# 國立屏東教育大學化學生物系研究所 Graduate Institute of Chemical Biology National Pingtung University of Education

# 碩士論文初稿

鐵砲百合柱頭/花柱分泌物可促進花粉特殊 分子之鑑定與功能分析

Identification and functional analysis of the components stimulating pollen germination in lily stigma/style exudates

指導教授:黃鐘慶博士 (Dr. Jong-Chin Huang) 趙光裕博士 (Dr. Guang-Yuh Jauh)

研究生:古家齊 (Jia-Chi Ku)

中華民國壹百年壹月

Jau,2011

# 國立屏東教育大學化學生物系 碩 士 學 位 論 文

研究生:古家齊

論文題目: 鐵砲百合柱頭/花柱分泌物可促進花粉特 殊分子之鑑定與功能分析

本論文業經審查及口試合格特此證明

論文老試委員會	+ B: A 12 \$	夏
	the the deside	5
·	委員: 14 2 0	4
	委員: 京 國	多唐
		2.12
指導教授:	音韻慶 夏 雪里	LE A

中華民國 100 年 01 月 25 日

ι

### 謝誌

研究所兩年半的時光,匆匆的過了,很高興在我人生的旅途中完成碩士這個 學位,在研究所的這段時間,選擇從未碰觸過的生物領域,不過我很慶幸這段時 間遇到很多貴人,給我不論是實驗上、生活上的各種建言,讓我在遇到挫折時, 想到一句話:你跌倒時的態度,決定你飛的高度。

感謝黃鐘慶老師不厭其煩的指導,無論將來我能否持續研究這條路,老師對 我的好我一輩子都不會忘記,感謝李佳穎老師在我實驗多有阻滯時給我加油和建 議,讓我可以繼續挑戰未知的實驗,感謝中研院植微所的趙光裕老師時時糾正我 科學研究的方法及做實驗的態度,謝謝 R126 室的大家,在我困頓於實驗時,帶 給我歡樂的時光,感謝中研院植微所溫端南老師在二維電泳的經驗分享與指正, 謝謝中研院植微所陳瑾玟學姐、徐子富學長不斷的給予我實驗上及人生上的經驗 分享,讓我可以學習到更多應有的生活態度,謝謝中研院植微所的吳玉菁教會我 氣相及液相層析儀的基本觀念,謝謝研究所的同學魏潔如、彭正學長及謝紀淳學 姐,在我剛踏入生物這個浩大的領域時,常常回答我的蠢問題及給我實驗上的建 議,謝謝若風,在我來台北這段阮囊羞澀的日子裡,家中借我住宿,讓我在做完 實驗後,還可以有個溫暖的地方可回,謝謝屏東實驗室的學妹柔芳,讓我在台北 只要專心做實驗,不用煩惱屏東實驗室的事項,謝謝學弟們,你們帶給實驗室的 歡樂氣氛,常讓我笑到久久不能自己,謝謝韻竹、雅玲在我剛進入實驗室時的實 驗經驗分享,讓我受益良多。

謝謝在我求學期間,遇到挫折,但一回到家就可以得到暖暖擁抱的家人, 僅以這篇不成氣候的論文,獻給我最愛的父親古榮勝先生、母親葉菊芳女士、哥 哥古又華,謝謝你們的支持,讓女兒及妹妹可以勇敢逐夢,願以此份榮耀與你們 分享。

## 中文摘要

花粉發育與花粉管的生長過程向來是細胞研究之良好課題 (如花粉發育各 階段之不同調控、花粉管極性生長之過程與引導、雙重授精或孢子體與配子體細 胞之交互作用等),多年來的相關研究亦載明此一繁延後代之旅程受到許多基因 的調控。當百合花粉降落於柱頭並開始啟動花粉管萌發與生長之程式時,百合花 粉必定會接觸柱頭/花柱分泌物,若於體外培養之百合花粉/花粉管加入柱頭/花柱 分泌物後,可促進花粉之萌發速率與花粉管之生長;以加熱 (100℃) 處理後的 柱頭/花柱分泌物效果依舊具有相同效用,因此引發吾人推測柱頭/花柱分泌物內 可能具有耐熱性分子可顯著地促進花粉萌發與花粉管生長,故本研究計畫將分析 探討柱頭/花柱分泌物中活性物質之成份,及此類成分所扮演促進花粉之萌發與 花粉管生長之角色。本研究發現乙酸乙酯層對花粉管初期萌發速率有相當程度的 影響,所以想要進一步了解乙酸乙酯層內的何種化合物影響花粉管萌發速率,並 探討其機制。一方面利用各種儀器分析(NMR、GC-MS、LC-MS、ESI Q-TOF MS) 之方法分析乙酸乙酯內可能促進花粉管萌發速率之成分,另一方面以蛋白質體學 之方式觀察乙酸乙酯層、正丁醇層及水層作用於花粉萌發時花粉內的蛋白質表現 及變化,並把具差異性之蛋白質進行質譜儀分析,以進行身分鑑定、比對及探討 其對於花粉管生長之影響。

關鍵字:柱頭分泌物,花粉管萌發,乙酸乙酯,二維電泳, 減壓濃縮

# Abstract

Pollen germination and tube growth are critical processes for successful double fertilization in higher plant. After landing on the stigmatic surface, dehydrated pollen grains will receive female signals to trigger pollen hydration, activation and pollen tube emergence. Many factors present in the stigma/style exudates have been suggested to be involved this sophisticated program, but very limited information was known about their composition and the identities of the active molecules involved in pollen-stigma interaction. In this thesis, first we examined the effect of lily stigma/style exudates on lily pollen germination and tube growth; followed by isolation and characterization of the composition of exudates. Our results clearly showed that stigma/style exudates significantly promoted pollen germination rate and the active molecules for germination enhancement were heat- and proteinase K-resistance. The later results suggested that the pollen germination promoting molecule is probably not protein. Then, we extracted the stigma/style exudates by a series of different solvents (ethyl acetate, *n*-Butanol and water) partition to separate the potential active molecules. Interestingly, molecules present in the layer of ethyl acetate even showed more significantly enhanced effect on pollen germination rate than those in the lily stigma/style exudates did. NMR · GC-MS · LC-MS and ESI Q-TOF MS were used to analyze the layer of ethyl acetate. In addition, two-dimensional PAGE were used to reveal the total protein profiles of germinating pollen affected by the active molecules in the layer of ethyl acetate and the identities of several protein spots were determined by LC-MS/MS.

Key word: pollen tube germination, two-dimensional PAGE, GC-MS

目	錄

壹	、中	7文摘要	I
貳	、英	英文摘要	II
參	、研	开究背景	1
肆	、材	↑料與方法	6
伍	、結	5果	15
陸	、討	十論	19
柒	、圖之	表	24
捌	、表材	格	59
玖	、參求	考文獻	65
拾	、附針	錄	73

### 研究背景

#### 開花植物的花粉發育及花粉管生長過程

開花植物的發育可分成三個階段:第一是種子萌發的胚胎時期 (embryonic phase),第二以陽光當能量來源的營養生長時期 (vegetative phase),最後是為繁 延後代而進行的生殖時期 (reproductive phase) (Spencer 2010)。花芽分生組織 (floral meristem) 在營養生長時期植株會受日照時間的長短、生長環境賀爾蒙、 供給的水分、溫度以及自體的基因所調控,自頂端分生組織誘導花序及其上花器 的發生與發育。不同植物之花器外觀皆有所異,其完整花器需具備:(1) 雄蕊 (stamens) 由花藥 (anthers) 和花絲 (filament) 所構成,花藥內含有許多花粉粒 (pollen grains); (2) 雌蕊 (pistil) 由柱頭/花柱 (stigma/style) 及子房 (ovary) 所組 成,子房中含有胚囊 (ovules),和(3)由花瓣、花萼、花托所共同組成一個完整的 花被 (tepal) (Borg et al., 2009)。

開花植物之生殖過程中,花粉扮演相當重要的角色,花粉發育過程初始,早 期的孢原組織在花藥中轉變成花粉母細胞 (pollen mother cells),花粉母細胞經減 數分裂後形成四分子體 (tetrad)。小孢子發育期間,花藥藥壁層會發生劇烈變化, 尤其是絨氈層 (tapetum) (Tang et al., 2010)。絨氈層會分泌胼胝質分解酶 (callase),以分解四分子體外層的胼胝質 (callose),並釋放出成熟小孢子於花藥 囊腔中,小孢子開始進行不對稱的有絲分裂 (mitotic division),較小的生殖細胞 (generative cell) 會被包裹在大的營養細胞 (vegetative cell) 內 (McCormick et al., 2004),此時的營養細胞中逐漸累積相當多物質以供給花粉管快速生長。花粉依 產生第二次有絲分裂之時程,可分為雙細胞及三細胞型。雙細胞型以百合為例, 花粉管經由花柱往胚囊生長時才進行第二次的有絲分裂形成兩個精細胞 (sperm cells) (Borg et al., 2009)。擬南芥則是典型的三細胞型,其花粉管萌發前在生殖 細胞會再進行一次有絲分裂,並產生兩個精細胞(McCormick et al., 1993)。花粉 繼續發育至成熟後期階段,最後進行自發性脫水後成熟。成熟的花粉自花藥囊腔 中被釋放出來,此時花粉的含水量只剩下約15~35%,並進入休眠狀態,等待於 合適環境中萌發(如:和雌蕊柱頭接觸) (Pacini 2000)。

開花植物的繁衍需藉由風、昆蟲等媒介傳送花粉,並附著於柱頭,以啟動授 粉過程。雌蕊柱頭可分為乾、濕雨型,乾柱頭以阿拉伯芥為例,其薄膜上富含蛋 白質及角質層 (Hiscock et al., 2008)。而百合為濕柱頭,濕柱頭與乾燥的花粉會 進行水合作用 (hydraction) ,促使花粉由非極化細胞轉變為極化細胞 (Edlund et al., 2004)。花粉管會自花粉內壁 (intine) 萌發孔穿出開始萌發 (germinate),此時 花粉管會開始分泌酵素以突破柱頭表皮細胞,這些酵素以知包含酸性的磷酸酶 (acid phosphatase)、核酸酶 (ribonuclease)、脂化酶 (esterase)、澱粉酶 (amylase) 及蛋白酶 (protease) (Knox et al., 1970)。花粉管沿著花柱朝著胚囊 (embryo sac) 生長,經由輔細胞 (synergid cell) 引導至珠孔 (micropyle) 進入胚囊內,精細胞 與卵細胞結合產生雙套體 (diploid) 的接合子 (zygote),另一精細胞與中央細胞 的兩個極核 (polar nuclei),發育成三套體 (triploid) 的胚乳 (endosperm),完成雙 重授精 (chen et al., 2009)。

在顯微鏡下觀察花粉管的生長,花粉管尖端 (apical) 囊泡聚集的形狀是類似倒圓 錐形,囊泡經由肌動蛋白絲 (actin) 傳送至尖端使細胞壁擴張;花粉管的次根尖 (subapical) 區域為胞器主要分布區域,包含了粒線體 (microchondria)、高爾基 體 (dictyosome,/等);核區 (nuclear zone) 具有兩個精細胞及營養核 (vegetative nucleus),其次為大液泡 (vacuolization) 區域及胼胝質栓塞 (callose plug) 區 (如 附錄19.) (Bedinger et al., 1994)。花粉管生長的調控相當複雜,其中包括肌動蛋 白絲的調控、鈣離子的平衡及醣蛋白的修飾等,皆對花粉管之生長發育具有一定 的影響力 (Kost et al., 1998, Lewis et al., 2007, Hepler et al., 2001, Zonia 2010, Reddy 2001, Jauh et al., 1996, Du et al., 1996)。

2

#### 與萌發有關的花粉物質成分

#### 花粉壁 (pollen coat)

花粉與柱頭接觸時可能需要經由訊息傳導而後萌發。以花粉而言,花粉壁為 此類接觸之第一線成分。花粉壁組成成分相當複雜,整個花粉壁之累積與花粉發 育之過程密切相關。在花粉發育之相對晚期,花藥壁之絨氈層崩解,崩解之物質 沉積在花粉表面形成含油層 (tryphine layer),含油層內之物質具高度歧異性,包 含蠟質 (Wax)、脂質油滴 (lipid droplets)、芳香族 (aromatic) 小分子以及蛋白 質 (Taylor et al., 1997)。

#### 臘質 (Wax)

植物的外表皮具有角質層,主要組成物質為蠟質(wax)及角質素 (cutin),可以 作為疏水屏障。角質層是經由外表皮細胞 (epidermal cells) 分泌及合成,可維持 植物基本生理功能,同時預防非經由氣孔之水分喪失,防止真菌孢子感染及紫外 線照射之傷害 (Lu et al., 2009)。文獻指出蠟質與開花植物雄配子體之生殖力有 關,若花藥外壁受到損傷,會造成表面含油層變異和雄性生殖力下降 (Preuss et al., 1993)。以阿拉伯芥的cer (eceriferum) 突變為例,由顯微鏡及生化分析中發現 cer6-2花粉含油層之沉積異常且無法水合 (Preuss et al., 1993), 但在體外試驗利用 高溼度的環境可扭轉雄不捻。將cer6-2花粉中的含油層進行分析,突變花粉中的 蠟質,其成分主要為C16及C18之長鏈脂肪酸,但缺乏在正常花粉所具有的C29 和C30,由此推測長鏈烷類可能為一種具生物活性之物質 (Preuss et al., 1993)。 並非所有雄性受孕力下降的cer突變都是因缺少含油層所造成的,從cer3花粉中可 觀察到外表正常但卻具有明顯的雄不捻的性狀 (Hulskamp et al., 1995), cer花粉 無法將水由柱頭上傳送到花粉中,顯示脂質在細胞間相互辨識的作用扮演一定程 度的角色。花粉壁的某些物質可能具有限度的移動力,而這些物質的移動,可能 可以解釋 mentor pollen rescue (Hulskamp et al., 1995, Preuss et al., 1993)。有些 cer突變會對溫度很敏感,溫度會影響脂質的黏度,且溫度的改變會影響溶解或

