

2010年臺灣國際科學展覽會
優勝作品專輯

編號：060005-02

作品名稱

以蛋白質體學方法分析佛手瓜捲鬚之向觸性調控蛋白質
**Proteomic identification of the thigmotropic proteins of
Chayote (*Sechium edule*) tendrils**

得獎獎項

植物學科大會獎二等獎

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學、國立宜蘭高級中學

作者姓名：張容禎、林巧文

指導老師：陳威戎、陳卉

關鍵詞：向觸性、蛋白質體學、佛手瓜、卷鬚

作者簡介



張容禎

我是張容禎，畢業於宜蘭縣復興國中，目前就讀於北一女中二年級，北一科學研習社!!(UCS 好強大)。喜歡繪圖、打籃球、打牌...球。從國二開始便以「無所不捲」參加科展，就此認識了很威的 partner 及很棒的老師，也因此投入實驗室而深深不可自拔。

林巧文

我是林巧文，目前就讀宜蘭高中資優班二年級，喜歡用閱讀探索這個世界，不管是驚悚、推理、科普或是通俗小說，我都可以欣賞。因為開始做生物的實驗後，才發覺生命的世界無窮無盡，決定接下來的人生方向。參加過很多次科展後，真的很感謝全面配合充當司機總務設備顧問的家長，不辭辛勞陪我們日夜趕工的教授老師，還有我最可愛聰明的夥伴，讓我們一起飛吧!

摘要

本研究利用佛手瓜的卷鬚探討向觸性的原理。本研究大致分為兩部份，一方面我們在卷鬚中發現了含量極為豐富的構造，此一螺旋狀構造分布於維管束中，且用雙縮脲試劑檢測後發現其含有蛋白質，且不具有運輸水分的功能；並發現此一構造的分布疏密，會影響到螺旋內側外側以及切割後片段泡溫水的彎曲方向。此外，在進行卷鬚蛋白質電泳的過程中，我們發現使用含尿素的緩衝液萃取蛋白質的效果最佳，1 克的卷鬚乾重約可萃取出 5 毫克的蛋白質，且蛋白質總量會隨著卷鬚的成熟而遞減。利用軟體比對及質譜分析八個蛋白質點，得知此八點的蛋白質為：malate dehydrogenase, oxygen-evolving enhancer protein 1, oxygen-evolving enhancer protein 2, calreticulin, peroxidase, stromal 70 kDa heat shock-related protein, and AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor。由此可知，向觸性為植物經過一連串訊號傳遞後，對外界刺激的順應。

關鍵詞：向觸性、蛋白質體學、佛手瓜、卷鬚

Abstract

In our current study, we investigate the phenomenon of thigmotropism (the response of a plant organ to a mechanical stimulation, typically “touch”) on the model of tendrils of chayote (*Sechium edule*). We have observed a kind of special structures, named as spring-like structure, inside the vascular bundles, between the xylem and phloem. However, it doesn't have any transport function. After stained by Biuret reagent, we proved that spring-like structures contain proteins. That matches some characteristics of thigmotropism, such as significantly affected by thermo and pH factors. Thus, the density of spring-like structure decides the interior or the exterior side of the helixes, one of the expressions of thigmotropism of chayote.

In order to gain further insights into the regulatory proteins involved in the thigmotropism of chayote, proteomic approaches were applied. Chayote tendrils were freshly collected from three growth stages, designated as “immature”, “mature but uncoiled” and “coiled”. During the process of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), we compared the amount of proteins extracted from many buffers, and found that urea-based buffer is the most effective one, from which 5 mg per 1g of tendrils could be extracted. Interestingly, the amount of protein in tendrils is decreasing during the process of maturing. Image analysis by Prodigy SameSpot software revealed 29 spots showing significantly differential expression with increasing maturity. Eight proteins were selected for LC-ESI-Q-TOF MS/MS analysis and were identified as malate dehydrogenase, oxygen-evolving enhancer protein 1, oxygen-evolving enhancer protein 2, calreticulin, peroxidase, stromal 70 kDa heat shock-related protein, and AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor. To the best of our knowledge, this is the first report describing plant thigmotropism using proteomic methodologies. According to our results, thigmotropism of chayote tendrils requires perception of a stimulus, a signal transduction cascade that amplifies the signal and finally the ability to respond to the touch stimulation through a differential growth response.

Keywords : thigmotropism, proteomics, chayote, tendril.

一、前言

向性(tropism)的定義為植物器官受到外界環境刺激後所產生之反應(高, 1979)。向觸性是一種因接觸或碰觸的刺激而引起的向性生長運動。Darwin(1881)認為向觸性是普遍存在植物的一種現象。當他研究植物根的生長時，發現利用機械刺激豆科植物的根，根的生長會些微改變方向，展現出向觸性的特徵。這似乎是一種正向適應，有利於當植物的根遭遇到固體阻礙物，可以繞著阻礙物生長(Wilson, 1967)。有一系列的報告指出，單一方向摩擦 *Avena sativa*, *Ranunculus arvensis*, *Brassica oleracea* and *Panicum sp.* 這些植物種子的幼芽，幼芽會朝向摩擦方向彎曲(Stark, 1916, 1917, 1919, 1922, 1927)。Schrank(1944)證實單側機械擾動(mechanically perturbation)，可造成植物的向觸性；Huberman and Jaffe(1986)又更進一步利用豌豆的卷鬚進行單側機械擾動時，而豌豆亦朝向該側彎曲。

有些研究是認為卷鬚的向觸性與細胞膨壓有關，外側的細胞因膨壓加大而伸長乃造成卷鬚呈螺旋狀彎曲。Yan(1963)發現在高等植物中存在類似骨骼肌的收縮蛋白，並證明該蛋白即肌動蛋白，Jaffe 和 Galston(1967)以同樣方法證明豌豆卷鬚中存在具收縮性的 ATP 酶。Lou(1996)提出卷鬚的快速向觸性運動是靠動作電位傳遞引起下段組織原生質體收縮來完成的。因此植物傳遞向觸訊號至另一部位與動作電位(action potential)有關，植物荷爾蒙也許亦參與其中(Jaffe *et al.* 2002)。

本研究材料為佛手瓜(*Sechium edule*)，它利用卷鬚攀附在物體上生長且捲曲的形式十分特別，不僅在末端會纏繞物體，且卷鬚其他部位會形成螺旋的結構。

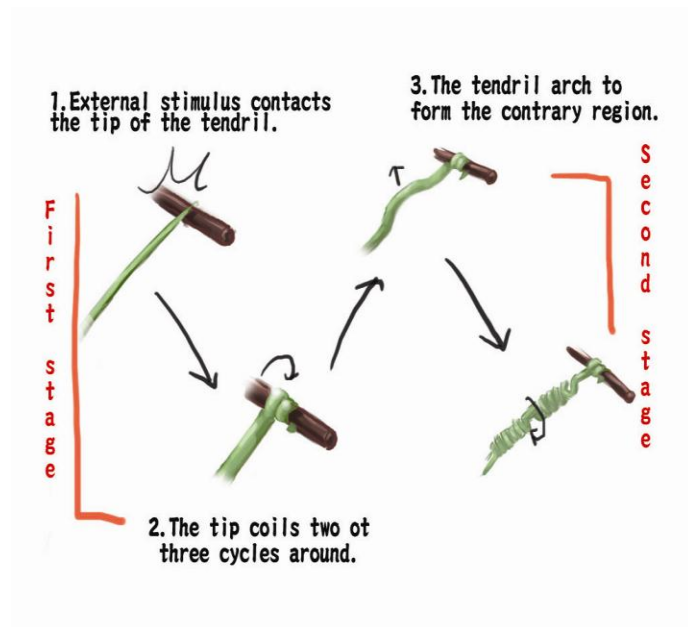


Figure 1 兩階段示意圖

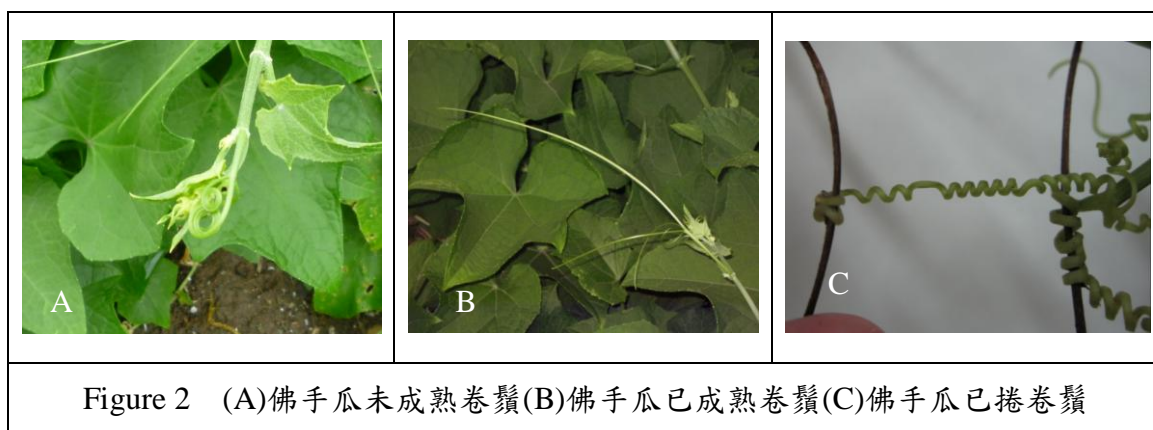
我們在之前的研究中發現，佛手瓜卷鬚在物體碰觸卷鬚後五分鐘內，末端會勾起並纏繞物體一到三圈，我們將此定義為「向觸性的第一階段」；之後，在十二小時內，卷鬚的中段便會拱起一區域，稱之為「逆向轉折區」，此一逆向轉折區會360度旋轉，在二十四小時內便會形成至少兩段的反向螺旋，我們將此定義為「向觸性的第二階段」(Figure 1)。也發現到溫度、酸鹼值在卷鬚末端灣區和形成螺旋有重大的影響，並利用玉米芽鞘實驗和添加 IAA 證明生長激素會影響卷鬚第二階段的向觸性。我們在之前的切片中也發現了一種螺旋狀的構造存在於卷鬚的維管束中，它並非屬韌皮部也不屬木質部，我們將之命名為似彈簧構造(spring-like structure)。除了佛手瓜，我們在同為瓜科的絲瓜(*Luffa cylindrica*)和苦瓜(*Momordica charantia*)卷鬚中，也發現含量豐富的似彈簧構造。

