

台灣二〇〇二年國際科學展覽會

科 別：植物學

作品名稱：日長處理對大豆蛋白質合成的影響

得獎獎項：植物學科佳作

學 校：高雄市立高雄高級中學

作 者：蘇柏嵐 廖雋安

作者簡介



我是廖雋安，目前就讀於高雄中學二年級。我的個性外向，平日喜歡聽音樂和看書。對我而言，科學是一個未知的世界，有許多的可能，許多的未知等待我們去探索，這次有機會在中山大學陳文孝教授的協助下，與蘇柏嵐合作完成作品，並參加這次台灣科學博覽會，我感到十分榮幸。希望未來能持續進行生物方面的研究，朝成為生物學家的目標努力。

作者簡介



我是蘇柏嵐，目前就讀高雄中學二年級，平常喜歡看書。我在高中時開始對生物這門科學產生興趣，對我而言，這個領域充滿了未知，也沒有絕對的定律與準則，需要探索的部分還相當多，這次在教授與學長的指導下，與廖雋安完成的這份作品，很榮幸能通過教授們的初選，並參加「台灣國際科學博覽會」。希望未來仍能從事生物相關研究，繼續向未知的世界探索。

摘 要

日照影響花芽分化及生長是植物生理學上的重要課題，根據相關文獻指出，蛋白質類型的變化是影響開花的重要關鍵。大豆是短日照植物，分別以長日照(LD,18hr/day)和短日照(SD,6hr/day)處理，抽取葉片中的蛋白質以 SDS-PAGE、2D-SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 的實驗結果顯示出在分子量 25.2、32.9、38.6、50.6、64.0、100.6 kDa 處的蛋白質 SD 比 LD 的量多，但是在分子量 16.8 kDa 以下的蛋白質 LD 含有高濃度而在 SD 只有一點。我們使用 2D-SDS-PAGE 做進一步的分析，SD 與 LD 分為三個區塊討論(SD1~3,LD1~3)。有許多蛋白在 LD1,LD3 出現但在 SD1,SD3 中未出現，可能有抑制花芽分化的作用。而在 SD2 中有多個高濃度蛋白出現，可能在花芽分化上扮演重要角色。其中編號 P1 與 P2 的蛋白質有較明顯的變化，根據 NCBI 網站上的資料顯示，P1 蛋白質與光敏素 C 有關，而 P2 蛋白質則沒有找到分子量和等電點類似的蛋白質。

Abstract

The effects of photoperiod on floral initiation and development is an important physiological subject and have studied over the past 70 years. According to the reference, polypeptide pattern plays an important role in photoperiodic induction. Soybean is a SD(short day) plant. So we planted them with 6-h(short day, SD) and 18-h(long day, LD) photoperiods. Total proteins in leaves of soybean were extracted from the vegetable, SD and LD. And using SDS-PAGE and 2-D electrophoresis to analyze. 25.2,32.9,38.6,50.6,64.0,and 100.6kDa polypeptides in SDS-PAGE were always present in leaves at SD but only a little bands of the polypeptides appeared at LD. And many polypeptides whose molecular weight (Mw) is below 16.8 kDa had higher concentration at LD and reduced at SD. We found three different areas(SD1~3,LD1~3) and analyze them. Many proteins were found in LD1,LD3 and reduced in SD2,SD5. Possibly, these polypeptides found in LD1 and LD3 play an important role in restraining floral initiation in soybean. Many proteins had more concentration in SD2. Probably, they play an important role in photoperiodic induction and floral initiation. We found a protein labeled P1 in SD2 and it is with molecular weight(Mw) of 36kDa at isoelectric

point (pI) of 5.2, and it may be related to cytochrome C. We also found a protein labeled P2 in SD2 and it is with molecular weight (Mw) of 40.2 kDa at isoelectric point (pI) of 5.4, and we couldn't find any protein that has the similar Mw and pI in protein database about flowering and daylength.

日長處理對大豆蛋白質合成的影響

Daylength affects protein synthesis in soybean

一、前言：

(一) 研究動機

植物的開花作用，主要由各種內生及環境訊號引發。其中日照長短是決定植物是否由營養生長轉變至生殖生長的重要環境因素之一。葉是植物負責感應日照長短的主要器官，一般認為葉感應日照長短後，製造並由莖轉運某種物質至頂端分生組織，使花芽開始發育。此種物質與激素類似，然而此種物質今日尚未找到。近年來發現了不少和花芽誘導有關蛋白質之報告，但需要釐清的的部分仍多。許多領域之探討，仍有待研究機關之研究。大豆是一種短日照植物(Short-Day Plant)，已知短日照處理約十日之後恢復長日照依然能誘導開花，且具有容易種植的優點。因此我們利用 SDS-PAGE、2-D 電泳技術，分析長日照(long day, LD)及短日照(short day, SD)處理十天後葉片蛋白質類型的變化。以找出變化的蛋白質並和網際網路上已知和開花、日照長短有關的蛋白質之分子量(Molecular Weight, Mw)、等電點(Isoelectric Point, pI)比對，以試圖推測其功能。

