

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 060016
參展科別 植物學
作品名稱 休息是為了走更遠—阿拉伯芥之耐熱記憶
得獎獎項 四等獎

就讀學校 國立彰化女子高級中學
指導教師 蕭碧鳳
作者姓名 吳季烜、林可函、粘蕎

關鍵詞 阿拉伯芥、熱逆境記憶、光週期

作者簡介



(右一:吳季烜、右二:粘蕎、右三:林可函)

我是吳季烜，就讀彰化女中三年級。兩年來的專題研究有歡笑、有期待、有失落，但更重要的是在研究的過程中，我們從一個長久以來被禁錮在選擇題的靈魂蛻變成能夠動手、構思、解決問題的研究者，參加科展不僅使我們的視野更加開闊，也讓我學會用不同角度探究事物。

我是粘蕎，就讀彰化女中三年級。很高興高中階段有專題課，給我足夠的資源和機會參與實驗研究。科展給了我們階段性的檢視與評比，而我認為比賽最大的收穫是在與評審的問答中發現了更多我們沒有涉獵到的領域，也因此讓我們用更廣的視角看我們的研究內容。

我是林可函，就讀彰化女中三年級。很幸運能在高中有參加科展的經驗，在比賽中打開眼界，在這其中我學到的不僅盡是表面上實驗操作技術和表達能力的進步，更多的是解決問題的態度和方法、從事研究的精神和克服膽怯的心裡。

摘要

阿拉伯芥的長期後天耐熱性 (LAT) 有如人類的「學習」, 如何延長其「記憶」為本研究探討的主要目標。首先以改變熱處理間期之光週期來確立 *hsp101*、*hsa32* 突變株在光照期變短下, LAT 處理後的存活率有提高之趨勢, 而西方墨點法也發現 HSP101 之表現量與存活率有相同的趨勢, LAT 耐熱記憶的延續與否和 HSP101 的量息息相關。低溫降低代謝與光照期變短在存活率、西方墨點法的實驗結果相似, 這顯示光照期變短可能也是透過代謝減緩, 進而減少 HSP101 的降解, 使突變株的存活率提高。最後, 花椰菜 HV-427、HV-178 的光週期實驗中, 在進行 LAT 處理後, 低光照下的受傷率有降低的趨勢, 顯示降低光照能夠提升其耐熱性。我們期望此結果未來可應用在農業生物科技, 透過更具經濟價值的方式來降低代謝進而延續 LAT 耐熱記憶, 提升其對抗熱逆境的能力。

Abstract

Plants have evolved diverse mechanisms in response to high temperature, including basal thermotolerance, short- and long-term acquired thermotolerance. Long-term acquired thermotolerance (LAT) plays an important role in response to heat stress and is thought to be as learning in plants. Here, we investigated how to extend its heat-tolerant memory span in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Firstly, we found that the survival rate of *hsp101*, *hsa32* mutant was increased under shorter-illumination environment in which the metabolism was decreased. The gene expression level of *heat shock protein 101* (HSP101) correlated with the survival rate. Thus, it is suggested a direct relation between extending the memory span of LAT and HSP101. In addition, the results from decreasing metabolic rate by treatment with lower temperature were similar to that of treatment of shorter illumination. These data indicated that lower temperature was able to slow down the degradation of HSP101 by decreasing metabolic rate, which in turn to boost the survival rate. Therefore, it was proposed that decreasing metabolism rate by lower temperature or illumination enhanced heat-tolerant memory span of LAT. Based on our finding of metabolism-mediated LAT, we extended our study on cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), HV-427 and HV-178 in response to heat stress. It was found that the injury of the cauliflower seedlings was inhibited under the shorter-illumination environment. As discussed above, the result of extending heat-tolerant memory span was not only in *Arabidopsis* but also in cauliflower. We can devote in discovering the approaches with higher economic value so as to extend the heat-tolerant memory span of LAT. It is promising to apply these findings to agri-biotechnology in the future.

壹、研究動機

一、研究動機

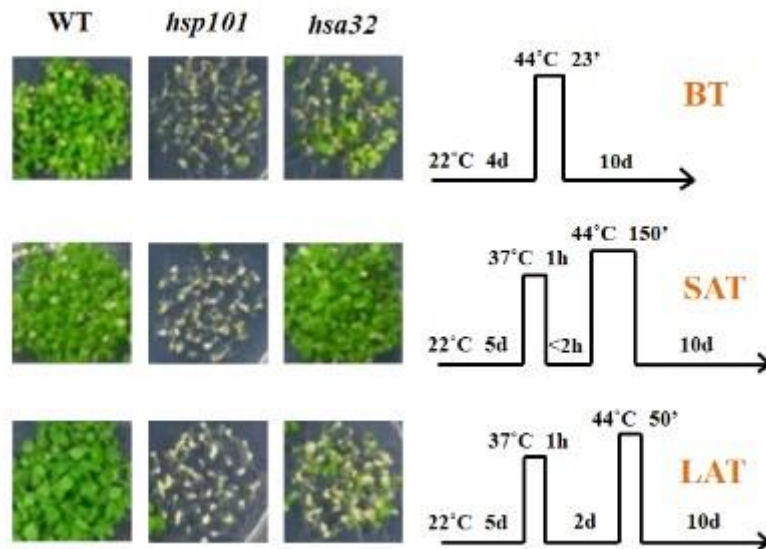
工業革命後，人為碳排放逐年增加，致使地表溫度上升，「溫室效應」成為人類無法迴避的問題。對此科學家們不斷地研究植物因應高溫的機制，期許在未來熱浪來襲時能找出因應之道，讓植物可以生長繁衍下去，維持生態系的榮景。

學期初很幸運聽了中研院常怡雍教授有關阿拉伯芥熱馴化效應的演講，我們驚訝於植物在面對外界的逆境時，竟也能透過學習來應對。熱馴化的過程就如同人類的「學習」，透過適當的熱誘導記取經驗，以提升後續抵抗熱逆境的能力，而此熱誘導的經驗值（亦即記憶）能持續多久，就大大影響後續能不能抵抗熱逆境的能力。記憶是學習的基礎，植物如何記憶熱誘導的經驗值引起了我們的興趣，我們該如何使植物記憶的時間延長，讓植物的耐熱性維持更長久的時間呢？

二、文獻探討

（一）阿拉伯芥的耐熱反應多樣性

有鑑於環境溫度過高會對植物的生長造成傷害，而植物則能透過熱馴化應對；其中阿拉伯芥的耐熱反應多樣性可分為基礎耐熱性(Basal thermotolerance, BT)及後天耐熱性，而基礎及後天耐熱性的差別在於有無經歷熱誘導。「熱誘導」講述的便是將植物先置於非致死的高溫中使其耐熱機制啟動的過程，經過熱誘導後的阿拉伯芥便可獲得後天耐熱性；其中，依熱處理間期的時長不同又分為短期後天耐熱性(Short-term acquired thermotolerance, SAT)以及長期後天耐熱性(Long-term acquired thermotolerance, LAT)，SAT的熱處理間期小於2小時，而LAT則長達2天。我們的實驗主要是研究LAT耐熱記憶的機制。



▲圖一、阿拉伯芥的三種耐熱反應多樣性（WT 為野生型，*hsp101* 為缺乏 *HSP101* 基因之突變株，而 *hsa32* 則為缺乏 *HSA32* 基因之突變株）

（圖片引用自 Hu et al. 2012）

（圖一）中，基礎耐熱性（BT）是將阿拉伯芥未經 37°C 熱誘導，直接置於 44°C 的致死高溫中；短期後天耐熱性（SAT）及長期後天耐熱性（LAT）則是將阿拉伯芥先經 37°C 的熱誘導，後置於 44°C 的致死高溫。

（二）影響 LAT 的基因

根據（圖一），在 LAT 的實驗中，WT 全部存活，*hsp101* mutant 幾乎死亡，*hsa32* mutant 僅少部分可以存活，顯示 *HSP101* 和 *HSA32* 兩個基因與 LAT 生成的機制有關，且 *HSP101* 較 *HSA32* 的影響更為顯著。其中 *HSP101*（heat shock protein 101）可協助蛋白質的正常摺疊，其存續與否與 LAT 的耐熱性維持有直接相關；而 *HSA32*（heat shock associate protein 32）雖然不如 *HSP* 家族（D Lanneau et al. 2008）直接參與植物的耐熱機制，但其與 *HSP101* 的表現多寡息息相關。據常怡雍（2013）研究發現 *HSP101* 與 *HSA32* 的基因表現存在著交互作用，兩者皆可經熱誘導後產生蛋白質產物，當 *HSP101* 達一定表現量時，可提高 *HSA32* 的合成；同時，*HSA32* 可反過來減緩 *HSP101* 的降解，兩者之間具有「正回饋」的關係（圖二）。所以我們的實驗選取 WT、*hsp101* mutant 以及 *hsa32* mutant 來進行 LAT 的耐熱實驗。



▲圖二、正回饋示意圖

貳、研究目的

- 一、光週期改變對 LAT 耐熱機制的影響
- 二、以西方墨點法測定 LAT 過程的蛋白質表現量
- 三、檢測光週期改變對生長指標的影響
- 四、低溫對 LAT 耐熱機制的影響

參、研究設備及器材

一、資料分析

- (一) Microsoft Excel

二、阿拉伯芥與培養條件

(一) 阿拉伯芥

1. 使用野生型及兩種突變型

- (1) WT (Wild Type)
- (2) *hsp101* (*heat shock protein 101 mutant*)
- (3) *hsa32* (*heat shock associate 32-kD mutant*)

2. 介紹

本研究使用的是常怡雍教授向國外購買的 WT (Wild Type) 和 *hsp101* (*heat shock protein 101*)、*hsa32* (*heat shock associate 32-kD protein*) 突變株，其中突變株是利用農桿菌將

T-DNA 插入 *HSP101* 和 *HSA32* 基因，破壞該基因使植物無法將其表現，如 *hsp101* mutant 無法表現 HSP101 蛋白，*hsa32* mutant 無法表現 HSA32 蛋白。

(二) 培養皿：直徑 9 公分、高 1.5 公分的滅菌塑膠培養皿

(三) 培養基：1/2MS medium、Agar (0.8%)、sucrose (1%)，pH=5.7

(四) 高溫滅菌釜：培養基滅菌 121°C，15 分鐘

(五) 植物生長箱：溫度維持 24°C，照光強度為 max：255 (lux)；min：254 (lux)

