

胡瓜種子萌發期間子葉內 巨分子的生化轉變

國中教師組生物第二名

台北市立金華女子國民中學

作 者：李 蘭 香

一、研究動機：

雙子葉植物的種子，依萌發後子葉的行爲，大致上可分成兩大類，一類屬於生長性子葉，即種子於萌發後，子葉可不斷生長，甚至進行光合作用，如胡瓜等瓜類植物的種子；另一類屬於萎縮性子葉即種子於萌發後，子葉即不斷萎縮，如綠豆等豆類植物的種子。生長性子葉通常含有多量貯藏性脂質、蛋白質，當萌發時，此類脂質及蛋白質必須經過一特殊的代謝途徑，乙醛酸循環進行「醣新生作用」，才能被生長中的幼苗所利用。通常貯藏的油脂為「三甘油酯」，經過 β -氧化途徑，三甘油酯可轉變為乙醯輔酶A，最後乙醯輔酶A再轉變為醣類或合成其他物質，以供幼苗生長。這些有關脂質的代謝過程。通常發生於一種小細胞器即乙醛酸體內。雖然此一途徑已被科學家們所熟知，但是其發育的生化變化及相關性和控制的機制，則所知仍極有限，本文即在探討其梗概。

二、研究目的：

探討脂質含量較高之種子，於萌發時各種巨分子的生化代謝情形，了解貯藏性脂質、蛋白質等的轉變途徑。

三、研究方法：

1 研究材料：

- ①由市面種子行購買之胡瓜種子，於以蒸餾水浸泡 2 小時，並以 5% 次氯酸鈉消毒 30 分鐘之後，種植於墊有潮濕棉花之培養皿上，只澆以蒸餾水。光照的處理為每天 12 小時照光。暗的處理則置完全黑暗之中。生長的溫度保持 26°C ~

28° C。

②由 0 天至第八天，每天收取子葉數對，供各項實驗之用。

2. 鮮重量與乾重量之測定：

收取的子葉於以濾紙吸乾外附之水分後，分別秤其重量，是為鮮重量；秤完鮮重量之子葉，再置於 80° C 的烘箱中 24 小時，秤得之重量即為乾重量。

3. 酶素、蛋白質溶液之製備

取子葉 10 對，以冰冷之研鉢研磨 1 ~ 2 分鐘，研磨液含 0.05M 磷酸鉀緩衝溶液，PH 7.4 研磨後之磨碎液以 1,000 g 離心 10 分鐘，所得的上澄溶液稀釋至大約 10mg / ml 蛋白質的濃度。此時測定之蛋白質含量為蛋白質總量。上澄液再經 10,000g 離心 10 分鐘之後，所得上澄液供測定溶解性蛋白質、脂質、醣類及酶素活性之用。

4. 脂質之抽取及測定：

依照 Radin (1969) 的方法，子葉以 10ml 甲醇一氯仿 (2 : 1 V / V) 的混合液研磨三次，300g 離心之後，上澄液加入體積之 2MKCl，俟兩層分離之後，把有機溶劑層吸出放入已經先秤好重量之燒杯內，乾燥後，再秤燒杯重，其差即代表脂質的量。

5. 蛋白質之測定：

①取 0.1g 去除脂質之殘渣（烘乾）加入 5ml 10% 三氯醋酸研磨再以 10% 之三氯醋酸洗入離心管中（最後體積 20ml）。

②以 5,000g 離心 10 分鐘，上澄液供測定醣類含量用之。

③加 20ml 1N 氢氧化鈉溶液於沈澱中，混合後置於 90° C 水浴十分鐘，然後過濾。

④所得濾液以酚法測定蛋白質之含量，以光電比色儀 660nm 波長測定吸光密度，並以牛血清蛋白製作標準曲線。

6. 醣類之測定：

①取 1ml 由 5 所得之上澄液，加入 4ml 蔥酮試劑，在沸水浴

中放置 5 分鐘。

②冷卻後，以光電比色儀 600nm 波長測定其吸光密度，並以葡萄糖溶液製作標準曲線。

7. 異檸檬酸分解酶 (IL) 及蘋果酸合成酶 (MS) 活性之測定：

酵素活性之測定均於 26°C 下進行，通常均以吸光度的變化表示其活性的大小。最後單位以每一對子葉所含酵素的單位數 (unit) 表示。通常以每分鐘每 ml 體積改變 0.001 吸光度為 1 單位酵素活性。

