

# 台灣二〇〇二年國際科學展覽會

科 別：植物學

作品名稱：聚球藻 R F - 1 品系生物時鐘之特性

得獎獎項：植物學科第二名  
新加坡第廿五屆青年科學節

學 校：國立高雄師範大學附屬高級中學

作 者：嚴婉禎

## 摘要

我們成功的用溶氧計偵測到了聚球藻 RF-1 在 28°C 下光合作用的概日韻律。和傳統的研究方法比起來，這個方法具有連續偵測的優點，減少因不斷取樣所造成的影響。此實驗可觀察到聚球藻 RF-1 溶氧量之變化圖與一般藻類（如單殼縫藻）不同。在光/暗條件下 RF-1 之溶氧量的增加與減少均呈週期性變化，而且此變化現象在進入連續照光後仍然可以維持兩個循環以上，這些結果顯示以溶氧計連續偵測聚球藻 RF-1 之概日韻律是可行的，而且所得到的變化圖形遠比傳統方法（於不同時間取樣）所得者自然。本實驗同時發現含聚球藻之培養液的溫度，在進入黑暗週期時會有明顯的上升，由於其變化程度比其他藻類明顯，如加以探討應有助於對此藻以及其韻律特性之瞭解。

## **Abstract**

We successfully detected the photosynthesis circadian rhythm of the prokaryote *Synechococcus* RF-1 under 28°C by a DO (Dissolved-Oxygen) meter. The advantage of this method, comparing with the traditional methods, is that it can detect signals continuously, reduce the influence of discrete sampling. The DO curves of the *Synechococcus* RF-1 are different from that of other algae. Under Light/Dark conditions, the DO values of RF-1 increased and decreased periodically. The periodic phenomena progressed over two cycles under constant lighting conditions. These results revealed the feasibility of using DO meter to continuous detect the circadian rhythm of the *Synechococcus* RF-1. The detected DO curves looked more natural than those obtained in the traditional discrete-sampling method. We also found that the temperature of the culture increased in dark cycle. Since the variation is clearer than that of other algae, further investigation will benefit the understanding of the *Synechococcus* RF-1 and its circadian rhythm.

## 致 謝 詞

隨著參與科展研究的時間越來越長、越來越深入，所需要的支援也越來越多，所需要感謝的人也越來越多。這段期間，承蒙許多師長盡心指導及協助，才有如今的成果。首先感謝指導我的中研院植物所黃檀溪教授，黃教授在這次的研究上提供我許多構想及相關知識，並不厭其煩的與我討論實驗上的問題等等；並在今年暑假期間，我曾到黃教授的實驗室學習技術，也要同時感謝實驗室的學長與學姊對我的照顧，幫我解決難題。我非常感謝他們！

我要感謝我的另一位指導教授：高師大生物所的廖麗貞教授。整個實驗系統的架設與實驗操作，都是在廖教授的實驗室進行，廖教授並十分熱心的提供我這些儀器，協助實驗的進行，以及實驗室的各位學長姊也不時給我建議，帶領我操作一些實驗，我時常打擾他們、借用設備，非常感謝！

謝謝我在學校的兩位指導老師，蕭淑娟老師及陳桂芳老師，她們在整的研究過程中，指導我進行實驗、幫我解決疑難雜症、幫我尋求各方面的研究資源並時時給我鼓勵，才能讓實驗順利進展。十分地感謝她們。

另外，謝謝中山大學的王維賢教授和高師大生科所的陳士賢教授借我使用 DO meter。也要謝謝台灣師大生物系周雪美教授和我們討論實驗結果，給了我們很多啟示。

謝謝爸爸在整個研究中辛苦的協助我，謝謝媽媽、好朋友們的鼓勵。以及很多未能在這裡提及的人，我知道若沒有你們，就不會有這次研究的成果。謝謝大家！

## 第一節 簡介

我們研究水生植物之光合作用的生物韻律已經有三年的時間，經過了兩年幼稚的摸索，終於在今年獲得黃檀溪教授的指導，學習正統的觀念和正確的研究方法。

過去兩年中我們都是用溶氧計（Dissolved Oxygen Meter, 簡稱 DO Meter）偵測培養液中溶氧量隨時間的變化，藉以觀察植物的生物韻律。溶氧計是生態學研究中常用的儀器，主要用途是測量水體的溶氧量，以了解生態變化的情況，最為人所熟知的應用就是監測河川的優氧化。但是，傳統生物學的生物韻律研究中，並不採用溶氧計作為研究的工具。我們的研究目標是 --- 探討用溶氧計偵測聚球藻 RF-1 之概日韻律的可行性，並了解這個方法的優缺點。

生物學家所稱的生物時鐘（Biological Clock）或內生性韻律（Endogenous Rhythm）是用來表示 --- 生物的“內生機制變化”表現在“行為上、生理上或生物化學上”的現象，且可以在“環境維持不變”的情況下，依然維持“週期性變化”的現象之總稱。

隨著生物種類之不同，生物時鐘之週期也會不同，但大多數生物時鐘之週期與日夜變化一致，稱為概日韻律（Circadian Rhythm）。它有四個主要的特點：

1. 需要某種環境因子加以設定。
2. 韻律設定之後，於恆定環境下其韻律可以維持一段時間。
3. 韻律週期之長短受溫度之影響不顯著。
4. 可以重新設定。

概日韻律十分廣泛地存在於真核生物中 --- 動物、植物或真核微生物等。早期在真核生物中對概日韻律的研究，包括有 *Neurospora* 孢子的形成、*Gonyaulax* 的生物體發光、果蠅 *Drosophila* 的羽化活動、葉片的運動、植物的光合作用、生物體體溫變化、賀爾蒙與酵素的濃度變化及人體對藥物的敏感性等等。

許多科學家嘗試研究生物時鐘是否存在於原核生物中，但由於許多對光合細菌、大腸桿菌、適鹽生物或藍綠藻之生物時鐘的研究並沒有成功，一般都認為原核生物不會產生概日韻律的現象。直到 1986 年中央研究院植物所黃檀溪教授的實驗室發現 --- 藍綠藻品系之聚球藻 RF-1 的固氮酵素活動具有內生之週期韻律現象，此後在 RF-1 的細胞分裂、胺基酸吸收或是 cop23 蛋白的合成之研究中，皆發現了生物時鐘的現象，從此開啟了原核生物之生物時鐘的研究領域。

過去科學家認為生物時鐘僅存在於真核生物中，故推論生物時鐘之存在可能需要某種特別的細胞結構。在證實了原核生物中也有生物時鐘存在之後，由於原核生物的細胞構造、基因表現及訊息傳導運作都比真核生物單純，立即成為探討生物時鐘之起源及其調控機制的最好的材料。

除了 RF-1 之外，生物學家亦陸續發現某些原核生物也具有生物時鐘的表現：

1. *Synechococcus* BG 43511. 這是一種生長速度很快的固氮海生藍綠藻。經過預先以暗週期調節之後，可將其培養過程中的的細胞分裂循環週期同步化。而其細胞分裂、固氮酵素的活性和光合

作用，在用 12 h L/12 h D（亦即 12 小時光照／12 小時黑暗）設定後，會表現出大約 24 小時的概日韻律。

2. *Cyanothece* BH63 和 BH68 (ATCC51142). 它們在形態上或生理構造上都與 *Synechococcus* BG43511 很相似，是由 Sherman 實驗室從潮間帶的沙洲中所分離出來的。當 *Cyanothece* ATCC 51142 在 L/D-Cycle (Light/Dark-Cycle：光照/黑暗-週期) 下培養時，其固氮作用會發生在 D-Cycle。固氮酵素的活動韻律會一直持續到培養條件轉變成 L/L-Cycle 之後。
3. *Synechococcus* WH7803. 這是一種紅色的海生藍綠藻。1978 年由 L. Brand 所分離發現。這種生物不會進行固氮作用，但在細胞分裂過程中會產生概日韻律。
4. 1986 年 Schaefer 和 Golden 在研究光誘導基因在 *Syrnchococcus* pcc 7942 的表現過程中，發現在 photosystem 中合成蛋白 D<sub>1</sub> 的 psbA 基因有韻律的表現。
5. 1993 年 Kondo et al. 建造了一個包含有 psb 基因啟動子和細菌 *Vibrio barveyi* 的螢光基因的質體。將其導入藍綠藻 AmC149 中，其螢光基因在生物體發光過程中會表現概日韻律的現象。利用高敏感度的光子計數相機可監測其單一群體的生物發光現象。

