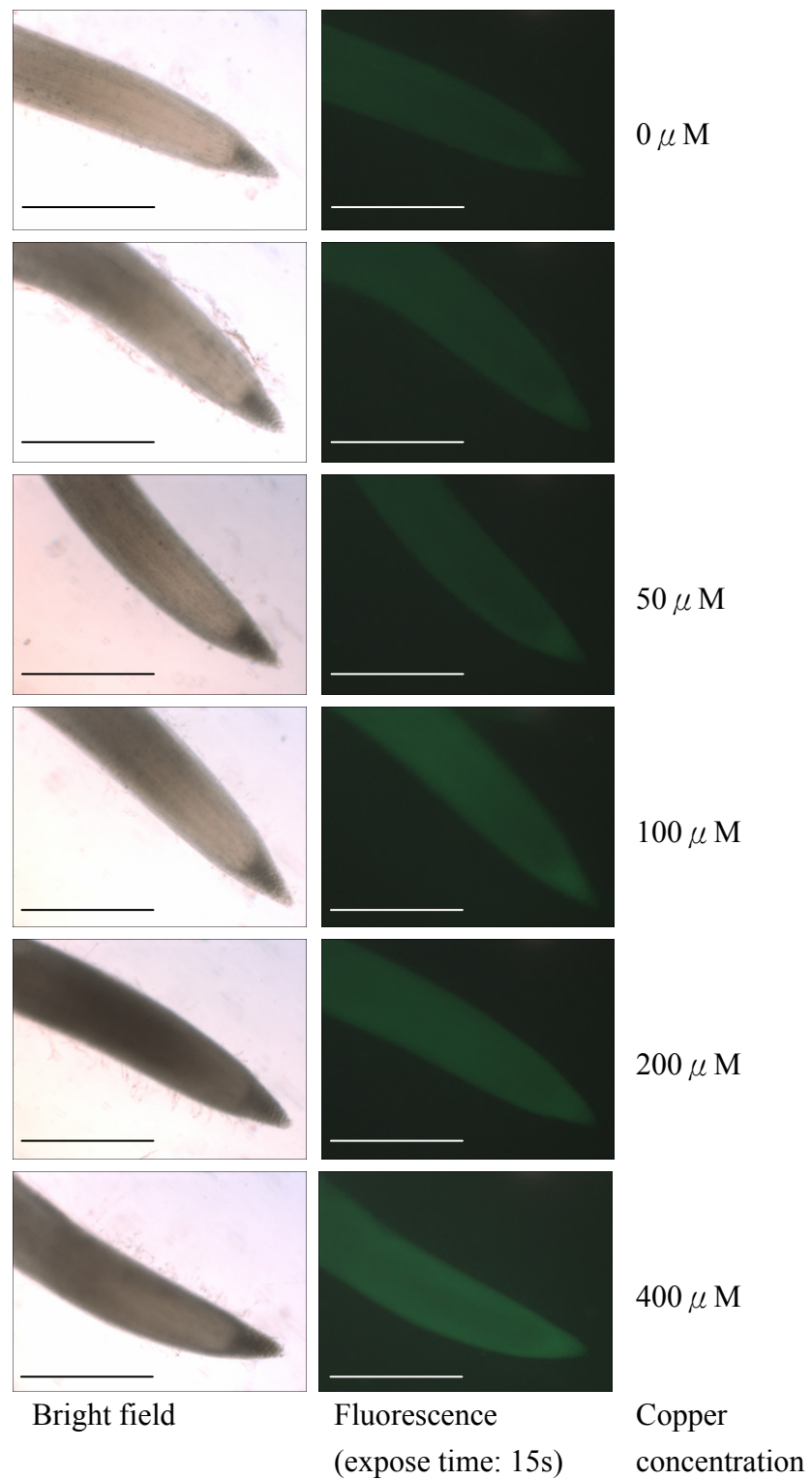
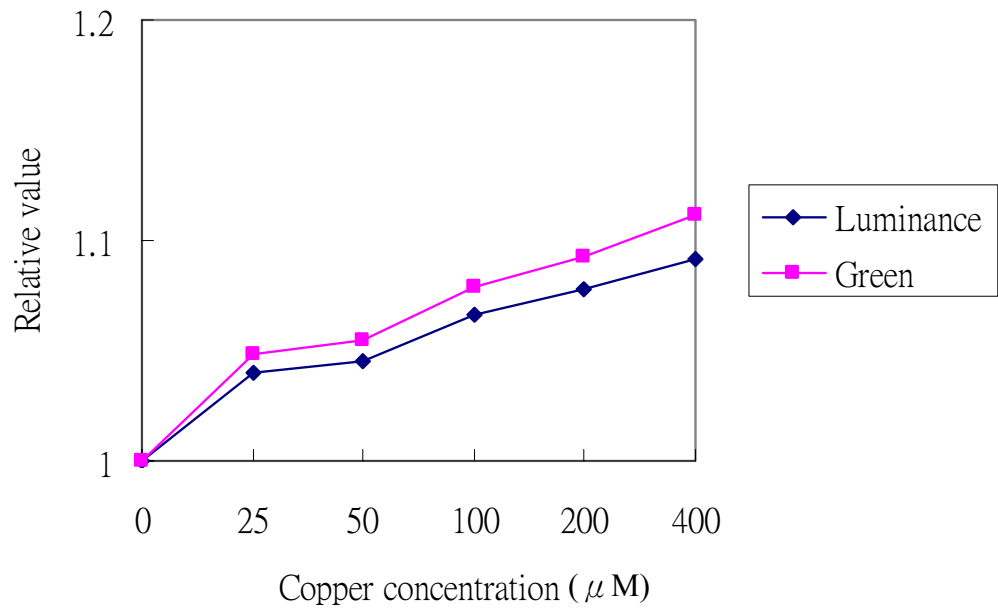


