

中華民國 第 50 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

佳作

040718

逆境入侵！有請細胞壁—探討 PME 基因
At3g49220 功能缺失對阿拉伯芥適應逆境與激
素之影響

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 李渝萱 高二 張惠平	指導老師： 潘彥宏
-------------------------	--------------

關鍵詞：阿拉伯芥、逆境、植物激素

摘要

PME(pectin methyl esterase)果膠甲基酯酶是維持植物細胞壁結構的重要酵素，可藉由分解果膠來調控鈣離子進出，間接影響細胞壁的完整性。本實驗選擇在實驗室中被篩出對熱逆境敏感的突變種，以 NaCl、ABA、GA 加入培養基，探討不同濃度下，突變種與 wt 根生長量的差異；另一方面，我們也用 RT-PCR 看逆境與激素對此基因 RNA 量的影響。實驗發現在 NaCl 逆境裡，此基因 RNA 表現量下降，但在 ABA 中卻呈現上升的趨勢。根長實驗部份，098874c 的種子在 NaCl 與 GA 的環境下，有差異大於 wt 約 10% 的情形。而 859540 的種子在 ABA 環境內，其生長情形比 wt 好，在 GA 處理下則較差，此部份差異也都達 10%。RT-PCR 兩種處理的結果符合根長實驗呈相反趨勢。所以 At3G49220 基因對植物生長確實有影響，但在鹽逆境、ABA、GA 環境下影響不似在熱逆境下顯著。

一、研究動機：

一、題目發想

植物不像動物能來去自如，面對不穩定的環境，勢必需發展出一套比動物更完備的防禦機制，以抵抗逆境的侵襲。好奇植物如何抵抗逆境是研究的初衷。經由老師的介紹，我們選擇以細胞壁和 PME 的觀點來研究。

果膠層是細胞壁裡的重要成分，PME 則是有能力分解果膠的酵素，其功能關係著細胞壁的構形。阿拉伯芥中已知有 66 個與 PME 相關的基因(以其序列做推測)，不同的 PME 除了結構有所不同，作用的部位、途徑與功能也有所異，現在對各種 PME 在植物體內的影響也不甚明瞭。而細胞壁又是所有外在逆境侵襲時碰到的第一道關卡。於是，我們藉由實驗觀察細胞壁堅固與否、PME 存在與否對阿拉伯芥的生長有無影響，期望能找出它們在植物生長、抵抗逆境時所扮演的角色。

二、逆境選擇

由於 ABA、鹽分都與植物缺水有間接的關係，缺水時，細胞間累積到一定量的 ABA，此訊息分子傳送到細胞內能使氣孔關閉，鹽分則會使環境的滲透壓變大，造成缺水逆境，簡言之，鹽份逆境也會進一步使植物體內產生 ABA，因此，我們認為這兩種逆境有上下游的關係，而且這些逆境最後都將導致植物體內的氧化逆境，於是，我們猜想是否可以藉實驗推知在抵抗逆境的機制中，以確定對熱逆境有所影響的基因作為實驗對象，看在抗 ABA 與鹽分的途徑中是否有相似或迥異的作用。

而做 GA 處理，則與 PME 最初被認為作用的場所——細胞壁有相關。GA 能夠使細胞延長，很可能與 PME 之間有交互作用，我們希望能從實驗結果中，推論這些現象之間的關連。

我們在選擇逆境種類時，參考中研院做出的 array(圖一)(圖二)，此圖顯示正常阿拉伯芥受到各種逆境時，各 RNA 的表現量與 ck 的對照，我們假設 RNA 的變化直接對植物生長有所影響，以此前提進行各種相關的驗證，以期找出此序列在阿拉伯芥遭受逆境時扮演的角色與功能。而參考(圖二)以其受逆境後三天、六天後的根長為觀察指標。

*附圖請見「捌、參考資料及其他 三、附錄」

二、研究目的

用 At3G49220 基因功能缺失的阿拉伯芥和鹽分、ABA、GA 逆境來觀察 PME 存在與否、PME 分布、細胞壁結構對阿拉伯芥生長情形的影響，進一步找出 At3G49220 生成的 PME、細胞壁於植物生長、抵抗逆境時所扮演的角色。

三、研究設備及器材

一、儀器

- (一) PH 計
- (二) 抽風台
- (三) 滅菌釜
- (四) 無菌操作台
- (五) 攪拌器
- (六) 相機
- (七) PCR 機器
- (八) 電泳槽
- (九) 離心機
- (十) 微波爐
- (十一) 紫外線照相機
- (十二) 顯微鏡

二、軟體

- (一) Image J
- (二) Excel

三、植物培養基配方

參照「肆、研究過程或方法」

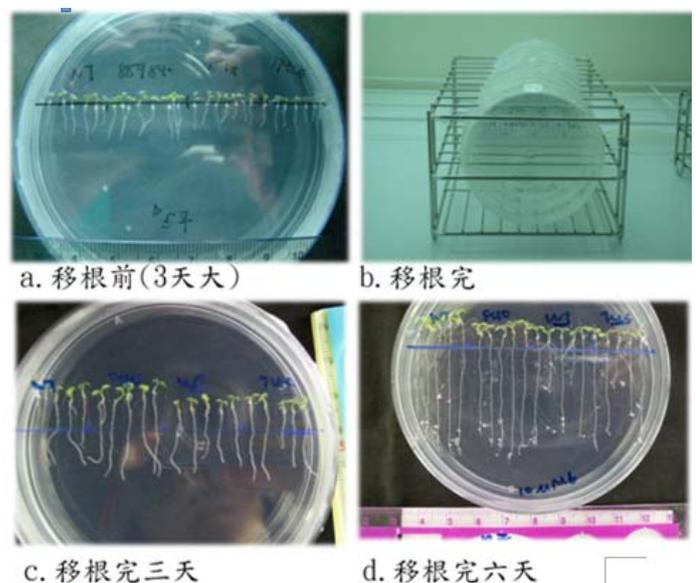
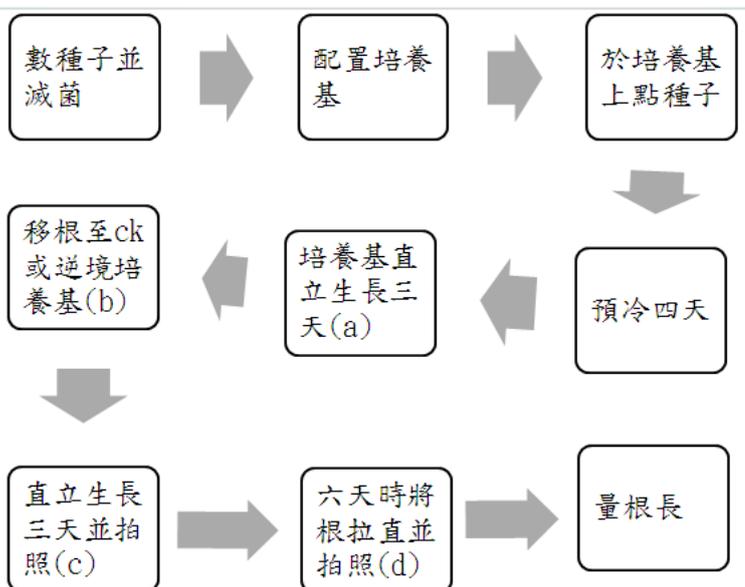
四、PCR Agar、Sample

參照「肆、研究過程或方法」

四、研究過程或方法

一、測量根長

我們使用兩種以一段 tDNA 插入 AT3G49220 的基因中所得突變株，分別命名為 859540、098874c，先在正常培養基上生長，其後，以三天大的幼苗進行移根，同時給予鹽分、ABA、GA 逆境後讓植物繼續生長。三天後拍照並紀錄根長，再放置三天，將根拉直並拍照紀錄，看是否出現差異。同一批種子與逆境濃度重複三次，才能做出有效的數據。