雖然相關的研究指出卷鬚的向觸性與生長激素、肌動蛋白和動作電位有關，但是到底是什麼原因讓它具有向觸性?我們希望探討出卷鬚內部特殊結構和蛋白質與向觸性之間的關係。

二、研究材料及方法

(一)、材料

本實驗是以佛手瓜(*Sechium edule*) 卷鬚作為研究對象，我們從學校附近的菜園分別取得未成熟卷鬚、已成熟卷鬚及已捲卷鬚，將其放置於冰桶帶回實驗室進行實驗。



(二)、探討似彈簧構造(spring-like structure)的組成及功能

1.似彈簧構造(spring-like structure)的組成

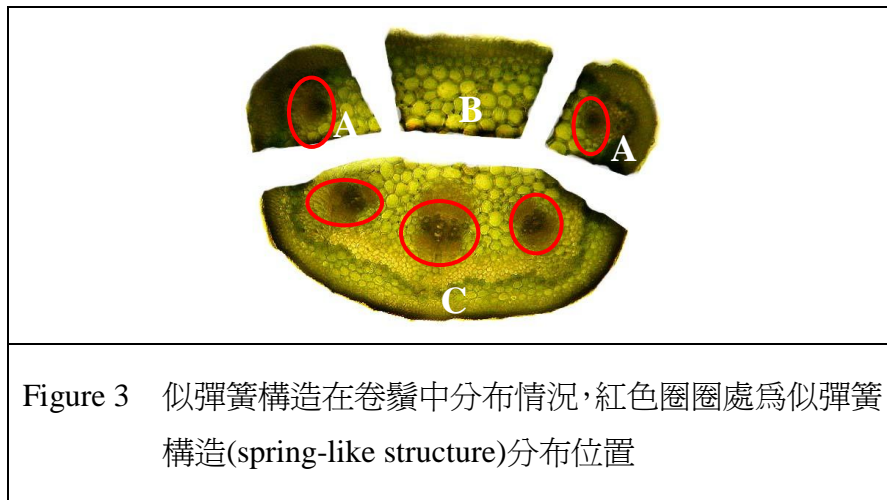
取佛手瓜卷鬚包含未成熟卷鬚、已成熟卷鬚及已捲卷鬚，分別加入 biuret 及 congo red，之後徒手切片後用複式顯微鏡觀察其似彈簧構造(spring-like structure)。

2.似彈簧構造(spring-like structure)與植物水分運輸之關係

我們查詢植物解剖的相關書籍，導管按照細胞壁厚薄分佈的不同，可區分為環紋導管、螺紋導管和孔紋導管三種(蔡,民 77)，我們發現環紋導管與螺紋導管的外形與我們觀察到的似彈簧構造(spring-like structure)最為相似。因此我們利用紅墨水測試其是否具有運輸水分的能力，以瞭解兩者是否為同一構造。

3. 分離似彈簧構造(spring-like structure)

我們將卷鬚橫切面分成 A、B、C (Figure 3) 三個部分使得似彈簧構造 (spring-like structure) 主要分布在 A、C，且 C 似彈簧構造 (spring-like structure) 含量大於 A。我們將這三個部分切成小塊泡在水裡 5 分鐘，以減少膨壓對卷鬚彎曲的影響，之後再加入溫水 10~15 分，直至卷鬚不再發生變化後，以肉眼觀察其變化。



(三)、探討參與向觸性過程之蛋白質

1. 佛手瓜卷鬚的蛋白質萃取

(1) 蛋白質萃取的緩衝液比較

採集佛手瓜卷鬚，剪碎成長寬各不超過 1 cm 之碎片，稱重後取 1.5 g 放置於研鉢中。加入液態氮冷凍 30 秒，待液態氮蒸發後以杵搗碎製粉末狀，重複 3 次。取 1 g 粉末於 15 ml 離心管中，加入 [10 % trichloroacetic acid、0.07 % 2-mercaptoethanol in acetone] 3 ml 混勻後靜置於 -20 °C 冰箱中 2 小時。以 15000 xg 離心 30 分鐘後，去除上清液。再加入 [0.07 % 2-mercaptoethanol in acetone] 3 ml 混勻後靜置於 -20 °C 冰箱中 10 分鐘，之後以 15000 xg 離心 30 分鐘後，去除上清液，重複 3 次。以真空幫浦將有樣品中的有機溶劑抽出。分別加入 RIPA、urea-based buffer、SDS sample

buffer 各 1 ml。再以超音波洗淨器震盪 15 分鐘後於冰上冷卻 5 分鐘，重複 4 次。以 15000 xg 離心 30 分鐘後，吸取上清液。取 200 μ l 蛋白質分析試劑依序加入 10 μ l 分別已稀釋為 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 以及 1.0 mg/ml 之牛血清白蛋白標準品與經過適量稀釋之待測蛋白質樣品，於 96 孔微量盤上均勻混合，靜置 10 分鐘後以多功能全光譜微量盤分析儀偵測波長 595nm 之吸光值。利用不同濃度牛血清白蛋白標準品之吸光值進行線性迴歸取得線性迴歸公式，並將迴歸線相關係數控制在大大於 0.97。最後將待測樣品之吸光值代入線性迴歸公式即可求得蛋白質濃度。

(2) 蛋白質總量比較

取未成熟卷鬚、已成熟卷鬚及已捲卷鬚，經過上述之前處理，並控制搗碎後的樣品粉末為 1 g，得到其蛋白質濃度。

2. 蛋白質二維電泳的操作與分析

(1) 蛋白質二維電泳的操作

取 200 μ g 且體積不大於 125 μ l 之蛋白質樣品(已經過上述之前處理)，加入等電點電泳膠條陶瓷容槽內，此時如加入的體積不足 125 μ l 則加入適量復水緩衝液補足。接下來將乾燥膠條上按照相對應之電極方向且膠面朝下放入陶瓷容槽內，最後再加入適當體積之礦物油覆蓋膠條。蓋上容槽上蓋後即可放入等電點聚焦電泳儀，其程序設定的電壓及時間(Figure 4)：

Step		Voltage (V)	Duration	Vhr
Rehydration	—	10	14 hr	—
Step 1	Step on hold	300	30 min	150 Vhr
Step 2	Step on hold	500	30 min	250 Vhr
Step 3	Gradient	1000	30 min	500 Vhr
Step 4	Gradient	5000	2 hr	10000 Vhr
Step 5	Step on hold	5000	30 min	2500 Vhr

Figure 4

焦集電泳完成後將膠條取出，以二次蒸餾水沖洗殘留的礦物油，之後依序放入分別含有 100 mg DL-dithiothreitol 與 250 mg iodoacetamide 之平衡緩衝液 [equivalent buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 8.8)、6 M urea、30 % glycerol、2 % dodecyl sulfate sodium salt (SDS)、0.02 % bromophenol blue] 10 ml，於室溫下搖晃 15 分鐘進行平衡反應。平衡完成後的膠條最後進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠電泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE)，其分離膠體濃度為 15%，焦集膠體濃度為 3%。其詳細配方如下表：

	3 % Stacking gel	15 % Separating gel
30 % Acrylamide-0.8 % bis-acrylamide	150 μ l	3.5 ml
1.5 M Tris-HCl	-	1.75 ml
0.5 M Tris-HCl	375 μ l	-
10 % SDS	15 μ l	70 μ l
Ammonium persulfate	75 μ l	350 μ l
TEMED	4 μ l	3 μ l
dH ₂ O	885 μ l	1.33 ml

Figure 5

將平衡完成的膠條先以二次蒸餾水稍微沖洗以去除表面的平衡緩衝液；電泳緩衝液內含有 0.025 mM Tris、0.192 mM glycine、0.1 % SDS。先以固定電壓 70 伏特進行電泳約 30 分鐘，待膠片上的追蹤染劑進入分離膠體時，增加電壓至 100 伏特進行電泳約 3 小時。完成電泳後將膠片拆下，置於裝有一次蒸餾水的容器中，於振盪器以 80 rpm 清洗 10 分鐘以去除 SDS，以上步驟依需求重複 3~4 次，以確保後續染色不被 SDS 干擾。待膠片內之 SDS 完全去除後，即可將膠片移至含有再 50 ml Coomassie blue G-250 染劑之容器，置於振盪器以 80 rpm 震盪進行染色；染劑內含有 0.01 % Brilliant Blue G-250、5 % ethanol、8.5 % phosphoric acid。染色 1

小時後，將膠片以適量一次蒸餾水退除膠內多餘的染劑，將膠片浸泡於一次蒸餾水保存於 4°C 冰箱。

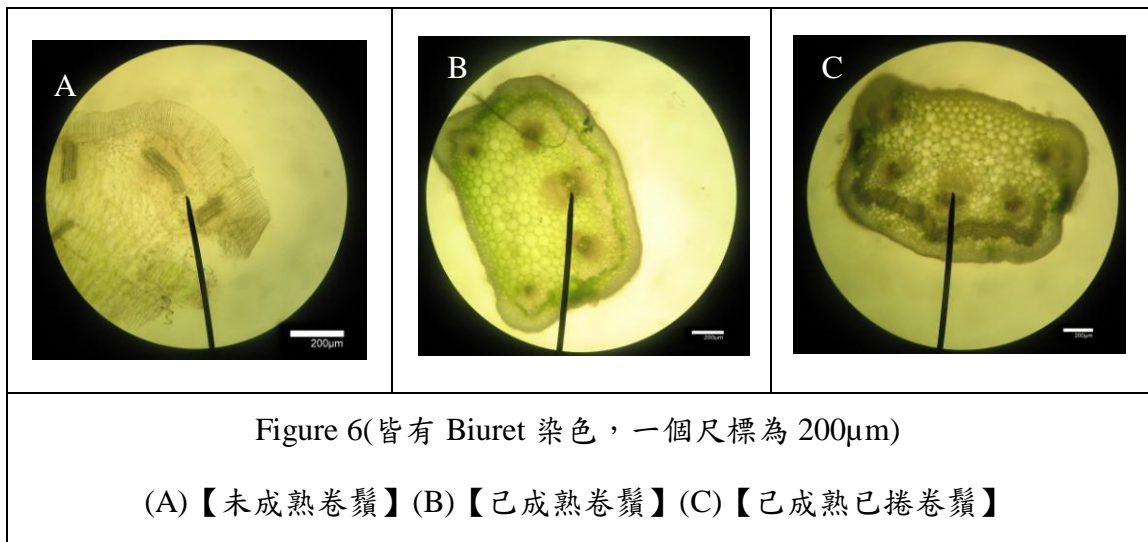
(2) 蛋白質二維電泳的分析

利用 Prodigy SameSpot 軟體分析未成熟卷鬚、已成熟卷鬚及已卷卷鬚之蛋白質二維電泳膠片。並選出蛋白質送出鑑定。

三、研究結果與討論

(一)、探討似彈簧構造(spring-like structure)的組成及功能

1、似彈簧構造(spring-like structure)的組成



似彈簧構造(spring-like structure)一直存在於佛手瓜卷鬚中(Figure 6)，卷鬚、葉柄、莖之組織切片中均發現有似彈簧構造(spring-like structure)，且為整束連續的存在於木質部及韌皮部之間。