Figure 8. Localization of Ca^{2+} in *Sesbania roxburghii* roots during dosage copper treatment for 15 minutes

Fluorescence indicates the presence of Ca^{2+} . Ca^{2+} is monitored by Oregon Green 488 BAPTA-2. Three independent experiments performed in duplicate showed the similar results. (Scale bar, 1 mm) Relative luminance of each treatment shows in Figure 9.

A



B

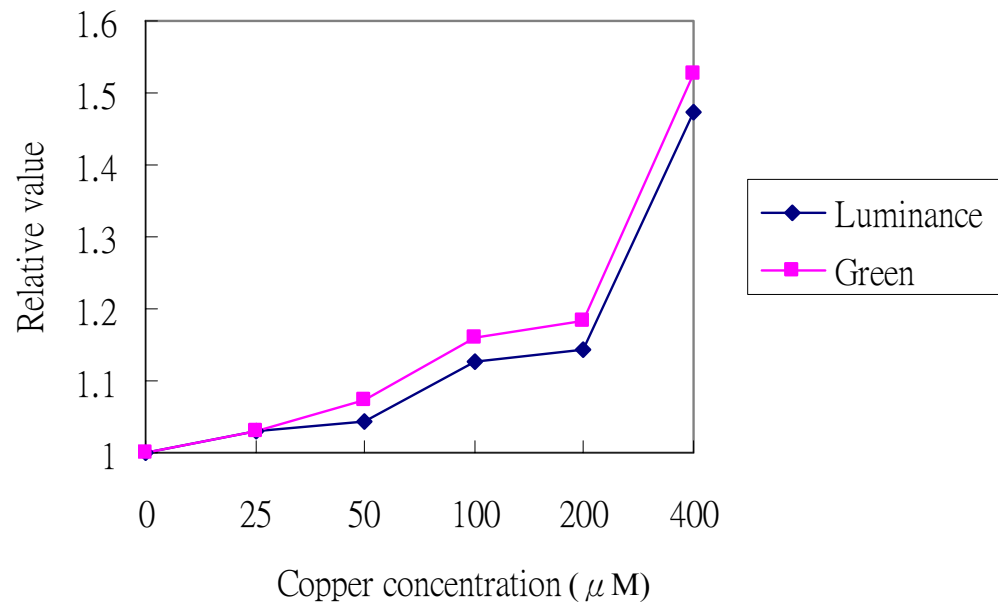
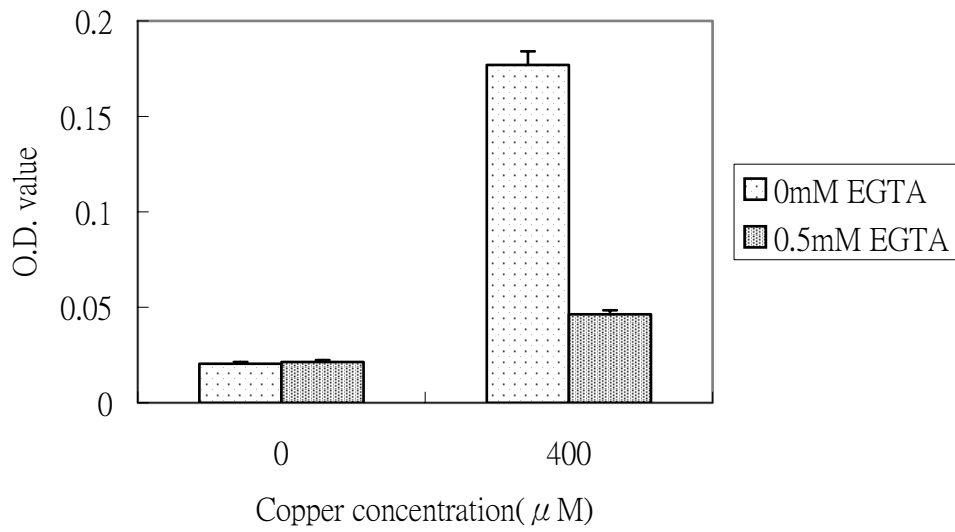


Figure 9. Relative luminance and green of fluorescence of Ca^{2+} in *Glycine max* (A) and *Sesbania roxburghii* (B) roots during dosage copper treatment for 15 minutes