(一)、 數種子

每種種子 100 顆，一次(一種逆境)做 4 種(含 ck)濃度

(二)、 配膠

1. 配方：(每 1L)

(1) 不含逆境的膠

名稱	數量
1/2MS	2.2g
Sucrose(蔗糖)	10g(1%)
PhytoAgar(粉)	8g(0.8%)

(2) 含逆境的膠須另加：

名稱	現有濃度
NaCl	X
ABA	10mM
GA	10mM

2. 步驟：

(1) 加入配方

(2) 定 PH 值(=5.7)

(3) 定量(=800ml)

(4) 滅菌

(5) 打入培養基

(6) 配製逆境培養基時，依所需的濃度，以稀釋的方式加入鹽、ABA、GA

3. 濃度：

(1) NaCl：

濃度	加入 NaCl(g)	總體積
125mM	1.4625	200mL
100mM	1.1700	200mL
75mM	0.8775	200mL
50mM	0.5850	200mL

(2) ABA：

濃度	加入 ABA(μ l)	總體積
15 μ L	300	200mL
10 μ L	200	200mL
5 μ L	100	200mL

(3) GA：

濃度	加入 ABA(μ l)	總體積
15 μ L	300	200mL
10 μ L	200	200mL
20 μ L	400	200mL

(三)、 鋪種子(培養基直立)

1. 所需：不含逆境的培養基、0.1 agar、種子、pipette(20 μ L) 、尺、筆、tip、垃圾桶
2. 步驟：
 - (1) 在 plate 上劃一中間偏上水平線，將線四等分，標上種子名稱。
 - (2) 每管種子加 50 μ L 的 agar，再用 pipette 吸種子(每次 5 μ L)
 - (3) 點在直線上，每區 6~8 顆。
 - (4) 播完後用 3M 膠帶封口，拿至 4 度 C 冰箱預冷三、四天

(四)、 預冷完，移至生長箱 3 天(垂直放置)

(五)、 移根

1. 所需：3 天大植物、含逆境培養基、無菌操作台、鑷子、酒精、尺、筆
2. 步驟：
 - (1) 先將特殊培養基畫一水平線(中央偏高)
 - (2) 用鑷子把幼苗移置 NaCl or ABA plate 上，根尖切齊橫線。
 - (3) plate 用 3M 膠帶封好，放回生長箱垂直生長。

(六)、 觀察移根三天後根長

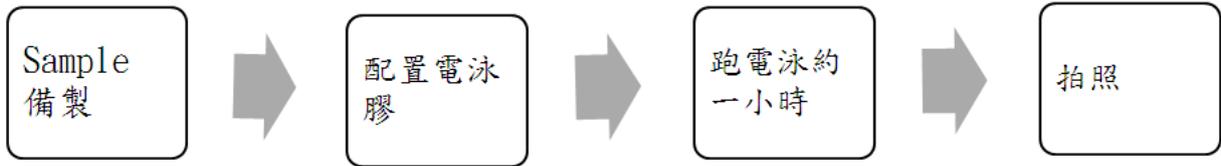
1. 所需：黑布、移根後長三天的 plate、相機、尺、電腦軟體 image J
2. 步驟：在黑布上照植株，一側放比例尺，以電腦軟體測量橫線以下根長。

(七)、 觀察移根六天後根長

1. 所需：黑布、移根後長三天的 plate、鑷子、相機、尺、電腦軟體 image J
2. 步驟：
 - (1) 用鑷子將根拉直，至少使其不交錯
 - (2) 放置比例尺、拍照並測量

二、PCR

為了解 At3g49220 基因在不同濃度的逆境下相對 ck 之表現量，將 wt 以逆境處理 6 小時，抽取 RNA 經 RT 轉為 DNA，再以 PCR 放大，以便觀察。



(一)、 所需：pipette(200、20、2 μ L)、一般離心管、PCR 離心管、PCR 機器、完成 RT 的 DNA

(二)、 Sample 備製：

1. 配方：(單位 μ L)

內容物	1 管
完成 RT 之 DNA	1
Taq polymerase	0.5
Forward primer	0.5
Reverse primer	0.5
dNTP	1
Buffer*10	2.5
ddH ₂ O(蒸餾水)	19
總體積	25

2. 步驟：

- (1) 依水、buffer、dNTP、primer、Taq 之順序加入。
- (2) 分裝入 PCR 管後，加入跑 DNA，每管總容量 25 μ L。
- (3) 跑 PCR。

三、跑電泳膠

(一)、 配方：

	每 0.1L
TAE buffer	0.1L
Agarose	0.8g
ETBR	4 μ L

(二)、 步驟：

- 1.以微波爐加熱混合好的配方。倒入電泳槽靜置至凝固。
- 2.將 ETBR 加入 PCR 管中，混合均勻。
- 3.將 PCR 管中的液體打進電泳槽裡。
- 4.跑電泳 30 分鐘

五、研究結果

一、根長實驗

以下數據含 NaCl 兩組、ABA、GA 各一組，每一種濃度的處理皆為(7 盤*4 品種*5 顆)，共一百四十顆(惟 NaCl(I)之濃度 125 μ M 處理的組別，少一盤，共 120 顆)，除去極端值後求其根長平均值，得此表。並且，為了解種子被逆境影響的程度我們計算了延長量的比值，依以下算式計算：

$$\text{(受逆境種子平均延長量/ck 平均延長量)*100\%}$$

為了避免不同人操作造成的誤差，我們算平均時，將兩人所做的數據依照盤數做加權。此外，有底線的(098874c,Wt)和沒有底線的(859540, Wt)為不同的兩批種子，將分開做比較。而比值的表格中，藍色、紅色的數字代表此對mutant與wt中的相差 5%以上的較大值，而粗體字則代表值相差 10%以上。(單位：cm)

此外每批實驗結果表格後皆附上延長量比值的柱狀圖，有「*」者表示經 T 檢定統計後其 P value 小於 0.05 者，「**」則代表 P value 小於 0.01。

(一)NaCl(I)

1. 移根後三天(單位：cm)

	ck	75mM	100 mM	125 mM
Wt	2.7135	1.8579	1.2463	0.5549
859540	2.6175	1.9501	1.2700	0.6216
Wt	2.3579	1.7369	1.4440	0.5603
098874c	2.0429	1.5260	1.1510	0.5954

延長量比值：

	75mM/ck	100 mM/ck	125 mM/ck
Wt	0.6847	0.4593	0.2045
859540	0.7450	0.4852	0.2375
Wt	0.7366	0.6124	0.2376
098874c	0.7470	0.5634	0.2914

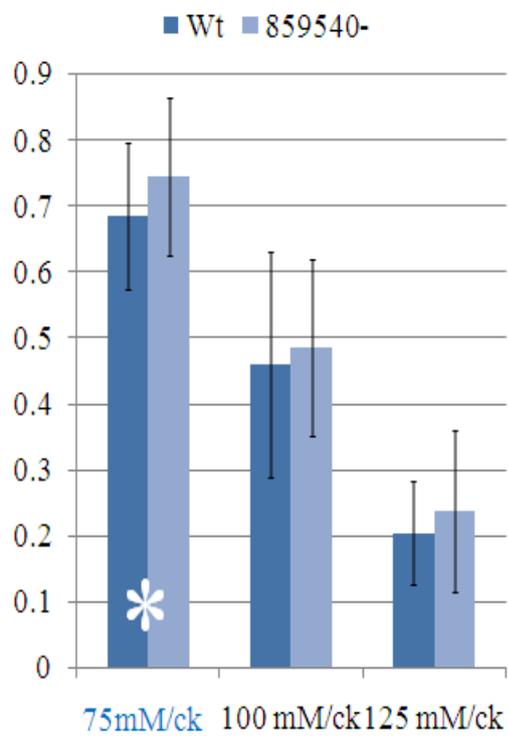
2. 移根後六天(單位：cm)

	ck	75mM	100 mM	125 mM
Wt	5.4110	3.5884	2.3373	1.0125
859540	5.3188	3.5614	2.3224	1.1231
Wt	5.0486	3.3480	2.2458	0.9295
098874c	4.2843	3.2659	2.1706	1.0326

