

出國報告（出國類別：研究）

# 利用 Sodium Green 染劑偵測鹽逆境下耐 鹽植物冰花體內鈉離子的分布

服務機關：國立中興大學 生命科學系

姓名職稱：顏宏真 教授

派赴國家：日本 神戶

出國期間：102.04.17~102.05.05

報告日期：102.07.18

## 摘要

本學術交流活動是到日本神戶大學生物系 Mimura 教授實驗室，進行高等植物對鹽逆境反應的探討，著重於利用生物影像為工具，進行生理功能分析研究，本人前往之實驗室正具備此方面之專業技術，但是從未利用耐鹽模式植物來進行研究，由於本人對於冰花的研究已超過 20 年，故非常歡迎本人去進行學術交流。結果成功建立了耐鹽植物冰花的活體觀測系統，利用無菌培養的冰花小苗施予定量的氯化鈉溶液，在鹽逆境下經過一天的培養，根部並不會累積大量的氯化鈉離子，所得結果與利用不耐鹽植物所測得之反應不同，顯示耐鹽植物具有獨特的排鹽機制，使其可生長於高鹽環境。

## 目次

目的-----	4
過程-----	5
心得與建議-----	8

## 目的

**原定計畫目標:**本實驗室長期著重探討高等植物耐鹽機制，以耐鹽植物冰花為模式，對於鹽逆境初始反應的分子生理機制特別感興趣，離子進出細胞必須經過細胞膜上特殊之 transporters，transporter 種類包括:唧筒(pump)，攜帶子(carrier)，或孔道(channel)等。當細胞外鈉離子濃度增加時，細胞膜內外之濃度梯度差，造成  $\text{Na}^+$  順向流入胞內，使細胞內的  $\text{Na}^+$  累積至毒害細胞的濃度，擾亂正常之生理代謝。植物細胞膜上並無專門吸收鈉離子之 transporter，而  $\text{Na}^+$  進入細胞的管道，已知是經由運輸  $\text{K}^+$  之攜帶子及孔道進入細胞。因此，高鹽環境下  $\text{K}^+$  的吸收會受到同是鹼金族離子  $\text{Na}^+$  的競爭， $\text{K}^+$  是影響植物細胞生長的重要營養物質，在含高鈉鹽的土壤中， $\text{K}^+$  吸收會受限制，造成植物同時遭受  $\text{Na}^+$  的毒害及  $\text{K}^+$  的缺乏，適當維持細胞內鉀含量及鉀鈉比值，有助於植物細胞維持生長及保持離子平衡。利用菸草懸浮培養細胞，測細胞內  $\text{Na}^+$  與  $\text{K}^+$  的含量在鹽處理下變化，未馴化的細胞  $\text{K}^+$  含量會隨著  $\text{Na}^+$  濃度的提高而下降，但是鹽馴化的菸草細胞在外加鹽濃度 50 mM 以下，仍能維持細胞內  $\text{K}^+$  的含量，推測鹽馴化後的植物細胞，在鹽環境下吸收  $\text{K}^+$  的能力較好。耐鹽模式植物冰花在不耐鹽的幼年期以鹽處理後，葉部的  $\text{K}^+$  含量明顯下降，無法維持  $\text{K}^+$  含量。但在具有耐鹽能力的冰花懸浮培養細胞經鹽處理後，細胞內  $\text{K}^+$  的濃度變化不大，將冰花懸浮培養細胞置於低鉀(5 mM)培養基並施予鹽逆境，細胞的生長並不受影響，且細胞內的鉀離子含量維持一定。顯示耐鹽植物冰花在鹽逆境下能維持細胞內的鈉鉀離子平衡，使其在高鹽下細胞能正常生長。

