

國立臺灣大學農業化學研究所
博士論文

衰化種子活勢指標分析：
衰化綠豆存活幼苗 RNA 解螺旋
的選殖及特性

Vigour analysis of accelerated aging seeds:
Cloning and characterization of a RNA helicase from the
viable seedlings of aged mung bean.

指導老師：陳慶三 教授

研究生：李信昌 撰

學號：D85623601

中華民國九十年七月

I. 序論

- 1.1 植物之老化及衰化
- 1.2 種子壽命
- 1.3 種子衰化
- 1.4 種子活勢定義及觀念
- 1.5 種子活勢測定
- 1.6 衰化種子生理與生化的變化
- 1.7 衰化種子發芽初期的變化
- 1.8 RNA 解旋酶的特性
- 1.9 RNA 解旋酶在生物體內扮演的角色
- 1.10 RNA 解旋酶結構學方面的研究
- 1.11 RNA 解旋酶可能作用機制的探討
- 1.12 RNA 解旋酶在植物學方面的研究

1.1 植物之老化及衰化 (Senescence and aging in plants)

老化 (senescence) 可以定義為導致組織器官或整個植株死亡之生理變化過程。許多植物 (例如水稻) 於開花結實後整個植物體死亡的過程可稱之為老化, 又如有些落葉植物在秋、冬季節葉片會變黃脫落, 葉片從綠色到趨近脫落的死亡過程亦稱之為老化, Senescence 通常存有內源性可控制的退化過程, 伴隨著計劃性細胞死亡 (programmed cell death)^(1, 2)。從文獻中可以看到另一個相近似的名稱 "aging" 經常容易與老化混淆, 嚴格的說 aging 與 senescence 意義不同, Aging 係指植物隨著時間變化, 所產生之生理變化過程, 其結果並不一定是死亡, 中文譯名可稱之為衰化, Aging 過程屬於被動性、非調節性及退化性, 其造成的主要原因是由於外源性因子, Aging 本身不會直接造成植物死亡, 但是會降低植物於惡劣環境下的適應力, 提高死亡的機率⁽²⁾。例如植物隨著時間增加, 每年植株高度生長降低; 煙草癒傷組織之生長與分化能力隨著年齡增加而降低; 種子儲藏過程中其發芽能力之降低都可稱之為 aging。然而 senescence 與 aging 彼此間由於生化上之性質並非瞭解很多, 通常無法將二者很明確的劃分⁽²⁾。

引導細胞趨於死亡的模式可區分為三 (Davies and Sigeo, 1984)⁽³⁾, 包含有: (1) 計劃性細胞死亡 (programmed cell death, PCD); (2) 壞死 (necrosis); (3) 慢性退化 (chronic degeneration)。Senescence 屬於 PCD, 細胞循一定的步驟走向死亡。而 Necrosis 則是細胞於短時間內大量累積傷害所造成的死亡, 例如急速凍傷、機械傷害或病原菌感染等。Chronic degeneration 則是細胞隨著長時間地慢慢累積傷害而後死亡, 也就是 aging。Aging 和 Necrosis 的差別在於外源性傷害強度的大小, 細胞因累積損傷的增加而提高死亡機率; 然而在另一方面, 細胞亦藉由本身修補機制來恢復活力, 種種因素取決於環境壓力 (environmental stress) 之大小。曾有報告指出細胞於較低的環境壓力下 (例如低溫冷凍), 此時細胞走向死亡之模式為 senescence⁽²⁾。

1.2 種子壽命 (The life of seeds)

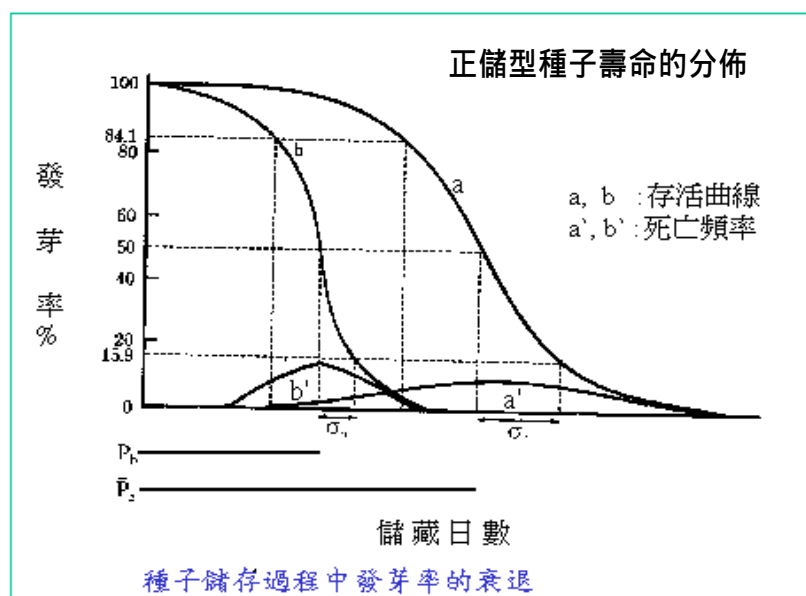
種子壽命是指自種子採收至失去發芽能力所經過的時間。一粒種子除非讓它發芽，否則無法判別其生或死。在適當的條件下若可以發芽，因為種子已長成幼苗，所以可能低估該種子的壽命；若不克發芽，又非休眠，則該種子已死，而且死於何時無從查知，因此也無法測量其壽命。種子壽命因種子種類不同而異，大多數種子其壽命都很短，約 5-30 年。探究種子的壽命，有兩個截然不同的方式，一是測驗某批古老種子是否具有生命，而這種種子的年代可以知曉；這個方法基本上還是如前所論，無法正確地測量種子的壽命。另一個方法則是由經控制的實驗，將一批種子分次於不同的日期測量發芽率，以記錄該批種子壽命衰退的歷程，更進一步，由所得的數據推算該種子在某環境下的可能壽命^(4, 7)。

第一個有系統研究種子壽命的是 Beal (1905)⁽⁵⁾。他在 1879 年發表 21 種種子中只有 *Oenothera biennis*、*Rumex crispus*、與 *Verbascum blatteria* 三種可以存活 70 年以上。Beal 於 1879 年在美國密西根農學院校園埋下 23 種植物的種子，種子拌砂裝於玻璃瓶，瓶口朝下埋於土中，令種子處於土中濕潤狀態。每隔五年（前期）、十年（後期）取樣一次進行發芽試驗。這個試驗進行到 1980 年時恰好是第一百年，到 2030 年該試驗才全部完成。供試的 20 餘種種子當中，約五種種子在首次五年挖出時即已完全不具生命，壽命在 30—50 年之間者約 11 種，壽命為 80—100 年者約五種。由這類試驗的結果很明顯地可以看出來，埋於土中可以生存較久的，皆是具有休眠性的種子；一般作物種子在一年內即在土內發芽死去。

種子壽命的長短係受遺傳與環境因子的影響，而種子水分含量與種子的壽命有密切的關係。種子水分含量受到種子的成分組成、本身的水分含量與貯藏時之相對濕度之影響。種子水分含量愈高，則其種子壽命愈短，水分含量愈低，種子壽命愈長。Robert (1960) 發現種子水分含量與 50% 活力 (half-viability, P_{50}) 喪失所需時間之對數成一直線的關係；而貯藏時之溫度對種子壽命亦有明顯的影響，溫度高時，種子貯藏壽命短，而溫度低時壽命長。Roberts (1972)⁽⁶⁾ 由許多試驗

的結果建立水分含量與溫度對種子壽命影響的數學模式： $\log P_{50} = K_v - C_1 m - C_2 t$
 式中 P_{50} 表示 50% 種子喪失活力所需的時間， m 為種子水分含量， t 為貯存時的溫度，而 k_v 、 C_1 與 C_2 分別為常數。利用該數學模式可準確的預測種子的壽命。但該模式只考慮到水分含量與貯藏溫度，其他可能的影響因子，如種子貯藏前的狀況與貯藏時氧氣含量並未考慮。Harrington (1973) 也提出簡單預測種子壽命的方法，他認為：(一)種子水分含量 (4-14%) 每降低 1%，種子壽命加倍；(二)貯藏之溫度 (0-50) 每降低 5 ，種子壽命加倍。

正儲型種子 (orthodox seeds) 為可乾燥、可冷凍儲藏的種子，例如綠豆、紅豆等。賈思勰齊民要術，卷一，收種篇：「凡五穀種子沍鬱則不生，生者亦尋死」沍者濕也，鬱乃熱氣，說明種子在高溫濕潤的環境下容易敗壞。到目前為止，我們所瞭解影響種子壽命的最大因素，還是沍鬱這兩個字。所謂「生者亦尋死」，應當指那些倖存的不正常幼苗，雖然發芽，但因其活勢 (vigour) 太弱，即使可發芽，也是不正常的幼苗，發芽後不久就死去之意。正儲型種子成熟採收之初，接近 100% 發芽率。固定不變的儲存條件下經過一段時間後，其活勢仍然維持很高的狀態，發芽率的降低相當緩慢。然後由某階段開始，發芽率的下降突然趨快，直到整批種子的發芽率相當低時，才又轉緩直到全部喪失生命為止 (下圖) (7)。



一般而言，儲藏條件越惡劣（即溫度越高或種子含水率越高），高活度的期間越短，發芽率下降的速度也越快。種子存活曲線（前圖中 a、b）很接近常態分布的反向累積頻率曲線，亦即表示種子族群在儲藏時間內的死亡頻率（前圖中 a、b，或者說壽命頻率）的分布亦是接近常態，也就是說一批種子中只有少數的種子壽命很短，也只有少數的種子壽命很長，種子壽命接近於平均值的最多。圖中的 \bar{n} 為平均壽命，在常態分布的狀況下，也代表發芽率由 100% 降到 50% 的儲藏時間。 σ 為死亡頻率分布的標準偏差，亦即發芽率由 50% 降到 15.9%（或 84.1% 降到 50%）所需的儲藏時間，因為這段時間所涵蓋的死亡頻率恰為 34.1% 常態分布的特性。

異儲型種子 (recalcitrant seeds)：乾燥後會喪失活勢的種子。許多熱帶果樹如芒果、蓮霧、荔枝、榴槤、可可椰子、波羅蜜；工藝作物如橡膠樹，以及栗、胡桃、榛等種子，經乾燥後發芽率皆會下降，皆是異儲型。齊民要術，卷四種栗篇：有關種子的注釋：「栗初熟時出殼，即於屋埋著濕土中，埋必深勿令凍徹。若路遠者以韋囊盛之；見風日則不復生矣」。這段文字對栗子不耐低溫、乾燥的特性，描述地十分清楚。

中間型種子 (intermediate seeds) 種子在 -20 下的壽命不超過一年，又若太乾燥，在 0 時的儲藏壽命反而不如在 15 的久。這些特性偏向於異儲型者；若種子含水率較高，而溫度也高於 0，則溫度越高儲藏壽命越短，這種特性又符合正儲型的特性，因此稱做中間型，木瓜、油棕、咖啡的種子屬之。

1.3 種子衰化 (Seed aging)

種子 aging 過程中，種子品質 (quality) 逐漸下降，其主要原因是受到貯藏溫度、貯藏環境相對濕度、種子本身組成及貯藏時間所影響。其造成的結果包括 DNA 的損傷造成發芽率的降低⁽⁸⁾，RNA 代謝過程發生變化⁽⁹⁾，改變種子蛋白質的生成代謝^(10,11)，降低發芽初期種子 polyA (+) RNA 的含量^(12,13,14)，細胞膜完整性降低導致種子滲漏 (leakage) 程度增加⁽¹⁵⁾，發芽初期乙烯的合成下降⁽¹⁶⁾，

脂質的過氧化作用造成種子惡化 (17)

種子 aging 被認為是降低種子 viability 和 vigour 的主要原因，包含退化性的累積造成種子惡化及發芽率降低 (18, 19)。影響種子壽命的主要的兩個環境因子包括溫度及種子本身的水份 (20)。以發芽率來測定種子 viability 為國際間公認的主要方法，然而發芽率試驗的主要限制是無法偵測高發芽率種子彼此間的品質差異。因此高發芽率種子，並不代表是高品質的種子，為何有這樣的差異呢？主要原因是在標準的發芽條件下，品質稍差的種子在良好的發芽環境下，仍可以維持高發芽率。一旦這些種子在較差的環境下發芽或是經由逆境 (stress) 處理後，高品質種子與品質較差的種子相較下，仍可維持較高的發芽率。

研究報告指出，相同品種之不同批次、年份種子，在理想的環境下有很高且相近的發芽率，一但置於田間試驗，或是長時間的儲藏，或是運送，種子發芽就有顯著的不同 (Table 1) (21)。

Table 1: Field, storage and transport performance of seed lots which germination data indicate are of similar quality

	Seed lots			
	1	2	3	4
Field-<i>Pisum sativum</i> L.¹				
Germination (%)	93	92	95	97
Field emergence (%)	84	71	68	82
Storage-<i>Trifolium pratense</i> L.²				
Germination before storage (%)	90	90	90	90
Germination after 12 month's storage (%)	71	90	66	89

Transport-*Bromus willdenowii* Kunth³.

	Seed lots			
	1	2	3	4
Germination before transport (%)	94	96	93	90
Germination after transport overseas (%)	87	19	74	53

¹adapted from data of Castillo et al. (1993)

²adapted from data of Wang and Hampton (1991)

³Hampton, unpublished.

如何在高發芽率種子間判定何者為高活力的種子，種子學家驗證的方法為 seed vigour testing。發芽率為測定種子之最大的發芽能力，其結果可以用來評估種子播灑於田間的種植效益^(22, 23, 97)，發芽率的測定在二方面很成功，一方面是重復性很高，而另一方面則是提供種子於理想環境下其發芽的能力之訊息。種子 aging 會導致發芽率的下降、胚軸 (axis) 不易突破種皮、對於不良的環境適應力下降、以及影響初生幼苗的生長⁽¹⁹⁾。因此有學者研究指出，當種子發芽率低於 90% 以下時，種子本身已經有惡化 (deterioration) 的情形發生⁽²⁴⁾。曾有報告指出實驗室發芽率低的黃豆種子，其在田間的發芽率也顯著的下降，二者間似乎有良好的相關性⁽²⁵⁾。然而在其他的學者研究卻發現，發芽率有明顯差異 (44~98%) 之豌豆 (garden pea)，其在田間之發芽率比較卻無明顯不同，因此在豌豆的實驗上，實驗室和田間發芽率試驗，二者無明顯相關⁽²⁴⁾。會造成以上差異的主要原因，是由於發芽率的試驗有其限制性，也就是當一群種子本身就有很高的發芽率時，我們無法以發芽率來評估個別種子品質上的不同。種子於自然與正常情形下有其一定的存活曲線，發芽曲線些微下降之種子，此時可能表示種子惡化情形已經很嚴重⁽²⁶⁾，在此情形下，學者利用種子內部活力 (seed vigour testing) 指標的建立，來判定種子品質。

1.4 種子活勢定義及觀念 (Definition and concept of seed vigour)

Seed vigour 並非只有使用單一指標來測定種子活力，而是藉由多源性指標來評估種子於儲藏、運送及田間的表現情況^(24,27,28)。依據 ISTA (International seed testing association) 對 seed vigour 之定義為”決定種子活力程度之所有表現特性，這些特性決定了種子活性程度、發芽率和發芽速率，其特性表現良好者稱為高活力種子”⁽¹⁵⁾。種子 vigour 檢測標準包括以下三方面：

1. 種子發芽率、發芽速率、及幼苗生長有無一致性。
2. 種子於田間生長情形有無一致性。
3. 種子於儲藏、運送後的表現，特別是保留種子之發芽能力有無一致。

種子惡化通常在成熟後便開始進行，並持續延續至採收、加工處理及儲藏過程，過程中會受到遺傳及環境因子的影響，種子惡化過程有階段性及連續性，其先後序列很難加以區分。然而導致種子惡化的主要原因被認為是細胞膜物理性及生理性的破壞^(19,21)；種子酵素；呼吸和荷爾蒙的改變；RNA 及蛋白質合成受損；損害遺傳物質；累積有毒代謝物質⁽³⁰⁾。此結果使得種子逐漸降低表現能力，包括降低發芽速率及發芽一致性、降低種子於逆境下的適應能力、影響幼苗的生長及表現⁽²¹⁾，逆境下除了影響植物的生長及表現外，並會影響作物的生長及產量^(19,21)。從圖一⁽¹⁹⁾我們可以發現，種子 vigour 的流失早於發芽率，因此高發芽率的種子，生理性年齡（種子惡化程度）亦有不同，種子因 vigour 不同，因此有不同表現情形。High vigour 種子與 low vigour 種子在理想環境下的發芽率也許差異不大，然而在逆境下，high vigour 種子有較好的表現能力。

高發芽率種子其 vigour 的狀態取決於儲藏環境，種子於儲藏過程中所遭遇的逆境（例如儲藏環境溫度上升或是濕度無法調控），會下降種子 vigour。而種子經由運送到不同地方，運送過程所遭遇到的環境變異（溫度、濕度嚴重變化），亦會下降種子 vigour。從 Table 1⁽²¹⁾我們可得知 high vigour 種子不管於田間種植、儲藏或運送過程對於逆境的耐受力，較 low vigour 種子為佳。

1.5 種子活勢測定 (Measuring seed vigour)

種子 vigour 測定法的困難度在於是否可以用量化的方式區別高發芽率種子群彼此間惡化的程度，其測定方法需符合簡便、有再現性及能夠描述種子於田間的實際播種結果或是種子本身的儲藏潛能 (storage potential)⁽¹⁶⁾。

過去四十年內，有許多測定 vigour 的方法被加以提出，但只有少數方法為國際間所通用，其主要原因是 vigour test 的再現性、靈敏度、種子適用性等變因會影響試驗本身的準確性⁽²¹⁾。然而種子 vigour 為種子品質之重要因子的觀念，已經被大多數人所接受。Vigour 試驗可區分為三類⁽²⁴⁾：

1. 以種子發芽現象為基礎。
2. 測量種子生理或生化指標。
3. 多樣性試驗程序。

第一類評估種子 vigour 的方法較為大眾所熟知，例如測量種子發芽速率、幼苗的生長和發育、低溫發芽試驗、加速 aging 試驗 (accelerated aging, AA) 及種子控制惡化試驗 (controlled deterioration, CD) 等⁽²¹⁾。這些 vigour 試驗法都有操作方便、數據再現性高等優點，廣為一般“種子測試”試驗室所採用，然而依據國際種子檢查協會 (ISTA) 標準，這些 vigour 試驗和種子實際在田間的種植，彼此間仍有差異性。依據 Hampton 和 Coolbear 綜合以上的 vigour 試驗發現以加速 aging 試驗和控制惡化試驗，對於種子 vigour 的評估有較佳的效果，其應用性可幫助瞭解播種潛力、儲藏及運送後的品質以及可以廣泛應用於農業、園藝及林業種子⁽³¹⁾。

第二類方法為測量種子生理或生化指標，最常使用的方法為電導度試驗 (conductivity test)^(83, 98) 和 tetrazolium 試驗 (TZ test)^(21, 96)。其他的試驗策略包括種子呼吸活力的測定、ATP 含量測定及穀氨酸去羧酶活性 (glutamic acid decarboxylase activity ; GADA) 的測定⁽³²⁾。除了電導度試驗具有方便、快速及滿足種子 vigour 試驗的需求外，其他方法仍有改良的空間。

第三類方法是為了更精確評估種子 vigour，研究學者採用超過一種以上的方

法來進行試驗，例如將豌豆 (*Pisum sativum* L.) 於田間的預期播種效益 (expected field emergence, E. F. E.) 列入計算，或是將小麥 (*Triticum aestivum* L.) 與玉米 (*Zea mays* L.) 置於不同之複雜逆境下分析種子 vigour，此外還必需考慮不同品種間的差異及不同環境下所收穫的種子⁽²⁴⁾。