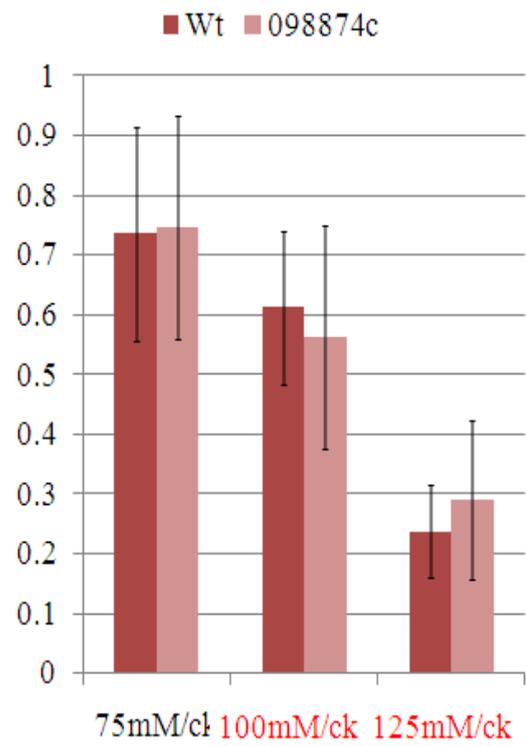
延長量比值：

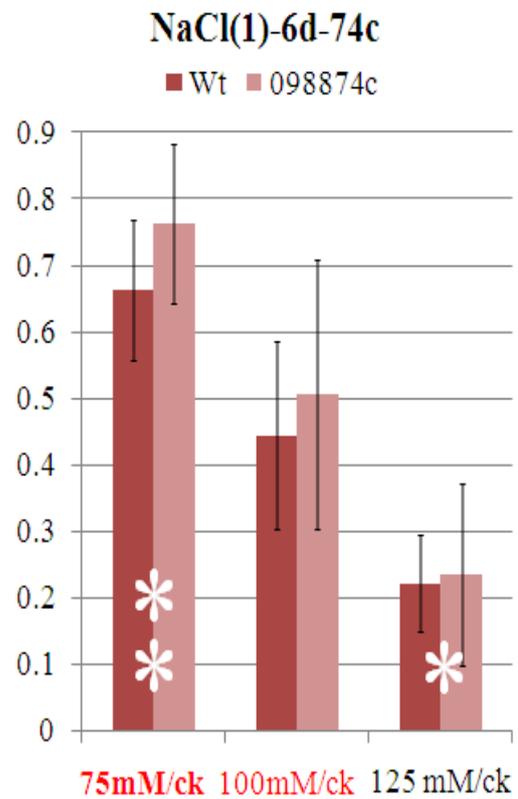
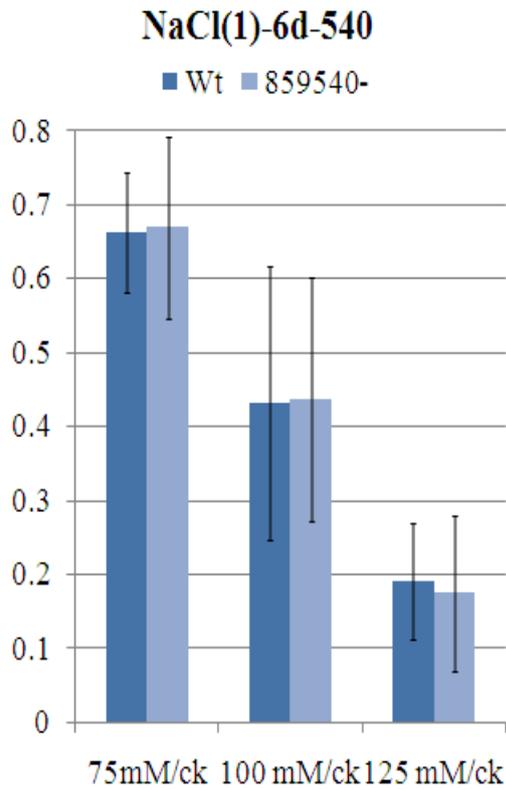
	75mM/ck	100 mM/ck	125 mM/ck
Wt	0.6632	0.4320	0.1908
859540	0.6696	0.4366	0.1748
Wt	0.6631	0.4448	0.2225
098874c	0.7623	0.5066	0.2363

NaCl(1)-3d-540



NaCl(1)-3d-74c





(二) NaCl(II)

1. 移根後三天(單位：cm)

	ck	50 mM	75 mM	100 mM
Wt	1.6679	1.5164	1.6006	1.3138
859540	1.7989	1.6213	1.6368	1.4722
Wt	1.4642	1.3577	1.3883	1.1810
098874c	1.3045	1.4054	1.5079	1.2249

延長量比值：

	50 mM/ck	75 mM/ck	100mM/ck
Wt	0.9092	0.9596	0.7877
859540	0.9013	0.9099	0.8184
Wt	0.9273	0.9482	0.8066
098874c	1.0773	1.1559	0.9390

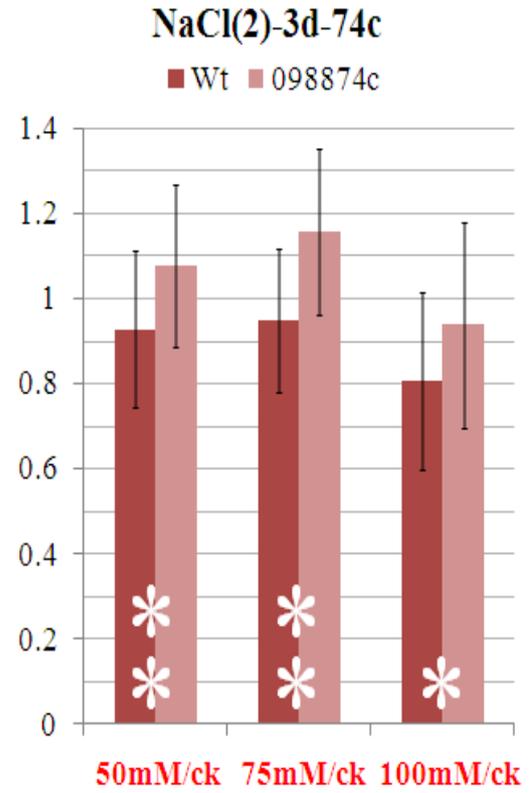
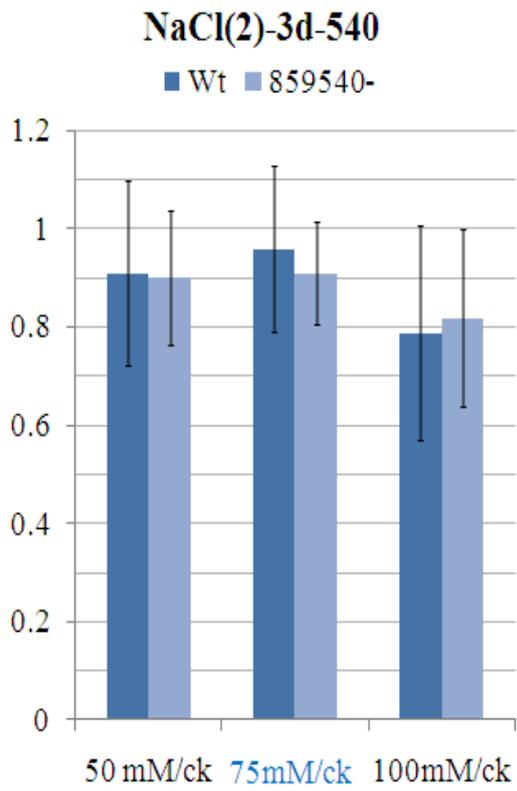
2. 移根後六天(單位：cm)

	ck	50 mM	75 mM	100 mM
wt	3.0508	2.8581	2.7208	2.1397

859540	3.3212	3.0401	2.8004	2.1155
<u>wt</u>	2.8843	2.5689	2.4466	1.9430
<u>098874c</u>	2.7224	2.7424	2.7022	2.1036