(二) 研究目的

以一維電泳及二維電泳分析短日處理前後的蛋白質類型，以了解作用蛋白質確切的分子量及等電點。並和已知與開花、日長的蛋白質比對，以推測其功能。

二、研究方法和過程：

(實驗一)：培養大豆

1. 種植 100 盆大豆，50 盆為實驗組，50 盆為對照組。
2. 以長日照（每天 18 小時光照）共同培養 30 天。
3. 實驗組改以短日照（每天 6 小時光照）誘導開花，對照組則維持長日照處理。
4. 十天後，摘下葉片抽取其中的蛋白質。

(實驗二)：萃取蛋白質

1. 將葉片放入研鉢，一起置於-75°C冰箱中，之後取出並將葉片磨碎。
2. 加入 50ml PH9.2 之 protein extraction buffer (見附件一) 然後以 2000g,4°C,10 分鐘離心。
3. 取上清液，使用抽氣過濾法濾掉雜質，加入約 5 倍體積的 methanol(含 0.1 M ammonium acetate)，之後放置於 4°C 冰箱過夜。
4. 以 10000g, 4°C,10 分鐘離心，倒掉上清液，沉澱物以 methanol(含 0.1 M ammonium acetate) 重複清洗三次。
5. 將沉澱物以氮氣吹乾，溶於 lysis solution (見附件二)。
6. 從二組的蛋白質萃取液各取 2 μ l 以 Bio-Rad Protein Assay contron 55998A 定量。

(實驗三)：SDS-PAGE 分析蛋白質的變化

1. 將等量對照組及實驗組的蛋白質以 1：2 的比例加入 sample buffer。
2. 於 100°C 水浴 5 分鐘，冷卻後每個 well 加入 15 μ l 的蛋白質液。
3. 以 12% 之 acrylamide 為 running gel
4% 之 acrylamide 為 staking gel (見附件三)
跑一維電泳。
4. 先以 80V 跑 30 分鐘，再以 100V 跑 80 分鐘，之後取出 gel 以 Coomassie blue R-250 染色。
5. 觀察並拍照紀錄。

(實驗四)：2D-SDS-PAGE 實驗分析

1. 從對照組、實驗組各取 40 μ g 準備跑兩條 Dry strip。
2. 將 2D 電泳專用之 Dry strip (18cm,pH4~7,-20°C) 泡在平衡液(見附件四)中 24 個小時。
3. 取出泡好的 Dry strip 置於電泳槽，將 sample 各取 30 μ l loading，並開啓冷卻循環系統保持 20°C，之後以 500V, 0.5mA, 5W 處理 90 分鐘，再以 3500V, 0.5mA, 5W 處理 18 小時。
4. 取出跑好的 Dry strip，浸泡於 solution A、solution B (見附件五) 中 15 分鐘。
5. 將 2D 膠片平舖在電泳平台上，開啓冷卻循環系統保持 15°C，之後將 strip 及 marker loading 到膠片上，先以 600V, 30mA, 20W 處理 30min，再以 600V, 50mA, 30W 處理 70 分鐘。
6. 電泳跑完後，用固定液(附件六)固定膠片上的蛋白質，然後再依照附件七的步驟進行硝酸銀染色。

7. 觀察並拍照紀錄。

三、研究結果與討論：

(一)經由一維和二維電泳的分析，我們發現實驗組在短日照處理十天後在分子量 25.2、32.9、38.6、50.6、64.0、100.6kDa 的位置蛋白質濃度有明顯的增加(見圖 1)。而在分子量小於 16.8kDa 的位置，對照組蛋白則有較高濃度。二維電泳分析結果顯示，在分子量較大的位置實驗組產生許多新的蛋白質點，許多分子量較小的蛋白質點在短日處理後量減少了(見圖 2,3)。我們在實驗組、對照組分子量小於 36.2kDa，等電點 5.5~7.0 的位置圈出區塊 SD1、LD1。在分子量小於 105kDa，等電點 5.0~5.5 的位置圈出區塊 SD2、LD2。在分子量小於 36.2kDa，等電點 4.0~5.0 的位置圈出區塊 SD3、LD3，以進行進一步的分析。

(二)Jackon and Thomas(1997)指出，植物葉片中有光敏素(phytochrome)，可感應光照並記錄日長。在經由吉貝素(Giberellin)及其他分子將訊息傳至頂端分生組織，使葉芽分化為花芽。阿拉伯芥為一種短日照植物，已發現的的開花基因有數十種。然而還有許多細節有待釐清，許多地方尚待研究機關進一步的研究。大豆已知為一種短日照植物，種植時間短，且所佔空間少都顯示其為理想實驗材料，且已知約十個短日照週期就能誘導開花。已知若將一處於生殖生長的植物嫁接至花芽未分化的植物上，則整株植物皆會開花，且都達到最佳的開花效果。顯示誘導花芽分化的機制及作用物質應大致相同，如此誘導開花才能一再被複製。因此我們將二維電泳所做出之結果和以知的許多與日照長短、開花有關的蛋白質之分子量、等電點比對。以猜測彼此之關聯。