三、蛋白質萃取與西方墨點法

(一) 植物組織均質機

(二) 鎢鋼珠

(三) 離心機：Fresco™ 17 Microcentrifuge (Thermo Scientific)

(四) 多功能微量盤檢測儀：Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek)

(五) 乾浴器

(六) 電泳槽：XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen)

(七) 電泳膠片

(八) 轉印槽：XCell II Blot Module (Invitrogen)

(九) 轉印膜

(十) HRP 酵素冷光試劑 (PerkinElmer)

(十一) 冷光攝像機

(十二) 抗體：

1. Rabbit anti-Arabidopsis HSA32 由 Charng et al. (2006)製備

2. Rabbit anti-Arabidopsis HSP101由 Chi et al. (2009)製備

3. Mouse anti- α -Tubulin (Sigma, catalog number: T5168)

肆、研究過程及方法

一、研究結構圖



二、研究方法

(一) 資訊分析

將數據匯入 Microsoft Excel 後繪製長條圖，觀察圖表趨勢、加上標準差，並以 T.TEST 比較、分析組內與各組間是否有顯著差異。

(二) 阿拉伯芥的培養

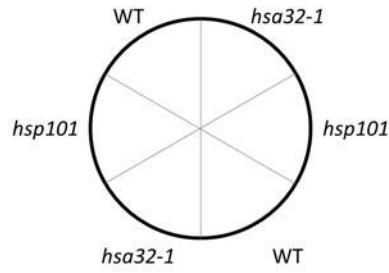
1. 種植過程

將阿拉伯芥種子冰至 4°C 環境三天，以 75% 酒精消毒 5 分鐘，3% 漂白水清洗 15 分鐘，再以二次滅菌水換水稀釋，種植於含 1% sucrose 的 1/2MS medium 培養基上。種植後，以白色透氣膠帶封閉培養皿外緣，避免汙染，並置於植物生長箱。

2. 種植、記錄方式

(1) 將本研究採用的三個品種對稱種植如 (圖三)，避免區域性汙染或培養基不均質造成單一品種數據落差太大。

(2) 在培養皿底部以抗酒精筆區隔並標示，方便觀察與紀錄。

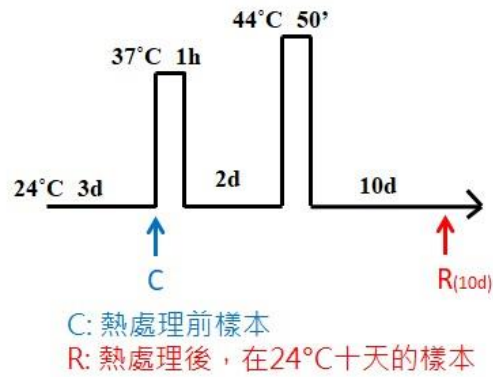


▲圖三、阿拉伯芥種植示意圖

3. 拍照記錄時間

(1) 熱處理前樣本 (C)：計算發芽數

(2) 熱處理後，在 24°C 十天的樣本 (R)：計算存活率



▲圖四、拍照記錄時間示意圖

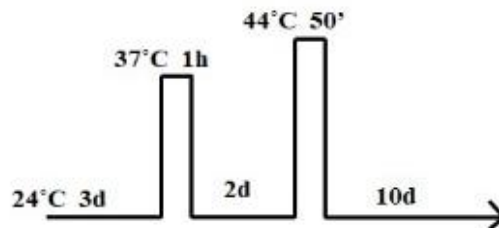
4. 存活率之計算

葉片枯萎或白化，並無新葉長出，即計算為死亡，其餘標示為存活。

5. 受傷率之計算

葉片黃化、幼葉白化、葉脈白化、頂芽受傷，即計算為受傷。

(三) 光週期實驗操作流程



▲圖五、長期後天耐熱處理流程圖

使用長期後天耐熱處理（圖五）；將進行完阿拉伯芥種植的培養皿置於植物生長箱（24°C）三天後進行第一次熱處理（37°C，一小時），再回到室溫（24°C）兩天後進行第二次熱處理（44°C，50 分鐘），於十天恢復期後觀察結果。

1. 熱處理：

以水浴法進行熱處理；將水浴槽調整至所需溫度，以黑色電器膠帶封緊培養皿外緣避免水滲入，並放入水浴槽中以重物壓置，以計時器定時。

2. 光週期顛倒實驗：

種植在培養基後置於生長箱時即加入操作變因至十天的恢復期結束，改變每日照光時數（對照組：16 小時；實驗組：8 小時）。

3. 階梯式光週期實驗：

於熱處理間期的兩天加入操作變因，將期間每日照光時數以階梯式遞減分為三組（22 小時、10 小時、4 小時）。

（四）蛋白質的萃取與西方墨點法

1. 將阿拉伯芥幼苗與鎢鋼珠放進 eppendorf，放入液態氮冷卻後以植物組織均質機磨碎。
2. 加入萃取緩衝液(extraction buffer)。
3. 以 70°C 加熱，離心後取上清液。
4. 加入 Bio-Rad DC Protein Assay 試劑和蛋白質樣本反應，並計算樣本蛋白質濃度，推算取樣體積。
5. 將樣本與 NuPAGE® LDS (Lithium dodecyl sulfate) Sample Buffer (4X) (Invitrogen, catalog number: NP0007) 和 NuPAGE® Reducing Agent (10X) (Invitrogen, catalog number: NP0004) 均勻混合。
6. 將樣本輸進膠體間隔中，在 200V 下電泳分離 50 分鐘。
7. 將膠體上的蛋白質電泳結果以 20V 的條件轉漬 (transfer) 至轉印膜。
8. 以脫脂奶粉將轉印膜上空白處填滿 (blocking)。
9. 配置一級抗體並將轉印膜浸泡於其中。

10. 以 PBST 清洗轉印膜。
11. 配置二級抗體並將轉印膜浸泡於其中。
12. 以 PBST 清洗轉印膜。
13. 將膜放置冷光攝像機偵測冷光並呈像。

(五) 低溫實驗操作流程

同樣使用長期後天耐熱處理（圖五），於熱處理間期的兩天加入操作變因，改變期間植物生長箱溫度（對照組：24°C；實驗組：15°C）。

伍、實驗結果與討論

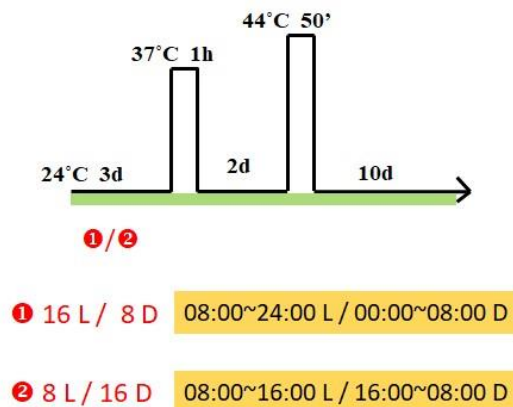
* 以下實驗內容將以（L）表示為每日照光時數；（D）表示為每日黑暗時數

一、顛倒光週期實驗

（一）實驗設計說明

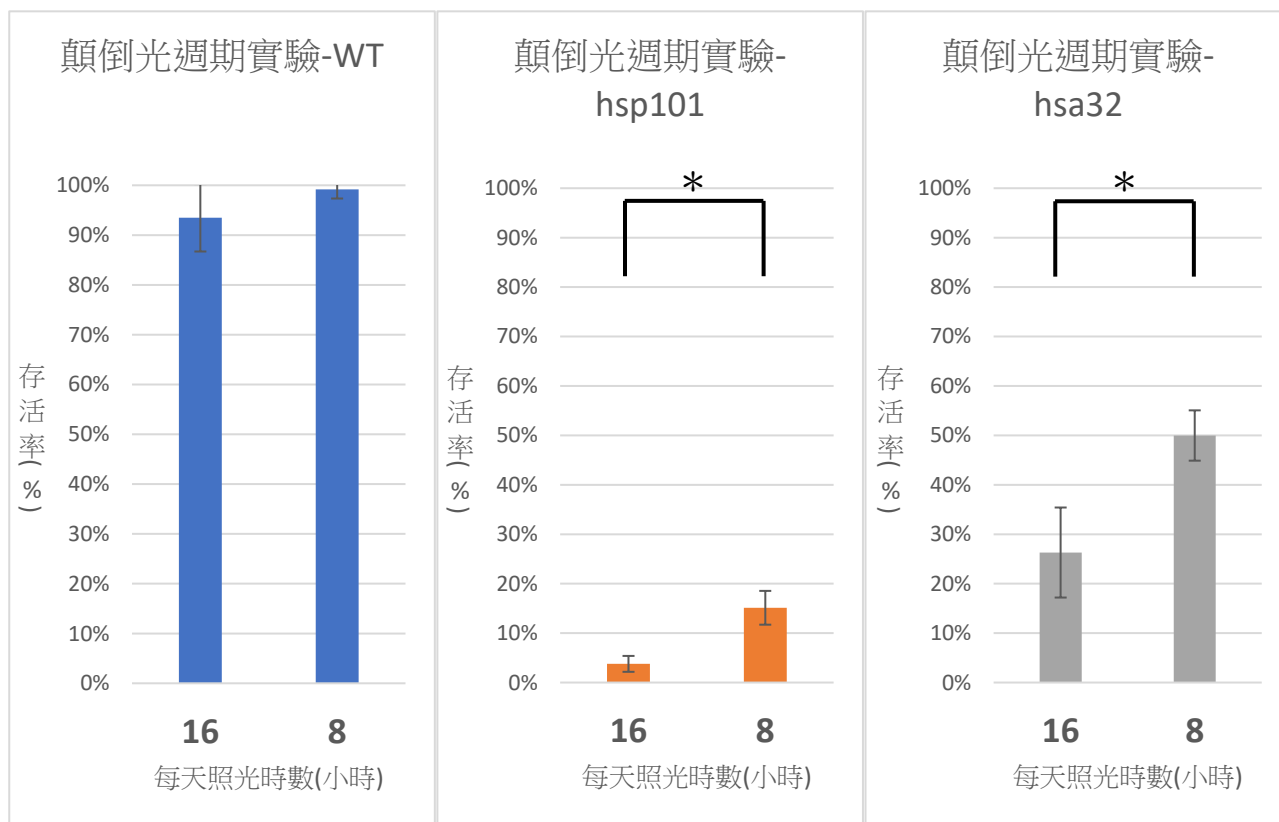
此實驗我們採用阿拉伯芥的長期後天耐熱性（LAT）實驗的流程，如（圖六），培養阿拉伯芥的正常光週期以每日光照時數 16 小時、黑暗時數 8 小時為對照組，實驗組則將正常光週期的晝夜長短顛倒，試圖打亂植物的生理時鐘，觀察顛倒光週期對 LAT 的影響。