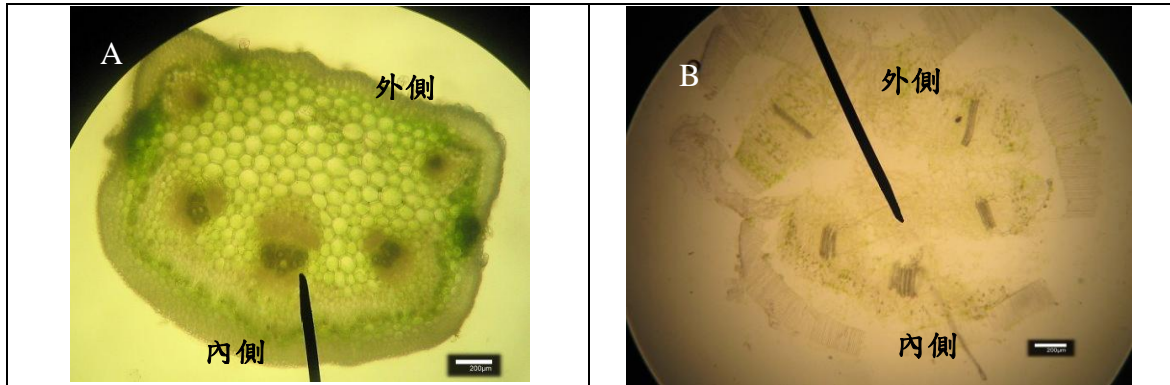


Figure 7(皆有 Biuret 染色，一個尺標皆為 200µm)

(A)未捲已成熟的卷鬚橫切面(B)未捲已成熟的卷鬚橫切面(經壓扁後)

在卷鬚內側有較多的似彈簧構造(spring-like structure)。我們推測這是因為當卷鬚碰觸到物體時，似彈簧構造(spring-like structure)產生形變，進而牽引卷鬚向內彎曲。

在先前的研究中我們確定了佛手瓜卷鬚碰觸位置不同會影響卷鬚捲曲的形成。卷鬚捲曲的速率依序為碰觸末端 $3\text{cm} > 1/4 > 1/3 > 1/2$ ，佛手瓜卷鬚碰觸卷鬚愈末端，卷鬚捲曲速率及程度愈大。

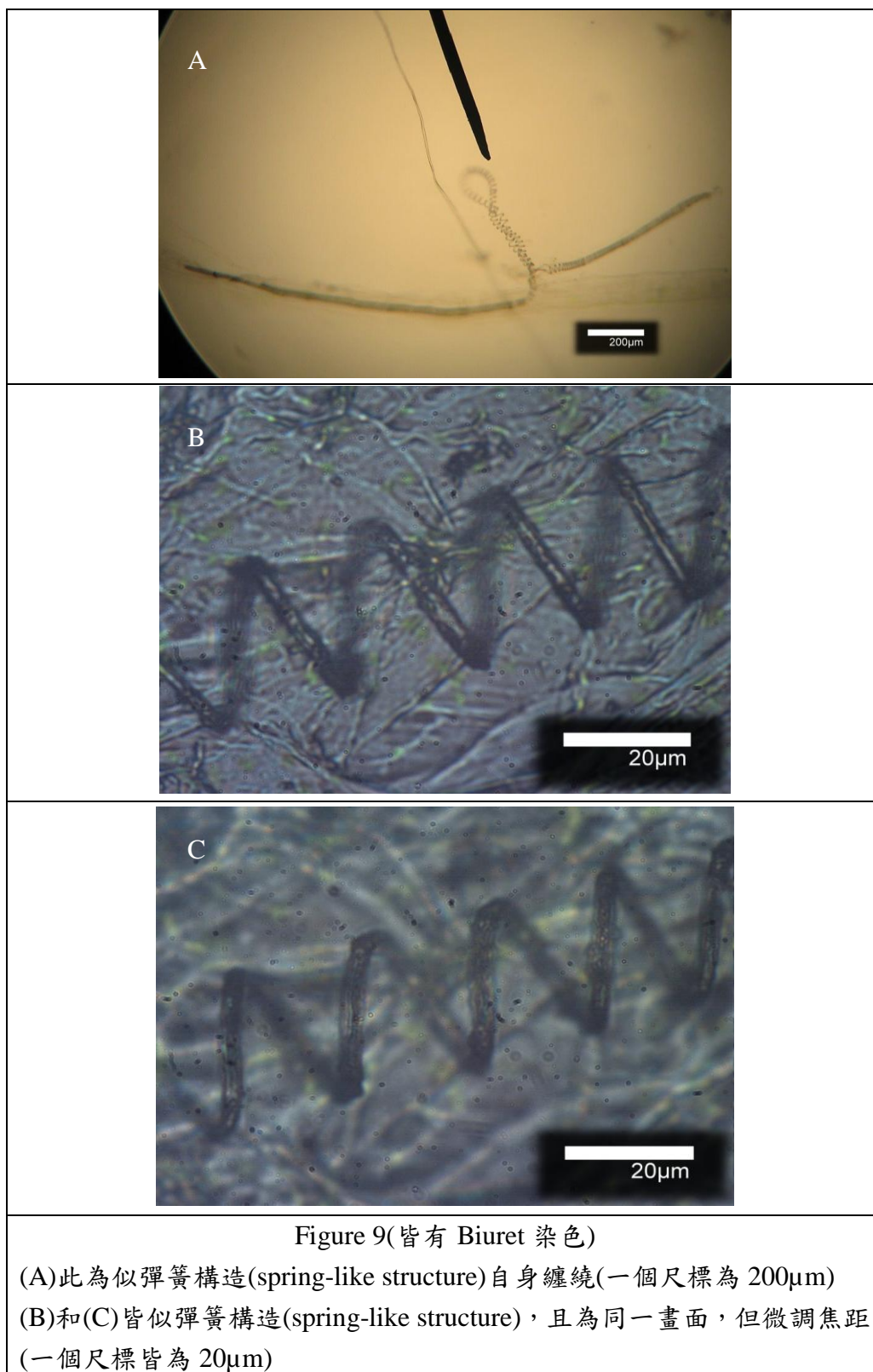


Figure 8(皆有 Biuret 染色，一個尺標為 20µm)

卷鬚末端的似彈簧構造(spring-like structure)

愈往卷鬚末端，似彈簧構造(spring-like structure)不僅愈豐富且愈細長(Figure 8)

碰觸點愈接近卷鬚末端，發生卷鬚捲曲速率愈快。在「佛手瓜卷鬚的形成及內部構造」的實驗中，亦發現卷鬚末端的似彈簧構造(spring-like structure)細長、含量豐富且螺旋直徑小。此結果顯示似彈簧構造(spring-like structure)與卷鬚的第一階段捲曲息息相關。



