

# 中華民國第 55 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

---

高中組 生物（生命科學）科

040702

讓汞污染之土地起死回生的水稻

學校名稱：高雄市立高雄高級中學

作者： 高二 劉丞軒	指導老師： 吳立森
---------------	--------------

關鍵詞：水稻、汞、過氧化酶

## 摘要

本研究以臺中 1 號 (TN1) 和臺農 67 號 (TNG67) 兩種品系之水稻為材料，比較兩品系水稻於 25  $\mu\text{M}$  汞逆境處理 24 小時下之生理及生化反應。兩種品系水稻在汞逆境下，TN1 及 TNG67 水稻根組織內分別累積 610  $\mu\text{g/ml}$  及 742  $\mu\text{g/ml}$  的汞，根生長速率分別為 11% 及 28%。實驗結果發現抗氧化酶中的過氧化酶(POD)及超氧化歧異酶(SOD)其活性在 TN1 及 TNG67 根部皆因汞逆境而上升。而且 ROS 代謝相關基因 POD、SOD、LOX 都因汞處理在兩品系水稻中的表現有顯著的差異。以雷射共軛焦顯微鏡觀察水稻在汞逆境下根部組織 ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 分佈情形，發現其皆因汞逆境處理而增加，但是分佈之部位在兩種品系水稻卻有顯著的差異。在本研究中，從水稻在汞逆境下的影響與認識，可提供植物在進行汞污染之土壤復育及整治技術的一個粗略模式。

## 壹、研究動機

自工業革命以來，工業快速發展，雖然為人類帶來了進步及便利，卻也破壞了環境，造成水污染、空氣汙染、垃圾汙染、水土流失、噪音問題.....。這些問題與人類是息息相關，因為人類取之於自然、用之於自然，污染了環境造成生態失衡，對人類有害的物質也在我們的周圍四處流竄。日常生活中我們所使用的鏡子、電燈、電池、以及「人手一機」手機都含有重金屬汞，垃圾焚化爐、燃煤發電廠也會排放汞至大氣中。在學習基礎生物的生物與環境以及選修生物中的生物多樣性與保育中，我們了解到環境保育與永續發展的重要，但是近年來，工廠不當排放廢水事件層出不窮，高雄為臺灣的工業重鎮，加工區、重工業區林立，但是其周圍的水源、土壤常常被檢測出超標重金屬。這些含有重金屬的廢水可能汙染農地，造成農作物受到鎘、銀、鉛、銻、砷、以及汞等的侵害。人類若誤食用汞污染的稻米，會對肝、腎造成負擔，神經系統造成損害，1965 年暴發於日本的「水俣病」，就是一起汞中毒事件，造成了數千人死亡。汞在環境中移動性強，在自然界以各種不同的形式和移轉遍及於空氣、水、土壤和生物體中。

汞會造成植物細胞氧化逆境，導致直接產生活性氧族物質(ROS)，如  $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  及  $\text{OH}^-$  的累積，(Yang et al, 2007; Chang et al, 2012)，汞亦會使植物根部型態發生改變，常見的根部

褐化是典型汞對植物的危害徵狀(Sanita di Toppi and Grabbreilli, 1999;Benvides et al, 2005)。汞會抑制水稻生長與水分利用效率(Sanita di Toppi and Grabbreilli,1999)，並活化過氧化酶(POD)、超氧化歧異酶(SOD)與其他抗氧化酶，以去除組織細胞內過量累積的  $H_2O_2$  及其他活性氧族物質( Reactive Oxygen Species, ROS) (Jonak et al, 2004;Pitzschke and Hirt, 2006;Yeh et al, 2007;DalCorse et al, 2010)。

本研究中採用的水稻品系分別為秈稻臺中 1 號(TN1)及梗稻臺農 67 號(TNG67)。水稻(學名：*Oryza sativa*)是草本稻屬的一種，也是稻屬中作為糧食最主要最悠久的一種，又稱為亞洲型栽培稻。本研究中我們探討汞對兩種品系水稻之耐受性，並檢測相關抗氧化酶基因及蛋白質表現及比較活性氧族物質(ROS)生成之情形，我們期待能找出一種較耐汞逆境的水稻品系，為汞污染之土地復育及整治、或生態保育盡一份心力。

## 貳、研究目的

水稻是高等植物第二種基因體全數被解碼的植物，約有 3 萬 5 千個基因，許多生化、分生的基礎研究十分完整。本研究以水稻作材料，除了它是全世界最重要的糧食作物之外，另一個原因就是它的基礎研究資料豐富。本研究的過程中，許多期望的參考資料方便獲得，對我們的研究助益甚大！本研究觀察水稻在汞逆境處理下的根部汞累積、活性氧物質(ROS)生成及其生長的情形，並且進行木質素、脯氨酸及相對含水量的測定，最後探討根部組織抗氧化之生化及基因表現的情形。

植物處在不良的環境中會對植物體本身造成傷害。目前研究已發現植物在逆境環境下，如缺水、鹽害、冷害與重金屬均有脯氨酸(proline)大量累積的現象，植物累積的大量脯氨酸能保護酵素、穩定膜系、清除自由基、降低脂質過氧化作用、調節滲透潛勢等。研究指出水稻在鹽及乾旱的環境中脯氨酸的含量皆顯著增加，但以過量的銅處理，則會降低水稻的脯氨酸含量。

## 參、研究設備及器材

### 一、研究材料

水稻 (*Oryza sativa*)，可分為秈稻 (*Oryza sativa Indica*) 和梗稻 (*Oryza sativa Japonica*) 本實驗使用的水稻為秈稻臺中 1 號 (TN1) 和梗稻臺農 67 號 (TNG67)。

### 二、研究設備

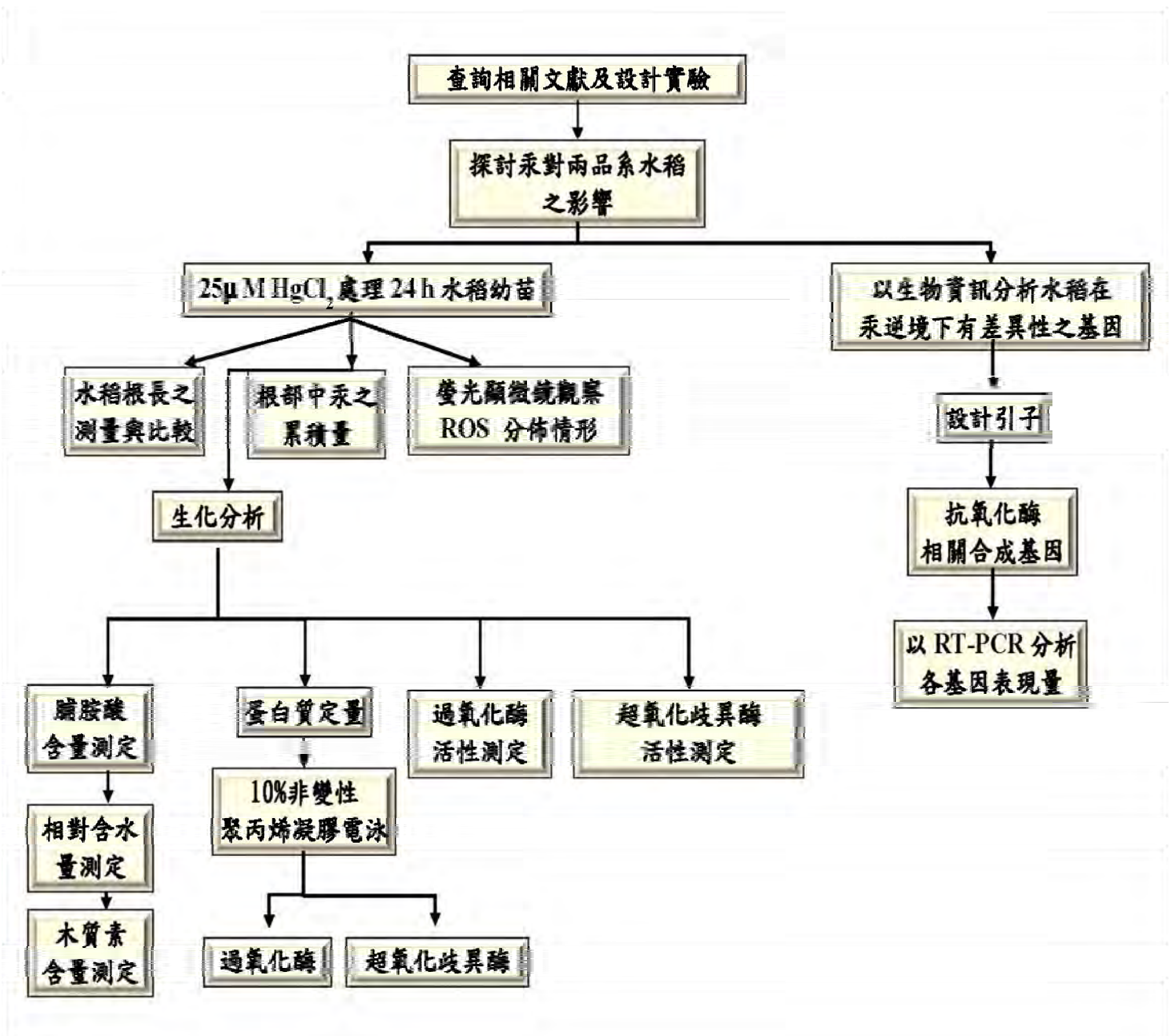
植物生長箱、電子天平、離心機、離心管、分光光度計、比色管、震動混合機、電泳槽、電壓器、電源供應器、熱水浴槽、研鉢、微量分注器、共軛焦顯微鏡。

### 三、藥品

蛋白質定量 A 試劑 (Alkaline copper tartrate solution)、B 試劑 (Folin Reagent)。	汞 (HgCl <sub>2</sub> )
磷酸緩衝液 (Potassium phosphate buffer)	10X 電泳緩衝液(TG buffer)
丙烯醯胺溶液 (30% Acrylamide/bis)	分離膠體緩衝液(1.5M Tris-HCl pH8.8)
焦集膠體緩衝液(0.5M Tris-HCl pH6.8)	過硫酸銨 (Ammonium persulfate, APS)
10X Protien tracer dye	四甲基乙二胺 (N,N',N'-etramethylethylenedimine)
三氯醋酸 (Trichloroacetic acid, TCA)	硫代巴比妥酸 (Thiobarbituric acid, TBA)
磺柳酸 (Sulfosalicylic acid)	印三酮 (Ninhydrin)
核黃素 (Riboflavin)	二氨基聯苯胺 (3,3'-Diaminobenzidine, DAB)
過氧化氫 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	鹽酸 (HCl)
醋酸 (Acetic acid)	愈創木酚 (Guaiacol)
甲苯 (Toluene)	硝基藍四氮唑 (Nitrobluetetrazolium, NBT)
液態氮	蒸餾水

# 肆、研究過程

## 一、研究流程圖



## 二、實驗方法

### (一) 水稻幼苗培育

#### 1. 水稻水根培育

各取 15 克水稻種子至離心管中，加入 30 ml 4% 次氯酸鈉溶液，震盪清洗 15 分鐘，再以 30 ml 清水洗滌 3 次。後將其置於植物生長箱中，以 37°C 之黑暗環境下培育四天，待其發芽。選取其生長相近的植株，移 15 株至(內含濾紙及 10 ml 蒸餾水)之 9 cm 培養皿中均勻分布，於 27°C 之黑暗環境繼續生長兩天。

#### 2. 水稻植株組織培育法

水稻種子，以消毒液（含 1.2% NaClO 及 Tween 20）消毒 10 分鐘，再以無菌水清洗 5 次。將消毒完成的種子以 37°C 之黑暗環境下培育四天，待其發芽。選取其生長相近的植株，移入在 0.25 MS 培養基上，以光照 12 小時、24°C 恆溫生長箱依實驗需求培養特定天數後進行汞逆境處理。

### (二) 汞逆境的處理

取上述 6 天大之水稻幼苗，將植株分別以蒸餾水（對照組）、25  $\mu\text{M}$  汞( $\text{HgCl}_2$ )（實驗組）於 27°C 之黑暗環境培育 24 小時，所有根部組織都被確認覆蓋於液面下。

### (三) 水稻根部長度測量

取不同處理的水稻各 7 株，測量其根長度，再計算其平均值及標準偏差，並且以第七日根部長度減去第六日根部長度，再除以第六日根部長度，計算出生長速率。

### (四) 以 ICP-AES 檢測水稻根部汞累積於之含量

取水稻根部 1 克，於微波消化管內，加入 5mL 濃硝酸及內部標準品銻(1 ppm) 250  $\mu\text{L}$ ，添加 Au 100 ppb 25  $\mu\text{L}$ 。石墨加熱板設定 105°C，微波前預消化 30 分鐘。待消化管冷卻後，加入 2 mL 過氧化氫，置入 CEM 微波消化器中進行微波消化。消化管冷卻至室溫後，將消化液移入 25 mL 定量瓶中，以去離子水定量至 25 mL。將消化液以濾紙過濾至消化儲存瓶中作為檢液，並以 Agilent 7700S ICP-MS 進行檢測。(本實驗於汞處理 24 小時後剪下水稻根部乾燥封存，委託景博科技股份有限公司代為檢測)。

