

第九屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA9-482

作品名稱：百變仙丹花-矮仙丹的花色影響因素初探

姓名：潘明鳳

關鍵字：矮仙丹 (*Ixora williamsii*)、花青素 (anthocyanins)、苯基苯乙烯酮合成酶 (chalcone synthase)

摘要

矮仙丹(*Ixora williamsii*)屬於茜草科(Rubiaceae)，是一種常見的校園植物。觀察發現，粉色的矮仙丹花朵較其它兩種顏色來的小，開花數量不多，植株葉片略呈黃綠色。我們嘗試探討影響矮仙丹花色的因素，首先分析校園中種有矮仙丹的三處土壤，發現土壤酸鹼值無明顯差異，推測土壤酸鹼值並非主要的影響因子。接著抽取三種矮仙丹花朵的花青素(anthocyanins)，結果顯示花青素的含量決定矮仙丹的花色，紅色最多，粉色次之，黃色則最少。花青素的含量和花青素合成路徑中酶表現量有關，我們選擇其中的關鍵酶—苯基苯乙烯酮合成酶(chalcone synthase)進行探討，經由聚合酶連鎖反應(PCR)發現粉色矮仙丹的苯基苯乙烯酮合成酶基因表現量較紅色矮仙丹少，因此影響粉色矮仙丹花青素含量，推測可能進一步影響粉色矮仙丹植株的生長狀況。我們另外針對花青素合成路徑中的兩個下游酶基因，二氫黃烷醇還原酶(dihydroflavonol 4-reductase)、花青素合成酶(anthocyanidin synthase)，以及參與在胡蘿蔔素合成路徑中的胡蘿蔔素去飽和酶(ζ -carotene desaturase)進行基因表現量檢測，但沒有獲得任何結果，因此推測在矮仙丹中，此三個酶的基因序列較其它物種來的不相似。

壹、研究動機

矮仙丹，是校園中常見的園藝花卉，伴隨著我們成長，畢業紀念冊中的照片裡，矮仙丹也永遠是最美麗的女配角。校園中其實有多種顏色的矮仙丹，除了大部分常見的紅色矮仙丹外，還有粉色和黃色的矮仙丹。在高一基礎生物第二章植物門的課堂中，老師曾提過土壤的酸鹼值會影響繡球花的花色(1)。好奇的我們就聯想到矮仙丹是否也是因為類似的因素，造成不同的花色，因此決定進行實驗探討影響矮仙丹花色的因素。



圖一 土壤酸鹼值會造成繡球花的花色不同，偏酸性時，繡球花呈現藍色（圖左）；而偏鹼性時，繡球花則為紅色（圖右）（呂學義，民99）。

貳、研究目的

- 一、觀察及分析紅色、粉色及黃色矮仙丹的外觀差異。
- 二、分析校園中種有紅色、粉色及黃色矮仙丹的三處土壤之酸鹼值。
- 三、抽取並比較紅色、粉色及黃色矮仙丹的花青素含量。
- 四、比較紅色及粉色矮仙丹苯基苯乙烯酮合成酶(chalcone synthase)基因的表現量。
- 五、進一步檢測三種矮仙丹中的二氫黃烷醇還原酶(dihydroflavonol 4-reductase)、花青素合成酶(anthocyanidin synthase)，胡蘿蔔素去飽和酶(ζ -carotene desaturase)基因表現量。

參、研究設備與器材

一、研究設備

- (一) 燒杯及玻棒
- (二) 酸鹼測定儀
- (三) 研鉢及研杵
- (四) 分光光度計及比色瓶
- (五) 超高速桌上型離心機
- (六) 吸注器與吸注管
- (七) 電泳槽
- (八) 水浴槽
- (九) PCR 反應儀