生物時鐘在生物體內扮演重要的一環，控制生物體對環境的適應情形，若生物時鐘有失調現象，對生物體生活上的影響有各種各樣的嚴重性。例如 --- 每個人都有過失眠的痛苦經驗，就是個很好的例子。而生物時鐘的研究，除了是生物學學術上的基礎研究之外，在醫學應用上也有其重要性。

在這份報告接下來的各節中，我們會先在第二節說明實驗樣品 RF-1 的生理性質以及目前一些有關 RF-1 的固氮酵素活動之概日韻律的研究結果，其中包括 --- 光強度、光的波長、溫度、Cycle 時間的長度等各種因素和建立概日韻律之間的關係。

第三節分為四個部份，分別詳細說明我們實驗系統的組成、溶氧計之工作原理、實驗樣品製備以及實驗步驟。

第四節是 RF-1 在 28 °C 之概日韻律實驗結果及討論，文中會仔細地討論 L/D-Cycle 和 L/L-Cycle 之溶氧量及溫度變化曲線，並且和去年單殼縫藻的實驗結果對照，嘗試分析造成溶氧量曲線變化的原因，由其中探討概日韻律存在的徵兆。我們還將 L/L-Cycle 曲線調整後重新表現，藉以凸顯概日韻律訊號的特點及其含意。在討論的過程中，也可以發掘出設計進一步實驗的構想。最後在第五節中報告我們的結論。

## 第二節 RF-1 之性質及概日韻律研究

聚球藻 RF-1 (電腦編號 pcc8801) 品系是分離自本省水田中之單胞固氮藍綠藻，RF 表示來自 rice field。其分類地位應屬於色球藻目 (*Chroococcales*)，色球藻科 (*Chroococcaeae*)，聚球藻屬 (*Synechococcus*)。

RF-1 為單細胞個體、桿狀、具類囊膜、無鞘、採二分法繁殖，平均大小在  $3.8 \times 3.0 \mu\text{m}$  左右。在結構上，它包含了一些不尋常的葡萄糖細粒，使它的大小變化在  $0.1$  到  $0.4 \mu\text{m}$  之間。RF-1 是一種光自營生物，當它在  $28^\circ\text{C}$  的 BG-11<sub>0</sub>(無氮源)中培養、並使用  $35 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  的白螢光燈給予光照時，一代的生長週期約為三天。在培養基 BG-11 中，生理上正常的溫度範圍為  $20^\circ\text{C} \sim 42^\circ\text{C}$ ；而在無氮的 BG-11 中，則是  $20^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ 。最適合生長之環境光強度為  $2000 \sim 3000 \text{ Lux}$ 。RF-1 的細胞可以在 "suspended state" (即連續黑暗(D/D)的環境下) 維持生長超過兩星期。

各類生物所發現之固氮酵素均非常怕  $\text{O}_2$ ，因此固氮生物通常需要有保護其固氮酵素不受  $\text{O}_2$  破壞的機制。一般的藍綠藻是以細胞生理分工之方式來解決。但單胞固氮藍綠藻由於只有一個細胞，便無法以細胞分工之方式解決固氮酵素與  $\text{O}_2$  的問題。黃檀溪教授在研究 RF-1 之固氮酵素的活動時，發現它具有概日韻律之表現，並進一步檢驗了生物時鐘的四個特性，這是首次發現原核生物也會具有與真核生物相同之週期韻律。

在持續光照下(L/L)，RF-1 會持續不斷的進行固氮作用。但當 L/L-Cycle 轉換到 L/D-Cycle 時，它的固氮作用主要是在 D-Cycle 進行。當環境從 20 h L/4 h D (20 個小時光照/4 個小時黑暗) 轉換到 6 h L/18 h D 後，RF-1 中固氮酵素的活動即可建立概日韻律。概日韻律建立的過程是逐步漸進的，它會受誘導過程的強烈程度和生物體本身生理構造的情況所影響。RF-1 中的概日韻律可以由 L/D-Cycle 誘發，例如：將原本的在 L/L 狀態下的樣品放入黑暗八個小時，即可建立概日韻律。要有效建立樣品的韻律，必須要連續進行一次以上的 L/D Cycle。

### 光強度和建立概日韻律的關係

週期性地改變光源的強度，例如：連續進行三個 12 h 3000 lx / 12h 1000 lx 的光照週期，也可以有效的建立 RF-1 的概日韻律。而在 L/D-Cycle 進行的過程中，短暫地（例如 30 分鐘）終止黑暗期或光照期，對固氮酵素的活動不會有太大的影響。

### 光的波長和建立概日韻律的關係

將一個在連續波 680 nm 紅光 (10 nm half-band width) 中放置一段時間的 RF-1 樣品，放入一段 12 h 的 D-Cycle 中，也可以建立固氮作用的概日韻律。在植物中，光敏色素會與某些概日韻律有關。例如：水稻葉綠粒中的葉綠素吸光蛋白質的 cab-1 基因 --- 當水稻在 L/D-Cycle 的 D-Cycle 中受到遠紅外線光照射 30 分鐘，便會影響其 cab-1 基因的表現週期。然而對 RF-1 而言，在任何黑暗期中照射 30 分鐘的脈衝波 730 nm 遠紅外光，也不會影響其韻律。

## 溫度和建立概日韻律的關係

只要在 RF-1 生理上可接受的溫度範圍內做小量的溫度改變，RF-1 也會有明顯的韻律表現。例如：

1. 將保持在 28 °C 的樣品進行 6 h 28 °C/8 h 35 °C (常溫→高溫) 或 16 h 28 °C/8 h 20 °C (常溫→低溫) 的處理，都可建立韻律。
2. 若是在 28 °C 中連續用光照射數天，再用 4 h~8 h 的低溫 (0 °C~15 °C) 處理，也可以誘發樣品中的韻律。
3. 細胞的生理狀態也是建立概日韻律的重要因素 --- 當 RF-1 細胞維持在 “suspended state” 時，在生理可接受範圍內，調整溫度的高低，也可以建立固氮酵素活動的概日韻律。

## Cycle 時間的長度和建立概日韻律的關係

當 RF-1 進行短週期 --- 10 h/10 h, 8 h/8 h 或 6 h/6 h 的 L/D-Cycle 設定時，固氮酵素的活動會從 D-Cycle 的起點開始啟動，並一直延續到下一個 L-cycle 中。但是，當樣品進行長週期 --- 14 h/14 h, 16 h/16 h 或 18 h/18 h 的 L/D-Cycle 設定，固氮酵素的活動會在 L-cycle 起始之後的 13 小時就開始啟動，亦即在 D-Cycle 開始之前，活動已經分別進行了 1、3 或 5 個小時。這個結果顯示 --- 除了黑暗 (沒有光照) 以外，光合作用的累積產物對固氮酵素的活動也有一定的影響力，而在 L/D cycle 較長的時候特別明顯。

生物時鐘是非常令人著迷的研究主題。目前關於 RF-1 概日韻律之研究仍在繼續進行中，學者們繼續從各個角度--- DNA, 蛋白質，酵素，Biological Pathway，光合作用...探索生物時鐘的本質，藉以了解它在生命運行中的角色。

## 第三節 實驗系統及方法

在這一節中我們分四個小節，分別介紹我們的實驗系統、實驗儀器（溶氧計）、實驗樣品製備及實驗步驟。

### 3-1 實驗系統

圖 3-1 為我們實驗系統的示意圖。和往年比起來、這次的系統有兩個特點，第一個是：實驗樣品及偵測的部份是放在培養箱中，以獲得較穩定的實驗條件控制；其次，由於電腦影像擷取卡價格降到兩千元左右，我們首次採用電腦擷取訊號，不過在長時間（7 天以上）、24 小時連續取樣的工作需求之下，電腦當機的問題一直令我們很擔心。