#### (五) ROS 中過氧化物(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)在組織內的分布情形

1. 取水稻根，以 10 μM CM-H<sub>2</sub>DCF-DA 染色 30 分鐘，於共軛焦顯微鏡下以 488nm 之綠色螢光雷射攝影記錄。

#### 2. 葉片組織過氧化氫酶( Peroxidase) 之分佈

過氧化氫為活性氧代謝系統中的中間產物，累積過多會傷害細胞，但是適量時可為對植物的訊號。本實驗是二品系水稻組織培育分別在對照及汞逆境下七天之葉片，剪下葉片加入二氨基聯苯胺在暗室反應 8 小時檢測葉片組織過氧化氫酶之分佈，褐色處即為葉片組織存在之 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與二氨基聯苯胺氧化所形成之顏色。

#### (六) 脯氨酸(Proline)含量之測定

取水稻根部 0.3 克，將樣本置入研鉢中，加入 5 ml Sulfosalicylic acid 研磨，置入 15 ml 螺旋試管以 5000 rpm 離心 20 分鐘。取 1ml 上清液至新標示好的 15 ml 螺旋試管中，分別加入 1 ml Ninhydrin 及 1 ml Acetic acid 混合均勻。放入 100°C 熱水浴反應 30 分鐘，後迅速放入冰浴中冷卻約 1 分鐘。各試管分別加入 4ml Toluene 快速混合 15 秒，靜置 5 分鐘。取 3 ml 上清液置入玻璃比色管，以分光光度計測取 520 nm(A<sub>520</sub>) 的吸光值並計算脯氨酸(Proline)含量。

【公式】  $\text{Proline } (\mu\text{mol}^{-1}) = A_{520} \div 3.24(K, \text{cm}^{-1}\mu\text{mol}^{-1}) \times 5(\text{稀釋倍數}) \div 0.3(\text{樣品克重})$

#### (七) 水稻根部相對水分含量(Relative Water Content, RWC)

相對水分含量 = (鮮重 - 乾重) / (膨潤重 - 乾重) × 100%

#### (八) 木質素(Lignin)含量之測定

取水稻根部 3 克，將樣本置入研鉢中，加入 10 ml ethanol 研磨，待其乾燥後秤取每份樣品 0.05 克，加入 5ml 2M 鹽酸與 0.5ml Thioglycolic acid，以 100°C 加熱 8 小時，後迅速放入冰浴中冷卻以終止反應，接著以 10000g 離心 30 分鐘。將樣品以 distilled water 清洗，回溶於 5ml 1M NaOH，以 25°C 下反應 18 小時，接著以 10000g 離心 30 分鐘。將上清液取出，加入 1ml 濃鹽酸，接著以 10000g 離心 30 分鐘，排除上清液，加入 1ml 1M NaOH。取 0.5ml 上清液置入玻璃比色管，以分光光度計測取 280 nm(A<sub>280</sub>) 的吸光值並計算木質素(lignin)含量。

【公式】  $\text{Lignin } (\text{mg g}^{-1}) = A_{280} \times 72.599 + 0.1581$

### (九) 總蛋白質定量 Bio-Rad DC Protein Assay

取水稻的根、芽，分別秤取 350 mg 將樣本置入研鉢並加入液態氮研磨至細粉狀，裝入離心管。分別加入 400  $\mu\text{l}$ (pH 6.0)磷酸緩衝液，以震動混合機充分混合均勻。離心 20 分鐘(轉速 12000 rpm)後將上澄清液吸出分管。各取樣本 2  $\mu\text{l}$  清液置入新的離心管。各管加入 100  $\mu\text{l}$  A 試劑、800  $\mu\text{l}$  B 試劑，快速混合均勻。靜置 15 分鐘，將其移入比色管中以分光光度測取 750nm(A750)的吸光值。以公式計算蛋白質含量。

【公式】 $A_{750} \div 0.01(K, \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 100 \div 1000 \div \text{FW}(\text{g})$

### (十) 過氧化酶(POD)、超氧化歧異酶(SOD)非變性聚丙烯醯胺凝膠電泳

電泳分離採用 PAGE 方法分別於 POD、SOD 膠片注入含 20、40  $\mu\text{g}$  蛋白質溶液，分離膠濃度為 10%，濃縮膠濃度為 4.5%，以 4°C、120 V、70 mA 穩壓電泳約 3-4h。

#### 1. POD 染色方法

10 ml 磷酸緩衝液 (pH 5.8) 加 200  $\mu\text{l}$  HCl，加入 0.045 g 二氨基聯苯胺，完全溶解後再加入 40 ml potassium phosphate buffer (pH 5.8)及 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (務必混合均勻)放入凝膠避光震盪 20 min 到褐色條帶顯現後，將凝膠浸泡於蒸餾水中漂洗 2-3 次，拍照，乾燥封膜後保存。

#### 2. SOD 染色方法

電泳後的凝膠置染色液 0.1% (NBT)，避光浸泡 20 min，並不時搖動，後用蒸餾水漂洗，再放入 0.036 M (pH 7.8)磷酸緩衝液 (100  $\mu\text{l}$  TEMED，28  $\mu\text{mol/L}$  核黃素)，避光浸泡 15 min，並不時搖動，經蒸餾水漂洗，放入 0.05 M PBS (pH7.8)，4 x 8 W 日光燈下照光 20-30 min，出現無色條帶後將凝膠浸泡於蒸餾水中漂洗 2-3 次，拍照，乾燥封膜後保存。

### (十一) 總、可溶性及離子結合性過氧化酶 Peroxidase (POD)活性測定

取水稻的根 0.3 公克，分別以(pH 5.8)磷酸緩衝液或含 0.8 M KCl 的(pH 5.8)磷酸緩衝液萃取過氧化酶，以 12000g 離心 20 分鐘，取出上清液。分別取 100 $\mu\text{l}$  上清液加入 200  $\mu\text{l}$  Guaiacol 與 180  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 之反應溶液，混和均勻。快速移入比色管，以分光光度計記錄其在 470 nm (A470)0 秒及 60 秒的吸光值。計算過氧化酶 (POD)的活性。



【公式】 總過氧化酶的活性(Units g<sup>-1</sup>)

$$= \Delta A_{470} \div 26.6(\text{K, mM}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 3 \times 40 \div 1(\text{min}) \div \text{FW}(\text{g})$$

可溶性過氧化酶的活性(Units g<sup>-1</sup>)

$$= \Delta A_{470} \div 26.6(\text{K, mM}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 3 \times 40 \div 1(\text{min}) \div \text{FW}(\text{g})$$

離子結合過氧化酶的活性(Units g<sup>-1</sup>)

$$= \text{總過氧化酶的活性} - \text{可溶性過氧化酶的活性}$$

## (十二) 超氧化歧異酶 Superoxide Dismutase (SOD) 活性測定

取根部 0.3 克於預冷的研鉢中，加入含 1% 聚乙烯 PVP 的磷酸緩衝液至最終體積 2 ml，於冰浴下研磨成漿，再以 12000 g 離心 10 分鐘，取出上清液。顯色反應部分，取 5ml 試管，其一作為樣品測定管，其一作為對照管，另一作為空白。依照以下溶液加入量配置各管: 0.05 M PBS 1.75 ml、0.13 M MET 0.3 ml、750 μM NBT 0.3 ml、100 μM EDTA-Na<sub>2</sub> 0.3 ml、20 μM 核黃素 0.3 ml、酵素萃取液 0.05 ml (空白管以含 1% 聚乙烯 PVP 的磷酸緩衝液代替、對照管避光)。混合均勻後，空白及對照管製於暗處，樣品測定管於日光燈下反應 10 分鐘，再分別測定 560 nm 波長下各管的吸光度值。按下列公式計算 SOD 活性：

$$\text{SOD 總活性} : (A_0 - A_s) \times V_T / (A_0 \times 0.5 \times \text{FW} \times V_1)$$

$$\text{SOD 比活性} : \text{SOD 總活性} / \text{蛋白質濃度}$$

公式中，SOD 總活性以每克鮮重酶單位表示；比活性單位以酶單位/mg 蛋白表示

A<sub>0</sub>：對照管 OD 值；A<sub>s</sub>：照光管 OD 值；V<sub>T</sub>：樣品液總體積；

V<sub>1</sub>：測定樣品用量；FW：樣品重

## (十三) 抗氧化酶相關的基因表現

### 1. 總核糖核酸(total RNA)的萃取

取 100mg 的水稻根部，以液態氮研磨均勻，加入 450 ul 的 Solution B/2-ME，並至於 60°C 水域 10 分鐘，並不時搖晃。加入 150 ul 的 Protein Precipitation Soution，於室溫下靜置反應 5 分鐘，後以 13200 rpm 離心五分鐘。取出並計算上清液總量，置於新的 RNA Spin Filter Collection Tube，再以 13200 rpm 離心 2 min。將下層液取出置於新的 1.5 μl eppendorf，再加入 1.5 倍下層液體積的 RNA Binding Solution，並混合均勻。將混合均勻的液體置入新的 RNA Spin Column，每次加入 700 μl，共加入 2 次，每次皆以 13200 rpm 離心 1 min。將 RNA Spin Column Membrane 置

入一個新的 Collection Tube，並加入 500  $\mu$ l RNA Wash Solution I，以 13200 rpm 離心 1 min。將下層液排除，並於 RNA Spin Column Membrane 的正中央加入 82  $\mu$ l 的 DNase 混合液（預先配置 80  $\mu$ l DNase I Incubation Buffer + 2  $\mu$ l DNase I），於室溫下靜置 20 min。加入 500  $\mu$ l RNA Wash Solution I，以 13200 rpm 離心 1 min。排除下層液，並將 RNA Spin Column 移入新的 tube 再加入 600  $\mu$ l RNA Wash Solution II，以 13200 rpm 離心 1 min。此步驟重複一次。將下層液排除，再以 13200 rpm 空轉 3 min 以排除任何可能的殘留物，將 RNA Spin Column 移入新的 tube，並加入 35  $\mu$ l 的 Nuclease-free Water 靜置 1 min，再以 13200 rpm 離心 1 min。得到 RNA，保存於 -70°C。

## 2. cDNA 備製

將純化定量後的 RNA 取 2  $\mu$ l，加入 DEPC treated water 7.8  $\mu$ l，再加入 1  $\mu$ l Oligo dT 於 65°C 下作用 10 分鐘，使 RNA 變性(denature)，加熱完畢後迅速移至冰上，以避免其形成二級結構。之後加入 1  $\mu$ l 10X dNTP mix、4  $\mu$ l Improm-IITM 5X Reaction Buffer、1  $\mu$ l Improm-IITM Reverse Transcriptase、3.2  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>。配置完成後以核酸合成機設定以下條件進行反應：25°C 10 分鐘，37°C 60 分鐘，70°C 10 分鐘。作用完成後，將所得之 cDNA 保存於 -20°C。

## 3. 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

配置 10  $\mu$ l Master Mix、Forward Primer 及 Reverse Primer 各 4  $\mu$ l、DNA template 1  $\mu$ l、DEPC treated water 1  $\mu$ l。將配置完成後之樣品至於核酸合成機上以下列條件進行反應：95°C 10 分鐘；95°C 30 秒、72°C 30 秒，以上兩條件共 35 循環；72°C 5 分鐘。將完成後之樣品以 2% Agarose Gel 電泳分析 DNA 產物。

## 4. 抗氧化基因的篩選

本實驗中所選用抗氧化酶基因是以 Microarray 對 TNG67 在汞逆境下之分析和前人研究為基礎，並且結合生物資訊分析所篩選出來，分別有以下幾類：POD、SOD 及 LOX。以下是針對各基因之 cDNA 所設計之引子。