1. 操作變因：從實驗開始時便改變其光週期至結束，如（圖六）之綠色區間；分別為對照組 16L/8D、實驗組 8L/16D。



▲ 圖六、顛倒光週期實驗流程圖（L 表示每日照光時數；D 表示每日黑暗時數）

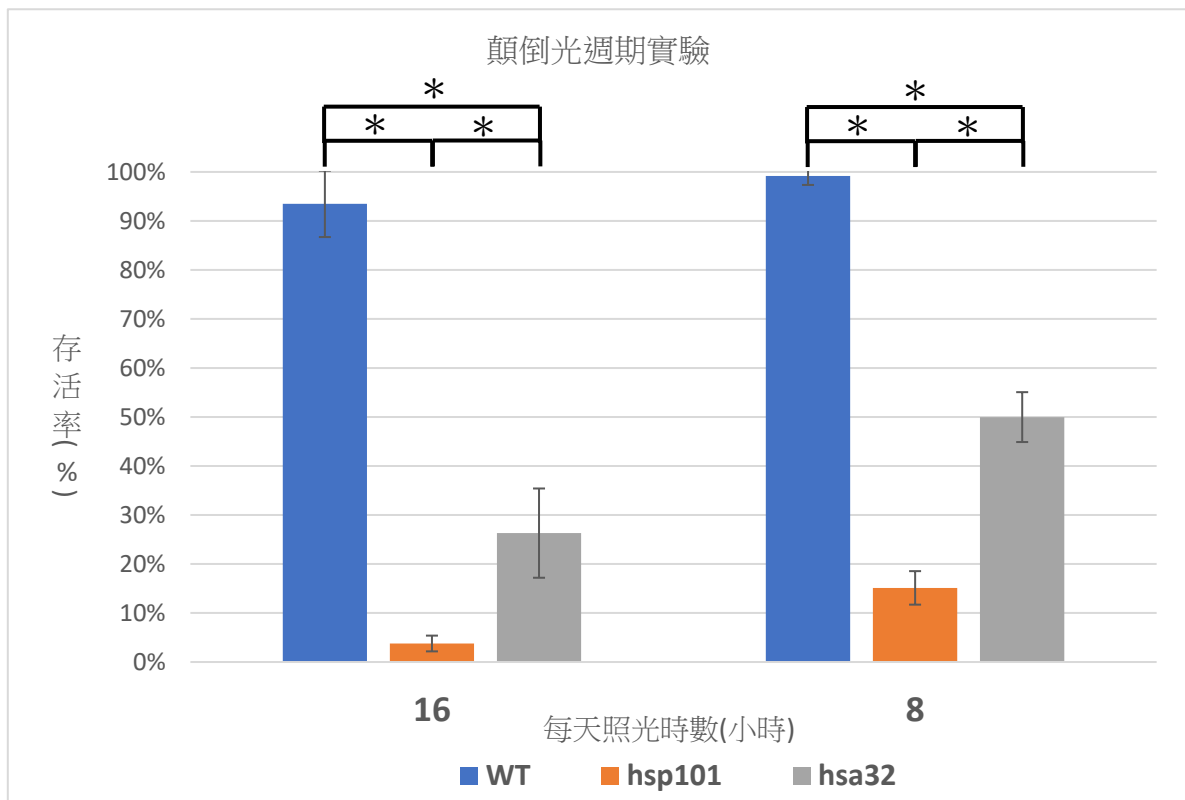
(二) 實驗結果



▲圖七、顛倒光週期實驗結果（以 T.TEST 統計分析，*表示 P<0.05）

由（圖七）實驗結果可得出

1. WT 在正常光週期與顛倒光週期下存活率並無顯著差異。
2. *hsp101* mutant 在顛倒光週期下的存活率大於正常光週期下之存活率。
3. *hsa32* mutant 在顛倒光週期下的存活率大於正常光週期下之存活率。



▲圖八、顛倒光週期實驗結果 (以 T.TEST 統計分析，* 表示 $P < 0.05$)

由 (圖八) 實驗結果可得出

1. 光週期 16L/8D、8L/16D 中皆為 WT 存活率最高，*hsa32* mutant 存活率次之，*hsp101* mutant 存活率最低。

(三) 討論

1. 顛倒光週期實驗中的幼苗存活率：WT ($\approx 100\%$) $>$ *hsa32* mutant $>$ *hsp101* mutant，顯示 *HSP101*、*HSA32* 兩個基因同時運作才可確保 LAT 耐熱記憶的延續，其中任一基因突變皆會對 LAT 耐熱記憶的延續造成影響，且 *HSP101* 的影響大於 *HSA32*。
2. 顛倒光週期實驗對 WT 的長期耐熱性 (LAT) 沒有影響，而較短光照期的處理皆會使 *hsa32* 與 *hsp101* mutant 的 LAT 耐熱記憶延續較久，因而提高幼苗存活率。此結果顯示光週期改變會影響 LAT 耐熱記憶的延續，所以我們想更進一步探討光週期光照時數對 LAT 耐熱記憶延續的影響。

(四) 顛倒光週期實驗之修正

在顛倒光週期實驗中，整個 LAT 過程的光週期處理皆不同，我們注意到顛倒光週期實驗組的幼苗的生長情況較不一致，較短的光照時數會使幼苗發生徒長的現象，為減少生長發育不良對結果的影響，我們之後的實驗是將光週期改變的處理只限於在兩次熱處理的間期，來減少生長發育不良的影響；其次，在 LAT 過程中，37°C熱誘導後所產生的耐熱記憶能否存續於兩次熱處理的間期，是致死高溫 44°C處理後幼苗能不能存活的關鍵，所以我們認為僅改變兩次熱處理間期的光週期處理，是更適合的實驗設計。

二、階梯式光週期實驗

(一) 實驗設計說明

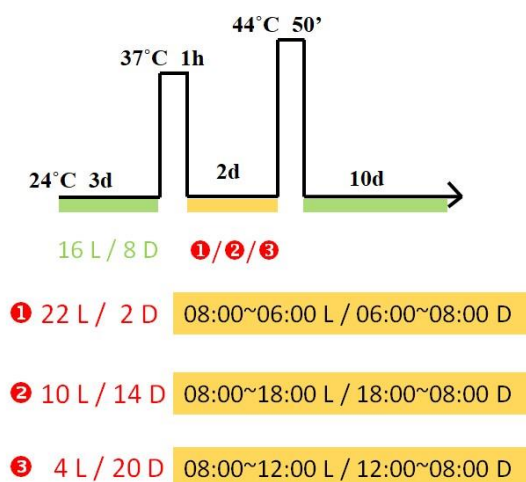
進行更多組光週期改變的處理，探討阿拉伯芥的長期耐熱性 (LAT) 是否會隨著光照期時數遞減而呈現遞減或遞增的趨勢。

1. 操縱變因：37°C與 44°C 熱處理間的兩天間期，如 (圖九) 橘色區間，階梯式光週期變化分別為

(1) 22L/2D

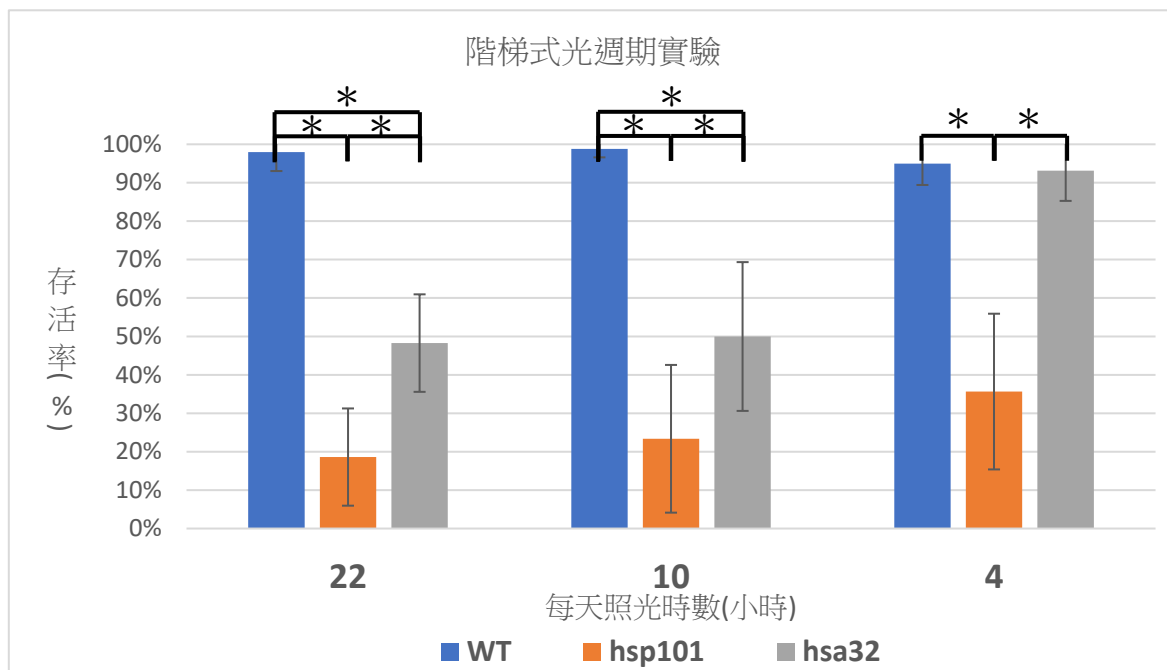
(2) 10L/14D

(3) 4L/20D



▲ 圖九、階梯式光週期實驗流程圖 (L 表示每日照光時數；D 表示每日黑暗時數)