(三)我們以 flowering, short day, long day, photoperiodic induction, floral induction, floral initiation 等作為關鍵字於 NCBI 查詢到的蛋白質，經由 ExPASy 計算其分子量及等電點。發現絕大多數和開花、日長有關聯的蛋白質多帶鹼性或中性。因此我們選擇 pH 4-7 的 Dry Strip 來跑第一維電泳 IEF，又因為許多許多文獻顯示，蛋白質點在電泳膠片上常因太過密集加上污染使得實驗結果不佳，蛋白質無法有效被分離。因此我們使用較長的 Dry Strip，以得到較好的實驗結果。

(四)區塊 LD1、LD3 中，我們可以看到對照組中有許多蛋白質在短日處理後濃度降低或完全消失(見圖 4,5,7,8)。在區塊 LD1 中有 15 個較 SD1 濃度高的蛋白質點，而在區塊 LD3 中有 7 個較 SD3 濃度高的蛋白質點。我們推測這些蛋白質可能和營養生長有相關，在生殖生長時不參與作用。也有可能這些蛋白質在長日照下量會增加，且具有抑止花芽分化

的功能。而短日照會抑止這個基因的表現，而使蛋白質濃度降低，於是花芽分化就不受抑止而開始進行。關於抑止花芽分化物質之報告並不多，詳細的作用機制仍有待研究。

(五)在區塊 SD2 中，我們可以看到實驗組蛋白的明顯增加(見圖 6)。有八個蛋白質點在區塊 SD2 中有較高的濃度，而在對照組區塊 LD2 中這些蛋白質點很微弱。我們推測這些蛋白質可能和感應日照長短有相關，也可能這些蛋白質將會經由轉運移至頂端分生組織進而誘導花芽分化。我們在分子量 36kDa、等電點 5.2 的位置發現了一個在區塊 SD2 新產生的蛋白質標示為 P1，經由和 NCBI 以 flowering, short day, long day, photoperiodic induction, floral induction, floral initiation 為關鍵字所查得的蛋白質之分子量、等電點比對，發現其分子量和等電點與一種存在於 *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 的光敏素 C 相似，此蛋白質在 NCBI 的資料庫中的編號為 P32646。我們同時以相同關鍵字比對區塊 SD2 中另一個在實驗組有較高濃度的蛋白質，此蛋白質的分子量為 63.9kDa 等電點為 5.4，我們標記為 P2。我們無法從 NCBI 的查詢結果比對出與 P2 相似的蛋白，我們推測 P2 或許是一個新的蛋白。關於 P2 進一步的資訊，仍有待氨基酸定序和 MALDI-TOF-MS 等進一步研究。

四、結論與應用：

(一)透過一維電泳及二維電泳對短日照處理前後蛋白質類型變化的研究，我們分析了二維電泳中變異的三個區塊。共有二十二個蛋白質點在十個短日週期後濃度減少，八個蛋白質點在十個短日週期後產生了較高的量。我們標記了其中的兩個點 P1、P2。P1 和一種已知光敏素 C 有相似的分子量及等電點。P2 無法從我們以開花、日長等關鍵字進行查詢的蛋白中，找到具有相似分子量及等電點的蛋白，有可能是一個新的蛋白。

(二)由於大豆具有容易種植，光期誘導速度快的特性。因此我們認為是理想的研究材料。花的誘導是一種複雜的生理反應，由嫁接實驗可知不同植物間誘導開花的代謝作用大致相同。我們希望能先從 P1、P2 及其他蛋白質的定序下手，進一步找尋主要作用的蛋白質，並研究其功能，而藉由控制這些蛋白的合成來達到控制開花的目的。

五、參考資料：

(一)William G. Hopkins 著 植物生理學 啓英文化 民國 88 年出版

- (二)劉賢祥譯 植物生理學 徐式基金會 民國 85 年出版
- (三)王月雲等著 植物生理學實驗 藝軒 民國 83 年出版
- (四)邱建智 中華民國 87 年 低溫處理時蝴蝶蘭葉片中蛋白質合成 mRNA population 及 cytokinin 活性之變化 國立中山大學生物系碩士論文
- (五)王文玉 中華民國 90 年 Abscisic acid 對蝴蝶蘭開花之影響即日長對 朵麗蘭葉片之 protein pattern 及開花影響之研究 國立中山大學生物系 碩士論文
- (六)丁世芬 中華民國 87 年 夜來香花芽分化過程蛋白質及 IAA 變化之研 究 國立中山大學生物系碩士論文
- (七)陸惠宗 八十九學年度 再現生機—由蝌蚪尾巴探討動物再生 國際 科展美國正選代表
- (八)Jackson, S. and Thomas, B. 1997. Photoreceptors and signals in the photoperiodic control of development. *Plant Cell Environ.* 20:790-795
- (九)Nugent JM, Palmer JD, 1991. RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell*66(3):473-81
- (十)Yu-Pei Chang, Shih-Fen Ding, Chin-Chin Chou, Bo-Shiun Du, and Wen-Shaw Chen, 1998. Daylength affects protein pattern and flowering in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, vol 39:199-203
- (十一)網站：
- NCBI：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 - ExPASy：<http://www.expasy.org/>
 - 酵素純化方法：<http://140.112.78.220/~juang/ECX/Pur0.htm>
 - 酵素分析方法：<http://140.112.78.220/~juang/ECX/Ana0.htm>