我們的實驗系統可分為置於培養箱內及培養箱外兩個部分。

1. 培養箱：這是一個大型的培養箱，內建照明設施，具有控制溫度及照光的功能。我們設定定時計自動控制照明日光燈的開關，以三天以上的 L/D cycle 設定樣品的韻律後，調至 L/L 持續觀察樣品韻律變化的情形。培養箱內除了放置 250 c.c 的實驗樣品、DO Meter 探針及電磁攪拌器外，沒有其他的樣品或儀器，以避免其他因素的干擾。在 28°C 左右，溫度的穩定度為 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ；在 8°C 左右，溫度的穩定度為 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。我們以照度計測得實驗樣品放置位置的光強度約為 2930 Lux。
2. 實驗樣品：放在 250 c.c 的燒杯中。
3. 電磁攪拌器：持續攪動樣品溶液，使水體中的 DO 值及溫度維持均勻，並避免樣品附著於 DO 探測頭上造成 DO 偵測值不可靠。

攪拌器轉速為 6000 rpm。

4. DO Meter：這是 YSI model-55 的 DO Meter，內含溫度計，可同時測量水體溶氧值及水體溫度。
5. CCD：小型監視用 CCD。由於 DO Meter 沒有電腦界面，我們用 CCD 攝取 DO Meter 的讀數，記錄為影像檔，每天再由影像中讀出數據。
6. 影像擷取卡：這是 640x480 的影像擷取卡，擷取 CCD 攝取到的 DO Meter 讀數的影像，顯示在電腦螢幕上。
7. 電腦：電腦每五分鐘掃描一次螢幕，將影像（DO Meter 讀數）儲存於硬碟機中。我們以電腦的時鐘做為系統的時間基準。

### **3-2 溶氧計 (DO Meter) 之工作原理**

溶氧計的感測器主體為一壓克力的圓柱，圓柱的末端嵌有一圈環形的金製陰極。環形陰極的中心有一小槽，槽內有一個多孔性的（porous）銀製陽極。使用時，槽內注入 KCl 的電解液，其中需添加少量的表面活性劑以增強電極和溶液的接觸。

感測器上緊覆一片滲透性的薄膜，藉以將電極與外界隔離，但卻能容許氣體透過薄膜進入感測器。偵測時在電極上加一個電壓，致使透過薄膜進入小槽內的氧氣在陰極產生反應而形成電流。

氧氣透過薄膜的速率和薄膜內外氧氣的分壓差（濃度差）成正比，由於氧氣在陰極消耗得很快，我們可以假設薄膜內氧氣的分壓為零。因此，氧氣滲入薄膜的驅動力只與薄膜外的氧氣的分壓成正比。當外界氧氣的分壓改變時，氧氣滲入薄膜的量也成正比地改變，使得感測器偵測到的電流也成正比地改變。

在進行測量的過程中，溶解在樣品中的氧氣一直在消耗，因此感測器尖端的樣品必須持續不斷地攪動。若是攪動發生停滯，讀數會變低而不正確。攪動的動作可以用機械帶動感測器周圍的樣品，或是直接迅速地將感測器在樣品中移動。攪拌的速率應至少每秒 1 英尺。

在我們的實驗中，是用一個電磁攪拌器攪動樣品溶液，如果攪拌的速度較慢，藻類會在感測器的四周凝聚，使得 DO 的讀值有嚴重的、不規則的變化、因此我們是用嘗試的方式，逐漸調整電磁攪拌器的轉速，使得感測器四周不會發生凝聚的現象。

實驗期間由於植物需要持續提供  $\text{CO}_2$ ，以維持生長，光合作用又會不斷地產生氧氣，因此我們不能將樣品放在封閉的容器內進行實驗。由於樣品和外界之間不是隔離的，DO Meter 所測得的數值並不是純粹由樣品所產生出來地氧氣，還包括大氣和溶液交互作用的結果 --- 溶液中的氧含量超過飽和溶解度時，溶液中的氧會溢出液面跑到大氣中，若是溶液中的氧含量低於飽和溶解度，大氣中的氧氣會溶入液體中。因此這個測量法在數據的討論和分析上有一些複雜和缺點。不過，由於在培養箱中溫度相當穩定，氧的飽和溶解度和空氣中氧的分壓可視作常數，使得大氣和溶液的交互作用也可視為常數，因此數據的變化仍然會相當真實地反應出實驗所發生的現象。

這個實驗方法還有一個獨具的優點 --- 我們可以即時 (real time) 地偵測，這是一般傳統的方法所做不到的，因此可能可以由其中發現一些新的現象，特別是一些較快的、時間較短的反應。用 DO Meter 研究光合作用的概日韻律可能不會成為正統的研究方法，但是做為輔助的佐證則可能相當不錯。

### 3-3. 實驗樣品製備

我們使用的培養基為 BG-11<sub>0</sub> (原 BG-11 含氮源)，因氮源會影響 RF-1 之固氮作用及光合作用，故培養上我們都使用無氮源的 BG-11<sub>0</sub>。詳細配方如下：

藥品成份	濃度(g/ L)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.004
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.075
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.036
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
EDTA(Disodium magnesium salt)	0.001
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02
→ Trace-metal mix A5 <sup>6</sup>	1.0(ml/L)
EPPS	2.523

→ Trace-metal mix A5<sup>6</sup> 配方：

藥品	濃度(g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.08
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0494

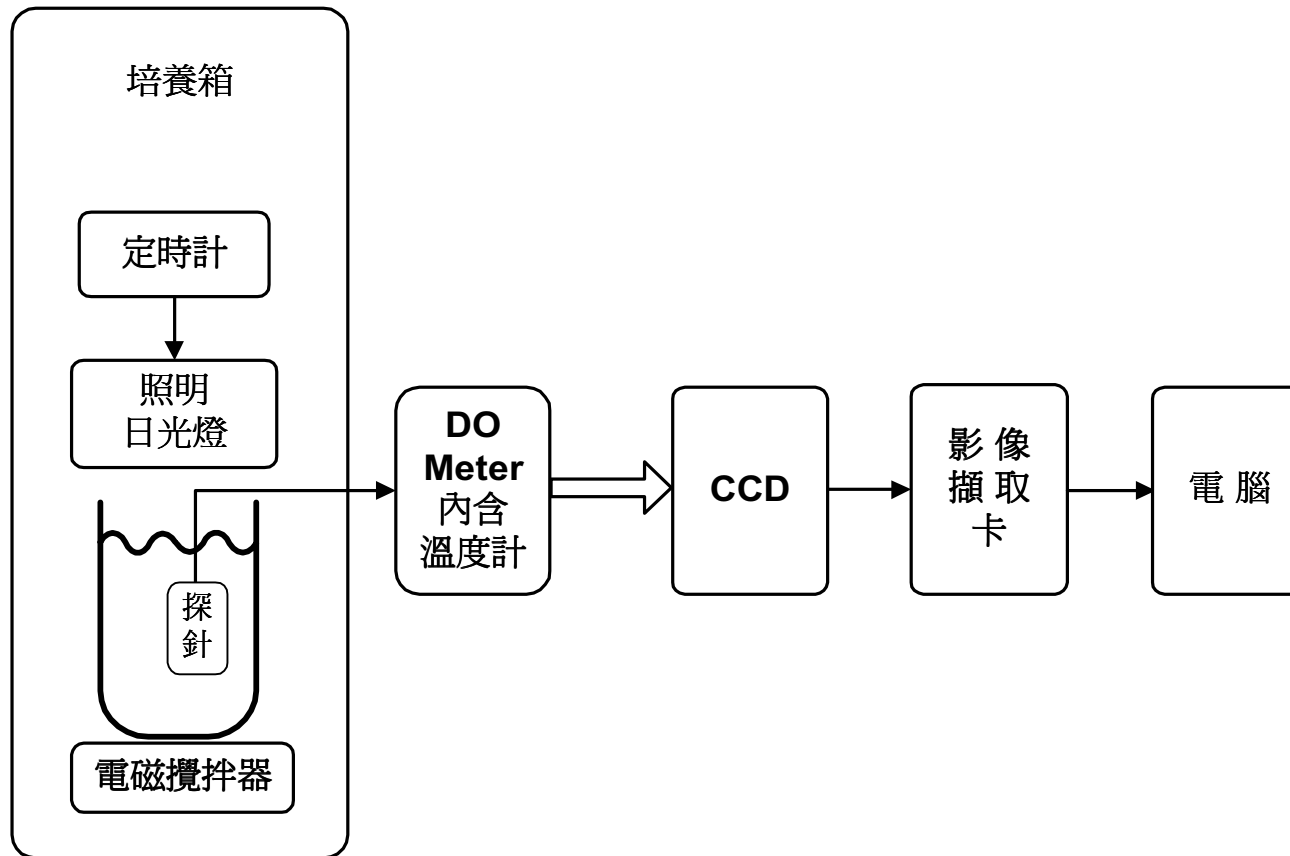
→培養液藥品都配好後，再使用 1N 的 HCl 或 NaOH 調整 pH 至 8.0。