以上的三類方法為依據 ISTA 針對種子 vigour 試驗所歸納的結果，這些 vigour 試驗本身並無強迫性，也就是種子間並無特定的方法來測定 vigour，然而其測定結果不僅可提供種子於播種及儲藏的活力指標，更能夠幫助我們區別不同種子群於內在及外在因子影響下，種子 vigour 表現效益。

1.6 衰化種子生理與生化的變化

種子收穫後，隨著儲藏期間增加造成種子活力逐漸降低，此種活力降低的過程稱之為種子衰化 (seed aging)。Bewley 和 Black 列舉種子因衰化所產生的惡化現象有以下幾個特徵，包括有種皮顏色發生變化、胚根延緩突出影響幼苗之生長、發芽率降低、對於不良環境的耐受力降低、不正常幼苗數目增多、對於輻射線敏感、衰化種子容易發霉並且於衰化過程中有熱的產生^(6, 33)。種子收穫後如果貯藏於不良環境下，往往製造出許多衰化或老化的種子，這些惡化結果造成種子活力下降，發芽率下降，導致幼苗存活的機率降低。除此之外，衰化或老化過程中，尚有下列現象：種子細胞膜受到氧族自由基或脂質過氧化作用而改變⁽³⁴⁾、DNA 引起變異或喪失完整性、蛋白質合成產物降低、代謝作用異常、細胞的微細構造發生改變⁽³⁵⁾。種子活力喪失則其應用價值降低，如何使種子在儲藏期間活力不喪失，是研究者想要瞭解之問題。

1.7 衰化種子發芽初期的變化

剛收穫之種子發芽快速，呼吸作用、ATP 之形成、各類 RNA 與蛋白質之合成於種子發芽後不久即開始進行。衰化種子之發芽較新鮮種子為慢，蛋白質與 RNA 之合成速率也低於新鮮種子⁽³⁶⁾，衰化種子其 DNA 開始複製的時間也延遲

(37)。衰化之大麥種子其糊粉層 α -amylase 之活性降低，其他酵素，如 protease、 β -amylase、phosphatase、catalase、peroxidase 與 dehydrogenase 等的活性亦會隨著衰化程度之增加而降低 (35)。

衰化種子發芽初期蛋白質合成能力降低，顯示種子衰化過程中會發生許多生化變化，這些變化可以由膜的間隔化消失；粒線體呼吸作用酵素、ATP 形成系統功能喪失；核糖體 rRNA 完整性消失；轉譯作用酵素 aminoacyl-tRNA synthetases、transfer enzyme I 與 II 功能喪失；細胞核 DNA 模版完整性喪失；轉錄作用能力喪失；無法合成 mRNA 以及長壽命 mRNA 功能降低。從微細構造層次來考慮，具有活力與衰化之種子間有明顯且一致的差異性。例如，死亡之黑麥種子其胚細胞內之粒線體外膜與破裂之內膜分離，細胞膜收縮與細胞壁分離，顯示細胞膜之半透性 (semi-permeability) 之特性受到破壞，核膜亦表現不正常與破裂。這些現象說明了種子衰化過程胚細胞之膜系統發生了明顯的變化。

衰化種子置於水中，細胞質內成分會滲漏到水中，這也顯示細胞膜之完整性喪失，其滲漏的程度會隨著衰化程度之增加而增加。雖然未衰化之種子亦會表現滲漏現象，然而新鮮種子之胚發芽時，此滲漏出之物質又可以經過主動運輸的方式被吸收到胚，由電子顯微鏡觀察之結果，顯示未衰化之種子於發芽初期能夠恢復膜之透過性，修補貯藏時膜完整性損壞之部分 (40, 41)。自由基與不飽和脂肪酸發生過氧化作用 (peroxidation) 造成膜完整性之喪失 (17, 82)。而自由基之形成亦可以由不飽和脂肪酸含量隨著衰化進行而降低得到證明 (17)，而衰化種子發芽能力降低之原因，即可能是由於其無法修補膜完整性損害之部份所造成。

衰化種子浸潤後呼吸作用下降與衰化種子粒線體膜完整性喪失有密切之因果關係 (38)。衰化種子發芽時，粒線體完整性之喪失不僅使呼吸速率下降，同時也使 ATP 之形成降低。而蛋白質之合成過程是需要利用 ATP，此可解釋為什麼衰化種子發芽初期蛋白質合成下降。通常衰化種子粒線體之脫氫酵素 (dehydrogenase) 活性下降 (21)。因此，脫氫酵素功能之喪失常用來做為檢定種子活力之依據。將種子浸於 1% 之 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 中，脫

氫酵素可使無色之 TTC 轉變為紅色之 formazan (42, 43), 而衰化種子因脫氫酵素活性降低, 因此將 TTC 轉為 formazan 的能力降低。由染色之深淺部位, 即可以得知種子衰化程度之大小。

黑麥種子衰化過程中已證實 rRNA 之完整性會喪失, 由不同衰化程度之種子中抽取 rRNA, 發現 18S rRNA 與 25S rRNA 被降解的程度, 隨著衰化程度之增加而增加 (1, 6)。98% 活力之種子其 rRNA 都沒被降解, 而活力低的種子其核糖體之 rRNA 已經被降解, 活力愈低, rRNA 被降解的程度愈大 (37)。rRNA 之降解主要是由於 RNase 持續作用的結果, 由於不同衰化程度之種子其 RNase 活性無差異, 因此, rRNA 之降解程度係決定於 rRNA 被 RNase 降解速率之大小。RNase 不同於脫氫酵素, 它在貯藏過程中之乾燥種子內非常穩定。由貯藏 103 年之小麥種子中抽取 RNase, 該酵素仍有活性 (39)。

理論上, 種子發芽初期在新的 mRNA 尚未合成時, 蛋白質是利用原有之 mRNA, 該 mRNA 在種子發育過程中合成, 種子脫水後該 mRNA 繼續存在種子內, 當種子吸水發芽時該 mRNA 恢復活性合成蛋白質。許多學者因而推測衰化種子中此長壽命 mRNA 可能受到損害而無法利用來合成蛋白質, 但是, 比較 0% 活力胚與 90% 活力胚之 poly A-rich mRNA 發現兩者都可以用來合成蛋白質 (39)。0% 活力胚之 poly A-rich mRNA 合成蛋白質的能力約為 90% 活力胚的 69% (39)。此外, 0% 活力胚之 poly A-rich mRNA 的分子量較低。這些結果顯示由於 poly A-rich mRNA 雖具有合成蛋白質的能力, 但其 poly A 分子變短, 因此合成蛋白質的能力降低。然而 0% 活力之種子根本不能合成蛋白質, 因此種子內原先存在的長壽命 mRNA 之功能喪失並不是唯一影響種子衰化之原因, 必定還有其他因子參與。

衰化過程中, 種子合成各類 RNA (包括 mRNA) 之能力下降 (36), 在黑麥種子的衰化過程中 31S rRNA (rRNA 之前身物) 修飾為 25S 與 18S rRNA 之速率下降, 0% 活力種子發芽初期所合成之 RNA 其分子量均比 4-5S 為小。此種小分子量 RNA 之合成原因很多, 其原因之一可能是由已斷裂的 DNA 做為模版而

合成。因此種子衰化過程中 DNA 之變化亦是有趣且重要的問題。黑麥種子胚細胞內每一個核所含之 DNA 總量在衰化過程中不會發生改變，然而衰化過程中 DNA 分子的完整性卻發生明顯的變化，高分子量 DNA 隨著衰化程度之增加而減少，且具有活力之種子其 DNA 平均分子量大於不具活力之種子⁽³⁷⁾。DNA 之斷裂可能使得作為模版之能力降低，同時進行錯誤的轉錄作用，會使得細胞無法合成蛋白質。由於衰化過程中 DNA 總量不變，因此 DNA 之斷裂很可能是由於 endodeoxyribonuclease 所引起。不具活力之黑麥胚 DNase 活性高於 95% 活力之種子⁽⁴⁴⁾。由於乾燥種子於貯藏過程或衰化期間不可能合成此種酵素，因此該酵素活性的增高，很可能是由原已存在之酵素經活性化產生。一些試驗結果也顯示，95% 活力之種子胚內含有 DNase 之抑制劑（該抑制劑對熱敏感），當種子活力消失時該抑制劑的活性消失⁽⁴⁵⁾。種子衰化過程中，斷裂的 DNA 不斷累積，從上述之討論可以推想，具有活力之種子含有穩定的 DNase 與該酵素之抑制劑。因此，DNase 之活性在發芽前無法表現。當種子衰化時，DNase 抑制劑喪失活性，因此，在吸水時 DNase 活性明顯的表現，再加上種子吸水後缺少 DNA 修補系統或修補酵素，因此 DNA 之完整性喪失。

種子成熟後，其活勢大小主要由儲藏環境的溫度、濕度及時間所控制，種子活勢流失愈少，發芽成幼苗的機率就愈大。在作物生產循環 (production cycle) 中，由種子發展成幼苗的過程，是一個重要的時期。欲獲得高發芽率和整齊的種苗，所用種子必需具成熟、充實及高活勢。不當的溫度、缺水等生長逆境，以及病原菌及蟲害，皆會影響發芽率及幼苗植相的建立。為了要得到最大的田間效益，種子在播種前必需經過一些處理，例如精選、萌爆、浸種及添加殺蟲劑、殺菌劑、植物生長調節劑、養份等等。正確的種子處理技術，確保其生產成本，尤其對於高經濟的園藝、作物種子，因而需要投注特別的種子處理技術來確保其投資及保證有最好的植株發育。一旦種子受到水份浸潤啟動發芽時，我們相信，決定種子”生 (viable)”或”死 (death)”的基因、酵素或相關因子便展開了激烈的拔河比賽，能夠幸存下來的幼苗，可能驅動了某些與活力有關的關鍵基因或酵素

之表現。

1.8 RNA 解旋酶的特性

解旋酶廣泛的存在於生物體內，從細菌到人類及許多的病毒都曾被發現，解旋酶包含有 RNA 解旋酶及 DNA 解旋酶，根據胺基酸序列相似性的比對分類，可將解旋酶分成三個大家族 (superfamilies, SF1~3) 及二個小家族 (families, F4, F5) (46)。其中 DEAD box protein 屬於 SF2, SF1 與 SF2 皆具有 7 個重要的 motif，與 RNA、ATP 的結合，及 ATP 的水解，RNA 的解旋活性有關。SF3 家族來自於小 DNA 及 RNA 病毒，只有 3 個保留區域 (conserved motifs)。F4 為 DnaB-like 蛋白質，包含有 5 個保留區域。F5 則以 DNA-RNA 解旋酶轉錄終止因子 Rho (transcription termination factor) 為代表。從序列上來看，SF1 與 SF2 具有 7 個相似的保留區域，和其餘 3 個家族的差異較大。若由解旋的方向來分類，則有 3' 5' 及 5' 3' 兩種方向，大部份 SF1 和 SF2 屬於 3' 5'，而 F4 和 F5 則多為 5' 3' 的解旋方向。

在 DNA 複製 (replication)、修復 (repair)、RNA 合成、剪裁 (splicing)、轉錄 (transcription) 及轉譯 (translation) 等過程中，雙股螺旋的 DNA 或 RNA 必須被解開成單股，方能進行以上的反應，解旋酶負責將雙股螺旋的 DNA 或 RNA 解開成單股的酵素。解旋酶最早在 1976 年被 Abdel-Monem 等人鑑定出來(47)。此類酵素解開雙股螺旋的時候需要以 NTP 的結合及水解作為能量來源，同時他們也能連續地在核酸長鍊上快速移動 (500~1000 bp/sec)，所以也被歸類為 motor protein (48)。具有功能的解旋酶的形式通常為寡聚合物 (oligomer) 或六聚合物 (49)。

1.9 RNA 解旋酶在生物體內扮演的角色

解旋酶除了有上述功能外，針對酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)，RNA 解旋酶更扮演了多元化的角色，包括參與 rRNA 的合成，pre-mRNA 的修飾，tRNA 的成熟，細胞核到細胞質的運送，RNA 代謝，如 Figure 1 (50) 所示：

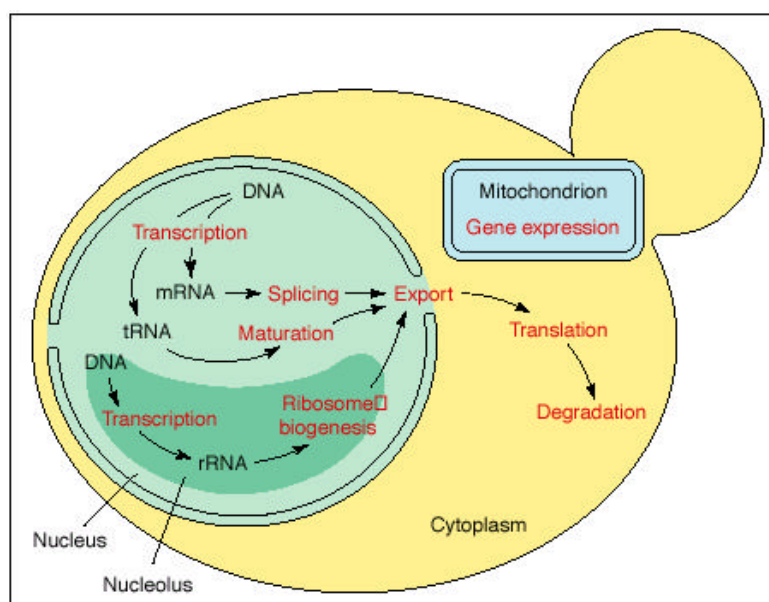


Figure 1
Cellular processes (shown in red) that require RNA helicases.

RNA 解旋酶能夠解開雙股 RNA 是來自於水解 NTP (nucleoside triphosphate)，特別是水解 ATP 以獲得能量來源。在大部份情形下，RNA 解旋酶其 ATPase 的活性是受到短鏈 RNA 所誘導產生。相對於 DNA 解旋酶而言，DNA 解旋酶一般是解旋較長、也較規則的雙股 DNA，而 RNA 解旋酶是經由單一步驟解旋較短之雙股 RNA，然而其詳細的作用機制及 RNA 解旋酶天然受質尚未被發現。

不同的 RNA 解旋酶在細胞內有其不同的功能及作用部位，RNA 解旋酶參與的功能包含有 (a) 核糖體合成，(b) 轉錄作用，(c) Pre-mRNA 修飾，(d) RNA 的成熟，(e) RNA 的運送，(f) 轉譯作用，(g) RNA 的分解 (52)。其中參與 translation 的 eIF4A 屬於 DEAD box protein family，具有 RNA 解旋酶核心區重要的 7 個 motif，這些 motif 與 ATPase 活性、解旋酶的活性以及與 RNA 結合有關。不同的 RNA 解旋酶其詳細的作用位置如 Figure 2 (51) 黃色標識處。

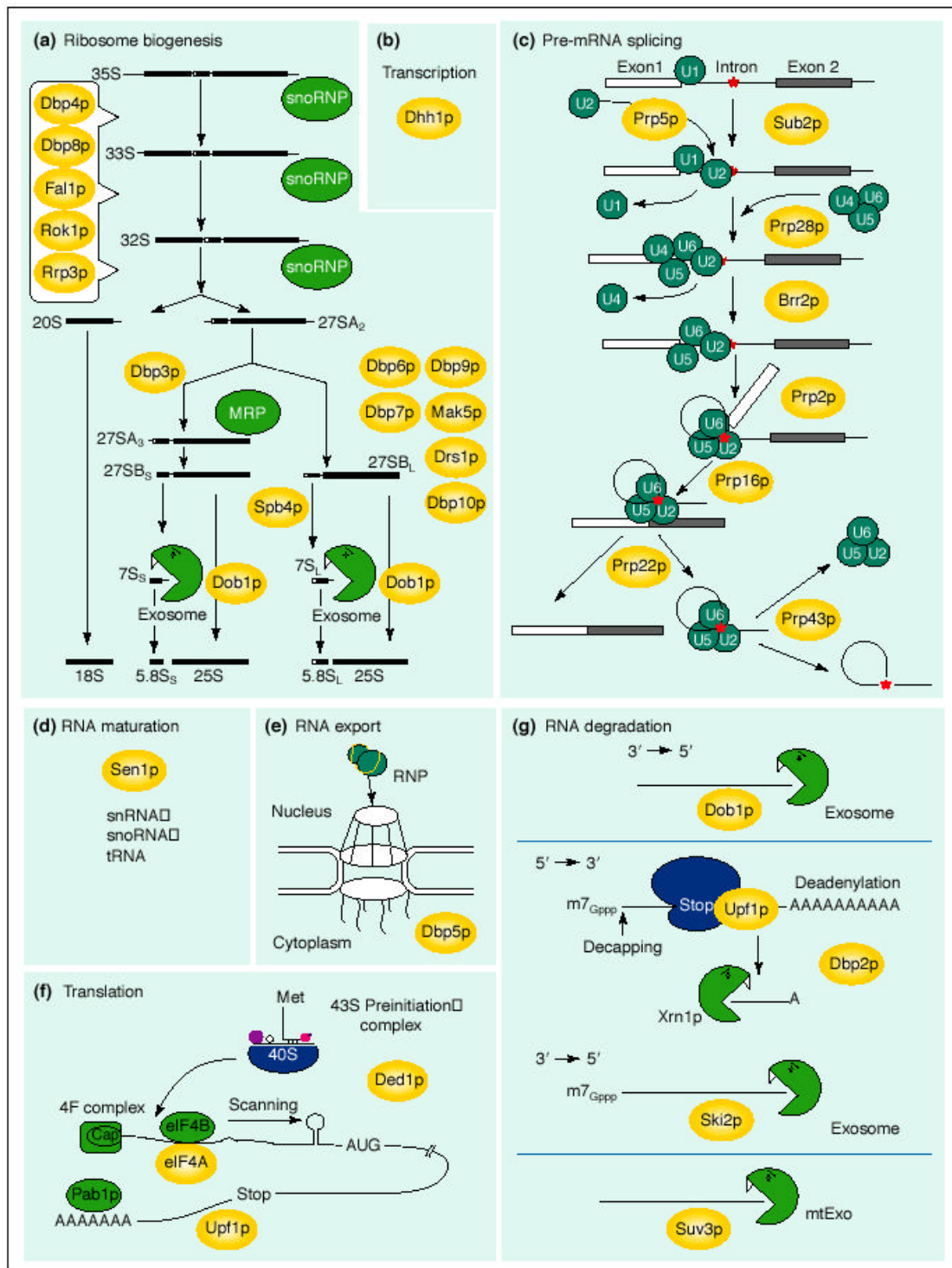


Figure 2
 The involvement of RNA helicases (shown in yellow) in the processes outlined in Fig. 1. (a) Ribosome biogenesis. (b) Transcription. (c) Pre-mRNA splicing. (d) RNA maturation. (e) RNA export. (f) Translation. (g) RNA degradation. Important non-helicase components are indicated in green or blue. MRP, RNase MRP; snoRNP, small nucleolar ribonucleoprotein; U1-U6, small nuclear RNAs.