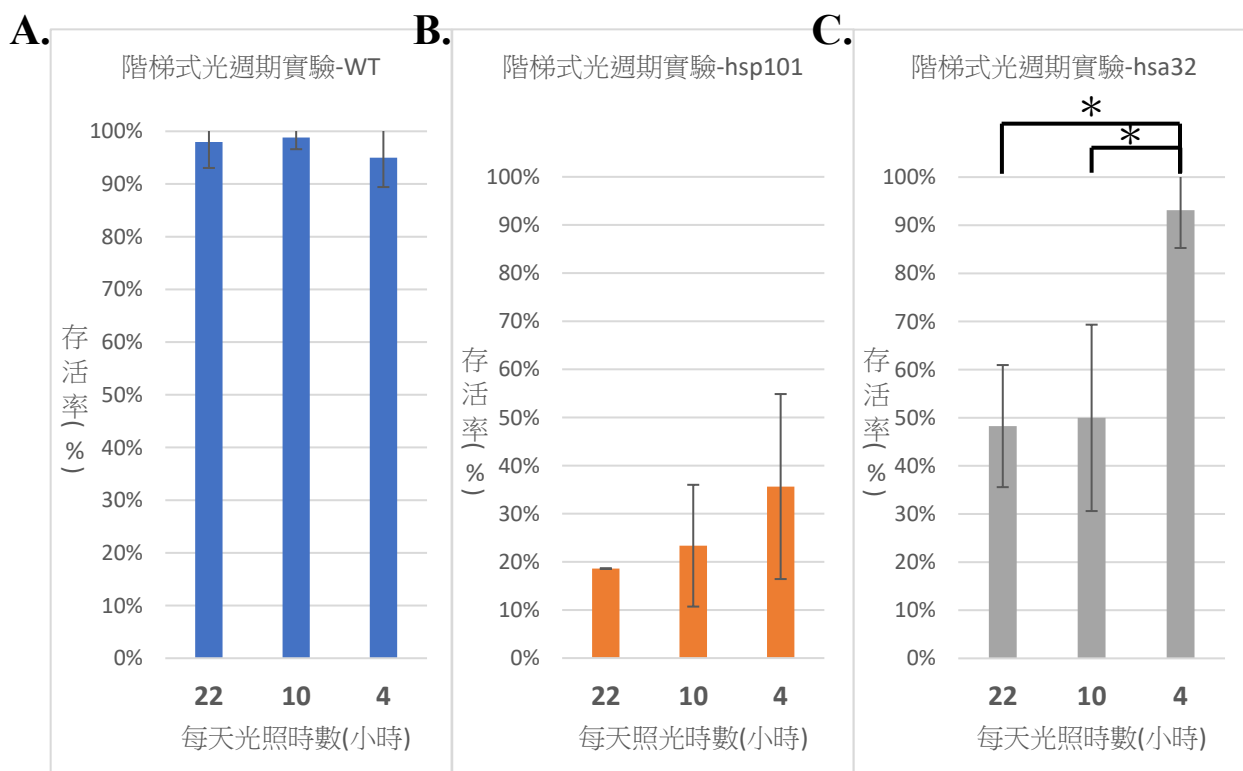
(二) 實驗結果



▲圖十、階梯式光週期實驗結果 (以 T.TEST 統計分析, *表示 P<0.05)

由 (圖十) 實驗結果可得出

1. 光週期 22L/2D、10L/14D 中存活率仍然為 WT 最高, *hsa32* 次之, *hsp101* 最低。
2. 光週期 4L/20D 中, *hsa32* mutant 存活率和 WT 存活率無顯著差異。



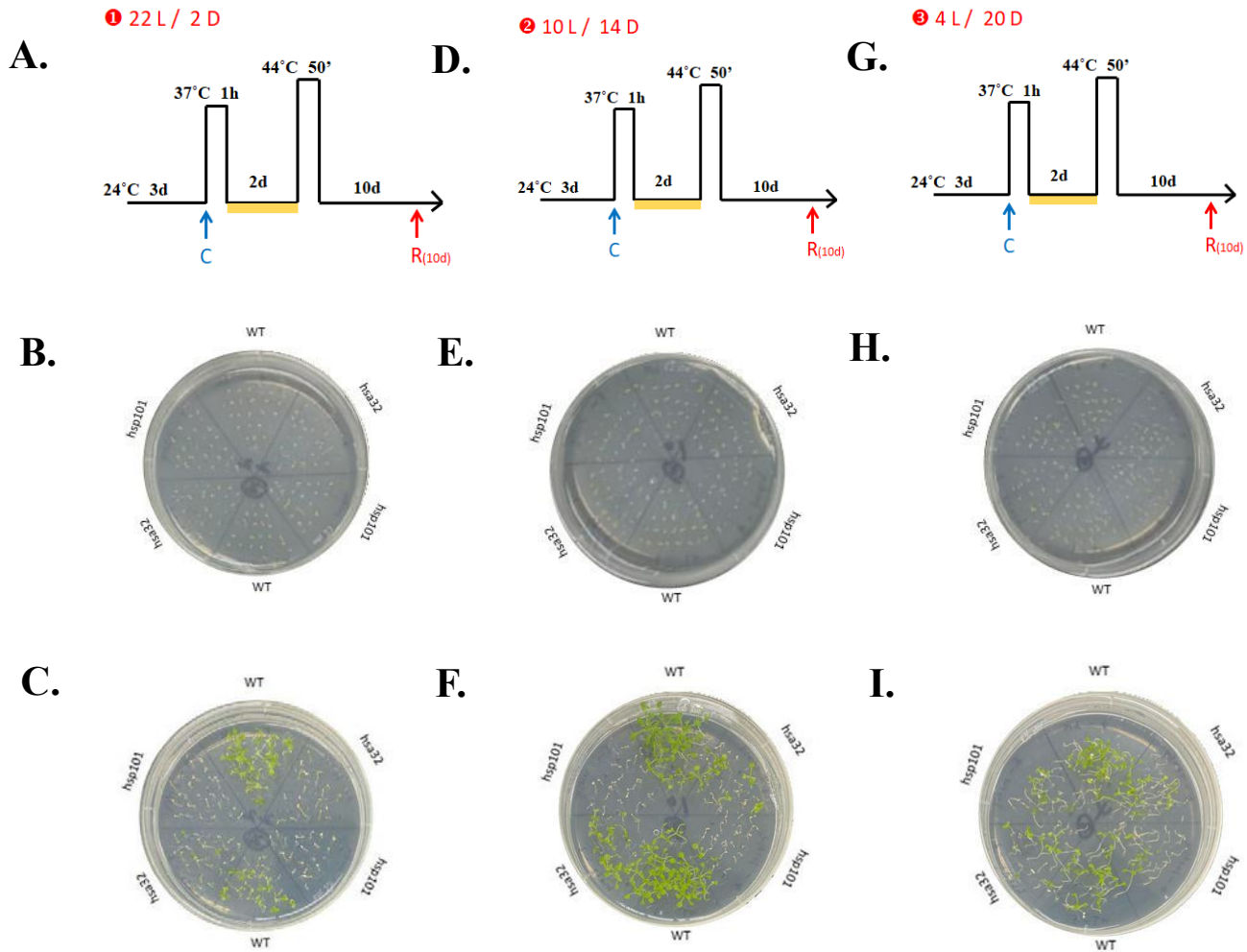
▲圖十一、階梯式光週期實驗中各品種在不同光週期下的存活率比較 (以 T.TEST 統計分析, *表示 P<0.05) (A)WT (B)*hsp101* (C)*hsa32*

由（圖十一）實驗結果可得出

1. WT 在階梯式光週期之存活率並無顯著差異。

2. *hsp101* 在階梯式光週期中，存活率為 4L/20D 大於 10L/14D 大於 22L/2D，但在統計上無顯著差異。

3. *hsa32* 在階梯式光週期中，存活率為 4L/20D 最大，而 10L/14D 的存活率與 22L/2D 差不多。



▲圖十二、(A)階梯式光週期實驗 22L/2D 取樣時間 (B)阿拉伯芥種植後在 24°C三天後的外觀 (C)光週期 22L/2D 之阿拉伯芥在 44°C熱處理後在 24°C十天後的外觀 (D)階梯式光週期實驗 10L/14D 取樣時間 (E)阿拉伯芥種植後在 24°C三天後的外觀 (F)光週期 10L/14D 之阿拉伯芥在 44°C熱處理後在 24°C十天後的外觀 (G)階梯式光週期實驗 4L/20D 取樣時間 (H)阿拉伯芥種植後在 24°C三天後的外觀 (I)光週期 4L/20D 之阿拉伯芥在 44°C熱處理後在 24°C十天後的外觀

(三) 討論

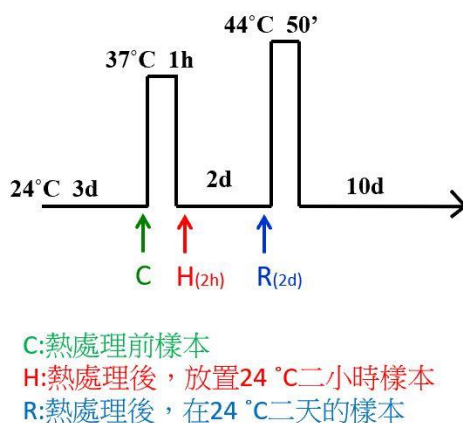
WT 的存活率並未隨光週期改變而有顯著差異；*hsp101* mutant 在三種光週期操作下，存活率呈現遞增的趨勢，但統計上無顯著差異，可能是因為 *HSP101* 基因突變對植物 LAT 的影響相當大，導致存活率皆過低而不容易有差異；*hsa32* mutant 的存活率亦隨光照時數變短而有遞增的趨勢，光照期最短的 4L/20D 處理甚至可使存活率上升到與 WT 一樣，由此可推論光週期的光照期長短確實會影響 LAT 耐熱記憶的延續。我們想更進一步確認 HSP101 與 HSA32 兩種蛋白質在 LAT 耐熱記憶延續的影響，所以接下來進行西方墨點法，探討相關蛋白質的表現量對 LAT 耐熱記憶延續的影響。