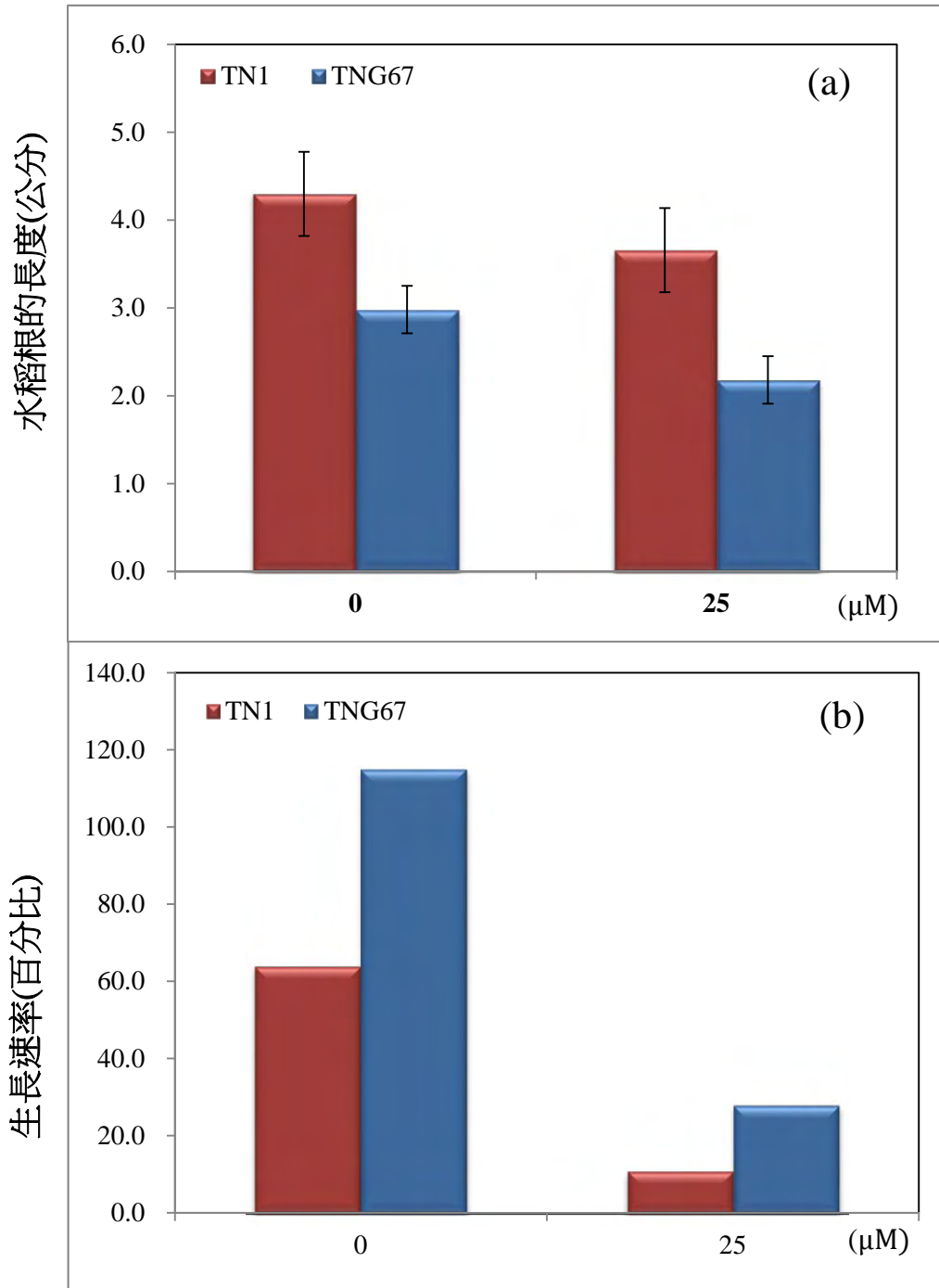
七個與水稻抗氧化相關的基因引子

Gene	Primer	Sequence(5'-3')	Length
POD(Loc_Os1g73200)	F	ACTGCACTTCCTTCGACAAGCG	22
	R	TTAGCACCCCTACAGCACCAAGC	22
POD(Loc_Os4g55740)	F	CAGGGTTAACTGCAGGAAGGTC	22
	R	AGAAACCTGACACTAACCAACCAC	24
POD(Loc_Os4g55740)	F	AGTCAAAGTGCGCCTTCGTGAG	22
	R	ACAAAGGCCATACTGGCGAGAC	22
POD(Loc_Os5g06970)	F	ACCGATGGAATTGATCCGTCGTTG	24
	R	AGCTGCAGTAGCAGTGACATTGAC	24
POD(Loc_Os7g48010)	F	GAGCATGGACAGCGCTAACAAAC	22
	R	ACTGAAACCCTTGTCGCCGAAC	22
SOD(Loc_Os6g02500)	F	TCTGGATGGGTTTGGCTTTGTTAC	24
	R	ACTGTGAAGCTGCCTGTACGAC	22
LOX(Loc_Os8g39850)	F	AAGGGCTTCTCAACAGCCTGAG	22
	R	TCTCCGACTTCGGGTCTTTCTTG	23
OsTub(Loc_Os3g51600)	F	TTGCCGAGATCACCAACAGTGC	22
	R	TCATTCTCGTCGGACTCAGAGAAC	24

## 伍、研究結果

### 一、汞對 (TN1 和 TNG67) 水稻根部生長之影響

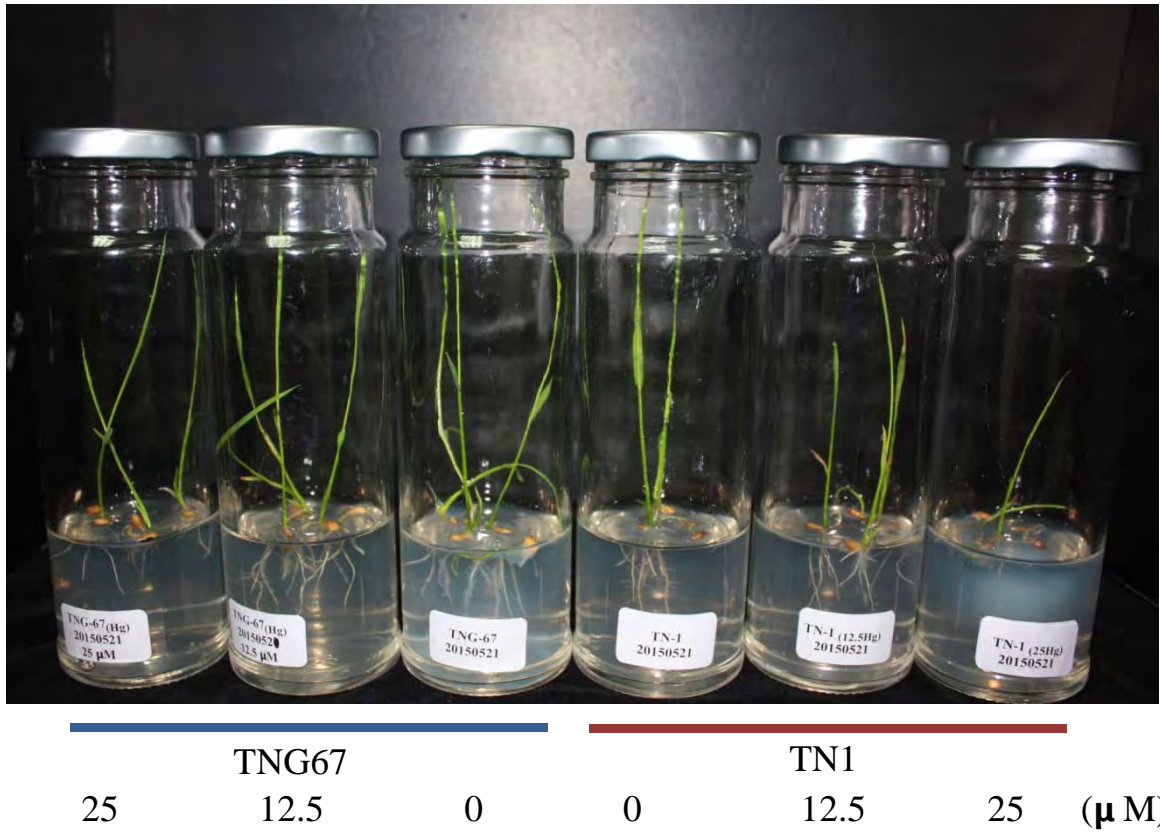
(一) 汞對不同品系之水稻，TN1 及 TNG67 都有抑制的作用。



圖一(A)、汞對 TN1、TNG67 水稻(a)根部生長之影響(b)根的生長速率

TN1 的生長速率為 11%，TNG67 則為 28%，相較下 TNG67 對汞逆境耐受性較高。

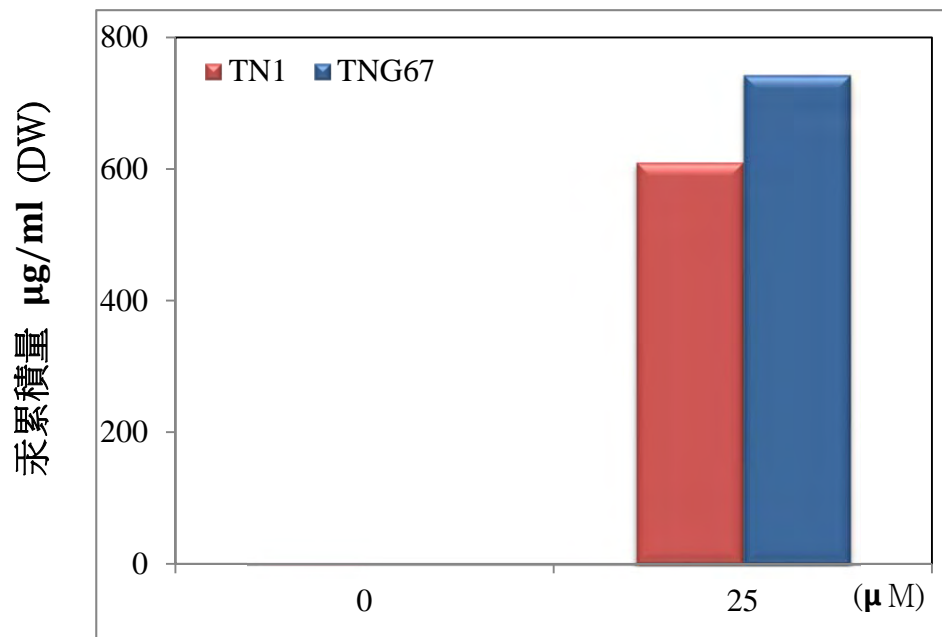
(二)兩品系水稻於不同濃度汞逆境經組織培育 7 天後之結果



圖一(B)、兩品系水稻於不同濃度汞逆境經組織培育 7 天後之結果

經由組織培育 7 天後，兩品系水稻在汞逆境下，生長皆被顯著的抑制，且觀察到，受抑制的程度隨著汞濃度的提升而增加。同時我們可以看到 TNG67 的對照組較 TN1 生長的還要好，在汞逆境下抑制的情形也不如 TN1 那麼嚴重，顯示出 TNG67 對汞有較高耐受性。

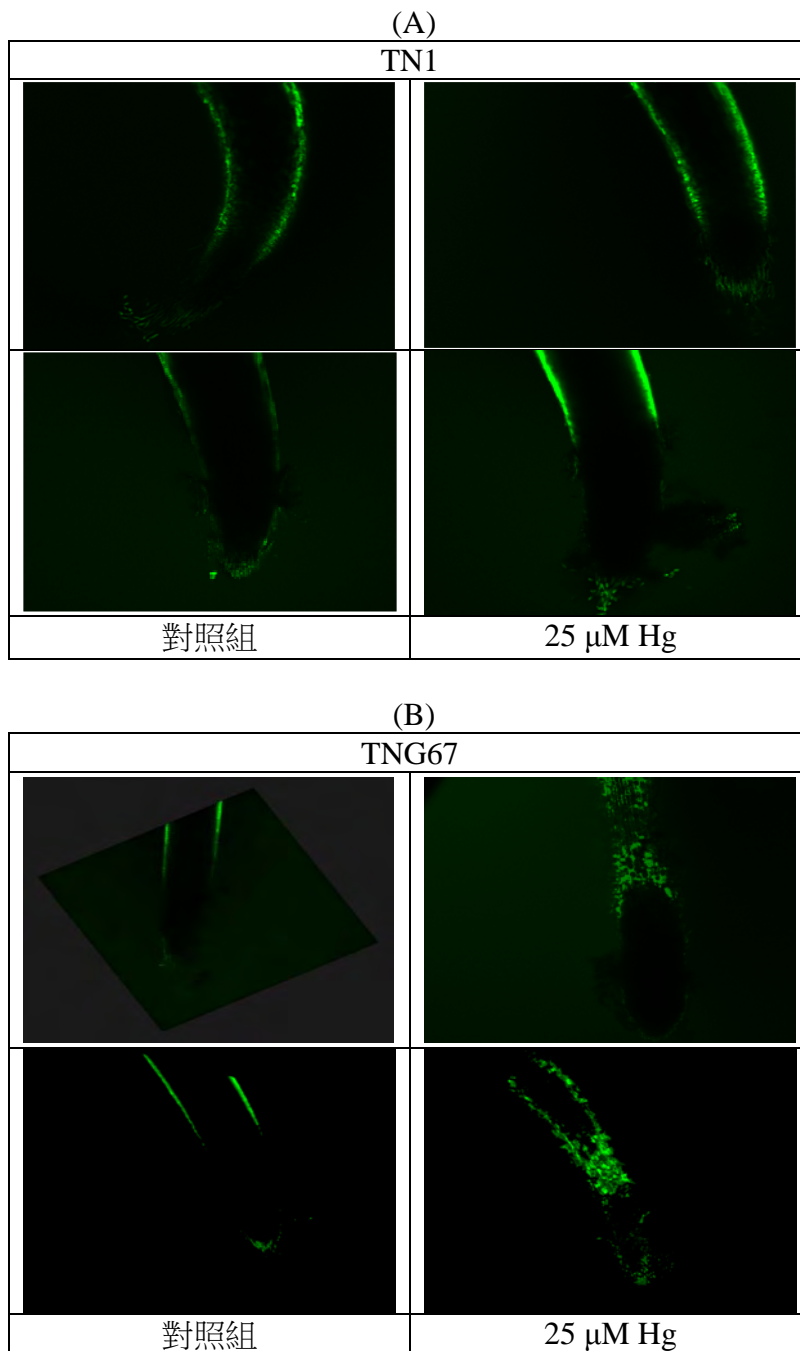
## 二、汞累積於水稻根部之含量



圖二、水稻根部組織汞含量之累積

兩品系的水稻在經過汞處理後，根部組織內的汞含量皆上升。TN1 根細胞累積 610µg/ml，而 TNG67 則累積 742 µg/ml，實驗結果證實 TNG67 的根部組織累積較多的汞。