A



B

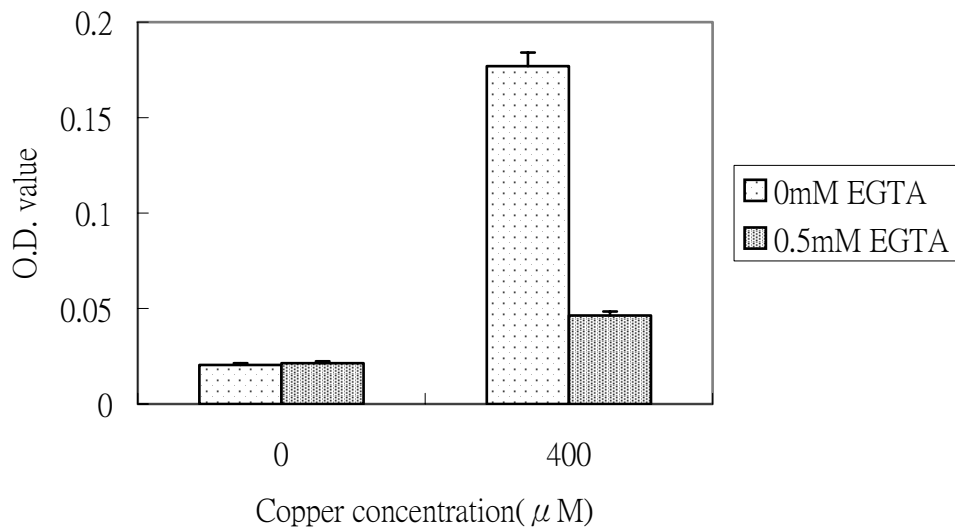
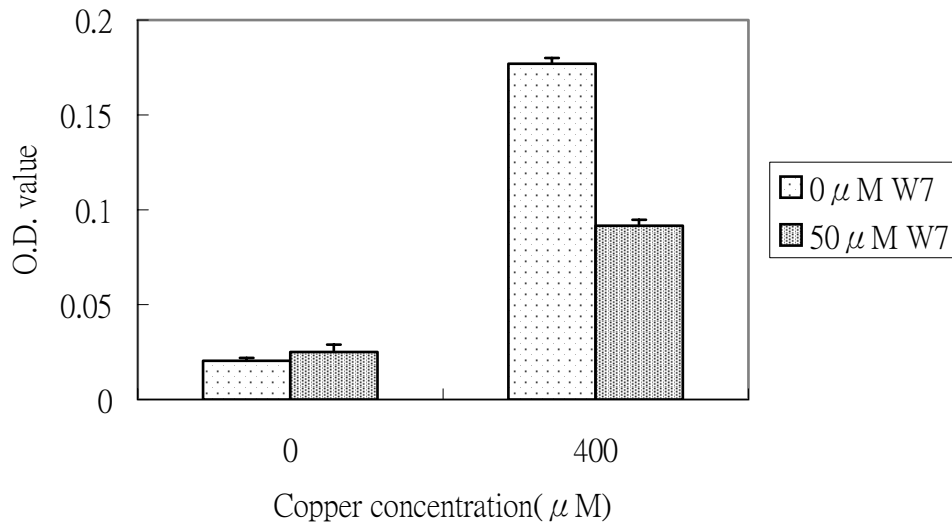


Figure 10. The effect of EGTA on copper-induced cell death in *Sesbania roxburghii* roots (A) and *Glycine max* roots (B). EGTA was added to the root-culture medium 1 hour before the addition of 400 μ M CuCl_2 . Results are the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate.

A



B

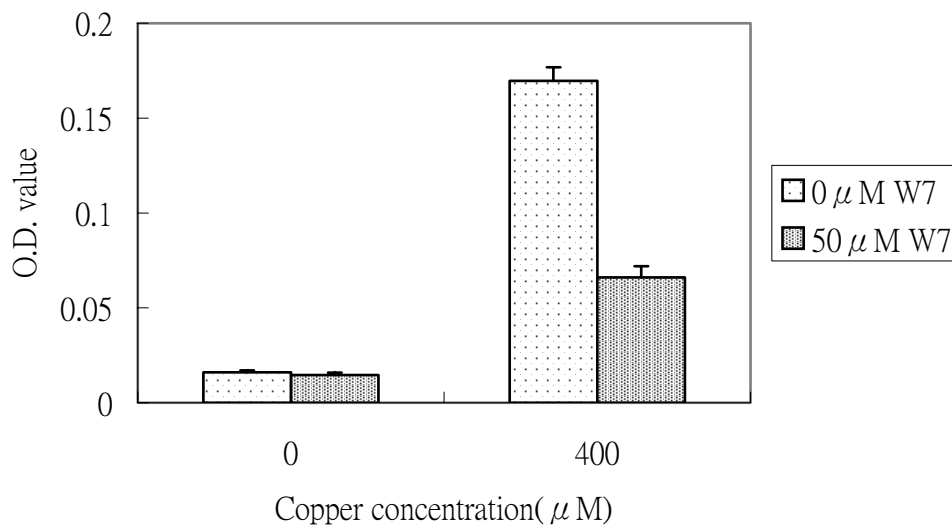


Figure 11. The effect of W-7 on copper-induced cell death in *Sesbania roxburghii* roots (A) and *Glycine max* roots (B)

W-7 was added to the root-culture medium 1 hour before the addition of 400 μM CuCl₂. Results are the mean ±SD of three independent experiments performed in duplicate.