### 3-4 實驗步驟

每次實驗時取正在培養中的新鮮樣品 50 c.c.，再加入 200 c.c. 的培養液稀釋，以 250 c.c. 的燒杯盛裝，置入培養箱中，以 DO Meter 探測溶氧量及溫度，並以電磁攪拌器持續攪拌維持溶氧量及溫度的均勻。我們會讓樣品在 L/D 之下適應三天以上，以建立其概日韻律。並觀察樣品及訊號是否已達穩定。再將系統切換到 L/L。在 L/L 下也約取二~三天的數據，觀察樣品是否有概日韻律的表現。

樣品的正常培養溫度為 28°C。L/D 的設定採取 12h L/12h D，準確的時間為上午 6:00 開燈，下午 18:00 關燈。實驗期間，每天早、中、晚三次檢視系統是否工作正常，以避免電腦當機損失太多數據。每天晚間讀出電腦記錄的數據，立即繪圖分析，以了解系統及樣品的狀況，做為實驗進展的依據。

圖3-1. 實驗系統圖



## **第四節 RF-1 在 28°C 之概日韻律實驗結果及討論**

我們想要探討“用溶氧計偵測聚球藻 RF-1 之概日韻律的可行性”，最基本的檢驗方式就是檢驗：在最普通的培養條件 --- 28°C 之下，能否用溶氧計測得概日韻律的訊號。本節將詳細討論這個實驗的結果。我們將實驗全程 RF-1 的溶氧量變化區線表現在圖 4-1 中，由於樣品平時就是在 28°C 的環境下培養，因此不須擔心樣品的情況是否穩定，實驗時，我們先取兩天 L/D-Cycle 的訊號，由訊號的重複性確定實驗系統的可靠度之後，隨即切入 L/L-Cycle 取三天訊號，以檢驗能否觀察到概日韻律的訊號。在以下的兩個小節中，我們分別討論 L/D-Cycle 和 L/L-Cycle 的實驗結果，同時也把去年單殼縫藻的實驗結果拿出對照，藉以強調概日韻律訊號的表現。

### **4-1. RF-1 在 28 °C L/D 條件下之溶氧量變化**

圖 4-2 為 RF-1 在 28°C L/D-Cycle 之溶氧量及溫度變化。我們先從 DO 曲線的 L-Cycle 討論起：L-Cycle 從早上 6 時開燈起，至下午 18 時關燈為止。6 時開燈後，DO 數值急劇上升，大約在 8 時到達最高峰值後開始呈近似指數函數下降，至 12 時才降到一個相對穩定的數值。

這段期間為開燈後燈光刺激 RF-1 的過程。剛開燈的兩個小時之內，RF-1 產生氧氣的速率十分劇烈，甚至能大於水中飽和含氧量的兩倍以上。第一次測試時，由於氧氣濃度太高，感測器中的電流太大，使得我們燒壞了一支 DO 感測器，因此在之後的實驗中我們都將樣品稀釋至培養時濃度的 1/5。

為了便於比較單殼縫藻和 RF-1 的實驗，我們將單殼縫藻 L/D-Cycle 的 DO 曲線表現在圖 4-3 中。在單殼縫藻的實驗中，也有開燈尖峰的變化，但是單殼縫藻產生氧氣的速率遠不如 RF-1，這也映證了藍綠藻是產生氧氣量非常大的植物（單殼縫藻是一種綠藻）。我們不知道開燈的尖峰為什麼會降下來，這顯示 RF-1 在 L-Cycle 中有一種消耗氧氣的機制存在，用以抑制細胞中氧氣的含量。在單殼縫藻中 DO 曲線也會下降，但是下降的速率較 RF-1 平緩。

L-Cycle 的後段（12 時至 18 時），DO 的數值大致維持穩定，在 15 時之後曲線會微微上升，這個變化很明確，意味著其中有某個反應正在進行。而單殼縫藻中則沒有類似的現象。

D-Cycle 從 18 時關燈開始；關燈後 DO 就快速下降，一般來說，這是關燈後呼吸作用消耗氧氣的過程。但是下降過程曲線變化的情形很特別，不是平滑、單調地變化，顯示其中的反應相當複雜。對照起來，單殼縫藻在這個時段的 DO 曲線呈現單調的指數函數下降，那是內部反應形式較單純之表現。

RF-1 的 DO 在 24 時左右降至谷底，而後穩定、平滑地快速上升，上升的形狀幾近指數函數。在單殼縫藻的 D-Cycle 中，DO 曲線下降至底部之後就穩定地保持在定值，直到開燈時才上升。

RF-1 的 D-Cycle 曲線的變化非常令我們迷惑，特別是 0 時（24 時）至 6 時 DO 上升的區段。在這段時間內，樣品沒有接受照光，但是 RF-1 會產生氧氣使 DO 上升！這些氧氣並不是光合作用所產生

的，所以應該是有其他的作用在製造氧氣 --- 一種不需要光就能產生氧氣的作用。從訊號變化的幅度來看，這個未知作用所製造的氧氣和開燈尖峰的振幅差不多，表示此一作用也是很強烈的。

RF-1 的 DO 曲線在 D-Cycle 中上升的現象是一種與外界光無關的自發反應（這時沒有照光），我們認為這個訊息暗示我們 --- 這就是概日韻律存在的表現。類似的 DO 上升之現象在 4-3 圖單殼縫藻的實驗中沒有發現，這可能和單殼縫藻的實驗中沒有觀察到概日韻律的現象有關。

圖 4-2 中同時也展示了 L/D 之下溫度的變化，實驗期間培養箱內溫度的穩定性非常高，一直都可以維持在  $28.0 \pm 0.1$  度之間。圖中 L-Cycle 和 D-Cycle 的溫度明顯地不同，溫差高達 0.6 度，而且是 D-Cycle 的溫度較高，可見得溫度上升並非環境光照所造成的，顯示在 D-Cycle 中有一些非常耗費能量的反應正在進行。我們猜想這是 RF-1 自己的溫度變化，而且可能和概日韻律有關。D-Cycle 中溫度上升得較快，到 L-Cycle 中才緩慢下降。

## **4-2. RF-1 在 28 °C 從 L/D 進入 L/L 之溶氧量變化**

在黃教授的研究中已經知道 RF-1 的光合作用受到生物時鐘的調控，這個現象可以在 L/L 狀態下觀察得到。圖 4-4 是 RF-1 由 L/D 進入 L/L 之溶氧量及溫度變化圖，我們依據橫軸的時間來討論 DO 訊號的韻律表現。

RF-1 從 11 月 1 日 6 時開始進入 L/L 狀態，11 月 1 日 6 時至 12 時曲線的尖峰仍然是圖 4-2 中 L/D 開燈尖峰的正常表現，12 時之後

訊號保持相當地平穩，而且 18 時附近也沒有下降的現象，這是由於 L/L 中沒有關燈的緣故。如果訊號中沒有生物時鐘的現象，我們會看到 DO 曲線自此之後都一直保持定值。曲線在 11 月 2 日 6 時左右出現了一個很大的抖動，在 11 月 3 日 6 時附近也有一次明顯的抖動，這就是我們所期待的概日韻律的訊號了！

圖 4-4 的上半部是溫度在 L/L 期間的變化，數值都在  $28.0 \pm 0.1$  度之間變化，顯示我們所用的培養箱溫控性能相當好，也反映出圖 4-2 中 L-Cycle 和 D-Cycle 之間 0.6 度溫差的變化是真實存在的現象。