三、西方墨點法

(一) 實驗設計

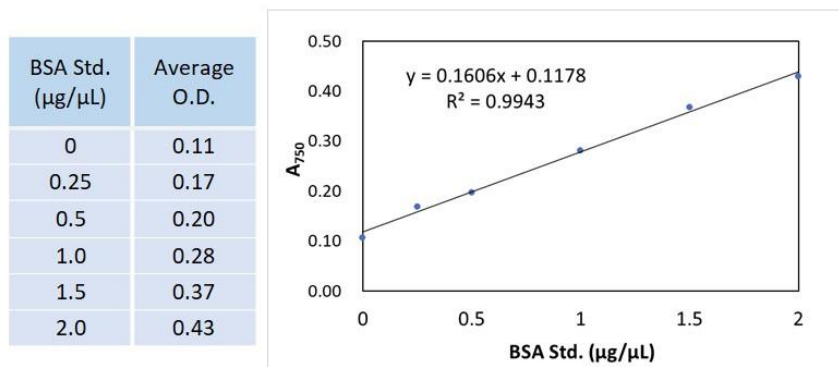
由於 *HSP101* 基因在耐熱機制中扮演相當重要的角色，我們藉由西方墨點法測定阿拉伯芥在各個時段之 *HSP101* 及 *HSA32* 的表現量，探討階梯式光週期實驗結果的植物存活率之梯度變化是否也呈現於蛋白質表現量。

我們取的樣本分為 C、H、R，如(圖十三)，其中 R 又分為對照組 16L/8D 及實驗組 10L/14D、4L/20D，欲比較阿拉伯芥之野生型與突變株於各組光週期中，相對於正常光週期在熱處理間期，其蛋白質表現量之差異。



▲ 圖十三、西方墨點取樣本時段

(二) 實驗結果



▲圖十四、以已知蛋白濃度所做之標準曲線（橫軸：蛋白質濃度，縱軸：吸光值）

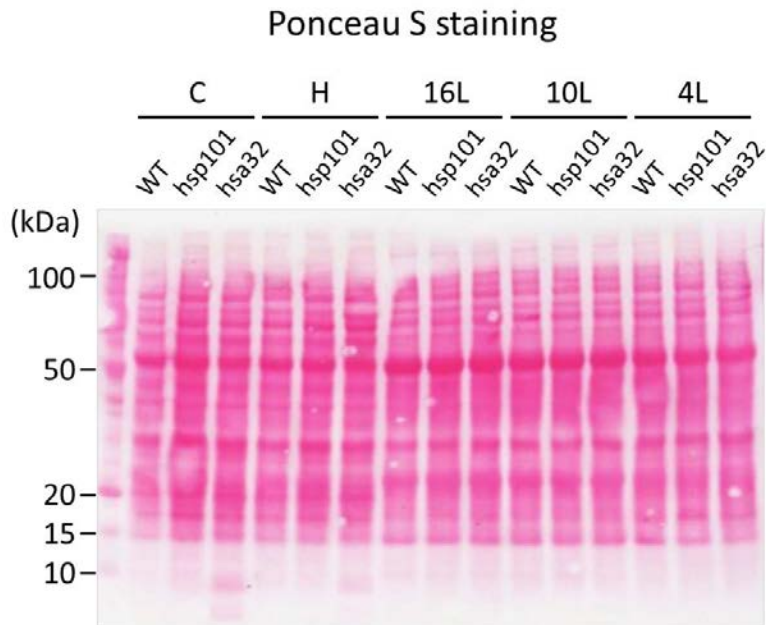
表一：蒐集樣本之鮮重(mg)、使用的萃取溶液體積(μL)、測得之總蛋白質濃度 (μg/μL)

No.	Sample	Weight (mg) / Buffer (μL)		Conc. (μg/μL)
1	WT_C	43.4	86.8	8.9
2	WT_H	44.5	89.0	4.8
3	WT_R_16L	43.4	86.8	6.9
4	WT_R_10L	43.6	87.2	7.2
5	WT_R_4L	43.5	87.0	5.6
6	<i>hsp101_C</i>	43.7	87.4	6.3
7	<i>hsp101_H</i>	45.3	90.6	8.1
8	<i>hsp101_16L</i>	42.7	85.4	7.4
9	<i>hsp101_10L</i>	42.1	84.2	5.9
10	<i>hsp101_4L</i>	44.7	89.4	7.4
11	<i>hsa32_C</i>	40.6	81.2	8.4
12	<i>hsa32_H</i>	42.3	84.6	7.8
13	<i>hsa32_16L</i>	44.2	88.4	5.7
14	<i>hsa32_10L</i>	45.8	91.6	4.1
15	<i>hsa32_4L</i>	43.7	87.4	3.9

表二：樣本取樣體積計算，電泳樣本順序

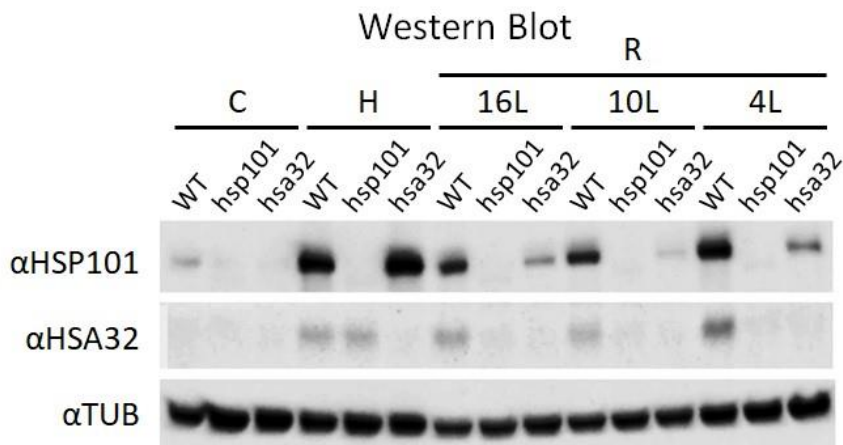
No.	Sample (25 µg)	Sample volume (µL)	4X SB (µL)	10X RA (µL)	ddH ₂ O (µL)	Total volume (µL)
1	Marker					5
2	WT_C	2.8	2.5	1	3.7	10
3	<i>hsp101_C</i>	5.2	2.5	1	1.3	10
4	<i>hsa32_C</i>	3.6	2.5	1	2.9	10
5	WT_H	3.5	2.5	1	3.0	10
6	<i>hsp101_H</i>	4.4	2.5	1	2.1	10
7	<i>hsa32_H</i>	4.0	2.5	1	2.5	10
8	WT_R_16L	3.1	2.5	1	3.4	10
9	<i>hsp101_16L</i>	3.4	2.5	1	3.1	10
10	<i>hsa32_16L</i>	4.2	2.5	1	2.3	10
11	WT_R_10L	3.4	2.5	1	3.1	10
12	<i>hsp101_10L</i>	3.0	2.5	1	3.5	10
13	<i>hsa32_10L</i>	3.2	2.5	1	3.3	10
14	WT_R_4L	4.4	2.5	1	2.1	10
15	<i>hsp101_4L</i>	6.1	2.5	1	0.4	10
16	<i>hsa32_4L</i>	6.5	2.5	1	0	10
17	Marker					5

(表二) 中，設定總體積為 10 µL 且每個樣本取 25 µg 總蛋白質含量，計算每個樣本應取體積，以 WT_C 為例，將 25 µg 除以其濃度 8.9 µg/µL (表一) 得樣本體積 2.8 µL，加入定量體積 Sample Buffer (染色) 及 Reducing Agent (破壞雙硫鍵使蛋白呈現直鏈狀)，最後加水填充至總體積為 10 µL。



▲圖十五、蛋白質轉印至膜上，以 Ponceau S 染色之結果

(圖十五) 中，因蛋白質以呈現直鏈狀，在蛋白質分離中，只受分子量影響，分子量較大的蛋白分離速度較慢，因此由上到下依序為分子量大到小之蛋白質。



▲圖十六、分別用 αHSP101、αHSA32 和 αTubulin 三種抗體反應之結果

(圖十六) 中，Tubulin 微管蛋白不受實驗各種變因影響，占總蛋白量的固定比例，因此在 (表二) 中的計算可將每個樣本總蛋白量固定，就能以各樣本之 Tubulin 表現量相同作為指標，確保電泳結果具參考性。

表三：蛋白質以 Image J 軟體定量的結果

(用 Tubulin 微管蛋白做為 normalization 標準化的蛋白)

Condition	WT					<i>hsp101</i>					<i>hsa32</i>				
	C	H	16L	10L	4L	C	H	16L	10L	4L	C	H	16L	10L	4L
HSP101	0.1	1.0	0.72	0.75	0.83			—			—	1.06	0.16	0.02	0.18
HSA32	—	1.0	1.56	1.10	2.15	—	0.87	—	—	—			—		

(三) 討論

以 Image J 定量後，我們將 WT 之 H 樣本的 HSP101、HSA32 表現量視為 1，討論以下樣本之 HSP101、HSA32 的相對表現量。

1. 討論 WT 之各蛋白質表現結果

WT_C 樣本之 HSP101 蛋白質的量極低，H 樣本經熱誘導後，HSP101 的量達最大值 1.0，接著比較 16L、10L、4L 的 R 樣本，三者之 HSP101 皆隨時間逐漸降解而略小於 1.0，分別為 0.72、0.75、0.83；而 WT_C 樣本之 HSA32 蛋白質的量為 0，H 樣本經熱誘導後 HSA32 的量達 1.0，接著比較 16L、10L、4L 的 R 樣本，三者之 HSA32 蛋白質表現量皆較 H 樣本高，分別為 1.56、1.10、2.15。

因在文獻探討中有提及 *HSP101* 與 *HSA32* 的基因表現具有正回饋的關係，所以我們認為 HSA32 是隨 HSP101 的量增加而升高，HSP101 的量隨光週期的光照期變短而遞增，促進 HSA32 的量亦隨之遞增，而 HSA32 的量遞增又促進更多的 HSP101 產生。雖然光照期變短會使 HSP101 的表現量遞增，但 WT 的 HSP101 與 HSA32 的正回饋使 HSP101 都可維持在高量 (>0.72)，高量的 HSP101 提高 WT 的耐熱性，使 WT 在 LAT 熱處理下的幼苗存活率幾乎都是 100%。