圖二—1 酸鹼測定儀



圖二—2 超高速桌上型離心機



圖二—3 電泳槽



圖二—4 水浴槽



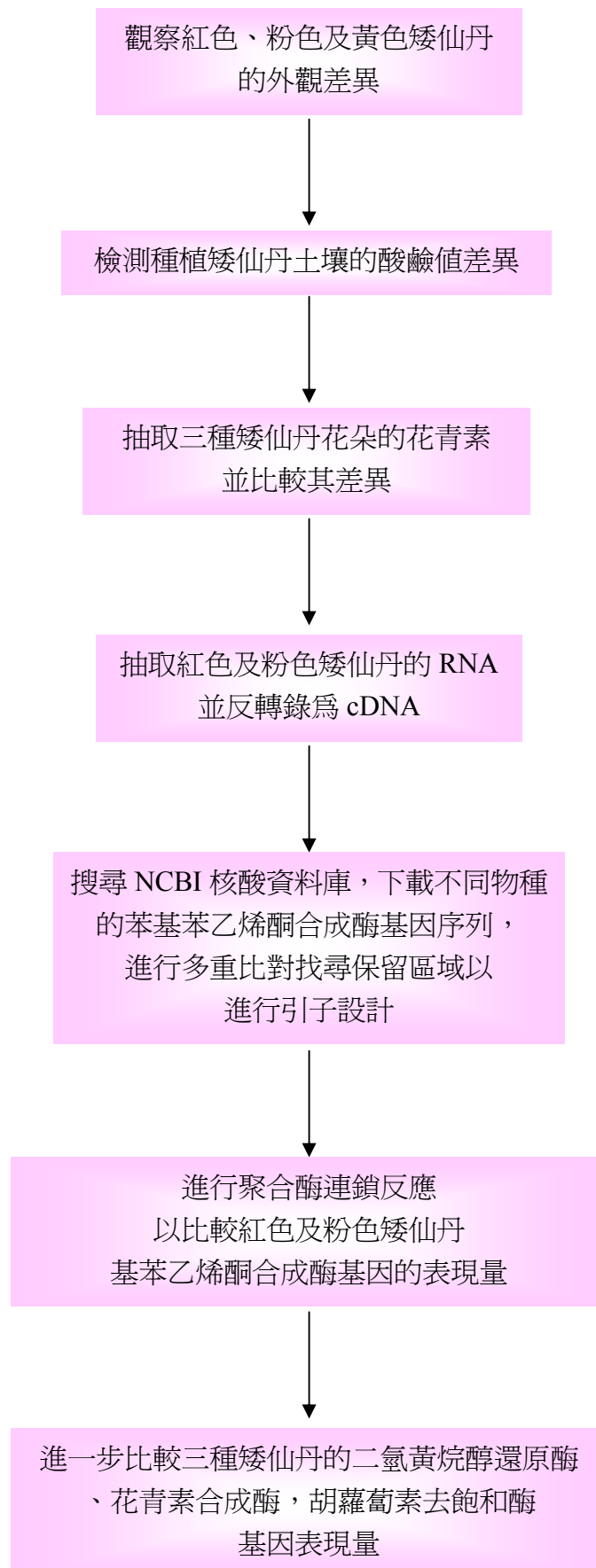
圖二—5 PCR 反應儀

二、材料與藥品

- (一) 紅、粉及黃色矮仙丹
- (二) 液態氮
- (三) Methanol 1% HCL
- (四) 雙蒸餾水
- (五) Guanidine Monothiocyanate
- (六) LiCl
- (七) CH₃COONA
- (八) Tris-HCl
- (九) Na₂EDTA
- (十) SDS
- (十一) 75%及 100%酒精
- (十二) Phenol:Chloroform:IAA
- (十三) Chloroform:IAA
- (十四) DNase
- (十五) Superscript II
- (十六) ProTaq 與 dNTP
- (十七) 5% TBE buffer
- (十八) Agarose
- (十九) Primer (序列設計於後詳述)

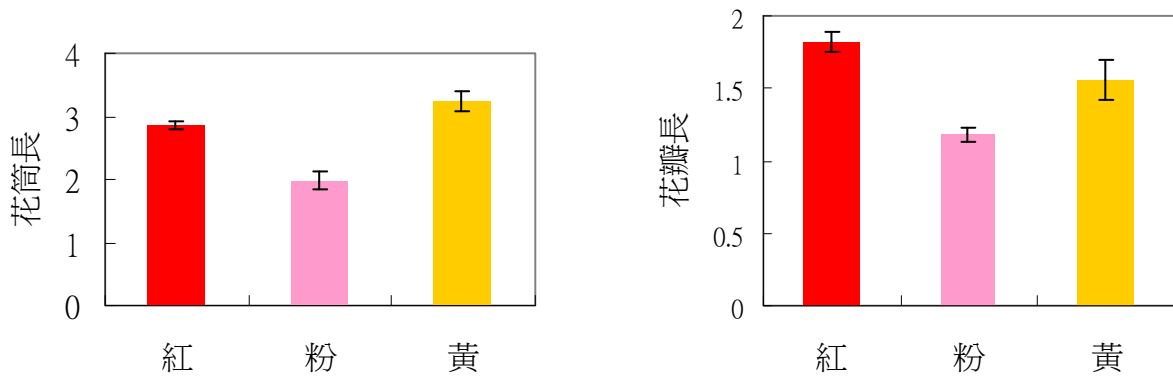
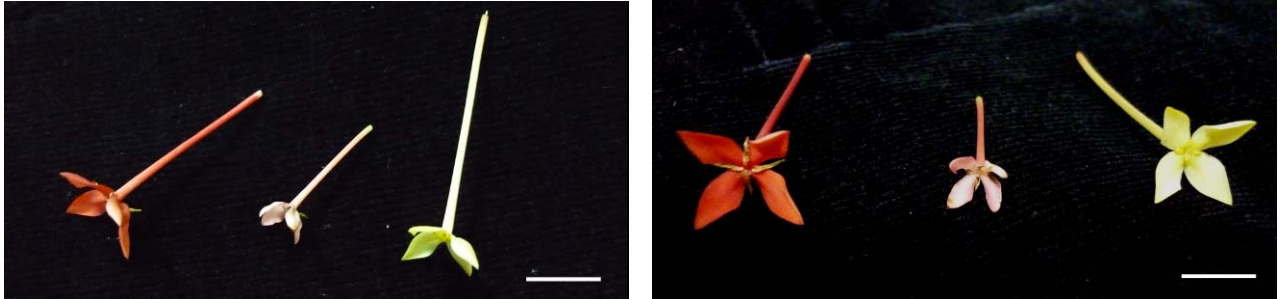
肆、研究過程與方法

一、實驗流程圖



二、紅色、粉色及黃色矮仙丹的外觀觀察

我們分別將每種顏色的矮仙丹各取三十朵進行外觀的測量及觀察。黃色矮仙丹的花筒較長，紅色次之，粉色矮仙丹最短（圖左）。黃色與紅色矮仙丹的花瓣大小相似，粉色矮仙丹最小（圖右）（比例尺為 1 公分）。



圖三 紅、粉及黃色矮仙丹外觀及花筒與花瓣長比較。

三、採集土壤進行土壤酸鹼值測定

(一) 採集土壤，每個地點取土壤量至 300 ml 燒杯的 100 ml 刻度。

1、採集地點一：校門左側花園種植紅色矮仙丹土壤



2、採集地點二：校門入口右前方種植粉色矮仙丹土壤



3、採集地點三：校門入口左前方種植黃色矮仙丹土壤



(二) 進行土壤酸鹼值測定

1、實驗步驟：

- (1) 加水：以和土壤量為二比一的比例加入 200 ml 的蒸餾水。
- (2) 攪拌：使土壤和水能充分溶解均勻。
- (3) 沉澱：靜置一個小時，使土壤中的大塊粒子沉澱，避免影響實驗結果。
- (4) 量測：設定酸鹼測定儀，進行土壤酸鹼值量測。



2、實驗結果：

- (1) 採集地點一（紅色矮仙丹土壤）：土壤 pH 值為 6.9。
- (2) 採集地點二（粉色矮仙丹土壤）：土壤 pH 值為 7.1。
- (3) 採集地點三（黃色矮仙丹土壤）：土壤 pH 值為 6.8。
- (4) 為避免殘餘土壤粒子影響量測結果，於沉澱五日後重新進行檢測，但酸鹼值並無明顯變化。