懸浮在含油層的物質之移動或存取 (accessibility) (Hulskamp et al., 1995),由此可 推測含油層成分細微的改變亦有可能造成花粉生育力之巨大改變。脂質所傳導的 水合作用是乾柱頭專屬的反應或者此反應亦存在於濕柱頭,仍具探討的空間 (Preuss et al., 1993, Kunst et al., 2003)。

#### 油體蛋白質 (Oleosins)

種子油體 (oil body) 包裹著一層結構性蛋白質,稱為油體蛋白質 (Oleosins) (Jiang et al., 2007)。花粉內也有類油體 (Oleosin-like) 蛋白質在含油層中被發現。 它中間有個約 70 個胺基酸所組成的高保留性疏水區,可與含油層結合,此蛋白 質N端及C端疏水區與其在含油層時的結構穩定有關 (Ross et al., 1996)。若我們 對絨氈層專一性的類油體蛋白cDNAs的疏水區做的測試,發現其N端疏水區與種 子油體蛋白質分析結果相同 (Murphy et al., 1998, Murphy 2001)。利用非極性環已 烷所分離的芥科 (Brassica) 花粉之類油體蛋白質,發現並無疏水區 (Ross et al., 1996)。

#### 黄酮類 (Flavonoids)

除了前述之脂質及蛋白質外,花粉亦被偵測包含一些芳香族小分子如黃酮類 (flavonols)、類胡蘿蔔素 (carotene)、茉莉酸 (jasmonates)、酚酸 (phenolic acid) 及油菜類固醇 (brassinosteroids) 等 (Scott et al., 2004, Ylstra et al., 1994, Mo et al., 1992)。在這些物質當中,只有黃酮醇被證實與花粉萌發有關。研究指出,黃酮 醇會促進花粉管的生長,反之,缺乏黃酮醇會導致花粉不萌發或無法產生具功能 性的花粉管;此生殖缺陷可在授粉時藉由外加黃酮醇或柱頭分泌物得以補足 (Taylor et al., 1992, Vogt et al., 1994, Ylstra et al., 1994)。在柱頭分泌物中已被確認 具有生物活性的成分山奈酚 (kaempferol) 為一種黃酮醇苷 (flavonol aglycones) (Mo et al 1992, Vogt et al., 1994)。黃酮醇在萌發時不會被分解代謝,而會快速與 特定醣類接合 (conjugate) 形成花粉獨特的黃酮醇 (Vogt et al., 1995, Xu et al., 1996, Zerback et al., 1989)。花粉萌發時期對黃酮醇具敏感、專一且快速的反應, 顯示黃酮醇在此過程可能為一訊息傳導分子 (Long et al., 1989)。

#### 研究目的

如同前文探討,花粉之成分對於花粉管之萌發生長具重要性,但由於花粉/ 花粉管在雌蕊萌發生長時具快速且極性生長之特性(相對於體外培養基生長), 其基因之調控必具相當之嚴謹性,且與雌蕊細胞之互動亦相當緊密,此乃體外培 養之花粉/花粉管無從反映的一環。吾人亦於先前之研究中發現當百合花粉管於 *in vivo* 之環境下生長時,會引發與萌發液培養之花粉管許多相當不同之基因表 現,當中包含一些經授粉誘導表現的基因。當百合花粉降落於柱頭並開始啟動花 粉管萌發與生長之程式時,百合花粉必定會接觸柱頭/花柱分泌物,若於體外培 養之百合花粉/花粉管加入柱頭/花柱分泌物後,可促進花粉之萌發速率與花粉管 之生長;以加熱(100°C)處理後的柱頭/花柱分泌物效果依舊具有相同效用,因 此引發吾人推測柱頭/花柱分泌物內可能具有耐熱性分子可顯著地促進花粉萌發 與花粉管生長,故本研究計畫將進行柱頭/花柱分泌物中活性物質之成分分析, 及探討其促進花粉萌發與花粉管生長之可能機制。

5

## 材料與方法

實驗使用鐵砲百合 (Lilium longiflorum Thunb. cv Snow Queen and cv Avita), 百合材料優勢在於花器大,且為濕柱頭,可較易取得柱頭/花柱分泌物,但由於 每一雌蕊之分泌量亦不多,故必需種植大量之百合以收集柱頭/花柱分泌物。待 收集足夠量之柱頭/花柱分泌物後,即可進行成分分離萃取之後續動作。將柱頭/ 花柱分泌物依序分別以乙酸乙酯溶劑 (ethyl acetate, EA)、正丁醇溶劑 (*n*-Butanol, *n*-BuOH) 及ddH<sub>2</sub>O萃取,分子將依溶劑極性不同而被分離,最後將萃取溶液進 行減壓濃縮,萃取層將依原本濃縮比例回溶至DMSO或ddH<sub>2</sub>O中,以測試個別濃 縮層內含之分子對花粉萌發速率的影響。

#### 一、 萃取及減壓濃縮

將73 ml的柱頭/花柱分泌物加入 127 ml的ddH2O混和後,再加入 200 ml的乙酸乙酯摇晃均匀後,靜置分層萃取,重複此步驟兩次後,乙酸乙酯層和水層分別進行減壓濃縮,乙酸乙酯層產量為 0.4399 g,水層產量為 9.0912 g,接續再把水層產物利用正丁醇溶劑再做一次萃取:取水層產物 6.819 g加入 64 ml的ddH2O混和後,並加入 70 ml的正丁醇,搖晃均勻後,靜置分層萃取,重複此步驟兩次, 正丁醇層及水層各別進行減壓濃縮,正丁醇層產量 0.7144 g,水層產量 3.4055 g,並以原本濃縮比例之DMSO或水回溶樣本,減壓濃縮流程圖如圖 1。

#### 二、 活性成分測試

為得知在三萃取層中哪一部份對花粉萌發速率產生影響,故將萃取層依原本 濃縮比例回溶至DMSO中後加入萌發溶液中(附1)(Vidali et al., 2001),以測試個 別分層內含之分子對花粉萌發速率的影響。花粉取自鐵炮百合(*Lilium longiflorum*),將冷藏的百合花粉置於潮濕的保鮮盒內回溫15分鐘後,取三顆花 藥加入萌發液內(12.7mM CaCl<sub>2</sub>、1.62mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、9.9mM KNO<sub>3</sub>、10% sucrose, pH5.2) (Koti et al., 2005), 再分別加入總體積十分之一的柱頭分泌物和依原 本濃縮比例回溶後總體積百分之一的乙酸乙酯層、水層、正丁醇層, 在恆溫震盪 培養器中以 30℃、50rpm 萌發一個小時, 再以顯微鏡物鏡 4X 下觀察花粉管萌發 數與花粉總數 (圖 2)。

#### 三、 成份鑑定

由以上活性成分測試後發現乙酸乙酯層最具促進花粉管萌發之效果,為進一 步分析乙酸乙酯層對於促進花粉萌發速率最為顯著之原因,所以利用薄層層析法 (Thin Layer Chromatography, TLC),薄層層析法原理為溶劑流經固定相時藉由毛 細作用使乙酸乙酯層成分達到分離的效果,移動相溶劑以正已烷和乙酸乙酯 19:1 的比例,放置展開槽中跑片1小時,跑片完成後將TLC 片取出,利用濃硫酸顯 影,並在254 nm 波長的紫外線照射下,刮下產物,並使用比原移動相溶劑更高 極性的溶劑(氯仿)溶解吸附於矽膠粉上的化合物,進行減壓濃縮後將樣品以核磁 共振光譜 (Nuclear magnetic resonance, NMR)分析乙酸乙酯層之內含分子 (圖3, 附2)。

#### 四、 二維電泳

1. 抽取花粉蛋白質

以phenol extraction (Wang *et al.* 1992a) 方法萃取花粉管蛋白, 將冷藏的鐵砲 百合花花粉 (snow queen) 取出後, 放置保鮮盒中回溫 15 分鐘, 取 0.5g 花粉與 不同萌發條件的萌發液混合均勻後,以 50 rpm 萌發 1 小時,將萌發後之花粉, 置於研鉢中研磨花粉並漸次加入花粉體積 5 倍的 extraction buffer (0.7M Sucrose、0.5M Tris-base、30mM HCl、50mM EDTA、100mM KCl、2% beta-mercaptoethanol) 及 phenol (pH8.0),研磨至粉狀。

待其回溶至液態時加入磁石攪拌 30 分鐘,攪拌完後將混和液分裝至 30 ml 離心管中,於25℃, 15000 rpm 離心 15 分鐘,取上層 phenol 層至新的離心管, 下層液加入原抽出之 phenol 層體積再萃取一次,重複此步驟兩次,最後再加入 等 phenol 層體積的 extraction buffer 於 25℃, 15000 rpm 離心 15 分鐘, 加入 5 倍體積(前兩次吸出之 phenol 層)的 0.1M Ammonium Acetate / methanol, -20℃下 靜置蛋白質沉澱 2 小時以上。

以 15000 rpm 在 4℃下離心 15 分鐘,把上清液倒掉後利用 10 ml 0.1M Ammonium Acetate / methanol 沖洗沉澱物,將懸浮之蛋白質以 15000 rpm,4℃離 心 15 分鐘,重複清洗的步驟雨次後,再以 10 ml acetone 清洗沉澱物一次,15000 rpm 在 4℃下離心 15 分鐘,把上清液倒掉後,最後以冷凍乾燥機將蛋白質沉澱 物抽乾,並加入適量的 rehydration buffer 回溶蛋白質,使用 Elisa reader 檢測蛋白 質濃度,並以 12% 的 SDS-page 跑膠,觀察蛋白質之品質。

2. 蛋白質定量

使用Thermo Pierce 660nm Protein Assay Reagent,並參照說明書提供的步驟,將標準濃度序列稀釋BSA 20 µg/µl、10 µg/µl、5 µg/µl、2.5 µg/µl、1.25 µg/µl, 0.625 µg/µl及 0 µg/µl,取樣品 1 µl加 9 µl ddH<sub>2</sub>O,再加入 140 µl的蛋白質定量試 劑,靜置五分鐘後,使用BioTek PowerWave<sub>TM</sub> Series Elisa reader,測定蛋白質在 660nm的吸光值,並利用Excel計算蛋白質濃度。

3. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel) 聚丙烯醯胺凝膠電泳

※製備 separating gel 12% (3.09 ml):

40% Bis/Acrylamide	1.7 ml
1.5 M Tris pH8.8	1.3ml
10% SDS	40µl
10% APS	35.8 µl
TEMED	11.4 μl
ddH <sub>2</sub> O	2.5 ml
	3.09 ml

將上述配方混合均勻後注入玻璃夾層內,不可有氣泡,預留 2.5 cm製備上膠,以

ddH2O覆蓋膠面,凝膠 40 分鐘。APS (ammonium persulfate) 及TEMED

(N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) •

※製備 stacking gel 4% (1.06 ml):		
40% Bis/Acrylamide	320 µl	
0.5 M Tris pH6.8	660 µl	
10% SDS	40µl	
10% APS	31.6 µl	
TEMED	8.2 μl	
ddH <sub>2</sub> O	1.8 ml	
	1.06 ml	

將上述配方混合均勻後注入玻璃夾層內,插入 comb,凝膠 25 分鐘, Comb well 需做記號,待膠凝固,將跑膠器具組裝好,加入 running buffer,將 comb 拔除後, 準備跑膠。

※製備 6X SDS sample buffer (1ml):

glycerol	0.3 ml
1M Tris pH6.8	0.15 ml
0.5M EDTA	12 µl
SDS	0.06 g
ddH <sub>2</sub> O	0.52 ml
β-mercaptoethanol	10 µl
	1ml

※處理樣品

將樣品、6X SDS sample buffer、ddH2O混合均勻後,於95℃加熱5分鐘,使蛋

白質變性後便可使用。

※製備 SDS running buffer (1X) 1L

Tris base25mMGlycerin192mM10% SDS0.1%補ddH2O至總體積

※製備 SDS staining solution:

Methanol50 % (V/V)Coomassie Brilliant Blue G2500.2 % (W/V)Acetic acid12 % (V/V)補dH2O至總體積12 % (V/V)

※製備 SDS destaining solution:

Methanol	40 % (V/V)
Acetic acid	7 % (V/V)
補ddH2O至總體積	

4. 等電聚焦一維電泳

a.等電聚焦覆水

一維電泳使用Bio-rad的Protean IEF Cell系統,將蛋白質與rehydration buffer (8M urea、0.5% CHAPS、0.2% mM DTT (DL-Dithiothreitol)、0.5% 4-7 Ampholyte、0.002% Bromophenol Blue),混和後總體積為 340µl,聚焦盤 (Focusing Trays) 依正負極方向放入一維等電聚焦系統,取2片濾紙 (Wicks) 以 ddH<sub>2</sub>O潤濕後,分別置於等電聚焦系統的兩端白金電極上,濾紙的用途是在去除 蛋白質上的鹽類和雜質,混和好的樣品注入聚焦盤兩邊電極以內的位置,須注意 不可有氣泡產生,將pH4-7 18cm膠條 (IPG strip) 撕去保護膜,膠條面朝下,依 正負極方向放入,最後在膠條上平均加入2 ml的礦物油 (mineral oil),此舉避免 樣品在進行等電聚焦時乾掉,進行被動式覆水 16 小時。