2. 討論 *hsp101* mutant 之各蛋白質表現結果

hsp101 mutant 各樣本之 HSP101 皆為 0；而 *hsp101*_C 樣本的 HSA32 量為 0，H 樣本經熱

誘導後，HSA32 的量達最大值 0.87，隨後 16L、10L、4L 的 R 樣本之 HSA32 量亦皆為 0。

我們認為 *hsp101* mutant 因無法表現 HSP101，使得 HSP101 與 HSA32 無法正回饋，致使 HSA32 在熱誘導後雖然有產生，但因無 HSP101 的正回饋而快速降解，使得 R 樣本的 16L、10L、4L 之 HSA32 量皆為 0。

雖然 16L、10L、4L 的 R 樣本之 HSP101、HSA32 的量皆為 0，但其幼苗存活率會隨著光照期變短而略為遞增，我們認為缺少 HSP101 會使幼苗的耐熱能力大減，但阿拉伯芥還有其他 HSP 家族（如 HSP90）（D Lanneau et al. 2008）可提升耐熱性，經熱誘導產生後亦會逐漸降解，其降解速率亦會隨光週期的光照期變短而遞減，使得幼苗存活率隨著光照期變短而略為遞增。

3. 討論 *hsa32* mutant 之各蛋白質表現結果

hsa32 mutant 各樣本之 HSA32 皆為 0；而 *hsa32_C* 樣本的 HSP101 量為 0，H 樣本經熱誘導後其 HSP101 表現量達最大值 1.06，隨後 16L、10L、4L 的 R 樣本，三者之 HSP101 蛋白質皆隨時間逐漸降解而表現量遠小於 1.06，分別為 0.16、0.02、0.18。

我們認為 *hsa32* mutant_R 樣本之 HSP101 表現量之所以遠小於 1.06，原因應為 *hsa32* mutant 無法表現 HSA32，使得 HSP101 與 HSA32 無法正回饋，因此無法有效減緩 HSP101 的降解速率，使得 R 樣本的 16L、10L、4L 之 HSP101 量極低。

4. LAT 耐熱機制的記憶基礎

綜上所述，LAT 的耐熱機制與 HSP101 的相關性最大，HSP101 在熱誘導後產生，隨時間逐漸遞減，HSP101 遞減愈少，耐熱性愈好，幼苗的存活率就愈高，故可將 HSP101 的量視為 LAT 耐熱機制的記憶基礎。

四、生長指標

(一) 實驗設計

結合在光週期實驗中觀察到植物生長不良的情況，我們利用不同光週期下，西方墨點法中樣本萃取後的總蛋白質濃度和澱粉的呈色，比較光週期改變對於生長的影響。

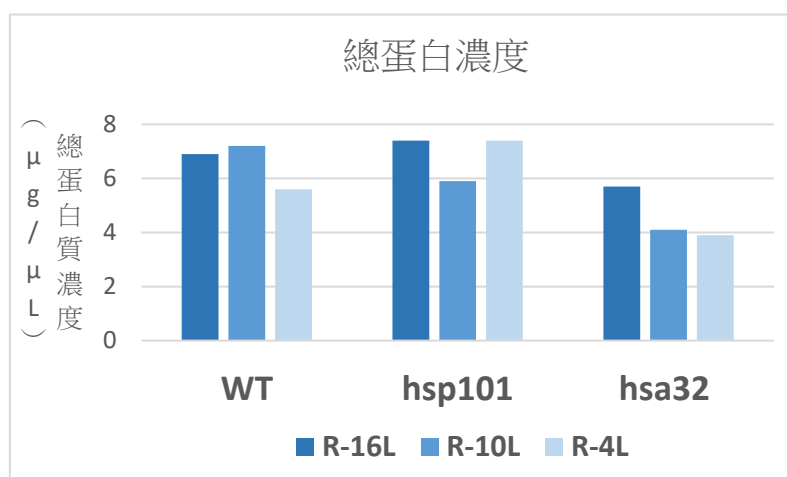
1. 總蛋白質濃度

根據(圖十四)的標準曲線，計算樣本萃取後的總蛋白質濃度，結果如(表一)，將光週期改變樣本的總蛋白質濃度繪圖如(圖十七)。

2. 澱粉呈色

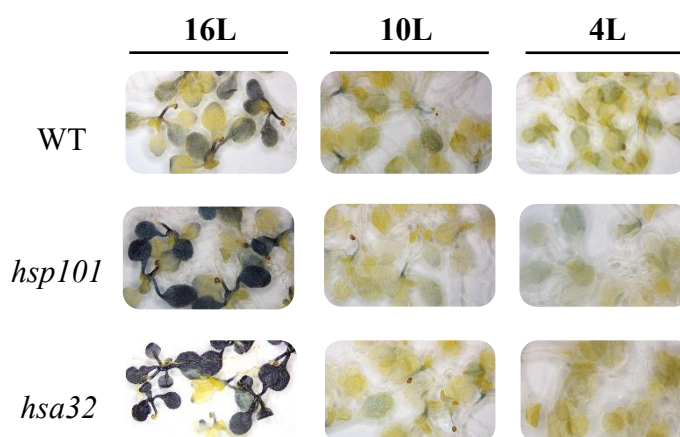
在阿拉伯芥於正常光照下發芽數日後，將其放入 16L、10L、4L 環境下生長兩日，利用酒精褪去葉綠素，滴上碘液比較其呈色(圖十八)。

(二) 實驗結果



▲圖十七、總蛋白質濃度變化圖

比較(圖十七)中 16L、10L、4L 之 R 樣本的總蛋白質濃度，發現在每天光照期較短時，植株的總蛋白濃度較低。



▲圖十八、澱粉呈色圖

(圖十八)中，在光照期較長時，碘液呈色較深，澱粉量較多，反之，在光照期較短時，澱粉量較少，故呈色較淺。

(三) 討論

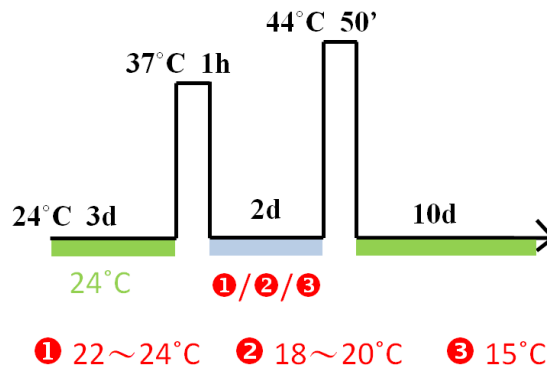
在(圖十七)及(圖十八)中，隨著光照期變短，植株總蛋白質的濃度及澱粉的含量皆變少，我們認為可能是因為光照期變短會使植物代謝減緩，使蛋白質及澱粉的合成減少，因而使生長減緩。

五、低溫實驗

(一) 實驗設計

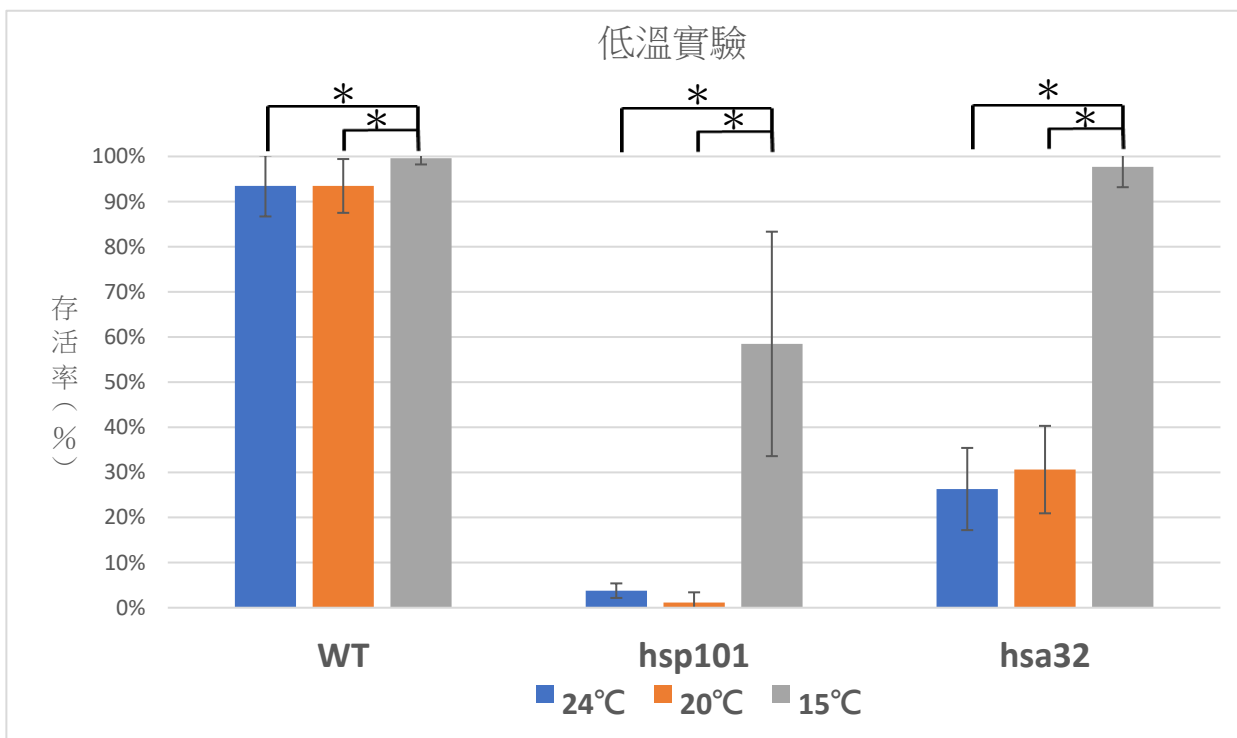
光週期改變影響生長指標，我們推測可能是光照期變短降低植物的代謝，因而減緩生長。而溫度高低和生物代謝速率息息相關，為了驗證是否因為代謝速率變慢而使 HSP101 降解減緩，因此我們設計了低溫實驗，來看溫度改變是否也會影響阿拉伯芥 LAT 的耐熱記憶。