3、結論：三個採集地點土壤酸鹼值無明顯差異，顯示土壤酸鹼值並非影響矮仙丹花色的主要因子。

四、檢測三種矮仙丹花青素含量

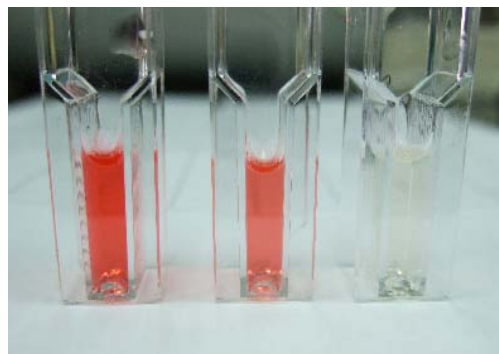
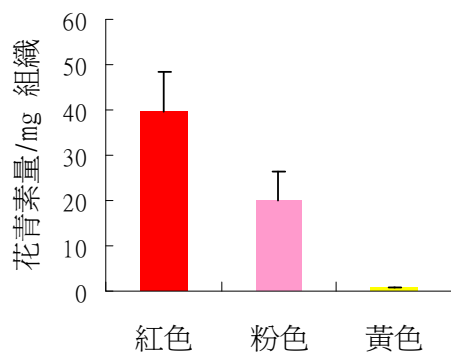
排除土壤酸鹼值因素後，我們和老師討論認為應是花青素的含量差異造成三種矮仙丹的花色不同，因此接著進行簡易的花青素含量的測定實驗。

(一) 實驗步驟(Bruslan, non-date)：

- 1、採集三種顏色的矮仙丹花朵，並秤重。將矮仙丹放入微量離心管中，接著將離心管放入液態氮中以迅速冷凍花朵組織。每種顏色的矮仙丹製備八管離心管的量，離心管內花朵數量依花朵重量有一至四朵不等。
- 2、利用研杵磨碎花朵，接著加入 300 μ l 的 Methanol 1% HCl，繼續研磨。接著將離心管放入冰箱中放置一個晚上。
- 3、在每管離心管內加入 200 μ l 的蒸餾水，接著在排氣櫃裡加入 500 μ l 的 chloroform，接著在離心機內高速離心五分鐘。
- 4、回到排氣櫃內，將離心管中的上清液取出放到新離心管中。
- 5、在離心管中加入 60% Methanol 1% HCl : 40% 蒸餾水至體積為 800 μ l。
- 6、接著將液體吸出放入比色皿中，在光波長 530nm 和 657nm 下進行檢測。最後以 $(A_{530}-A_{657}) * 1000 / X$ mg 組織的公式進行花青素量的計算。

(二) 實驗結果：

	紅色	粉色	黃色
Anthocyanin average	39.6038	19.94588	0.615261
Stdev	8.752893	6.497183	0.070492



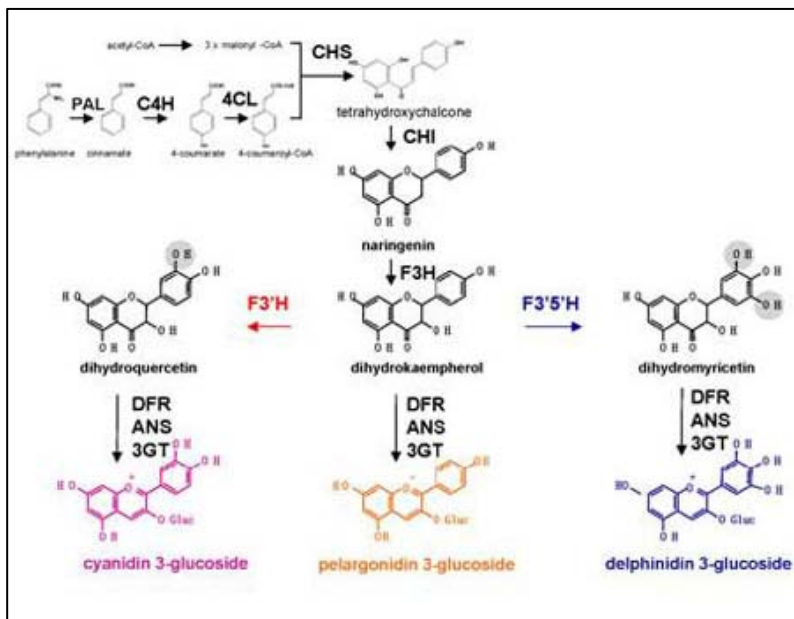
圖四 紅色、粉色及黃色矮仙丹的花青素的平均含量及其標準差（圖左），及有機溶劑萃取液放入比色皿中比較（圖右，由左至右為紅色，粉色及黃色矮仙丹）。

(三) 實驗結論：

經由有機溶劑萃取矮仙丹花青素，可以發現紅色矮仙丹內花青素量最多，粉色次之，黃色量最少。和我們所觀察的外表是相符合的。

五、檢測矮仙丹中參與花青素生合成路徑酶基因表現量

在高二下生物第七章有基因的表現課程，我們想試著探討基因表現的差異是否會造成紅色和粉色矮仙丹花青素量的差異。在花青素的合成路徑中，包含有多種參與酶，我們推測這些酶的表現量是影響花青素含量的關鍵。上游的苯基苯乙烯酮合成酶(chalcone synthase, CHS)會決定花青素前驅物的合成量。花青素化合物的顏色則由中游的 F3H、F3'H 或 F3'5'H 所決定，此三種酶會分別製造 dihydrokaempferol(DHK), dihydroquercetin (DHQ)和 dihydromyricetin (DHM)，藉由下游的酶(如二氫黃烷醇還原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)、花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)和轉糖酶(UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, UFGT))修飾後，會產生具有磚紅、紅或藍紫色的化合物(Ferrer *et al.*, 2008, Han *et al.*, 2010)。之前的花青素萃取實驗顯示矮仙丹的花色主要為紅色，因此初步排除和下游酶有關。我們選擇一個上游酶 CHS，兩個下游酶 DFR 和 ANS 進行基因表現量檢測。另外，查詢資料後發現黃色和胡蘿蔔素有關(黃勝忠, 民 92)，因此我們另外選擇一個參與在胡蘿蔔素生合成路徑中的胡蘿蔔素去飽和酶(ζ -carotene desaturase, ZDS)，檢測其在黃色矮仙丹中的基因表現量。