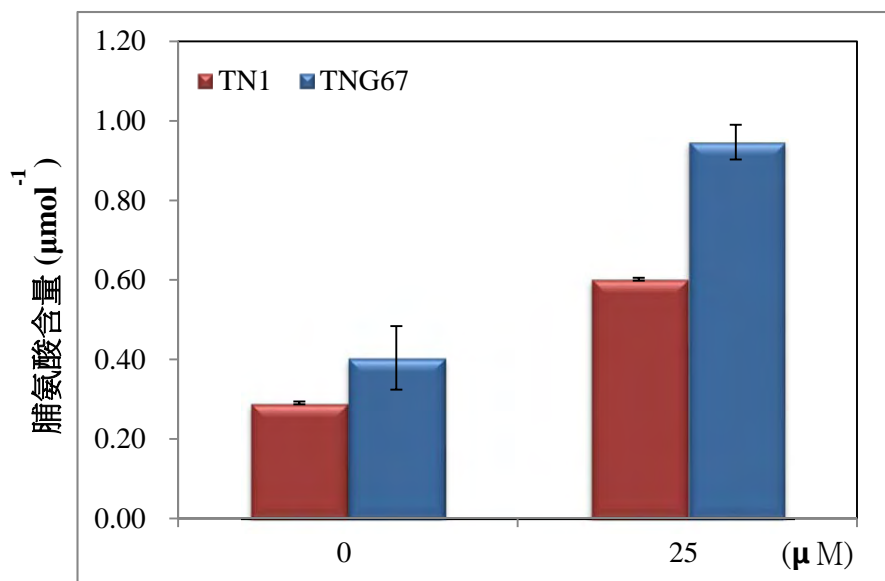
### 三、水稻根部組織活性氧族(ROS)之分布情形



圖三、汞逆境下不同品系水稻根部組織內活性氧族(ROS)之變化  
依照雷射共軛焦顯微鏡之觀察，綠色螢光表示 ROS 之存在

汞逆境下以雷射共軛焦顯微鏡偵測 ROS 中的  $H_2O_2$ (綠色螢光表示 ROS 分佈的位置) 利用此觀察不同品系水稻根部組織內活性氧族(ROS)之分佈。結果顯示，TN1 及 TNG67 的根部 ROS 含量皆顯著增加，在 TN1 中，ROS 大部份分佈於根部表層；而在 TNG67 則擴大分佈於根部中央組織。此外我們還觀察到，綠色螢光不論在對照組或汞處理組，於根尖部位皆有明顯螢光分佈。

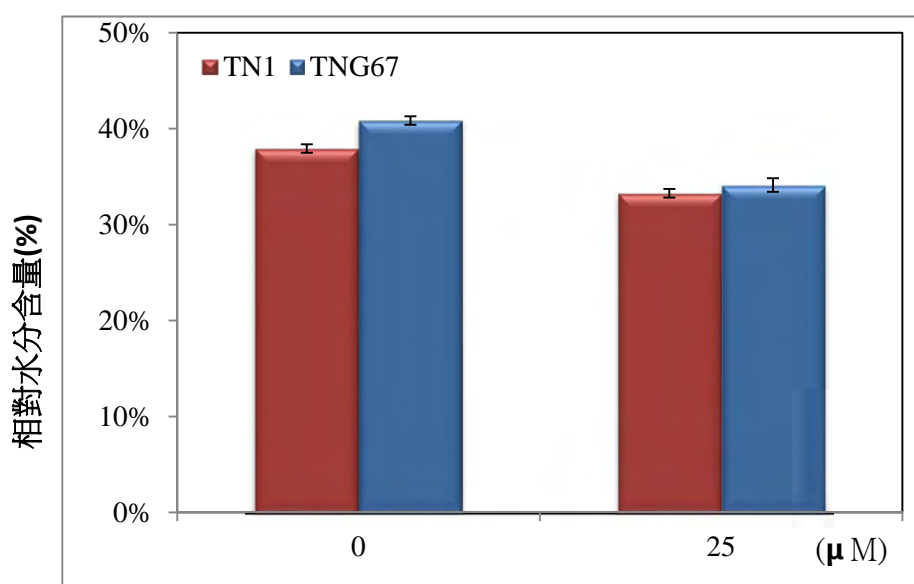
#### 四、水稻根部組織內脯氨酸(Proline)含量



圖四、水稻根部脯氨酸之含量

兩種品系水稻在遭受汞逆境時根部脯氨酸之含量，根部組織內脯氨酸含量皆上升，TN1 上升 39%、TNG67 則上升 57%，結果顯出 TNG67 在汞逆境下會產生較 TN1 多的脯氨酸。

#### 五、水稻根部相對水分含量(relative water content, RWC)

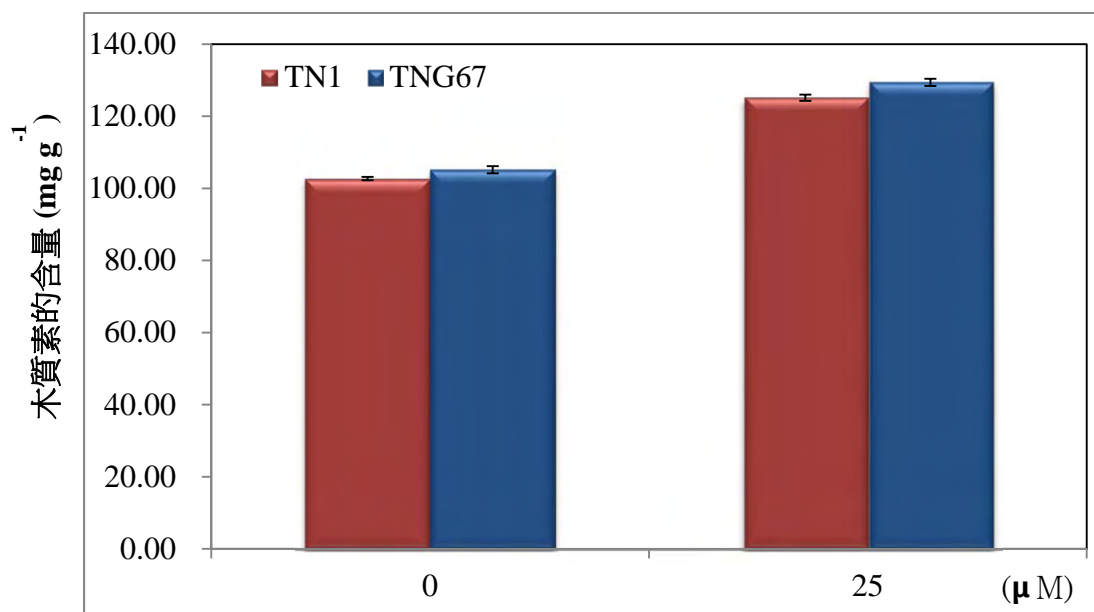


圖五、根部相對水分含量之比較

兩品系水稻在汞逆境下 24 小時 RWC 皆有些許的下降，但其差異並不顯著。



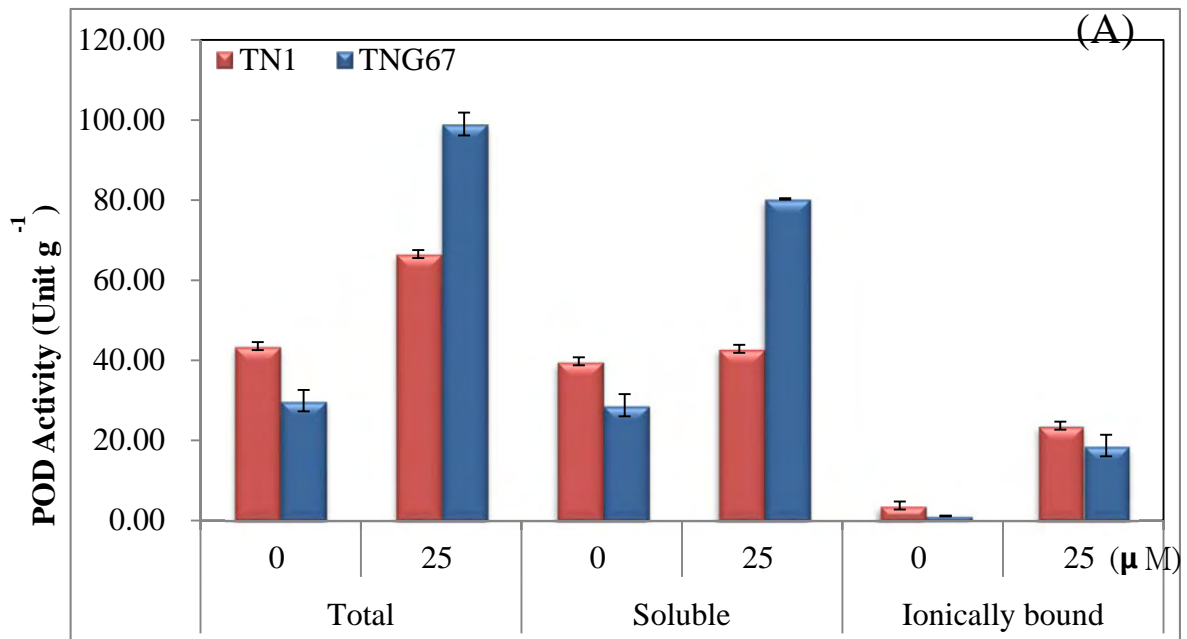
## 六、水稻根部組織木質素(Lignin)含量



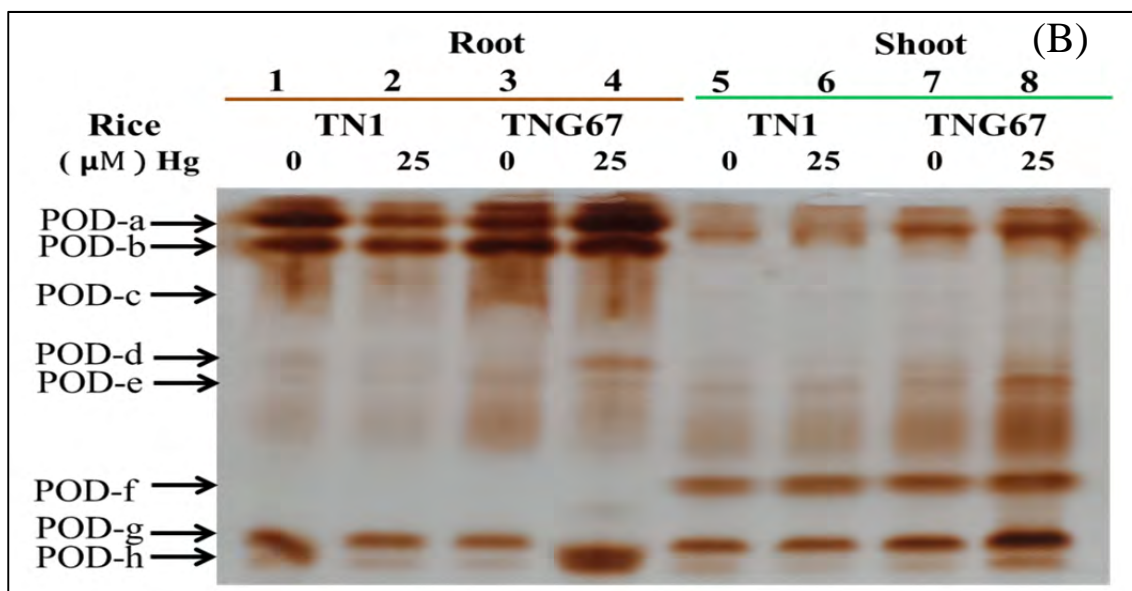
圖六、水稻根部木質素之含量

觀察水稻根部型態時，發現經過汞處理的水稻，根部組織顏色與對照組有差異，兩種品系水稻在汞逆境下顏色都較對照組深，其中 TNG67 又較 TN1 顏色深，因此繼續檢測根部木質素含量。實驗結果顯示，TN1 在汞逆境下的木質素含量為 125 mg/ml，較對照組上升 21%，而 TNG67 在汞逆境下的木質素含量為 130mg/ml，較對照組上升 23%。實驗結果證實，在汞逆境下，TNG67 的木質素含量的確較 TN1 高，但是其差異並不顯著，且其在汞逆境下，木質素含量的上升情形也十分相似。