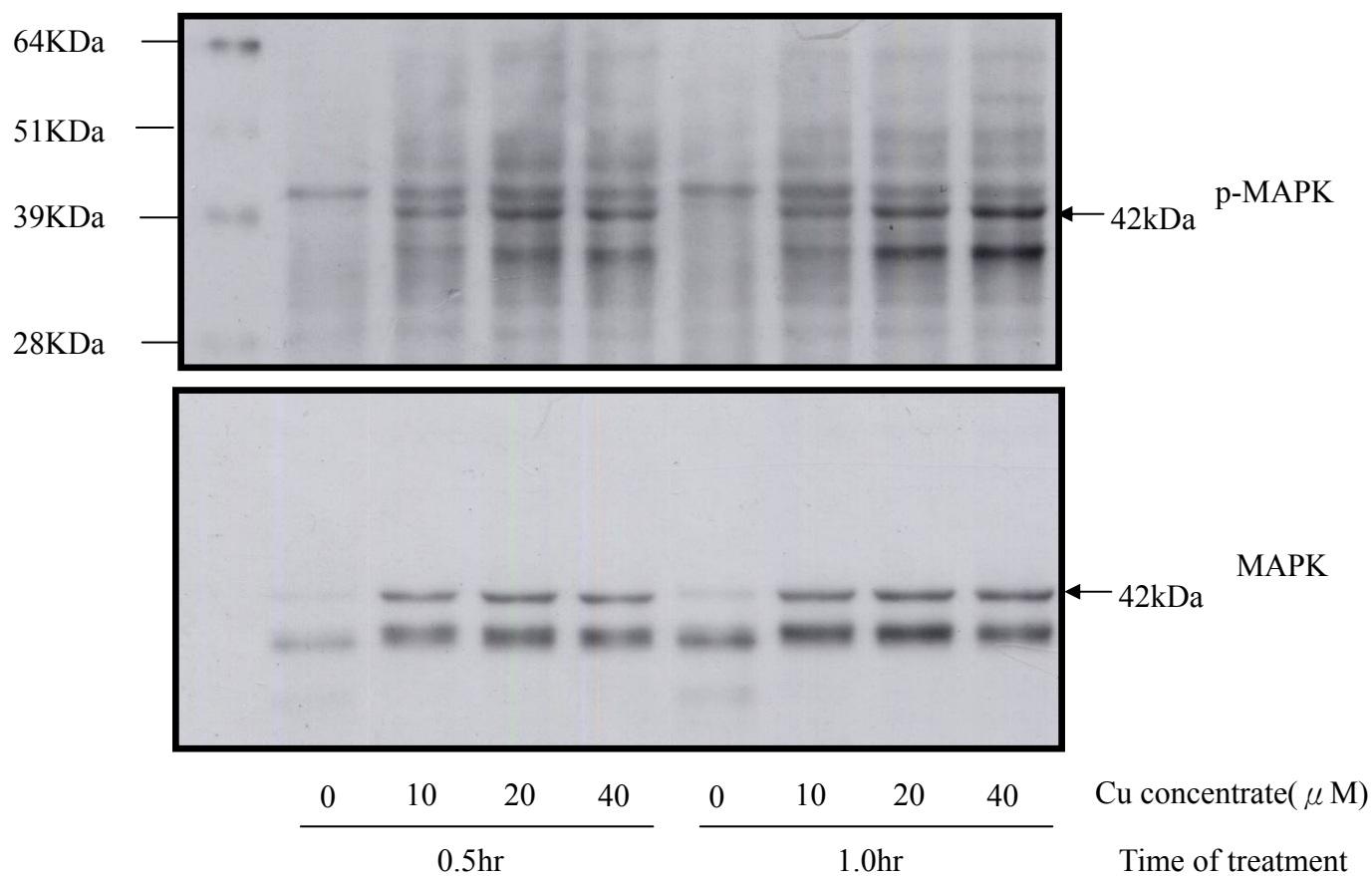


Figure 12. Western blot analysis of MAPK activation after copper treatment in *Sesbania roxburghii* roots

Three independent experiments performed in duplicate showed the similar results.