圖 4-5 是單殼縫藻室溫下由 L/D 進入 L/L 之溶氧量變化曲線，其中看不出有類似圖 4-4 中的概日韻律訊號。圖中曲線的不規則變動可能是由於室溫變化所造成的（該實驗不是在培養箱中進行的）。對照圖 4-4 和圖 4-5 很容易就明白概日韻律訊號的表現形式。

為了更仔細地討論圖 4-4 中的概日韻律現象，我們把其中的數據重新調整表現在圖 4-6 中。首先我們將 10 月 31 日 12 時至 11 月 1 日 12 時的數據畫在最下面，這 24 個小時是 DO 曲線在 L/D 狀態下的表現；然後將 11 月 1 日 12 時至 11 月 2 日 12 時的數據畫成中間的曲線，這是進入 L/L 之後概日韻律第一次的表現；最後將 11 月 2 日 12 時至 11 月 3 日 12 時的數據畫在最上面，這是概日韻律第二次的表現。為了將曲線的變化表現得更清楚，我們分別將概日韻律第一次的訊號和第二次的訊號放大 5 倍及 20 倍。

圖 4-4 及圖 4-6 中 11 月 1 日 18 時附近的 DO 數值（大約 7.3），可能是 L/L 中培養液溶氧量的平衡值（前後有 12 個小時的時間），這

時候 RF-1 產生的氧氣和大氣中的氧氣之間的交互作用(逸出/滲入)達到平衡；由於第一次概日韻律訊號的尖峰高於這個數值，顯示出表現概日韻律的機制中的確有產生氧氣的反應，而訊號的前緣則是消耗氧氣的跡象，第二次概日韻律訊號中也有類似的現象。

我們在圖 4-6 中沿 0 時及 6 時各畫一條垂直的虛線標示時間點，中間那條曲線清楚地顯示出第一次概日韻律訊號的確是發生在 0 時至 6 時之間，我們認為圖 4-2 中 L/D 曲線 6 時後的開燈尖峰並不是概日韻律的表現，它是“開燈動作”所激發出來的一個暫態的訊號 --- 一定要由 D-Cycle 開燈才有的訊號、只是開著燈而沒有“切換”的動作是不會激發這個尖峰的。而 L/D 曲線中我們一直很有興趣地 0 時至 6 時的上升區段的確對應於概日韻律的訊號，這個上升區段就是概日韻律自發性的表現，其中的確有自發性地產生氧氣的反應 --- 在沒有光的照射之下。再從強度來比較，L/D 曲線中 0 時至 6 時 DO 的變化約為 2.8 mg/L，第一次概日韻律訊號中 DO 的變化約為 1.4 mg/L，其強度佔前者中的 50%，是相當大的比例（開燈尖峰中 DO 的變化約為 5 mg/L）。

從概日韻律訊號出現的時間來看，由於它的發生不是在 L-Cycle，它可能不是屬於光合作用的一環。也許我們應該說---這是一種會產生氧氣的作用之韻律，它是一種發生在 D-Cycle 的作用。未來我們會更深入探討這個作用的性質。

圖 4-6 中最上面的曲線是第二次概日韻律訊號，它的強度弱了許多，而且曲線隨時間變化的情形和第一次概日韻律訊號之間有一些不一致。黃教授建議這可能是由於光合作用產生氧氣的活性逐漸減低所

造成的，類似的跡象也表現在圖 4-4 中曲線的後半段 --- DO 數值逐漸緩慢下降。

圖 4-4 和 4-6 中的曲線給了我們兩個問題：為什麼我們觀察到的概日韻律訊號在 L/L 的表現在時間上不是很規則（圖 4-6 最上面的曲線）？而且訊號在強度上也不是很規則？對照起來，蛋白質或酵素實驗中訊號就表現得相當規則了 --- 訊號在兩、三天之內，時間的變化上很規則、訊號變化的強度也很規則。而我們的訊號在第二次概日韻律訊號就有很大的改變了。

我們嘗試對其間的差異提出解釋：光合作用產生氧氣的機制雖然受到生物時鐘的調控，但是它並不是最基本的生物時鐘的現象，它可能是生物時鐘調控的 **Biological Pathway** 中相當下游的反應，而不是直接由生物時鐘調控的作用，因此光合作用概日韻律的現象不像蛋白質或酵素實驗所表現得那麼單純。我們所觀察到的訊號只是 “會影響光合作用產生氧氣的許多反應” 之中和概日韻律有關的成份而已，這些反應之間的關係可能相當複雜，在 L/D 狀態下，L/D 的韻律驅使這些反應之間的同步性維持地很好，DO 訊號很強，L-Cycle 和 D-Cycle 之間變化明顯。在進入 L/L 之後，一開始各反應間仍能保持不錯的同步，第一次概日韻律的訊號在時程上及強度上仍然有相當明確的表現，但是再久一點，各反應間的同步漸漸亂掉了，以致於第二次概日韻律的訊號不但強度變弱，而且形狀也有有改變。根據以上的討論，我們的實驗方法可能可以應用到光合作用中概日韻律的 **Biological Pathway** 的研究上。我們希望能在未來的實驗中研究出這些問題的答案。