由 Figure 9 可看出似彈簧構造(spring-like structure)為一立體螺旋構造，非平面管狀構造。

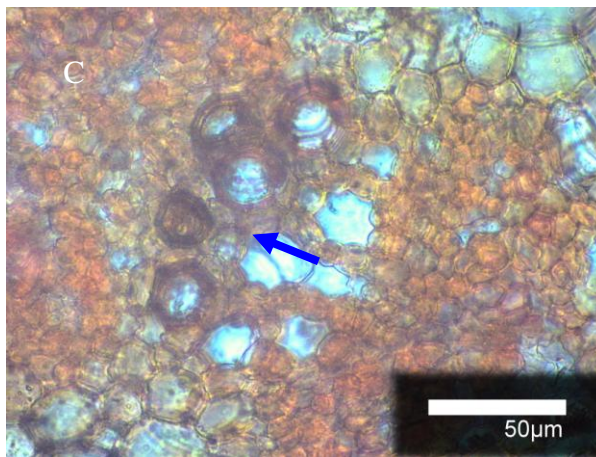
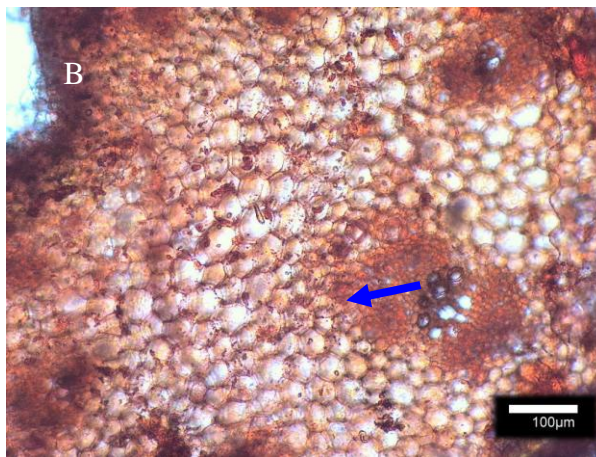
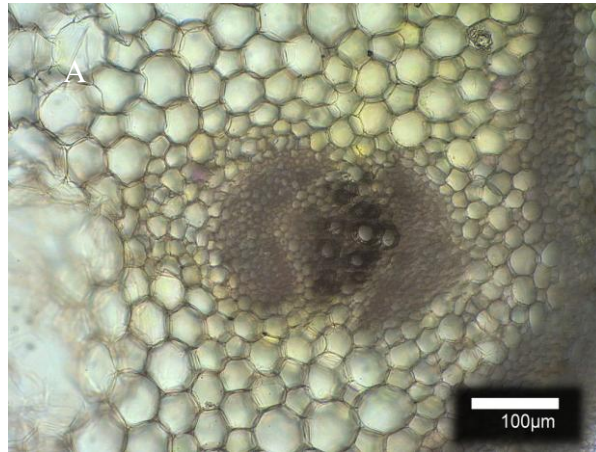
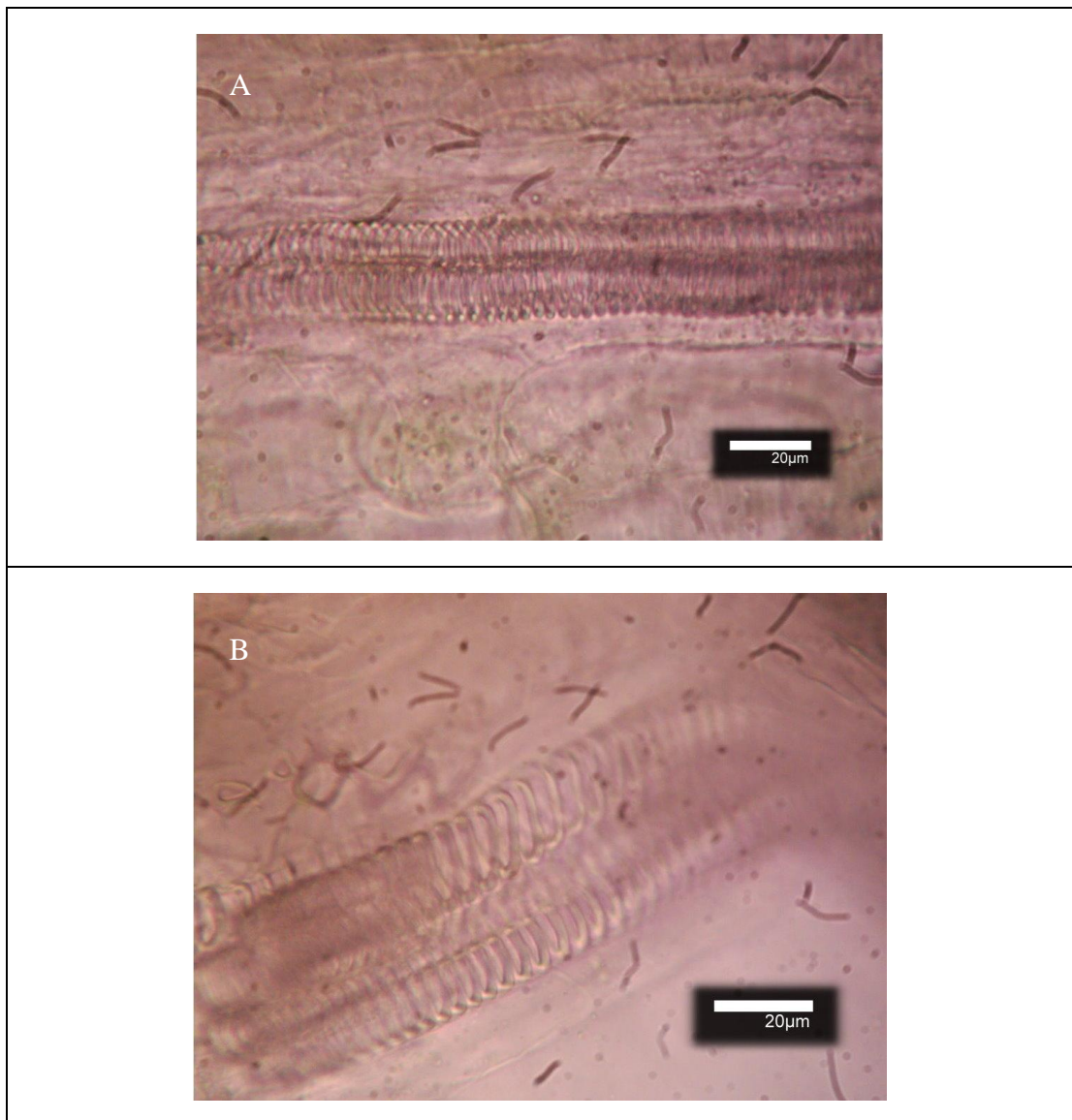
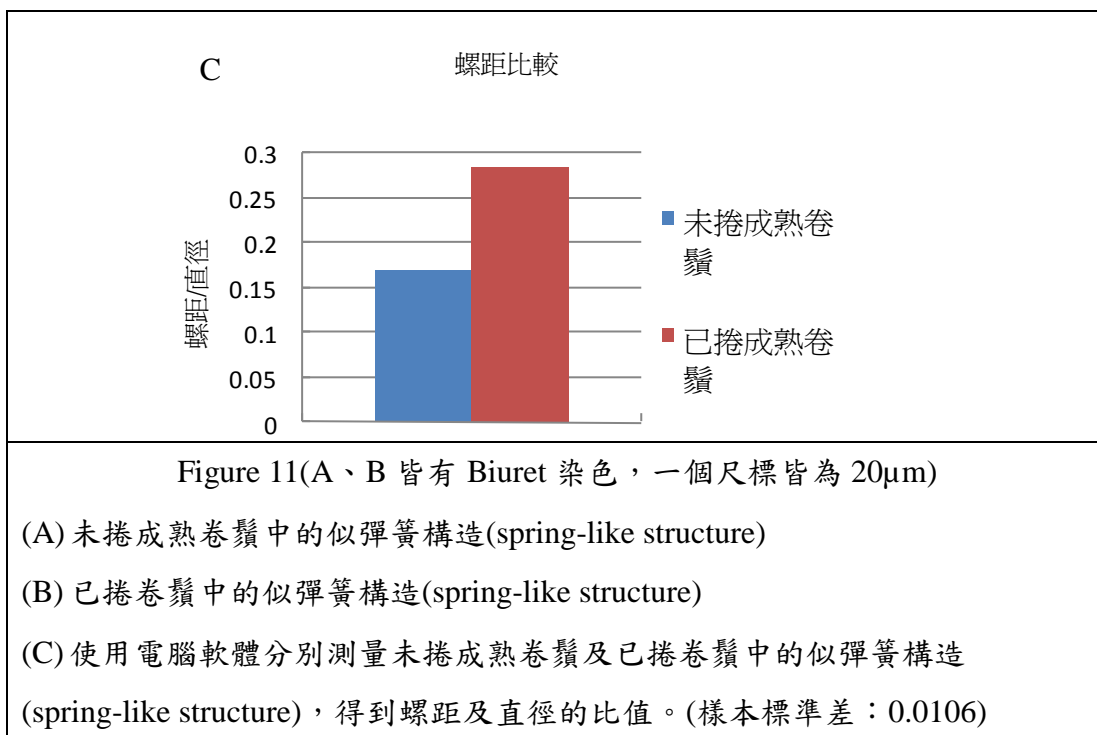


Figure 10(皆有 Biuret 染色, A、B 一個尺標為 100 μ m, C 為 50 μ m)
 (A) 未捲已成熟卷鬚橫切面
 (B) (C) 皆為未成熟卷鬚橫切面, 皆 congo red 染色。箭頭指處缺乏似彈簧構造(spring-like structure)

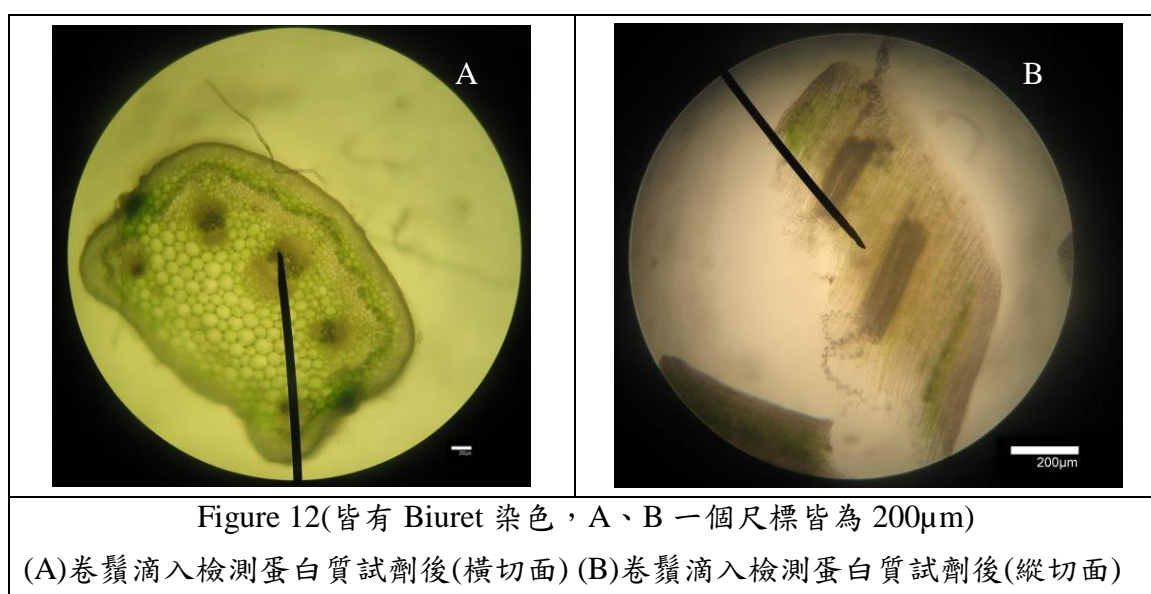
實驗過程中我們發現佛手瓜卷鬚的成熟度會影響卷鬚的捲曲，未成熟的卷鬚是無法形成捲曲。

圖中(Figure 7)可以明顯的看到，和成熟未捲卷鬚相比，在同樣的部位中，無法表現向觸性的未成熟卷鬚的似彈簧構造(spring-like structure)還未完全發育。這也證明了似彈簧構造(spring-like structure)和卷鬚向觸性有十分密切的關連。





圖(Figure 11)中可以看到，已捲卷鬚似彈簧構造(spring-like structure)的螺距明顯比未捲卷鬚來的大，其螺距及直徑的比值分別為 0.285 及 0.170。我們推測這是因為似彈簧構造(spring-like structure)具有收縮性，當螺線中的蛋白質收縮時，會造成似彈簧構造(spring-like structure)的長度變小，螺距變大，而使得卷鬚彎曲(Figure 12)。



在滴入檢測蛋白質試劑後，卷鬚中的似彈簧構造(spring-like structure)反應結果呈紅紫色(Figure 12.B)，證明似彈簧構造含有蛋白質成分。