開啟 Bio-rad, Protean IEF Cell 系統,設定蛋白質等電聚焦條件,條件為 150V 3hr rapid, 300V 1min linear, 300V 3hr rapid, 1500V 2hr linear, 1500V 3hr rapid, 4000V 2hr linear, 4000V 3hr rapid, 8000V 2hr linear, 8000V 3hr rapid,總伏特小 時為 61176Vhr。

b. 鑄 10%~16% 梯度電泳膠

分別製作 1.5mm厚度的電泳膠 10% (1.5M Tris pH8.8, 40% Acrylamide, ddH<sub>2</sub>O, 89% Glycerol, 10% APS, TEMED)及 16% (1.5M Tris pH8.8, 40%

Acrylamide, ddH<sub>2</sub>0, 86% Glycerol, 10%APS, TEMED), 將溶液分別倒入Bio-rad Model 495 gradient former 後,將膠注入Bio-rad protean<sup>TM</sup> II multgel casting chamber, 待膠凝結 12-16 小時。

#### c.平衡膠條

將等電聚焦後的膠條取出,利用ddH<sub>2</sub>O潤洗膠條,去除殘留於膠條之多餘礦 物油,將膠條面朝上加入 10ml的平衡buffer (50mM Tris-HCl pH8.8, 6M urea, 30% glycerol, 100mg DTT),搖晃 15 分鐘,取出膠條後,用ddH<sub>2</sub>O潤洗膠條,放入另 一平衡buffer (50mM Tris-HCl pH8.8, 6M urea, 30% glycerol, 250mg IAA),搖晃 15 分鐘,取出膠條,進行二維跑膠步驟。

#### d.聚丙烯醯胺膠體二維電泳

將處理完平衡步驟的膠條放入玻璃夾層中,過程中避免氣泡產生,加入 0.5% 低熔點瓊脂膠及微量的 bromophenol blue (利於電泳時之觀察),進行架膠,電泳 槽接上低溫循環水槽,溫度設定在 15℃,膠片電流設定為 15mA,十分鐘後,改 以 35mA 進行電泳至膠片底部後停止。

#### e.掃描電泳膠片

使用 Amersham imageMaster Scanner III, 掃描設定為穿透式,解析度為 600dpi。

#### 5. 銀染 (Silver staining)

由於銀染靈敏度高於Coomassie Brilliant Blue十到數百倍左右。使用銀染試 劑呈現二維電泳膠片,靈敏度可達pg範圍。將膠片由玻璃夾層中移至保鮮盒,加 入Fixing solution (50% Ethanol, 10% glacial acetic acid, 0.05% formaldehyde) 浸 搖 16 小時,隔天以 35% Ethanol清洗三次,每次 20 分鐘,加入Sensitive solution (0.02% Sodium Dithionite)作用 2 分鐘,以ddH<sub>2</sub>O清洗移除殘留的Sensitive solution三次,每次5分鐘,加入Silver stain solution (0.2% Silver nitrate, 0.076% Formaldehyde)作用 20 分鐘,以ddH<sub>2</sub>O清洗移除殘留的Silver stain solution雨次,每次1分鐘,加入Developing solution (6% Sodium carbonate, 0.0004% Sodium Dithionite, 0.05% Formaldehyde),直到蛋白質點完全顯現,再加入Stop solution (50% methanol, 10% glacial acetic acid),最後以ddH<sub>2</sub>O 清洗三次,每次5分鐘 (Mortz et al., 2001)。

### 6. SYPRO<sup>®</sup> Ruby呈色法

Fix solution (50% methanol, 7% glacial acetic acid) 浸搖 16 小時,加入 SYPRO Ruby 染劑 350ml,最後利用 wash solution (10% methanol, 7% glacial acetic acid) 清洗電泳膠片兩次,每次 30 分鐘。

SYPRO Ruby 使用(Amersham Pharmacia Typhoon9200 Variable mode imager) 掃描,設定條件為 Emission filter: 610 BP 30 SYPRO Ruby; PMT: 600; Laser: Green 532; Sensitivity: middle; Pixel size: 200 microns,以 TIFF 檔儲存 (Ian et al., 2004)。

#### 7. Coomassie brilliant blue G-250 呈色法

Fix solution (50% methanol, 8% phosphoric acid) 浸搖一小時,加入 stain solution (0.12% Coomassie brilliant blue G-250, 10% phosphoric acid, 10% ammonium sulfate) 搖晃 12~16 小時, destain solution (1% acetic acid),退至背景 顏色一致 (Candiano et al., 2004)。

8.氣相層析質譜儀 (Gas Chromatography/Mass Spectrometer, GC-MS)

利用氣相層析質譜儀分析乙酸乙酯層成分,氣相層析質譜儀型號為 Agilent 7890A/5975C,GC 管柱型式為 DB-5ms,內徑=0.25mm,長度=30m,厚度 =0.25µm,樣品注入體積為 1µl,樣品進樣前後,注射針頭以甲醇溶液清洗 3 次, 再以樣品溶液清洗三次。其升溫程式設定為:初始溫度為 50°C,維持定溫 3 分鐘,第一段升溫速率 4°C/min,升至 65°C。第二段升溫速率 6°C/min,升至 270°C, 第三段升溫速率 2°C/min,升至 300°C,由 270°C升至 300°C為主要分析時間,終 溫 310°C,分析時間為 60.91 分鐘,GC-MS 所使用之載流氣體為氦氣 (Helium, He),流速 1ml/min,分餾比為 10:1,樣本注射口之溫度設定為 280°C,離子源 (ion source) 之溫度設定為 250°C,四極柱溫度為 150°C。使用 NIST 08 Database 分析 數據。

9.液相層析質譜儀 (Liquid Chromatography/Mass Spectrometer, LC-MS)

此實驗所使用的液相層析質譜儀為Waters: SYNAPT™ High Definition Mass Spectrometry™ (Synapt HDMS™) System (Waters Corp., Manchester, U.K.), 偵檢 器為電噴灑游離式 (electrospray ionization, ESI), 離子泳動分析儀 (ion-mobility spectrometry) 以及 飛行式質譜分析系統 (time-of-flight, Tof), LC管柱型式為 C18 reverse phase column, 監測模式為正電荷 (Positive) 模式及負電荷 (Negative) 模式,分析所用的溶劑移動相為兩種,A液為 (100% H<sub>2</sub>O/0.1% FA),B液為 (100 % ACN/0.1% FA),設定濃度梯度進行乙酸乙酯層成分分析,流速為 0.5ml/min, 樣品注入體積 1µl,管柱溫度 40℃。升溫程式設定為:0-0.5 分鐘A液 99%, 0.5-4 分鐘A液由線性梯度 1%-99%,維持 0.5 分鐘, 4.5-6 分鐘A液由 99%-1%, 最 後平衡回原狀態,確定正離子與負離子的Retention time,破碎片段以 4.5 分鐘內 為主。

10. 四極柱暨飛行時間串聯式液相質譜儀

(Electrospray ionization Quadrupole time-of-flight mass spectrometry, ESI Q-TOF MS)

條件同液相層析質譜儀,依各成份給予不同能量 (collision energy) 以擊碎母 離子形成子離子片段。

13

11.串聯式液相質譜儀蛋白質鑑定 (Liquid Chromatography/Mass Spectrometer, LC tandem MS)

用 Tip 把蛋白質點挖下,置放於 1.5ml eppendorff 中,委託中研院植微所蛋白質體實驗室做 LC-MS/MS 鑑定。

12.核磁共振光譜 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

將減壓濃所後的乙酸乙酯樣品取 5µl,委託成功大學貴重儀器中心做鑑定。

### 結果

#### 一、 不同時期的花粉萌發活性測試

為得知在三層所含成分中哪一部份對花粉萌發速率產生影響,故依原本濃縮 比例回溶至 DMSO 中,以測試個別分層內含分子對花粉萌發速率的影響。如圖 2 所示,相對於對照組而言,柱頭/花柱分泌物可顯著促進花粉管萌發。當加入不 同萃取層於萌發溶液時,乙酸乙酯層層對於促進花粉萌發速率較為顯著。其效果 甚至大於萌發液中加入柱頭/花柱分泌物者,而正丁醇層及水層對於促進花粉萌 發速率也有效果,但不及乙酸乙酯層,其上結果顯示乙酸乙酯層內的某些物質可 促進花粉萌發。本研究接續利用不同儀器分析其內組成為何。

(I) 核磁共振光譜分析結果

為探究乙酸乙酯層內促進花粉萌發的物質為何,接下來利用薄層層析法依極 性分離乙酸乙酯層所得的四個混合物,並將四個混合物,減壓濃縮後,以核磁共 振氫光譜分析,其圖譜分析利用各分子不同位置及環境而有不同的訊號位置,得 知其化學位移,NMR的波峰分佈片段和高度比可知特定原子的數量和原子鍵結 的環境,但因樣品不夠純,因此無法非常的明確知道四個混合物內的成分結構, 大致上,成分一可能為長鏈脂肪(圖 3-1);成分二為苯環類的溶劑安定劑(圖 3-2);成分三為不飽和脂肪酸(圖 3-3)及成分四為萜類化合物(圖 3-4)。並將 這四個成分進行花粉萌發測試,各成分對於促進花粉萌發速率沒有明顯的效果 (皆低於萌發液中加入柱頭分泌物)(附 2)。

(II) 氣相層析質譜儀分析結果

於 NMR 分析乙酸乙酯層結構,因樣品純度不如預期,使得結構分析不夠明確,所以進一步利用氣相層析質譜儀 (GC-MS) 分析該樣品,並將所得結果搜尋

15

比對 NIST 08 資料庫,預測出乙酸乙酯內含有二十種以上之不同化學分子,其中 由 GC-MS 得到的長鏈脂肪與 NMR 結果雷同,GC-MS 分析圖譜 (圖 4)。 (III) 液相層析質譜儀分析結果

為更了解乙酸乙酯層內成份,故將乙酸乙酯層內物質進行 LC-MS 成分分析,由 LC-MS 分析結果(圖 5.1),參考文獻並利用元素組成分析得知某些片段成分的荷質比 (m/z) 及滯留時間 (Retention time),預測出(a)四個正離子片段,化合物分別為 Furanone,2-Pyrrolidinone,Cytosine,Nicotinic acid (圖 5.2-5.5,表 2-1)。 預測出(b)三個負離子片段,化合物分別為 3-methylideneoxolane-2,5-dione, Purine, uracil (圖 5.6-5.8,表 2-2)。

(IV) 四極柱暨飛行時間串聯式液相質譜儀分析結果

由第一次LC-MS得知七個離子片段之荷質比及滯留時間,進行ESI Q-TOF MS分析,但因為某些離子片段訊號太弱導致儀器無法偵測。ESI Q-TOF MS分析 結果,於正離子檢測,參考文獻比對並利用元素組成分析,在滯留時間 1.068 分鐘,荷質比 86.0584 (圖 5.9),預測出化合物 2-Pyrrolidinone (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO);負離 子檢測,參考文獻比對並利用元素組成分析,在滯留時間 1.144 分鐘,荷質比 111.0073 (圖 5.10),預測出化合物 3-methylideneoxolane-2,5-dione (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) (Brewbaker et al., 1963)。

#### 二、二維電泳圖譜之建立與分析

(I)各種二維電泳染色法及花粉萌發時間點之比較:

由成分活性測試得知三層萃取成分於花粉萌發時間點 60 分鐘時對花粉管萌發速率產生影響,故先以花粉萌發 30 分鐘的時間點,抽取花粉管蛋白質 (pollen tube protein),樣品分別為:花粉 (GM + pollen)、花粉加入花柱/柱頭分泌物 (pollen + SE)、花粉加入乙酸乙酯層 (pollen + EA layer)、花粉加入正丁醇層 (pollen + n-buOH layer) 及花粉加入水層 (pollen tube + H<sub>2</sub>O layer ),共五個樣

品。以pH 4-7 IPG strip 與 10-16% SDS PAGE 之二維電泳,三種染色方法: 銀染、SYPRO Ruby 呈色法、Coomassie blue G-250 (CBG250) 呈色法,比較染色方法之穩定性及與操作者技術的熟練度。

由銀染所呈現之蛋白質點易造成定量上的差異,故不考慮(附錄 3)。而 SYPRO Ruby 染劑放置太久導致其餘的樣品染色效果不佳,故只呈顯花粉(GM + pollen) 及花粉加入花柱/柱頭分泌物 (pollen + SE) 於花粉萌發 30 分鐘的時間 點,抽取花粉管蛋白質 (pollen tube protein)(附錄 5)。五個樣品於花粉萌發 30 分 鐘的時間,抽取花粉管蛋白質 (pollen tube protein),利用 Coomassie blue G-250 呈色之二維電泳圖片,以 PDQuest 軟體分析得知五個樣品定量上的差異而定性 上的差異則無 (附錄 4)。

(II)不同時間點之花粉萌發二維電泳圖

由花粉萌發活性測試得知萌發 60 分鐘之活性最好,故將原先 30 分鐘時間點 放寬為 15 分鐘及 60 分鐘,並將五個樣品數,縮減為三個樣品數,分別為花粉 (pollen)、花粉加入花柱/柱頭分泌物 (pollen + SE) 及花粉加入乙酸乙酯層 (pollen + EA layer),先以 SDS-page 觀察,三個時間點及其蛋白質品質,以 Coomassie blue G-250 染色法呈現 (圖 6)。花粉萌發時間點(15 分鐘及 60 分鐘)的 三個樣品(花粉、花粉加入花柱/柱頭分泌物及花粉加入乙酸乙酯層),共六張二 維電泳分析圖以 Coomassie blue G-250 呈現 (圖 7)。並使用 PDQuest 軟體分析, 以花粉加柱頭分泌物萌發 60 分鐘所抽取之花粉管蛋白質當控制組,偵測分析及 手動修飾後得知,與控制組相似度最高的圖譜為花粉加乙酸乙酯萌發 60 分鐘所 抽取之花粉管蛋白質,相似度高達 70%,呈現一致的蛋白質點高達 365 點,六張 二維電泳分析圖譜,相同的蛋白質點共有 119 點 (表 3),找出 13 個差異性蛋白 質點 (圖 8),花粉萌發 15 分鐘與花粉萌發 60 分鐘之二維電泳差異蛋白質點大多 分布在鹼性端,相較於控制組,某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以 花粉加入乙酸乙酯層萌發 60 分鐘所抽取之花粉管蛋白質,蛋白質點表現量更有 明顯增加(圖 9-圖 21)。為了鑑定這些表現具差異性的蛋白質點身分,我們將二維