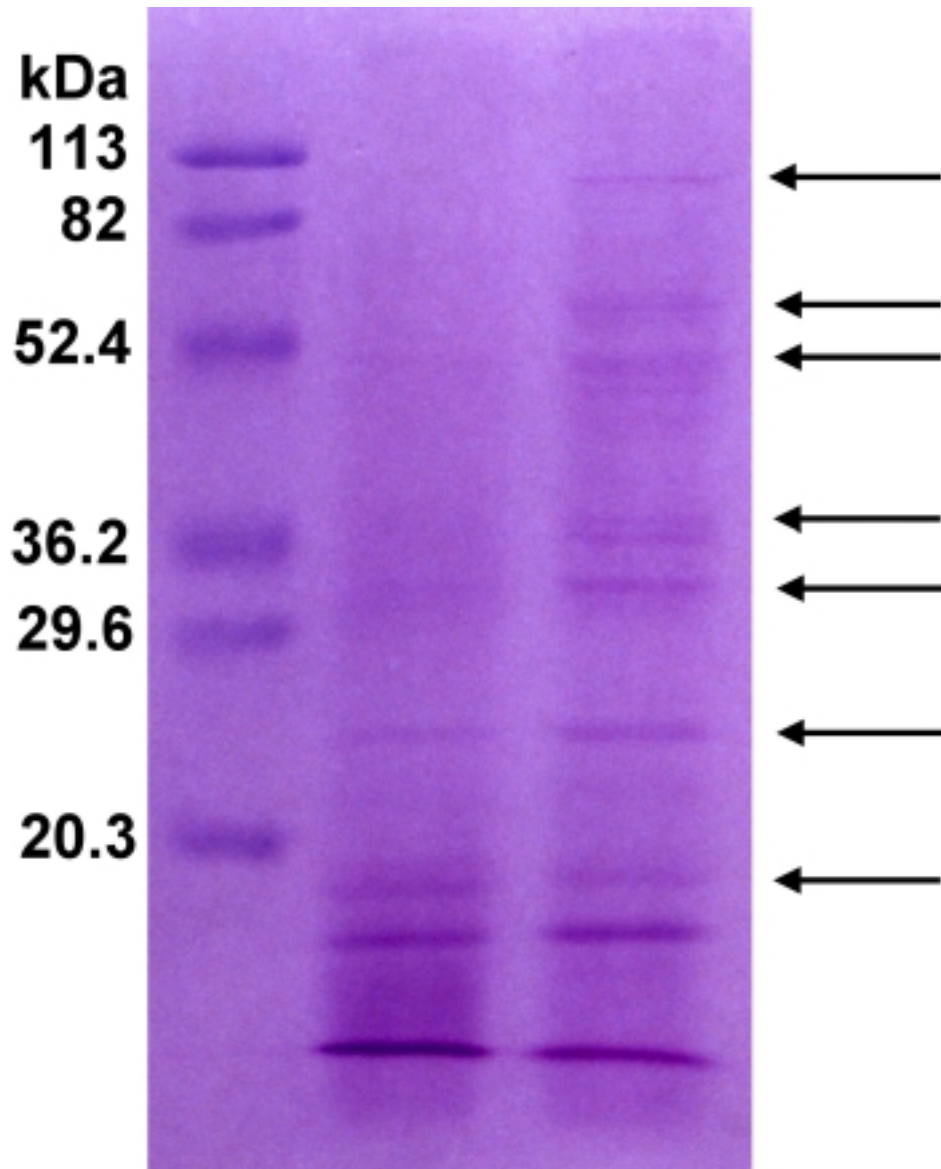


圖 1 對照組(左)與實驗組(右)蛋白質

SDS-PAGE 電泳全圖

“←” 表示有變化的蛋白質

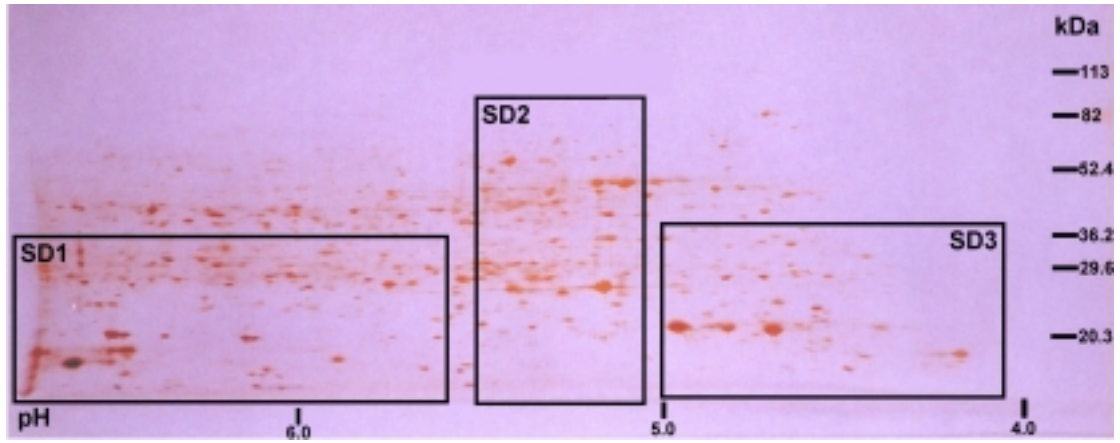