2. 似彈簧構造(spring-like structure)與植物水分運輸之關係

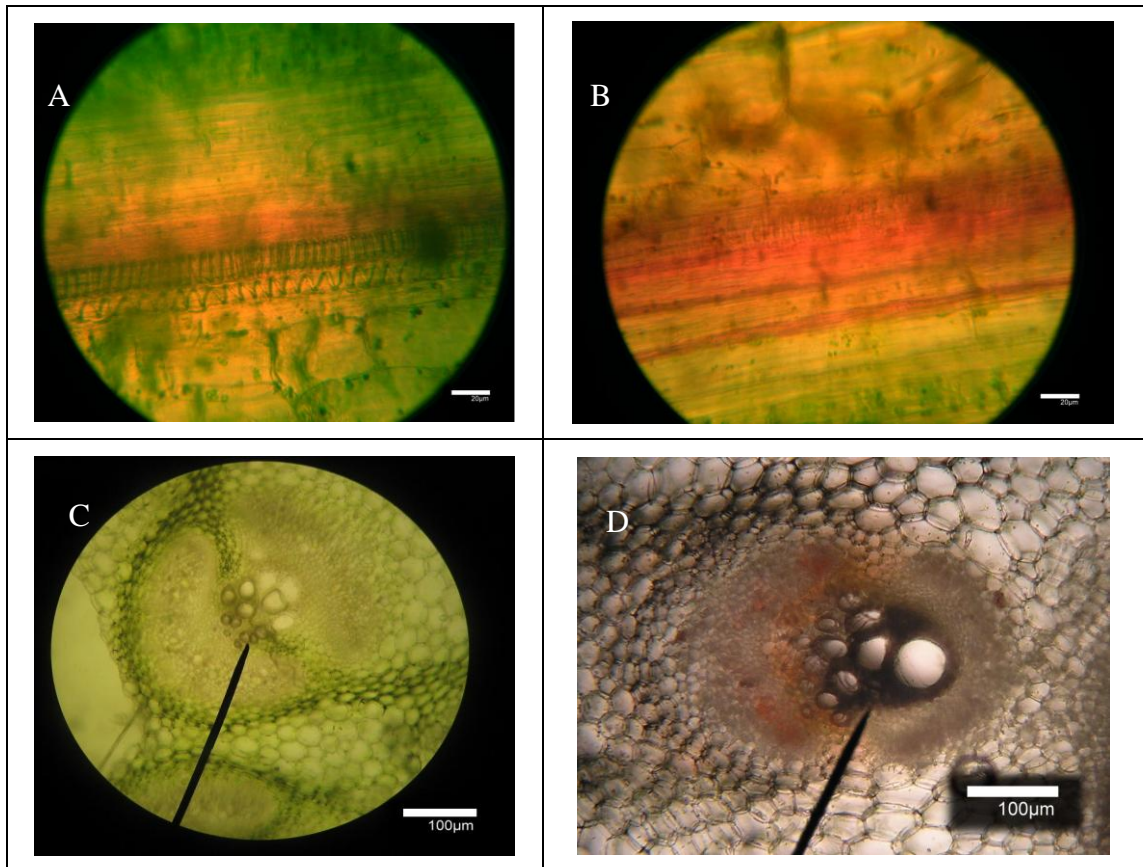


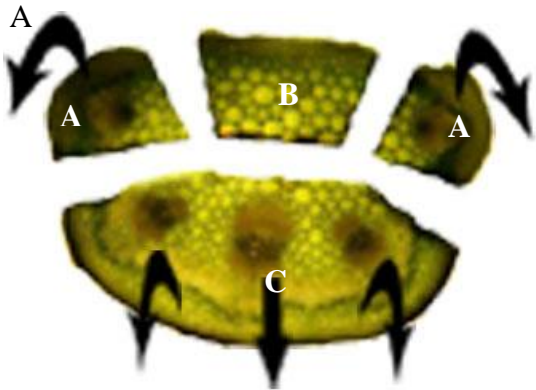
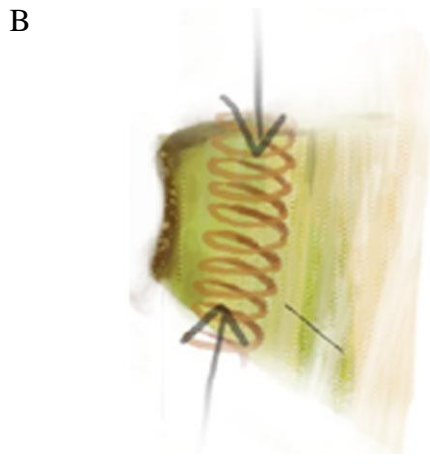
Figure 13(皆有 Biuret 染色, A、B 一個尺標皆為 20 μm , C、D 一個尺標皆為 100 μm)

(A)(B)卷鬚已吸紅墨水的縱切面(經過電腦調高對比後)

(C)莖尚未吸紅墨水的橫切面 (D)莖已吸紅墨水的橫切面

由 Figure 13 可知，運輸水分的路徑和似彈簧構造(spring-like structure)不同 (Figure 14)，證明似彈簧構造(spring-like structure)不具有運輸水分的功能。

3. 分離似彈簧構造(spring-like structure)

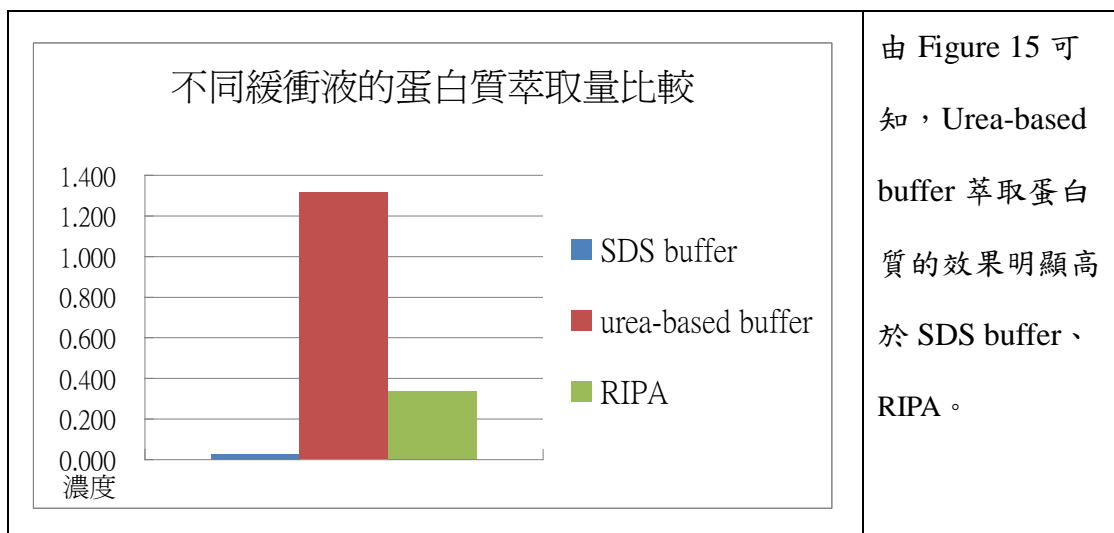
	<p>Figure 14</p> <p>(A)我們發現 A、C 都朝非切口側彎曲，而 A 彎曲的幅度小於 C。B 則不彎曲。</p>
	<p>(A) 卷鬚彎曲示意圖似彈簧構造(spring-like structure)的形變，牽引卷鬚朝向內側彎曲。</p>

A 和 C 含有似彈簧構造(spring-like structure)，所以加入溫水後，似彈簧構造(spring-like structure)形變後，卷鬚片段會往較靠近似彈簧構造(spring-like structure)分布的一側彎曲。由於分布在 A 的似彈簧構造(spring-like structure)的量較在 C 的量少，所以捲曲的幅度以 C 最為明顯。此實驗證明似彈簧構造(spring-like structure)具有形變並牽引卷鬚彎曲的功能。