**主題:**一些蛋白會影響細胞質之鈉鉀比值，例如 SKD1 (suppressor of  $\text{K}^+$  transport growth defect) 是從老鼠巨噬細胞分離出的一個與鉀離子運輸有關的 cDNA，但其氨基酸序列中並無典型之 transmembrane domains，應不是膜蛋白。SKD1 的分離方式與之前的 HKT1 相同(將老鼠巨噬細胞的 cDNA 置入缺乏  $\text{K}^+$  吸收能力酵母菌突變種中，於低鉀培養基中篩選出能生長的酵母菌，將分離出來的其中兩個類似的 cDNA，命名為 SKD1 和 SKD2。這兩個 cDNA 序列轉譯成氨基酸，經序列比對之後，發現均有一段與 ATP 結合的位置，屬於一個 ATPase 家族成員，這個家族包含許多細胞層次上的功能：如參與細胞循環中膜及囊泡的運輸和分泌；參與酵母菌 peroxisome biogenesis；以及抑制 HIV 轉錄因子 tat 蛋白的作用。這些具 ATPase 活性的蛋白，在鹽逆境下可能參與離子的平衡作用。雖然 SKD1 基因的確切功能至今未明，但在人類及阿拉伯芥的基因組中也有發現相似序列存在，故此序列應普遍存在高等生物之基因組中。在冰花中亦發現一鹽誘導 SKD1 基因，

在高鹽及缺鉀的環境下會提高其表現量，其功能可能經由輔助鉀離子吸收系統，達成維持細胞內鉀離子之平衡，進而提升冰花之耐鹽性。此計畫將針對此基因，設計一系列實驗，來觀察鈉離子在高鹽逆境下的分布，用以推論此基因在冰花耐鹽機制中所扮演之角色。

**緣起:**在 2002 年時利用 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)偵測到加鹽數小時之間，冰花體內發生劇烈的蛋白構型變化，而阿拉伯芥則無此反應。在 2006 年與 2012 年的文章中發現特定的 ATPase SKD1 與 protein kinase SnRK1，在加鹽一到六小時之間會由細胞質往原生質膜移動，推測此現象可能參與逆境的感應或訊息傳遞。但是由於在觀察活體細胞時，遭遇到一些困難，包括冰花細胞自體螢光強烈，容易干擾 reporter 螢光蛋白的訊號；一般高鹽處理以外加方式進行，缺乏細胞內鈉離子的真正累積程度，故無法確切的進行相關性分析。

**預期效益或欲達成事項:**耐鹽植物冰花(*Mesembryanthemum crystallinum* L.; common ice plant)為一年生雙子葉植物，其自然棲地為高鹽或乾燥的地區，常見的分佈區為地中海型氣候區，如美國加州海岸，地中海沿岸，南非內陸沙漠等地。其名稱的由來是因表皮細胞有一種特化的細胞稱為腎形細胞，在高鹽的環境下，由根部吸收的氯化鈉會被集中在這些迅速增大的細胞內，其內氯化鈉濃度可達 1 M 以上，遠看狀似覆蓋了一層冰晶而得名。由於其成熟植株為一多肉植物，並且十分耐旱，加上具有景天酸代謝的特徵，一直被視為典型的 CAM 植物。在 1970 年初期才由兩位德國科學家發現，冰花在幼年期是行 C3 循環，在遭遇到缺水高鹽環境時會轉變成 CAM。經過多年的努力，C3 轉變成 CAM 的生理及生化上的改變，如日夜間二氧化碳固定型態的轉變及參與景天酸代謝酵素如 PEP carboxylase 和 NADP-malic enzyme 之誘導，均已被詳細的研究。在 1980 年末期，分子生物學家開始對於植物耐鹽的分子機制產生興趣時，冰花因其基因表現變化的特性，被選中為高等植物抗鹽機制的模式植物，其耐鹽性在幼苗期即顯現，不需等到成熟期，若是可發展出一種方法，可同時監測活體細胞內蛋白分布以及細胞內鈉離子累積程度，則可精確的評估冰花特定蛋白在高鹽逆境下的反應。