圖 2 實驗組 2D-SDS-PAGE 全圖

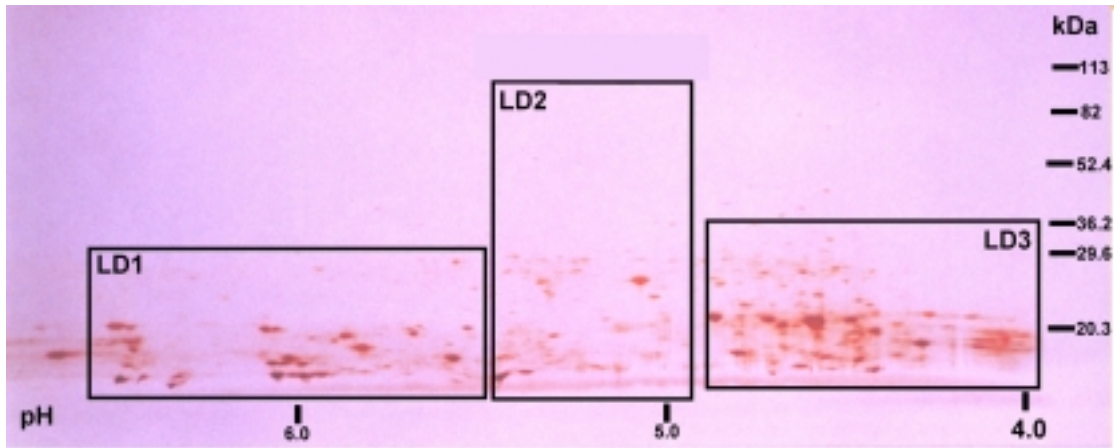


圖 3 對照組 2D-SDS-PAGE 全圖

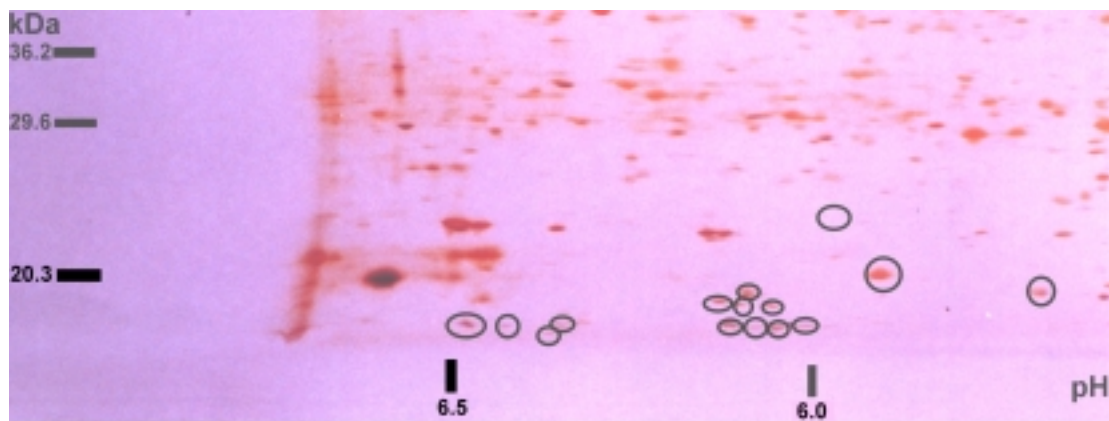