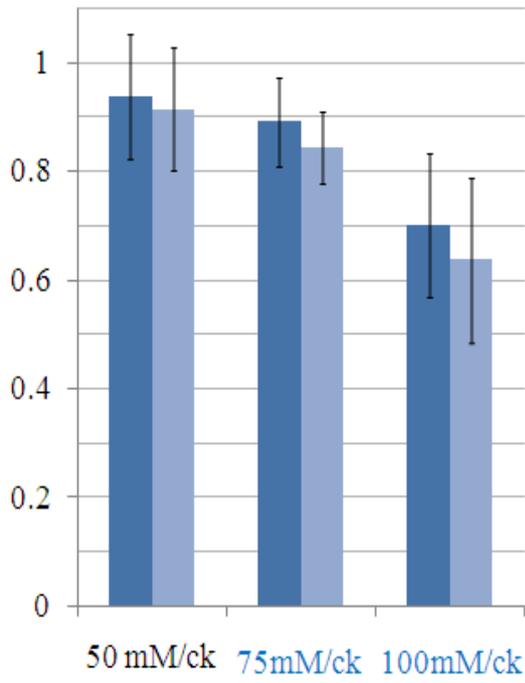
延長量比值：

	50 mM/ck	75 mM/ck	100mM/ck
wt	0.9368	0.8918	0.7014
859540	0.9154	0.8432	0.6370
<u>wt</u>	0.8906	0.8482	0.6736
<u>098874c</u>	1.0074	0.9926	0.7727



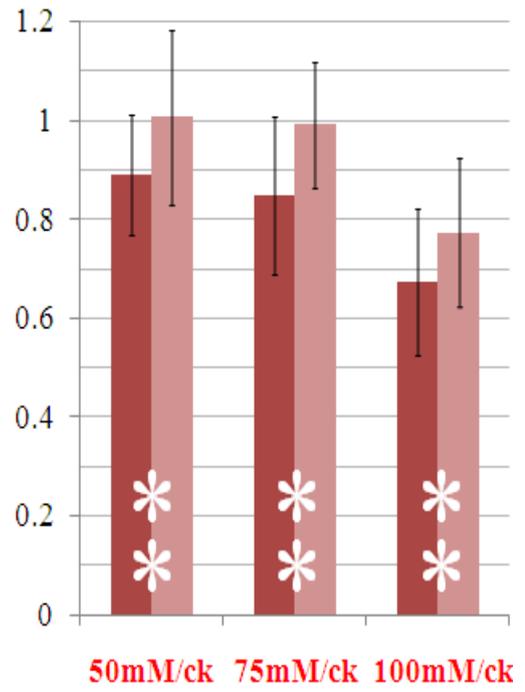
NaCl(2)-6d-540

■ wt ■ 859540-



NaCl(2)-6d-74c

■ wt ■ 098874c



(三) ABA(I)

1.移根後三天(單位：cm)

	ck	5 μ M	10 μ M	15 μ M
wt	1.9068	1.7722	1.4846	1.3002
859540	1.8202	2.1372	1.5969	1.4495
<u>wt</u>	1.7784	1.8324	1.4202	1.3435
<u>098874c</u>	1.8161	1.6690	1.4211	1.3433

延長量比值：

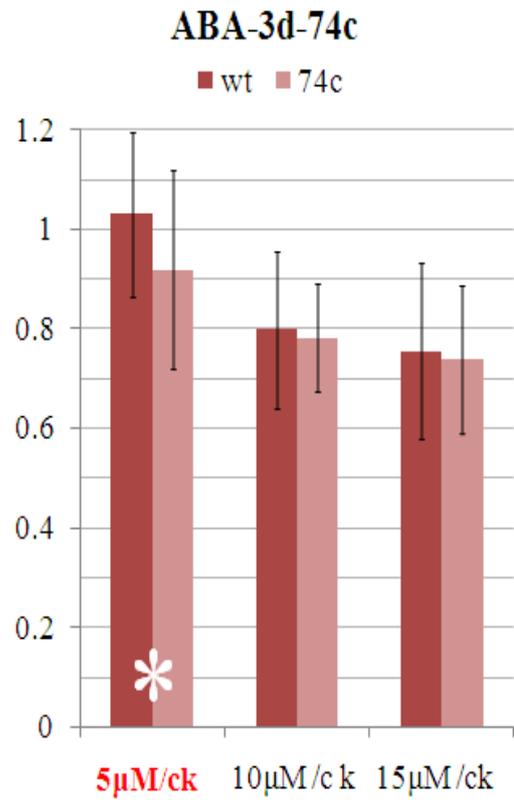
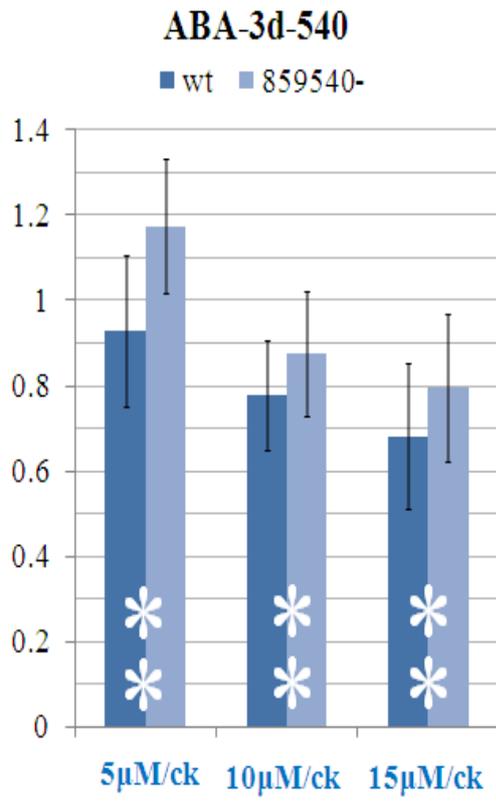
	5 μ M /ck	10 μ M /c k	15 μ M /ck
wt	0.9294	0.7786	0.6819
859540	1.1742	0.8773	0.7963
<u>Wt</u>	1.0304	0.7986	0.7554
<u>098874c</u>	0.9190	0.7825	0.7397