17

電泳膠片中,有差異的蛋白質點取出,送至中研院植微所蛋白質核心實驗室進行 串聯式液相質譜儀蛋白質鑑定(LC tandem MS)分析,分析結果經與水稻資料庫 (BioWorks v3.3.1)比對後鑑定出蛋白質的資料如表4、表 5-1,5-1及附錄6-18所 示。

質譜鑑定蛋白質身份如下:

- spot 1 : 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase.
- spot 2 : pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit.
- spot 4 : Pyruvate, phosphate dikinase 2.
- spot 5,6,13 : Cell division cycle protein 48.
- spot 7,11 : Actin-1.
- spot 8,9 : Succinate dehydrogenase.
- spot 10 : aldehyde dehydrogenase (ALDH).
- spot3,12: 無法比對到水稻peptides。

### 討論

#### 一、花柱分泌物的萃取及活性分析

關於二級代謝產物對植物授粉作用的影響,大多集中於花粉的研究,但雌蕊的並不多 (Campos et al., 2003)。

雌蕊柱頭是花粉進行授粉作用時首先遭遇的第一個雌性生殖器官的部分,目 前已知其上表達的蛋白質可參與自交不親合性的反應,高等植物的柱頭可分為乾 性與濕性柱頭,以擬南芥的乾柱頭為例,其上的 lipid 參與了乾燥花粉水解及花 粉管萌發;而另一種的濕性柱頭以本實驗的鐵砲百合為代表,花粉和花粉管向來 是密不可分的關係,由於花粉管的萌發需要藉由柱頭分泌物上的醣蛋白或其他物 質以辨識花粉是否為同一物種,再經由授粉作用完成雙重受精。我們的最終目標 是希望知道:(1) 柱頭分泌物對於花粉的萌發效果;(2) 其內的有效的物質為何; 以及 (3) 花粉如何對於此物質產生相對的反應(機制)以達促進萌發之效。當花粉 接觸到柱頭分泌物時,可促進萌發花粉管萌發,且本研究花粉萌發活性測試得 知,新鮮的鐵砲百合花粉 (snow queen or white fox) 在萌發初期 (15 分鐘至 60 分鐘),於培養液中進行萌發,加入柱頭分泌物的乙酸乙酯層會促進花粉萌發長 出花粉管,萌發速率高於萌發液中加入柱頭分泌物 (圖 2),因此可知乙酸乙酯 層內含有某些物質可促進花粉管萌發。

#### 二、花柱萃取的成分鑑定

由核磁共振光譜分析乙酸乙酯內含物結果得知其一成分為長鏈脂肪(圖 3.1),有文獻指出脂肪在新鮮花粉中佔有相當大的比例 (Human et al., 2006),此脂肪可以促進花粉管的萌發 (Schnurr et al., 2004)。

利用氣相層析質譜儀分析乙酸乙酯層內含物,與NIST 08資料庫比對,比對後的結果,總共分析出20種化合物。其內的物質多為長鏈脂肪,而現有文獻並無 針對柱頭分泌物之長鏈脂肪加以探討。 利用液相層析質譜儀分析乙酸乙酯內含物,預測出四個正離子片段,分別為: Furanone, 2-Pyrrolidinone, Cytosine, Nicotinic acid (圖 5.2-5.5, 表 2-1)。藍莓果實 在新陳代謝還沒生成花青素前,會大量累積 phenylalanine,直到花青素成熟,酚 類物質產生,當藍莓吸收黃酮醇 (flavonols)、醣類、Furanone 和 esters 會使果實 加速成熟 (Menager et al., 2004)。以矮牽牛為例,當自交不親合的柱頭分泌物與 野生種的柱頭分泌物雜合,並加入花粉中會使萌發率提高 33% (Mo et al., 1992) 。 LC-MS 分析乙酸乙酯內含物,預測出三個負離子片段 3-methylideneoxolane-2,5-dione, Purine, uracil (圖 5.6-5-8,表 2-2),其中 Purine 是 一種重要的生化合成路徑,它可以驅動子房的活化,使授粉機率提高 (Kateryna et al., 2007)。

利用四極柱暨飛行時間串聯式液相質譜儀分析乙酸乙酯層內含物,檢測正離 子片段,參考文獻比對,再利用元素組成分析,在滯留時間 1.068 分鐘,荷質比 86.0584,預測出此片段的化合物為 2-Pyrrolidinone (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO) (圖 5.9);檢測負 離子片段,參考文獻比對,再利用元素組成分析,在滯留時間 1.144 分鐘,荷質 比 111.0073,預測出此片段的化合物為 3-methylideneoxolane-2,5-dione (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) (圖 5.10)。花粉管的生長需要水分的供給,充足的氧氣和合適的滲透壓環境,為 得知花粉管內生長因子,前人在矮牽牛 (*Petunia*) 和萬年青 (*Ornithogalum*) 花 粉中,發現會促進花粉管萌發的許多物質,這些生長因子包括 kinetin, IAA, NAA 及 gibberellic acid,但是若無加入下列這些物質會無法刺激花粉管的萌發或延 展, purine- and pyrimidine-analogs (including cytosine, and uracil [100 ppm]), and vitamins (including pyridoxine [2 ppm], nicotinic acid [10 ppm]) (Brewbaker et al.,1963)。

我們所找到的片段化合物 (Cytosine, Nicotinic acid, Purine, uracil), James 於 1963年有相關探討。其餘片段化合物無法由相關文獻證實,而本研究中找到的片 段化合物為首次於柱頭分泌物的乙酸乙酯層所分析得到,未來會針對這些物質, 測試各別化合物對於花粉管的萌發效果。

#### 三、受花柱分泌物及萃取物誘導產生之花粉蛋白的分析及身分鑑定

蛋白質體學二維電泳技術用於花粉管蛋白中得知,一些影響圖譜良莠的因素 有蛋白質萃取時樣品重量、rehydration buffer配置比例、蛋白質離心及二維電泳 中IEF條件之設定。在本研究中,我們找到適當的條件完成上述關鍵步驟,克服 二維電泳技術之困難,完成整個實驗。

本研究將柱頭分泌物及乙酸乙酯層加入花粉後以不同萌發時間點(15分鐘及 60分鐘),所抽取之鐵砲百合花粉管蛋白,以二維電泳圖譜表現,並經由軟體分 析後,將特異性蛋白共 13 個進行 LC-MS/MS 分析,並以 BioWorks v3.3.1 (Thermo Scientific) 蛋白質資料庫分析結果,與水稻資料庫比對後所鑑定出蛋白 質的資料如表 4 所示,而這 13 個蛋白點中, spot 4,5,6、spot 7,11、spot8,9,10 及 spot12,13 可能是在萌發花粉管時產生的蛋白質經由磷酸化 (phosphorylation) 修 飾、醣基化 (glycosylation) 作用及乙醯化 (acetylation)所產生的蛋白質 isoforms,但這並不會造成分子量的改變,但pI 值會有位移的現象,在花粉發育 及花絲生長時所產生的蛋白質也會有此效果 (Li et al., 2008)。在花粉管生長的過 程中,有些貯存性 (storage protein) 的蛋白質會經由胺基酸的生合成持續累積, 而檸檬酸循環 (citric acid cycle) 及醣解作用 (glycolysis) 即是胺基酸分子氧化 的途徑之一。

spot 1 屬胺基酸代謝 (amino acid metabolism) 作用, spot 1: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase,此功能的蛋 白質經由甲基轉移酶 (methyltransferase) 合成胺基酸 (Brenner et al., 2003)。此蛋 白在闊葉蘇鐵 (*Cycas rumphii*) 中利用 Homocysteine methyltransferase 傳導生長 訊號及生化合成 BMAA (S(+)-beta-methyl-alpha, betadiaminopropionic),在阿拉伯 芥中已證實 BMAA 在光照的環境下可使胚軸 (hypocotyl) 延伸兩到三倍 (Brenner et al., 2000, 2003)。

其中spot 2及4蛋白都為丙酮酸 (Pyruvate) 的衍生物,丙酮酸參與醣類代謝。葡

萄醣解作用最後會形成丙酮酸,在含氧狀態下,丙酮酸會氧化脫羧 (oxidative decarboxylayion) 形成乙醯輔酵素 (Acetyl CoA),此活性乙醯經檸檬酸循環完全氧化產生CO<sub>2</sub>。為形成ATP主要步驟,可做為能量儲藏,供給細胞所需。 Spot 2: pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit,當此蛋白質酵素參與檸檬酸循環時,影響遍及內部碳流量調節及能量產生,在這個代謝反應中,ATP的產生會更進一步影響到花粉管萌發及生長 (chen et al., 2009)。其中*pyruvate dehydrogenase E1*參與醣解作用時,進入 tricarboxylic acid (TCA) 循環產生ATP。 pyruvate dehydrogenase (PDH) 是一控制能量代謝 (energy metabolism) 的主要酵素。E1 alpha subunit 在其中扮演活化 E1 且控制 PDH 整體的活性 (Jilka et al., 1986)。

Spot 4: Pyruvate phosphate dikinase 2, 在玉米 (Zea mays) 成熟花粉的胚乳有一基因,稱為 opaque-2(O2),這個 O2 基因可經由醣解途徑活化花粉細胞質內的 pyruvate phosphate dikinase (PPDK) (Wang et al., 2001)。

Spot 5,6,13: Cell division cycle protein 48, 文獻指出此蛋白質於花粉管生長時所合成,並為花粉管延展時的生長因子 (Sheoran1 et al., 2007)。

Spot 8,9: Succinate dehydrogenase,於檸檬酸循環中,琥珀酸 (Succinate) 會經由Succinate dehydrogenase 氧化會形成 fumarate。

但本實驗的琥珀酸應屬於於植物體內的胞器(乙醛酸循環, glyoxylate cycle)中所發現的,此琥珀酸可用以合成糖以及細胞的其他組分。琥珀酸存在於花粉管外壁,可使柱頭軟化後,讓花粉管進入胚囊內,進行雙重受精作用 (Dai et al., 2007)。

Spot 10: aldehyde dehydrogenase, 在花粉管生長時被誘導所產生的基因, aldehyde dehydrogenase (ALDH),可使植物內芳香族及脂肪族的醛類化合物氧 化,當大量的ALDH在雌蕊內會使花粉管內的乙醛代謝成乙醇 (Roel et al., 1997)。 在裸子 (gymnosperm) 植物花粉管內粒線體的aldehyde dehydrogenase主要功能 為酒精代謝 (ethanol fermentation),此酵素會使粒線體內的ATP synthase beta subunit向上調節 (chen et al., 2009)。 spot 7,11: Actin-1, 在植物中肌動蛋白絲參與了許多重要的過程,包括細胞分裂、細胞延展、產生胞器、細胞質、花粉管生長的趨向性及花粉管的生長等(Rachel et al., 2005)。在花粉管生長時,肌動蛋白絲會進入胞器內分泌液泡,使花粉管內充滿肌動蛋白絲而持續生長 (Chen et al., 2003)。

spot3,12無法比對到水稻的蛋白質peptides,所以他們的功能性也是未知的。 由本研究活性測試得知,加入乙酸乙酯層可促進花粉管萌發,並由蛋白體學分析 證實乙酸乙酯層內的物質可促進 gene turn on,或是加強其萌發效果,雖然由目 前結果仍無法得知是何種物質,但從蛋白質體學分析可以證實乙酸乙酯層確實具 有促進萌發之效果。 圖表



圖 1、減壓濃縮流程圖,取柱頭/花柱分泌物加入ddH<sub>2</sub>O混和溶解後,加入等量 的乙酸乙酯,並以分液漏斗萃取,靜置待其分層,分層後取出乙酸乙酯層及水層, 利用減壓濃縮得到乙酸乙酯層 0.4399 克及水層 9.0912 克。由於水層的極性非常 高,故再利用正丁醇對水層做二次萃取,減壓濃縮後得到正丁醇層 0.7144 克及 水層 3.4055 克。



圖 2、鐵砲百合花粉萌發一小時萌發率統計圖,當加入乙酸乙酯層於萌發液時, 對於促進花粉萌發速率較為顯著 (大於萌發液中加入柱頭/花柱分泌物),而正丁 醇及水層也有促進花粉萌發速率但不及萌發液中加入柱頭/花柱分泌物,結果如 上圖。

compound 1



圖 3. 利用 NMR 氫光譜分析乙酸乙酯層內四個區塊的物質結構 圖 3-1. 利用 NMR 氫光譜分析 compound 1,並由 NMR 波峰分佈片段和高度比 可知特定原子的數量和原子鍵結的環境及各分子不同的位置及環境而有不同的 訊號位置(即化學位移),但因樣品不夠純,只可約略預測化合物為長鏈脂肪。





圖 3-2. 利用 NMR 氫光譜分析 compound 2,並由 NMR 波峰分佈片段和高度比可知特定原子的數量和原子鍵結的環境,及各分子不同的位置及環境而有不同的 訊號位置(即化學位移),但因樣品不夠純,使得氫光譜訊號複雜,只可約略預測 化合物為苯環類的溶劑安定劑。

compound 3



圖 3-3. 利用 NMR 氫光譜分析 compound 3,並由 NMR 波峰分佈片段和高度比可知特定原子的數量和原子鍵結的環境,及各分子不同的位置及環境而有不同的 訊號位置(即化學位移),但因樣品不夠純,只可約略預測化合物為不飽和脂肪鏈。

compound 4



圖 3-4. 利用 NMR 氫光譜分析 compound 4, 並由 NMR 波峰分佈片段和高度比 可知特定原子的數量和原子鍵結的環境,及各分子不同的位置及環境而有不同的 訊號位置 (即化學位移),但因樣品不夠純,使得氫光譜訊號複雜,只可約略預 測化合物為萜類 (terpene)。