1. 操縱變因：37°C與 44°C熱處理間的兩天間期，如(圖十九)藍色區間，溫度變化分別為：22~24°C、18~20°C、15°C。



▲圖十九、低溫實驗流程圖

(二) 實驗結果



▲圖二十、低溫實驗結果（以 T.TEST 統計分析，*表示 P<0.05）

由（圖二十）可得

1. 不同溫度處理對 WT 存活率（皆>90%）的影響較小，但在最低溫 15°C環境的存活率還是明顯略高於 24°C、20°C。
2. *hsp101* mutant 在 24°C、20°C環境的存活率極低（皆<10%），在最低溫 15°C的存活率明顯高於 24°C、20°C（≈60%）。
3. *hsa32* mutant 在 24°C、20°C環境的存活率較低（皆<40%），在最低溫 15°C環境的存活率最大，且存活率接近 100%。

(三) 討論

1. 溫度與光週期改變處理的實驗結果相似，由此可推測溫度改變處理與光週期改變處理對阿拉伯芥 LAT 耐熱記憶延續的影響相似，皆可能透過讓阿拉伯芥的代謝減緩，進而減少 HSP101 的降解，而使 LAT 耐熱記憶延續較久的時間，提升了突變株的耐熱性。

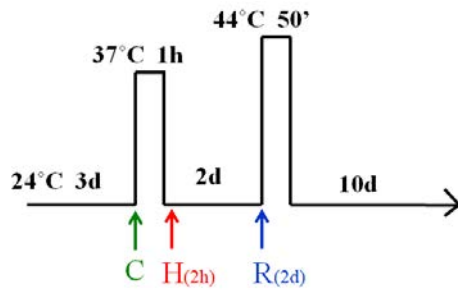
2. 植物的生長以及啟動耐熱機制(如熱休克蛋白協助蛋白質正常摺疊)的過程皆會耗能，若 ATP 供應量固定，植物生長減緩就代表有更多能量可用於耐熱機制來對抗熱逆境，此也可能是在低溫和光照期變短時 LAT 耐熱記憶延續更好的原因。綜上所述，在正常光照或常溫處理下，將正常代謝，造成 HSP101 降解較多、累積較少；若透過光照期變短或低溫的處理，將減緩代謝，造成 HSP101 降解較少、累積較多，可以提升 LAT 耐熱記憶的延續性，從而提升阿拉伯芥對抗熱逆境的能力。故我們接著再進行低溫實驗的西方墨點法，檢測相關耐熱蛋白質的含量變化。

六、西方墨點法

(一) 實驗設計

我們再次以西方墨點法測定阿拉伯芥在各個時段之 HSP101 及 HSA32 的表現量，並且多測定了 sHSP (small heat shock protein)，藉此探討低溫處理對耐熱蛋白質表現量的影響。

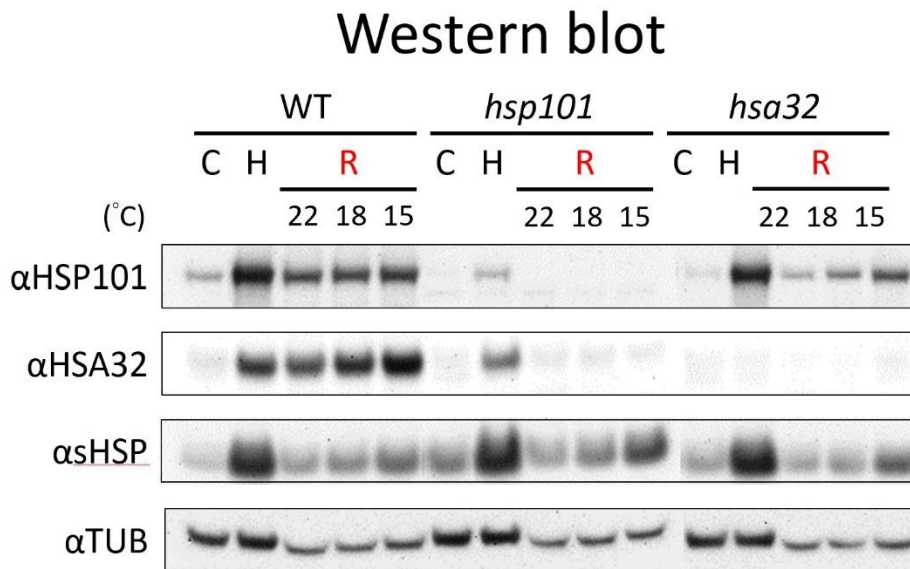
我們取的樣本分為 C、H、R，如(圖二十一)，其中 R 又分為對照組 22~24°C 及實驗組 18~20°C、15°C，欲比較阿拉伯芥之野生型與突變株於各組溫度中，在熱處理間期的耐熱蛋白質表現量之差異。



C: 熱處理前樣本
 H: 熱處理後，放置16L/8D二小時樣本
 R: 熱處理後，在16L/8D二天的樣本

▲圖二十一、西方墨點取樣本時段

(二) 實驗結果



▲圖二十二、分別用 αHSP101、αHSA32、αsHSP 和 αTubulin 四種抗體反應之結果

表四：蛋白質以 Image J 軟體定量的結果

(用 Tubulin 微管蛋白做為 normalization 標準化的蛋白)

Condition	WT					<i>hsp101</i>					<i>hsa32</i>				
	C	H	22°C	18°C	15°C	C	H	22°C	18°C	15°C	C	H	22°C	18°C	15°C
HSP101	1.0	6.1	6.9	7.1	6.3	—	0.6	—	—	—	0.2	5.8	1.4	3.4	3.7
HSA32	1.0	20.6	38.2	50.4	50.0	0.2	12.5	0.1	0.3	—			—		
sHSP	1.0	4.9	3.1	3.8	4.3	2.2	2.5	3.6	4.2	6.9	1.8	5.8	2.9	3.7	4.6

(三) 討論

以 Image J 定量後，我們將 WT_C 樣本的 HSP101、HSA32、sHSP 表現量視為 1，討論以下樣本之 HSP101、HSA32、sHSP 的相對表現量。

1. WT、*hsp101* mutant、*hsa32* mutant 之蛋白質表現結果

WT_R 樣本之 HSP101、HSA32 蛋白質的量由於有兩者間的正回饋而極高；*hsp101* mutant_R 樣本由於無法產生 HSP101，HSA32 的量也極低；*hsa32* mutant_R 樣本之 HSP101 的量則較穩定，隨著溫度下降而愈多。

2. sHSP 蛋白質表現結果與討論

在低溫實驗的西方墨點法中，我們也測定了 sHSP 蛋白質的量，發現在 WT、*hsp101* mutant、*hsa32* mutant 中，sHSP 皆隨著溫度降低而減少降解，此結果也顯示了：*hsp101* mutant 這個缺乏重要耐熱基因的突變株，仍可藉由其他 HSP 家族的耐熱蛋白的作用，使其能維持一定的存活率。

3. 低溫及低光照結果異同討論

從 (表四) 中可看出 HSP101、HSA32 蛋白質的量在溫度較低時較多，說明低溫會使耐熱蛋白的降解速率減緩，和低光照處理的結果相似。

另外，比較低溫（表四）及低光照（表三）中的 H 及 R 樣本間相對表現量的相差幅度，發現低溫處理的相差幅度較低光照處理更大，可推測低溫處理對於減緩耐熱蛋白降解速率的影響較低光照處理大。

4. 討論

由於低溫及低光照處理的耐熱蛋白質表現量的趨勢大致相同，所以我們認為低溫及低光照處理對耐熱蛋白質產生的影響機制相似，皆是透過減緩代謝而減少耐熱蛋白質的降解，因而提升植株的耐熱性。另外在低溫處理時的耐熱蛋白質相差幅度較大，顯示低溫對植株代謝速率的影響可能較低光照更為明顯，更能減緩耐熱蛋白的降解，使植株的存活率更高。

七、花椰菜光週期實驗

花卉蔬果等作物在培育過程為了獲得使花更鮮豔、花冠更大、更具香氣或使果實更大而飽滿、沒有種子等特徵，往往可能犧牲了其對抗逆境、病原菌的能力，若能將類似耐熱記憶延長之研究應用於農業上，將能補足育種改造後的缺失。我們期望能將本研究結果應用於一些不耐熱品種的植物，藉由低溫或低光照處理提高其耐熱性，於是我們選取與阿拉伯芥同為十字花科的兩種不同品種之花椰菜進行實驗，HV-427 為較耐熱的品種，而 HV-178 則為較不耐熱的品種，透過低光照處理探討其提升耐熱性的實際效益。