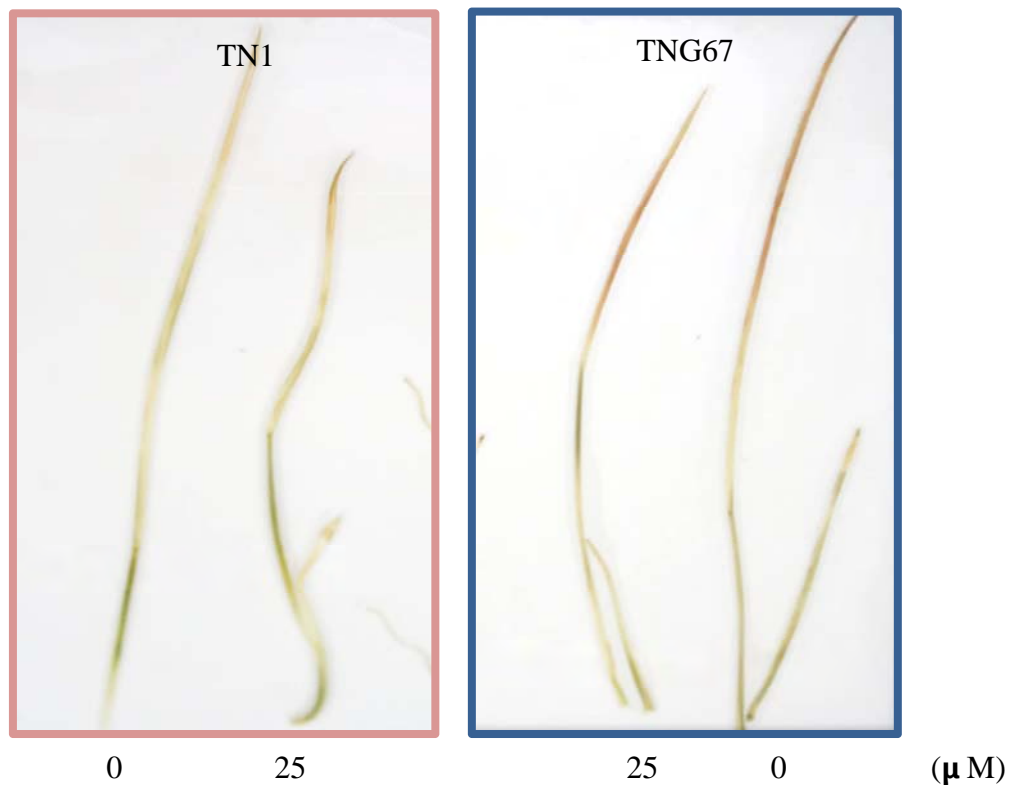
七、汞對水稻根部之總(Total)、可溶性(Soluble)、離子結合性(Ionically bound) POD 活性之影響、POD 電泳分析及葉片組織之過氧化酶之分佈



圖七、(A)汞對不同品系水稻根部組織總、可溶性及離子結合性過氧化酶的活性  
兩品系水稻在遭受汞逆境時，根部組織內 POD 活性皆上升，而 TNG67 在汞環境下會產生較 TN1 高的 POD 來應付汞逆境。在汞逆境下，TNG67 的總過氧化酶及可溶性過氧化酶活性分別比 TN1 高 33%、47%，但是 TN1 的離子結合過氧化酶比 TNG67 高 21%。



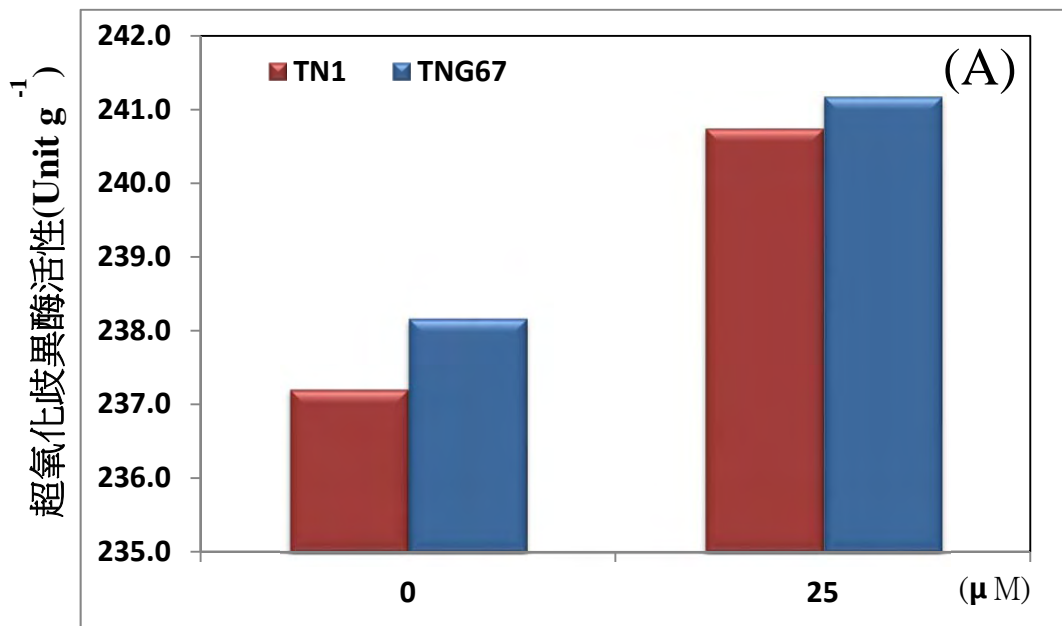
圖七、(B)汞對不同品系水稻根及芽組織過氧化同功酶(POD)電泳後活性之結果  
POD-a,b,d,g,h 的活性分別出現於根部組織，在汞逆境下 TNG67 的 POD-a,d,h 在顯著的較對照組高。兩品系水稻的芽部組織在汞逆境下的 POD 含量皆較對照組高。TNG67 的 POD 含量總體而言，較 TN1 高出許多。



圖七、(C)葉片組織過氧化氫酶( Peroxidase)之分佈

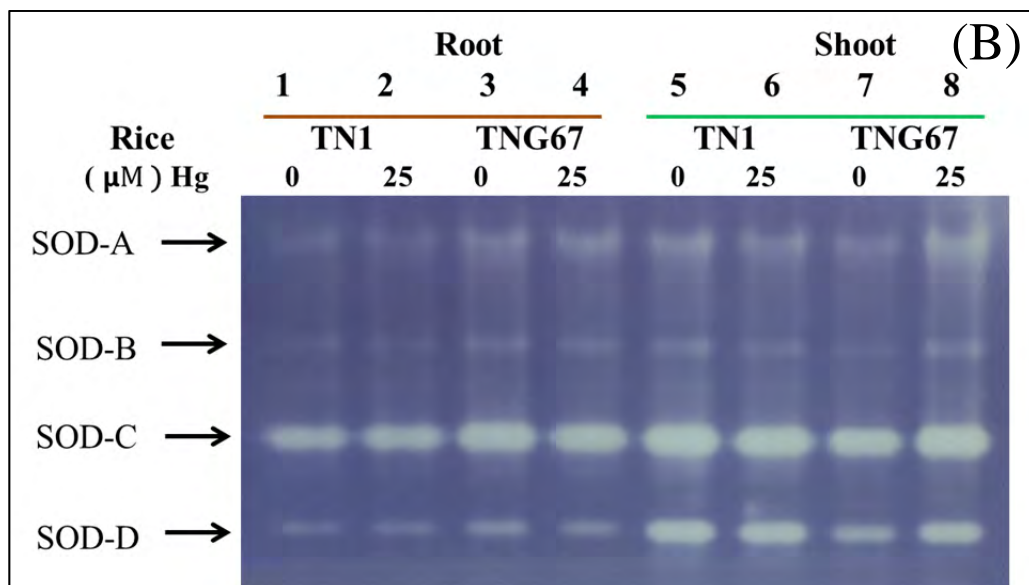
兩品系水稻組織培育分別在對照組及汞逆境下七天之葉片，褐色處即為葉片組織過氧化氫酶( Peroxidase)之分佈。

八、汞對水稻根部之超氧化歧異酶活性之影響



圖八、(A)汞對不同品系水稻根部組織總超氧化歧異酶活性

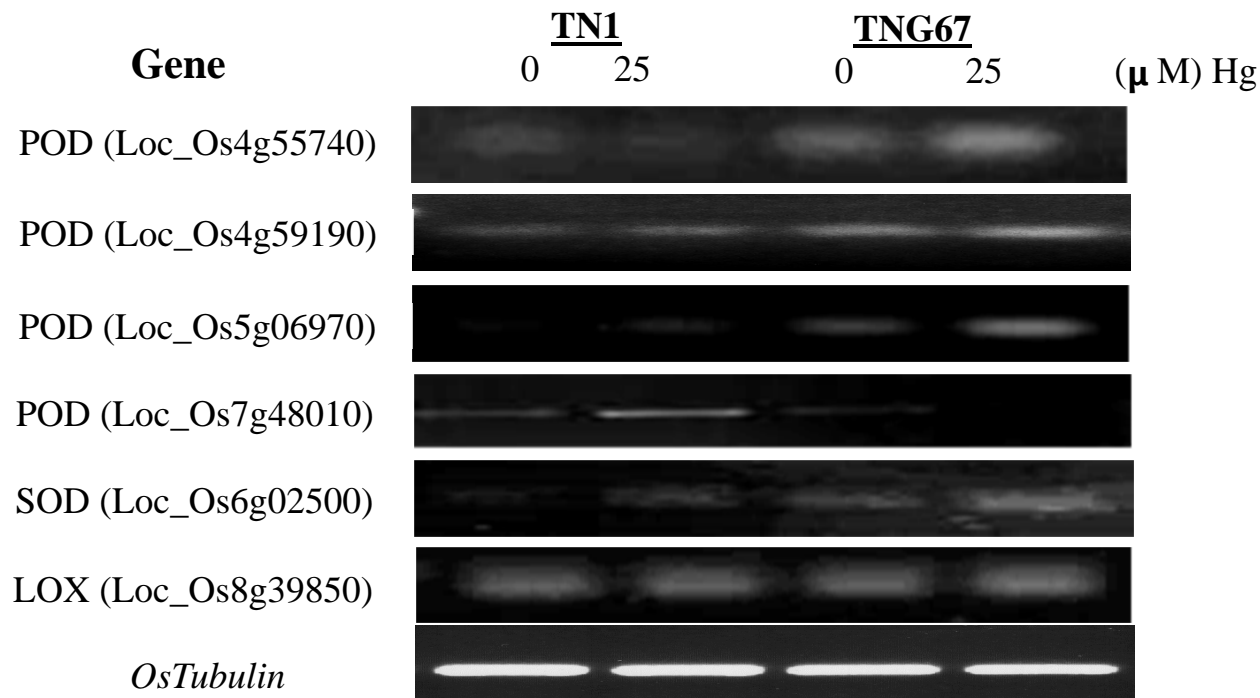
在汞逆境下，TNG67 及 TN1 根部組織內的 SOD 活性皆較對照組高。而在對照組中，TNG67 的 SOD 活性較 TN1 高；在汞逆境下亦是如此，但是其差異不明顯。



圖八、(B) 電泳分析水稻根及芽部組織超氧化歧異同功酶活性

TN1 及 TNG67 根部組織的 SOD 活性在汞逆境與正常環境下沒有太大的差異。SOD 活性 TNG67 較 TN1 高，在汞逆境下和正常環境下都相同。TN1 及 TNG67 芽部組織內的 SOD 活性在汞逆境下皆上升。就單一處理分析，TN1 的 SOD 活性在正常環境下較 TNG67 高；但是在汞逆境下，TNG67 的 SOD 活性較 TN1 高。

九、汞對水稻根細胞內抗氧化相關基因表現之影響



圖九、汞對水稻根細胞內抗氧化相關基因表現之影響。經 RT-PCR 檢測六個抗氧化相關基因發現，在汞逆境下 TN1 及 TNG67 的表現隨各基因有所差異。

- (一)POD (Loc\_Os4g55740)在 TN1 的表現經汞處理後下降，而在 TNG67 中明顯上升。
- (二)POD (Loc\_Os4g59190)的表現在汞逆境下，兩品系水稻皆上升，而在 TNG67 比在 TN1 上升還要顯著。
- (三)POD (Loc\_Os5g06970) 的表現不太顯著，在汞逆境處理下，兩品系水稻皆上升，同樣的在 TNG67 比 TN1 上升還要明顯。
- (四)POD (Loc\_Os7g48010)的表現在 TN1 經汞逆境處理後顯著上升，而 TNG67 則是沒有太大的變化。
- (五)SOD (Loc\_Os6g02500)在兩品系水稻的表現在汞逆境下有明顯增加，TNG67 經汞逆境處理明顯上升。
- (六)LOX(Loc\_Os8g39850)的表現在兩品系水稻經汞處理後皆上升，兩者趨勢接近。