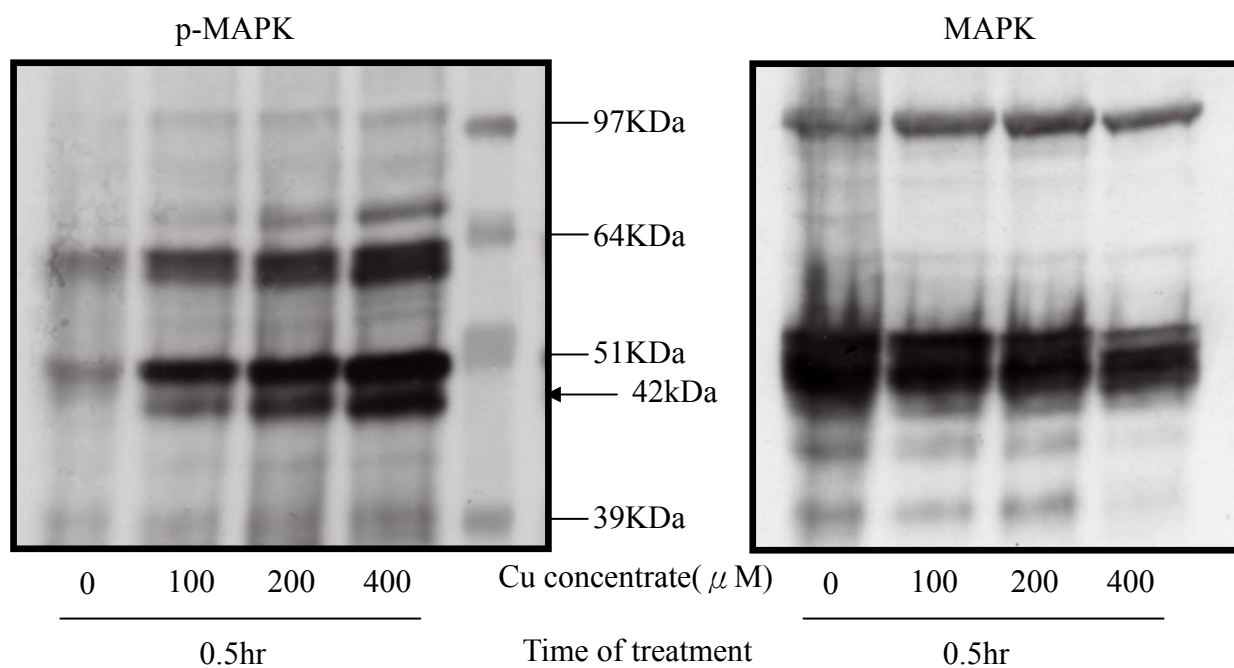


Figure 13. Western blot analysis of MAPK activation after copper treatment in *Glycine max* roots

Three independent experiments performed in duplicate showed the similar results.

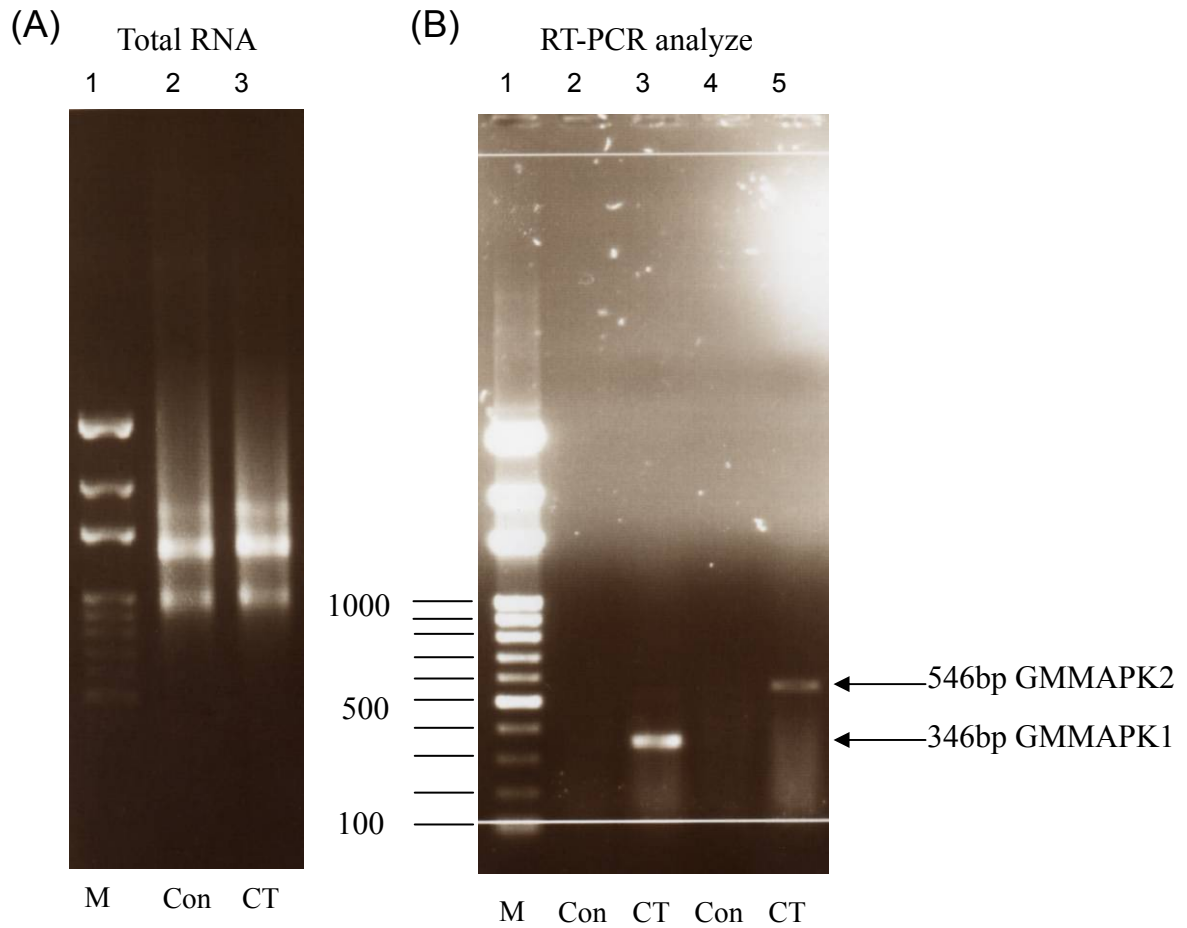


Figure 14. RT-PCR analyze of *Glycine max* MAPK1 and MAPK2 mRNA expression

RNA were extracted from the roots of *Glycine max* after copper treatment: 0 μ M (Con) and 400 μ M (CT). Markers were loaded in Line1. Total RNA were shown in (A). RT-PCR analyze by using primers were shown in (B) and the transcripts were shown by arrows at the right.