RNA 解旋酶 參與的部位以黃色表示，整個輪廓圖如前頁 (Figure 1) 所示，(a) 核糖體合成，(b) 轉錄作用，(c) Pre-mRNA修飾，(d) RNA的成熟，(e) RNA的運送，(f) 轉譯作用，(g) RNA的分解。

1.10 RNA 解旋酶結構學方面的研究

解旋酶至今被解出的結構包括 *Bacillus stearothermophilus* 的 DNA 解旋酶, PcrA_(53, 54), *Escherichia coli* 的 DNA 解旋酶, Rep₍₅₁₎ 及 C 型肝炎病毒的 RNA 解旋酶, NS3_(35, 56, 57, 58), 前二者屬於 SF1, 而 NS3 則屬於 SF2, 這 3 個結構的結晶都是單元體。HCV NS3 解旋酶是 SF2 目前唯一結構被測定出來的, 其結構包含有 3 個 domains (1~3), 其中 domain 1、2 的胺基酸序列雖然沒有相似性, 但確有類似的結構相似性 (structural homology), 二者的核心部份都是由平行交疊的 β -sheet 所組成, 周圍包圍著數條 α -helices, 這樣的結構和 1992 年發表的 *E.coli* 的 DNA 重組蛋白 RecA 很相似₍₅₉₎, 所以稱為 RecA-like domain。Domain 3 則都是由 α -helice 所構成。

除了前述已解出的 PcrA (DNA 解旋酶) 及 HCV NS3 解旋酶 (RNA 解旋酶) 外, 對於細胞內 RNA 解旋酶的結構仍不清楚, 然而 DNA 解旋酶與 RNA 解旋酶因有結構的相似性, 因此二者解開雙股核酸的機制應該也很類似。HCV NS3 解旋酶有三個 domains, 組成 Y 字型, Domain 1 含有 NTPase I 與 NTPase II, Domain 2 包含 motif VI 其與 RNA 的作用有關, Domain 3 則無任何保留區。Domain 1 與 Domain II 由 motif III 如同絞鍊般將二個 motif 連在一起, motif III 容易彎曲, 使得 Domains I 與 II 能夠轉動₍₅₀₎。

從研究轉譯啟動子 eIF4A (DEAD-box-protein family) 發現, 當 ATP、RNA 與 eIF4A 結合後, Domain I 與 II 會使得 cleft 關閉, 而 ATP 經水解產生 ADP 後, 又使得 cleft 打開, 並且伴隨解開雙股核酸。因此藉由 eIF4a 結構上的改變, 影響了 RNA 與蛋白質或蛋白質與蛋白質之間的排列, 使得雙股 RNA 分子能夠解旋成單股。NS3 解旋酶核心, 其七個重要 motif 在蛋白質結構上的位置如下圖所示₍₅₀₎:

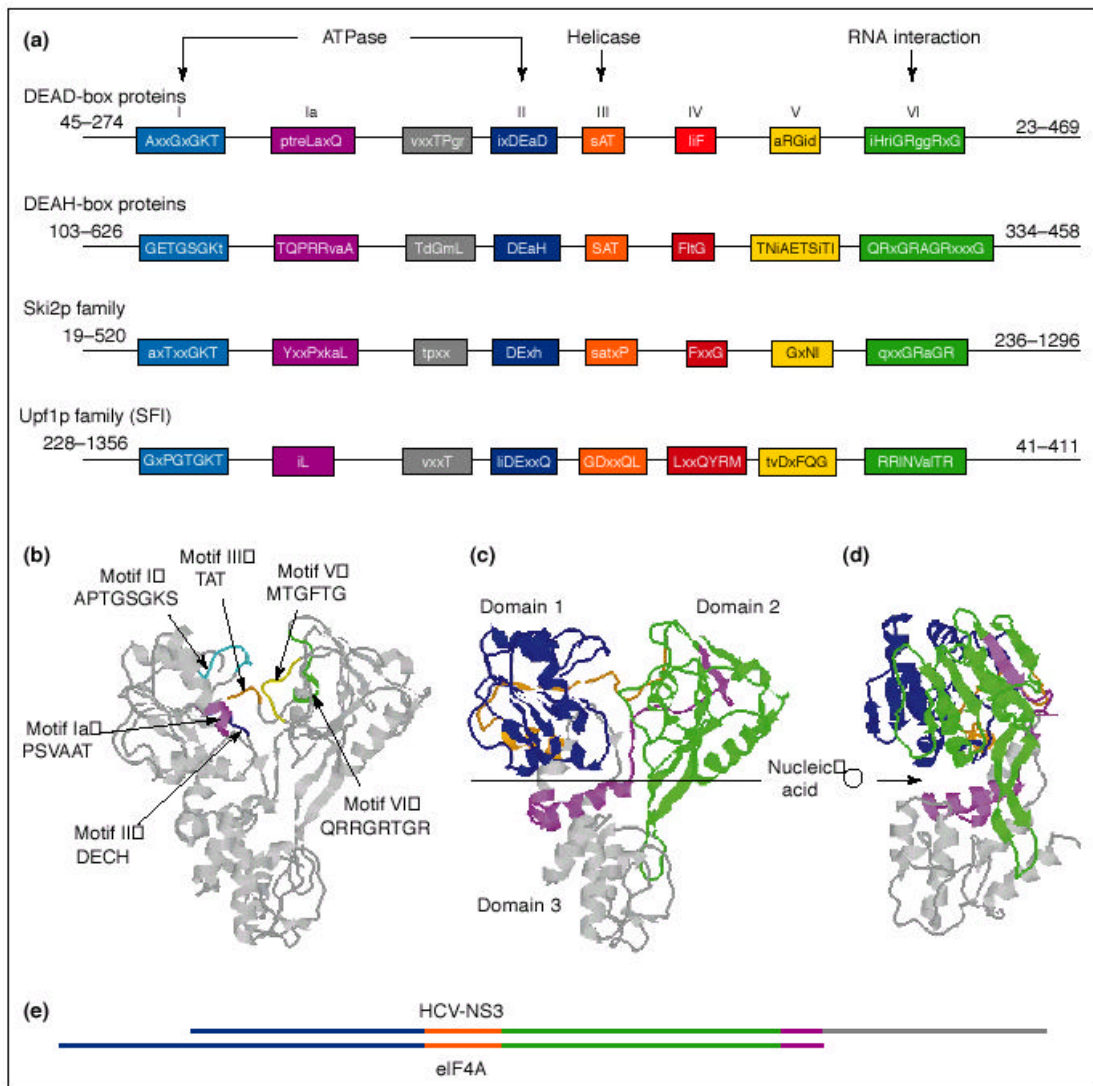


Figure 3

(a) The modular structure of the RNA-helicase core region, showing conserved motifs I, Ia, II, III, IV, V and VI (shown as coloured boxes) and proposed biochemical functions (established for the translation initiation factor eIF4A). Identical residues are indicated by capital letters; highly conserved residues (>50% occurrence) are indicated by lower case letters. The variable lengths of the N- and C-terminal extensions are indicated. The grey boxes represent a motif that is conserved in the DEAD-box proteins; the function of the motif is not known. (b-d) The HCV NS3 RNA helicase domain structure (PDB accession number 1HEI)⁸. Front (b,c) and side (d) views are shown. Domains are coloured as follows: blue, domain 1 (residues 6-120); orange, hinge region (residues 121-150); green, domain 2 (residues 151-290); magenta, domain 3 (residues 291-328); grey, domain 3 (residues 329-448). According to Kim *et al.*⁶, the ATP-binding site is constituted by residues from motifs I, II and VI, and ATP is bound in the cleft between the first two domains and the third. (e) Schematic alignment of HCV-NS3 RNA helicase and yeast eIF4A, coloured as in (c,d).

(J. de la Cruz., 1999, TIBS)

1.11 RNA 解旋酶可能作用機制的探討

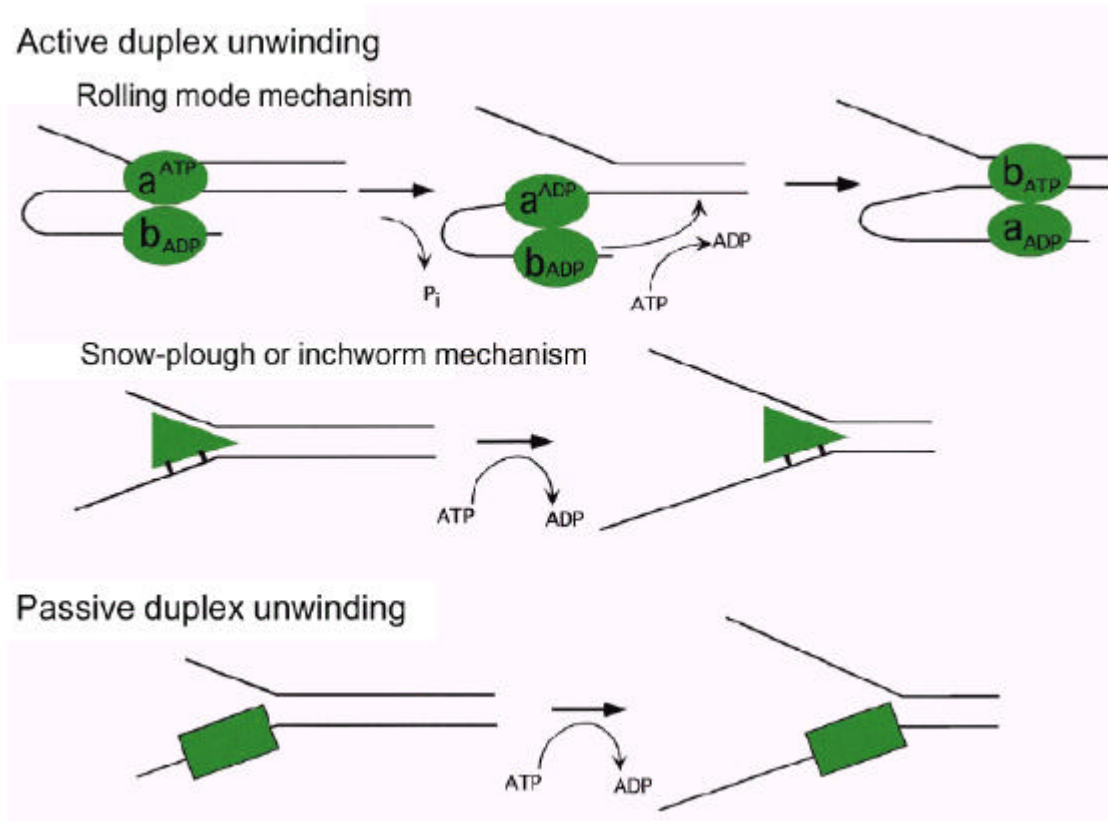
從文獻回顧可得知 RNA 解旋酶存在於所有的細胞生物和病毒基因組，對於各種 RNA 的生合成代謝扮演了重要的角色。解旋酶最早在 1976 年被 Abdel-Monem 發現後，研究者分別從細菌，酵母菌及病毒選殖到許多種類的解

旋酶。但是由於其種類繁多，又有許多不同的作用機制，其中又以 DEAD/DExH-box 這些蛋白質對於解開 RNA 螺旋構造，變成了熱門的研究題材。從 1996 年嗜熱脂肪芽孢桿菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 解讀出 DNA 解旋酶 - PcrA 之結構，1997 年解讀出大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 的 DNA 解旋酶 - Rep，1998 年解讀出屬於 RNA HCV NS3 解旋酶，我們對於解旋酶在生物體內所扮演的角色，才有一些可能的推測與探討。

權威期刊「自然」的姐妹刊物「自然結構生物學」最新的研究報告指出解旋酶可能的作用機制有”主動解開雙股”(Active duplex unwinding)”及被動解開雙股”(Passive duplex unwinding)”兩種可能的模式，Active duplex unwinding 又可分為”Rolling model mechanism”⁽⁶⁰⁾及”Snow-plough or inchworm mechanism”⁽⁵⁸⁾

在 active rolling model 需要解旋酶以多元體（至少為雙體）的行式方能進行。每一個次單元體 (subunit) 都具有和單、雙股螺旋結合的能力，但無法同時結合，並利用 NTP 結合及水解去調控每個次單元體對不同 DNA 的親和力。從下頁圖上可知寡聚合體解旋酶 交互結合在單股及雙股的核酸分子上，而 ATP 和蛋白質的結合體 (a^{ATP}) 和雙股核酸的結合能力很強，一旦水解變成 (a^{ADP})則與雙股核酸的結合能力減弱，此時 (b^{ADP}) 再藉由 ATP 的水解獲得磷酸根成為 (b^{ATP}) 結合上核酸分子，其過程如同滾輪般滾動，因而解開雙股 DNA。而在另一個 snow-plough model 不嚴格要求解旋酶為寡聚合體的形式，單體亦可，而且每個單體都能和單雙股螺旋同時結合，如同鏟雪機般在雙股螺旋上滑動，滑動的同時並解開雙股螺旋。從附圖圖中可知 RNA 解旋酶延著核酸開岔處，藉由 ATP 水解所獲得的能量把雙股核酸分子間的氫鍵打開，如同鏟雪般向內滑動。相對地，在 passive unwinding model 中，解旋酶會結合在單股核酸分子，藉由 ATP 水解供應能量向內移動打開雙股 RNA。

Active duplex unwinding 及 Passive duplex unwinding 兩種模式詳見下圖所示⁽⁵¹⁾：



1.12 RNA 解旋酶在植物學方面的研究

RNA 解旋酶廣泛分佈於各種生物體，在植物方面的研究包括煙草 (tobacco) (60, 61, 62, 63)、阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) (64, 65, 66, 67, 68) 和豌豆 (69, 70)。經由電腦軟體預測可得到為數眾多的“putative computer predicted helicases”，然而只有少數經實驗證明具有 ATP-dependent helicase activity，例如 human p68 (71)、rabbit reticulocyte eIF-4A (72)、PPVCI (73)、a DEAH box RNA helicase from HeLa cell (74)、vaccinia virus RNA helicase (75)、*Drosophila* vasa protein (76)、*E.coli* CsdA (77) and DbpA (78)、*Xenopus* xp54 (79) 和 An3 (80, 81)。

在植物方面具有活性的 RNA 解旋酶只有阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 *AtDRH1* (66) 和豌豆 (69, 70)，其在植物體內扮演的生物功能 (Biological function) 並不是很清楚。

II. 研究目地

- 2.1 綠豆品系選擇與種子加速衰化條件的建立
- 2.2 種子衰化指標的分析
- 2.3 mRNA 差異展現法
- 2.4 *VrRH1* 基因全長選殖、基因表現與酵素活性分析
- 2.5 *VrRH1* 生物功能之推測

2.1 綠豆品系選擇與種子加速衰化條件的建立

本實驗初期所使用的種子年份包括 92 年台南三號綠豆、94 年及 98 年台南五號綠豆。其中台南三號光皮綠豆，為育成台南五號粉質綠豆之父本，本實驗室因多年來專注於台南五號綠豆醣苷酶的研究，發現發芽初期的幼苗，至少有 13 種以上的醣苷酶會被誘發，大量表現於發芽後第 4~5 天。其後並完成 α -半乳糖苷酶異構酶的純化與生化功能的探討⁽⁸⁴⁾及基因的選殖。

三種不同年份種子其間隔最大年份雖達 6 年，但於實驗室理想狀況的發芽條件下，其發芽率幾近於 96~98%，但是種子間的發芽情況並非很整齊，因此引發我們研究的興趣，種子或是初期發芽幼苗間彼此的差異，是否存有差異的蛋白質及基因的表現？而這些差異因子的表現是否就是種子的活勢 (vigour) 因子？最後影響種子發芽率的總體表現。許多學者從 80 年代開始，利用蛋白質化學許多實驗利器 (例如：2-dimension gel electrophoresis)^(9, 10, 14) 企圖找尋發芽初期的相關蛋白質，並無很好的結果。本實驗室近年來由於由研究「抗豆象基因的選殖、基因表現及生物活性探討」⁽⁹⁵⁾，累積許多經驗，因此我們想分頭並進，分離出使得衰化幼苗可以繼續生長的蛋白質或是基因，以期進一步研究其生化、生理或是生物學上的功能。

為了拉大高活勢群種子 (high vigour seeds) 與低活力群種子 (low vigour seeds) 彼此間的差距，實驗室常用的方法為高溫 (40~50)、高濕法 (80~100% RH, relative humidity)⁽²¹⁾。我們選定 1994 年台南五號綠豆為材料，分別以室溫 (25)及高溫 (50)搭配不同的相對濕度處理種子，以瞭解種子於逆境處理後，發芽初期基因與蛋白質的表現。

2.2 種子衰化指標的分析

鑑定種子品質最常使用的方法為測定發芽率，其為活力指標 (viability index)；以及發芽速率，其為活勢指標 (vigour index)。種子衰化程度愈高，發芽率降低，種子發芽速率亦隨之降低，結果造成種子不發芽或不正長苗的增多。

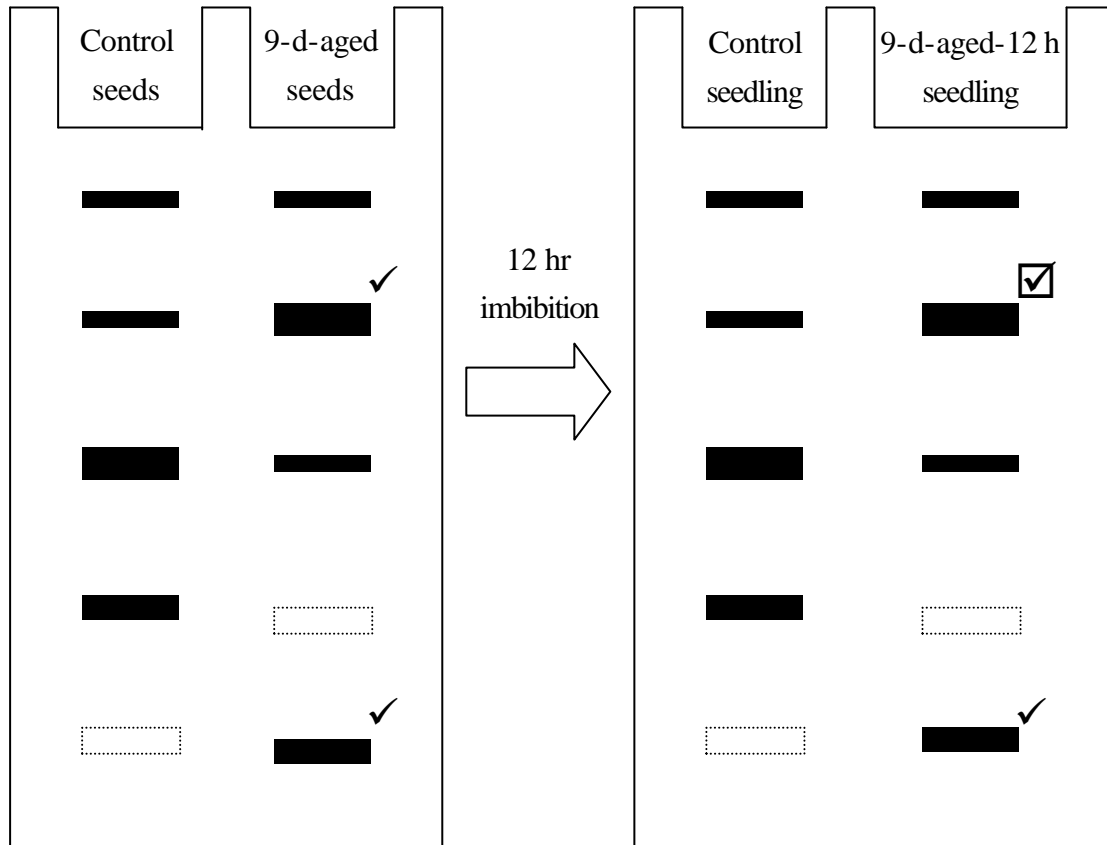
我們參考文獻⁽⁷⁾，選則正儲藏形種子常用的活勢指標分析，來分析綠豆種子於不同程度衰化情形下，種子 vigour 的大小。Vigour index 常用法包括有 tetrazolium chloride test (TTC 法)，其原理是當種子活力愈強，其去氫酶的活性愈高，因此可藉由已知的 TTC 染色圖譜，利用圖譜判讀不同批次種子活力比較，快速地篩選出活力強的種子群。另一類的活體染料是伊凡斯藍 (Evan's Blue)，因其只能進入死亡或受傷的細胞並染色，而細胞膜完整的細胞則阻止染料進入而保持未染色的狀態，常用來作為處理植物組織的活體染料。除了染色法外，另一個常用的指標為電導度法，種子衰化常導致細胞膜的不完整，細胞質滲漏到胞外的情形隨之提高，造成導電度的上升，可用電導度計加以測量。衰化種子評估指標，除了上述幾種作法，亦有學者利用不同衰化種子發芽初期，乙烯釋出量會隨著種子衰化程度的不同而有所不同來加以測定。本實驗則是觀察不同衰化程度下，種子於密閉試管內，乙烯釋放情形之分析。