## 陸、討論與應用

汞會在植物體內累積，使植物生理調節異常並產生顯著傷害 (Zhou et al., 2007; Zhou et al., 2008)。前人研究已在豌豆 (*Pisum sativum* L.)、黑麥草 (*Lolium perenne* L.)、綠薄荷 (*Mentha spicata* L.)、歐洲雲杉 (*Picea abies* L.)、菠菜 (*Spinacia oleracea* L.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.)、紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.)、綠豆 (*Pisum sativum*) 與芥菜 (*Brassica juncea* L.) 等植物報導關於汞吸收與累積的植物生理表現 (Shiyab et al., 2009)。已知的毒害效應包括造成光合作用、葉綠體合成、水分輸導與蒸散作用等功能被抑制，以及產生脂質過氧化 (lipid peroxidation) 等傷害，進而對植物生長與養分攝取造成影響 (Cho and Park, 2000)。

植物體內的抗氧化系統是一套快速且有效率的防禦方式，尤其在面對重金屬如汞所造成的氧化性傷害時，顯得特別重要。由於汞除了誘導產生活性氧族物質而造成氧化逆境外，還會影響細胞內抗氧化系統清除活性氧族物質的效率 (Schutzendubel et al., 2001; Romero-Puertas et al., 2004)，因此，快速且有效誘導產生各種抗氧化酶如過氧化酶 (POD)、超氧化歧異酶 (SOD) 等，來清除這些毒害物質，是最有效率的方法。過氧化酶 (POD) 活性的改變被視為一種逆境指標 (stress marker)，明顯與組織生長及發育有關。

本研究中，汞所造成氧化逆境，主要發生在水稻根部。汞為二價的離子態，和銅 (Cu)、鐵 (Fe) 特性不一樣，不是氧化還原金屬，無法催化類似的 Fenton Reaction，因而導致直接產生活性氧族物質 (ROS)，如  $H_2O_2$ 、 $O_2^-$ 、OH 的累積，推測主要是由於  $H_2O_2$  清除效率減緩而間接產生累積現象或是由於細胞內酶與非酶類的代謝過程所產生 (Yang et al., 2007; Chang et al., 2012)。

本研究中在根部的生長上，TN1 水稻在汞逆境下被抑制的比 TNG67 嚴重 (如圖一)，以雷射共軛焦顯微鏡觀察到產生過氧化氫 ( $H_2O_2$ ) 螢光之部位，結果顯示兩品系水稻在汞逆境下根部組織內的 ROS 中的過氧化氫含量皆上升，而在根尖部位明顯螢光分佈，推測是由於根尖的細胞分裂活躍，直接接觸到含汞水溶液所造成，結果也顯示 TNG67 水稻的根部組織內所累積的 ROS 較 TN1 多 (如圖三)，此外，根據 ICP-AES 實驗結果，TNG67 組織內的汞累積量也較 TN1 多 (如圖二)，因此初步推論，TNG67 比 TN1 更耐汞逆境。汞會抑制水稻生長與水分利用效率 (Sanita di Toppi and Grabbreilli, 1999)，而其誘發產生的一些活性氧族物質，進而誘導一類 MBP (myelin basic protein) 激酶 (kinase) 的信號分子，透過調節 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) 路徑 (pathway)，活化過氧化酶 (POD)、超氧化歧異酶 (SOD) 與其他抗氧化酶，以去除  $H_2O_2$  及其他活性氧族物質 (Jonak et al., 2004; Pitzschke and Hirt, 2006; Yeh et al., 2007; DalCorse et al., 2010) 進而保護植物體本身。

過氧化酶(POD)屬於較龐大的酵素類群，在水稻中多達 138 個 (Passardi et al., 2004)。由於異構酶的種類相當多且酵素反應上的多功能性，這些 POD 在植物體中參與了廣泛的生理機制 (Passardi et al., 2005)；例如生長素 (auxin) 的代謝、木質素 (lignin) 與木栓質 (suberin) 的形成以及植物防禦素 (phytoalexins) 的合成等等。植物 POD 在汞逆境下活性改變，依汞對植物根部所造成的汞逆境情況、植物種類、同一植物不同品系或基因型而異(Tomas et al,2007)。本研究中所採用之水稻品系 TN1 及 TNG67 因各有其遺傳基因型，因此面對汞逆境時，兩不同品系的水稻過氧化酶其活性皆有上升，但是此兩水稻品系之間上升的幅度亦有差異，TN1 水稻的過氧化酶活性上升 53%、TNG67 水稻則上升 231%(圖七 A)，結果顯示 TNG67 水稻在汞的處理下會產生較 TN1 多的 POD 來應付汞逆境。

我們的實驗結果也顯示，水稻根部的過氧化酶大多以可溶性過氧化酶(soluble peroxidase)型態存在，並游離於根部組織間隙中，這些未結合的過氧化酶隨即釋放到土壤中，或與其他外泌蛋白及有機酸結合(Gramss et al,1999; Hinsinger et al,2005; Tomas et al, 2007)，以降低汞對植物根部組織的傷害。抗氧化酶，諸如 POD、SOD，無論在 TN1 水稻或 TNG67 水稻，基本上皆因汞逆境而導致上升，此一現象和 POD 及 SOD 基因表現因汞處理而上升互相一致。這樣的結果顯示，在汞逆境下，水稻根細胞遭受此一逆境，組織受到毒害衝擊，產生活性氧族(ROS)，進而牽動細胞內抗氧化的相關基因如 POD、SOD 等，在細胞內製造這些基因產物如 POD 酶、SOD 酶來清除細胞內多餘的活性氧族。相較之下，TNG67 水稻的根細胞內產生較大的抵抗力，導致生長上比起 TN1 更耐汞逆境。而其最直接的影響就是會使植物根部型態發生改變，常見的根部褐化是典型汞對植物的危害徵狀(Sanita di Toppi and Grabbreilli, 1999;Benvides et al, 2005)，造成褐化的原因可能是植物因汞逆境導致細胞在製造抗氧化酶的同時，合成更多的木質素以應付氧化逆境 (Cheng et al, 2002)。許多的研究指出，細胞的過氧化酶其多功能之一就是能利用細胞內的木質素前驅物(precursor)多醇類及 ROS 物質如  $H_2O_2$  合成木質素。如此一來植物細胞不但能合成植物細胞內必需的物質-木質素，亦能清除許多細胞內有害的  $H_2O_2$ ，減少植物細胞受到活性氧族的損傷。我們的實驗結果也證實，在汞逆境下，TNG67 的木質素含量較 TN1 略為升高(如圖六)。本研究中我們另外觀察到，TNG67 水稻的根部褐化的較 TN1 深，因此推論，TNG67 水稻的根部在汞逆境下累積的 ROS 較 TN1 水稻多，可能產生較多的木質素來應付汞逆境。

實驗所設計的七個水稻抗氧化相關的基因中，在 POD(Loc\_Os4g59190)、POD(Loc\_Os5g06970)、SOD(Loc\_Os6g02500)及 LOX(Loc\_Os8g39850)之基因中二個品系水

稻經汞處理後的表現皆上升，TNG67 的表現在汞逆境下較 TN1 還要顯著的上升，然而在 POD(Loc\_ Os7g48010)中，TN1 大幅上升，推論是因為水稻 POD 基因共有 138 個基因，不同品系間的相同基因，對同一環境逆境的反應不盡相同。此項實驗結果表示，TNG67 水稻在汞逆境下，相對於 TN1，大多數的抗氧化相關基因會積極表現以應付汞逆境，符合我們所做的各式生理生化分析，因此經由本研究之實驗結果可歸納出 TNG67 水稻比 TN1 水稻更耐汞逆境。

植生復育法(Phytoremediation)為利用植物吸收土壤中離子的特性所衍生出的復育方法。若是土地受到重金屬污染，人們可以種植較耐重金屬的植物，利用植物對重金屬的吸收，達到減輕或去除土壤中重金屬的污染。本研究所歸納出之結論，TNG67 水稻比 TN1 水稻較耐汞逆境，依環境復育概念，搭配本研究中汞累積於水稻根部含量數據，便可以計算歸納出有效的水稻植生復育法。研究文獻指出，許多先進國家皆採用此法來達成淨化或改良土壤之手段。一般來說，如果利用對環境污染負載力較高的木本植物來進行土壤復育，則必須考慮落葉問題，若是處理不妥，可能會減少土壤復育效果。本研究所採用之水稻則不會造成此一困擾。植物體容易回收處理，操作方便，期盼抗重金屬較強的水稻可成為復育被重金屬污染土壤的好材料。



## 柒、參考文獻

- 一、高景輝。(2005)植物生理分析技術，五南圖書公司，台北
- 二、徐越明，孫若茜，陳家安。(2014)與 UV 的戰鬥「豆」-利用綠豆探討植物遭受紫外線逆境之生理反應，高雄市第 54 屆中小學科學展覽會作品
- 三、黃怡寧，馬悅華，黃聖龍。(2014)揮發性化合物抑制水稻去白化的分子機制，中華民國第 53 屆中小學科學展覽會作品
- 四、林穎楨，趙家珩，卓筱芸。逆境對 ABRC-CBF1 轉殖番茄之影響，中研院高中生命科學資優生培育計畫專題研究
- 五、Chang ML, Cheng NY, Liao LJ, Cho CL, Liu ZH. (2012) Effect of cadmium on the activity of peroxidase isozymes in roots of two *Oryza sativa* cultivars. *Bot.Stud.*53:31-34
- 六、Chen YA, Chi WC, Huang LY, Chen YC, Cheng KT, Huang TL, Lin CY, Huang HJ, et al. (2014) Transcriptome profiling and physiological studies reveal a major role for aromatic amino acids in mercury stress tolerance in rice seedlings. *PLoS ONE* 9(5):e95163
- 七、Chen YA, Chi WC, Huang TL, Lin CY, Quynh Nguyeh TT, et al. (2012) Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots. *Plant Physiology Biochem* 55:23-32.
- 八、Cheng EL, Cheng YA, Cheng LM, Liu ZH. (2002)Effect of cooper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativa*. *Plant Physiol Biochem* 40:439-444
- 九、Chou CH, Huang YC, Liu ZH. (2010) Peroxidase genes differential response to auxin during the formation of adventitious roots in soybean hypocotyls. *Plant Growth Regul.* 60:151-161
- 十、Cho, U. & Park, J. 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings.*Plant Sci*, 156, 1-9.
- 十一、Chuan CL, Ching HK, et al. (1999) NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant and Soil* 216: 147-153.
- 十二、DalCorse G, Farinati SM, Furini A, et al. (2008) How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J. Integ. Plant Bot.* 50:1268-1280
- 十三、Huang LY, Huang HJ, et al. (2014) Transcriptome analysis of rice root response to environmental stress.
- 十四、Lin CC, Cheng LM, Liu ZH. (2005) Rapid effect of cooper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Sci.* 168:855-861
- 十五、Liu BY, Lin YR, et al. (2012) The recent research and application of drought stress in rice.

- 十六、Pitzschke A, Hirt H, et al. (2006) Mitogen-Activated Protein Kinase and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiol.* 141:351-356
- 十七、Romero-Puertas MC, Rodriguez-Serrano FJ, Corpas M, Gomez LA de Rio, Sandalio LM, et al. (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves. *Plant Cell Environ.* 27:1122-1134
- 十八、Santi di Toppi L, Gobbreilli R, et al. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41:105-130
- 十九、Saul Fraire-Velazquez, Victor Emmanuel Balderas-Hernandez, et al. (2013) Abiotic stress in plants and metabolic stress. INTECH
- 二十、Schutzendubel A, Schwan P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A, et al. (2001) Cadmium -induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scot Pine roots. *Plants Physiol.* 127:887-898
- 二十一、Shiyab, S., Chen, J., Han, F. X., Monts, D. L., Matta, F. B., Gu, M., Su, Y. & Masad, M. A. 2009. Mercury-induced oxidative stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Environ Toxicol*, 24, 462-471.
- 二十二、Tomas L, Durcekova K, Haluskova L, Huttova J, et al. (2007) Rhizosphere localized cationic peroxidase from barley roots is strongly activated by cadmium and correlated with roots inhibition. *Chemosphere* 66: 1292-1300
- 二十三、Valdir Augusto Neves, et al. (2002) Ionically bound peroxidase from peach fruit. *Brazilian Archives Of Biology And Technology* 45: 7-15.
- 二十四、Yang YJ, Cheng LM, Liu ZH. (2007) Rapid effect of cadmium on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Sci.* 172:632-639
- 二十五、Yeh CM, Chein PS, Huang HJ, et al. (2007) Distinct signaling pathway for induction MAP kinase activities by cadmium and copper in rice. *J. Exp. Bot.* 58:659-671
- 二十六、Zhou, Z. S., Huang, S. Q., Guo, K., Mehta, S. K., Zhang, P. C. & Yang, Z. M. 2007. Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. *J Inorg Biochem*, 101, 1-9.
- 二十七、Zhou, Z. S., Wang, S. J. & Yang, Z. M. 2008. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere*, 70, 1500-1509.