## 過程

**研究項目性質:**在實驗室進行預計的實驗，並與與校園內相同領域之研究人員進行學術交流。

**研究主題:** 利用 Sodium Green 染劑偵測鹽逆境下耐鹽植物冰花體內鈉離子的分布

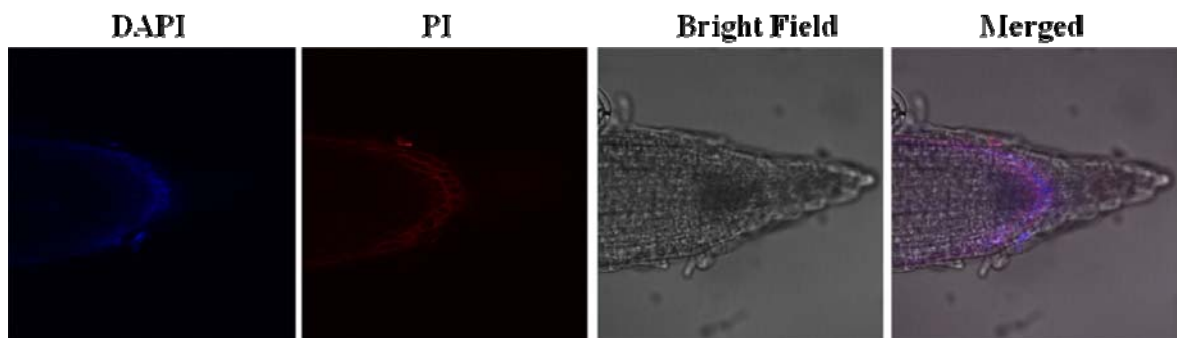
**研究機關(機構、單位)介紹:** 日本神戶大學建立於 1929 年，是日本的國立大學之一，由於神戶港是日本最早開放的港口之一，西化程度頗深。最早成立的是商學院與理工學院，尤其是經濟系在日本頗富盛名，1992 年成立藝術學院和教育學院，開始朝人文社會領域發展，各個科系幾乎都包括大學部和研究所，研究風氣頗盛。神戶大學生物系屬於理學院，理學院包括化學系、物理系、和數學系。位於六甲校區地址如下: The Second Rokkodai (六甲台第 2, Rokkdai Daini) Campus Letters, Science, Agriculture, Engineering (1-1, Rokkodai, Nada-ku, Kobe)，此校區依山而建，每天從阪急電鐵六甲站到校區需要爬山約 10-15 分鐘，非常適合鍛鍊身體。

**研究經過:** 從 102.04.17 到 102.05.05 之間星期一到星期五，早上九點到下午五點，都到神戶大學生物系五樓 Mimura 教授實驗室，利用冰花小苗及培養細胞觀察鹽逆境初始反應，首先利用 Mimura 教授實驗室建立的阿拉伯芥條件，觀察冰花根部及培養細胞鈉離子累積及分布。將冰花種子無菌播種於 MS 培養基中，於適當的條件下培養一週，待根部長到 2-3 cm 長，如下圖。

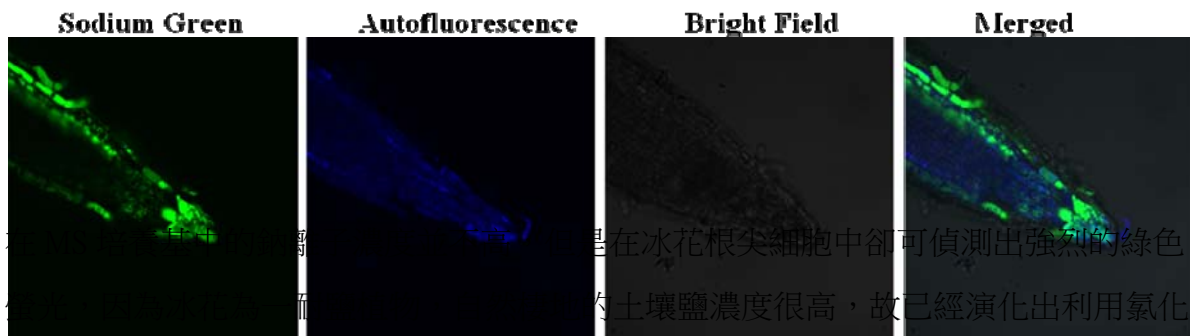


MS 培養基配方如下: Ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 1,650 mg/l, Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 440 mg/l, Magnesium sulphate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 370 mg/l, Potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 170 mg/l, Potassium nitrate ( $\text{KNO}_3$ ) 1,900 mg/l, Boric acid ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 6.2 mg/l, Cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0.025 mg/l, Cupric sulphate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0.025 mg/l, Ferrous sulphate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 27.8 mg/l, Manganese sulphate ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 22.3 mg/l, Potassium iodide (KI) 0.83 mg/l, Sodium molybdate ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0.25 mg/l, Zinc sulphate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 8.6 mg/l,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37.2 mg/l, i-Inositol 100 mg/l, Niacin 0.5 mg/l, Pyridoxine  $\cdot$  HCl 0.5 mg/l, Thiamine  $\cdot$  HCl 0.1 mg/l. 由於目的是發芽，故培養基中並無加入荷爾蒙及蔗糖。