PAL: Phenylalanine ammonia lyase

(苯丙氨酸解氨酶)；

C4H: Cinnamate 4-hydroxylase

(肉桂酸羟化酶)；

4CL: 4-coumarate: CoA-ligase:

CHS: chalcone synthase

(苯基苯乙烯酮合成酶)；

CHI: chalcone isomerase

(苯基苯乙烯酮異構酶)；

F3H: flavanone 3-hydroxylase

(二氫黃酮-3-羟化酶)；

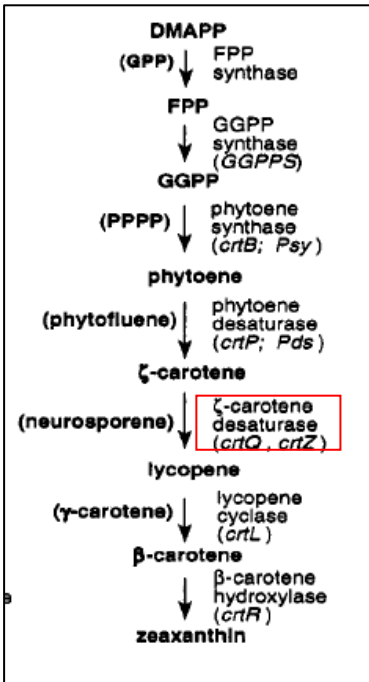
F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase

(類黃酮 3'-羟化酶)；

F3'5'H: flavonoid 3'5'-hydroxylase (類黃酮 3'5'-羟化酶)；DFR: dihydroflavonol 4-reductase (二氫黃酮醇還原酶)；

UFGT: UDPglucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (尿苷二磷酸葡萄糖類黃酮-3-O-葡萄糖基轉移酶)。

圖五 花青素合成路徑(Florigene, non-date)。



DMAPP : dimethylallyl diphosphate (二甲烯丙基焦磷酸)

GPP: geranyl pyrophosphate (二異戊二烯焦磷酸)

FPP: farnesyl pyrophosphate (法呢基焦磷酸)

GGPP: geranylgeranyl pyrophosphate (四異戊二烯焦磷酸)

Phytoene: 八氫番茄紅素, Phytofluene: 六氫番茄紅素

ζ-carotene: zeta-胡蘿蔔素, Lycopene: 茄紅素,

β-carotene: beta-胡蘿蔔素, Zeaxanthin: 玉米黃素

Phytoene desaturase: 八氫番茄紅素去飽和酶

Lycopene cyclase: 茄紅素環化酶

β-carotene hydroxylase: beta-胡蘿蔔素羥化酶

圖六 胡蘿蔔素合成路徑(Hirschberg *et al.*, 1997)。

(一) 抽取 RNA，基因的表現量可由組織內 RNA 的表現量初步觀測。

1、實驗步驟：

- (1) 秤取材料重量後，放入研鉢中，加入液態氮研磨直到成粉末狀，接著加入 6 ml lysis buffer，繼續研磨直到成液態狀。
- (2) 拿出離心管，在 13000 rpm，4°C 下離心 15 分鐘。接著將上清液倒入另一離心管中，接著加入 4M LiCl 直到體積為 30 ml。將管子放入 4°C 冰箱一個晚上。
- (3) 在 13000 rpm，4°C 下離心 90 分鐘。丟棄上清液，加入 12 ml 3M LiCl，接著大力震盪。
- (4) 於 13000 rpm，4°C 下離心 60 分鐘。丟棄上清液，加入 6 ml solubilization buffer，接著搖晃 45 分鐘。
- (5) 在步驟四的液體中加入 Phenol: Chloroform: IAA=25: 24: 1，接著大力震盪。在 13000 rpm，4°C 下離心 15 分鐘。
- (6) 在步驟 12 的上清液體中加入 Chloroform: IAA=24: 1，接著大力震盪。在 13000 rpm，4°C 下離心 15 分鐘。
- (7) 在步驟 6 的上清液體中加入 Isopropanol 和 3M NaOAc，上下搖晃，放入 -80°C 冰箱。

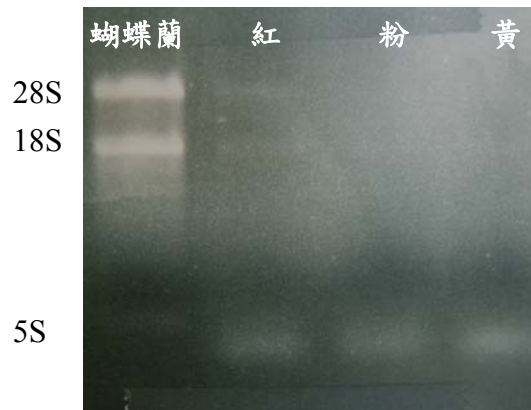
- (8) 在 13000 rpm，4°C 下離心 20 分鐘。丟棄上清液。
- (9) 加入 500 μ l 的冰 75%酒精，在 13000 rpm，4°C 下離心 15 分鐘。
- (10) 丟棄上清液在 50~60°C 下烘乾約 15 分鐘。加入適當的 H₂O 溶解沉澱物，溶解完後置於冰上。
- (11) 測量濃度後，取 500 ng RNA 進行跑膠(1%)確認 RNA 品質。

2、抽取 RNA 實驗結果

(1) 第一次抽取



(2) 第二次抽取



圖七

- (1) 抽取紅色矮仙丹及粉色矮仙丹的 RNA。黑色片段為染劑顏色。
- (2) 抽取紅色、粉色、及黃色的矮仙丹 RNA，大葉蝴蝶蘭(*Phalaenopsis bellina*)的 RNA 作為比較值。