## 附 錄

### 一、各實驗原理

#### (一)測量水稻根長度差異

當植物暴露於逆境下或衰老時，會產生活性氧族（Reaction Oxygen Species），包含  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $OH^\cdot$  此三類。這些活性氧族會間接或直接的攻擊植物，使細胞內的分子受到傷害，影響其根長度的差異。

#### (二)脯氨酸(Proline)濃度測定

當植物遭受逆境，造成生理性缺水時，植物會通常累積大量的脯氨酸來調節細胞滲透，因此植物體內脯氨酸的含量可反應植物體的含水分狀況可做為植物逆境的參考指標。在酸性條件下，印三酮(Ninhydrin)與脯氨酸反應，生成紅色化合物，用分光光度計測得之吸光值與脯氨酸含量成正比，此外具有專一性。

#### (三)總蛋白質定量 Bio-Rad DC Protein Assay

因蛋白質具還原力的特性，A 試劑(Alkaline copper tartrate solution)中的 copper 會和其作用，特別是在 tyrosine 和 tryptophan 這兩種胺基酸上。其會使 B 試劑中的 Folin reagent 失去 1~3 個氧原子，產生的還原產物呈現藍色，其最大吸光值在 750nm。故以測取其樣本加入 A、B 試劑後在波長 750nm 下的吸光值，以計算樣本內所含蛋白質量，吸光值越高，蛋白質濃度也越高。




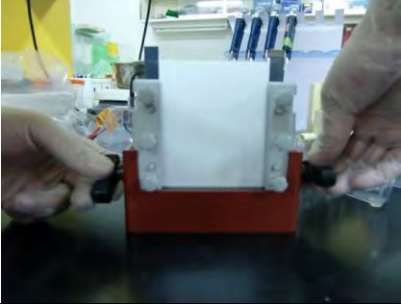
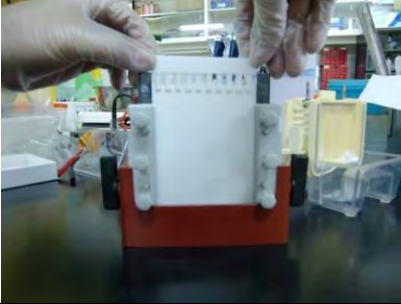
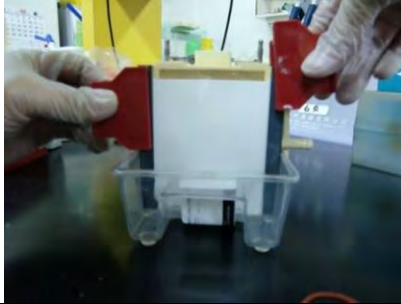
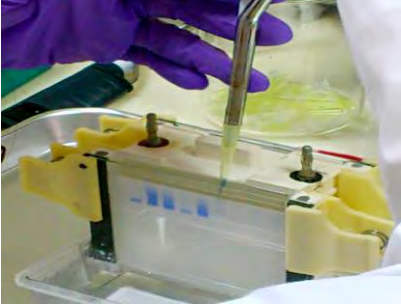

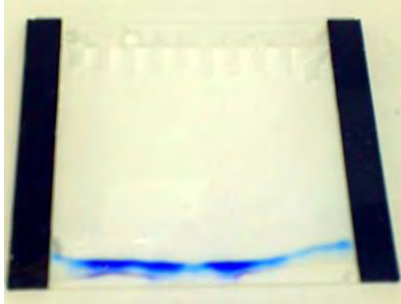
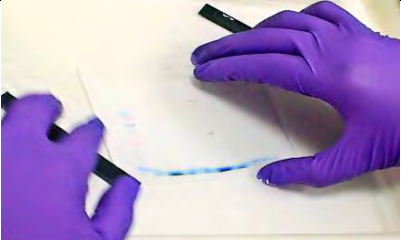
#### (四)過氧化酶 Peroxidase (POD)活性測定

過氧化酶 Peroxidase (POD)為植物體內普遍存在、活性較高的一種酶，能夠使過氧化氫分解為水和氧氣，反應於植物的抗氧化機制。並可使愈創木酚(Guaiacol)氧化，生成褐色物質。用分光光度計測得之吸光值與 POD 含量成正比。

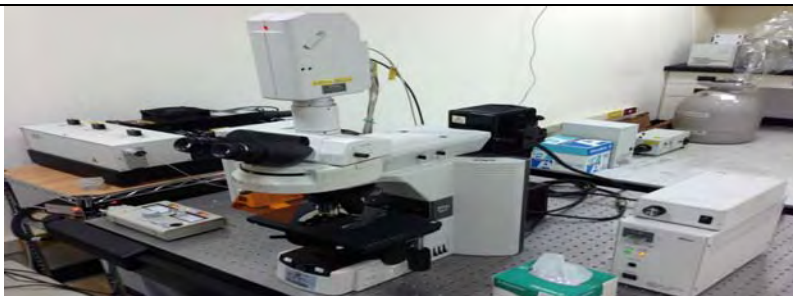
#### (五)超氧化歧異酶 Superoxide Dismutase (SOD)活性測定

本實驗依據超氧歧異酶抑制淡藍四坐(NBT)在光照下的還原作用來確定超氧化歧異酶活性大小。在此反應系統中，核黃素光照產生  $O_2^-$ ，NBT 在光照下被  $O_2^-$  還原為藍甲鑷(藍色)。產物在 560nm 處有最大吸光值。而 SOD 可清除  $O_2^-$  進而抑制藍甲鑷的形成，於是光還原反應後，反應液藍色越深，表示超氧化歧異酶活性愈低，反之則愈高。一個酵素活性單位定義為將 NBT 的還原抑制到對照一半(50%)時所需的酵素量，並據此計算出超氧化歧異酶活性大小。

二、實驗相關照片

POD、SOD 聚丙烯醯胺凝膠電泳		
		
一、組合鋁片、spacer、玻片	二、放入固定夾中	三、檢查是否對齊
		
四、放上鑄膠底座並用黑色旋鈕卡緊。	五、注入下膠再注入上膠並放入孔梳。	六、凝膠後放上電泳槽並以紅色固定夾夾住，並加入 running buffer。
		
七、注入各樣品	八、電泳進行	九、電泳完成後卸下膠片。
	<b>隨後進行 <u>POD、SOD 活性染色</u></b>	
十、電泳完成後卸下膠片。		

共軛焦顯微鏡



### 三、ICP 送驗報告



ABM 忠、信、實、廉、勤、誠、服務

**檢測報告**  
**ANALYSIS REPORT**

**申請單編號 Report Number :** 14-0819-001-001      **收樣日期 Sample Received :** 2014/8/19 上午 10:43:00  
**申請單位 Applicant :** 國立中山大學生科系      **樣品名稱 Sample Name :** TNI-Control-1  
**聯絡電話 Tel :** 07-5252000#3604      **產品資訊 Sample Info :** TNI-Control-1  
**傳真電話 Fax :**      **報告日期 Date Issued :** 2014/08/27  
**申請單位地址 Applicant Address :** 804 高雄市鼓山區蓮海路 70 號

(第 1 頁 / 共 1 頁)

檢測項目 Item(s)	結果 Result(s)	定置極限	檢測方法 Method(s)
汞 (Hg) Mercury	0.73 ppm	0.1 ppm	衛生福利部 102.09.06 部 授食字第 1021950329 號 公告修正重金屬檢驗方 法總則

---以下空白---

備註：檢驗報告僅就委託檢驗者之委託事項提供檢驗結果。至若本產品之合法性，仍應由主管機關依法判斷。



報告簽署人/實驗室主管

QM14-01

附註：一、本報告所用樣品與名稱係由委託單位提供，實驗室僅負責檢測分析。二、檢驗結果僅對檢測樣品有效。三、本報告記載事項僅作為參考資料，不得作為任何商業推銷及訴訟用。四、本報告經塗改者無效。五、本報告內容未經授權不得部分複製，但完整複製除外。六、結果檢測值小於定置極限，以 N.D. (未檢出 / Non Detected) 表示。  
 景博科技股份有限公司 91252 屏東縣內埔鄉內埔工業區維新路 22 號 電話 08-779-9310 傳真 08-779-9598 www.abmlab.com



ABM 忠、信、實、廉、勤、誠、服務

**檢測報告**  
**ANALYSIS REPORT**

**申請單編號 Report Number :** 14-0819-001-002      **收樣日期 Sample Received :** 2014/8/19 上午 10:43:00  
**申請單位 Applicant :** 國立中山大學生科系      **樣品名稱 Sample Name :** TNI-Control-2  
**聯絡電話 Tel :** 07-5252000#3604      **產品資訊 Sample Info :** TNI-Control-2  
**傳真電話 Fax :**      **報告日期 Date Issued :** 2014/08/27  
**申請單位地址 Applicant Address :** 804 高雄市鼓山區蓮海路 70 號

(第 1 頁 / 共 1 頁)

檢測項目 Item(s)	結果 Result(s)	定置極限	檢測方法 Method(s)
汞 (Hg) Mercury	0.77 ppm	0.1 ppm	衛生福利部 102.09.06 部 授食字第 1021950329 號 公告修正重金屬檢驗方 法總則

---以下空白---

備註：檢驗報告僅就委託檢驗者之委託事項提供檢驗結果。至若本產品之合法性，仍應由主管機關依法判斷。



報告簽署人/實驗室主管

QM14-01

附註：一、本報告所用樣品與名稱係由委託單位提供，實驗室僅負責檢測分析。二、檢驗結果僅對檢測樣品有效。三、本報告記載事項僅作為參考資料，不得作為任何商業推銷及訴訟用。四、本報告經塗改者無效。五、本報告內容未經授權不得部分複製，但完整複製除外。六、結果檢測值小於定置極限，以 N.D. (未檢出 / Non Detected) 表示。  
 景博科技股份有限公司 91252 屏東縣內埔鄉內埔工業區維新路 22 號 電話 08-779-9310 傳真 08-779-9598 www.abmlab.com



ABM 忠、信、實、廉、勤、誠、服務

**檢測報告**  
**ANALYSIS REPORT**

**申請單編號 Report Number :** 14-0819-001-003      **收樣日期 Sample Received :** 2014/8/19 上午 10:43:00  
**申請單位 Applicant :** 國立中山大學生科系      **樣品名稱 Sample Name :** TNI-Hg-1  
**聯絡電話 Tel :** 07-5252000#3604      **產品資訊 Sample Info :** TNI-Hg-1  
**傳真電話 Fax :**      **報告日期 Date Issued :** 2014/08/27  
**申請單位地址 Applicant Address :** 804 高雄市鼓山區蓮海路 70 號

(第 1 頁 / 共 1 頁)

檢測項目 Item(s)	結果 Result(s)	定置極限	檢測方法 Method(s)
汞 (Hg) Mercury	636.4 ppm	0.1 ppm	衛生福利部 102.09.06 部 授食字第 1021950329 號 公告修正重金屬檢驗方 法總則

---以下空白---

備註：檢驗報告僅就委託檢驗者之委託事項提供檢驗結果。至若本產品之合法性，仍應由主管機關依法判斷。



報告簽署人/實驗室主管

QM14-01

附註：一、本報告所用樣品與名稱係由委託單位提供，實驗室僅負責檢測分析。二、檢驗結果僅對檢測樣品有效。三、本報告記載事項僅作為參考資料，不得作為任何商業推銷及訴訟用。四、本報告經塗改者無效。五、本報告內容未經授權不得部分複製，但完整複製除外。六、結果檢測值小於定置極限，以 N.D. (未檢出 / Non Detected) 表示。  
 景博科技股份有限公司 91252 屏東縣內埔鄉內埔工業區維新路 22 號 電話 08-779-9310 傳真 08-779-9598 www.abmlab.com



ABM 忠、信、實、廉、勤、誠、服務

**檢測報告**  
**ANALYSIS REPORT**

**申請單編號 Report Number :** 14-0819-001-004      **收樣日期 Sample Received :** 2014/8/19 上午 10:43:00  
**申請單位 Applicant :** 國立中山大學生科系      **樣品名稱 Sample Name :** TNI-Hg-2  
**聯絡電話 Tel :** 07-5252000#3604      **產品資訊 Sample Info :** TNI-Hg-2  
**傳真電話 Fax :**      **報告日期 Date Issued :** 2014/08/27  
**申請單位地址 Applicant Address :** 804 高雄市鼓山區蓮海路 70 號