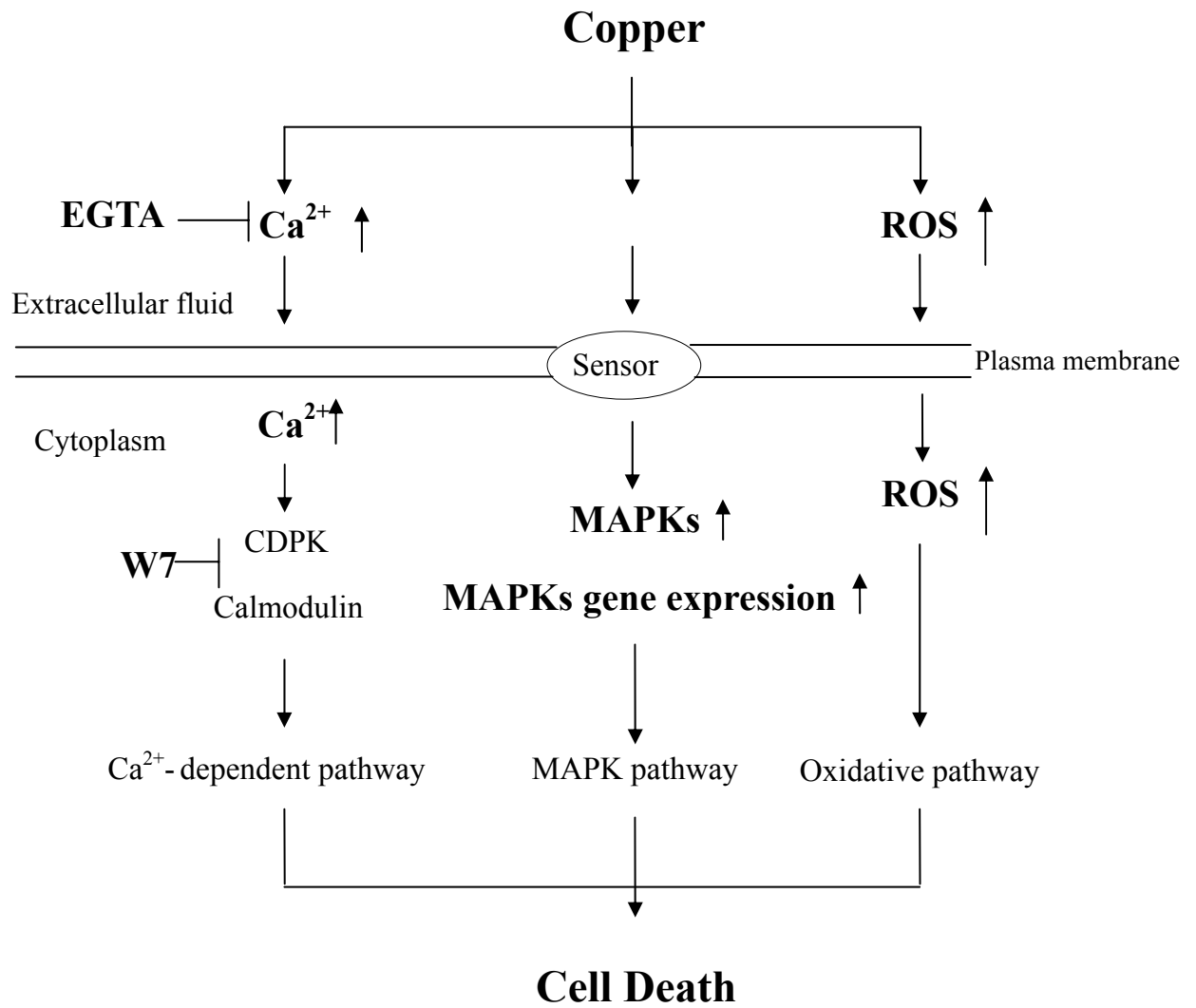
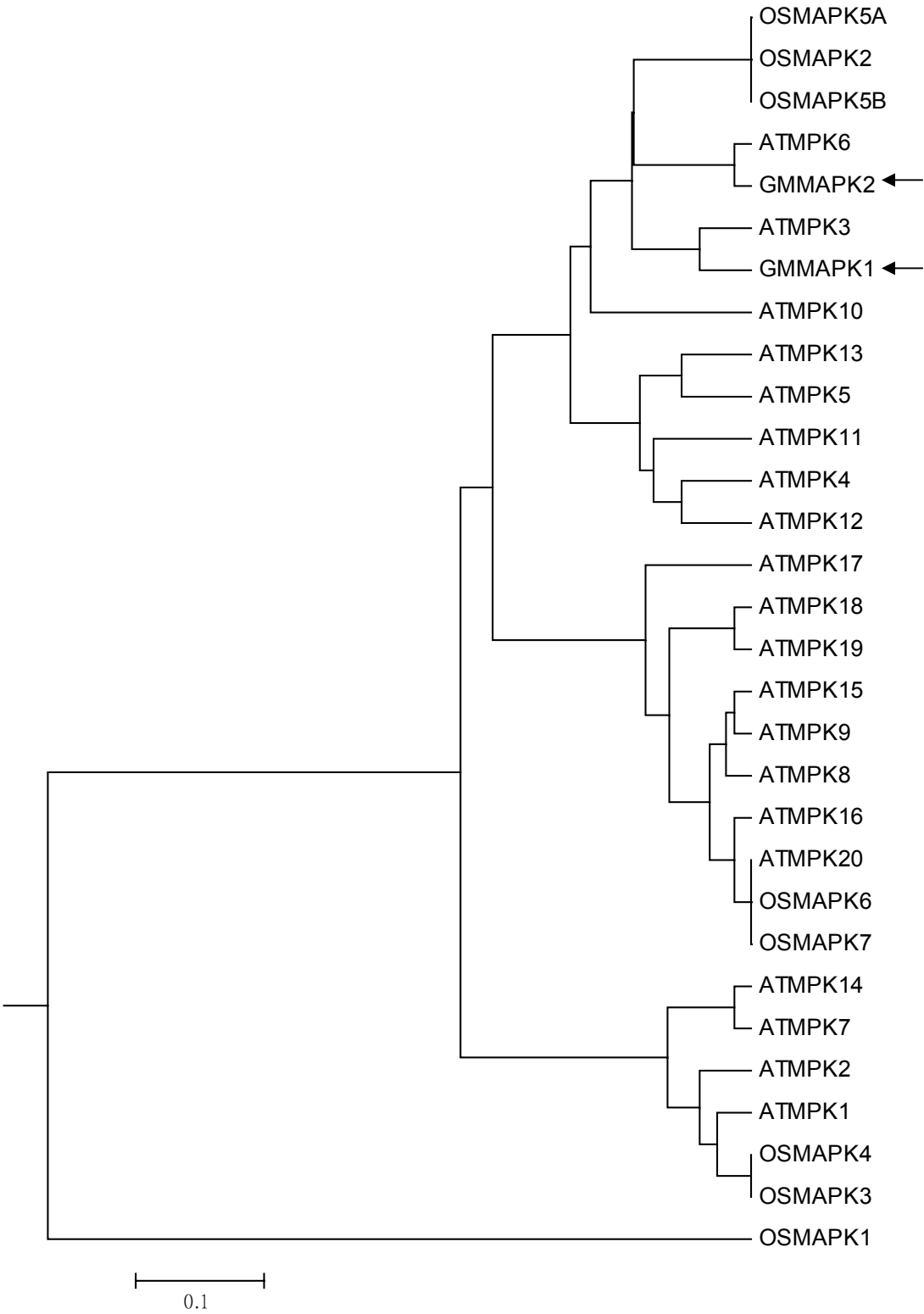