(二)、探討參與向觸性過程之蛋白質

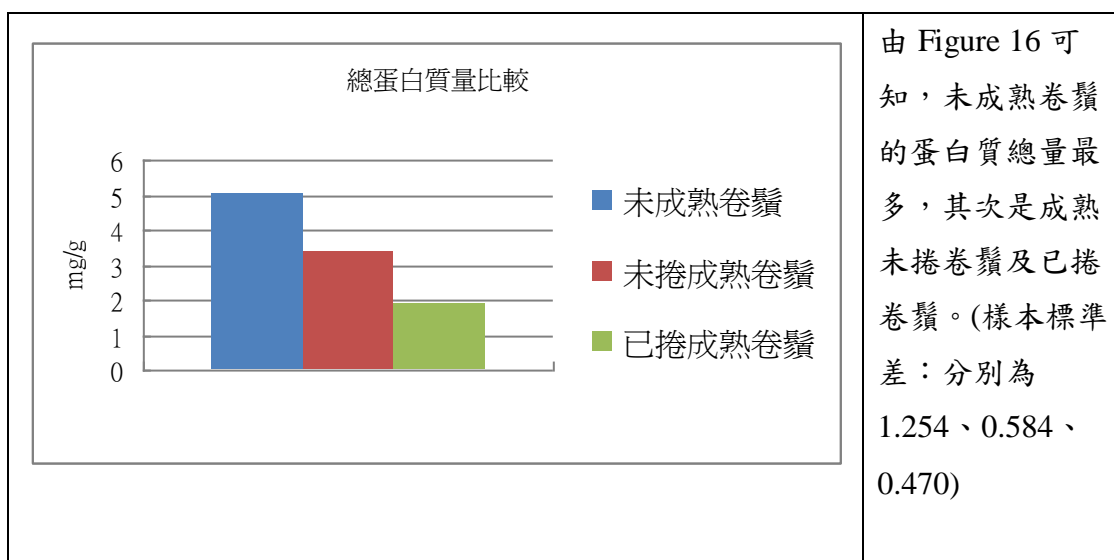
1. 佛手瓜卷鬚的蛋白質萃取

(1) 蛋白質萃取的緩衝液比較



因為等電點聚焦法中使用的 rehydration buffer 亦含有 urea，所以接下來的萃取蛋白質的步驟我們皆使用 rehydration buffer。

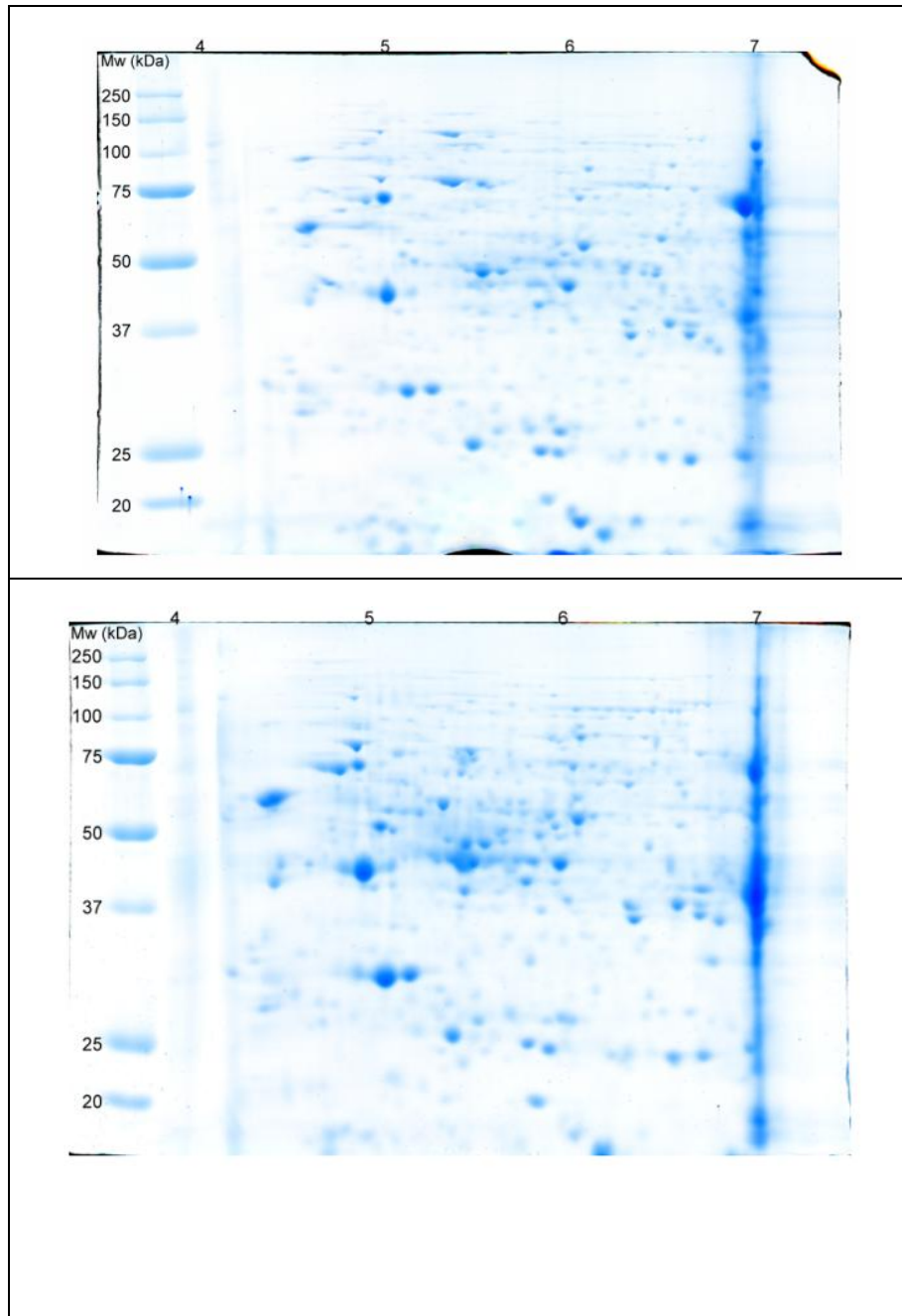
(2) 蛋白質總量比較

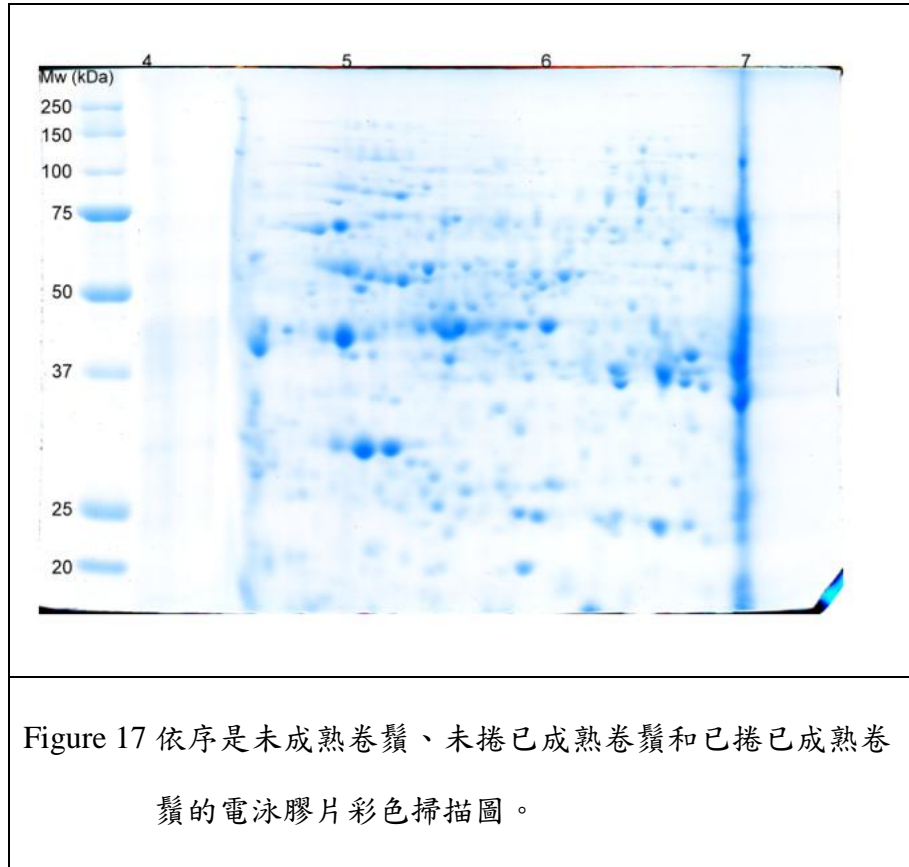


卷鬚的蛋白質總量隨著成熟捲曲而減少。

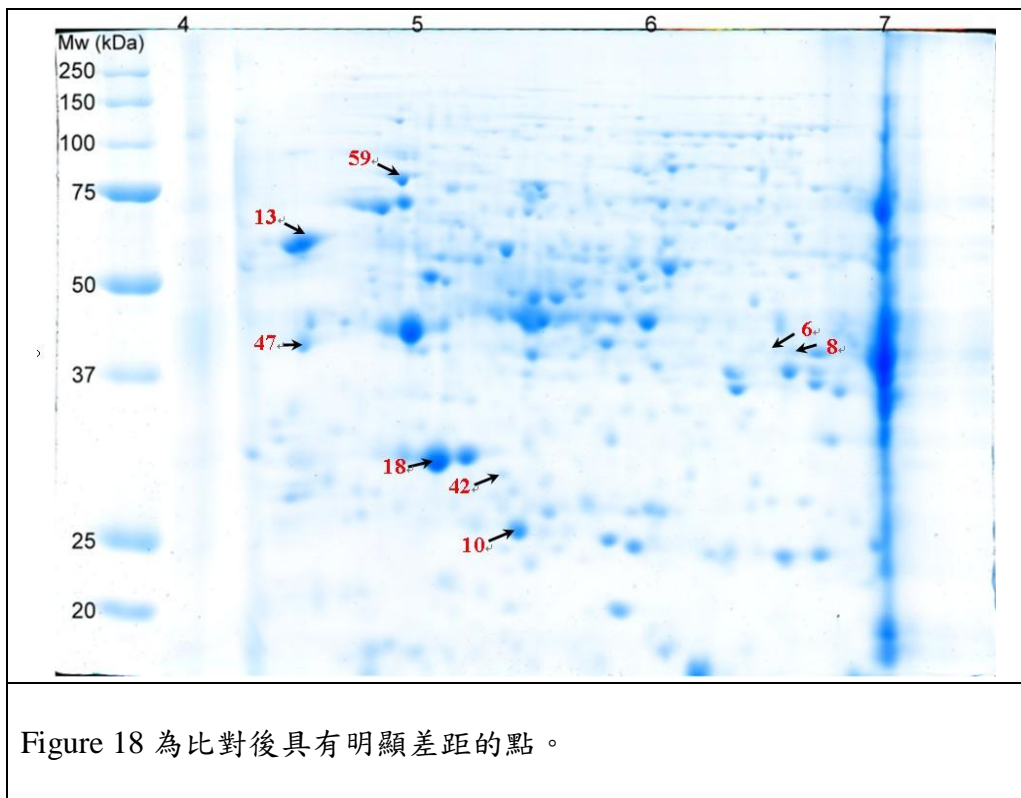
2. 蛋白質二維電泳的操作與分析

(1) 蛋白質二維電泳的操作

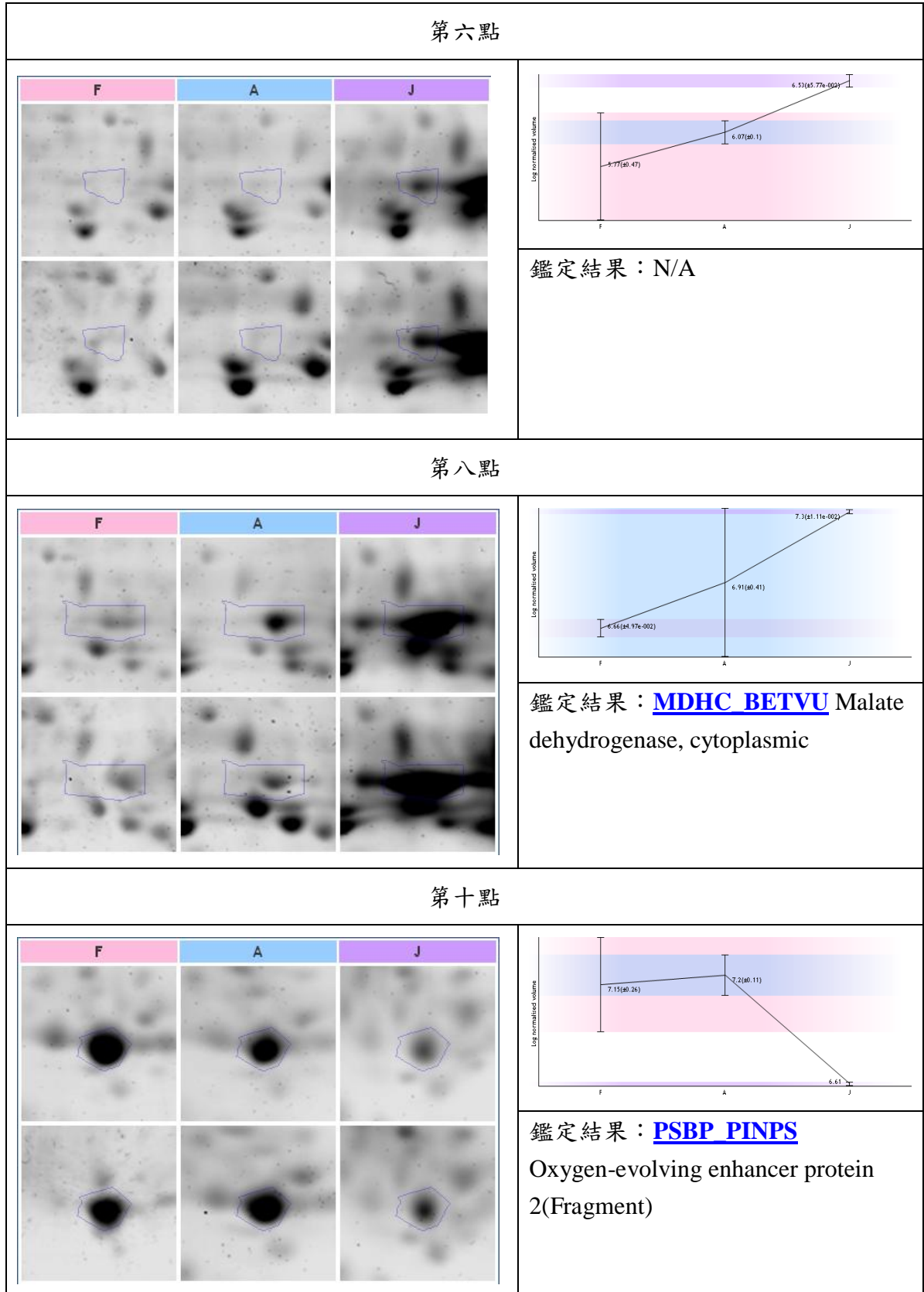




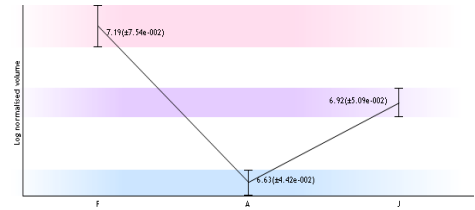
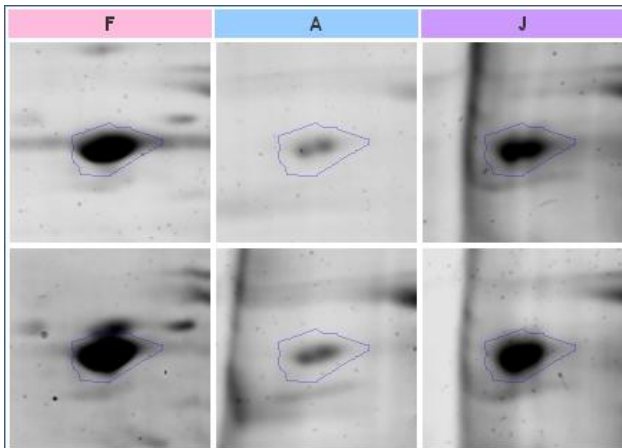
(2)蛋白質二維電泳的分析



在下圖中，F代表未成熟卷鬚，A代表未捲已成熟卷鬚，J代表已捲已成熟卷鬚。

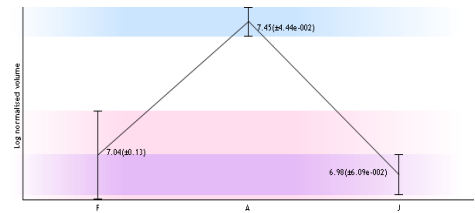
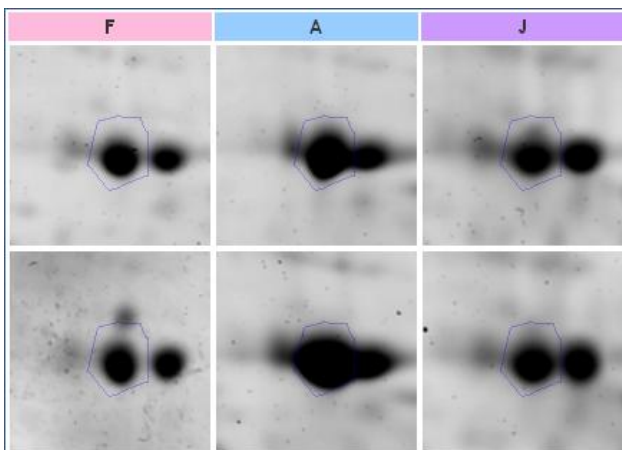


第十三點



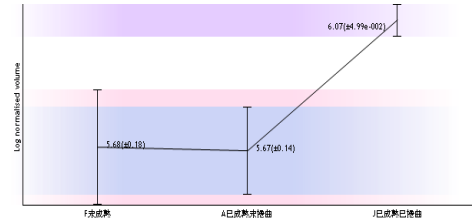
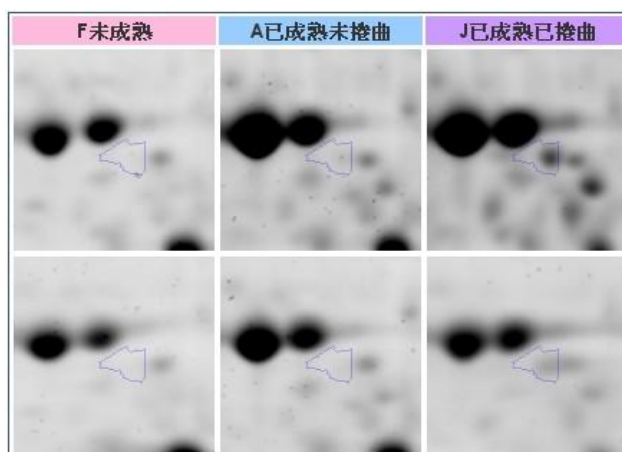
鑑定結果：[CALR_BERST](#)
Calreticulin

第十八點



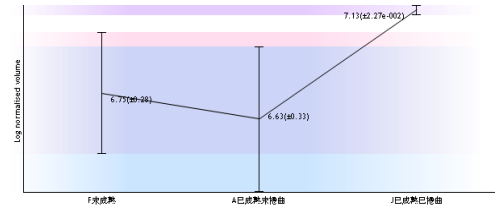
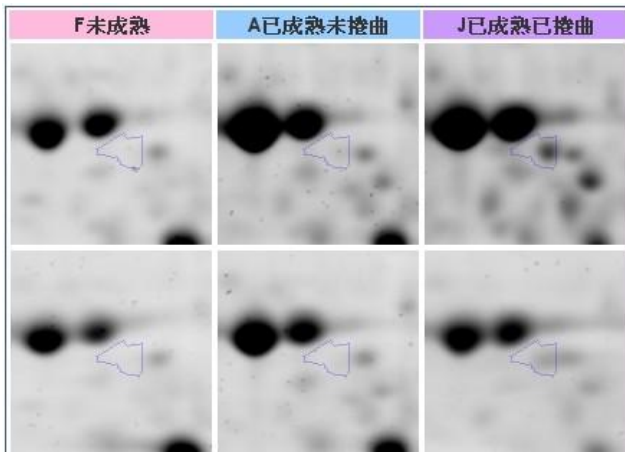
鑑定結果：[PSBO_FRIAG](#)
Oxygen-evolving enhancer protein
1, chloroplastic

第四十二點



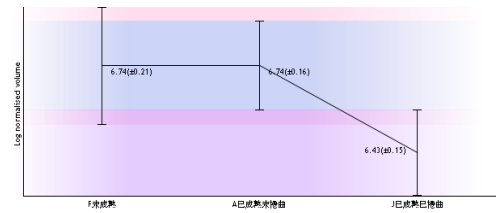
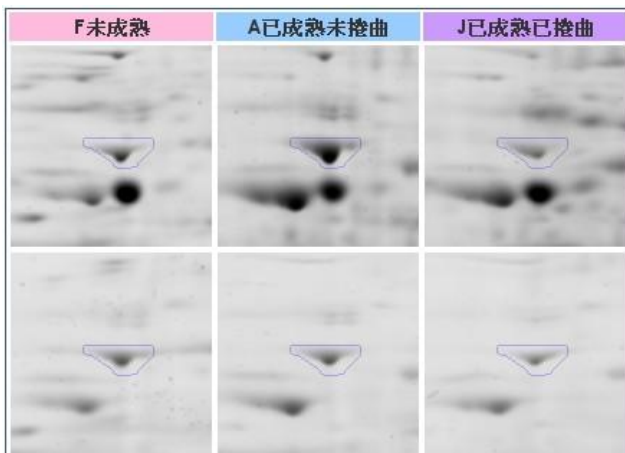
鑑定結果：[RAVL1_ARATH](#)
AP2/ERF and B3
domain-containing transcription
repressor

第四十七點



鑑定結果：[PER6_VITVI](#)
 Peroxidase 6(Fragment)

第五十九點



鑑定結果：[HSP7S_PEA](#)