(第 1 頁 / 共 1 頁)

檢測項目 Item(s)	結果 Result(s)	定置極限	檢測方法 Method(s)
汞 (Hg) Mercury	583.7 ppm	0.1 ppm	衛生福利部 102.09.06 部 授食字第 1021950329 號 公告修正重金屬檢驗方 法總則

---以下空白---

備註：檢驗報告僅就委託檢驗者之委託事項提供檢驗結果。至若本產品之合法性，仍應由主管機關依法判斷。



報告簽署人/實驗室主管

QM14-01

附註：一、本報告所用樣品與名稱係由委託單位提供，實驗室僅負責檢測分析。二、檢驗結果僅對檢測樣品有效。三、本報告記載事項僅作為參考資料，不得作為任何商業推銷及訴訟用。四、本報告經塗改者無效。五、本報告內容未經授權不得部分複製，但完整複製除外。六、結果檢測值小於定置極限，以 N.D. (未檢出 / Non Detected) 表示。  
 景博科技股份有限公司 91252 屏東縣內埔鄉內埔工業區維新路 22 號 電話 08-779-9310 傳真 08-779-9598 www.abmlab.com



檢測報告  
ANALYSIS REPORT

申請單編號 Report Number : 14-0819-001-005  
 收樣日期 Sample Received : 2014/8/19 上午 10:43:00  
 申請單位 Applicant : 國立中山大學生物系  
 樣品名稱 Sample Name : TNG67-Control-1  
 聯絡電話 Tel : 07-5252000#3604  
 產品資訊 Sample Info : TNG67-Control-1  
 傳真電話 Fax :  
 報告日期 Date Issued : 2014/08/27  
 申請單位地址 Applicant Address : 804 高雄市鼓山區蓮海路 70 號

(第 1 頁, 共 1 頁)

檢測項目 Item(s)	結果 Result(s)	定置極限	檢測方法 Method(s)
汞 (Hg) Mercury	0.29 ppm	0.1 ppm	衛生福利部 102.09.06 部授食字第 1021950329 號公告修正重金屬檢驗方法總則

~~~以下空白~~~

備註：檢驗報告僅就委託檢驗者之委託事項提供檢驗結果，至於本產品之合法性，仍應由主管機關依法判斷。

報告簽署人/實驗室主管




QM14-01

附註：一、本報告所用樣品名稱係由委託單位提供，實驗室僅負責檢測分析。二、檢測結果僅對檢驗樣品有效。三、本報告記載事項僅作為參考資料，不得作為任何商業用途及訴訟用。四、本報告給出改善無效。五、本報告內容未經授權不得部分複製，但完整複製除外。六、結果檢測值小於檢測極限，以 N.D. (未檢出; Non Detected) 表示。

景博科技股份有限公司 91252 屏東縣內埔鄉內埔工業區鎮興路22號 電話 06-779-9370 傳真 06-779-9598 www.lababm.com

檢測報告  
ANALYSIS REPORT

申請單編號 Report Number : 14-0819-001-006  
 收樣日期 Sample Received : 2014/8/19 上午 10:43:00  
 申請單位 Applicant : 國立中山大學生物系  
 樣品名稱 Sample Name : TNG67-Control-2  
 聯絡電話 Tel : 07-5252000#3604  
 產品資訊 Sample Info : TNG67-Control-2  
 傳真電話 Fax :  
 報告日期 Date Issued : 2014/08/27  
 申請單位地址 Applicant Address : 804 高雄市鼓山區蓮海路 70 號

(第 1 頁, 共 1 頁)

| 檢測項目 Item(s)   | 結果 Result(s) | 定置極限    | 檢測方法 Method(s)                                  |
|----------------|--------------|---------|-------------------------------------------------|
| 汞 (Hg) Mercury | 0.22 ppm     | 0.1 ppm | 衛生福利部 102.09.06 部授食字第 1021950329 號公告修正重金屬檢驗方法總則 |

~~~以下空白~~~

備註：檢驗報告僅就委託檢驗者之委託事項提供檢驗結果，至於本產品之合法性，仍應由主管機關依法判斷。

報告簽署人/實驗室主管




QM14-01

附註：一、本報告所用樣品名稱係由委託單位提供，實驗室僅負責檢測分析。二、檢測結果僅對檢驗樣品有效。三、本報告記載事項僅作為參考資料，不得作為任何商業用途及訴訟用。四、本報告給出改善無效。五、本報告內容未經授權不得部分複製，但完整複製除外。六、結果檢測值小於檢測極限，以 N.D. (未檢出; Non Detected) 表示。

景博科技股份有限公司 91252 屏東縣內埔鄉內埔工業區鎮興路22號 電話 06-779-9370 傳真 06-779-9598 www.lababm.com

檢測報告  
ANALYSIS REPORT

申請單編號 Report Number : 14-0819-001-007  
 收樣日期 Sample Received : 2014/8/19 上午 10:43:00  
 申請單位 Applicant : 國立中山大學生物系  
 樣品名稱 Sample Name : TNG-Hg-1  
 聯絡電話 Tel : 07-5252000#3604  
 產品資訊 Sample Info : TNG-Hg-1  
 傳真電話 Fax :  
 報告日期 Date Issued : 2014/08/27  
 申請單位地址 Applicant Address : 804 高雄市鼓山區蓮海路 70 號

(第 1 頁, 共 1 頁)

| 檢測項目 Item(s)   | 結果 Result(s) | 定置極限    | 檢測方法 Method(s)                                  |
|----------------|--------------|---------|---|
| 汞 (Hg) Mercury | 752.6 ppm    | 0.1 ppm | 衛生福利部 102.09.06 部授食字第 1021950329 號公告修正重金屬檢驗方法總則 |

~~~以下空白~~~

備註：檢驗報告僅就委託檢驗者之委託事項提供檢驗結果，至於本產品之合法性，仍應由主管機關依法判斷。

報告簽署人/實驗室主管




QM14-01

附註：一、本報告所用樣品與名稱係由委託單位提供，實驗室僅負責檢測分析。二、檢測結果僅對檢驗樣品有效。三、本報告記載事項僅作為參考資料，不得作為任何商業用途及訴訟用。四、本報告給出改善無效。五、本報告內容未經授權不得部分複製，但完整複製除外。六、結果檢測值小於檢測極限，以 N.D. (未檢出; Non Detected) 表示。

景博科技股份有限公司 91252 屏東縣內埔鄉內埔工業區鎮興路22號 電話 06-779-9370 傳真 06-779-9598 www.lababm.com

檢測報告  
ANALYSIS REPORT

申請單編號 Report Number : 14-0819-001-008  
 收樣日期 Sample Received : 2014/8/19 上午 10:43:00  
 申請單位 Applicant : 國立中山大學生物系  
 樣品名稱 Sample Name : TNG-Hg-2  
 聯絡電話 Tel : 07-5252000#3604  
 產品資訊 Sample Info : TNG-Hg-2  
 傳真電話 Fax :  
 報告日期 Date Issued : 2014/08/27  
 申請單位地址 Applicant Address : 804 高雄市鼓山區蓮海路 70 號

(第 1 頁, 共 1 頁)

| 檢測項目 Item(s)   | 結果 Result(s) | 定置極限    | 檢測方法 Method(s)                                  |
|----------------|--------------|---------|-------------------------------------------------|
| 汞 (Hg) Mercury | 732.3 ppm    | 0.1 ppm | 衛生福利部 102.09.06 部授食字第 1021950329 號公告修正重金屬檢驗方法總則 |

~~~以下空白~~~

備註：檢驗報告僅就委託檢驗者之委託事項提供檢驗結果，至於本產品之合法性，仍應由主管機關依法判斷。

報告簽署人/實驗室主管




QM14-01

附註：一、本報告所用樣品與名稱係由委託單位提供，實驗室僅負責檢測分析。二、檢測結果僅對檢驗樣品有效。三、本報告記載事項僅作為參考資料，不得作為任何商業用途及訴訟用。四、本報告給出改善無效。五、本報告內容未經授權不得部分複製，但完整複製除外。六、結果檢測值小於檢測極限，以 N.D. (未檢出; Non Detected) 表示。

景博科技股份有限公司 91252 屏東縣內埔鄉內埔工業區鎮興路22號 電話 06-779-9370 傳真 06-779-9598 www.lababm.com

重金屬-汞之參考物質

FAPAS® Report 07213

**SUMMARY**

1. The test material for FAPAS® proficiency test 07213 was dispatched in May 2014. Each participant received a canned crab meat test material to be analysed for total arsenic, inorganic arsenic, cadmium, lead, and total mercury.

2. An assigned value ( $x_a$ ) was determined for each analyte and in conjunction with the standard deviation for proficiency ( $s_p$ ) was used to calculate a z-score for each result. However, for inorganic arsenic no assigned value or z-scores could be set due to the wide spread of results.

3. Results for this proficiency test are summarised as follows:

| analyte       | assigned value, $x_a$ | number of scores $ z  < 2$ | total number of scores | % $ z  < 2$ |
|---------------|-----------------------|----------------------------|------------------------|-------------|
| total arsenic | 13.9 mg/kg            | 61                         | 65                     | 93          |
| cadmium       | 0.53 mg/kg            | 55                         | 65                     | 85          |
| lead          | 82.1 µg/kg            | 47                         | 65                     | 72          |
| total mercury | 93.5 µg/kg            | 64                         | 67                     | 96          |

4. Surplus test materials are available for sale, see APPENDIX II.

Page 3 of 31

Hg 測定之 Raw Data

| Date/ File   | Acq. Date/Time    | Type   | Level            | Sample Name | Cenr. [Inp.] | Cenr. [Std.] | 103 Rn. [Std.] | [He]       |
|--------------|-------------------|--------|------------------|-------------|--------------|--------------|----------------|------------|
| 2.d          | 8/23/2014 2:11 PM | Calibr | 2 (U)ppb         |             | 0.87549706   | 2.269413     |                | 0.730719   |
| 3.f          | 8/23/2014 2:13 PM | CS&D   | 3 (ppb)          |             | 0.89547906   | 2.625408     |                | 0.866606   |
| 4.d          | 8/23/2014 2:15 PM | CS&D   | 4 (ppb)          |             | 3.14413720   | 5.154052     |                | 0.17851    |
| 5.d          | 8/23/2014 2:17 PM | CS&D   | 5 (ppb)          |             | 5.01622520   | 3.1180610    |                | 25943.017  |
| 6.d          | 8/23/2014 2:20 PM | CS&D   | 6 (ppb)          |             | 7.45982886   | 3.300173     |                | 20596.05   |
| 7.d          | 8/23/2014 2:22 PM | CS&D   | 7 (ppb)          |             | 9.9252426    | 0.8795443    |                | 252481.409 |
| 13.d         | 8/23/2014 2:26 PM | Sample | WASH             |             | <0.000       | N/A          |                | 91.983153  |
| 15.d         | 8/23/2014 2:28 PM | Sample | ICV-6PPB         |             | 6.00738916   | 1.744615     |                | 296807.58  |
| 1468220001.d | 8/23/2014 2:30 PM | Sample | RM               |             | 2.03932413   | 2.412953     |                | 831690.875 |
| 1468220002.d | 8/23/2014 2:32 PM | Sample | RM               |             | 1.67881818   | 7.787203     |                | 365786.972 |
| 1468220003.d | 8/23/2014 2:35 PM | Sample | RM-Control-1     |             | 1.79691658   | 1.7629633    |                | 37640.243  |
| 1468220004.d | 8/23/2014 2:37 PM | Sample | RM-Control-2     |             | 3.77240422   | 0.4887228    |                | 338745.057 |
| 1468220005.d | 8/23/2014 2:39 PM | Sample | RM-Hg-1-5000xdat |             | 3.9318993    | 0.7307085    |                | 334219.953 |
| 1468220006.d | 8/23/2014 2:41 PM | Sample | RM-Hg-2-5000xdat |             | 0.88767842   | 2.6256109    |                | 38961.887  |
| 1468220007.d | 8/23/2014 2:44 PM | Sample | RM-Hg-Control-1  |             | 0.95847681   | 8.1772668    |                | 406560.79  |
| 1468220008.d | 8/23/2014 2:46 PM | Sample | RM-Hg-Control-2  |             | 4.49747262   | 0.2492242    |                | 306884.057 |
| 1468220009.d | 8/23/2014 2:48 PM | Sample | RM-Hg-1-5000xdat |             | 4.48737825   | 0.7208872    |                | 371801.08  |
| 1468220010.d | 8/23/2014 2:57 PM | Sample | RM-Hg-2-5000xdat |             | 5.7850019    | 2.4137049    |                | 412012.753 |
| 1468220012.d | 8/23/2014 2:57 PM | Sample | CCV-6PPB         |             |              |              |                | 1853184    |

## 【評語】 040702

探討水稻在汞逆境處理下的根部汞累積、ROS 生成及其生長情形，並進行木質素、脯氨酸及相對含水量的測定用水稻作為清除汞的材料有待商榷，如果利用不可食用的植物將較為安全。