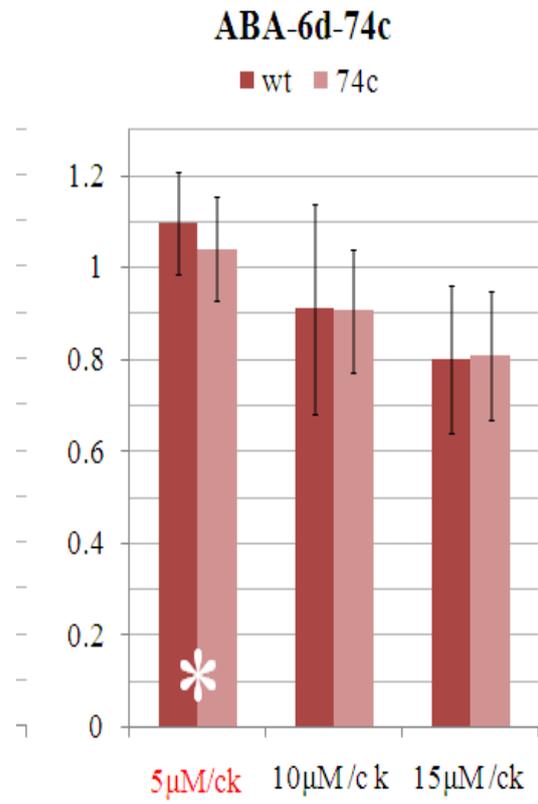
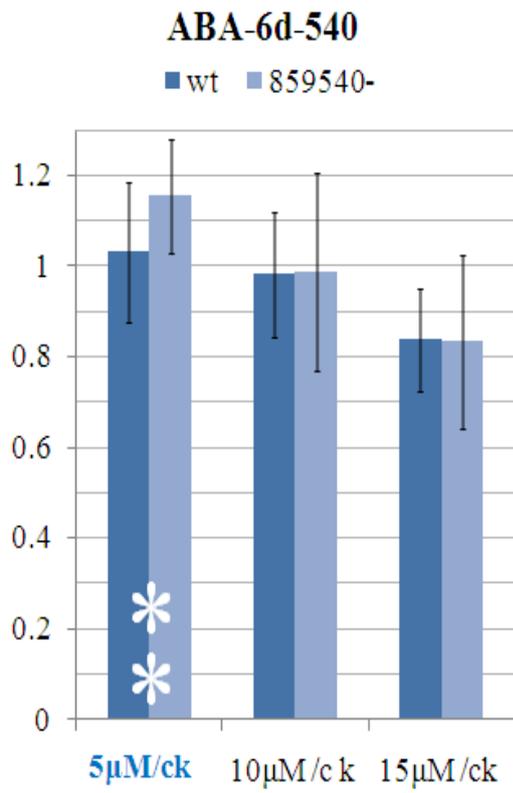
2.移根後六天(單位：cm)

	ck	5 μ M	10 μ M	15 μ M
Wt	3.6741	3.7889	3.6088	3.0748
859540	3.6553	4.2185	3.6084	3.0482
<u>Wt</u>	3.6614	4.0163	3.3344	2.9321
<u>098874c</u>	3.6461	3.7930	3.3087	2.9522

延長量比值：

	5 μ M /ck	10 μ M /c k	15 μ M /ck
Wt	1.0312	0.9822	0.8369
859540	1.1541	0.9872	0.8339
<u>Wt</u>	1.0969	0.9107	0.8008
<u>098874c</u>	1.0403	0.9075	0.8097





(四) GA(I)

1. 移根後三天(單位：cm)

	ck	10 μ M	15 μ M	20 μ M
Wt	1.6613	1.9839	1.8123	1.9439
859540	1.8569	1.9582	2.1124	2.0601
Wt	1.6109	1.9333	1.8207	1.9156
098874c	1.5571	2.0627	1.7482	1.9526

延長量比值：

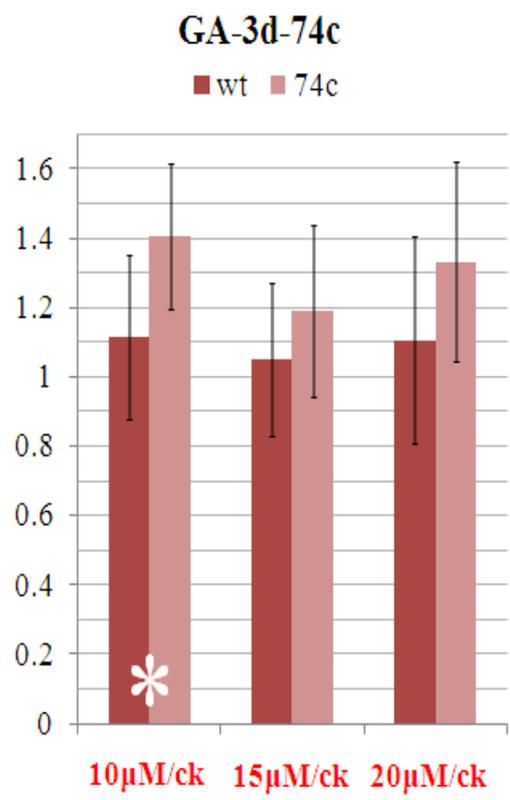
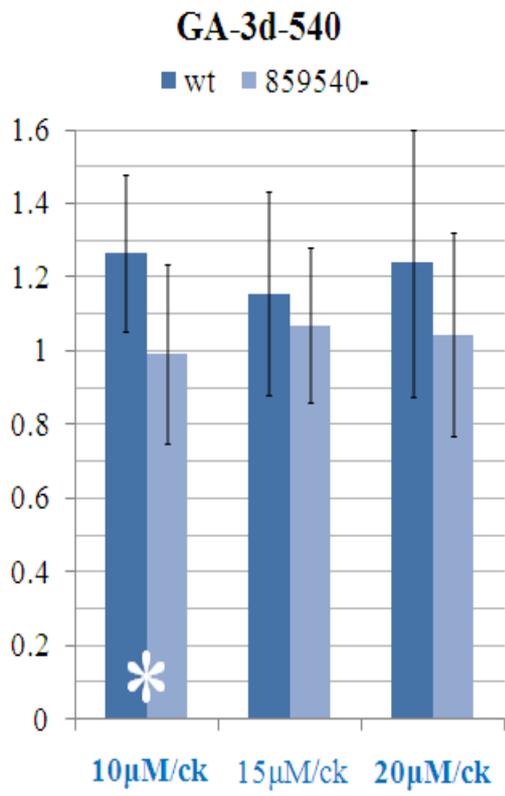
	10 μ M /ck	15 μ M /ck	20 μ M /ck
wt	1.2649	1.1554	1.2394
859540	0.9923	1.0705	1.0439
wt	1.1161	1.0510	1.1058
098874c	1.4062	1.1918	1.3311

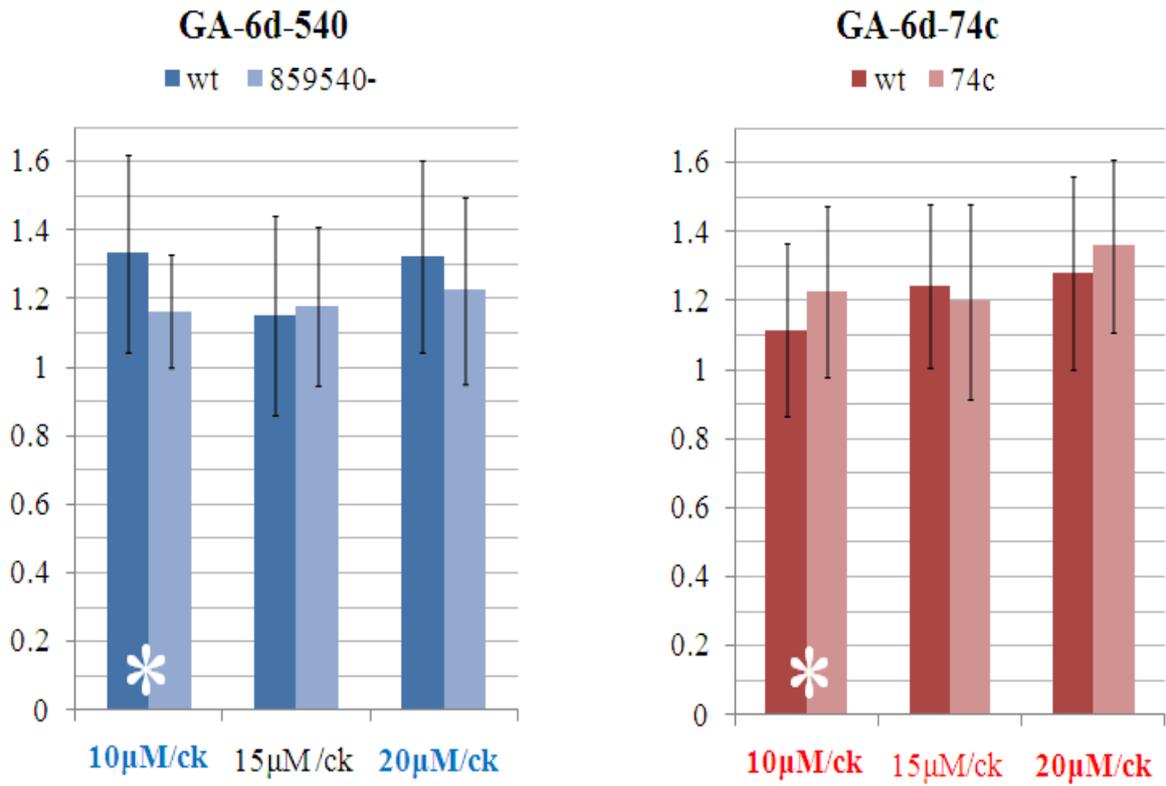
2. 移根後六天(單位：cm)