①異檸檬酸分解酶依照 Schnarrenberger 等人 (1971) 的方法測定，溶液最後濃度為 0.05M 磷酸緩衝溶液 PH 7.2 0.4mM glyoxylate 及 0.1 mM Phenylhydrazine 而以後兩者經酵素作用形成之 glyoxylate phenylhydrazone 的量代表酵素活性的大小，而以反應溶液於 325nm 吸光度的改變代表酵素之單位數。

②蘋果酸合成酶：依照 Cooper 和 Beevers (1969) 的方法測定，最後反應溶液於加入 0.1ml / mM / DTNB (5,5'-dithiobis - 2 - nitrobenzoic acid) 後，產生之黃色複合物於 410nm 有最大吸光，故可以 410nm 吸光度的改變代表酵素活性的大小。（反應溶液最後濃度為 3ml，含有 0.3 mM Tris 緩衝溶液，PH 8.0，0.3 μM DTNB，15 μM MgCl₂ 及 15 μM glyoxylate）。

8. 三種水解酵素活性之測定：

①蛋白質水解酶

(a) 於試管中加入 1ml 酵素溶液及 4ml 1% 酪蛋白溶液，置於 30°C 中一小時。

(b) 作用前後，分別取 1ml 加入 4ml 蛋白質沈澱劑 (5% 三氯醋酸) 後，放置三十分鐘。

(c) 以 5,000g 離心十分鐘，所得上澄液以 5ml 蒸餾水稀釋。

(d) 於光電比色儀 275 nm 波長測定其吸光密度，並以酰胺酸為標準比較之。

(e) 以一小時內所增加的酰胺酸量，代表蛋白質水解酶的活性。

。

② 澱粉水解酶

(a) 於試管中加入 1ml 酶素溶液及 1ml 1% 澱粉溶液置於 30°C 中。

(b) 五分鐘後，加入 2ml DNS 試劑 (3, 5-Dinitro salicylic acid)，置沸水浴中五分鐘再以自來水冷卻。

(c) 以 16ml 蒸餾水稀釋後，於光電比色儀中測定其 540 nm 波長之吸光密度。

(d) 另以麥芽糖溶液 (0.1-2mg / 1ml H₂O) 製作一標準曲線，而以煮過之酵素溶液作為空白管。

(e) 以經過五分鐘作用時間後所增加之麥芽糖量代表澱粉水解酶之活性。

③ 脂質水解酶

(a) 於試管中加入 5ml 酶素溶液及 5ml 乳化橄欖油溶液，置於 30°C 中一小時。

(b) 然後加入 20ml 1 : 1 的酒精 - 丙酮溶液。

所得溶液於加入 3 滴酚酞溶液後，以 0.05 N 氢氧化鈉滴定之。

以所需氫氧化鈉的毫克當量數代表脂質水解酶的活性。

四、結果與討論：

1 幼苗的發育狀況：(從略)

五、建議及未來展望：

1 我們在國中生物有關植物的營養講解上，最好能兼及豆科子葉的萎縮型和胡瓜等瓜科子葉的生長型這兩種類型的營養方法，方能給與國中學生一明確的概念。

2 以胡瓜子葉為工具，還可做其他代謝如核酸、植物激素和蛋白質代謝等的研究。

六、參考資料：

1. 鄭湧涇和李蘭香，1978，胡瓜子葉粒腺體呼吸活性變化的初步探討 師大生物學報 第十二期第35頁
2. Cooper, T.G. and H. Beevers, 1969, Mitochondria and Glyoxysome from castor bean endosperm, Enzyme Constituents and Catalytic activity, J. Biol Chem, 224 : 3507-13.
3. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951, Protein Measurement with Folin Phenol Reagent, J. Biol Chem, 193 : 265-275.
4. Radin. N.S. 1969 Preparation of lipid extracts Methods Enzymol, 14 : 245-254.
5. Schnarrenberger, C., A. Oeser, and N.E. Tolbert, 1971 Development of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean endosperm during germination, plant physiol, 48 : 566-574.