3、抽取 RNA 實驗結論：

在第一次的抽取中，發現矮仙丹的核糖體 RNA 只有一個片段，和植物中常見的三個片段（28S、18S 和 5S）不相同。第一次抽取時，我們發現矮仙丹花朵中具有較多的多醣類物質，導致 RNA 純化不易。故在進行第二次抽取時，我們將具有黏液的雄蕊部分去除後再行抽取，並同時抽取大葉蝴蝶蘭(*P. bellina*)的 RNA 作為比較值。實驗結果顯示第一次 RNA 抽取的片段應為 5S 的核糖體 RNA，但矮仙丹的片段較大葉蝴蝶蘭來的小。矮仙丹的 28S 和 18S 片段較大葉蝴蝶蘭的量來的稀少，5S 則較多。

(二) 去除 DNA 及進行反轉錄

要進行基因的表現量測定需利用聚合酶連鎖反應(PCR)。因此去除在抽取 RNA 實驗過程中可能污染的 DNA，並利用反轉錄酶(Superscript II) 將 RNA 轉錄成 cDNA。

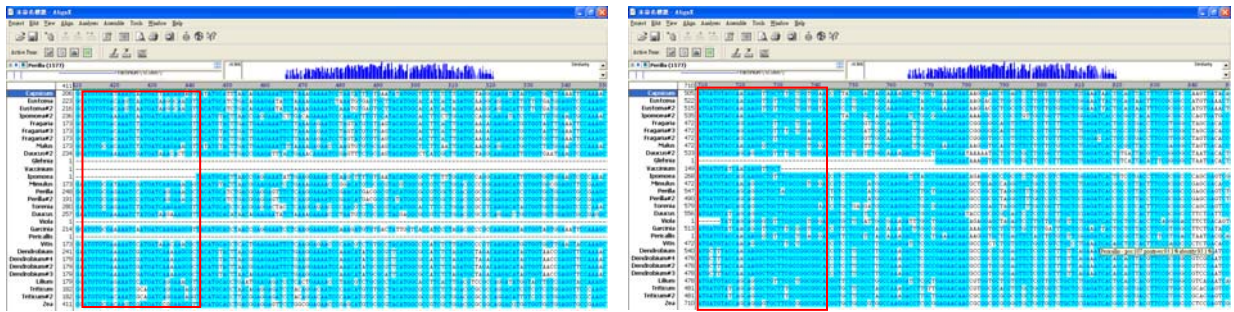
實驗步驟：

- (1) 分別取出紅色、粉色及黃色矮仙丹 20 μg RNA，加入 DNase 及 buffer 後，放入 37°C 水浴 15 分鐘進行 DNA 的去除。
- (2) 加入 Chloroform: IAA=24: 1 後，在 13000 rpm，4°C 下離心 15 分鐘。
- (3) 將上清液倒入另一離心管中，加入 100% 酒精和 3M NaOAc 進行核酸沉澱，放入 -80°C 冰箱一個晚上。
- (4) 在 13000 rpm，4°C 下離心 30 分鐘，丟棄上清液，加入 75% 酒精以進行清洗，再次離心後，加入適當的 H₂O 溶解沉澱物。
- (5) 取去除 DNA 的 RNA 10 μg ，加入 Oligo-dT 和 dNTP 後，放入 70°C 水浴 5 分鐘後，接著加入 1st strand buffer、0.1M DTT 及 superscript II。
- (6) 放入 50°C 水浴 1.5 小時後，再放入 70°C 內，最後用水稀釋到濃度為 100 ng/ μl 。

(三) 設計進行聚合酶連鎖反應的引子(primer)

利用美國 NCBI 的核酸資料庫(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)，分別以關鍵字 chalcone synthase RNA、dihydroflavonol 4-reductase RNA、anthocyanidin synthase RNA 和 ζ -carotene desaturase RNA 進行搜尋後，各選擇其中的 29、18、7 和 10 序列（分別來自阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)、台灣山茶(*Camellia sinensis*)、甜椒(*Capsicum annuum*)、胡蘿蔔(*Daucus carota*)、洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)、大理花(*Dahlia variabilis*)、石斛蘭(*Dendrobium*)、杜莎藻(*Dunaliella salina*)、荷蘭草莓(*Fragaria x ananassa*)、山竹(*Garcinia mangostana*)、濱防風(*Glehnia littoralis*)、紅鳳菜(*Gynura bicolor*)、天茄兒(*Ipomoea alba*)、圓葉牽牛(*Ipomoea purpurea*)、豔紅鹿子百合(*Lilium speciosum*)、蕃茄(*Lycopersicon esculentum*)、蘋果(*Malus x domestica*)、*Mimulus aurantiacus*、瓜葉菊(*Pericallis cruenta*)、紫蘇(*Perilla frutescens*)、黑楊(*Populus trichocarpa*)、小麥(*Triticum aestivum*)、夏堇(*Torenia hybrida*)、蔓越莓(*Vaccinium macrocarpon*)、山桑子(*Vaccinium myrtillus*)、葡萄(*Vitis labrusca*)、香堇(*Viola cornuta*)、玉米(*Zea mays*)利用 Vector NTI 軟體和 Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW(<http://align.genome.jp/>)進行序列多重比對(multiple alignment)，並選取兩個保留片段分別進行上下游的引子設計。