 Stromal 70 kDa heat shock-related protein

Figure 19 依序為我們送出的五個蛋白質點，在不同膠片的影像和比較，以及送出質譜鑑定後的鑑定結果(所使用的搜尋引擎是 Mascot database，資料庫是採用 SwissProt 57.8)。下表為我們整理此八點的資料的表格。

Spot No.	Protein description	Sequence accession	Source of the matched protein	Theoretical	Experimental	Fold change	Probability based mpwse scores
				Mr(kDa)/pI			
6	N/A	N/A	N/A		35.8/6.30	5.3	
8	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_BETVU	Beta vulgaris	35.810/5.89	40.714/6.61	4.4	44
10	Oxygen-evolving enhancer protein 2 (Fragment)	PSBP_PINPS	Pinus pinaster	1.294/6.02	25/5.44	3.9	33
13	Calreticulin	CALR_BERST	Berberis stolonifera	48.152/4.50	61.364/4.55	3.7	81
18	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	PSBO_FRIAG	Fritillaria agrestis	35.076/6.26	30.600/5.09	3.0	3
42	AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor	RAVL1_ARATH	Arabidopsis thaliana	40.761/	29.46/5.3	2.9	33
47	Peroxidase 6(Fragment)	PER6_VITVI	Vitis vinifera	38.840/	36.63/4.5	2.5	44
59	Stromal 70 kDa heat shock-related protein	HSP7S_PEA	Pisum sativum	75.583/	81.82/4.9	2.1	572

5. 討論

「向觸性」是植物末端在碰觸到物體後，發生纏繞物體的現象。

在先前的研究中，我們將佛手瓜卷鬚的向觸性分為兩個階段。在葫蘆科佛手瓜、絲瓜、苦瓜，三種瓜類的卷鬚，其向觸性的表現除纏繞物體外，還具有形成螺旋的過程。這兩個階段分別受到不同因子的影響。