	ck	10 μ M	15 μ M	20 μ M
wt	3.8607	4.6358	4.4452	5.1133
859540	4.1393	4.3690	4.8775	5.0667
wt	3.9158	4.8174	4.8573	5.0176
098874c	3.7790	5.1483	4.5234	5.1337

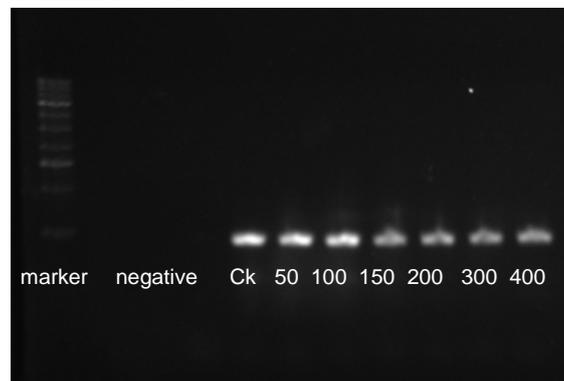
延長量比值：

	10 μ M /ck	15 μ M /ck	20 μ M /ck
wt	1.3335	1.1514	1.3245
859540	1.1638	1.1784	1.2241
wt	1.1157	1.2404	1.2814
098874c	1.2267	1.1970	1.3585

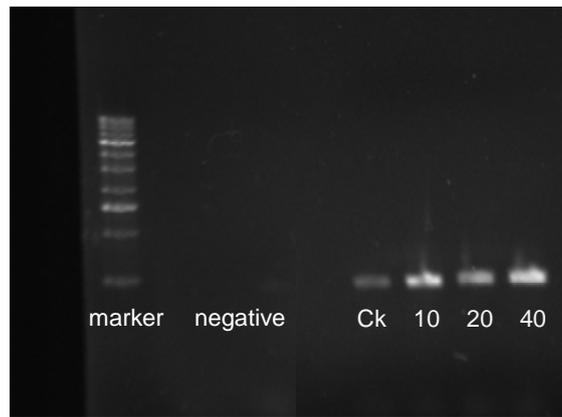




二、RT-PCR
(一) NaCl



1. 濃度：negative、ck、50mM、100mM、150 mM、200 mM、300 mM、400 mM
 2. 結果：與 ck 相較，濃度越高 RNA 的表現量越低。
- (二) ABA



1. 濃度：negative、ck、 $10\ \mu\text{M}$ 、 $20\ \mu\text{M}$ 、 $40\ \mu\text{M}$
2. 結果：與 ck 相較，濃度越高 RNA 的表現量越高。

六、討論

- 一、根長實驗中，NaCl (I)兩批種子差異不大，NaCl(II)經濃度下修後 098874c 較其 wt 為優勢種，我們推測此種突變種對鹽份逆境的抗性較強。
- 二、在一些組別中，三天的差異大於六天的差異，推測其原因有二：第一，由於我們種植方式為在培養基加入固定量激素，因此植物並沒有持續受到高濃度的 ABA 影響，可能在後期時，剩餘的激素已不足以對植物的生長產生強烈的抑制，因此影響趨緩。第二，ABA 的加入可視為一種逆境，在放入六天之間，植物可能已建立起對抗此逆境的方式，因此受到的影響便不若之前來的重大。
- 三、原已知道 ABA 和 GA 為互相拮抗之激素，在根長實驗中，亦可見此情形，ABA 中 859540 的 mutant 生長較 wt 佳，GA 中則相反。098874c 的 mutant 則在 GA 中生長較 wt 佳，在 ABA 中相反。亦符合我們之前得知此二激素互相相反的情形。
- 四、以 GA 組為例，兩 mutant 與各自的 wt 生長有相反的趨勢，生長情形 098874c 較 wt 好，但 859540 較 wt 差，與預期結果不符。因兩 mutant 是 tDNA 插入同一基因的不同處。應該得到兩相同結論才足以互相驗證，確認此基因之功能。但實驗中，兩 mutant 卻呈現無關或相反的情形。我們認為或許是與 tDNA 插入的位置有關，若無真正破壞 PME 行使功能的片段，或插至會被除去的位置就可能無破壞此序列之效，造成結果相反。
- 五、RT-PCR 結果顯示外界 NaCl 的濃度與 At3g49220 基因 RNA 量呈反向關係；ABA 激素濃度則與 RNA 量呈正向關係。雖然 RNA 的量與蛋白質的量不一定相關，但我們推測逆境仍有影響此基因，連帶改變其產物在植物體內作用的程度。
- 六、綜合兩種實驗結果，我們在根長或 PCR 實驗中，都見到 NaCl 逆境與 ABA 激素使植物呈現相反反應的情況。NaCl 中 098874c 有優勢，在 ABA 較差，859540 卻與 098874c 相反。雖然目前無法解釋，但比對 RT-PCR 的結果，仍與根長實驗有相符的趨勢。
- 七、由實驗室篩出對熱敏感的突變株，以其他逆境處理，發現生長上沒有一致並明顯的差異，推測可能此 PME 基因對熱逆境有專一性。

七、結論

098874c 在 NaCl、GA 中相對其 wt 生長良好，859540 在 ABA 處理下優於其 wt、在 GA 處理下則相反。普遍而言，三天的結果較六天明顯。RT-PCR 部分，NaCl 處理下 At3G49220 的 RNA 表現量下降，ABA 處理下則為上升。兩種處理的結果符合根長實驗呈相反結果。不過根長實驗的結果差異仍不夠明顯及穩定，所以 At3G49220 基因對植物生長確實有影響，但在鹽逆境、ABA、GA 環境下影響不似在熱逆境下顯著。