2.3 mRNA 差異展現法

一般高等生物的細胞內約含有十萬個不同的基因，在全部生命過程的不同階段，只有 10~15% 的基因在個別的細胞中表現，若我們想要瞭解這些過程中有那一些基因被表現或關閉，依上述理論約有一萬到一萬五千種 mRNA，如何找到這些差異的基因呢？針對 RNA 這一層次一般人熟知的方法有 cDNA 扣除雜交法 (cDNA subtractive hybridization method) 或是 mRNA 差異展現法 (mRNA differential display method, DDRT-PCR)⁽⁸⁵⁾。我們採用 Sokolov 於 1994 年⁽⁸⁶⁾ 修飾 Liang & Pardee 的 DDRT-PCR⁽⁸⁵⁾，其方法為首先以 6 個寡核苷酸進行 RT-PCR，所合成之 cDNA 再以不同任意引子的搭配組合進行 PCR，最後以洋菜膠體電泳進行差異片斷的溶離⁽⁸⁶⁾。此方法無須使用放射性物質，能夠經由染色於洋菜膠體電泳找到明顯差異之 cDNA 片段，從文獻指出所得到的片斷幾乎都是 Northern 正相關，由於其 cDNA 量多、回收方便，可方便後續基因的選殖定序及分析。

本實驗為瞭解衰化種子與正常種子不發芽或是二者發芽初期，mRNA 的表現

是否有所不同？因此採用「mRNA 差異展現技術」篩選衰化 9 天種子 (9-d-aged seeds), 或是衰化 9 天種子可發芽、正常生長的幼苗 (9-d-aged-12 h seedling) 相較於正常種子 (Control seeds) 正常幼苗所誘導出之基因 (Control seedling), 經「mRNA 差異展現技術」後, 於 DNA 洋菜膠體電泳後之可能示意圖如下：



我們的目標是篩選處理衰化種子差異基因或衰化種子幼苗發芽初期差異的基因, 如上圖✓號所示, 而被篩選出之 *VrRH1* 基因如符號☑所示。

未浸潤前之正常與衰化種子, 從衰化種子選殖到許多 rRNA 片斷; 然而經浸潤 12 小時後, 從可存活的衰化幼苗, 除了篩得很多的 rRNA 片斷外, 我們幸運篩得一個 1.2 kb 之 RNA helicase 片斷外, 因此實驗焦點集中在正相關基因 - *VrRH1* (*Vigna radiata* RNA helicase 1) 全長基因序列的選殖及表現。

2.4 *VrRH1* 基因全長選殖、基因表現與酵素活性分析

為了瞭解篩選出之差異片段基因之功能為何? 首先必需選殖全長基因, 所採用的方法為 5' / 3' RACE 法, 其次對於基因全長的表現, 有許多蛋白質表現系統

提供使用者快速的純化方法，以本文所篩選到的基因 *VrRHI* 為例，1998 年於阿拉伯芥中已有日本 Okanami 等人成功地將所篩到的 RNA helicase-AtDRH1 構築入 pET-28(+)系統，並於大腸菌 (BL21/ DE3) 成功地加以表現及純化⁽⁶⁶⁾。我們修飾其蛋白質表現系統及純化流程，得到 *VrRHI* 基因表現的融合蛋白質”His-VrRH1”。

VrRHI 經 GCG 序列分析比對及活性分析後，證明屬於 DEAD box protein，屬於 RNA helicase SF2 (SF2, superfamily 2 之簡稱)，然而為數眾多的 RNA helicase 的推測序列，並不一定有酵素活性，為了研究從 *E. coli* 表現之 VrRH1 是否有 helicase 活性，我們以人工合成的雙股 RNA 基質 (ds RNA) 及 α [P³²]ATP 分析 VrRH1 helicase 活性及 ATPase 活性的分析。VrRH1 表現蛋白並且作為抗原免疫兔子，進行抗血清的製備。

2.5 VrRH1 生物功能之推測

除了證明 *VrRHI* 基因表現所得到的融合蛋白 His-VrRH1 是否有活性外，我們亦追蹤在活力高低種子、種子發芽初期以及不同部位，*VrRHI* 基因的表現情形。一般而言，種子為了抵抗惡劣的環境，外表通常有特殊的構造來保護種子，使其活力不至於喪失，如果當種子長期處於不適的環境中，特別是儲存於高溫、高濕的環境，便會造成種子 vigour 快速地喪失，一旦有合適的萌芽環境，雖然有水份浸潤啟動發芽，衰化嚴重、活力喪失到無法恢復的種子只有走向死亡一途；而活力喪失較少，能夠加以彌補的種子，雖遭受阻礙但終能長成幼苗。衰化種子為何仍能發芽？發芽後，植株生化、生理及外觀產生了何種變化？會不會影響到下一代的種子？一連串的疑問目前在種子方面的研究瞭解不是很多，如能深入加以研究，應該可以幫助對於衰化種子其活力的再回復，提供一條思考的途徑。

III. 材料與方法

3.1 種子加速衰化條件建立

3.2 種子含水率之測定

3.3 種子品質分析

3.4 mRNA 差異展現法

3.5 T-vector 選殖及定序

3.6 *VrRH1* cDNA 全長的選殖

3.7 *VrRH1* 基因的表現與純化

3.8 His-VrRH1 融合蛋白質活性分析

3.9 蛋白質分析方法

3.10 His-VrRH1 抗體製備

3.11 蛋白質電泳轉印

3.12 VrRH1 免疫組織定位

3.13 *VrRH1* 北方點墨法分析

3.14 原態 VrRH 純化

3.1 種子加速衰化條件建立

取置於 -20 貯藏之 1992、1994 和 1998 之台南五號綠豆種子 (*Vigna radiata* VC 3890 Sel #5) 進行加速衰化處理。處理條件為將種子置於塑膠材質培養皿上，以 50 粒綠豆為一組，進行四重複。不同年份樣品分別以室溫 (25) 或是高溫 (50) 處理，其環境相對濕度分別為 20% RH (relative humidity)、45% RH、79% RH 和 100% RH 直到 21 天。為了控制不同環境相對濕度，我們利用不同飽合度之硫酸銨置放於容器內來調整相對濕度的變化⁽⁸⁷⁾，並以濕度計來加以監測。衰化種子每三天進行取樣，進行種子發芽試驗及含水率測定。

3.2 種子含水率之測定

種子含水量的測定為參考國際種子檢查規則，採用低恆溫烘乾法⁽⁹²⁾，將綠豆樣品均勻分佈於容器表面，放入種子前後，容器和蓋子均應稱重，容器置蓋子上迅速放入溫度為 103 ± 2 的烘箱內烘乾 17 ± 1 小時。烘乾時間由烘箱溫度回升至所需溫度時算起，測定時室內周圍空氣的相對濕度須低於 70%。結果計算方法如下：

水分含量之重量百分比以下列公式計算至小數點一位：

$$(M_2 - M_3) \times \frac{100}{(M_2 - M_1)}$$

M_1 - 容器和蓋子的重量，以公克表示。

M_2 - 乾燥前容器、蓋子和內含物的重量，以公克表示。

M_3 - 乾燥後容器、蓋子和內含物的重量，以公克表示。

一個樣品的測定，取二重覆的算數平均值為其結果，若二者間的差異超過 0.2%，則另取二重覆重新測定

3.3 種子品質分析

3.3.1 發芽率測定

取 50 粒種子為一組，使用捲紙法進行四重覆之發芽實驗，以測定種子活力。方法為將種子平均散佈於拭手紙上，並將拭手紙捲成圓筒狀，置於夾鍊帶內，加入去離子水維持樣品濕潤，移入 28℃ 恆溫生長箱培養二天，由於幼苗胚軸伸長達 0.5 cm 以上者可繼續生長。因此我們以胚軸長度大於 0.5 cm 以上，作為判斷幼苗繼續生長的界線。

3.3.2 種子活勢測定

3.3.2.1 發芽速率之測定

取 50 粒種子為一組，使用捲紙法進行四重覆之發芽速率實驗，以測定種子活勢。其方法為不同衰化程度種子，浸潤 12 小時後，測量胚軸突出於種皮之長度。

3.3.2.2 Tetrazolium test

Tetrazolium (TZ) 試驗方法為配置 2,3,5-triphenyl tetrazolium 之氯化物或溴化物基質液，其方法為將定量的 tetrazolium 溶於 pH 7.0 之磷酸緩衝液內，配置成 1% (w/v) 使用^(21, 92, 96)。取 50 粒種子為一組進行四重覆實驗，種子樣品先以去離子水浸潤 6~8 小時，脫去種子外皮後浸潤於基質液中於 37℃ 避光反應 30 分鐘後，再以去離子水沖洗二次，每次 10 分鐘。

3.3.2.3 Evan's Blue test

Evan's Blue test 方法是利用生理食鹽水配置 0.25% (w/v) Evan's Blue 染色液⁽⁸⁸⁾。取 50 粒種子為一組進行四重覆實驗，種子樣品先以去離子水浸潤 6~8 小時後，脫去種子外皮後浸潤染色液中，於 25℃ 避光反應 30 分鐘後，再以去離子水沖洗二次，每次 10 分鐘。

3.3.2.4 電導度測定

電導度測定方法是將不同衰化處理之綠豆種子 50 顆，分別置於三角錐瓶內，再加入預冷的去離子水 250 ml，將樣品存放於 20℃ 生長箱內 24 小時後，以電導度計測量其導電度的變化，以分析不同程度的衰化種子，其離子滲漏的情形 (83)。

3.3.2.5 乙烯測定

乙烯含量的測定是將種子置於密閉的採血管內 (10 ml)，經由不同的衰化條件處理種子，以針筒抽取 1 ml 的氣體進行氣相層析分析 (Hitachi Ltd., Model 063) (89)。

3.4 mRNA 差異展現法

採用 Boris⁽⁹⁰⁾ 改良自 Liang⁽⁸⁵⁾ mRNA 差異展現技術，進行篩選與抗綠豆衰化相關的基因。必須以 mRNA 為材料，其概念仿自 DNA 的 RAPD (random amplified of polymorphic DNA)，實驗以 1~3 條 20~25 個核苷酸任意組合的寡核苷酸引子，利用 PCR 法分析經衰化處理與未處理綠豆或幼苗間，相關基因表現的差異。以 T 載體選殖有差異的 DNA 帶，經南方轉印及北方轉印的確認，可做為篩選與綠豆衰化有關基因的探針或是 3' / 5' RACE 之模板。

3.4.1 總 RNA 抽取

總 RNA 的抽取採用 hot phenol 法 (92)，其方法如下：

1. 綠豆樣品 4 g 以 20 ml 65℃ 預熱萃取溶液 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 100 mM LiCl / 100 mM EDTA, pH 8.0 / 1% SDS / 100 mM β -mercaptoethanol) 加入等體積 phenol，震盪 30 秒。
2. 將樣品置於 65℃ 水浴槽加熱 5 分鐘，間歇震盪，再加入 1/2 體積 chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1，震盪 1 分鐘後，15000 rpm 離心 20 分鐘。
3. 以 phenol / chloroform / isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1 再抽一次，震盪 1 分鐘後，

15000 rpm 離心 10 分鐘。

4. 加入等體積 chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1 , 震盪 1 分鐘後 , 15000 rpm 離心 5 分鐘以除去 phenol , 取上清。
5. 加入等體積 4 M LiCl 後 , 置於 -70 冰箱 1~2 hr 以幫助 RNA 沉澱。
6. 樣品以 15000 rpm 離心 30 分鐘 , 可得到白色 RNA 樣品沉澱於管底。
7. 取 10 ml 之 2 M LiCl 震盪懸濁 RNA , 15000 rpm 離心 10 分鐘。
8. 加入 5 ml 之 0.1% lauro-sarcosyl 震盪懸濁 RNA , 此時 RNA 溶於上清液中。
9. 取 ependoff 加入 1 ml 之 100% EtOH , 40 μ l 之醋酸溶液 (3M CH₃COONa, pH 4.3) 後 , 溶解之 RNA 平均加入 ependoff 內 , 置於 -70 冰箱過夜。
10. 4 , 14000 rpm 離心 15 分鐘後 , 可得白色 RNA 沉澱於管底。
11. 將上清去除 , 取 80% 酒精清洗白色 RNA 沉澱物 , 4 , 14000 rpm 離心 15 分鐘後真空抽氣凍乾。
12. 將 pellet 溶於 200 μ l 之 0.1% lauro-sarcosyl 置於 -70 備用 , 即可得到總 RNA。
13. 以分光光度計測其 A₂₆₀ / A₂₈₀ 比值應達 1.8~2.0 者表示該總 RNA 純度較佳 , 否則可以加作 1~2 次 phenol / chloroform (24:1) 與總 RNA 上層液等體積混合 , 除去蛋白質的污染。又每一 A₂₆₀ 的吸光值表示 RNA 濃度約為 40 μ g/ml。

3.4.2 訊息 RNA 的分離

訊息 RNA (mRNA) 具有 poly (A)⁺ tail 的特性 , 可用 Oligo-dT cellulose 從總 RNA 中分離 , 方法如下 :

1. 取 1 g Oligo (dT) cellulose , 通入 TES (10 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 1 mM EDTA , pH 8.0) 流洗 15 ml , 再以 15 ml LTES (10 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 1 mM EDTA, pH 8.0) 平衡。
2. 全部 RNA 約 5 mg , 65 加熱 10 分鐘 , 冰浴冷卻 , 並 12 M LiCl 調整 LiCl

濃度為 0.5 M。

3. 將 RNA 通入已平衡的管柱中，流出液再回加入管柱三次，使 poly (A)⁺ RNA 能完全結合於 Oligo (dT) Cellulose 上。
4. 以 15 ml LTES 流洗，以除去 poly (A)⁻ RNA。
5. 以 TES 沖提之 mRNA，每 0.4 ml 為一分劃，加入無水酒精 1 ml、醋酸溶液 (3 M CH₃COONa, pH 4.3)，40 μ l 混合後，置於 -70 30 分鐘後以幫助 mRNA 沉澱。
6. 14000 rpm 4 離心 30 分鐘後，將樣品以 70% 酒精清洗後，再以 14000 rpm 離心 10 分鐘。
7. 將樣品真空抽氣乾燥後，以緩衝液 (5 mM Tris-HCl, pH 7.5) 回溶，其純度應達 A₂₆₀ / A₂₈₀ > 2.0，定量法同總 RNA 定量法。
8. 所得之 mRNA 置 -70 貯存。

3.4.3 cDNA 合成

1. 將 mRNA 於使用前離心以除去不溶物。
2. 依下列方式製備 cDNA 合成反應液：

Component	Sample	No RT Control	Control RNA
1 to 5 μ g total RNA	n	n	-
Control RNA	-	-	1
Random hexamer	2	2	2
DEPC-treated water	10-n	10-n	9
Total	12	12	12

3. 於 70 反應十分鐘後，置於冰浴一分鐘。

4. 再製備以下反應液：

Component	Each Reaction (μ l)	4X Reaction (μ l)
-----------	--------------------------	------------------------

10X PCR buffer	2	8
25 mM MgCl ₂	2	8
10 mM dNTP mix	1	4
0.1 M DTT	2	8
Total	7	28

- 加入以上反應液 (7 μ l) 於 cDNA 合成反應液中，混合均勻並離心。
- 25 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘，每個 PCR 管中加入 1 μ l (200 units) SuperScript II RT 反轉錄酶，混合均勻並於 25 $^{\circ}$ C 反應十分鐘。
- 42 $^{\circ}$ C 反應 50 分鐘。
- 於 70 $^{\circ}$ C 反應 15 分鐘以終止反應進行，並將樣品置於冰浴冷卻。
- 每管加入 1 μ l RNase H 以除去 RNA，並於 37 $^{\circ}$ C 反應 20 分鐘。
- 將樣品置於 -20 $^{\circ}$ C 保存，此樣品為 mRNA 差異展現法所用之 cDNA pool。

3.4.4 mRNA 差異展現法

- 分別合成 C 組 (1994-T5 未衰化綠豆浸潤發芽 12 小時)，及 T 組 (標準衰化條件處理 9 天浸潤發芽 12 小時) 之 cDNA pool，二者加入經電腦比所得到的引子，以進行 PCR 反應。Primer 序列如下：

No	Name	Oligonucleotide sequence(s) 5' 3'	Total Base
1	Heat-Soy-F	AGGCTTCCATGGAAAATGGG	20
2	Heat-Soy-R	CGTGGCATCGCGTGGAGCGAAGC	23
3	Sen-Ara-F	GGCAGCTGCGGTTCAAAC	18
4	Sen-Ara-R	CATCGGACATCCGACTAGAG	20
5	Pro-Bra-F	GTCAAGCCGCTGTGGGACAG	20
6	Pro-Bra-R	TTTAACATTCATATCCATT	19
7	Pro-Soy-F	TCTGCTACAAACCCTGCAAG	20
8	Pro-Soy-R	GCTGTGATCTCTGCATGTGC	20

其中 No 1~2 為比對黃豆熱休克蛋白質之引子； No 3~4 為比對阿拉伯芥老化相關基因之引子；No 5~6 為比對青花菜蛋白質水解酶之引子；No 7~8 為比對黃豆蛋白質水解酶之引子。

2. 另一方面，我們亦以 OPERON 商業引子 (10 mers)，進行 mRNA 差異展現法，引子序列如下：

No	Name	Oligonucleotide sequence(s) 5' 3'	Total Base
1	OPA-01	CAGGCCCTTC	10
2	OPA-02	TGCCGAGCTG	10
3	OPA-03	AGTCAGCCAC	10
4	OPA-04	AATCGGGCTG	10
5	OPA-05	AGGGTGCTTG	10
6	OPA-06	GCTCCCTGAC	10
7	OPA-07	GAAACGGGTG	10
8	OPA-08	GTGACGTACG	10

3. mRNA 差異展現法所使用之 PCR 反應液，內含物如下：

Component	Control	Exp
10 X PCR buffer	5	5
25 mM MgCl ₂	3	3
2.5 mM dNTP mix	5	5
Glycerol	5	5
Primer (single)	1	1
<i>Taq</i> DNA polymerase	1	1
C-12-h cDNA	5	-
9-d-12-h cDNA	-	5
Autoclaved, distilled water	26	26
Total	50	50

4. 混合均勻，並滴入礦油覆蓋上層。

5. PCR 反應程式如以下所示：

程式一	94 反應 3 分鐘，40 反應 4 分鐘，72 反應 1 分鐘
程式二	94 反應 45 秒，40 反應 1 分鐘，72 反應 1 分鐘共進行 45 cycle
程式三	72 反應 10 分鐘

6. PCR 反應後產物以 1% 洋菜膠體電泳進行分析，切離膠體上有差異的片斷，進行膠體溶離，並加以回收。

3.4.5 DNA 片段之分離純化

1. 將 PCR 產物進行洋菜膠體電泳。
2. 差異之 DNA 片斷以小刀自洋菜膠體割下。
3. 膠體稱重後，加入 3 倍體積之 buffer QG (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) 後，置於 50 °C 水浴 10 分鐘。
4. 待膠體完全溶解後，將其加入 QIAquick spin column, 13000 rpm 離心 1 分鐘。
5. 倒掉濾液，加入 75 μ l buffer PE 至管柱中，13000 rpm 離心 1 分鐘。
6. 以 50 μ l buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) 或無菌水加入管柱中，室溫靜置 1 分鐘後，13000 rpm 離心 1 分鐘將 DNA 溶離。