圖 4 SD1 局部放大圖

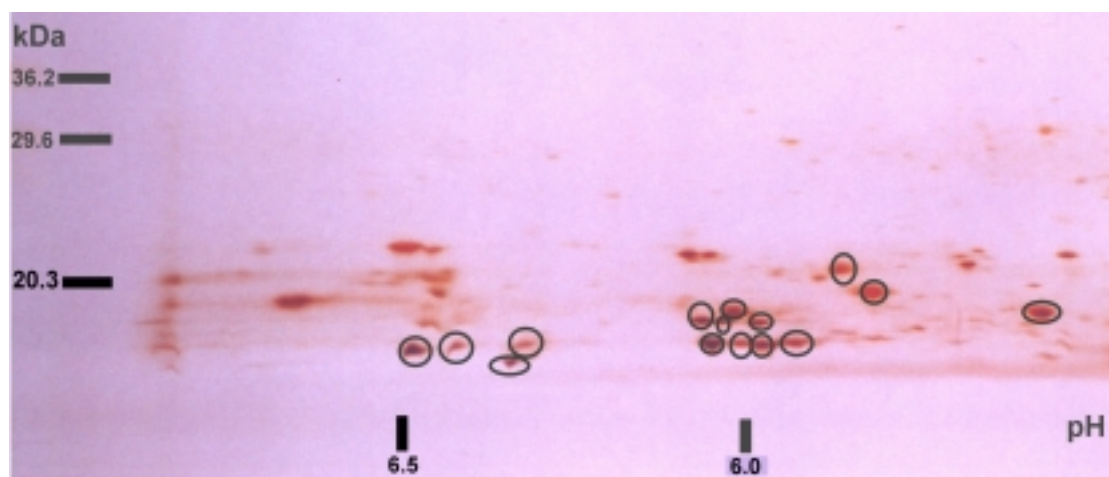


圖 5 LD1 局部放大

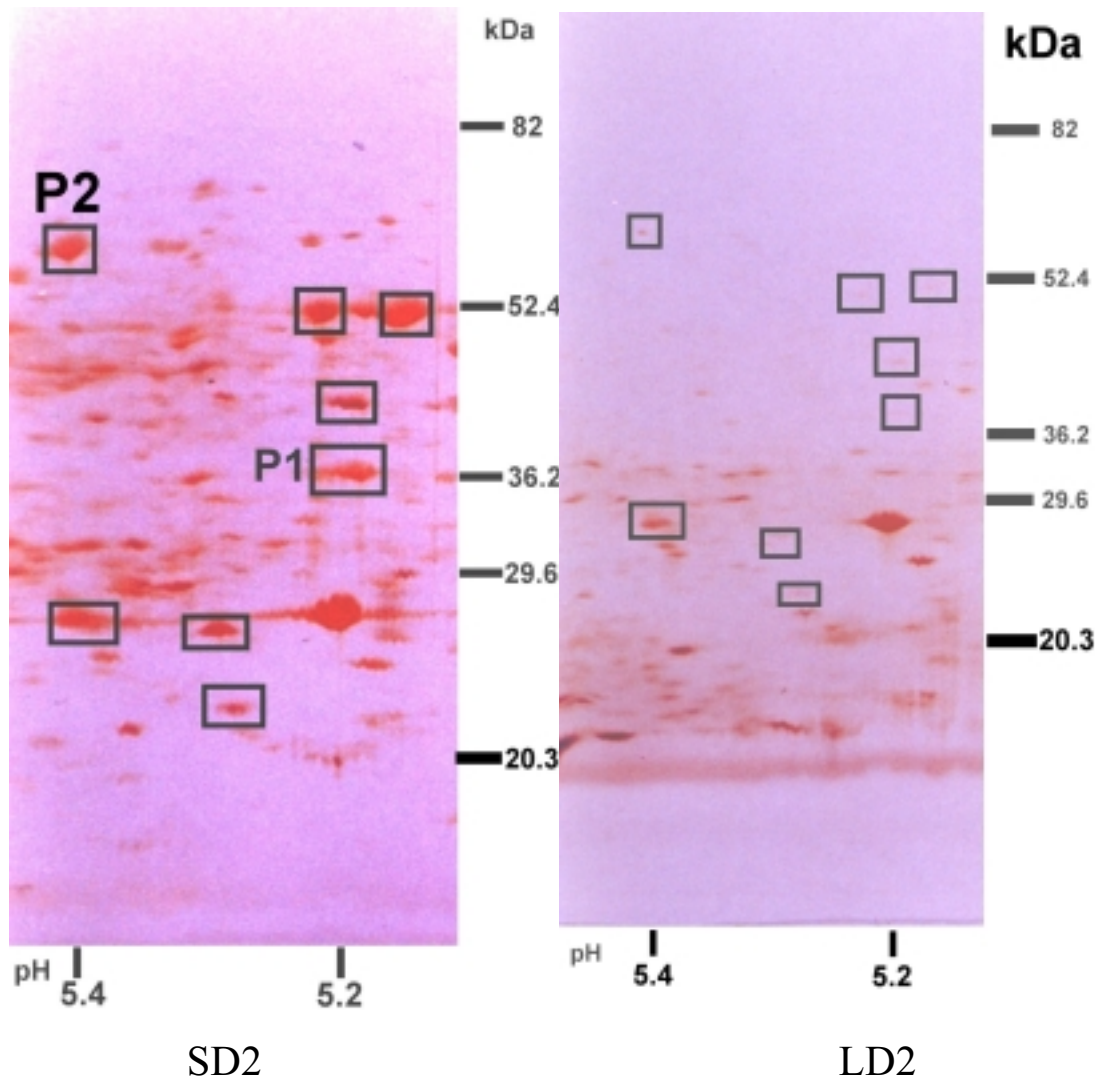


圖 6 SD2、LD2 局部放大圖