八、參考資料及其他

一、參考文獻

- (一) Je´roˆme Pelloux, Christine Ruste´rucci and Ewa J. Mellerowicz.(2007). *New insights into pectin methyl esterase structure and function*. TRENDS in Plant Science Vol.12 No.6
- (二) Wu, Hui-Chen, Hsu, Shih-Feng, Huang, Wen-Dar, Lur, Hui-Sheng and Jinn, Tsung-Luo.(2008) *Heat Shock-Released and -Reabsorbed Apoplastic Ca²⁺ Is Required for Thermotolerance in Soybean (Glycine max) Seedlings*. Institute of Plant Biology and Department of Life Science, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan ROC
- (三) Min Jung Kim, Ryoung Shin, and Daniel P. Schachtman.(2009) *A Nuclear Factor Regulates Abscisic Acid Responses*. Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, Missouri 63132
- (四) <http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp?experiment=abiostress&normalization=absolute&probesetcsv=at3g49220&action=Run#top>(鹽)
- (五) [http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp?experiment=hormones&normalization=absolute&probesetcsv=at3g49220&action=Run\(ABA\)](http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp?experiment=hormones&normalization=absolute&probesetcsv=at3g49220&action=Run(ABA))
- (六) [http://en.wikipedia.org/wiki/Abcisic_acid\(ABA\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Abcisic_acid(ABA))
- (七) <http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=2430#more-2430>(鹽逆境)
- (八) <http://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=2360#more-2360>(熱逆境)
- (九) <http://www.baphiq.gov.tw/public/Attachment/84161420371.pdf> (HSP)
- (十) http://en.wikipedia.org/wiki/Heat_shock_protein (HSP)
- (十一) <http://top100.ntu.edu.tw/intro/2-1-3-5.pdf>(植物逆境)
- (十二) <http://www.ceps.com.tw/ec/ecjnlarticleView.aspx?atliid=919243&issueid=54301&jnliid=3232>(鹽逆境)

二、未來展望

(一)根長實驗

觀察氧化逆境對 wt 和 mutant 生長上的影響，並嘗試作出移根後阿拉伯芥每天的生長量曲線。

(二)RT-PCR

自製以逆境、激素處理的 wt，完成 NaCl、ABA、GA、BH 的 RT-PCR。

(三)PME 活性測試

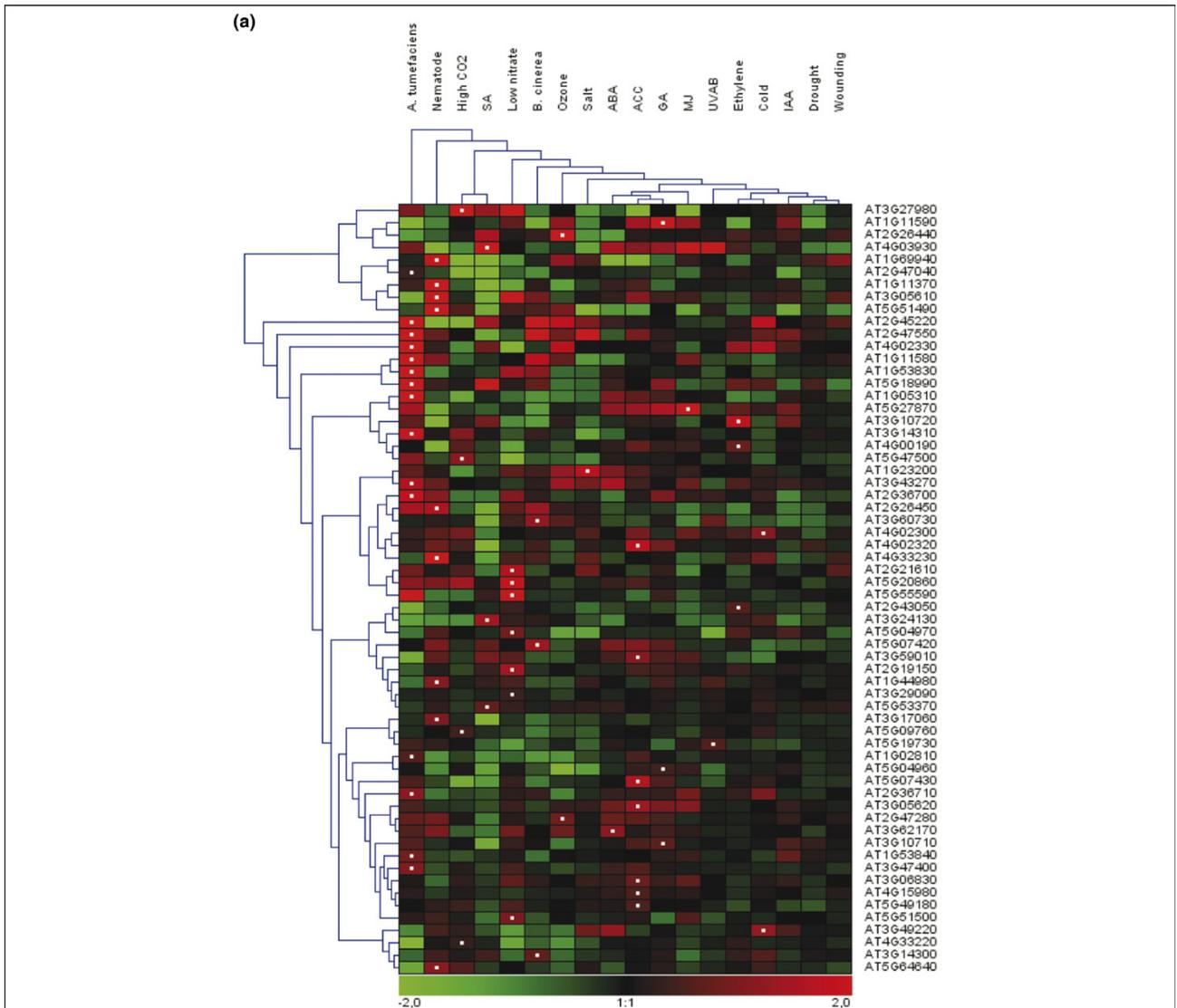
觀察此基因產物的活性。

(四)基因槍：

將 At3g49220 接上螢光蛋白基因後，以基因槍打入洋蔥表皮細胞表現，觀察其蛋白質產物在植物細胞的分部。

期望能以多角的觀測方式找出此基因對於植物生長、抵抗逆境的種種關聯。

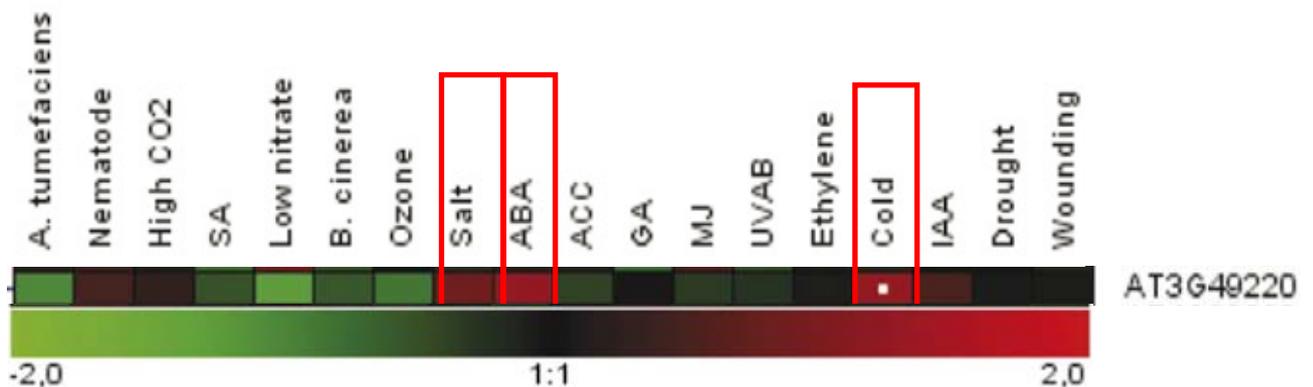
三、附錄
(圖一)