3.5 T-vector 選殖及定序

1. 將膠體溶離所回收的片斷以 pGEM-T easy vector 進行連接。
2. 其方法為加入 1 μ l vector，3 μ l 回收 DNA，1 μ l ligase 及 5 μ l 10X ligation buffer 於 10 °C 反應過夜。
3. 取反應過夜的溶液 5 μ l，加入 100 μ l 已製備好的 DH5 α competent cell，置於 4 °C 冰上反應 1.5 小時。
4. 其後進行轉形作用，其方法是將樣品置於 60 °C 反應 90 秒後，再置於冰上 3 分鐘。
5. 取 1 ml LB 加入樣品內，於 37 °C 反應 1.5 小時。

6. 將反應後樣品均勻塗佈在 LB / Amp / X-gal 培養基上，37 隔夜培養，進行藍白篩選。
7. 挑選白色菌落，以專一性引子進行 colony PCR，colony PCR 反應，PCR 內含物如下：

Component	Volume (l)
10 X PCR buffer	2.5
25 mM MgCl ₂	2.5
2.5 mM dNTP mix	2.5
T-vector forward primer	0.5
T-vector reverse primer	0.5
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.5
Colony	-
Autoclaved, distilled water	16
Total	25

PCR 反應條件如下：

程式一	94 反應 3 分鐘
程式二	94 反應 1 分鐘，55 反應 1 分鐘，72 反應 1 分鐘共進行 35 cycle
程式三	72 反應 10 分鐘

8. 選取經 PCR 確認為正相關之菌株，抽取質體進行定序。
9. 定序後之 DNA 核酸序列以 GCG 進行序列分析比對。

3.6 *VrRH1* cDNA 全長的選殖

從 mRNA 差異展現法，我們可以得到 1.2 kb 差異片段，我們以 1.2 kb 為模板設計專一性引子，仿照 3' / 5' RACE 概念，選殖 1.2 kb 全長序列。本實驗採用的試劑組為 CapfinderTM PCR cDNA synthesis kit。

3.6.1 cDNA 合成

1. 加入 3 μ l mRNA (1 μ g poly A⁺ mRNA)、1 μ l CapSwitch II oligonucleotide 以及 1 μ l CDS / 3' primer 於離心管內，混合樣品後離心。
2. 樣品置於 72 $^{\circ}$ C 反應 2 分鐘後，置於 4 $^{\circ}$ C 冷卻 2 分鐘。
3. 將樣品快速離心後加入 2 μ l 5X first-strand buffer、1 μ l DTT (20 mM)、1 μ l dNTP (10 mM)及 1 μ l MMLV (200 units / μ l) 混合後離心。
4. 置於 42 $^{\circ}$ C 反應 1 小時後置於冰上終止反應。
5. First-strand cDNA 可保存於 -20 $^{\circ}$ C 達三個月。

3.6.2 LD PCR 放大 cDNA

1. 將 PCR 機器於 95 $^{\circ}$ C 預熱。
2. 將樣品置於預熱的 PCR 機器內，PCR 內含物如下：

Component	Volume (μ l)
First-strand cDNA	2
Deionized H ₂ O	80
10X KlenTaqnPCR buffer	10
DNTP mix	2
T-vector reverse primer	2
5' PCR primer	2
CDS/3' PCR primer	2
50X Advantage KlenTaq Polymerase Mix	2
Total	100

PCR 反應條件如下：

程式一	95 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘
程式二	95 $^{\circ}$ C 反應 15 秒，68 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘共進行 30 cycle
程式三	72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘

3. 取 5 μ l PCR 產物，以 1.1 % 洋菜膠體電泳進行分析，所合成 ds cDNA 需在 0.5~6 kb 形成模糊的亮帶，甚且大量表現的 mRNAs 會合成大量的 cDNA 而

形成明顯亮帶。

4. 所合成的雙股 cDNA 稱之為 cDNA pool，此 cDNA pool 作為選殖 *VrRH1* 5' 端及 *VrRH1* 3' 端，PCR 合成所使用之模板 (template)，合成之 cDNA 置於 -20 保存。

3.6.3 *VrRH1* 5' 端合成

我們取 1 μ l 已合成之 cDNA 進行 PCR 反應，合成 *VrRH1* 之 5' 端，其 PCR 內含物如下：

Component	Volume (μ l)
10 X PCR buffer	5
25 mM MgCl ₂	5
2.5 mM dNTP mix	5
5' PCR primer	1
<i>VrRH1</i> reverse primer	1
<i>Taq</i> DNA polymerase	1
cDNA template from CapFinder	1
Autoclaved, distilled water	31
Total	50

PCR 反應條件如下：

程式一	94 反應 3 分鐘
程式二	94 反應 1 分鐘，55 反應 1 分鐘，72 反應 1 分鐘共進行 35 cycle
程式三	72 反應 10 分鐘

3.6.3 *VrRH1* 3' 端合成

我們取 1 μ l 已合成之 cDNA 進行 PCR 反應，合成 *VrRH1* 之 3' 端，其 PCR 內含物如下：

Component	Volume (μ l)
10 X PCR buffer	5
25 mM MgCl ₂	5

2.5 mM dNTP mix	5
<i>VrRHI</i> forward primer	1
3' CDS primer	1
<i>Taq</i> DNA polymerase	1
cDNA template from CapFinder	1
Autoclaved, distilled water	31
Total	50

PCR 反應條件如下：

程式一	94 反應 3 分鐘
程式二	94 反應 1 分鐘, 65 反應 1 分鐘, 72 反應 1 分鐘共進行 35 cycle
程式三	72 反應 10 分鐘

3.6.4 *VrRHI* 全長合成

我們取 1 μ l 已合成之 cDNA 進行 PCR 反應，所使用的專一性引子為從 *VrRHI* 5' 端及 *VrRHI* 之 3' 端得之，其 PCR 內含物如下：

Component	Volume (μ l)
10 X PCR buffer	5
25 mM MgCl ₂	5
2.5 mM dNTP mix	5
<i>VrRHI</i> forward specific primer	1
<i>VrRHI</i> reverse specific primer	1
<i>Taq</i> DNA polymerase	1
cDNA template from	1
Autoclaved, distilled water	31
Total	50

PCR 反應條件如下：

程式一	94 反應 3 分鐘
程式二	94 反應 1 分鐘, 55 反應 1 分鐘, 72 反應 2 分鐘共進行 35 cycle
程式三	72 反應 10 分鐘

PCR 夾擊出之全長 *VrRHI* 基因，以 T-vector 選殖及定序，方法同前述，被殖入

T-vector 命名為 pVRH1。

3.7 VrRH1 基因的表現與純化

設計內含 *Eco* RI 及 *Not* I 引子夾擊 pVRH1，所得到的 PCR 產物再接入 T-vector 內，經養菌抽取質體分別以 *Eco* RI 及 *Not* I 將 insert 切出，此時 insert 因兩端含有 *Eco* RI 及 *Not* I 的限制酶切點，我們將表現載體 pET28b(+) 亦以相同的限制酶切出缺口，將 insert 與 pET28b(+) 進行接合，可得到 pSCEE3 的重組質體，操作過程中都分別以限制酶或 colony PCR 方法加以確認。

pSCEE3 經轉型作用送入 BL21 中，所得到的表現蛋白質命名為 His-VrRH1，His-VrRH1 因含有 His，因此可藉由鎳離子親合性管柱層析加以純化，我們將 His-VrRH1 蛋白質大量表現（養菌 1L），集菌溶於一倍的 binding buffer (5 mM imidazole / 500 mM NaCl / 20 mM Tris-HCl, pH7.5 / 1 mM PMSF)，以超音波破菌後加以純化，純化方法如下：

1. 取 5 ml 樹脂以重力沉澱均勻地充填在管柱內，以 15 ml 二次水沖洗樹脂，再加入 25 ml 50 mM NiSO₄，使鎳離子固定在樹脂上，最後以 15 ml 的 binding buffer (5 mM imidazole / 500 mM NaCl / 20 mM Tris-HCl, pH7.5) 平衡管柱。
2. 接著注入約 30 ml 經破菌後的可溶性蛋白質，管柱每分鐘流速為 0.5 ml。
3. 接著先後以 30 ml binding buffer 及 15 ml 的 washing buffer (30 mM imidazole / 200 mM NaCl / 20 mM Tris-HCl, pH7.5) 沖洗出與鎳離子樹脂非專一性的蛋白質，然後以 15 ml elution buffer (300 mM imidazole / 200 mM NaCl / 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) 沖提出專一接合在樹脂上的 His-VrRH1。
4. 純化過程皆以 UV 偵測器及自動收集器收集蛋白質。

3.8 His-VrRH1 融合蛋白質活性分析

His-VrRH1 活性分析法，我們是參考文獻製備雙股 RNA 來分析 His-VrRH1 其 helicase 活性⁽⁹³⁾。另一方面 ATPase 活性的分析我們參考 Jae-Young 分析

ROK1p, 其對於 ATP 水解活性的研究⁽⁹⁴⁾。

3.8.1 雙股 RNA 受質製備

1. 配置以下藥品, 以進行 *In vitro* transcription

	Cold (µl)	Hot (µl)
5X buffer	4	4
100 mM DTT	2	2
RNasin	0.5	0.5
pGEM3	1	-
pGEM4	-	1
AGU	-	4
AGUC (2.5 mM)	4	-
DEPC-H ₂ O	7.5	0.1
CTP (100µM)	-	2.4
Total	19	14

- 將上述樣品混合後, 於放射線室中先加入 5 µl *CTP 於 hot tube 中, 再分別加入 1 µl SP6 polymerase 於兩管中, 震盪離心, 總體積共 20 µl。
- 37 °C 反應 1.5 小時進行 *In vitro* transcription。
- 加入 1 µl DNase I, 37 °C 反應 15 分鐘。
- 加入等體積 phenol / chloroform / isoamyl alcohol = 25: 24: 1, 於兩管中, 震盪離心, 12000 rpm 5 分鐘。
- Chroma-spin 10 DEAE column 先以 2000 rpm 離心 3 分鐘, 去除 DEPC-H₂O 後, 保留去除液, 換新的載管後, 將前 4 步驟所得之上清液通入管柱中, 2000 rpm 離心 3 分鐘。
- 以 liquid scintillation analyzer 計算 hot RNA label 量, 方法如下:
 - 取 1 µl *CTP 以 ddH₂O 稀釋 100 倍後, 取 1 µl 滴於濾紙 (Watman GF/C filter paper) 上。
 - 將濾紙以鑷子置入含 3 ml cocktail (Nakalai) 之閃爍計數瓶內。
 - 以 PACKARD 2200CA β -counter, protocol card 向左靠齊, 按 F2 即可計

算 RNA 濃度，單管反應時間約 1 分鐘。

$$d. \text{ RNA 濃度} : \frac{\text{Hot value}}{\text{Control value}} \times \frac{1}{30000} \times \frac{15.4}{11} \times 10^6 = (n) \text{ fmol}/\mu\text{l}$$

8. Cold 股計算 RNA 量：

a. 以分光光度計計算 A_{260} 吸光值

$$b. \text{ RNA 濃度} : A_{260} \text{ 吸光值} \times 40 \times \text{稀釋倍數} \div 1000 \div (324.5 \times 104) \times 10^9 \\ = (n) \text{ fmol}/\mu\text{l}$$

9. Hot / Cold RNA 比例為 1/10，通常所製備的 hot/cold 等體積加入即可省去計算量，但必需留 1 μl hot RNA 為 control。

10. 將 19 μl 的 hot RNA 與 20 μl cold-RNA 加入 100 μl 之 2 X hybridization buffer (40 mM Herpes-KOH, pH 7.6 / 1 M NaCl / 2 mM EDTA / 0.2% SDS) 進行 hybridization。

11. 100 水浴加熱 10 分鐘後，置於燒杯中自然冷卻反應過夜。

12. 預鑄 8% (30:1) gel，其濃度如下：

40% Acryl / Bis (29:1)	5 ml
5 X TBE	2.5 ml
H ₂ O	17.3 ml
APS	175 μl
TEMED	8.75 μl
Total	25 ml

13. 鑄完膠後，其凝膠時間需 2 小時或是置放於室溫下，使其凝膠過夜。

3.8.2 雙股 RNA 受質製備 (continued)

1. 取第一天反應之樣品 200 μl ，加入 50 μl / 5X loading dye，平均 loading 於 well 內，另加入未 hybridization 之 hot-RNA 為控制組。
2. 以 1X TBE 電泳緩衝液，250 V 進行電泳 1.5 hr。
3. 膠體以 3 M 紙黏起，包上膠膜，剪刀剪去不需要部份，以 X 光片壓片 15 分

鐘。

4. 沖片後，將片子與膠片重合，用針頭於雙股 RNA 處戳 4 個孔，以刀片將膠體割下，置於 15 ml 離心管中，將其搗碎後，加入 3 ml elution buffer (0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{OAc}$, pH 7.0 / 0.1% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0)，緩慢震盪 2 小時待其 diffusion。
5. 加入等體積 phenol / chloroform / isoamyl alcohol = 25: 24: 1 於離心管中震盪一分鐘後，3000 rpm 離心 30 分鐘。
6. 取 8 管 1.5 ml ependoff，內含 0.7 ml 無水酒精，將步驟 5 所得之上清液平均加入 ependoff 中後，加入 1 μl glycogen 及 30 μl 幫助沉澱 RNA，置入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 30 分鐘。
7. 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpm 離心 15 分鐘後，可得白色 RNA 沉澱於管底。
8. 將上清去除，以 75% 酒精清洗 pellet，4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpm 離心 5 分鐘後，抽氣凍乾。
9. 上清溶於 30 μl 緩衝液 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.6) 中，計算雙股 RNA 數量。

3.8.2 RNA Helicase 活性分析法

取 0.5 μg 的 His-VrRH1 純化蛋白質於 20 μl 的反應混合液中 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.0 / 2 mM DTT / 1.5 mM MnCl_2 / 2.5 mM ATP / 0.1 mg/ml BSA / 2 units RNasin, 4.4 fmol 雙股 RNA)，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應 1 小時後，加入 5 μl 5 倍的 RNA loading dye (0.1 M Tris-HCl, pH 7.4 / 20 mM EDTA / 1% SDS / 0.1% bromophenol blue / 0.1% xylene cyanol / 50% glycerol)。取 10 μl 跑 8% native polyacrylamide gel，跑完膠後乾片並進行放射性顯影，顯影後之底片以 phosphorimager 計算活性。

3.8.3 ATPase 活性分析

取適當酵素量的 His-VrRH1 加入 1 μl $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 或 1 μl $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci / mmol; Amersham) 於 10 μl 反應液 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.0 / 2 mM DTT / 1.5

mM $MgCl_2$), 37 反應 15 分鐘後, 加入 0.5 ml 終止液 (500 mM EDTA) 停止反應。取出 1 ml 反應物點在 Silica gel 60 sheet 上, 以延展劑 (methyl nitril : H_2O = 80 : 20) 進行薄層分析 (Thin layer chromatography, TLC), 風乾後進行放射顯影, 顯影後之底片以 phosphoimager 計算活性。

3.9 蛋白質分析方法

3.9.1 蛋白質定量法

以 Bio-Rad protein Assay Dye Reagent Concentrate, 使用前先以去離子水稀釋 5 倍, 以 BSA 作標準曲線, 可偵測量為 1~20 µg/ml, 測得吸光值可得標準迴歸直線方程式。同樣地, 樣品蛋白質與試劑反應後吸光值, 內插標準迴歸直線可估量樣品含量。

3.9.2 原態膠體電泳法

電泳前先製備以下試劑:

A 液: 丙烯醯胺液 (T 30%, C 2.6%):

丙烯醯胺	29.2 g
<u>Bis</u>	<u>0.8 g</u>

加水至 100 ml。通常加入 5% (w / v) Dowex MR-3 攪拌過夜後再過濾, 以免不溶物干擾膠體凝結, 避光保存於 4 °C。

B 液: 4X 分離膠體緩衝液:

Tris (1.5 M)	90.8 g
<u>TEMED</u>	<u>1.8 ml</u>

300 ml 水溶解之, 以 HCl 調整 pH 值至 8.8, 加水至 500 ml。

C 液: 4X 焦集膠體緩衝液:

Tris (0.5 M)	6.0 g
--------------	-------

TEMED

0.4 ml

40 ml 水溶解之，以 HCl 調整 pH 值至 6.8，加水至 100 ml。

3. 10 % APS：取 0.1 g APS 溶於 1 ml 二次水中，4 保存。

4. 5X 通用電泳緩衝液：

Tris (450 mM) 54.5 g

Boric acid (400 mM) 24.8 g

EDTA.2Na (12.5 mM) 4.7 g

800 ml 水溶解之，以 HCl 調整 pH 值至 8.4，加水至 1000 ml。

5. 追蹤染料：Bromophenol blue 1mg 溶於 10 ml 50% (v/v) 甘油中。

6. 高分子量標準蛋白質組合：其分子量分別為 Thyroglobulin (669 kDa)、Ferritin (440 kDa)、Catalase (232 kDa)、Lactate dehydrogenase (140 kDa) 及 BSA (67 kDa)。

方法：

甲、鑄膠為五組電泳片組合，分離膠濃度為 7.5 % 及 10 %，焦集膠體為 4 %，其配方如下：

膠體 (%) 溶液 (ml)	分離膠體溶液		焦集膠體溶液 4 %
	7.5 %	10 %	
A 液	5	6.7	2.64
B 液	5	5	-
C 液	-	-	4.96
水	9.9	8.2	11.8
APS	0.1	0.1	0.4

總體積	20	20	20
-----	----	----	----

乙、電泳：將電泳片組合於電泳槽中，注入 1X 通用電泳緩衝液，每一電泳槽約須 150 ml，預跑 10 分鐘後，蛋白質樣品加入 2/5 體積的追蹤染料，以微量針筒注入樣品槽內，以 100 V 進行電泳，等追蹤染料進入分離膠體後，可調高電壓至 120 V。等追蹤染料跑出膠體後，停止電泳取出膠片進行染色。

3.9.3 SDS 膠體電泳法

電泳前先製備以下試劑

1. A 液、B 液、C 液、5 % APS、5X 通用電泳緩衝液及追蹤染料同前原態膠體電泳所述。

2. 2X SDS 膠體電泳樣品緩衝液：

Tris (250 mM)	54.5 g
β -mercaptoethanol (10 %)	10 ml
SDS (4 %)	24.8 g
<u>EDTA.2Na (4 mM)</u>	<u>4.7 g</u>

80 ml 水溶解之，以 HCl 調整 pH 值至 6.8，加水至 100 ml。

3. 10 % SDS 溶液。
4. 低分子量標準蛋白質組合：其分子量分別為 Phosphorylase b (94 kDa)、BSA (67 kDa)、Ovalbumin (43 kDa)、Carbonic anhydrase (30 kDa)、Trypsin inhibitor (20 kDa) 及 α -Lactalbumin (14.4 kDa)。

方法：

1. 鑄膠為五組電泳片組合，分離膠濃度為 10 % 及 12.5 %，焦集膠體為 4 %，其配方如下：

膠體 (%) 溶液 (ml)	分 離 膠 體 溶 液		焦集膠體溶液
	10 %	12.5 %	4 %
A 液	6.7	8.3	2.64
B 液	5	5	-
C 液	-	-	4.96
10 % SDS	0.2	0.2	0.2
水	8.2	6.6	11.8
APS	0.1	0.1	0.4
總體積	20	20	20

2. 電泳：將電泳片組合於電泳槽中，注入含 0.1 % SDS 溶液之 1X 通用電泳緩衝液，每一電泳槽約須 150 ml，預跑 10 分鐘後，蛋白質樣品加入 2/5 體積的追蹤染料，100 °C 水浴中加入 10 分鐘，置於冰浴中，以微量針筒注入樣品槽內，以 100 V 進行電泳，等追蹤染料進入分離膠體後，可調高電壓至 120 V。等追蹤染料跑出膠體後，停止電泳取出膠片進行染色。