圖 4. 利用 GC-MS 分析乙酸乙酯層,波峰範圍由 3.4 至 45.4 分鐘, 3.346 分鐘為 Silane, 3.530 分鐘為 tert-Butyldimethylsilanol, 10.296 分鐘為 2(3H)-Furanone, 34.666 分鐘為 3-Eicosene, 34.764 分鐘為 9-Tricosene, 35.034 分鐘為 Octadecane, 37.219 分鐘為 trans-9-Octadecenoic acid, 37.311 分鐘為 trans-13-Octadecenoic acid, 37.400 分鐘為 9-Nonadecene, 37.498 分鐘為 Z-12-Pentacosene, 37.549 分 鐘為 Octadecanoic acid, 37.727 分鐘為 Heptacosane, 39.937 分鐘為 3-Eicosene, 40.026 分鐘為 Trichloroacetic acid, 40.220 分鐘為 Heneicosane, 42.412 分鐘為 17-Pentatriacontene, 42.513 分鐘為 Nonadecyl trifluoroacetate, 42.694 分鐘為 Tritetracontane, 45.301 分鐘為 Heptacosyl acetate, 45.415 分鐘為 17-Pentatriacontene,總共分析出 20 種化合物。


圖 5-1 LC-MS 分析乙酸乙酯層,上圖為負離子檢測,下圖為正離子檢測。由 LC-MS 分析,參考文獻比對,再利用元素組成分析,結果得知各離子片段的荷 質比 (m/z) 及滯留時間 (Retention time),箭頭處所指的就是我們預測出波峰 (a) 三個負離子片段: 3-methylideneoxolane-2,5-dione, Purine, uracil (圖 5.6-5.8) (b) 四 個正離子片段,分別為 Furanone,2-Pyrrolidinone,Cytosine,Nicotinic acid (圖 5.2-5.5)。



圖 5-2. LC-MS 正離子分析乙酸乙酯層

以LC-MS 正離子分析乙酸乙酯層,參考文獻比對,再利用元素組成分析, 預測正離子片段,在滯留時間 1.003 分鐘,荷質比 85.0284 (箭頭處指示),預測 出化合物Furanone (C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>)。



圖 5-3 LC-MS 正離子檢測分析乙酸乙酯層

以LC-MS 正離子分析乙酸乙酯層,參考文獻比對,再利用元素組成分析, 預測正離子片段,在滯留時間 1.067 分鐘,荷質比 86.0558(箭頭處指示),預測 出化合物 2-Pyrrolidinone (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO)。



圖 5-4 LC-MS 正離子檢測分析乙酸乙酯層

以LC-MS 正離子分析乙酸乙酯層,參考文獻比對,再利用元素組成分析, 預測正離子片段,在滯留時間 1.067 分鐘,荷質比 112.0392(箭頭處指示),預測 出化合物Cytosine (C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O)。



圖 5-5 LC-MS 正離子檢測分析乙酸乙酯層

以LC-MS 正離子分析乙酸乙酯層,參考文獻比對,再利用元素組成分析, 預測正離子片段,在滯留時間 3.287 分鐘,荷質比 124.0958(箭頭處指示),預測 出化合物Nicotinic acid (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>)。



圖 5-6 LC-MS 負離子檢測分析乙酸乙酯層

以LC-MS 負離子分析乙酸乙酯層,參考文獻比對,再利用元素組成分析, 預測正離子片段,在滯留時間 1.143 分鐘,荷質比 111.0117(箭頭處指示),預測 出化合物 3-methylideneoxolane-2,5-dione (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>)。



圖 5-7 LC-MS 負離子檢測分析乙酸乙酯層

以LC-MS 負離子分析乙酸乙酯層,參考文獻比對,再利用元素組成分析, 預測正離子片段,在滯留時間 1.578 分鐘,荷質比 119.0518(箭頭處指示),預測 出化合物Purine (C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>)。



圖 5-8 LC-MS 負離子檢測分析乙酸乙酯層

以LC-MS 負離子分析乙酸乙酯層,參考文獻比對,再利用元素組成分析, 預測正離子片段,在滯留時間 1.578 分鐘,荷質比 112.9884(箭頭處指示),預測 出化合物uracil (C4H4N2O2)。



圖 5-9 ESI Q-TOF MS 正離子檢測分析乙酸乙酯層

以ESI Q-TOF MS 正離子分析乙酸乙酯層,参考文獻比對,再利用元素組成 分析,預測正離子片段,在滯留時間 1.068 分鐘,荷質比 86.0584(箭頭處指示), 預測出化合物 2-Pyrrolidinone (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO)。



圖 5-10 ESI Q-TOF MS 負離子檢測分析乙酸乙酯層

以ESI Q-TOF MS 負離子分析乙酸乙酯層,参考文獻比對,再利用元素組成分析,預測負離子片段,在滯留時間 1.144 分鐘,荷質比 111.0073 (箭頭處指示), 預測出化合物 3-methylideneoxolane-2,5-dione(C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>)。



圖 6. SDS-PAGE,取等量蛋白濃度 20μg,進行 12% SDS-PAGE 電泳分離後以 Coomassie blue 染色, lane 1 至 lane 3 依序為花粉萌發 15、30 及 60 分鐘所抽取 之花粉管蛋白, lane 4 至 lane 6 依序為花粉加柱頭分泌物萌發 15、30 及 60 分鐘 所抽取之花粉管蛋白, lane 7 至 lane 9 依序為花粉加乙酸乙酯萃取液萌發 15、 30 及 60 分鐘所抽取之花粉管蛋白。



圖 7.利用 PDQuest 分析軟體分析花粉(P)、花粉加柱頭分泌物(S)、花粉加乙酸乙 酯萃取物(e),萌發 15 分鐘及 60 分鐘所抽取之花粉管蛋白,二維電泳分析圖生 物性二重複,圖中的 Master 為花粉加柱頭分泌物萌發 60 分鐘。



圖 8.上圖分別為(A)花粉,(B)花粉加柱頭分泌物,(C)花粉加乙酸乙酯萃取物,花 粉萌發 15 分鐘所抽取之花粉管蛋白,(D)花粉,(E)花粉加柱頭分泌物,(F)花粉加 乙酸乙酯萃取物花粉萌發 60 分鐘所抽取之花粉管蛋白,利用 PDQuest 分析軟 體,於花粉加乙酸乙酯萃取物萌發 60 分鐘,發現 13 個蛋白質相異點。



70-

50

40 30

20-

10-

0-

| 5

11.43

10

Relative Abundance 60



29.20

30

24.66

18.93

20

15

24.01 MMM

25

圖 9a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 1 SSP 8903,由分析結果得知,相較於控制組, 某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以花粉加入乙酸乙酯層萌發 60 分 鐘所抽取之花粉管蛋白,蛋白質點表現量更有明顯增加。圖 9b. 將蛋白質點 (Spot 1 SSP 8903) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進行串聯式質 譜儀 (LC MS/MS) 分析。

37.39

37.<u>30</u>

35

<u>37</u>.45

38.32

40

Time (min)

42.37 44.40

45

63.36

64.12

65

72.77 7777 75

70

63.08

52.06

50

52.12

54.60

55





圖 10a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 2 SSP 7409,由分析結果得知,相較於控制組, 某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以花粉加入乙酸乙酯層萌發 60 分 鐘所抽取之花粉管蛋白,蛋白質點表現量更有明顯增加。圖 10b. 將蛋白質點 (Spot 2 SSP 7409) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進行串 聯式質譜儀(LC MS/MS) 分析。





圖 11a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 3 SSP 7108,由分析結果得知,相較於控制組, 某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以花粉加入乙酸乙酯層萌發 60 分 鐘所抽取之花粉管蛋白,蛋白質點表現量更有明顯增加。圖 11b. 將蛋白質點 (Spot 3 SSP 7108) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進行串 聯式質譜儀 (LC MS/MS) 分析。



圖 12a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 4 SSP 3812,由分析結果得知,相較於控制組, 某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以花粉加入乙酸乙酯層萌發 60 分 鐘所抽取之花粉管蛋白,蛋白質點表現量更有明顯增加。圖 12b. 將蛋白質點 (Spot 4 SSP 3812) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進行串 聯式質譜儀 (LC MS/MS) 分析。



圖 13a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 5 SSP 4813,由分析結果得知,相較於控制組, 某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以花粉加入乙酸乙酯層萌發 60 分 鐘所抽取之花粉管蛋白,蛋白質點表現量更有明顯增加。圖 13b. 將蛋白質點 (Spot 5 SSP 4813) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進行串 聯式質譜儀 (LC MS/MS) 分析。





圖 14a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 6 SSP 4812,由分析結果得知,相較於控制組, 某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以花粉加入乙酸乙酯層萌發 60 分 鐘所抽取之花粉管蛋白,蛋白質點表現量更有明顯增加。圖 14b. 將蛋白質點 (Spot 6 SSP 4812) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進行串 聯式質譜儀 (LC MS/MS) 分析。





圖 15a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 7 SSP 2413,由分析結果得知,相較於控制組, 某些實驗組之蛋白質點有明顯<sup>『</sup>量』上差異。圖 15b. 將蛋白質點 (Spot 6 SSP 4812) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進行串聯式質譜儀 (LC MS/MS) 分析。





圖 16a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 8 SSP 7707,由分析結果得知,相較於控制組, 某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以花粉加入乙酸乙酯層萌發 60 分 鐘所抽取之花粉管蛋白,蛋白質點表現量更有明顯增加。圖 16b. 將蛋白質點 (Spot 8 SSP 7707) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進行串 聯式質譜儀 (LC MS/MS) 分析。





圖 17a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 9 SSP 7705,由分析結果得知,相較於控制組, 某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以花粉加入乙酸乙酯層萌發 60 分 鐘所抽取之花粉管蛋白,蛋白質點表現量更有明顯增加。圖 17b. 將蛋白質點 (Spot 9 SSP 7705) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進行串 聯式質譜儀 (LC MS/MS) 分析。





圖 18a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 10 SSP 7706,由分析結果得知,相較於控制 組,某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以花粉加入乙酸乙酯層及花粉 加入柱頭分泌物萌發 60 分鐘所抽取之花粉管蛋白,蛋白質點表現量更有明顯增 加。圖 18b. 將蛋白質點 (Spot 10 SSP 7706) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進行串聯式質譜儀 (LC MS/MS) 分析。



圖 19a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 11 SSP 2506,由分析結果得知,相較於控制 組,某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異。圖 19b. 將蛋白質點 (Spot 11 SSP 2506) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進行串聯式質譜儀 (LC MS/MS) 分析。

圖 20a.





圖 20a.利用 PDQuest 分析軟體 Spot 12 SSP 8901,由分析結果得知,相較於控制 組,某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以花粉加入乙酸乙酯層萌發 60 分鐘所抽取之花粉管蛋白,蛋白質點表現量更有明顯增加。圖 20b. 將蛋白質 點 (Spot 12 SSP 8901) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),後進 行串聯式質譜儀 (LC MS/MS) 分析。





圖 21a.利用 PDQuest 分析軟體分析 Spot 13 SSP 8902,由分析結果得知,相較於 控制組,某些實驗組之蛋白質點有明顯『量』上差異,以花粉加入乙酸乙酯層萌 發 60 分鐘所抽取之花粉管蛋白,蛋白質點表現量更有明顯增加。圖 21b. 將蛋白 質點 (Spot 13 SSP 8902) 挖出,以 Trypsin 進行膠內水解 (In-gel Digestion),進 行串聯式質譜儀 (LC MS/MS) 分析。

表格

表 1. 由 LC-MS 正離子偵測分析乙酸乙酯層,參考文獻比對後,再利用元素組成分析,預測出正離子片段,滯留時間、荷質比,及分子結構、分子式。

Positive mode MSMS	Retention time	M/Z	Molecular formula	name	structure
	1.003min	314.9787	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	Furanone	0_0
	1.067min	234.1322	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO	2-Pyrrolidinone	0 HN
	1.067min	112.0392	C4H5N3O	Cytosine	
	3.287min	124.0958	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Nîcotinic acid	ОН

表 1-2. LC-MS 負離子分析乙酸乙酯層

由 LC-MS 負離子偵測分析乙酸乙酯層,參考文獻比對後,再利用元素組成分 析,預測出負離子片段,滯留時間、荷質比,及分子結構、分子式。

Negative mode MSMS	Retention time	M/Z	Molecular formula	name	structure
	1.143min	232.1240	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	3- methylideneoxola ne-2 <sub>2</sub> 5-dione	°
	1.578min	119.0518	C5H4N4	purine	
	1.578min	112.9884	$C_4H_4N_2O_2$	uracil	

表 2-1. ESI Q-TOF MS 正離子偵測分析乙酸乙酯層

由ESIQ-TOF MS 正離子偵測分析乙酸乙酯層,參考文獻比對,並利用元素組成 分析,預測正離子片段,在滯留時間 1.067 分鐘及荷質比 86.0606,分子式為 C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO,因利用ESIQ-TOF MS無法打斷 2-Pyrrolidinone (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO),下表是利 用mass fragment 程式分析出 2-Pyrrolidinone可能的斷裂處。

Daughter (Da)	Mass (Da)	Mass error (mDa)	Formula	DBE	∆Formula	Structure(s), score & H-deficit
86.0617	86.0606	+1.1	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> NO	1.5	none	N
						S:1.0 B:0 H:+1
69.0377	69.0340	+3.7	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O	2.5	H <sub>3</sub> N	N
						S:12.0 B:2 H:-1