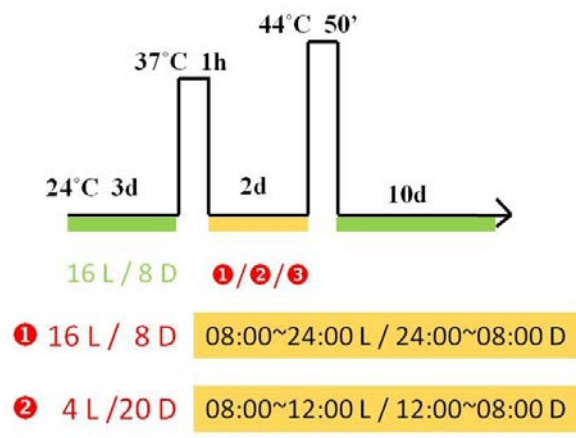
（一）實驗設計說明

此實驗我們採用阿拉伯芥的長期後天耐熱性（LAT）實驗的流程培養花椰菜。

1. 操縱變因：37°C與 44°C 熱處理間的兩天間期，如（圖二十三）橘色區間，光週期變化分別為

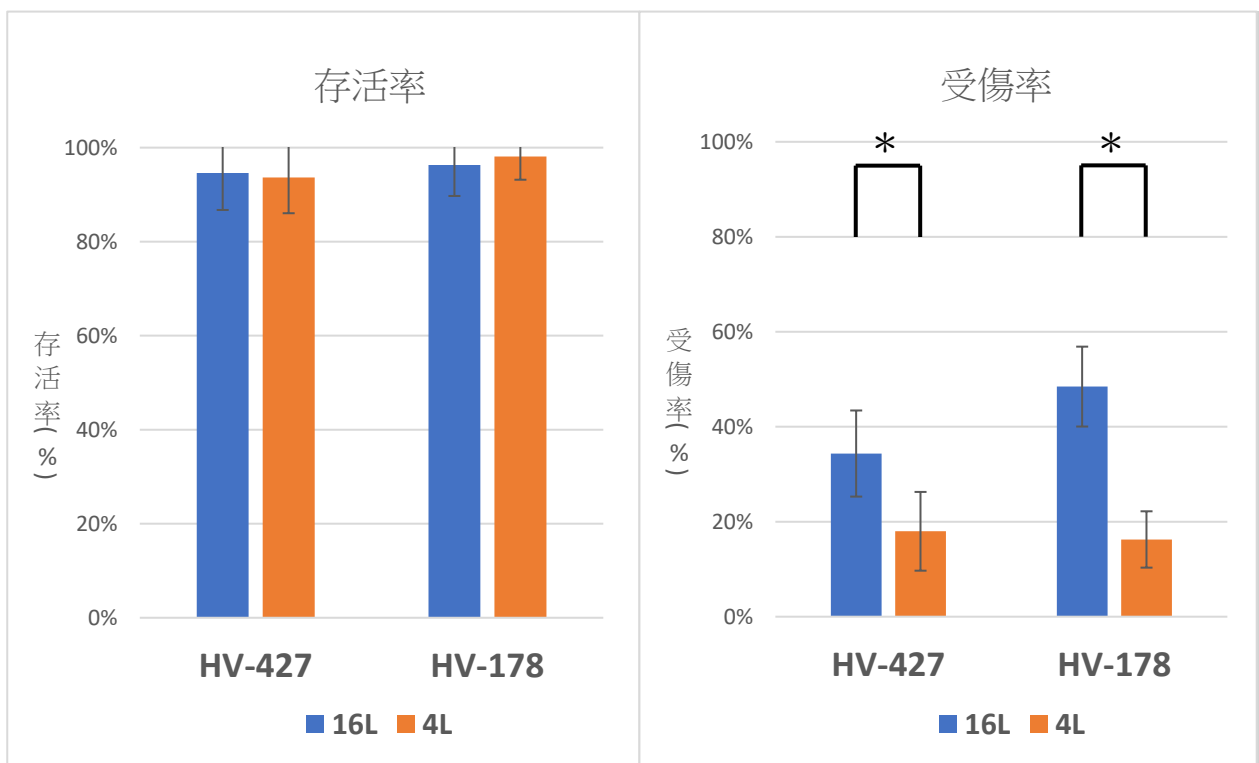
（1）16L/8D

（2）4L/20D



▲圖二十三、花椰菜光週期實驗流程圖

(二) 實驗結果



▲圖二十四、花椰菜存活率實驗結果
(以 T.TEST 統計分析, *表示 P<0.05)

▲圖二十五、花椰菜受傷率實驗結果
(以 T.TEST 統計分析, *表示 P<0.05)

由 (圖二十四) 可得

1. HV-427 及 HV-178 在 16L/8D、4L/20D 光週期下的存活率皆無顯著差異。

由（圖二十五）可得

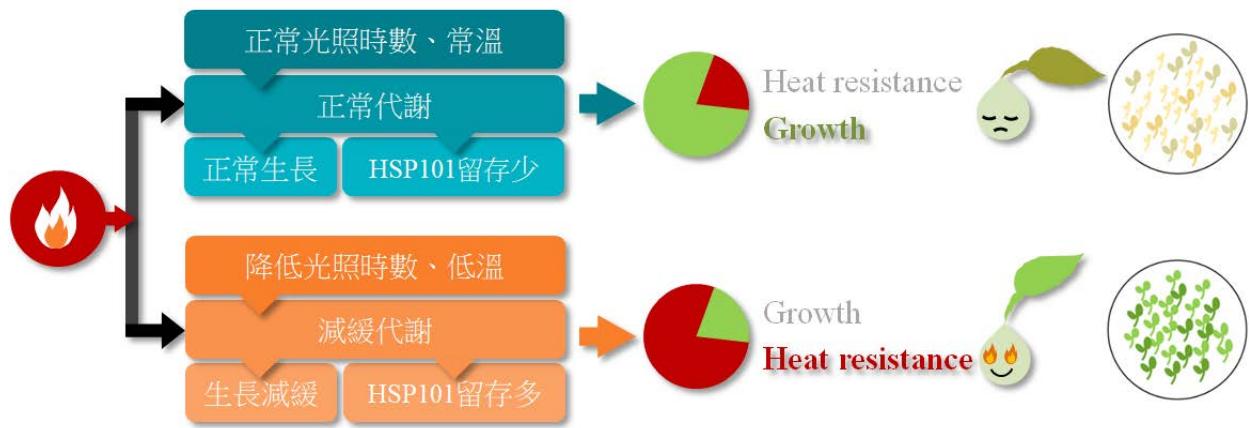
1. HV-427 及 HV-178 在 4L/20D 光週期下的受傷率較在正常光週期下皆有顯著降低。
2. 比較 HV-427 及 HV-178，HV-178 較不耐熱，受傷率較高，但在低光照處理後受傷率與 HV-427 相當。

（三）討論

在阿拉伯芥光週期實驗中我們知道在低光照下突變株經 LAT 處理後存活率會提高，但花椰菜幼苗在 LAT 處理後的存活率都相當高且無顯著差異，可能是因為花椰菜耐熱基因的突變影響較小或其幼苗較阿拉伯芥強壯。雖然低光照處理不影響花椰菜幼苗在 LAT 的存活率，卻可顯著降低其受傷率，且對較不耐熱的品系影響愈顯著。由此可知阿拉伯芥延續耐熱記憶的方式也可以應用到花椰菜，減少其在高溫環境中所受到的傷害。

陸、結論

- 一、HSP101 與 HSA32 蛋白在阿拉伯芥的 LAT 扮演重要角色，兩者的正回饋確保 HSP101 可維持在某一高量，使 LAT 的耐熱記憶可以延續。
- 二、WT 在 LAT 之幼苗存活率不受光照期變短與低溫的影響；*hsp101 mutant*、*hsa32 mutant* 在光照期變短與低溫的處理下，可能透過減緩植物代謝，而減少 HSP101 的降解，使阿拉伯芥在 LAT 的耐熱記憶可以延續較久的時間，從而提升阿拉伯芥對抗熱逆境的能力。
- 三、透過光照期變短與低溫的處理可改變阿拉伯芥在熱逆境中的適應能力，其生理作用機制可能如（圖二十六）。
- 四、低光照處理可降低花椰菜幼苗在 LAT 的受傷率，在未來，花卉、水果或作物之較不耐熱的品系，可透過光照期變短或低溫的處理，延長其對抗熱逆境的能力。



▲圖二十六、不同條件下植物生長及耐熱之能量分配

柒、參考文獻資料

- 一、 D Lanneau, M Brunet, E Frisan, E Solary, M Fontenay, C Garrido. (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Jun, 12(3), 743–761.
- 二、 Ting-ying Wu, Yu-ting Juan, Yang-hsin Hsu, Sze-hsien Wu, Hsiu-ting Liao, Raymond W.M. Fung, Yee-yung Charng. (2013). Interplay between Heat Shock Proteins HSP101 and HSA32 Prolongs Heat Acclimation Memory Posttranscriptionally in Arabidopsis. *Plant Physiology*, Volume 161, Issue 4, Pages 2075–2084.
- 三、 Christine Queitsch, Suk-Whan Hong, Elizabeth Vierling, Susan Lindquist. (2000). Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, Apr, 12(4), 479–492.
- 四、 Liu HC, Liao HT, Charng YY. (2011). The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 34, 738-751.
- 五、 Wu TY, Juan YT, Hsu YH, Wu SH, Liao HT, Fung RWM, Charng YY. (2013). Interplay between heat shock proteins, HSP101 and HSA32, prolongs heat acclimation memory posttranscriptionally in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 161:2075-208

六、Chang YY, Liu HC, Liu NY, Hsu FC, and Ko SS. (2006). Arabidopsis Hsa32, a novel heat-shock protein, is essential for acquired thermotolerance during a long recovery period after acclimation treatment. *Plant Physiol*, 140:1297-1305.

七、吳慧珍（2010）。植物熱休克反應之分子基礎研究-熱休克訊息傳遞相關分子之鑑定與氧化逆境交叉路徑之探討。台灣大學植物科學研究所。民 110 年 2 月 26 日， 取自：

<https://www.airitilibrary.com/Publication/alDetailedMesh1?DocID=U0001-0812201021001100>

八、蔣韋丞、林泊里、陳允平（2020）。地錢熱逆境記憶元件 HSA32 及 HSP101 之功能探討。2020 年台灣國際科學展覽會優勝作品專輯。民 110 年 2 月 26 日， 取自：

<https://twsf.ntsec.gov.tw/activity/race-2/2020/pdf/TISF2020-060010.pdf>

九、吳季烜、林可函、粘蕎。（2020）。越熱！越激發我的小宇宙——探究阿拉伯芥的耐熱機制。全國高級中等學校小論文寫作比賽。民 110 年 2 月 26 日， 取自：

<https://www.shs.edu.tw/works/essay/2020/03/2020032416332745.pdf>

十、徐國凱。（2002）。深度探索 Bio-rad，我的蛋白質要怎麼定量？。民 110 年 2 月 26 日， 取自：

<file:///C:/Users/evon/Desktop/9107%20%E6%B7%B1%E5%BA%A6%E6%8E%A2%E7%B4%A2%20Bio-Rad%20%E6%88%91%E7%9A%84%E8%9B%8B%E7%99%BD%E8%B3%AA%E8%A6%81%E6%80%8E%E9%BA%BC%E5%AE%9A%E9%87%8F%EF%BC%9F.pdf>

十一、Sarah Laskow. (2017). The Hidden Memories of Plants. Atlas Obscura. February 26, 2021, from <https://www.atlasobscura.com/articles/plant-memory-hidden-vernalization>

【評語】 060016

1. 團隊成員研究合作佳，並能積極表達成果。
2. 實驗結果有設計分析，具有完整意義。
3. 內容豐富，多項實驗結果具體明確。
4. 實驗結果之完整應用性仍待評估。