3.9.4 CBR 染色法

使用 Bio-Safe™ Coomassie G250 (BIO-RAD) 染色，如為 SDS-PAGE，須先以去離子水浸潤膠體 10 分鐘二次，以減少 SDS 干擾。

3.10 His-VrRH1 抗體製備

將 His-VrRH1 經對透析液 (10 mM PB, pH 6.8) 隔夜透析後，取約 200 µg 蛋白量，以佐劑進行乳糜化後，以疫前試血不反應的兔子，25 及 28 號兔為免疫動物。疫前試血的方法為將純化的 His-VrRH1 以 dot blot 或是經 SDS-PAGE 後，進行蛋白質轉印至 PVDF 膜上，然後以一次抗體 (來自兔子血清)、二次抗體 (山羊抗兔血清，上連接以 alkaline phosphatase)，進行以 AP 系統之呈色反應。

3.11 蛋白質電泳轉印

3.11.1 轉印試劑製備：

1. 10X 通用電泳緩衝液及追蹤染料同前原態膠體電泳所述。

Tris (0.25 M)	90.86 g
Glycine (1.92 M)	288 g

1500 ml 水溶解之，以 HCl 調整 pH 值至 8.3，加水至 2000 ml。

2. 原態電泳膠片，則緩衝液稀釋 10 倍使用，如為 SDS-PAGE，則還須加入最終濃度為 10 % (v/v) 的甲醇，以避免小分子蛋白質的擴散。
3. 6 M 尿素 PBST：取 180 g 尿素加入 200 ml PBST 微波加熱溶解後，以 PBST 定量至 500 ml。
4. 100 % 甲醇。

方法：

1. 蛋白質樣品電泳後，膠片浸於 1X 轉印緩衝液中平衡 30 分鐘。
2. 取 PVDF 膜切成如同膠片大小，先以 100 % 甲醇浸 1~2 分鐘，再以去離子水沖洗，接著以去離子水沖洗後，以緩衝液平衡 15 分鐘。
3. 切如同膠片大小之濾紙，浸入緩衝液中，取卡夾組合多孔性海棉 - 濾紙 - 膠片 - PVDF 膜 - 多孔性海棉，中間不可有氣泡存在，將整個膠片卡夾裝好。
4. 膠片面朝負極，PVDF 膜在正極，40 mA 轉印過夜。
5. 來自於 SDS-PAGE 轉印者，則浸在尿素洗液中 1 小時褪去 SDS。來自於 Disc-PAGE 者則可進行免疫染色。

3.11.2 免疫染色法：

轉印到 PVDF 膜上的抗原可以用抗體與之結合後，再以 AP-2nd Ab 結合形成的酵素連結體，加入 AP 反應基質後進行呈色反應。

方法：

1. 將轉印膜以 PBST 清洗三次，每次十分鐘。
2. 加入 10 ml blocking buffer (TBST, 1% BSA) 反應 1 小時。
3. 以 20 ml 2X TBST (40 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 280 mM NaCl) 清洗轉印膜二次，每次 10 分鐘。
4. 取 10 ml blocking buffer, 加入 2 μ l (1:5000 稀釋) 一次抗體反應 1~2 小時。
5. 以 20 ml TBST 清洗轉印膜二次，每次 10 分鐘。
6. 取 10 ml blocking buffer, 加入 2 μ l (1:5000 稀釋) 二次抗體反應 1 小時。
7. 以 20 ml TBST 清洗轉印膜二次，每次 10 分鐘。
8. 10 ml 去離子水加入 SIGMA FASTTM BCIPNBT Buffered Substrate Tablet, 將清洗過的轉印膜浸潤，於室溫下進行呈色反應。

3.12 VrRH1 免疫組織定位

3.12.1 固定

將經過標準衰化處理 9 天之綠豆，於 28℃ 之恆溫生長箱中避光發芽 3 天後，分別將上胚軸、子葉、下胚軸在 1X PBS 緩衝液切下以手術刀切離，置入新鮮配置之固定液，並抽氣使組織沈入瓶底，放置 4 小時於冰箱過夜。再以 1X PBS 緩衝液清洗組織兩次，以 30% 到 100% 之酒精於室溫下進行一系列的組織脫水，分別進行 30 分鐘。接著換置新的 100% 酒精 1 小時後，利用 Histo-clean 以 1/3、2/3、3/3 比例分別每 1 小時加入與酒精作置換，最後靜置於 100 % Histo-clean 中，並 1 小時更換一次，共 3 次。

3.12.2 包埋

加入最後 Histo-clean 一半體積的臘片，於 42℃ 烘箱中放置過夜，待臘片溶解再加入新臘片並打開瓶蓋使組織中的 Histo-clean 揮發，提高烘箱溫度至 60℃，再加入臘片以提高組織中蠟之濃度，每天換三次，直到滲蠟完全。滲蠟完全之樣

品，最後將組織移入有溶蠟之模具，排列整齊後即可將模具移至室溫待其凝成蠟塊。

3.12.3 玻片製備

乾淨載玻片浸泡在 acetone 中 5 分鐘，取出，瀝乾；再浸入 VECTABOND (7 ml 加入 350 ml acetone) 5 分鐘，取出、瀝乾。最後浸入蒸餾水中 30 秒，取出、瀝乾後在室溫下晾乾，並將玻片放置在 37 °C 烘箱過夜，置於乾燥箱備用。

3.12.4 切片

將組織臘塊固定在蠟座上，並將蠟座固定於切片機上，調整切片機上的切片厚度為 7 μm ，進行連續切片。將合適長度之連續切片以 0.1% DEPC-H₂O 水滴及加熱板 (42 °C) 延展黏附在已製備好的 Vectabond 覆膜玻片上，於 42 °C 烘乾備用。

3.12.5 呈色反應

1. 填補 (Blocking) 作用：PBS 加入 1% BSA，室溫 30 min；以 PBS 清洗 1 min。
2. 一次抗體 (目標抗體)，以 200 X 濃度，浸潤組織室溫 60 min。
3. 以 PBS 清洗三次，每次 10 min。
4. 二次抗體 (anti-rabbit antibody: alkaline phosphatase conjugates)：1：2000 對 PBS 稀釋。
5. 再以 PBS 清洗三次，每次 10 min。
6. 以 AP buffer 平衡組織 2 min 後，加入 NBT/BCIP (88 μl NBT solution 及 68 μl BCIP solution 加入 AP buffer 至 20 ml) 基質反應液，避光反應 30-60 min。
7. 封膠、拍攝與影像處理。

3.13 VrRH1 北方點墨法分析

在進行北方點墨法前，需進行甲醛膠體電泳，其方法是配製 1.2% 甲醛洋菜膠 稱 0.78 克 agarose powder 加入 50 ml DEPC-H₂O，經微波加熱溶解後加 6.5 ml 10X running buffer (20 mM MOPS, pH 7.0 / 8 mM NaOAc / 1 mM EDTA) 及 1.95 ml 37% formaldehyde，加 DEPC-H₂O 至 65 ml。

將總 RNA (25 µg) 溶於 4.5 µl DEPC 水並於 65 °C 加熱 15 分鐘後置於冰上，再加 2 µl 10X running buffer (50% (v/v) glycerol / 1mM EDTA / 0.25% (w/v) bromophenol blue)，總體積為 22 µl，混合後載入 1.2% 甲醛洋菜膠，電泳進行至距膠底 1/3 處即可停止，以 ethidium bromide 染色 20 分鐘後，再以 DEPC 水退染。退染後之膠體於 254 nm UV 光下照相後，可進行北方點墨法分析 (90)。實驗過程應儘量避免 RNAase 的污染，以免 RNA 遭受分解。我們以 1.2 kb 部份或全長的 VrRH1 基因為模板，使用 Rediprime labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech)，以製備探針。經由 RNA 轉印後之膜以預雜交液 (Amersham Pharmacia Biotech)，於 65 °C 雜交過夜後，再以製備之探針於相同溫度下進行雜交反應。雜交完後之膜以 2 X SSC-0.1% SDS 於 65 °C 清洗 15 分鐘二次後，再以 0.2 X SSC-0.1% SDS 清洗 15 分鐘二次。最後將膜以濾紙吸去水份後，以感光版壓片 20 小時後，再以 phosphor imager (Molecular Dynamics) 分析。

3.15 原態 VrRH 純化

經過標準衰化處理 9 天之綠豆，於 28 °C 之恆溫生長箱中避光發芽 3 天後取上胚軸部份，置於研钵加入液態氮磨成粉末狀後，加入粗抽液 (50 mM Tris-HCl, pH7.5 / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA / 0.01% Triton-X100, 10 mM β-mercaptoethanol) 進行原態 VrRH 酵素萃取 (65)。粗抽液以 12000 rpm 離心 30

分鐘後，取上清液部份進行 0~40%、40%~60% 和 60%~80% 之硫酸銨分劃後，以陽離子交換管柱平衡緩衝液（10 mM Tris-HCl, pH 7.5）進行透析。

將透析完全之 40%~60% 硫酸銨分劃部份，通入陽離子交換管柱內，以起始緩衝液（10 mM Tris-HCl, pH 7.5）流洗，流速每分鐘 0.5 ml，每 3 ml 為一分劃，待流洗完全後，進行 0~1 M NaCl（以起始緩衝液溶解）直線梯度，高低各 50 ml。

整個純化圖如 Fig. 40 A 所示，圖中可分為 Peak I~IV，四群蛋白峰部份。分別將四個蛋白峰完全透析後，進行 ATPase 活性測定。具有 ATPase 活性之蛋白峰（Peak IV）^(Fig. 50)，另外與 His-VrRH1 表現蛋白進行免疫染色^(Fig 51)。

IV. 結果

- 4.1 種子加速衰化條件的建立
- 4.2 種子品質分析
- 4.3 mRNA 差異展現法篩選衰化種子存活幼苗相關之
cDNA
- 4.4 *VrRH1* cDNA 全長的選殖
- 4.5 *VrRH1* 表現載體構築
- 4.6 VrRH1 融合蛋白質的純化
- 4.7 His-VrRH1 的解旋酶活性分析
- 4.8 His-VrRH1 的 ATPase 活性分析
- 4.9 *VrRH1* 基因表現與種子活勢之關係
- 4.10 VrRH1 多源抗體免疫組織分析
- 4.11 天然 VrRH 蛋白質的純化

4.1 種子加速衰化條件的建立

評估種子活勢指標有許多種方法，其一便是”種子加速衰化法”，其原理是分層採樣不同樣品種子，以高溫、高濕加速種子衰化後，比較種子加速衰化後的發芽率來作為種子活勢 (Vigour) 指標依據。活勢高之種子者經加速衰化後，衰化程度低，發芽率明顯地較活勢低者為高^(21,25)。種子加速衰化的溫度通常為 40~50℃，濕度通常為 80% RH (relative humidity, RH) 以上。從 Fig. 1 得知，實驗以不同環境濕度，但較溫和的溫度 (25℃) 來加速種子衰化，環境相對濕度雖然從 33% RH 提高至 100% RH，種子發芽率並無明顯地下降。除了 100% RH 種子發芽率較低外，其他不同 RH 處理 15 天後之綠豆，仍可維持大於 90% 以上之發芽率。然而環境溫度一旦提高，種子發芽率就有明顯的下降 (Fig. 2)。三種不同年份的綠豆種子 (1992 年、1994 年和 1998 年) 未經加速衰化處理前，於實驗室理想發芽環境下，種子發芽率都很高 (96~98%)，以 1994 年台南五號綠豆為例，因種子本身並不容易衰化，因此我們選定以 50℃ 作為加速種子衰化的臨界溫度。從 Fig. 2 得知種子於 20% RH 經過 15 天的衰化處理，其發芽率幾乎無改變；當環境相對濕度提高至 45% RH 時，種子的發芽率開始下降，初期下降緩慢 (0~3 天)，中期下降快速 (3~12 天)，末期又趨於緩和 (12~15 天)，種子加速衰化後的發芽率曲線呈現 Sigmoidal curve (S curve)，類似正儲藏型種子於自然及人工加速衰化後種子發芽率曲線⁽⁸²⁾。當加速衰化濕度繼續提高至 79% RH 時，種子發芽率下降更為劇烈。從文獻得知高濕加速種子衰化，可能造成種子含水率提高，導致種子惡化、細胞壞死 (necrosis)，與正常種子的衰化有所不同⁽³⁾。為瞭解環境相對濕度對種子含水率的影響，我們將種子衰化溫度設定於 50℃，分別以 25% RH、45% RH 及 79% RH 進行種子加速衰化，種子含水率以 45% RH 處理時變化最少，其含水率約為 11.5%，但如果太乾 (20% RH) 或太濕 (79% RH) 環境濕度時，使得種子於加速衰化的過程中失水或吸水，因而影響種子含水率的變化 (Fig. 3)。濕度太高使得種子惡化情形嚴重，實驗末期甚且有發霉的情形產生，造成實驗變因控制複雜。我們以不同批的綠豆種子：1992 年台南 3 號 (1992-T3) 1994

年台南 5 號 (1994-T5) 和 1998 年台南 5 號 (1998-T5), 於 50 , 45% RH 加速種子衰化, 儲藏年份較久的 1992-T3 衰化較快; 1994-T5 次之; 1998-T5 再次之, 三者發芽率從 Fig. 4 得知皆呈現 S curve。三批種子於標準衰化條件下, 種子含水量的變化呈現恆定, 含水率以 1994-T5 為 11.5% 最高, 1992-T3 為 10.5% 次之, 1998-T5 為 9% 最低 (Fig. 5)。從以上結果得知於 45%RH 的環境濕度下, 不會影響種子含水率的改變。從 Fig. 4 中我們亦發現, 愈新鮮的種子 (1998-T5), 種子活力及活勢均高, 愈不容易衰化。為了便利實驗的進行, 我們選定 50 、 45% RH 作為標準衰化條件, 並且以 1994-T5 為實驗材料, 利用 mRNA 差異展現法選殖 9-d-12-h (標準衰化 9 天浸潤 12 小時發芽) 和 C-12-h (控制組種子浸潤 12 小時發芽), 發芽初期差異展現的基因。希望透過對於差異基因之進一步研究, 以瞭解經衰化處理後仍可發芽的幼苗, 可能存活下來的原因。

4.2 種子品質分析

不同年份種子 (1992-T3、1994-T5 和 1998-T5) 經標準衰化條件處理後, 由 Fig.4 得知發芽率的高低為: 1998-T5 > 1994-T5 > 1992-T3, 三組種子衰化後, 種子發芽率皆呈現 S 曲線, 年份較久的 1992 年綠豆, 因其種子活力低, 較容易衰化; 反之年份愈年輕之 1998 年種子, 種子活力愈高, 較不易衰化。

另一方面, 於標準條件下衰化 9 天之綠豆 (9-d) 與控制組綠豆 (C) 於 28 浸潤發芽 12 小時, 9-d-12-h 組發芽率為 37%, C-12-h 組發芽率為 98%。我們分別取二者可存活之幼苗 (胚軸大於 0.5 cm 以上為可存活幼苗), 移盆至溫室繼續生長, 二者外觀除了衰化幼苗生長初期植株較矮外, 都可以正常的生長和發育, 開花與結實。整個生長週期冬季約 3 個月, 夏季約 2.5 月。採收二者種子於標準條件下衰化 3 個月, 從 Fig. 6 得知, 9-d-12-h 可存活幼苗, 經過 2.5~3 個月生長後所產生的第一代種子, 相較於控制組植株所產生後代, 其種子有較高之發芽率。

以 1994-T5 為例, 種子於標準條件下衰化 0~15 天後, 置於 28 生長箱進行發芽試驗時, 相同的時間內, 未衰化種子, 種子發芽速率快且較整齊; 衰化程度

高之種子，發芽速率慢，不正常、矮小或是胚軸無法突出種皮的數目增多，從實驗記錄得知，胚軸長度大於 0.5 公分以上之正常或衰化幼苗，皆可以繼續正常生長，繁殖後代。

活細胞內的去氫酵素會將無色的 TTC (2, 3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 還原為紅色的 triphenyl formazan，後者無法通過細胞膜，而死細胞內因缺乏去氫酵素，因此不會進行 TTC 的還原。活細胞經呈色反應後，生成紅色 formazan 不會滲透到死細胞，因此可以清楚判別那些是活細胞？以及那些是死的細胞。未衰化處理之綠豆，種子活勢較高，胚軸經由 TTC 染成紅色(Fig. 7)；衰化程度嚴重的種子，種子活勢弱，胚軸 TTC 無法染色為共同的特徵(Fig. 7)。9-d-12-h 幼苗，活勢強的種子胚軸突出較長、TTC 染色較紅；反觀活勢較弱者，胚軸突出長度較短或根本無法突破種皮、胚軸呈現白色(Fig. 9)。

Evan's blue 只能進入死亡或受傷的細胞並染色，可以用來檢驗細胞死亡數目多寡及判別細胞膜的完整性。活細胞因有完整的細胞膜，能阻止染料進入而保持細胞未染色的狀態(Fig. 9A)，1994-T5 綠豆以標準衰化條件處理 15 天後，種子才有明顯的染色情形發生(Fig. 9B)。C-12-h 幼苗，胚軸長度平均較 9-d-12-h 幼苗為長，然而其子葉與胚軸的 Evan's blue 染色並沒有顯著的差異(Fig. 10,11)，TTC 染色也無法加以區別 (結果未表)。從以上結果得知，種子於標準條件下加速衰化，種子溫和的衰化，因此從外觀上細胞死亡並不明顯。

電導度實驗結果發現，綠豆於標準衰化條件下經過不同天數衰化處理，使得細胞膜的不完整，造成種子離子滲漏 (leakage) 增加，不同年份種子電導度隨著衰化天數的增長而增加，以 1992-T3 增加最多，1994-T5 次之，而 1998-T5 離子滲漏最少 (Fig. 12)。從 Fig. 4 與 Fig. 14 得知，種子發芽率隨著離子滲漏度的提高而下降，原因為加速衰化造成種子細胞膜不完整，造成種子發芽初期滲漏物質無法再回收，導致發芽率下降。當實驗以 25 /45% RH 進行衰化時，三批種子間之離子滲漏度，並沒有顯著的差別(Fig. 12)。

乙烯對於果實的后熟，葉片、花朵的老化關係密切，因此在加速衰化處理過

程中，種子乙烯含量變化為何？亦是值得觀察的問題。綠豆於標準衰化條件下以不同天數處理，乙烯生成量隨著衰化天數的增加而提高。其中以 1992-T3 乙烯的釋出量最高，1994-T5 次之，1998-T5 最少 (Fig. 13)。乙烯生成量多者，種子發芽率顯著下降，內生性乙烯釋出增加與種子衰化度提高，二者似乎有所相關。當實驗以 25 /45% RH 進行衰化時，三批種子間乙烯釋出量並沒有顯著的差異 (Fig. 13)。

4.3 mRNA 差異展現法篩選衰化種子存活幼苗相關之 cDNA

mRNA 差異展現法的成敗在於能否抽取高品質之 RNA，RNA 品質如果不好，往往影響後續實驗的進行。種子以標準衰化條件處理 0~15 天後，無論有無 12 小時的浸潤處理，綠豆 RNA 均會有降解的情形產生，並且隨著衰化時間愈長降解愈嚴重 (Fig. 14, 15)。進行 mRNA 差異展現法時，首先由 GCG 比對設計可能的核苷酸引子 (P-1~P-8)，再分別抽取 C-12-h 組 (C) 與 9-d-12-h (T) 組之總 RNA，分離 mRNA 為模版合成 cDNA，再以 cDNA 為模板進行 PCR 後，以 1.2% 洋菜膠體電泳分析差異表現之 mRNA。實驗結果於 T 組，以 P-7 引子進行 PCR 後，於洋菜膠體電泳 1.2 kb 處發現有明顯的差異亮帶 (Fig. 16)，實驗以同樣的 cDNA 為模版，配合不同的商業引子 L1~L20 共 20 組進行 mRNA 差異展現，篩選出之差異片斷多為 rRNA 片段 (結果未表)。將 1.2 kb 從膠體溶離出來，接合至 pGEM-T vector，轉型至 competent cell (DH 5⁺) 培養 2 小時後，塗抹於含 ampicillin 之 LB 培養皿 (表層含有 X-gal 及 IPTG) 隔夜培養，分別以藍白篩選挑菌，並以 colony PCR 篩選正相關株 (Fig. 21)，以進行定序分析。