Figure 15. The presumable copper-induced cell death pathway

柒、附錄

(A)



(B)

ATMPK6	1	MDGGSGQPAADTEMT	60
OSMAPK2	1	-----MDGAP-----	33
GMMAPK2	1	MEGGGAAPPADTVMSDAAP----	56
GMMAPK1	1	-----MAGVNP-----	36
WIPK	1	-----MADANMG-----	40
ATMPK6	61	KYKPPIMPPIGKGAYGIVCSAMNSETNESVA	120
OSMAPK2	34	KYQPPIMPPIGRGGYGIVCSVMNFETREMV	93
GMMAPK2	57	KYKPPIMPPIGKGAYGIVCSALNSETNEHV	116
GMMAPK1	37	KYRPPIMPVGRGAYGIVCSLLNTEETNELV	96
WIPK	41	KYRPPIMPPIGRGAYGIVCSVLNTELNEMV	100
ATMPK6	121	NIVAIRDIIPPPLRN	180
OSMAPK2	94	NIIGTRDIVPPPIQAFNDVYIATELMDTDLH	153
GMMAPK2	117	NVVAIRDIVPPPQREIFNDVYIATELMDTDLH	176
GMMAPK1	97	NVIGLRDIVPPPLRREFNDVYIATELMDTDLH	156
WIPK	101	NVIGLRDIVPPPLRREFSDVYIATELMDTDLH	160
ATMPK6	181	HSANVLHRDLKPSNLLNANCDLKICDFGLARVT	236
OSMAPK2	154	HSANVIHRDLKPSNLLNANCDLKICDFGLARPSS	209
GMMAPK2	177	HSANVLHRDLKPSNLLNANCDLKICDFGLARVT	232
GMMAPK1	157	HSANVIHRDLKPSNLLNSNCDLKIIYFGLARPT	212
WIPK	161	HSANVLHRDLKPSNLLVNANCDLKICDFGLARPN	216
ATMPK6	237	NS-SDYTAAIDVWSVGCIFMELMDRKPLFPGRDHVHQLRLLMELTGTPSEEELEFLN-EN	294
OSMAPK2	210	NS-TDYSAAIDVWSVGCIFMELINRQPLFPGRDHMHQMLRITVIGTPTDDELGFIRNED	268
GMMAPK2	233	NS-SDYTAAIDVWSVGCIFMELMDRKPLFPGRDHVHQLRLLMELTGTPSEADLGFLN-EN	290
GMMAPK1	213	NS-SDYTSAIDVWSVGCIFMELMNKKPLFPCKDHVHQMRLLTTELTGTPTEADLGFLVKNED	271
WIPK	217	NS-SDYTAAIDVWSVGCIFMELMNKPLFGKGDHVHQIRLLTELTGTPTEADLGFLQNE	275
ATMPK6	295	AKRYIRQLPPYPROSITDKFPTVHPLAIDLIEKMLTFDPRRRITVLDALAHPLYNSLHDI	354
OSMAPK2	269	ARKYMRHLPPQYPRRTFASMEFRVQPAALDLIERMLTFNPLQRITVEEALDHPYLERLHDI	328
GMMAPK2	291	AKRYIRQLPLYPYRQSFQEKFPFHVHPEAIDLVEKMLTFDPRKRITVEDALAHPLYTSLHDI	350
GMMAPK1	272	ARRYIRQLPQYPRQPLAQVFPFHVHPAAIDLVDKMLTVDPTRKRITVEEALAHPLYEKLHDV	331
WIPK	276	AKRYIRQLPQHPRQQLAEVFPFVNPLAIDLVDKMLTFDPTTRITVEEALDHPYLAHLDA	335
ATMPK6	355	SDEPECT--IPFNDFEN-HALSEEQMKELIYREALAFNPEYQQ-----	395
OSMAPK2	329	ADEPICL--EPFSDFEQ-KALNEDQMKQLIFNEALEMNPNIYR-----	369
GMMAPK2	351	SDEPVCM--TPFNDFEQ-HALTEEQMKELIYREALAFNPEYQQ-----	391
GMMAPK1	332	ADEPICM--EPFSDFEQ-QQLDEEQIKEMIYREALALNPEYA-----	371
WIPK	336	GDEPICP--VPFSDFEQ-QGIGEEQIKDMIYQEALSLNPEYA-----	375