圖4-1. RF-1 28°C 實驗全程之溶氧量變化

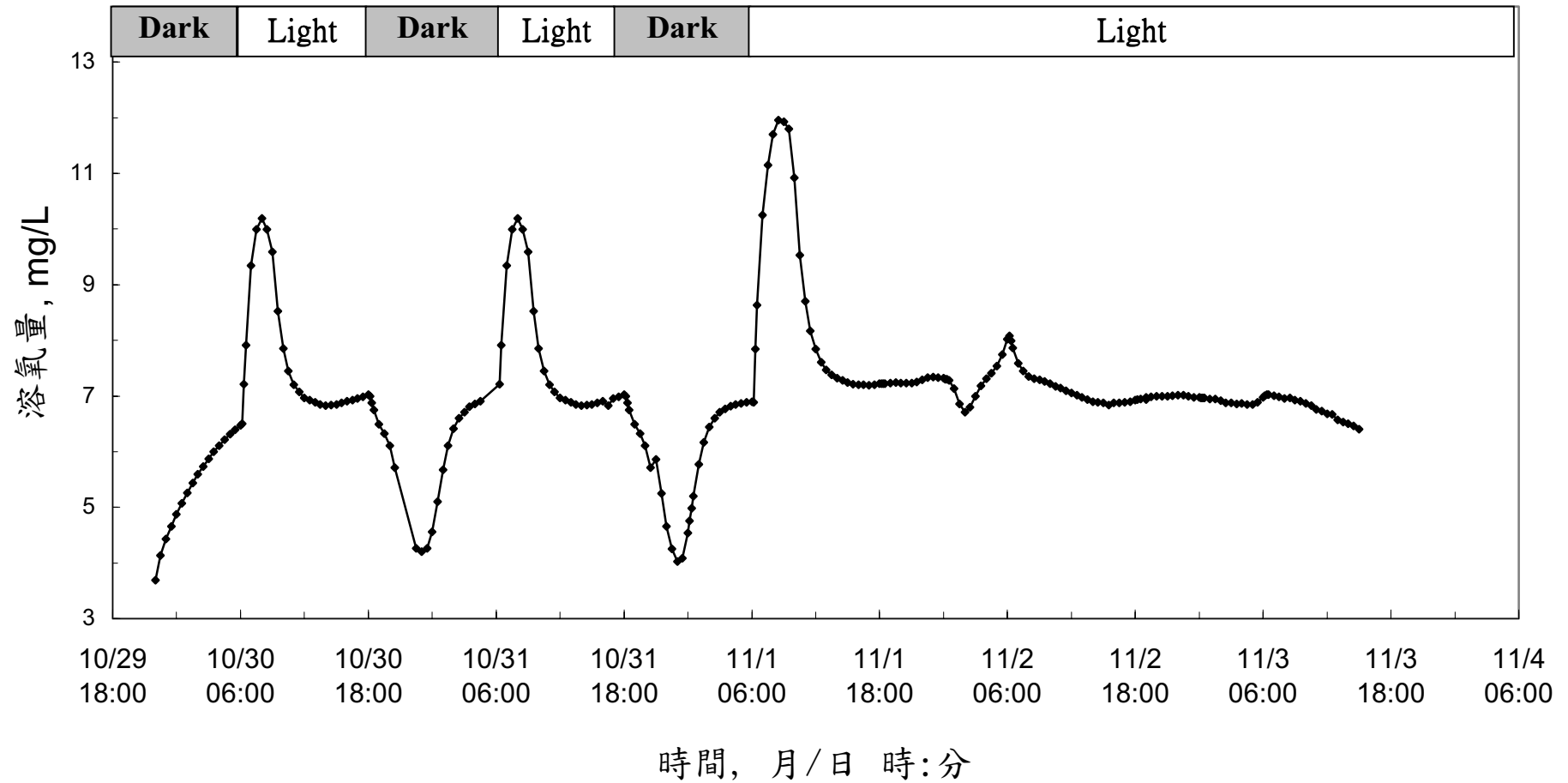


圖4-2. RF-1 28°C L/D之溶氧量及溫度變化

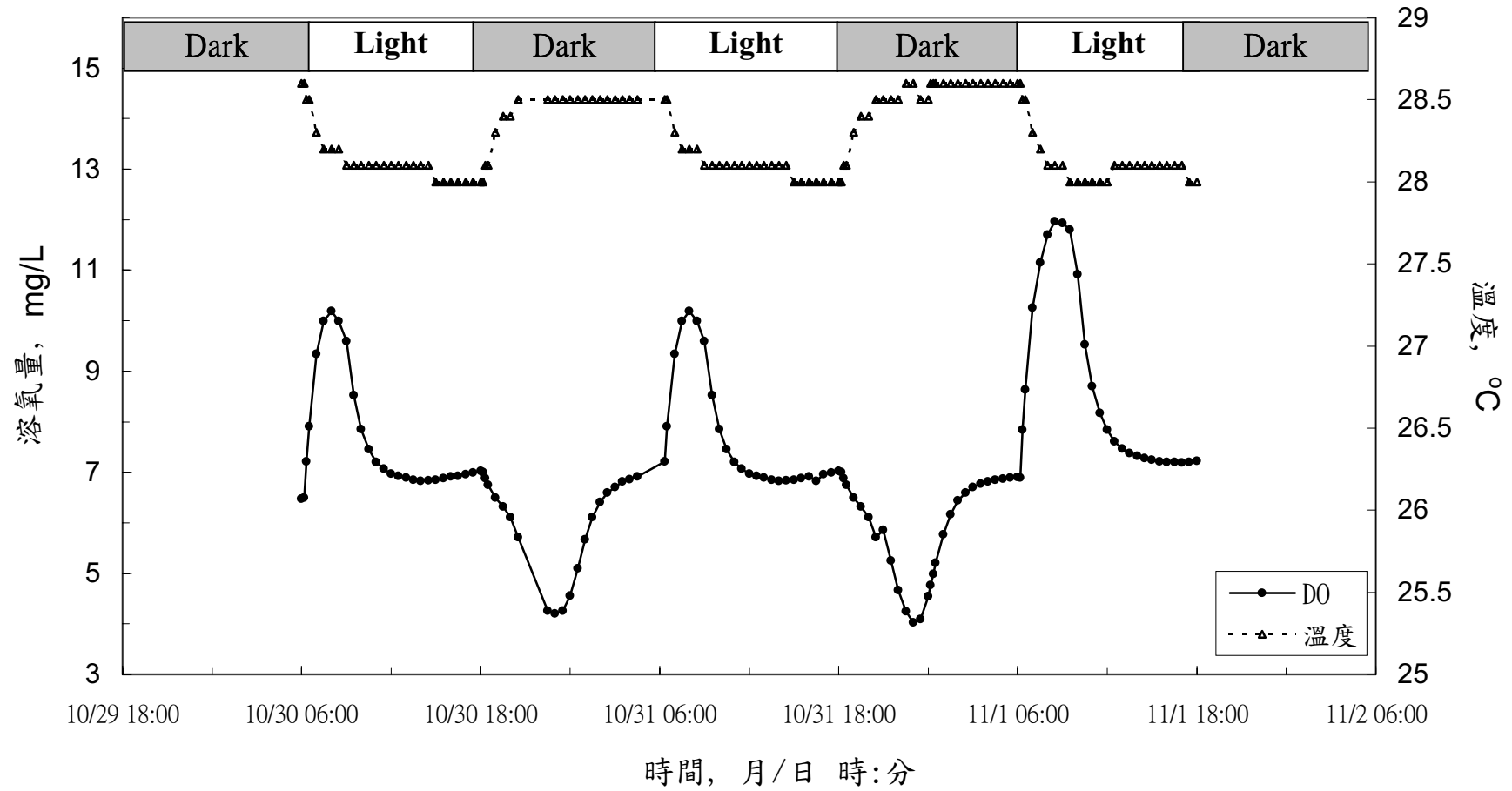


圖4-3. 單殼縫藻室溫下 L/D 之溶氧量變化

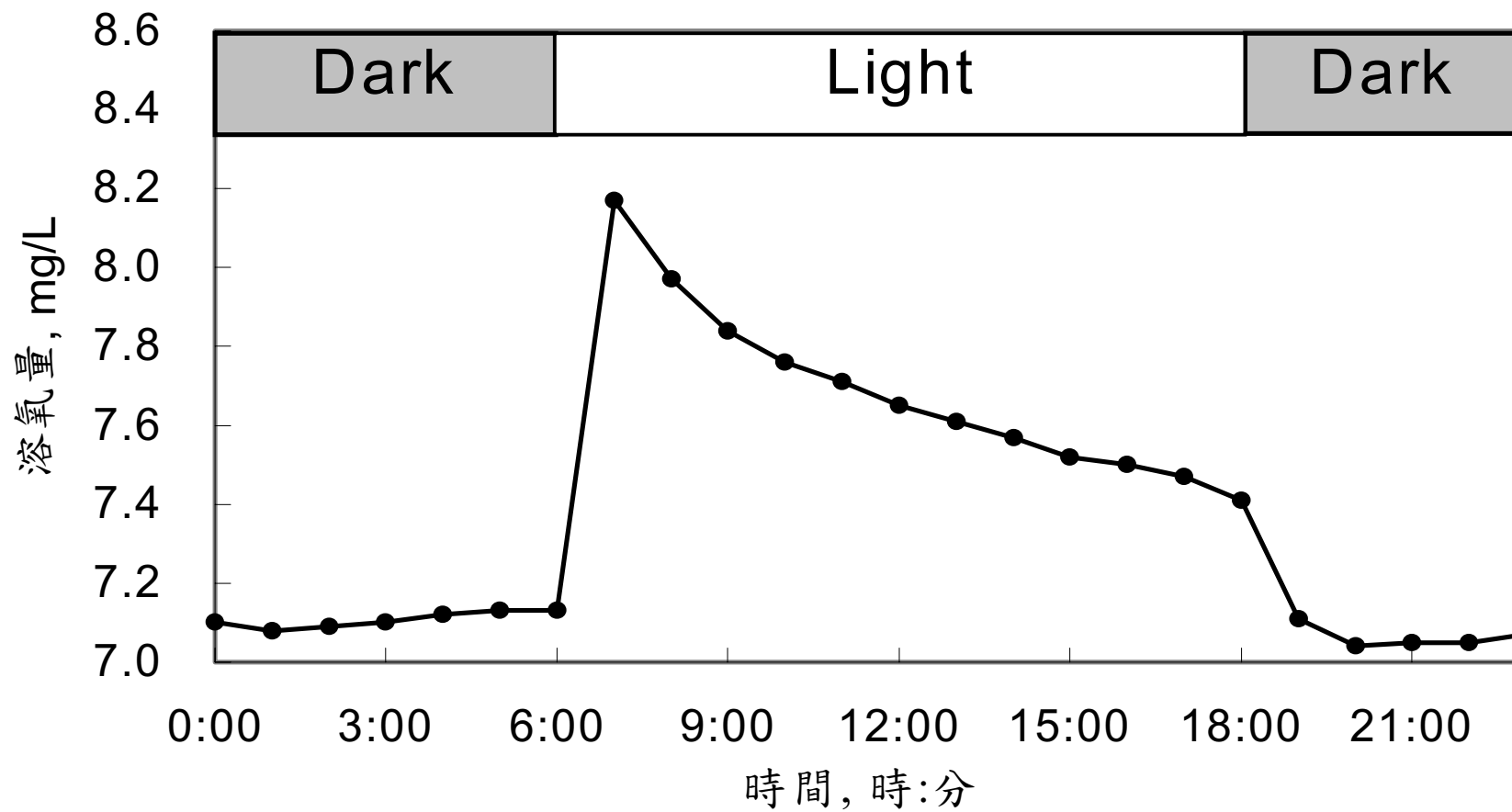


圖4-4. RF-1 在28°C由L/D進入L/L之溶氧量及溫度變化圖

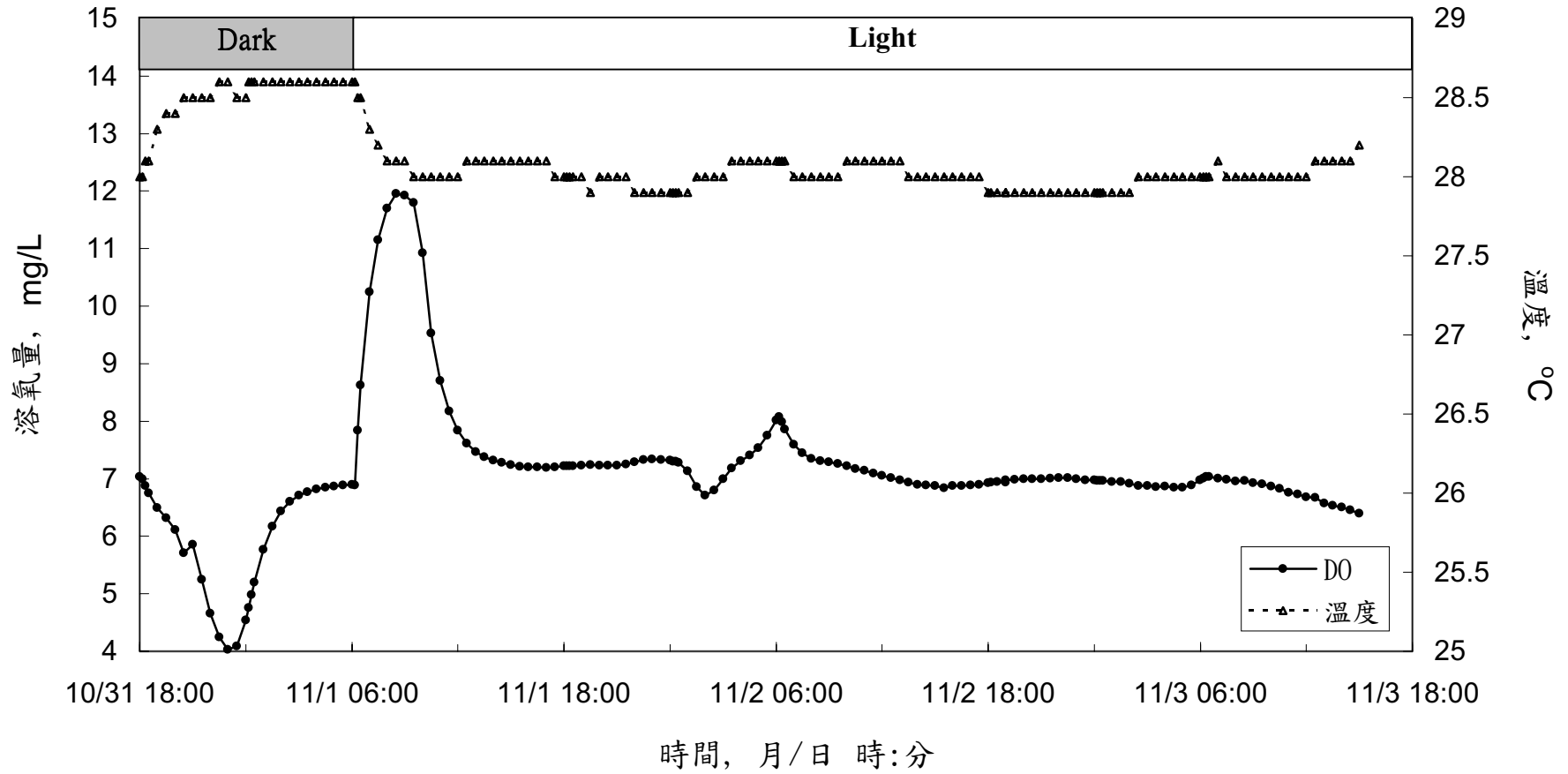


圖4-5. 單殼縫藻室溫下由L/D進入L/L之溶氧量變化

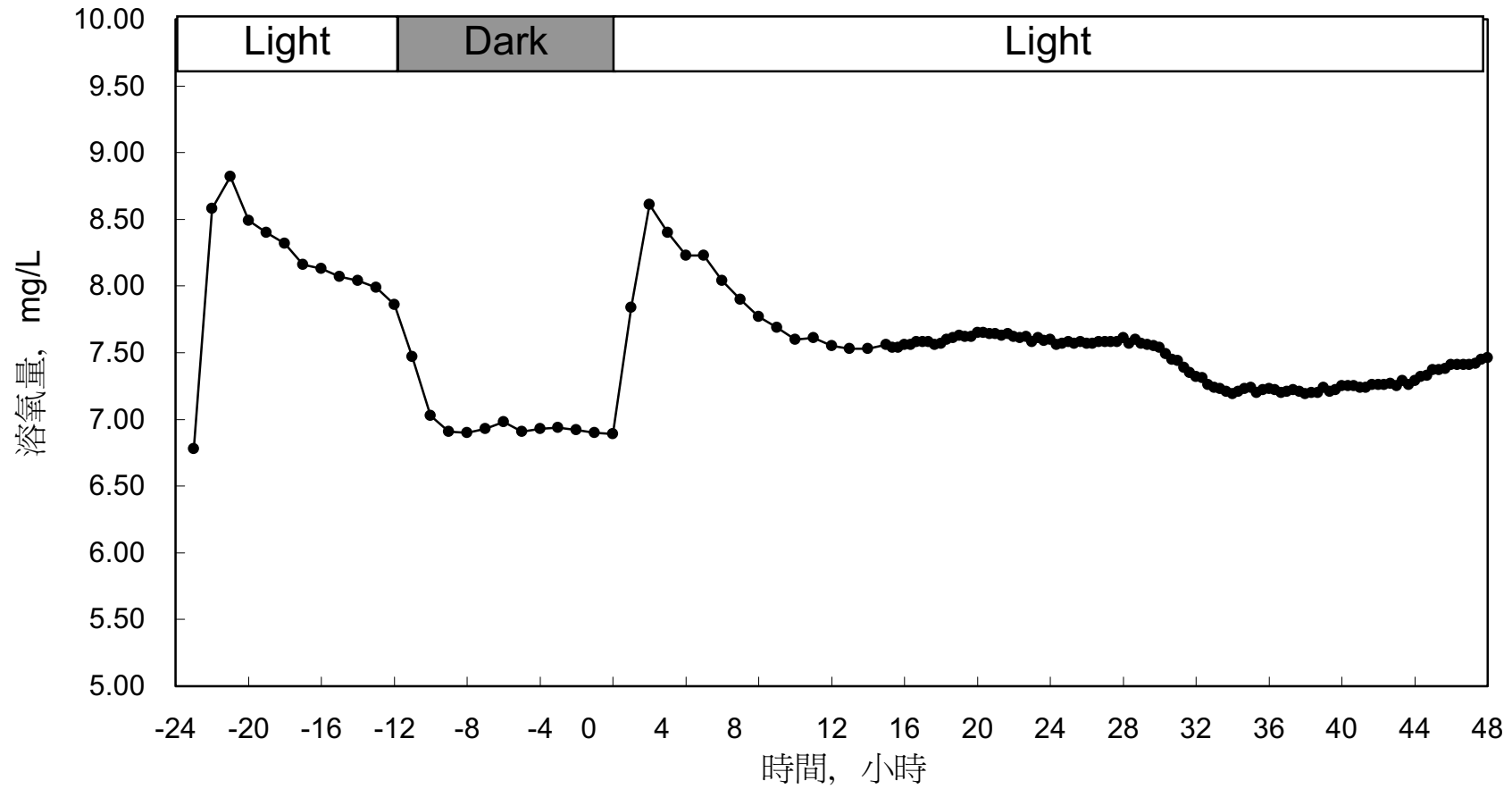
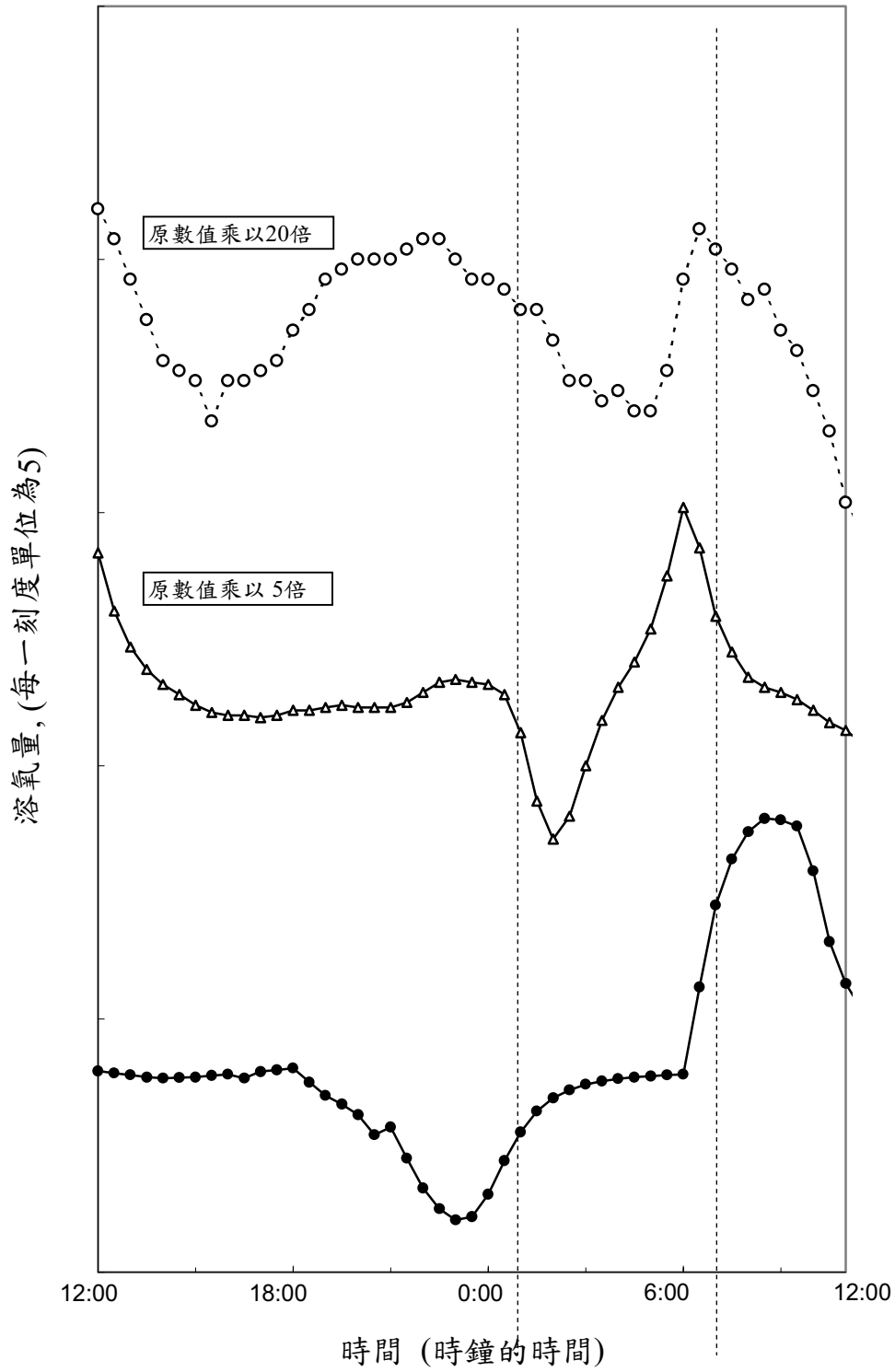


圖4-6. RF-1 28°C L/L之溶氧量曲線變化比較圖



## 第五節 結 論

我們將生態學研究中常用的溶氧計，應用到聚球藻 RF-1 的概日韻律研究中，藉由偵測培養液中的溶氧量，成功的偵測到了聚球藻 RF-1 在 28°C 下光和作用之概日韻律的訊號。在傳統的研究方法中，大約是兩個小時抽取一次樣品以進行實驗，這種間斷取樣不但會對樣品造成影響，而且所測得訊號的變化也很不自然，特別是無法觀察到樣品在時間上較快速的變化。我們的研究方法最主要的優點是可以連續偵測，克服了上述的傳統方法中的困擾；而且可以由其中發現一些新的現象，尤其是一些較快的、時間較短的反應。