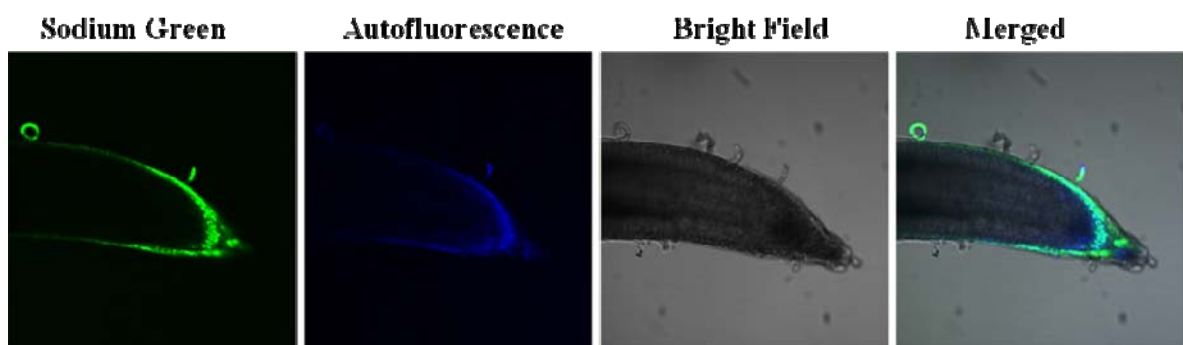
由於之前本實驗室用本校生技中心的共軛焦顯微鏡觀察冰花細胞，發現冰花細胞壁的自我螢光強烈，且對於高鹽的動態反應與阿拉伯芥不盡相同，故先偵測冰花自我螢光的分布，PI 染劑則是用來顯示出根尖細胞的型態與分布，在不同波長的激發光下 (DAPI: 405 nm; PI: 535 nm)，冰花小苗的自我螢光波段與 DAPI 重疊，如下圖。



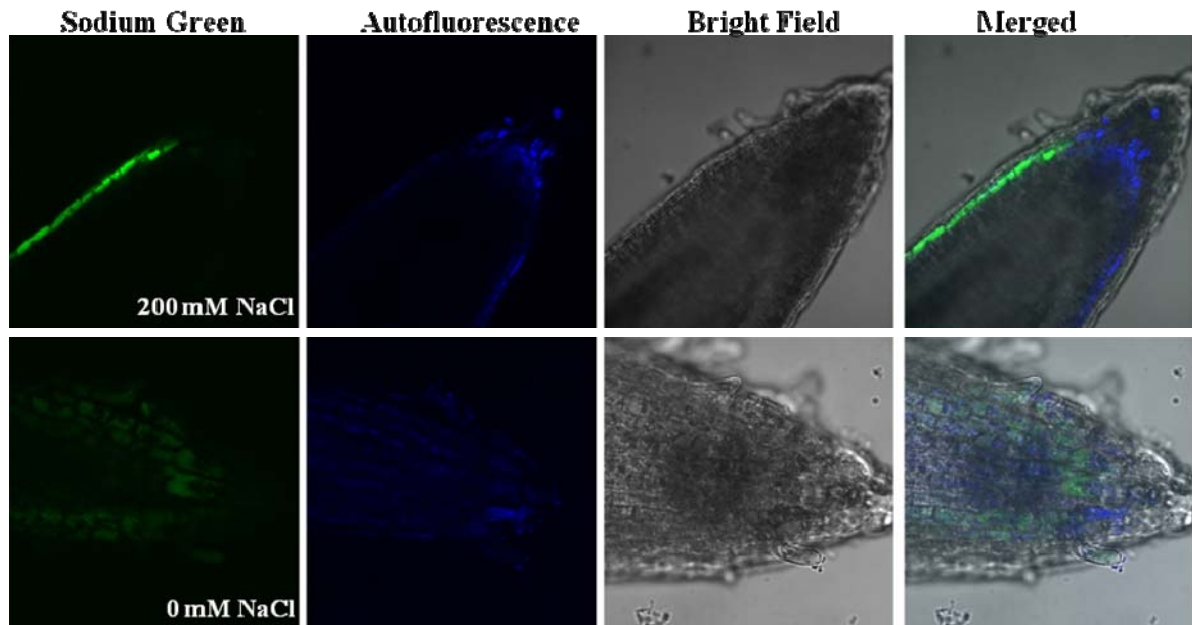
由於 DAPI 散發的螢光波段與 Sodium Green 散發的螢光波段並不相互重疊，故進一步利用 Sodium Green 偵測冰花細胞累積鈉離子的狀況。Sodium Green 是用 Alexa 488 nm 激發，autofluorescence 是用 DAPI 405 nm 激發，結果顯示冰花根部可偵測到 Sodium Green 所散發出來的螢光，顯示在鹽處理之前根部已經會累積鈉離子，如下圖。