(1) 苯基苯乙烯酮合成酶(chalcone synthase, CHS)引子設計



圖八-1 CHS 基因上 (左) 游、下 (右) 游引子設計的保留片段位置 (紅色方框)。

鈎取矮仙丹內 CHS 基因的引子序列設計如下，大小約為 300 bp：

CHS_5' ATGTGYGANAAATCNATGATMATCARRAAGCG

CHS_3' CCDCCRGCRARACAGCCYTGNTGRTACATCAT

(2) 二氫黃烷醇還原酶(dihydroflavonol 4-reductase, DFR)引子設計



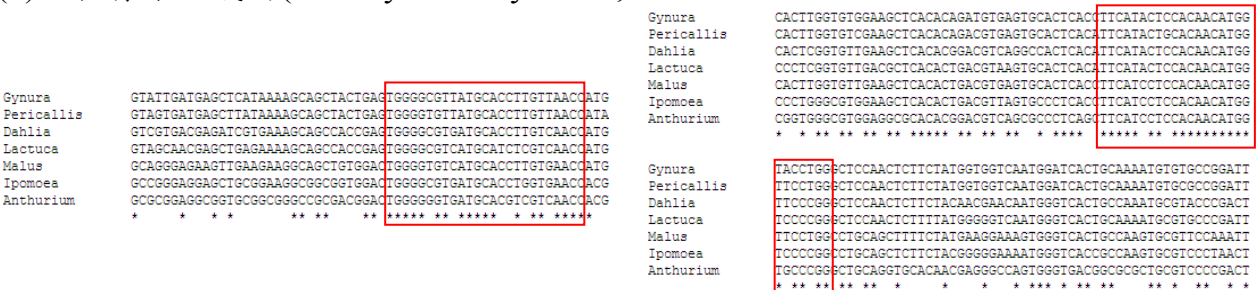
圖八-2 DFR 基因上 (左) 游、下 (右) 游引子設計的保留片段位置 (紅色方框)。

鈎取矮仙丹內 DFR 基因的引子序列設計如下，大小約為 200 bp：

DFR_5' CCHGAGAABGARRTRATHAAVCCNRC

DFR_3' TTKGANRCRAARTACATCCADSCDGTGTCAT

(3) 花青素合成酶(anthocyanidin synthase, ANS)引子設計



圖八-3 ANS 基因上 (左) 游、下 (右) 游引子設計的保留片段位置 (紅色方框)。

鈎取矮仙丹內 ANS 基因的引子序列設計如下，大小約為 400 bp：

ANS_5' TGGGGBGTBATGCAYSTBGTBAACC

ANS_3' CCRGGNACCATGTTGTGSAGKATGAA

(4) 胡蘿蔔素去飽和酶(ζ -carotene desaturase, ZDS)引子設計

Arabidopsis_1	TCGACTGCTGTA	BAGCTTCTGGATCAGGGTCACGAGGTG ATATATGATTGAGGACA	Arabidopsis_1	ATGTGGATCCTGTTGCTTATGCTTAG TTTCATAGACTGCGATAACATGAGTGC
Arabidopsis_2	TCGACTGCTGTA	BAGCTTCTGGATCAGGGTCACGAGGTG ATATATGATTGAGGACA	Arabidopsis_2	ATGTGGATCCTGTTGCTTATGCTTAG TTTCATAGACTGCGATAACATGAGTGC
Malus_2	TCACCCGCGT	BAGCTTTTGGATCAGGCCATGAGGTG ATATTTATGAATCGAGGCT	Malus_2	ATGTGGATCCTGTTGCTTATGCTTAG TTTATGACTGTGATAATATTAGCGCTGT
Malus_1	TCACCCGCGT	BAGCTTTTGGATCAGGCCATGAGGTG ATATTTATGAATCGAGGCT	Malus_1	ATGTGGATCCTGTTGCTTATGCTTAG TTTATGACTGTGATAATATTAGCGCTGT
Lycopersicon_1	TCGACTGCTGTC	BAGCTCTTGGATCAGGGACATGAGGTG ATATACGAATCAAGGACT	Lycopersicon_1	ATGTGGATCCTGTTGCTTATGCTTAG TTTCATGACTGTGATAACATGAGTGC
Lycopersicon_2	TCGACTGCTGTC	BAGCTCTTGGATCAGGGACATGAGGTG ATATACGAATCAAGGACT	Lycopersicon_2	ATGTGGATCCTGTTGCTTATGCTTAG TTTCATGACTGTGATAACATGAGTGC
Fragaria	TCACACGCTGT	BAGCTTTTGGATCAGGCCATGAGGTG ATCTACGAATCGAGGCT	Fragaria	ATGTGGATCCTGTTGCTTATGCTTAG TTTCATGACTGTGATAACATGAGTGC
Ipomoea	TCACCCGCTGT	BAGCTTTTGGATCAGGGACACGAGGTG ATCTTATGATTGAGGCT	Ipomoea	ATGTGGATCCTGTTGCTTATGCTTAG TTTCATGACTGTGATAATATTAGTGC
Triticum	TCACCCGCTGT	BAGCTTTTGGATCAGGGACACGAGGTG ATCTTATGATTGAGGCT	Triticum	ATGTGGATCCTGTTGCTTATGCTTAG TTTCATGACTGTGATAATATTAGTGC
Zea	TCACCCGCTGT	BAGCTTTTGGATCAGGGACACGAGGTG ATCTTATGATTGAGGCT	Zea	ATGTGGATCCTGTTGCTTATGCTTAG TTTCATGACTGTGATAATATTAGTGC
Jatropha	TCACCTGCTGT	BAGCTATTGGATCAAGGTG ATATATGATTGAGGCT	Jatropha	ATGTGGATCCTGTTGCTTATGCTTAG TTTCATGACTGTGATAACATGAGTGC

圖八-4 ZDS 基因上 (左) 游、下 (右) 游引子設計的保留片段位置 (紅色方框)。

鈎取矮仙丹內 ZDS 基因的引子序列設計如下，大小約為 300 bp：

ZDS_5' GAGCTHYTGGAYCARGGHCAYGAGGTDGA

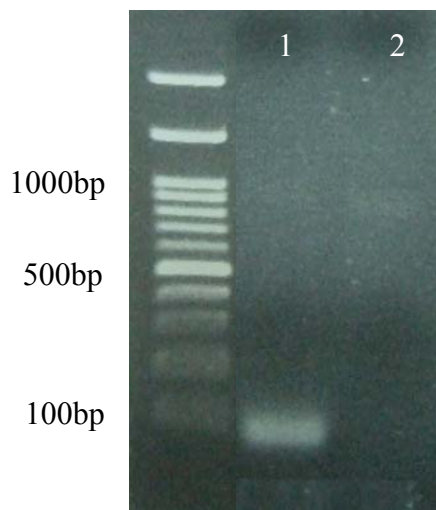
ZDS_3' CCHARDGCRRTANSSRACAGGATCCCACAT

(四) 進行聚合酶連鎖反應

(1) 鈎取矮仙丹內 CHS 基因

實驗步驟：

取出紅色及粉色矮仙丹各 20 ng 的 cDNA，以 94°C 下 45 秒，55°C 下 45 秒及 72°C 下 30 秒進行 35 個循環，並將結果進行跑膠(1%)測定。