表 2-2. ESI Q-TOF MS 負離子偵測分析乙酸乙酯層

由ESI Q-TOF MS 負離子偵測分析乙酸乙酯層,參考文獻比對,並利用元素組成 分析,預測負離子片段,在滯留時間 1.143 分鐘及荷質比 111.0082,分子式為  $C_5H_4O_3$ ,因利用 ESI Q-TOF MS 無法打斷 3-methylideneoxolane-2,5-dione ( $C_5H_4O_3$ ),下表是利用mass fragment 程式分析出 3-methylideneoxolane-2,5-dione 可能的斷裂處。

Daughter (Da)	Mass (Da)	Mass error (mDa)	Formula	DBE	∆Formula	Structure(s), score & H-deficit				
111.0073	111.0062	-0.9	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	4.5	Н2	о <del>с ,</del> 				
67.0174	67.0184	-1.0	C4H3O	3.5	сн <sub>2</sub> 0 <sub>2</sub>	07 	on the	~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~		ot
						S.3.0 B:2 H:-1	S:3.0 B:2 H:-1	S:8.0 B:3 H:+1	S:15.0 B:3 H:-1	S:15.0 B:3 H:-1

表 3. 利用 PDQuest 分析二維電泳軟體,以花粉管蛋白加柱頭分泌物萌發 60 分鐘當控制組,分析六種樣品的二維電泳圖片之蛋白質總數 (spots),六種樣品與控制組比對呈現一致的蛋白質數量 (match)、比例 (match rate) 和相似度 (correlation coefficient)。

Gel Name	Spots		Matched	Mato	h Rate	2 Con	Coeff	
e15 v2 434		235	459	45%		0.739		
e60 v2	665		365	70%		0.7	0.739	
P15 v2	640		311	60%		0.7	0.716	
P60 v2	621		291	56%		0.7	0.720	
\$15 v2	465		212	409	40%		0.551	
*S60 v2	518		518	100	%	1.0	00	
(i) Master is marki MatchSet information —	ed with *	Correlation	n coefficient based on	S60 v2	mation			
Spots matched to every	member:	119	Replicate Gro	up/Classes	Member	Matched to all	Mean CV	
Queral mean coefficient	t of variation:	35.33	all not assign	ed	6	110	25.22	

## 表 4. 經 LC-MS MS 鑑定鐵砲百合花粉加入乙酸乙酯層之蛋白質點分析

樣品利用 LC-MS/MS (LTQ, Thermo Scientific) 分析,以 BioWorks v3.3.1 (Thermo Scientific) 軟體比對,比對的物種為稻米 (*Oryza sativa*, 172,276 protein entries),實驗數據由 NCBI 下載。蛋白質點分析編號(Spot number),分子量 (molecular weight, MW),等 電點 (isoelectric point, pI), sequence coverage 是以 LC tandem MS 找到胺基酸序列與物種胺基酸序列比對後的比例, Score 高於 18 為 可信數據, Accession number,由 NCBI 胺基酸序列比對之編號。

Spot no.	pI/MW	sequence	matched	score	nectoin identity.	accordian
		coverage	peptide		protein identity	accession
1	5.89/84.58	33.10%	13(18)	120.24	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase [Oryza sativa]	gi 257676169
2	7.66/42.70	9.80%	7(8)	60.17	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit [Oryza sativa]	gi 115448577
3	4.78/78.89	3.90%		16.15	No confident protein hit.	gi 295639541
4	5.31/96.55	3.80%	7(8)	50.18	Pyruvate, phosphate dikinase 2 [Oryza sativa]	gi 257659167
5	5.00/92.08	5.70%	4(7)	40.25	Cell division cycle protein 48, putative, expressed [Oryza sativa]	gi 257725199
6	4.98/89.74	11%	7(11)	70.24	Cell division cycle protein 48, putative, expressed [Oryza sativa]	gi 115450773
7	5.19/41.81	33.10%	13(18)	120.24	Actin-1 [Oryza sativa]	gi 148886767
8	6.63/68.85	9.80%	5(12)	40.26	Succinate dehydrogenase[Oryza sativa]	gi 75135397
9	6.61/68.85	4.90%	4(5)	30.22	Succinate dehydrogenase [Oryza sativa]	gi 75135397
10	8.50/56.40	6.0%	4(4)	40.15	aldehyde dehydrogenase [Oryza sativa]	gi 47900421
11	5.19/41.81	42.20%	14(29)	130.15	Actin-1[Oryza sativa]	gi 148886767
12	7.09/57.53	3.30%		10.2	No confident protein hit.	gi 222622064
13	5.00/92.08	3.10%	2(2)	20.19	Cell division cycle protein 48, putative, expressed [Oryza sativa]	gi 257725199

Spot no.	peptide sequence	Spot no.	peptide sequence
1	K.VVAPPERK.Y	4	R.GGM*TSHAAVVAR.G
	K.VVAPPERK.Y		R.GGM*TSHAAVVAR.G
	K.DAYVGDEAQSKR.G		R.GGMTSHAAVVAR.G
	K.AGFAGDDAPR.A		R.NNGAEGIGLCR.T
	K.AEYDESGPSIVHR.K		K.LSEVNPM*LGFR.G
	K.EITALAPSSM*K.I		K.LSEVNPMLGFR.G
	R.GYSFTTTAER.E	5	K.YQAFAQTLQQSR.G
	K.IWHHTFYNELR.V		R.KGDLFLVR.G
	K.EITALAPSSMK.I		K.AIANECQANFISVK.G
	K.YPIEHGIVSNWDDM*EK.I		R.IVSQLLTLM*DGLK.A
	R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	6	R.ELQETVQYPVEHPEK.F
	VAPEEHPVLLTEAPLNPK		K.YQAFAQTLQQSR.G
	K.SYELPDGQVITIGAER.F		R.KGDLFLVR.G
2	R.YHGHSMSDPGSTYR.T		R.VLNQLLTEM*DGM*NAK.K
	K.RGDYVPGLK.V		K.AIANECQANFISVK.G
	R.RM*EIAADSLYK.A		K.GVLFYGPPGCGK.T
	R.RMEIAADSLYK.A		R.IVSQLLTLM*DGLK.A
	MEIAADSLYK		
	R.MEIAADSLYK.A		

表 5-1. 經 LC-MS/MS 鑑定鐵砲百合花粉管蛋白(乙酸乙酯)之 peptide 比對

Spot no.	peptide sequence	Spot no.	peptide sequence
7	K.VVAPPERK.Y	10	R.SVNGTTYAGIR.A
	K.VVAPPERK.Y		SVNGTTYAGIR
	K.DAYVGDEAQSKR.G		GAGIGTPEAIK
	K.AGFAGDDAPR.A		LEDAGFDWK
	K.AEYDESGPSIVHR.K	11	R.HTGVMVGM*GQK.D
	K.EITALAPSSM*K.I		R.HTGVMVGM*GQK.D
	R.GYSFTTTAER.E		K.DAYVGDEAQSKR.G
	K.IWHHTFYNELR.V		R.HTGVM*VGMGQK.D
	K.EITALAPSSMK.I		HTGVM*VGMGQK
	K.YPIEHGIVSNWDDM*EK.I		K.DAYVGDEAQSK.R
	R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A		K.AEYDESGPSIVHR.K
	VAPEEHPVLLTEAPLNPK		K.IWHHTFYNELR.V
	K.SYELPDGQVITIGAER.F		R.AVFPSIVGRPR.H
8	R.VM*QNNAAVFR.T		R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A
	R.VM*QNNAAVFR.T		K.YPIEHGIVSNWDDMEK.I
	R.AYFSATSAHTCTGDGNAM*VAR.A		K.SYELPDGQVITIGAER.F
	R.AAIGLSEHGFNTACITK.L		R.TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR.L
	R.LGANSLLDIVVFGR.A		K.DLYGNIVLSGGTTM*FPGIADR.M
9	R.VM*QNNAAVFR.T	13	K.AIANECQANFISVK.G
	R.VM*QNNAAVFR.T		K.GVLFYGPPGCGK.T
	R.VMQNNAAVFR.T		
	R.AYFSATSAHTCTGDGNAM*VAR.A		

表 5-2. 經 LC-MS MS 鑑定鐵砲百合花粉管蛋白(乙酸乙酯)之 peptide 比對

參考文獻

- Borg, M., Brownfield, L. and Twell, D. (2009) Male gametophyte development: a molecular perspective. *J Exp Bot*. 60: 1465-1478.
- 2. Brewbaker, J. L. and Beyoung, H. K. (1963) The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Amer. Jour. Bot.* 50: 859-865.
- Bedinger, P. A., Hardemen, K. J. and Loukides, C. A (1994) Travelling in style: the cell biology of pollen. *Cell biology*. 4: 132-138.
- Brenner, E. D., Stevenson, D. W., McCombie, R. W., Katari, M. S., Rudd, S. A. and Mayer, F. K. et al. (2003) Expressed sequence tag analysis in *Cycas*, the most primitive living seed plant. *Genome Biology*. 4: R78.1-R78.11.
- Brenner, E. D., Nora, M. B., Clark, A. P., Liang, Q. S., Stevenson, D. W. and Coruzzi, G. M. (2000) *Arabidopsis* mutants resistant to S(+)-beta-methyl-alpha, beta-diaminopropionic acid, a cycadderived glutamate receptor agonist. *Plant Physiology*. 124: 1615-1624.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L. and Ghiggeri, G. M. (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 25: 1327-1333.
- Campos, M. G., Webby, R. F., Markham, K. R., Mitchell, K. A. and Cunha, A. P. (2003) Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. J. Agric. *Food Chem.* 51: 742-745.
- Chen, C. Y., Cheung, A. Y. and Wu, H. M. (2003) Actin-depolymerizing factor mediates Rac/Rop GTPase-regulated pollen tube growth. *Plant Cell*. 15:

237-249.

- Chen, T., Wu, X., Chen, Y., Li, X., Huang, M., Zheng, M., Baluska, F., Samaj, J. and Lin, J. (2009) Combined Proteomic and Cytological Analysis of Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin Regulation in *Picea meyeri* PollenTube Growth. *Plant Physiology.* 149: 1111-1126.
- Chen, Y., Lei, S., Zhou Z. et al., (2009) Analysis of gene expression profile in pollen development of recessive genic male sterile *Brassica napus* L. line S45A. *Plant Cell Rep* 28:1363-1372.
- Du, H., Simpson, R. J., Clarke, A. E. and Bacic, A. (1996) Molecular characterization of a stigma-specific gene encoding an arabinogalactan-protein (AGP) from *Nicotiana alata. Plant J.* 9: 313-23.
- Dai, S. Wang, T., Yan, X. and Chen, S. (2007) Proteomics of pollen development and germination. *Proteome Research*. 6: 4556-4563.
- Edlund, A. F., Swanson, R. and Preuss, D. (2004) Pollen stigma structure function-the role of diversity in pollinationl. *Plant Cell*. 16: S84-S97.
- Hiscock, S. J. and Allen, A. M. (2008) Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytol.* 179: 286-317.
- Hulskamp, M., Kopczak, S. D., Horejsi, T. F., Kihl, B.K. and Pruitt, R. E. (1995) Identification of genes required for pollen-stigma recognition in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 8: 703-14.
- 16. Hepler, P. K. Luis, V. and Alice, Y. C. (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 17: 159-187.
- Human, H. and Nicolson, S. W. (2006) Nutritional content of fresh, beecollected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*. 67: 1486-1492.
- Ian, R.W., Skehel, J. M. and Cutler, Paul. (2004) A statistical comparison of silver and SYPRO Ruby staining for proteomic analysis. *Electrophoresis*. 25: 3048-3054.
- Jauh, G. Y. and Lord, E. M. (1996) Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum L.*) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta*. 199: 251-61.
- Jiang, P-L., Wang, C-S., Hsu, C-M. Jauh, G-Y. and Tzen, J. T. C. (2007) Stable Oil Bodies Sheltered by a Unique Oleosin in Lily Pollen. *Plant Cell Physiol.* 48: 812-821.
- Jilka, J. M., Rahmatullah, M., Kazemi, M. and Roche, T. E. (1986). Properties of a newly characterized protein of the bovine kidney pyruvate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.* 261: 1858-1867.
- Kunst, L. and Samuels, A. L. (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in lipid research*. 42: 51-80.
- 23. Koti, S., Reddy, K. R., Reddy, V. R., Kakani, V. G. and Duli, Z. (2005) Interactive effects of carbon dioxide, temperature, and ultraviolet-B radiation on soybean (Glycine max L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination, and tube lengths. *Journal of Experimental Botany*. 56: 725-736.
- Knox, R. B. and J. H. H. (1970) Pollen-wall proteins: localization and enzymic Activity. *Journal of Cell Science*. 6: 1-27.

- Kost, B., Spielhofer, P. and Chua, N. H. (1998) A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant Journal*. 16: 393-401.
- 26. Kateryna, V., Faiza, T., Matton, D. P., Douglas, J. H. and Andrew, R. S. (2007) A comparative proteome and phosphoproteome analysis of differentially regulated proteins during fertilization in the self-incompatible species *Solanum* chacoense Bitt. *Proteomics*. 7: 232-247.
- Lu, S., Song, T., Kosma1, D. K., Parsons, E. P., Rowland, O. and Jenks, M. A. (2009) *Arabidopsis* CER8 encodes long-chain-CoA synthetase 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant Journal*. 59: 553-564.
- Long, S.R. (1989) Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground.*Cell*. 56:203-14.
- Lewis, J., Martin, R., Keith, R., Alexander, J., Peter, W. and Bruce, A. (2007) The cytoskeleton. In: Sarah G. *Molecular biology of the cell 4<sup>th</sup>*. Garland Science, New York, pp 907-982.
- Li, J., Chen, J., Zhang, Z. and Pan, Y. (2008) Proteome Analysis of Tea Pollen (*Camellia sinensis*) under Different Storage Conditions. J. Agric. Food Chem. 56: 7535–7544.
- Mo, Y., Nagel, C. and Taylor, L. P. (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89: 7213-7217.