1.2 kb 經 NCBI Web site 序列分析比對後與菠菜 RNA 解旋酶序列比對於 833 bp 中有 72% identity，RNA 解旋酶於 1997 年最早由德國 Lorkovic 等人從阿拉伯芥與菠菜中加以選殖其 cDNA₍₆₅₎，1998 年日本 Okanami 等人首先自阿拉伯芥選殖 RNA 解旋酶 cDNA，並表現出具有活性之 RNA 解旋酶重組蛋白質₍₆₆₎。

4.4 VrRHI cDNA 全長的選殖

上述選殖之 1.2 kb 片段，經由 Northern 確定為正相關後，後續進行基因全長的選殖與定序。以 1.2 kb 片段為模版，進行 5' /3' RACE 法後可得到全長 cDNA，送至 NCBI 序列分析比對，屬於新發現的 RNA 解旋酶，命名為 *VrRHI* (*Vigna radiata* RNA helicase 1)₍₁₀₀₎。 *VrRHI* 轉譯胺基酸序列與阿拉伯芥及菠菜之 RNA 解旋酶比對相似性最高，都有 71% (380/533) 胺基酸相同_(Fig. 18)，其中七個高度保留區中的除了 motif IV 有所差別外，其餘六個 motifs 皆相同。而 *VrRH1* 胺基酸序列，其 motif IV 與菠菜相似度較高。從胺基酸序列比對亦發現，*VrRH1* N 端序列變化較 C 端為大，N 端序列並有類似阿拉伯芥 *PRH75* 蛋白質之 nuclear localization sequence (NLS) 特殊序列。

將 *VrRHI* 送至 NCBI 以 BLAST 進行核苷酸序列比對，可以發現和許多物種的 RNA 解旋酶都有很高的相似性_(Fig. 18)，*VrRH1* 胺基酸序列分析比對與阿拉伯芥及菠菜 RNA 解旋酶有 71% 一致性_(Fig. 18)，*VrRHI* 基因全長為 2139 bp，可轉譯出 713 個胺基酸，pI 推測為 9.9，二級結構的推測有三個醣基化修飾位置。

4.5 *VrRHI* 表現載體構築

將全長 *VrRHI* 選殖入 T-Vector 後，設計含 *Eco RI* 與 *Not I* 限制酶切點於 *VrRHI* 兩端，經由 PCR 後得到具有二個切點之 *VrRHI*，命名為 *VrRHEN*。先將 *VrRHEN* 送至 T-vector 後，經由大量培養後再以 *Eco RI* 與 *Not I* 限制酶切出 *VrRHEN* 後，與經由 *Eco RI* 與 *Not I* 限制酶切出缺口之 pET-28b(+) 進行接合反應，*VrRH1* 所得到的蛋白質表現載體稱為 *pSCEE3*，整個 *VrRHI* 表現載體構築流程如 Fig. 19 所示。

4.6 *VrRH1* 融合蛋白質的純化

抽取 *pSCEE3* 質體，經由轉型作用送入宿主細胞 BL21(DL3) 內進行最適表現條件的探討，我們選定 37、30 及 25 搭配不同濃度 IPTG (1 mM~0.0625 mM)，進行最適表現探討及 12.5% SDS-PAGE 進行蛋白質電泳檢定，結果各組

間並無明顯蛋白質色帶變化(結果未表)。因此我們參考文獻 RNA 解旋酶蛋白質的表現條件⁽⁶⁶⁾，將菌種培養於 LB (含 50 ug/ml karamycin)，37 培養 OD₆₀₀ 約 0.5，加入 IPTG 使最終濃度為 1mM 誘導 3 小時後，離心集菌、超音波破菌以 0.45 μm 膜過濾後進行管柱層析。

VrRH1 所構築之表現融合蛋白質因含有 His，命名為 His-VrRH1，可使用鎳離子親和性管柱層析法加以純化，不同純度之 His-VrRH1 與 SDS-PAGE 電泳檢定如 Fig. 20 所示。實驗得到的 His-VrRH1 似乎有降解的情形發生，從實驗結果發現，VrRH1 原態分子量約 77.6 kDa，純度越高的蛋白質，可能發生自我分解產生較小的片斷，如果以含 gelatin 的原態電泳進行分析，其分解 gelatin 的情形不明顯，但如果以 dot blot 檢測，純度較高之 His-VrRH1 分解 gelatin 情形較顯著(Fig. 21)。

4.7 His-VrRH1 的解旋酶活性分析

我們從台大醫學院黃麗華老師得到 pGEM4 與 pGEM3 vector，分別以 Xba I 及 Pvu II 兩種限制酶切成 linear form 以進行 in vitro transcription，分別製造出 41 nt (hot strain) 與 104 nt (cold strain) 兩種長度之 RNA，hot strain 加入[α-³²P]CTP 標幟之，這兩種 RNA 有 34 個核苷酸互補序列(Fig. 22)。我們以鎳離子親和性管柱層析純化 VrRH1 基因表現之融合 His-VrRH1，於不同 imidazole 沖提之蛋白質，加入已製備的雙股 RNA 基質進行反應，實驗結果為純度較高的 His-VrRH1 可以將雙股 RNA 解旋成單股，證明 His-VrRH1 具有解旋雙股 RNA (ds RNA) 成為單股 RNA (ss RNA) 的能力(Fig. 23)。以不同 (d)NTP 進行解螺旋反應時，只有 ATP 與 dATP 可以幫助解旋 ds RNA 成為 ss RNA (Fig. 24)。另外以不同酵素量反應 30 分鐘 (Fig. 25 A)，以及相同酵素量 (160 ng) 於不同反應時間進行酵素反應 (Fig. 25 B)，其結果均證明 His-VrRH1 具有解旋雙股 RNA 基質的能力。

4.8 His-VrRH1 的 ATPase 活性分析

根據文獻，具有解旋能力之 RNA 解旋酶，多數需由水解 ATP 作為能量的來源，從 Fig. 24 得知，His-VrRH1 解旋 ds RNA 時，可水解 ATP 或 dATP 得到能量。經由不同純化步驟所得到的 His-VrRH1，具有水解 [α - 32 P]ATP 成為游離磷酸根離子和 ADP 的能力，經由 TLC (Thin layer chromatography) 可以將此二者產物分開 (Fig. 26)。為了排除非專一性 ATPase 活性，另外以表現載體 pET-28b(+) 不含 VrRH1 (-RH) 為對照組，從 Fig. 27-A 得知，-RH 於吸附部份幾乎無吸附之蛋白質，含有 VrRH 載體 (+RH) 之不同蛋白質峰處 (Fraction I-IV)，都具有 ATPase 的活性，然而不含 VrRH 載體 (-RH)，相對於 +RH 吸附處，並無 ATPase 活性 (Fig. 27 B)。實驗以不同酵素量反應 10 分鐘 (Fig. 28 A)，以及相同酵素量 (160 μ g) 於不同反應時間進行酵素反應 (Fig. 28 B)，其結果均證明 His-VrRH1 具有 ATPase 之活性。His-VrRH1 於加入 Li、Na、K 離子進行酵素活性抑制反應時，Li 離子需 250 mM 以上、而 Na 和 K 離子需 200 mM 以上才有抑制效果 (Fig. 29)。VrRH1 之 ATPase 活性最適 pH 值為 8.5 (Fig. 30 A)，最適溫度為 37 $^{\circ}$ C (Fig. 30 B)。

4.9 VrRH1 基因表現與種子活勢之關係

綠豆經標準衰化條件處理 0~15 天，以 1.2 kb-VrRH1 為探針進行 Northern 分析時，從 Fig. 31-B 得知，種子隨著衰化時間增加，VrRH1 雜合訊號消失。0~15 天衰化處理之種子經過 12 小時浸潤處理，胚軸大於 0.5 cm 之幼苗，VrRH1 基因表現量增加 (Fig. 32)。

綠豆經標準衰化條件處理 9 天，以 1.2 kb-VrRH1 為探針進行 Northern 分析時，從 Fig. 32 得知控制組種子 (C, lane 5) 未浸潤前有雜合訊號，衰化 9 天種子 (9-d, lane 6) 則無雜合訊號。控制組種子浸潤 12 小時 (C-12-h)，以及衰化 9 天種子浸潤 12 小時 (9-d-12-h)，二者分別取胚軸大於 0.5 cm 但小於 1cm 進行 Northern 分析時，9-d-12-h 雜合訊號 (lane 8) 較 C-12-h (lane 7) 為強。

從文獻得知，種子胚軸長短為判別種子活勢指標分析之一⁽¹⁰⁾，9-d-12-h 幼苗，

依胚軸長度可區分為三組，第一組幼苗胚軸長度為大於 0.5 cm (Group 1)，第二組幼苗胚軸長度為小於 0.5 cm (Group 2)，第三組幼苗胚軸無法突破種皮 (Group 3)。由 Fig. 34 不同 lanes 之胚軸長度分別為，lane 5、lane 6 為 Group 1 幼苗，lane 7 為 Group 2 幼苗，lane 8 為 Group 3 幼苗，以 1.2 kb-*VrRHI* 為探針進行 Northern 轉印分析時，*VrRHI* 或是 *VrRH* 基因表現量：Group 1 > Group 2 > Group 3。

我們追蹤控制組 (C) 與衰化組 (9-d) 隨著發芽 1hr、8hr、16hr、24hr、32hr、45hr 後，分別抽取二者總 RNA 進行 Northern 轉印分析，實驗結果發現 C 組綠豆 *VrRHI* 基因於 8~32 小時皆有表現 (Fig. 35)；而 9-d 組綠豆於發芽 24 小時表現量最高，32 小時開始下降 (Fig. 36)。從 Fig. 36 實驗結果同時發現，18 S rRNA 與 25 S rRNA 於 9-d 種子發芽後 32 小時重新合成，然而 C 組種子之 rRNA 則無重新再合成的情形 (Fig. 35)。

VrRHI 基因於不同部位的表現方面，從 Fig. 37 得知 C-12 組與 9-d-12 組，二者均在胚軸 (lane 7 and lane 8) 表現量較子葉為多 (lane 5 and lane 6)。從 Fig. 38 得知控制組種子和衰化組種子發芽 24 小時之幼苗 (lane 4 and lane 8) 表現量最多，初生葉次之 (lane 1 and lane 5)，成熟葉 (lane 2 and lane 6) 與花 (lane 3 and lane 7) 表現量最少。

4.10 *VrRH1* 多源抗體免疫組織分析

我們以 His-*VrRH1* 融合蛋白質為抗原，對兔子進行免疫以製備多源抗體。取衰化種子發芽 3 天後之幼苗，經過脫水、石臘包埋及切片後，以 *VrRH1* 製備之多源抗體進行免疫組織定位，結果如 Fig. 39 所示。Fig. 39-A 為未加 *VrRH1* 抗體之控制組；Fig. 39-B 與 C 為幼苗頂芽生長點處，有較強的 *VrRH1* 表現；Fig. 39-D 與 E 為 Fig. 39-B 與 C 放大圖，*VrRH* 表現於細胞核處訊號較強；Fig. 39-F 為綠豆胚軸的縱切面，*VrRH1* 似乎表現於鄰近導管位置。

4.11 天然 VrRH 蛋白質的純化

衰化種子發芽三天後之幼苗，去除子葉後進行粗抽、硫酸酸分劃（40%~50%）與陽離子交換層析管柱後，吸附於陽離子上之蛋白質約佔粗抽蛋白質之 0.1%，不同純化步驟所得到的蛋白質，除了吸附於陽離子交換層析管柱之蛋白質（Fig. 40 A, Peak III）具有 ATPase 活性外（Fig. 40 B, lane 8），Peak III 經過濃縮，進行 Western 轉印分析，可被 VrRH1 多源抗體所辨識（Fig. 41）。

V. 討論

5.1 加速種子衰化條件的建立

5.2 種子品質分析

5.3 *VrRH1* cDNA 全長的選殖

5.4 *VrRH1* 的特性

5.5 *VrRH1* 基因表現與種子活勢之關係

5.1 加速種子衰化條件的建立

評估種子活力方法有許多種，其一便是”種子加速衰化法”，其原理是分層採樣不同批種子，以高溫、高濕法加速種子衰化，比較各批種子加速衰化後的發芽率來作為判別種子品質的標準。種子活勢高（high vigour seeds）者，雖然經過加速衰化處理，較能抵抗衰化，一旦在良好的發芽條件下，仍可以發芽。然而對於低活勢種子（low vigour seed），同樣地經過衰化處理後，種子活勢已經消耗殆盡，造成種子不發芽，或是發芽率比高活勢種子為低。

本實驗初期為建立種子加速衰化的條件，由於綠豆種子並不容易衰化，因此在 25℃ 條件下，環境濕度雖提高至 100%，但種子仍維持很高的發芽率（86%）（Fig. 1），一旦提高溫度至 50℃，發芽率才有明顯的下降（Fig. 2）。文獻指出以高濕加速種子衰化，可能導致種子含水率提高，造成種子惡化，而與正常種子的衰化有所差別。1994-T5 未加速衰化前種子本身的含水率為 12.5%，但是經由不同相對濕度（RH）處理下，只有在 45% RH 之環境濕度下，可維持種子本身的含水量不變（Fig. 3），此時溫度成為影響種子衰化的唯一變因。從 Fig. 5 得知，實驗重覆以不同時期採收之種子，於標準衰化條件處理下，種子內部含水率與環境濕度可以維持衡定。

5.2 種子品質分析

發芽率高的種子並不代表種子活勢一定也很高，原因是標準的發芽條件下，提供良好的發芽溫度及濕度，因此活勢弱的種子於如此優渥的條件下，同樣地維持很高的發芽率，因此發芽率高的種子只能說活力（viability）很好，活勢（vigour）並不一定很好。

以 1994-T5 綠豆為例，種子未衰化前的發芽率很高（96~98%），經過標準衰化條件處理後其發芽率開始下降呈現 S 曲線（Fig. 2），衰化天數經 15 天後種子發芽率下降為 15% 左右，然而經標準衰化 9 天後可存活的幼苗，所產生的子代，種子未衰化前為 95% 發芽率，但經過標準衰化條件處理後，發芽率亦呈現 S 曲線（Fig.

6), 整個衰化天數拉長為 45 天後, 發芽率下降至 15%。從以上結論得知, 實驗所使用的 1994-T5 綠豆, 從發芽率來看種子活力雖然很強, 但需經由標準衰化條件處理與浸潤發芽後, 才能夠篩選出高、低活勢種子。

以 TTC 染色、Evan's Blue 染色、電導度法和乙烯釋放量作為分析衰化種子之活勢指標方面: 衰化程度愈高的種子, 胚軸總去氫酶活性下降, 因而呈現白色 (Fig. 7), 未衰化種子 (Fig. 7, Fig. 8) 或衰化後高活勢之種子其胚軸為紅色。而以 Evans blue 進行呈色反應方面, 其靈敏度較 TTC 染色法為低, 嚴重衰化 (惡化) 的種子, 才有藍色染料沉積於損傷的細胞 (Fig. 9)。然而這二種染色法並無法區別 9-d-12 幼苗 (標準衰化 9 天種子發芽 12 小時) 與 C-12 幼苗 (控制組種子發芽 12 小時) (Fig. 9, 10, 13)。而從電導度法和乙烯釋放量的結果顯示, 種子衰化程度高離子滲漏增加 (Fig. 12), 乙烯的釋放量亦隨之提高 (Fig. 13), 二者呈現正相關。衰化種子乙烯釋放量會提高, 此方面的文獻報告不多, 然而衰化嚴重種子幼苗發芽初期乙烯的釋放量會降低 (99)。

除了以上的活勢指標分析外, 衰化程度高的種子其 rRNA 降解嚴重 (Fig. 14), 經 0~15 天衰化處理發芽 12 小時, 胚軸大於 0.5 cm 之幼苗, 其 rRNA 的降解亦是很嚴重 (Fig. 15)。因此以 rRNA 之降解情況, 亦可以作為判別種子活勢的大小的指標。

5.3 VrRH1 cDNA 全長的選殖

從文獻得知, 許多選殖出的 RNA 解旋酶, 都是經由電腦序列比對而得, 只有少數的 RNA 解旋酶具有酵素活性。我們以 1.2 kb 為模板, 藉由 5'/3' RACE 選殖綠豆全長的 RNA 解旋酶, 命名為 VrRH1 (*Vigna radiata* RNA helicase 1) (100), 其胺基酸推衍序列與 DEAD box protein 七個重要的 motifs 如 Fig. 18 所示。

RNA 解旋酶廣泛的存在於生物體內, 從細菌到人類及許多的病毒都曾被發現, 植物中已發現的 RNA 解旋酶 cDNA 只有阿拉伯芥 (9, 21, 34, 37)、菠菜 (34)、煙草 (25) 和豌豆 (69, 70)。VrRH1 胺基酸序列之 motif IV 與菠菜 RNA 解旋酶序列較類似。

我們亦發現 VrRH1 蛋白質 N 端具有類似 NLS (nuclear localization sequence) 之序列，從阿拉伯芥選殖之 RNA 解旋酶 (PRH75)，已被證明為核蛋白，其 N 端 81 個胺基酸已被證實，能夠將 GUS 融合基因帶至於細胞核進行表現⁽³⁴⁾，因此我們推測 VrRH1 可能是存在於細胞核內表現之蛋白質。

5.4 VrRH1 的特性

His-VrRH1 於純化過程中，蛋白質本身有降解的情形發生，曾有文獻指出 HCV NS3 蛋白質其 N 端具胰蛋白酶絲胺酸蛋白酶的 motif，具有 catalytic triad (His1083 Asp1107 及 Ser1165) 有水解產生，其切割是快速地發生於分子內 (in cis) 的自我切割。因此我們以非專一性的蛋白酶基質 gelatin 進行實驗，初步結果證明 His-VrRH1 有蛋白酶的活性，如果以含 gelatin 的原態電泳進行分析，其分解 gelatin 的情形不明顯，但如果以 dot blot 進行實驗，純度高的 His-VrRH 蛋白質降解情形較顯著 (Fig. 21)，因此推測 His-VrRH1 可能發生自我分解，造成蛋白質本身的降解而產生較小的片斷。

除了證明 His-VrRH1 具有解旋 ds RNA 成為 ss RNA 能力外，針對酵素本身 ATPase 活性部份，我們從 Fig. 26-B 得知不同純度之 His-VrRH1，其水解 [α -³²P]ATP 成為 [α -³²P]ADP 之能力，隨著酵素純度的提高而上升，然而從圖中可能有大腸菌非專一性的 ATPase 活性攙雜，為了排除此一變因，實驗以含 VrRH 序列為實驗組 (+ RH)，及不含 VrRH 為控制組 (- RH) 分別進行純化，結果如 Fig. 27 所示，+RH 吸附於 Ni²⁺-Agarose 蛋白峰處有 ATPase 活性 (Fig.27 B, lane 9 and 10)，-RH 於相對位置上並沒有 ATPase 活性 (Fig. 35 B, lane 4 and 5)。以不同量的 His-VrRH1 (5~320 ng) 及固定蛋白量 160 ng 進行不同的反應時間，除了證明 His-VrRH1 具有 ATPase 活性外，其水解 ATP 能力與解旋 ds RNA 能力二者間似乎有關。文獻指出，多數的 RNA 解旋酶其 ATPase 活性，會受到合成之寡核苷酸或去氧核苷酸所誘發，然而當我們以合成的人工基質 (poly A, U, C and poly dA, dT, dC) 進行實驗，並無誘發效果。His-VrRH1 最適作用為 pH8.5 (Fig. 38 A)，顯