圖九 紅色矮仙丹 (1) 及粉色矮仙丹 (2) 的苯基苯乙烯酮合成酶 (chalcone synthase) 的表現量，約 100 bp 上有一明顯片段。使用 2000bp Marker。

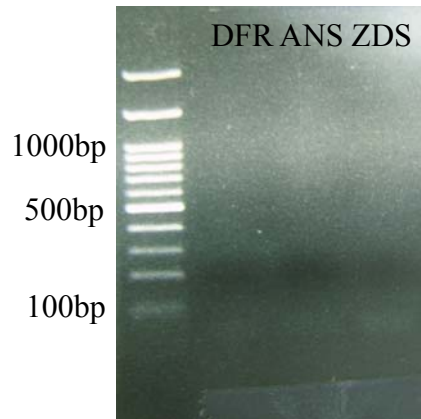
實驗結果：

經由 PCR 實驗發現紅色矮仙丹內苯基苯乙烯酮合成酶 (chalcone synthase) 的表現量明顯較粉色矮仙丹來得多，推測可能因此造成粉色矮仙丹花青素含量較少，雖在此實驗中粉色矮仙丹並沒有明顯的片段，但若將模板(template)濃度提升至 40 ng，即可觀察到粉色矮仙丹的表現。

(2) 鈎取矮仙丹內 *DNR*、*ANS* 及 *ZDS* 基因

實驗步驟：

取出紅色、粉色及黃色矮仙丹各 20/50/100/200/500 ng 的 cDNA，以 94°C 下 1 分鐘，55/56/58/59°C 下 1 分鐘及 72°C 下 1 分鐘進行 35/37/40 個循環，並將結果進行跑膠(1%)測定。



圖十 (在此顯示其中一個 PCR 條件跑膠結果) 利用紅色矮仙丹 RNA 50 ng 進行二氫黃烷醇還原酶(DFR)與花青素合成酶(ANS)的基因表現量測定。另外利用黃色矮仙丹 RNA 50 ng 進行胡蘿蔔素去飽和酶(ZDS)的基因表現量測定。但沒有得到任何片段。

實驗結果：

在這個實驗中，我們嘗試使用不同批次的 RNA、不同的模板濃度與不同的 T_m 值，甚至是更換 Tag 酶來進行 PCR，但都無法得到有意義的片段。因此推測在矮仙丹中這三個基因的序列較其它物種來的不相似。

伍、研究結果

- 一、觀察三種顏色的矮仙丹後發現，紅色和黃色矮仙丹的花朵花筒及花瓣都較粉色矮仙丹來的長和大。而從日常觀察也發現，粉色矮仙丹的開花數量明顯較少，葉片顏色不若紅色及黃色矮仙丹鮮豔，偏黃綠色，因此我們推測粉色矮仙丹的生長狀況推測較不佳。
- 二、種植三種顏色矮仙丹的土壤酸鹼值並無明顯差異，皆偏中性，因此不是影響矮仙丹顏色差異的主要因素。
- 三、比較三種顏色矮仙丹的花青素含量顯示，紅色矮仙丹量最多，粉色次之，黃色矮仙丹量最少，顯示影響矮仙丹顏色的主要差異是在花朵內花青素的含量。黃色矮仙丹幾乎不含花青素，顯示黃色並非由花青素所造成，而可能是由胡蘿蔔素所影響（黃勝忠，民 92）。
- 四、接著比較紅色矮仙丹和粉色矮仙丹中，苯基苯乙烯酮合成酶(CHS)的表現量，發現紅色矮仙丹的表現量較粉色矮仙丹多，顯示紅色矮仙丹的花青素含量較高乃是因為紅色矮仙丹內基苯乙烯酮合成酶 (chalcone synthase)的表現量較高導致。
- 五、進一步檢測三種矮仙丹中的二氫黃烷醇還原酶(DFR)、花青素合成酶(ANS)和胡蘿蔔素去飽和酶(ZDS)的基因表現量，但都無法得到有意義的結果。初步推測在矮仙丹中，此三個基因的序列較我們選擇的其它物種序列來的不相似。

陸、討論

- 一、紅色、粉色及黃色矮仙丹的花青素含量與其生長狀況之相關性

花青素儲存在植物細胞的液胞中，是植物呈現紅、藍及紫顏色的主要來源，也扮演著吸引授粉者的角色，和植物的繁衍有相當密切的關係。花青素的顏色會隨著身處環境的酸鹼值而有所變化，酸性時為紅色，而隨著氫離子的減少，會有紫色、藍色和青色等等的變化，因此花青素可作為酸鹼指示劑使用。花青素會吸收光能，當太陽光中的紫外線太多，會對植物體內的蛋白質、核酸進行破壞時，花青素就可以發揮吸收的作用，進而保護植物體(Winkel-Shirley, 2001)。花青素也是天然的抗氧化劑。氧是不穩定的元素，容易搶奪其它元素的電子，因而導致細胞的不穩定狀況，花青素藉由提供自由基電子，達到抗氧化的功能。深色蔬果內含有大量的花青素，對人類的健康有益(Crinnion, 2010)。

經由本次實驗我們發現，由於粉色矮仙丹內苯基苯乙烯酮合成酶基因的表現量較低，導致粉色矮仙丹的花青素量較紅色矮仙丹少，這可能是導致粉色矮仙丹植株生長狀況較不佳的原因之一。而黃色矮仙丹雖僅含微量花青素，生長狀況卻仍十分良好，查詢資料後發現（黃勝忠，民 92），黃色系花朵大部份含有大量的胡蘿蔔素，胡蘿蔔素會參與在植物的光合作用反應中，胡蘿蔔素也是良好的抗氧化劑(Zadák *et al.*, 2009)。因此我們推測，黃色矮仙丹雖然花青素含量偏低，但胡蘿蔔素可以取代花青素的角色，故黃色矮仙丹的生長狀況仍佳。