其中我們又對似彈簧構造特別感興趣，因為我們並未在文獻中描述此構造，因此我們對向觸性和似彈簧構造之間的關聯，以及似彈簧構造的本身特性分別做了實驗及觀察。

- (1) 未成熟卷鬚無法表現向觸性：文獻中指出向性的表現不受到成熟度的影響。但佛手瓜的未成熟卷鬚卻無法表現向觸性，而我們也觀察到未成熟卷鬚缺乏足量的似彈簧構造(spring-like structure)
- (2) 含量豐富：不是所有植物的莖部皆有我們看到的似彈簧構造，其中只有其卷鬚具向觸性的苦瓜及絲瓜含量非常豐富(又密又細)，其他攀附性植物如毬蘭和苦瓜，並沒有發現到似彈簧構造，其向觸性反應亦不如卷鬚迅速。而且卷鬚末端是向觸性表現最為靈敏快速的地方，在卷鬚末端的似彈簧構造(spring-like structure)含量又是最為豐富的。
- (3) 經縱切分離的卷鬚，只有含有似彈簧構造的部分會表現彎曲的現象。且彎曲程度與似彈簧構造分佈的多寡呈正相關。
- (4) 在未捲卷鬚和已捲卷鬚中，似彈簧構造(spring-like structure)的螺距有所改變。

所以我們認為向觸性會受到似彈簧構造(spring-like structure)的影響。

- (1) 似彈簧構造(spring-like structure)是單一條的立體螺旋結構，以束狀的方式存在卷鬚維管束的木質部及韌皮部之間。從最初的未成熟卷鬚到成熟已捲卷鬚，似彈簧構造(spring-like structure)一直存在其中，只是未成熟卷鬚缺乏足量的似彈簧構造(spring-like structure)，而成熟未捲卷鬚和成熟已捲卷鬚的似彈簧構造(spring-like structure)表現也有不同。
- (2) 似彈簧構造(spring-like structure)會受到雙縮脲試劑(biuret)染色，證明其含有蛋白質的成分，且不具有運輸水分的功能。螺紋導管的外型與似彈簧構造(spring-like structure)十分相似，但導管是由木質素及纖維素組成，且具有運輸水分的功能，所以似彈簧構造(spring-like structure)不為螺紋導管。

我們將卷鬚分類為三種，未成熟卷鬚、成熟未捲卷鬚、成熟已捲卷鬚。因為在「探討似彈簧構造(spring-like structure)的組成」的實驗中，我們發現到未成熟卷鬚缺乏足量的似彈簧構造(spring-like structure)，而成熟未捲卷鬚和成熟已捲卷鬚的似彈簧構造(spring-like structure)表現也有不同，所以我們希望藉由分析此三種卷鬚的蛋白質差異，來探討向觸性、蛋白質以及似彈簧構造(spring-like structure)的關聯。

我們使用過三種不同的緩衝液：RIPA、SDS sample buffer 和含有尿素的緩衝液後，發現使用含有尿素的緩衝液效果最好，萃取的蛋白質量最高。剛好等電點交集法的所使用的復水緩衝液含有尿素，因此使用復水緩衝液萃取蛋白質不僅效果好，而且步驟簡單。

我們也發現到隨著卷鬚的成熟，蛋白質量隨之下降，可能是當卷鬚尚未成熟時，仍須多種蛋白質參與其發育過程。

使用比對軟體後，我們選擇兩種趨勢的點送去檢驗：一是逐漸上升，可能此蛋白質隨著向觸性過程的發展而逐漸增多；或是逐漸下降，隨著向觸性的發展逐步減少。我們主要看成熟未捲和成熟已捲卷鬚的蛋白差異含量，這樣可去除「發育」的因素。

其中，逐漸上升的蛋白質有：malate dehydrogenase、calreticulin、peroxidase、AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor 逐漸下降的蛋白質有：oxygen-evolving enhancer protein 1、oxygen-evolving enhancer protein 2、stromal 70 kDa heat shock-related protein。在下面針對幾個和向觸性較有關連的蛋白質提出我們的推測。

(1) calreticulin：此為一種普遍存在於真核生物內質網的蛋白質，可與鈣結合進而參與鈣離子訊息傳遞路徑。Calreticulin 的 mRNA 和蛋白質表現量，在多

種刺激下(包含鹽分、溫度和植物激素)表現出向上調控(Shen, Jing, Kuang . 2003)。我們認為在向觸性中,它可能與 calmodulin 有相似的功能。Calmodulin 也是一種可與鈣結合的蛋白質,經文獻指出,它和許多蛋白直接參與向觸性(Esmon, Pedmale, Liscum. 2005)。另外文獻指出此蛋白質和生長激素的運輸有關聯(Toyota, Furuichi, Tatsumi, Sokabe .2008),我們在之前的研究中發現到添加 auxin 會增強卷鬚的向觸性表現;因此此蛋白在 auxin 參與向觸性的路徑中也扮演相當重要的角色。

(2)stromal 70 kDa heat shock-related protein: 研究指出,此蛋白在菸草葉中對鹽和低溫逆境表現出向下調節,同時樣本乾重減輕且產生型態改變(Razavizadeh, Ehsanpour, Ahsan, Komatsu . 2009)。在我們的研究中,同樣表現出向下調節的此蛋白可能導致似彈簧構造中的蛋白質錯誤摺疊。

(3) peroxidase: 向觸性所引發的氧化逆境,可能會引發此蛋白的向上調節(Soares, Francisco, Vielba, Ricardo, Jackson. 2009)。

(4) AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor: 此蛋白被研究出在高等植物面臨乾旱及低溫逆境時,在基因層次調節上有順式作用(Sakuma, Liu, Duabouzet, Abe, Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki. 2002)。

(5) oxygen-evolving enhancer protein 1 and 2: 此兩種蛋白為植物光系統的重要組成,乾旱和創傷逆境可引發其表現量下降(Abbasi FM, Komatsu S. 2004、Blodner, Majcherczyk, Kues, Polle . 2007);也有研究指出可扮演與 thioredoxin 類似的角色。在本研究中,此兩種蛋白皆呈現向下調控,表示向觸性可能會影響光合作用。

由上述可知,向觸性的現象,為植物體接收到刺激後,經由一連串的訊息傳遞並放大訊號,在上述幾種蛋白的調控下,所引發出來的。

四、結論與應用

我們歸結我們的研究結果為以下幾點：

- (一) 向觸性的現象可視為植物體被碰觸後，在此一逆境下經由一連串的訊號傳遞及放大後，產生的反應。
- (二) 似彈簧構造是一立體螺旋構造，成分含有蛋白質且分布於木質部及韌皮部間，不具有輸送物質的功能。
- (三) urea-based buffer 萃取蛋白質的效果最好，且我們已建立了穩定萃取植物蛋白的實驗操作方法。
- (四) 生長激素、幾種蛋白質及似彈簧構造(以形變的方式)共同參與向觸性的過程。

未來我們期望能用 Q-PCR 了解我們所發現的蛋白質在轉譯層面上的調控情形，更希望能找到這些蛋白質與似彈簧構造(spring-like structure)的交互關係，以建立出一個更為完整的向觸性假說。

五、參考文獻

高景輝(民 68)。植物生長與分化。臺北市：茂昌圖書有限公司。

李學勇(民 72)。植物學要義。臺北市：國立編譯館。

蔡淑華(民 77)。植物解剖學。台北市：國立編譯館。

王月雲、陳是瑩、童武夫(民 87)。植物生理學實驗。臺北市：藝軒圖書出版社。

Abbasi FM, Komatsu S. (2004) A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics* 4: 2072-2081.

Blodner C, Majcherczyk A, Kues U, Polle A. (2007) Early drought-induced changes to the needle proteome of Norway spruce. *Tree Physiol* 27: 1423-1431.

Borisjuk N, Sitailo L, Adler K, Malysheva L, Tewes A, Borisjuk L, Manteuffel R. (1998)

Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. *Planta* 206: 504-514.

Cleland R. E. (1971a) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22,197.

Cleland R. E. (1971b) *Plant Physiol.* 47, 805.

Darwin C. (1881) *The power of movement in plants*, Appleton, New York.

Esmon CA, Pedmale UV, Liscum E. (2005) Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism. *Int J Dev Biol* 49: 665-674.

Huberman M. and Jaffe M. J. (1986) Thigmotropism in organs of the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.). *Annals of Botany* 57, 133-137.

Jaffe. M. J. and Galston A. W. (1967) Physiological studies on pea tendrils. III. ATPase activity and contractility associated with coiling. *Plant Physiology.* 42, 845-847.

Jaffe M. J., Leopold A. C., Staples R. C. (2002) Thigmo responses in plants and fungi. *American journal of botany.* 89(3), 375-382.

Lou. C. H. (1996) Electrochemical wave transmission in higher plants. *Acta Biophysica Sinica.* 12, 739-745.

Razavizadeh R, Ehsanpour AA, Ahsan N, Komatsu S. (2009) Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress. *Peptides* 30: 1651-1659.

Sakuma Y, Liu Q, Duabouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 998-1009.

Schrank A. R. (1944) Relation between electrical and curvature responses in the avena coleoptile to mechanical stimuli. *Plant Physiology* 19, 198-211.

Shen S, Jing Y, Kuang T. (2003) Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. *Proteomics* 3: 527-535.

- Soares NC, Francisco R, Vielba JM, Ricardo CP, Jackson PA. (2009) Associating wound-related changes in the apoplast proteome of *Medicago* with early steps in the ROS signal-transduction pathway. *J Proteome Res* 8: 2298-2309.
- Stark P. (1916) Experimentelle untersuchungen uber das wesen und die verbreitung der kontaktreizbarkeit. *Jahrbuch fur wissenschaftliche botanik* 57, 189-320.
- Stark P. (1917) Beitrage zur kenntnis des traumatotropismus. *Jahrbuch fur wissenschaftliche botanik* 57, 461-552.
- Stark P. (1919) Uberdie gultigkeit des weberschen gesetzes bie den haptotropischen reaktionen von koleoptilen und keimstengeln. *Jahrbuch fur wissenschaftliche botanik* 58, 475-524.
- Stark P. (1922) Weitere untersuchengen uber das resutantengesetz beim haptotropismus. *Jahrbuch fur wissenschaftliche botanik* 58, 475-524.
- Stark P. (1927) Das reizleitungsproblem bei den pflanzen im licht neuerer erfahrungen. *Ergrunden biologie* 2, 1-94.
- Takahashi H. and Jaffe M. J. (1990) Thigmotropism and the modulation of tropistic curvature by mechanical perturbation in cucumber hypocotyls. *Physiologia Plantarum*. 80, 561 – 567.
- Toyota M, Furuichi T, Tatsumi H, Sokabe M.(2008) Critical consideration on the relationship between auxin transport and calcium transients in gravity perception of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Signal and Behavior* 3(8): 521–524.
- Wilson B. F. (1967) Root growth around barriers. *Botanical Gazette* 128, 79-82.