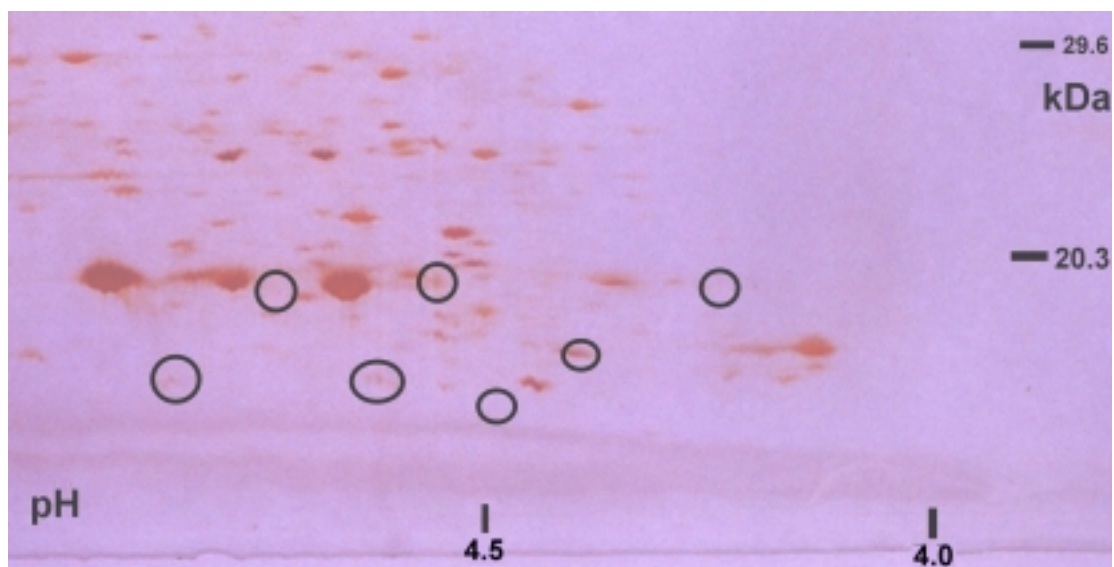


圖 7 SD3 局部放大圖

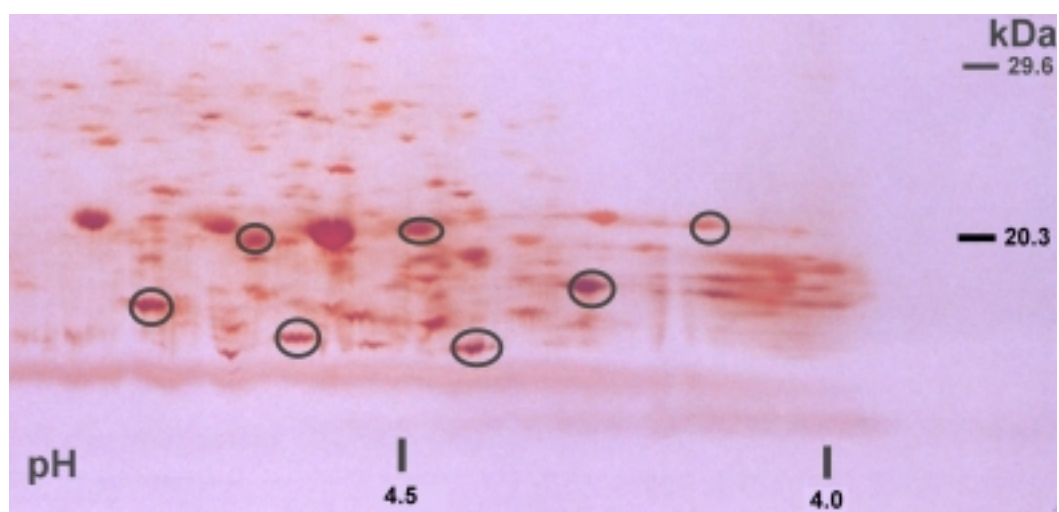
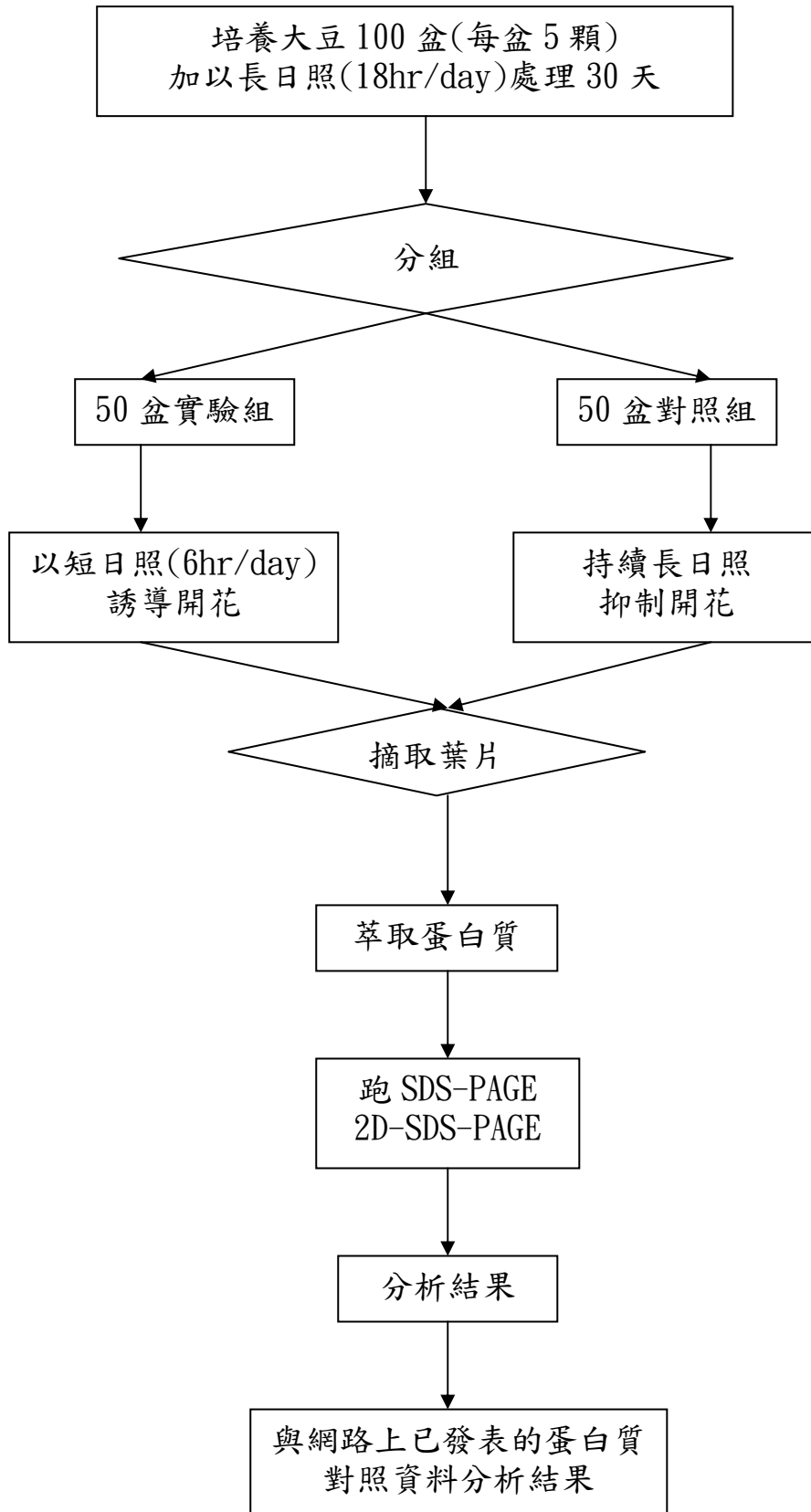