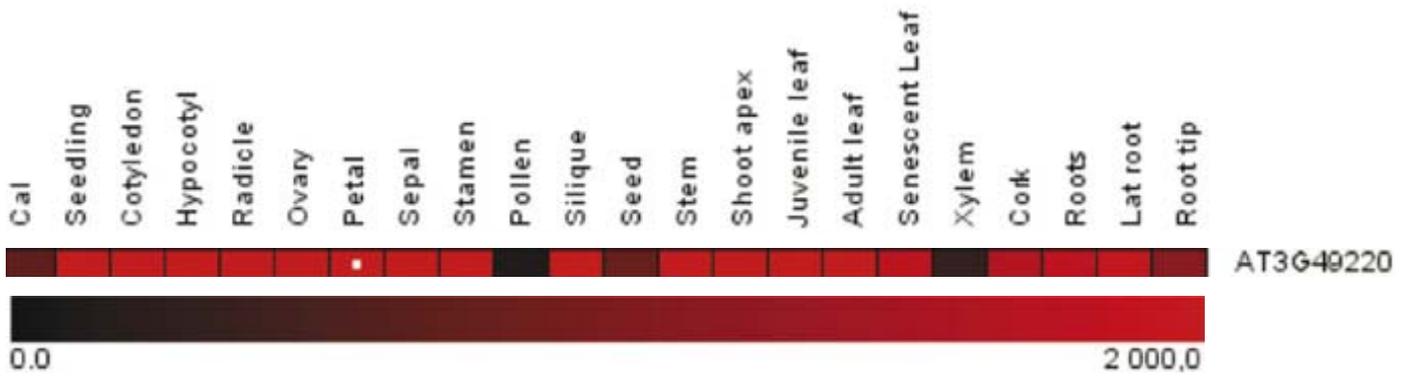


引自：Ewa J. Mellerowicz.(2007).,TRENDS in Plant Science Vol.12 No.6

上圖之縱軸為阿拉伯芥中，被推測與 PME 相關之 66 個基因，橫軸為各種逆境處理。圖表中，紅色表此基因轉譯的 RNA 在逆境下有相對 ck 增加的情形，綠色則代表 RNA 減少。白點所在方格，表此逆境使該基因之 RNA 增加最多。下圖為 AT3G49220 之結果放大圖。

(圖二)

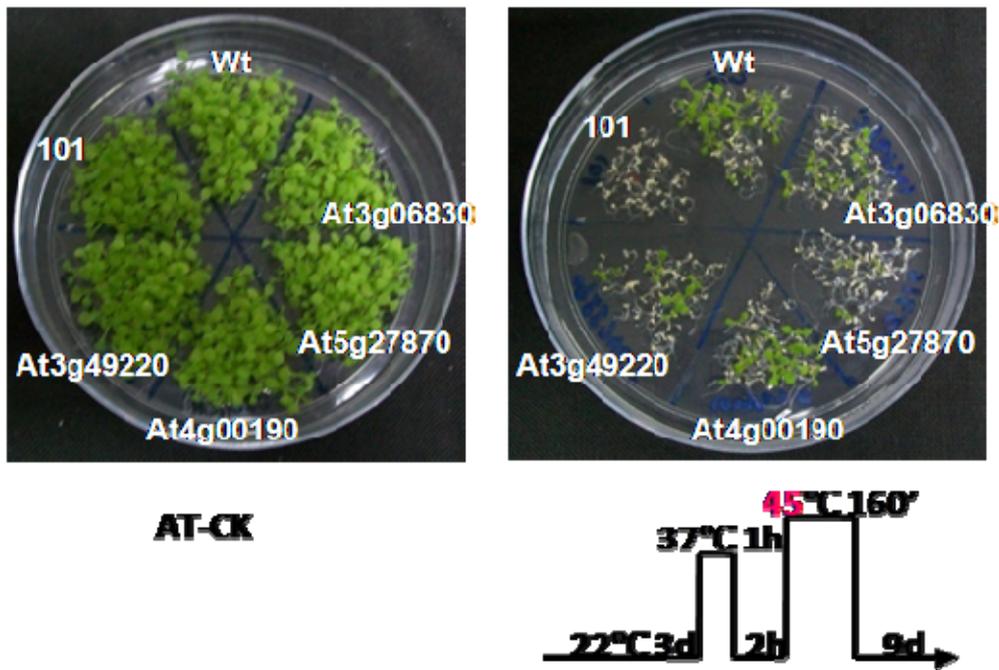




引自：Ewa J. Mellerowicz.(2007).,TRENDS in Plant Science Vol.12 No.6

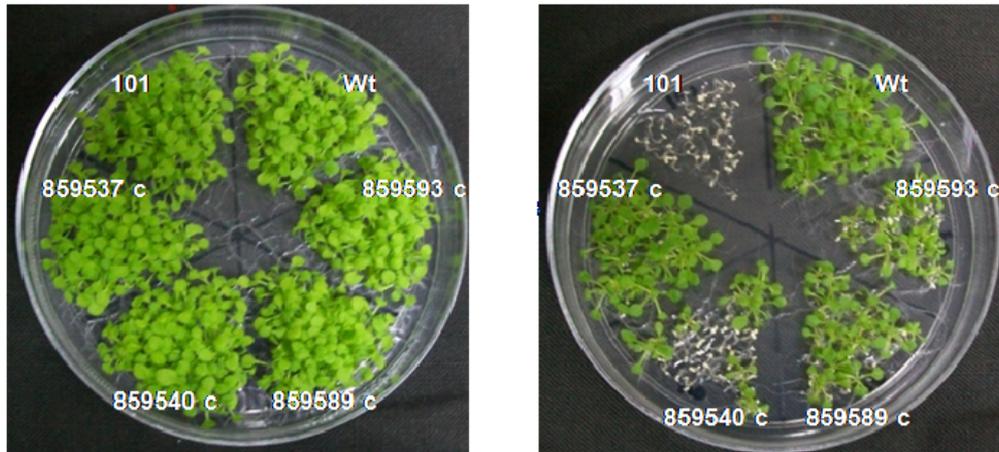
此圖節錄自中研院同篇論文之 array data，以阿拉伯芥 66 個有關 PME 的基因為縱軸，植物各部位為橫軸，測其未經任何處理下，各基因 RNA 的表現量。此基因之 RNA 在植物體各部位皆大量表現，也由於根在幼苗時期生長較地上部明顯，更是為眾所接受的觀察方式，因此我們選擇以根長為量測指標。

(圖三)



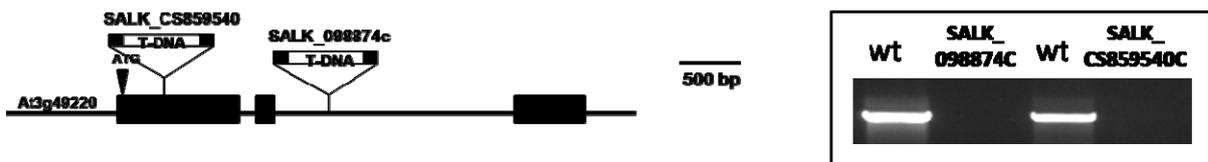
上圖為實驗室中被篩出與熱相關的基因，左上圖為處理前，右上圖為熱處理後 9 天大的照片，此處之 At3g49220 即為 098874c，在經過右下角的處理後，存活率明顯與 wt 有異。故可推測此基因於阿拉伯芥熱逆境的保護途徑中，扮演重要角色。

(圖四)



為確認 At3g49220 基因之熱保護的作用，再次檢驗同一條基因於不同位置插入 tDNA 的突變種 859540，經與上圖相同的熱處理 12 天後，存活率亦大減，如此便可確認此基因確實與熱逆境的保護有關連。

(圖五)



左圖為 At3g49220 基因示意圖。859540 與 098874c 的 tDNA 分別插在此基因的不同位置，皆使其 mRNA 無法被正常轉錄。右圖為 RTPCR 後的結果。

【評語】 040718

1. RTPCR 之 data 可改用 Q-RT-PCR 來定量。
2. 所有分析除了有 error bar 之外，必須用 t-test 分析其是否有意義。
3. At3G49220 基因功能之缺乏之扮演抗逆境之機制可繼續再探討。