- 32. Mortz, E., Krogh, T. N., Vorum, H., and Gorg, A. (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*. 1: 1359-1363.
- McCormick, S. (1993) Male gametophyte development. *Plant Cell*. 5: 1265-1275.
- 34. McCormick, S. (2004) Control of male gametophyte development. *Plant Cell*.16: 142-153.
- Murphy, D. J. (2001) Biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.* 40: 325-438.
- Murphy, D. J. and Ross, J. H. E. (1998) Biosynthesis, targeting and processing of oleosin-like proteins, which are major pollen coat components in Brassica napus. *Plant J.* 13: 1-16.
- Menager, I., Jost, M. and Aubert, C. (2004) Changes in physicochemical characteristics and volatile constituents of strawberry (Cv. Cigaline) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 1248-1254.
- Pacini, E. (2000) From anther and pollen ripening to pollen presentation. *Plant sys evol.* 222: 19-43.
- Preuss. D., Lemieux, B, Yen. G. Davis, R. W. (1993) A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* 7: 974-85.
- Reddy, A. S. N. (2001) Calcium silver bullet in signal. *Elsevier Science*. 160: 381-404.

- Ross, J. H. E. Murphy, D. J. (1996) Characterization of anther-expressed genes encoding a major class of extracellular oleosinlike proteins in the pollen coat of *Brassicaceae*. *Plant J.* 9: 625-37.
- Roel, G. L., Camp, O. D., and C, K. (1997) Aldehyde dehydrogenase in tobacco pollen. *Plant Molecular Biology*. 35: 355-365.
- 43. Rachel, H. D., Tanaka, C. K., Vensel, W. H., Hurkman, W. J. and McCormick, S. (2005) Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*. 5: 4864-4884.
- 44. Spencer C. H. B. (2010) Understanding plant reproductive diversity. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 365: 99-109.
- Scott, R. J., Spielman, M. and Dickinson, H. G. (2004) Stamen Structure and function. *Plant cell*. 16: 46-60.
- Sheoran1, I. S., Ross, A. R. S., Olson, D. J. H. and Sawhney, V. K. (2007) Proteomic analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *Journal of Experimental Botany.* 58: 3525-3535.
- Schnurr, Judy. Shockey, J. and Browse, J. (2004) The Acyl-CoA Synthetase Encoded by LACS2 Is Essential for Normal Cuticle Development in *Arabidopsis. The Plant Cell.* 16: 629-642.
- Tang, X., Zhang, Z. Y., Zhang, W. J., Zhao, X. M., Li, X., Zhang, D., Liu, Q. Q. and Tang, W. H. (2010) Global Gene Profiling of Laser-Captured Pollen Mother Cells Indicates Molecular Pathways and Gene Subfamilies Involved in Rice Meiosis. *Plant Physiology*. 154: 1855-1870.
- 49. Taylor, L. P. and Jorgensen, R. (1992) Conditional male fertility in chalcone

synthase-deficient petunia. J. Hered. 83: 11-17.

- 50. Taylor, L. P. and Hepler, P. K (1997) Pollen germination and tube growth. *Plant Physiol.*48: 461-491.
- 51. Vidali, L. McKenna, S. T. and Hepler, P. K. (2001) Actin Polymerization is essential for pollen tube growth. *Molecular Biology of the Cell*. 12: 2534-2545.
- Vogt, T., Pollak, P., Tarlyn, N. and Taylor, L. P. (1994) Pollination- or wound-induced kaempferol accumulation in petunia stigmas enhances seed production. *Plant Cell.* 6: 11-23.
- Vogt, T. and Taylor, L. P. (1995) Flavonol 3-O-glycosyltransferases associated with petunia pollen produce gametophyte-specific flavonol diglycosides. *Plant Physiol.* 108: 903-11.
- Wang, C-S., Walling, L-L., Eckard K-J. and Lord, E- M. (1992a) Patterns of Protein Accumulation in Developing Anthers of Lilium longiflorum Correlate. *Am. J. Bot.* 79: 118-127.
- Wang, X. and Larkins, B. A. (2001) Genetic analysis of amino acid accumulation in *opaque-2* maize endosperm. *Plant Physiology*. 125: 1766-1777.
- 56. Xu, P., Vogt, T. and Taylor, L. P. (1996) Uptake and metabolism of flavonols during in vitro germination and tube growth of *Petunia hybrida* pollen. *Planta*. *In press.* 2: 257-265.
- 57. Ylstra, B., Busscher, J., Franken, J., Hollman, P. C. H., Mol, J. N. M. and van, T. A. J. (1994) Flavonols and fertilization in *Petunia hybrida*: localization and mode of action during pollen tube growth. *Plant J.* 6: 201-12.

- Zonia L. (2010) Spatial and temporal integration of signalling networks regulating pollen tube growth. *J Exp Bot.* 61:1939-1957.
- Zerback, R. Bokel, M., Geiger, H. and Hess, D. (1989) A kaempferol
  3-glucosylgalactoside and further flavonoids from pollen of *Petunia hybrida*. *Phytochemistry*. 28: 897-99.

## 附錄

附錄 1. 為得知在三層萃取成分中哪一部份對花粉萌發速率產生影響,故將萃取 物依原本濃縮比例回溶至 DMSO 或乙醇中,以測試這兩種溶劑是否對花粉管萌 發產生影響,並測試個別濃縮層內含之分子對花粉管萌發速率的影響,由下圖 花粉萌發一小時結果得知,適當比例的 DMSO 或乙醇並不會影響花粉管萌發, 並以加入 DMSO 於萌發液中比例為 1/100,為三層萃取層之萌發條件。



附錄 2. 為得知由乙酸乙酯薄層層析之化合物對花粉管萌發產生影響,並測試個 別濃縮層內含之分子對花粉管萌發速率的影響,由下圖花粉萌發一小時結果得 知,各成分對於促進花粉萌發速率沒有明顯的效果(皆低於萌發液中加入柱頭分 泌物)。



附錄 3. 下圖由左至右分別為花粉、花粉加柱頭分泌物、花粉加乙酸乙酯層、花粉加正丁醇層及花粉加水層, 萌發 30 分鐘所抽取之花粉管蛋白,第一維電泳使用 IPG strip pH4-7,第二維電泳使用 8%~16%之梯度膠片,以銀染呈色 2 分 30 秒。



附錄 4. 下圖由左至右分別為花粉、花粉加柱頭分泌物、花粉加乙酸乙酯層、花粉加正丁醇層及花粉加水層, 萌發 30 分鐘所抽取之花粉管蛋白,第一維電泳使用 IPG strip pH4-7,第二維電泳使用 8%~16%之梯度膠片, 以 Coomassie blue G250 呈色。



附錄 5. 下圖由左至右為花粉、花粉加柱頭分泌物花粉萌發 30 分鐘所抽取之花 粉管蛋白,第一維電泳使用 IPG strip pH4-7,第二維電泳使用 8%~16%之梯度 膠片,以 SYPRO Ruby 呈色。



附錄6. 蛋白質點1經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長度為716個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

附錄7. 蛋白質點2經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長度為390個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

MAAAILLRRV PPARAQATAL IAARSISDST APLTIETSVP FTSHIVDPPS
 RDVTTTPAEL LTFFRDMSVM RRMEIAADSL YKAKLIRGFC HLYDGQEAVA
 VGMEAAITRS DSIITAYRDH CTYLARGGDL VSAFAELMGR QAGCSRGKGG
 SMHFYKKDAN FYGGHGIVGA QVPLGCGLAF AQKYRKEETA TFALYGDGAA
 NQGQLFEALN ISALWKLPAI LVCENNHYGM GTAEWRAAKS PAYYKRGDYV
 PGLKVDGMDV LAVKQACKFA KEHAIANGPI VLEMDTYRYH GHSMSDPGST
 YRTRDEISGV RQERDPIERV RKLILAHDLA TAAELKDMEK EIRKEVDDAI
 AKAKESPMPD TSELFTNVYV KGFGVESFGA DRKELRATLP

附錄8. 蛋白質點3經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長度為740個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

1	MAGAVLVAIA	ASIGNLLQGW	DNATIAGAVL	YIKKEFNLQS	EPLIEGLIVA
51	MSLIGATIIT	TFSGAVADSF	GRRPMLIASA	VLYFVSGLVM	LWAPNVYVLL
101	LARLIDGFGI	GLAVTLVPLY	ISETAPTDIR	GLLNTLPQFS	GSGGMFLSYC
151	MVFGMSLMPQ	PDWRIMLGVL	SIPSLIYFAL	TIFYLPESPR	WLVSKGRMAE
201	AKRVLQGLRG	REDVSGEMAL	LVEGLGVGKD	TKIEEYIIGP	DDELADEGLA
251	PDPEKIKLYG	PEEGLSWVAR	PVHGQSALGS	ALGLISRHGS	MVSQGKPLVD
301	PVVTLFGSVH	EKMPEIMGSM	RSTLFPNFGS	MFSVAEQQQA	KGDWDAESQR
351	EGEDYGSDHG	GDDIEDSLQS	PLISRQATSV	EGKEIAAPHG	SIMGAVGRSS
401	SLMQGGEAVS	SMGIGGGWQL	AWKWTEREGA	DGEKEGGFQR	IYLHEEGVTG
451	DRRGSILSLP	GGDVPPGGEF	VQAAALVSQP	ALYSKELMEQ	RLAGPAMVHP
501	SQAVAKGPKW	ADLFEPGVKH	ALFVGIGIQI	LQQFAGINGV	LYYTPQILEQ
551	AGVGVLLANI	GLSSSSASIL	ISGLTTLLML	PSIGIAMRLM	DMSGRRFLLL
601	ATIPILIVAL	AILILVNILD	VGTMVHASLS	TVSVILYFCF	FVMGFGPIPN
651	ILCAEIFPTT	VRGICIAICA	LTFWIGDIIV	TYTLPVMLNA	IGLAGVFGIY
701	AVVCILAFLF	VFMKVPETKG	MPLEVITEFF	SVGAKQAKED	

附錄9. 蛋白質點4經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長度為887個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

1	MAPAAHRDGA	AEAVGQRVFH	FGKGRSDGNK	TMKDLLGGKG	ANLAEMASIG
51	LSVPPGFTVS	TEACQQYQAQ	KAMPAGLWDE	ILAALTWVEG	NMGAVLGDPR
101	RPLLLSVRSG	AAVSMPGMMD	TVLNLGLNDH	VVAGLAHRSG	ERFAYDSYRR
151	FLDMFGNVVM	DIPHSLFEEK	IEAMKAALGL	RNDTELTARD	LKELVAQYKN
201	VYVEAKGEEF	PSDPKKQLHL	SVLAVFNSWD	SARAKKYRSI	NQITGLKGTA
251	VNVQCMVFGN	MGDTSGTGVL	FTRNPSTGER	KLYGEFLVNA	QGEDVVAGIR
301	TPQDLDTMKD	CMPEPYAELV	ENCKILESHY	KEMMDIEFTV	QENRLWMLQC
351	RTGKRTGKGA	VKIAVDMVNE	GLIDRRSAIK	MVEPRHLDQL	LHPQFESPSS
401	YGDKVIATGL	PASPGAAVGQ	IVFTADDAEA	WHAQGKSVIL	VRTETSPEDV
451	GGMNAAAGIL	TARGGMTSHA	<b>AVVAR</b> GWGKC	CVAGCSGIRV	NDAEKVVLVA
501	DKVLCEGEWL	SLNGSTGEVI	LGKLPLSPPA	LSGDLGEFMS	WVDEVKKLKV
551	KANADTPADA	LTAR <mark>NNGAEG</mark>	<b>IGLCR</b> TEHMF	FSSDERIKAM	RQMIMAETIE
601	HRQIALDRLL	PYQRLDFEGI	FRAMDGLPVT	IRLLDPPLHE	FLPEGNVEDM
651	VRLLSSGNVY	TQEEILTRIE	KLSEVNPMLG	FRGCRLGISY	PELTAMQARA
701	IFEAAISMTE	QGVKVFPEIM	VPLIGTPQEL	AQQVDVIREV	AEKVFANAET
751	TISYKIGSMI	EVPRAALIAD	EIAALAEFFS	FGTNDLTQMT	FGYSRDDVGK
801	FLPTYLSKGI	LQNDPFEVFD	QKGVGELVKV	AVERGRKARP	DLEVGICGEH
851	GGEPSSVAFF	AKVGLNYVSC	SPFRVPIARL	AAAQVML	

附錄10. 蛋白質點5經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長 度為826個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

1	MASQGEPSSS	ADPKGKKDYS	TAILERKKSP	NRLVVDEATN	DDNSVVALHP
51	DTMERLQLFR	GDTVLLKGKK	RKDTICIVLA	DETCEEPKIR	MNKVVRKNLR
101	VRLGDVVSVH	QCQDVKYGKR	VHILPIDDTV	EGITGNLFDA	FLKPYFLEAY
151	RPVR <mark>KGDLFL</mark>	<b>VR</b> GGMRSVEF	KVIETDPTEY	CIVAPDTEIF	CDGEPIKRED
201	EERLDEVGYD	DVGGVRKQMA	QIRELVELPL	RHPQLFKSIG	VKPPKGILLY
251	GPPGSGKTLI	ARAVANETGA	FFFLINGPEI	MSKLAGESES	NLRKAFEEAE
301	KNAPSIIFID	EIDSIAPKRE	KTNGEVERR <mark>I</mark>	VSQLLTLMDG	LKARSHVIVM
351	GATNRPNSID	PALRRFGRFD	REIDIGVPDE	VGRLEVLRIH	TKNMKLAEDV
401	DLELIAKDTH	GYVGADLAAL	CTEAALQCIR	EKMDIIDLED	ETIDAEILNS
451	MAVTNDHFKT	ALGTSNPSAL	RETVVEVPNV	SWEDIGGLEN	VKRELQEPIY
501	VLEFLQTVQY	PVEHPEKFEK	FGMSPSKGVL	FYGPPGCGKT	LLAKAIANEC
551	QANFISVKGP	ELLTMWFGES	EANVREIFDK	ARQSAPCVLF	FDELDSIATQ
601	RGSSVGDAGG	AADRVLNQLL	TEMDGMNAKK	TVFIIGATNR	PDIIDPALLR
651	PGRLDQLIYI	PLPDEQSRLQ	IFKACLRKSP	VAKDVDLNAL	AKYTQGFSGA
701	DITEICQRAC	KYAIKREHRE	AHPYYNKLDD	IERERRSKEN	PEAMEEDEVD
751	DIAEIKAAHF	EESMKYARRS	VSDADIRK <mark>YQ</mark>	AFAQTLQQSR	GFGSEFRFER
801	TEAGAGAAAD	PFASAAAVAD	DDDLYS		