二、矮仙丹的核糖體 RNA 片段

在本次實驗中我們另外觀察一個有趣的現象，矮仙丹核糖體 RNA 的 28S 和 18S 的片段相對較弱，並具有一個明顯的 5S（有可能更小）片段。第一次矮仙丹的 RNA 抽取實驗中，甚至只有觀察到一個 5S 片段。和老師實驗室經驗中的核糖體 RNA 模式不符（也就是具有明顯的 28S 與 18S RNA，5S 相對較不明顯）。

我們嘗試推測造成此現象的原因。第一次抽取時，我們發現矮仙丹花朵中似乎具有較多的多醣類，導致 RNA 純化不易，這時我們只有觀察到一個 5S 片段；去掉花朵中具有黏液的雄蕊後，我們就觀察到微弱的 28S 與 18S 片段。我們推測有可能是矮仙丹花朵中過多的多醣類導致 RNA 在跑膠時不易展開，因此 28S 與 18S 片段才無法觀察到，這樣的推測目前尚無文獻可證實，也是未來可以進一步研究的方向。

三、紅色與粉色矮仙丹的苯基苯乙烯酮合成酶基因

本次實驗中我們利用多個物種的苯基苯乙烯酮合成酶基因序列，進行多重比對後的保留性區域，設計引子釣取矮仙丹中的苯基苯乙烯酮合成酶基因序列。經由電泳膠片顯示引子可以在矮仙丹 cDNA 中放大一個約 100 bp 的片段，和所預期的 300 bp 的片段大小不符合，顯示在矮仙丹中，苯基苯乙烯酮合成酶基因序列可能和其它物種較不相似。而我們查詢 NCBI 的核酸資料庫，無法查到矮仙丹所屬茜草科(Rubiaceae)關於花青素的相關資料，故未來可進一步定序此片段以確認矮仙丹的苯基苯乙烯酮合成酶基因序列和其它物種的差異。

四、矮仙丹的二氫黃烷醇還原酶、花青素合成酶和胡蘿蔔素去飽和酶基因

以鈎取矮仙丹的苯基苯乙烯酮合成酶基因的經驗為基礎，我們嘗試測試其它三個基因—二氫黃烷醇還原酶、花青素合成酶和胡蘿蔔素去飽和酶的表現量。令我們十分挫敗的是，不論如何更改實驗條件，我們挑選的保留片段所合成的引子都無法鈎取在矮仙丹中的這三個基因。顯然在矮仙丹中，此三個基因的序列和其它物種較不相似，雖然我們在選擇物種時，已盡量挑選多樣化的物種（包括木本植物、單子葉及雙子葉植物）。

未來若要進行相似的實驗，我們建議應先使用快速放大 cDNA 尾端實驗 (Rapid amplification of complementary DNA ends) 嘗試鈎取矮仙丹的基因全長後，再進行表現量的測定。PCR 實驗雖然簡單方便，但比較適用於已經確認的基因序列，鈎取未知序列時，尤其是在序列的保留性不高時，很容易碰到與本實驗相同的狀況。僅供後人參考。

矮仙丹雖然是常見的園藝花卉，但在我們查詢文獻的時候，發現目前對矮仙丹的研究十分稀少，尤其是在分子層次上的研究可以說是完全沒有。而針對矮仙丹所屬的茜草科進行搜尋，也幾乎沒有相關資料可以參考。矮仙丹確實有其獨特性，但同時也具有很大的實驗困難性。希望藉由我們的實驗能拋磚引玉，吸引更多人來共同研究這伴隨在我們身旁的矮仙丹。

柒、結論

在本次實驗中，我們從校園中常見的園藝植物—矮仙丹著手，探討造成矮仙丹花色差異的幾個因子。經由實驗顯示土壤酸鹼值並非主要的影響因素，矮仙丹花朵組織內的花青素含量才是矮仙丹花色差異的主因。進一步利用聚合酶連鎖反應檢測矮仙丹苯基苯乙烯酮合成酶基因的表現量，發現紅色矮仙丹的苯基苯乙烯酮合成酶表現明顯較粉色矮仙丹為多，因此造成花青素含量的差異。我們推測此差異可以進一步導致粉色矮仙丹生長不佳的狀況。未來可藉由定序矮仙丹中苯基苯乙烯酮合成酶，探討和其它物種的差異性。

捌、參考資料及其他

玫瑰中心呂學義（無日期）。幸福花團－繡球花。園藝文摘。民 99 年 4 月 10 日，

取自 http://web.igarden.com.tw/magazine/show_one.php?serial_s=699&serial_m=3

黃勝忠、陳裕星、秦立德（民 92）。彩色海芋花色素組成分之分析。台中農業改良場研究彙報，七十八，23-24

Brusslan, J.. (non-date) Anthocyanin extraction protocol. California State University. Retrieved April 10, 2010, from <http://www.csulb.edu/~bruss/>

Crinnion, WJ. (2010) Organic foods contain higher levels of certain nutrients, lower levels of pesticides, and may provide health benefits for the consumer. *Altern Med Rev.* 15: 4-12

Ferrer, JL., Austin, MB., Stewart, C Jr., Noel, JP.. (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol Biochem.* 46: 356-70.

Florigene Pty Ltd (non-date) Anthocyanin biosynthetic pathway. Retrieved October 10, 2010, from <http://www.florigene.com/research/research.php>

Han, Y., Vimolmangkang, S., Soria-Guerra, R. E., Rosales-Mendoza, S., Zheng, D., Lygin, AV., Korban, SS. (2010) Ectopic expression of apple *F3'H* genes contributes to anthocyanin accumulation in the *Arabidopsis tt7* mutant grown under N stress. *Plant Physiol.* (Epub ahead of print)

Hirschberg, J., Cohen, M., Harker, M., Lotan, T., Mann V., and Pecker, I.. (1997) Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure & Appl. Chem.* 69: 2151-2158

Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126: 485-493

Zadák, Z., Hyspler, R., Tichá, A., Hronek, M., Fikrová, P., Rathouská, J., Hrcniariková, D., Stetina, R. (2009) Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol Res.* 58: 13-17.