Appendix 1. The phylogenetic relationship of MAPKs to other plant MAPKs (A) and alignment of the predicted Glycine max MAPK1 and MAPK2 with MAPKs from other organisms (B)

The protein sequences shown in these diagrams are listed in the NCBI database

Appendix 2. Primer sequence for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence(5'→3')
GMMAPK1	GMMAPK1-3'UTR-F	GAA AAA CTC AAG GAC TTG AAG CAG GC
	GMMAPK1-3'UTR-R	GCA ATA AGT TAA CGA TGC AAA TAA C
GMMAPK2	GMMAPK2-mid-CDS- F	TGG CTC GTG TCA CGT CTG AAA CTG AT
	GMMAPK2-mid-CDS- R	TCA GGG TTA AAT GCT AGA GCC TCT CG

Appendix 3.. Reactant for experiments

A. RT-PCR

Reactant	Volume(μ l)	Final concentration
Nuclease-Free Water	16	to a final volume of 40 μ l
AMV/Tfl 5X Reaction Buffer	8	1X
dNTP mix (10mM)	0.8	0.2mM
MgSO4 (25mM)	1.6	1mM
Downstream primer	4	1 μ M
Upstream primer	4	1 μ M
AMV Reverse Transcriptase (5u/ μ l)	0.8	0.1u/1 μ l
Tfl DNA Polymerase (5u/ μ l)	0.8	0.1u/1 μ l
RNA Template (0.25 μ g/ μ l)	4	1 μ g
Total volume	40	

B. Evans blue staining

1. 0.25 % Evans blue

Take 1 g Evans blue and add ddH₂O to make to 100 ml

2. Evans blue distain

Take 0.5 g SDS and 25 ml Methyl alcohol, and add ddH₂O to make to 50 ml

C. Western blotting

1. Running buffer

Outer buffer

47.2 ml mops buffer and add 452.8ml ddH₂O to make to 900ml

Take 300ml for inner buffer

Inner buffer

300ml outer buffer +750 μ l antioxidant

2. Transfer buffer

Electrophoresis buffer

	10× stocks
Tris-base	30.285 g
Glycine	144.13 g
Add distilled water to make 1 L	

Transfer buffer

100 ml 10× Electrophoresis buffer + 200 ml methanol + 700 ml distilled water

3. 10× TBS

	10× stocks	10×
Tris-base	12.114 g	200 mM
NaCl	40.03 g	1370 mM
Add HCl to make 499ml at pH 7.6		

1×TBS

50 ml TBS + 0.5 ml 100% Tween-20

Add distilled water to make to 500 ml

3. Blocking solution

TBST + 5 % non-fat milk

4. stripping buffer

35.5μl 2-mercaptoethano,

10 ml 10%SDS

3.125 ml 1M Tris-base

add water to make 50 ml

評語

分量及深度已略俱碩士論文的架式，故選為佳作。值得改進的地方是各項研究顯得片片段段，應該加強各個研究的相關性。例如 ROS、 Ca^{++} 、MAPK 與細胞死亡的相關性及上下游關係，以及大豆和田菁 Cu 的反應不同處，如何用所測得的 Ca^{++} 、ROS 及 MAPK 來解釋。