附錄11. 蛋白質點6經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長 度為809個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

1	MASQGEPSSS	SDPKGKKDFS	TAILERKKSP	NRLVVDEATN	DDNSVIGMHP
51	DTMEKLQLFR	GDTVLLKGKK	RKDTICIVLA	DDTCEEPKIR	MNKVVRKNLR
101	VRLGDVVSVH	QCPDVKYGKR	VHILPIDDTV	EGITGNLFDA	FLKPYFLEAY
151	RPLRKGDLFL	<b>VR</b> GGMRSVEF	KVIETDPAEY	CIVAPDTEIF	CDGEPIKRED
201	EERLDEVGYD	DVGGVRKQMA	QIRELVELPL	RHPQLFKSIG	VKPPKGILLY
251	GPPGSGKTLI	ARAVANETGA	FFFLINGPEI	MSKLAGESES	NLRKAFEEAE
301	KNAPSIIFID	EIDSIAPKRE	KTHGEVERR I	VSQLLTLMDG	LKARSHVIVM
351	GATNRPNSID	PALRRFGRFD	REIDIGVPDE	VGRLEVLRIH	TKNMKLAEDV
401	DLEHIAKDTH	GYVGADLAAL	CTEAALQCIR	EKMDIIDLED	ETIDAEILNS
451	MAVTNDHFKT	ALGTSNPSAL	RETVVEVPNV	SWEDIGGLEN	VKRELQETVQ
501	YPVEHPEKFE	KFGMSPSK <mark>GV</mark>	LFYGPPGCGK	TLLAKAIANE	CQANFISVKG
551	PELLTMWFGE	SEANVREIFD	KARQSAPCVL	FFDELDSIAT	QRGSSVGDAG
601	GAADR <mark>VLNQL</mark>	LTEMDGMNAK	KTVFIIGATN	RPDIIDPALL	RPGRLDQLIY
651	IPLPDDQSRL	QIFKACLRKS	PVAKDVDLNA	LAKYTQGFSG	ADITEICQRA
701	CKYAIRENIE	KDIEMEKRRK	DNPEAMEEDE	VDDIAEIKAA	HFEESMKYAR
751	RSVSDADIRK	YQAFAQTLQQ	SRGFGTEFRF	ADQPASGAGA	AADPFASAAA
801	AADDDDLYS				

附錄12. 蛋白質點7經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長度為377個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

MADAEDIQPL VCDNGTGMVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHTGVMVGMG
 QKDAYVGDEA QSKRGILTLK YPIEHGIVSN WDDMEKIWHH TFYNELRVAP
 EEHPVLLTEA PLNPKANREK MTQIMFETFN TPAMYVAIQA VLSLYASGRT
 TGIVLDSGDG VSHTVPIYEG YALPHAILRL DLAGRDLTDY LMKILTERGY
 SFTTTAEREI VRDMKEKLSY IALDYDQEME TAKTSSSVEK SYELPDGQVI
 TIGAERFRCP EVLFQPSFIG MEAAGIHETT YNSIMKCDVD IRKDLYGNIV
 LSGGTTMFPG IADRMSKEIT ALAPSSMKIK VVAPPERKYS VWIGGSILAS
 LSTFQOMWIA KAEYDESGPS IVHRKCF

附錄13. 蛋白質點8經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長 度為630個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

1	MWRGCVSRGL	RSLSKGKGSS	SSAPVSAAAR	LFSTASSSYT	VVDHSYDAVV
51	VGAGGAGLR <mark>A</mark>	AIGLSEHGFN	TACITKLFPT	RSHTVAAQGG	INAALGNMTE
101	DDWRWHMYDT	VKGSDWLGDQ	DSIQYMCREA	PKAVIELENY	GLPFSRTEDG
151	KIYQRAFGGQ	SLDFGKGGQA	YRCACAADRT	GHAMLHTLYG	QAMKHNTQFF
201	VEYFALDLIM	DSEGTCQGVI	ALNMEDGTLH	RFRATNTILA	TGGYGR <mark>AYFS</mark>
251	ATSAHTCTGD	GNAMVARAGL	PLQDLEFVQF	HPTGIYGAGC	LITEGSRGEG
301	GILRNSEGER	FMERYAPTAK	DLASRDVVSR	SMTMEIREGR	GVGPLKDHIY
351	LHLNHLPPEV	LKERLPGISE	TAAIFAGVDV	TKEPIPVLPT	VHYNMGGIPT
401	NYHGEVVTMK	GDNPDSVVPG	LMAAGEAACA	SVHGANRLGA	NSLLDIVVFG
451	RACANRVAET	AKPGEKQKPL	QKSAGEKTIA	WLDKLRNANG	SLPTSKIRLN
501	MQRVMQNNAA	VFRTQETLEE	GCKLITKAWE	SYHDVKISDR	SLIWNSDLIE
551	TIELENLLIN	ACITMHSAEA	RKESRGAHAR	EDFTKRDDEQ	WMKHSLGYWE
601	NEKVRLAYRP	VHMNTLDSEV	ESFPPKARVY		

附錄14. 蛋白質點9經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長 度為630個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

1	MWRGCVSRGL	RSLSKGKGSS	SSAPVSAAAR	LFSTASSSYT	VVDHSYDAVV
51	VGAGGAGLRA	AIGLSEHGFN	TACITKLFPT	RSHTVAAQGG	INAALGNMTE
101	DDWRWHMYDT	VKGSDWLGDQ	DSIQYMCREA	PKAVIELENY	GLPFSRTEDG
151	KIYQRAFGGQ	SLDFGKGGQA	YRCACAADRT	GHAMLHTLYG	QAMKHNTQFF
201	VEYFALDLIM	DSEGTCQGVI	ALNMEDGTLH	RFRATNTILA	TGGYGR <mark>AYFS</mark>
251	ATSAHTCTGD	GNAMVARAGL	PLQDLEFVQF	HPTGIYGAGC	LITEGSRGEG
301	GILRNSEGER	FMERYAPTAK	DLASRDVVSR	SMTMEIREGR	GVGPLKDHIY
351	LHLNHLPPEV	LKERLPGISE	TAAIFAGVDV	TKEPIPVLPT	VHYNMGGIPT
401	NYHGEVVTMK	GDNPDSVVPG	LMAAGEAACA	SVHGANRLGA	NSLLDIVVFG
451	RACANRVAET	AKPGEKQKPL	QKSAGEKTIA	WLDKLRNANG	SLPTSKIRLN
501	MQRVMQNNAA	VFRTQETLEE	GCKLITKAWE	SYHDVKISDR	SLIWNSDLIE
551	TIELENLLIN	ACITMHSAEA	RKESRGAHAR	EDFTKRDDEQ	WMKHSLGYWE
601	NEKVRLAYRP	VHMNTLDSEV	ESFPPKARVY		

附錄15. 蛋白質點10經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長 度為550個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

1	MSLILSRRRL	AAAVRRSGPA	ALASRWMHTP	PFATVSPQEI	SGSSPAEVQN
51	FVQGSWTTSG	NWNWLVDPLN	GEKFIKVAEV	QEAEIKPFVE	SLSNCPKHGL
101	HNPLKAPERY	LMYGDISAKA	ANMLGQPVVS	DFFAKLIQRV	SPKSYQQALA
151	EVQVSQKFLE	NFCGDQVRFL	ARSFAVPGNH	LGQSSNGYRW	PYGPVAIITP
201	FNFPLEIPLL	QLMGALYMGN	KPVLKVDSKV	SIVMDQMLRL	LHACGMPAED
251	VDFINSDGIT	MNKLLLEANP	KMTLFTGSSR	IAEKLAADLK	GKIKLEDAGF
301	DWKILGPDVQ	EVDYIAWVCD	QDAYACSGQK	CSAQSILFMH	KNWSSSGLLD
351	KMKSLSERRK	LEDLTIGPVL	TVTTSSMIEH	MKNLLKIPGS	KVLFGGEPLE
401	NHSIPEIYGA	FKPTAVFVPL	SEILKSGNFE	LVTREIFGPF	QVVTEYSDDE
451	LELVLEACER	MNAHLTAAVV	SNDPLFLQEV	LGRSVNGTTY	AGIRARTTGA
501	PQNHWFGPAG	DPRGAGIGTP	EAIKLVWSCH	REIIYDIGPL	PKNRALPSAT

附錄16. 蛋白質點11經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長度為377個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

MADAEDIQPL VCDNGTGMVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHTGVMVGMG
 QKDAYVGDEA QSKRGILTLK YPIEHGIVSN WDDMEKIWHH TFYNELRVAP
 EEHPVLLTEA PLNPKANREK MTQIMFETFN TPAMYVAIQA VLSLYASGRT
 TGIVLDSGDG VSHTVPIYEG YALPHAILRL DLAGRDLTDY LMKILTERGY
 SFTTTAEREI VRDMKEKLSY IALDYDQEME TAKTSSSVEK SYELPDGQVI
 TIGAERFRCP EVLFQPSFIG MEAAGIHETT YNSIMKCDVD IRKDLYGNIV
 LSGGTTMFPG IADRMSKEIT ALAPSSMKIK VVAPPERKYS VWIGGSILAS
 LSTFQQMWIA KAEYDESGPS IVHRKCF

附錄17. 蛋白質點12經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長度為517個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

MYTQHQKCLL VDTPASGSTR RITAFLGGLD LAAGRYDTPS HRLFADLGTV
 FSGDVYNPAI PPAGNKGGAG EEGPRQPWHD MHCRVDGPAA VDVLENFEQR
 WRKATKLFRR AKAHWKDDAL LKLERISWIL SPSDSGAGDG DGGDSHLYAL
 PDGHPDCWNA QVFRSVDSGS VKGLPRCWET KKMLKHRYAM QEAKHLVCDK
 NVTVEQSIHT AYVRAIRSAK RFIYIENQLS SQFVRLSSYF KKIHMSGAGN
 LVPMEIALKV ASKIAAGERF AVYIVIPMWP EGVPTSGPIQ EILFWQRQTM
 QAMYEVIAAA IRAAGMEGAA HPRDYLNFYC LGKREAAAAA AAGSPEQEHN
 PAASSARRHR RFMIYVHSKG MIVDDEYVIV GSANINQRSL AGSRDTEIAV
 MEIAAENWRR YAADDDVAM QGHLMRYPVD VGDDGKISEL RGHEFFPDVG
 GRILGSTNNN YWDYLTM

附錄18. 蛋白質點13經由LC tandem MS分析後,以水稻序列比對,蛋白質序列長度為826個胺基酸。紅色字體為比對後與水稻資料庫相同之胺基酸序列。

1	MASQGEPSSS	ADPKGKKDYS	TAILERKKSP	NRLVVDEATN	DDNSVVALHP
51	DTMERLQLFR	GDTVLLKGKK	RKDTICIVLA	DETCEEPKIR	MNKVVRKNLR
101	VRLGDVVSVH	QCQDVKYGKR	VHILPIDDTV	EGITGNLFDA	FLKPYFLEAY
151	RPVRKGDLFL	VRGGMRSVEF	KVIETDPTEY	CIVAPDTEIF	CDGEPIKRED
201	EERLDEVGYD	DVGGVRKQMA	QIRELVELPL	RHPQLFKSIG	VKPPKGILLY
251	GPPGSGKTLI	ARAVANETGA	FFFLINGPEI	MSKLAGESES	NLRKAFEEAE
301	KNAPSIIFID	EIDSIAPKRE	KTNGEVERRI	VSQLLTLMDG	LKARSHVIVM
351	GATNRPNSID	PALRRFGRFD	REIDIGVPDE	VGRLEVLRIH	TKNMKLAEDV
401	DLELIAKDTH	GYVGADLAAL	CTEAALQCIR	EKMDIIDLED	ETIDAEILNS
451	MAVTNDHFKT	ALGTSNPSAL	RETVVEVPNV	SWEDIGGLEN	VKRELQEPIY
501	VLEFLQTVQY	PVEHPEKFEK	FGMSPSK <mark>GVL</mark>	FYGPPGCGKT	LLAKAIANEC
551	QANFISVKGP	ELLTMWFGES	EANVREIFDK	ARQSAPCVLF	FDELDSIATQ
601	RGSSVGDAGG	AADRVLNQLL	TEMDGMNAKK	TVFIIGATNR	PDIIDPALLR
651	PGRLDQLIYI	PLPDEQSRLQ	IFKACLRKSP	VAKDVDLNAL	AKYTQGFSGA
701	DITEICQRAC	KYAIKREHRE	AHPYYNKLDD	IERERRSKEN	PEAMEEDEVD
751	DIAEIKAAHF	EESMKYARRS	VSDADIRKYQ	AFAQTLQQSR	GFGSEFRFER
801	TEAGAGAAAD	PFASAAAVAD	DDDLYS		

90