圖 8 LD3 局部放大圖

實驗流程圖



附件

附件一

protein extration buffer

Drugs	Final concentration	Amount
Sucrose	0.7M	239.61g
Tris-base	0.5M	60.55g
HCl	30mM	3ml
EDTA	50mM	18.612g
KCl	0.1M	7.455g
2-mercaptoethanol	2%	20ml
PMSF	1mM	0.4756g

Add ddH₂O to 1000ml

*add protease inhibitor before using

附件二

lysis solution

Drugs	Final concentration	Amount
Urea	8M	19.2g
CHAPS	4%	1.6g
Tris-base	40mM	0.194g

Add ddH₂O to 40ml and store at -20°C

附件三

	Running Gel	Staking Gel
Acrylamide	40.0ml	1.3ml
DH ₂ O	33.5ml	6.1ml
1.5M Tris-HCl,pH 8.8	25.0ml	0ml
0.5M Tris-HCl,pH 6.8	0ml	2.5ml
10%SDS	1.0ml	100 μ l
10%ammonium persulfate	500 μ l	50 μ l
TEMED	50 μ l	10 μ l
Total	100ml	10ml

附件四

Rehydration stock solution with IPG buffer

Drugs	Final concentration	Amount
Urea	8M	12g
CHAPS	2%	0.5g
IPG buffer	0.5%	250 μ l
Bromophenol blue	trace	a few grains

Add ddH₂O to 25 ml

附件五

SDS equilibration buffer

<u>Drugs</u>	<u>Final concentration</u>	<u>Amount</u>
1.5M Tris-HCl,pH8.8	50mM	6.7ml
Urea	6M	72.07g
Glycerol	30%	69ml
SDS	2%	4.0g
Bromophenol blue	trace	a few grains

Add ddH₂O to 200 ml and store at -20°C

*Add DTT 2g ——— solution A
 Iodoacetamide 5g ——— solution B

附件六

固定液

Drugs	Amount
Ethanol	100ml
Acetic acid glacial	25ml

Add dH₂O to 250 ml

附件七

Sliver Staining Protocol for Proteins

Step	Solution	Amount	Time
Sensitizing	Ethanol	75ml	30min
	Glutardialdehyde(25%)	1.25ml	
	Sodium thiosulphate(5%)	10ml	
	Sodium acetate	17g	
	Add dH ₂ O to 250ml		
Washing	dH ₂ O		3x5min
Sliver reaction	Sliver nitrate solution(2.5%)	25ml	20min
	Formaldehyde(37%)	0.1ml	
	Add dH ₂ O to 250ml		
Washing	dH ₂ O		2x1min
Developing	Sodium carbonate	6.25g	2-5min
	Formaldehyde(37%)	0.1ml	
	Add dH ₂ O to 250ml		
	Stir vigorously to dissolve Sodium carbonate		
Stopping	EDTA-Na ₂ · 2H ₂ O	3.65g	10min
Washing	dH ₂ O		3x5min
Preserving	Glycerol(87%)	25ml	20ml
	Add to 250ml dH ₂ O		

Add components marked * immediately before use

Kit and protocol provided by *Pharmacia Biotech*

評 語

- (1) 本研究主要是研究日照長短對大豆開花的影響。
- (2) 雖然已有日照長短對葉片蛋白質種類合成顯著影響結果，但是如何調控開花的機制則未深入研究，這是本文中最大缺陷，否則本文將是一篇很好的學術論文。