在我們的實驗中，由於樣品和外界之間不是隔離的，溶氧計所測得的數值並不只有樣品所產生或消耗的氧氣，還包括大氣和溶液的交互作用，使得這個測量方法在分析和討論上有一點複雜。若是培養箱中溫度相當穩定，大氣和溶液之間氧的交互作用可視為常數，則數據變化所反應出的現象仍然是相當真實地。

我們觀察到在光/暗條件下 RF-1 之溶氧量曲線呈 24 小時週期性的變化，而且此週期現象在進入連續照光後仍然可以維持兩個循環以上，這是概日韻律典型的表現。我們也討論了曲線變化的細節，發現概日韻律的訊號是來自 RF-1 在黑暗週期中一種自發性地、不須照光

就會產生氧氣的機制，這個機制在整個概日韻律所調控的 Biological Pathway 的網路中可能是屬於較下游的部份，因此和蛋白質或酵素所得到的訊號比起來，我們的訊號強度和韻律性都衰減得較快。

這個實驗同時發現含聚球藻之培養液的溫度，在進入黑暗週期時會有 0.6°C 的上升，顯示其中有非常耗費能量的反應正在進行，由於個溫差的變化比其他藻類明顯，更進一步的研究可能會對 RF-1 的性質及其韻律之特性有較多的瞭解。

未來我們將繼續研究溶氧計所測得的訊號和傳統的蛋白質或酵素所得到的訊息之間的關係，對生物體的概日韻律做更深入的探討。

## 參考資料

1. 黃檀溪 (1991). 原核生物之週期韻律. 生命科學簡訊 第五卷, 第五期, p.3.
2. 黃檀溪 (1995). 概日韻律在原核系統之研究近況. 生命科學簡訊 第九卷, 第九期, p.2.
3. 曾玉華 (1995). 原核型聚球藻 RF-1 概日韻律突變株之探討. 中國文化大學生物科技研究所, 碩士學位論文.
4. 陽明柳與微小單殼縫藻之生物節律研究. 第四十一屆全國中小學科學展覽會 國中組生物科 作品說明書 (2000).
5. Huang, T.-C., Chen, H.-M., Pen, S.-Y. and Chen, T.-H. (1994). Biological clock in the prokaryote *Synechococcus* RF-1. *Planta* 193, 131-136.
6. Huang, T.-C. and Grobbelaar, N. (1995). The circadian clock in the prokaryote *Synechococcus* RF-1. *Microbiology* 141, 535-540.
7. YSI (1997). Model-55 Dissolved Oxygen and Temperature System Operations Manual. YSI Incorporated Co., Yellow Springs, Ohio, USA.

## 評 語

- (1) 本論研究方法及步驟嚴謹，點、面均顧及，所得結果及結論也正確及創新，是一篇具有學術參考價值的論文。
- (2) 惟論文中很明顯發現此球藻於沒有光照（暗期）情況下，仍然有氧氣的釋放現象，而此現象於本論文中並未深入探討，這是本論文美中不足之處，希望作者補強之。