在冰花根尖細胞中卻可偵測出強烈的綠色螢光，顯示在鹽處理之前根部已經會累積鈉離子，而阿拉伯芥的土壤鹽濃度很高，故已經演化出利用氯化鈉離子來進行細胞內滲透壓的調節。進一步將冰花小苗進行鹽處理 200 mM NaCl 6 小時，冰花根部細胞的螢光量並無顯著變化，與鹽處理之前的螢光放射量相似；但分布的位置似乎有向表皮移動的趨勢，請見下圖。



為了進一步確認此現象，且考慮是否鹽處理時間不夠久，繼續將小苗進行鹽處理 24 小時後，再次觀察其鈉離子的分布。結果發現鹽處理 24 h 也無法增加根部細胞累積氯化鈉離子，顯示高鹽環境下，冰花根部啟動排鹽機制，將鈉離子排出體外或是往上運送到地上部，如下圖。



**研究成果或檢討事項：**研究成果請看上面所述，冰花小苗施予 200 mM NaCl 處理並不會使根部細胞的鈉離子累積量有明顯的增加。檢討事項:由於冰花小苗有強烈的自體螢光，故需要進一步確認鈉離子跟染劑結合後所散發之螢光，可以以 ion chromatography 或是 ICP-MS 分析根部鈉離子的含量來比較。並且利用切片後再染色的方式，將根部細胞進行較細部的觀察。

### 心得及建議事項

神戶大學 Mimura 教授實驗室在 2009 年時(Hamaji et al. Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in Arabidopsis. Plant Cell Physiology 50: 2023-2033)，發展了以 Sodium Green 染劑觀察活體阿拉伯芥根部以及培養細胞內鈉離子累積的情形，同時也以 Neutral Red 染劑觀察液胞的分布，再配合觀察特定 Q-SNARE-GFP 融合蛋白螢光分布，發現在鹽處理下有許多膜狀粒子(membrane-bound vesicles)在細胞質內快速重新分布。本實驗室之前利用冰花小苗根部，亦觀測到類似現象，一個與 vesicle trafficking 相



關的 ATPase SKD1，在鹽處理六小時後，會由細胞質往細胞膜移動，並與一蛋白激酶 SnRK1 和一 E3 ligase 泛素結合酶產生交互作用(Chiang et al. 2013. Suppressor of K<sup>+</sup> Transport Growth Defect 1 (SKD1) interacts with RING-type ubiquitin ligase and sucrose non-fermenting 1-related protein kinase (SnRK1) in halophyte ice plant. Journal of Experimental Botany 64: 2385 – 2400)，但是其中所用的是固定後的死細胞，無法對活體細胞進行連續偵測，因此無法判斷其在細胞內的動態平衡。

**出國主題相關之具體建議事項:**本次學術交流活動，不但成功發展出偵測冰花體內鈉離子分布的有效方法，而且與神戶大學性質相似的數個研究室建立起很好的關係，例如 Fukaki 教授專長為 auxin 調控側根的發育，恰好與本實驗室另一主題 SKD1 蛋白參與鹽逆境反應與側根發育(Ho et al. 2010. Reduced expression of a vesicle trafficking-related ATPase SKD1 decreases salt tolerance in Arabidopsis. Funct Plant Biology 37: 962-973)契合。並對於日本學者做研究的謹慎小心的態度，以及日本學生認真研究的態度，印象深刻。無論是老師或學生，大概一天有 12 小時在研究室，星期六也照常工作，實在值得本人及本實驗室的研究生學習。