示酵素作用之可能位置於細胞核中。

5.5 *VrRH1* 基因表現與種子活勢之關係

以 1.2 kb 為探針分析不同天數衰化處理之綠豆，從 Fig. 31-B 發現，*VrRH1* 基因表現產物隨衰化天數增加而消失，雜合訊號集中於降解的片斷，其可能的原因為 1.2 kb 並非全長基因，1.2 kb 相對於 *VrRH1* 基因 5' 端至 motif IV 之位置，因此圖中的雜合訊號有可能是綠豆其它 RNA 解旋酶 (*VrRH*) 或是細胞核內蛋白之類似基因，經過衰化處理所斷裂的片段所造成。從 Fig. 32-B 可以發現衰化種子浸潤 12 小時，其胚軸大於 0.5 cm 之幼苗，*VrRH1* (*VrRH*) 表現較多，其可能解釋原因為衰化程度愈嚴重的種子，經過浸潤後其胚軸如能大於 0.5 cm 以上之種子已經很少，這些存活幼苗應當是原本存於種子群內的高活勢種子，能夠抵抗惡劣的環境而存活下來，因此 *VrRH1* 基因的表現增多，應該與種子的活勢有關。

另一個重要的支持理由為 Fig. 34，從文獻回顧得知發芽速率為判別種子活勢的指標，種子活勢愈強，單位時間內胚軸突出的長度愈長₍₁₀₎，1994-T5 經標準衰化處理 9 天後，依胚軸的長短可分為大於 0.5 cm 以上 (Group 1)，小於 0.5 cm (Group 2) 和胚軸無法突出種皮 (Group 3)，種子未衰化前都屬於 Group 1，但衰化後可分為三個 Groups，透露出 1994-T5 種子原本就有這三群不同活勢的種子，但未經標準衰化程序前，我們很難以目視法加以區分 (發芽率 96~98%)，但如果經過衰化處理後就可以加以區別。從 Fig. 34-B 可得知，*VrRH1* 基因的表現量和胚軸的突出長度成正比 (lane 6~lane 8)，而 lane 5 雖然也是 Group1 幼苗，然而如同前述，種子未衰化前高活勢與低活勢種子夾雜在一起，因此不像 lane 6 所得到種子，大部份為高活勢，因此 lane 6 的表現量較 lane 5 為高。

我們追蹤 C-12 組與 9-d 組隨著發芽 1hr、8hr、16hr、24hr、32hr、45hr 後，分別抽取正常與衰化綠豆總 RNA，以全長 *VrRH1* 序列進行 Northern blot analysis，我們發現 C 組 *VrRH1* 基因在 8~45 小時皆有表現，基因表現量較無明顯的差異變化_(Fig. 35)。而 9-d 組綠豆，rRNA 在發芽後 32 小時才重新出現 (C 組

為 8 小時)。9-d 組 *VrRHI* 基因的表現在 8~32hr 小時後下降，基因表現量以 24 小時最高(Fig. 36)。從以上結果得知，*VrRHI* 基因表現時間，較 rRNA 再合成的時間為早，因此 *VrRHI* 與 rRNA 的再合成有無關聯？或是合成新的 mRNA？或是幫助轉錄、轉譯作用的進行？其中一種綜合的效應促使衰化種子能夠回復活力使得種子可以發芽，或是高活勢種子，目前在種子方面的研究幾乎無人涉獵，如能加以深入研究，應該可以幫助對於種子發芽，特別是對於衰退種子其活力的再回復，提供一條思考的途徑。

另一方面，從 Fig. 37 得知 *VrRHI* 其在胚軸的表現量大於子葉，9-d-24-h 幼苗，*VrRHI* 基因的表現量大於幼葉、成熟葉及花 (Fig. 38)。從文獻得知阿拉伯芥 *PRH75* 基因的表現於生長旺盛的組織，例如根、幼葉、生長點，雖然 *VrRH1* 與 *PRH75* 胺基酸序列高達 71% 的相似性，然而其在葉片的表現卻不是很一致，推測 *VrRHI* 可能只會大量表現於高活勢種子浸潤初期。

從 Fig. 39 初步結果得知 *VrRH1* 多源抗體可以在生長點 (圖 B, C) 處有較強的訊號，而在圖 F 側端生長點 (lateral meristem) 亦有訊號。因此我們推測衰化綠豆，浸潤處理後可以生長成植株的重要原因，可能是 *VrRH* 蛋白質在這些分列旺盛組織，大量表現的結果。

為了進一步瞭解 *VrRH1* 在綠豆幼苗所扮演的角色生物功能，我們進行原態 *VrRH* 的純化，我們以 ATPase 的活性來分割經由陽離子交換樹脂所得到之不同蛋白質峰是否有酵素活性？從陽離子交換樹脂吸附部份所沖提之蛋白質經 ATPase 活性測定後證明有 ATPase 活性 (Fig. 50)，並能被 His-*VrRH1* 置備之抗體所補捉，推測此蛋白峰 (Fig. 50, Peak III) 應該含有原態 *VrRH*。原態 *VrRH* 蛋白質 N 端定序、大量純化及解旋活性的分析仍持續進行中。

VI . 結論與展望

種子活力喪失則其應用價值降低，如何使種子在儲藏期間活力不喪失，或者是種子於浸潤過程中，種子活力的再恢復，是個重要的問題。因此，這個論文的目的首先是建立加速綠豆種子衰化的系統，運用不同的指標加以評估後，種子經浸潤處理後，選殖與種子活勢相關的基因，並研究這些基因產物的構造、可能的生理功能及基因調控情形，希望闡明綠豆種子衰化過程中，高活力種子為何能夠存活下來之可能的生理與生化機制。

本論文目前已完成綠豆種子加速衰化條件的建立並篩選出衰化綠豆存活幼苗 RNA 解旋酶 - *VrRHI* 基因的選殖，重組蛋白質的表現及活性分析，以及探討 *VrRHI* 與種子活勢之間的關係。從文獻回顧得知，阿拉伯芥 *PRH75* 的研究發現，其 N 端與 C 端序列差異性很大，這些差異性可能對於不同種類 RNA 的結合有關，並經證明其 *PRH75* 為核內蛋白質。我們從綠豆中所得到的 *VrRHI* 和阿拉伯芥 *PRH75* 相似度很高，也許亦有類似於植物體內的生化功能，闡明 *VrRHI* 在生物體內的角色扮演，應可以釐清 *VrRHI* 與種子活勢之間的關係，因此我們擬定未來以下幾個研究方向：

- (一) 原態 *VrRH* 蛋白質的純化，以探討其生化性質、酵素特性與結構
- (二) 我們希望進一步釐清 *VrRHI* 與種子活勢的關係，其方法是建立阿拉伯芥或綠豆轉殖系統，配合已建立之種子加速衰化條件進行實驗，希望藉由調控 *VrRHI* 基因的表現，探討二者之間的關係。
- (三) 綠豆 *VrRH1* 融合蛋白質上高度保留區點突變實驗 (例如 ATPase 活性區、Helicase 區或 RNA interaction 區) 進行 computer modeling 配合 in vitro 活性分析來探討這些區域的作用機制。

(四) 大量表現 VrRH1 重組蛋白質，將其純化結晶，利用 X 繞射分析測定其三度結構，並以 Yao 在 1997 年所測定的 HCV NS3 helicase 結構作為 search model，以 molecular replacement 的方法得到位相解出 VrRH1 蛋白質的結構，希望能闡明植物 helicase 與 NTP 結合、水解及解旋之間的關連，同時並可以推測 helicase 作用機制。

(五) 尋找 *VrRHI* 的 in vivo substrate，來闡明 *VrRHI* 的生理功能。

總之，未來將探討 VrRH1 的生理功能及基因調控情形，闡明綠豆種子衰化過程中，高活勢種子是否因 *VrRHI* 之大量表現而存活下來？並希望本研究結果能應用於種子的品種改良，提高種子活勢，以增進種子在逆境下的適應能力。

VII. 參考文獻

1. Leopold, A.C. 1995. Aging, senescence and turnover in plants. *Bioscience*. 25: 659-662.
2. Nooden, L.D. 1988. Senescence and aging in plants.
3. Davies, I. and Sigeo, D.C. 1984. Cell aging and cell death: perspectives. in "Cell aging and cell death" (Davies, I. and Sigeo, D.C., eds.), pp. 347-350. Cambridge Univ. Press, London and New York.
4. 高景輝 1987 植物生長與分化
5. Beal, W.J. 1905. *Bot. Gaz.* 40: 140
6. Roberts, E.H. 1972. In: *Viability of seeds*, Chapman and Hall, London. P. 253.
7. 郭華仁 (1998) 台大農藝學系種子研究室全球資訊網
<http://seed.agron.ntu.edu.tw>
8. Cheah, K.S.E. and Osborne, D.J. 1978. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of aging rye seed. *Nature*. 272: 593-599.
9. Reuzeau, C. and Cavalie, G. 1997. Changes in RNA and protein metabolism with alternations in the germination efficiency of sunflower seeds. *Annals of Botany*. 80: 131-137.
10. Guy, P.A. and Black, M. 1998. Germination-related proteins in wheat revealed by differences in seed vigour. *Seed Science Research*. 8: 99-111.
11. Ghosh, B. and Chaudhuri, M.M. 1984. Ribonucleic acid breakdown and loss of protein synthetic capacity with loss of viability of rice embryos (*Oryza sativa*). *Seed Science and Technology*. 12: 669-677.
12. Grilli, I., Bacci, E., Lombardi, T., Spano, C. and Floris, C. 1995. Nature aging: poly(A) polymerase in germinating embryos of *Triticum durum* wheat. *Annals of Botany*. 76: 15-21.
13. Bray, C.M. and Smith, C.A.D. 1985. Stored polyadenylated and loss of vigour in germinating wheat embryos. *Plant Science*. 38: 71-79.

14. Gidrol, X., Noubhani, A. and Paradet, A. 1990. Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. II. RNA population and protein synthesis. *Physiologia Plantarum*. 80: 598-604.
15. Simon, E.W. and Harun, R.M.R. 1972. Leakage during seed imbibition. *Journal of Experimental Botany*. 77: 1076-1085.
16. Samimy, C. and Taylor, A.G. 1983. Influence of seed quality on ethylene production of germinating snap beans. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 767-769.
17. Stewart, R.R.C. and Bewley, D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 65: 245-248.
18. Basra, A.S. 1994. Seed viability and seed vigor. In: *Seed quality basic mechanism and agricultural implications*. Food Products Press: An Imprint of The Haworth Press, Inc. New York, London, Norwood. 1-76.
19. Powell, A.A. 1988. Seed vigour and field establishment. *Advances in Research and Technology of Seeds*. 11: 29-80.
20. Puntarulo, S. and Boveris, A. 1990. Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soybean embryonic axes. *Plant Science*. 68: 27-32.
21. Hampton, J.G. and Tekrony, D.M. 1995. Measuring of seed vigour. In: *Hand book of vigour test*; Published by The International Seed Testing Association. 14-20.
22. Hampton, J.G. and Hill, M.J. 1990. Herbage seed lots: Are germination data sufficient ? *Proceeding of the New Zealand Grassland association*. 52: 59-64.
23. Hall, R.D. and Wiesner, L.E. Relationship between seed vigor tests and field performance of "Regar" meadow bromegrass. *Crop Science*. 30: 967-970.
24. Hampton, J.G. and Coolbear, P. 1990. Potential versus actual seed performance - can vigour testing provide an answer ? *Seed Science and Technology*. 18: 215-228.
25. Delouche, J.C. and Boskin, C.C. 1973. Accelerated aging technique for predicting

- the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology*. 1: 427-452.
26. Ellis, R.H. and Roberts, E.H. 1980. Towards a rational basis for testing seed quality. In: *Seed Production* (ed P.D. Hebblethwaite), 605-645, Butterworths, London.
 27. Perry, D.A. 1981. Introduction In: *Handbook of vigour test methods*, 3-7. International Seed Testing Association, Zurich.
 28. Perry, D.A. 1978. Report of the Vigour Test Committee. 1974-1977. *Seed Science and Technology*. 6: 159-181.
 29. Powell, A.A. 1986. Cell membrane and seed leachate conductivity in relation to the quality of seed for sowing. *Journal of Seed Technology*. 10: 81-100.
 30. Priesley, D.A. 1986. Seed aging: Implications for seed storage and persistence in the soil comstock, Ithaca, USA.
 31. Hampton, T.G. 1992a. Report of the vigour test committee 1989-1992. Supplement to *Seed Science and Technology*. 20: 191-198.
 32. AOSA. 1983. *Seed vigour testing handbook*. Contribution No. 32. Association of official seed analysis, USA. 1983.
 33. Desai, B.B., Kotecha P.M. and Salunkhe, D.K. 1997. *Seeds handbook*.
 34. Leshem, Y.Y. 1988. Plant senescence processes and free radicals. *Free Radic Biol Med*. 5: 39-49.
 35. Mackay, D.B. 1972. In: *Viability of Seeds*. Chapman and Hall, London. P-172.
 36. Sen, S. and Osborne, D.J. 1977. Decline in ribonucleic acid and protein synthesis with loss of viability during the early hours of imbibition of rye (*Secale cereale* L.) embryos. *Biochem. J*. 166: 33-38.
 37. Scharpe, A. and Parijs, R. V. 1973. The formation of polyploid cells in ripening cotyledons of *Pisum sativum* L. in relation to ribosome and protein synthesis. *J. Exp. Bot*. 24: 216-222.

38. Hallman, N.D., Roberts, B.E. and Osborne, D.J. 1973. Embryogenesis and germination in rye. *Planta*. 110: 279-290.
39. Parrish, D.J. and Leopold, A.C. 1978. On the mechanism of aging seeds. *Plant Physiol*. 61: 365-368.
40. Berjak, P. and Villers, T.A. 1970. Autoradiographic localization of soluble and insoluble ¹⁴C from [¹⁴C] indolylacetic acid supplied to isolated coleus internodes. *New Phytol*. 69: 919-927.
41. Berjak, P. and Villers, T.A. 1972. Aging in plant embryos. II. Age-induced damage and its repair during early germination. *New Phytol*. 71: 135-144.
42. Kittock, D. L. and Law, A.G. 1968. *Agron. J.* 60: 286.
43. Macleod, A.M. 1952. *Trans Bot. Soc. Edinburgh*. 36: 18.
44. Roberts, E.H. 1973. *Seed Sci. and Technol.* 1:499.
45. Cheah, K.S.E. and Osborne, D.J. 1978. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of aging rye seed. *Nature*. 272: 593-599.
46. Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V. and Wolf, Y. I. 1993. Helicase: Amino acids sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 419-429.
47. Abdel, M.M., Durwald, H. and Hoffmann, B.H. 1976. Enzymatic unwinding of DNA. 2 Chain separation by an ATP-dependent DNA unwinding enzyme. *Eur. J. Biochem.* 65: 441-449.
48. Moore, K.J.M., and Lohman, T.M. 1995. Helicase-catalyzed DNA unwinding: energy coupling by DNA motor proteins. *Biophys J.* 68: 180-185.
49. Lohman, T.M. and Bijornson, K.P. 1996. Mechanism of helicase-catalyzed DNA winding. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 169-214.
50. Cruz, J.D.I., Kressler, D. and Linder, P. 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends in Biochemical*

- Sciences. 5: 192-198.
51. Linder, P. and Daugeron, M.C. 2000. Are DEAD-box proteins becoming respectable helicases? *Nature Structural Biology*. 7: 97-99.
 52. Korolev, S., Hsieh, J., Gauss, G.H., Lohman, T.M. and Waksman, G. 1997. Major domain swiveling revealed by the crystal structure of complex of *E. coli* Rep helicase bound to single-strand DNA and ADP. *Cell*. 90: 635-647.
 53. Subramanya, H.S., Bird, L.E., Brannigan, J. and Wigley, D.B. 1996. Crystal structure of a Dext box DNA helicase. *Nature*. 384: 318-325.
 54. Velankar, S.S., Soultanas, P., Dillingham, M.S., Subramanya, H.S. and Wigley, D. B. 1999. Crystal structure of complex of *PcrA* DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell*. 97: 75-84.
 55. 宋東儒 1998 C 型肝炎病毒 NS3 解旋酶的晶體結構
 56. Cho, H.S., Ha, N.C., Kang, L.W., Chung, K.M., Back, S.H., Jang, S.K. and Oh, B. H. 1998. Crystal structural of RNA helicase from genotype 1b hepatitis C virus. *J. Biol. Chem*. 273: 15045-15052.
 57. Kim, D.W., Kim, J., Gwack, Y., Han, J.H. and Choe, J. 1997. Mutational analysis of the hepatitis C virus RNA helicase. *J. Virol*. 71: 9400-9409.
 58. Wong, I. and Lohman, T. M. 1992. Allosteric effects of nucleotide cofactors on *Escherichia coli* Rep helicase-DNA binding. *Science*. 256: 350-355.
 59. Story, R.M., Weber, I.T. and Steitz, T. A. 1992. The structure of the *E. coli* recA protein monomer and polymer. *Nature*. 355: 318-325.
 60. Owttrim, G.W., Hofmann, S. and Kuhlemeier, C. 1992. Divergent genes for translation initiation factor eIF-4A are coordinately expressed in tobacco. *Nucleic Acids Res*. 19: 5491-5496.
 61. Owttrim, G.W., Mandel, T., Trachsel, H., Thomas, A.A.M. and Kuhlemeier, C. 1994. Characterization of tobacco eIF-4A gene family. *Plant Mol. Biol*. 26:

1747-1757.

62. Itadani, H., Sugita, M. and Sugiura, M. 1994. Structure and expression of a cDNA encoding an RNA helicase-like protein in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 24: 249-252.
63. Brander, K.A. and Kuhlemeier C. 1995. A pollen-specific DEAD-box protein related translation initiation factor eIF-4A. *Plant Mol. Biol.* 27: 637-649.
64. Metz, A.M., Timmer, R.T. and Browning, K.S. 1992. Sequences for two cDNAs encoding *Arabidopsis thaliana* eukaryotic protein synthesis factor 4A. *Gene* 120: 313-314.
65. Lorkovic, Z.J., Herrmann, R.G. and Oelmuller, R. 1997. PRH75, a new nucleus-localized member of the DEAD-box protein family from higher plants. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2257-2265.
66. Okanami, M., Meshi, T. and Iwabuchi, M. 1998. Characterization of a DEAD box ATPase/RNA helicase protein of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 26: 2638-2643.
67. Gagliardi, D., Kuhn, J., Spadinger, U., Brennicke, A., Leaver, C.J. and Binder, S. 1999. An RNA helicase (AtSUV3) is present in *Arabidopsis thaliana* mitochondria. *FEBS Letters.* 458: 337-342.
68. Aubourg, S., Kreis, M. and Lecharny, A. 1999. The DEAD box RNA helicase family in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 27: 628-636.
69. Pham, X.O., Reddy, M.K., Ehtesham, N.Z., Matta, B. and Tuteja, N.A. 2000. DNA helicase from *Pisum sativum* is homologous to translation initiation factor and stimulates topoisomerase I activity. *The Plant Journal.* 24: 219-229.
70. Tuteja, N., Beven A. F., Shaw, P. J. and Tuteja, R. 2001. A pea homologue of human DNA helicase I is localized within the dense fibrillar component of the nucleolus and stimulated by phosphorylation with CK2 and cdc2 protein kinases. *The Plant Journal.* 25: 9-17.

71. Hirling, H., Scheffner, M., Restle, T. and Stahl, H. 1989. RNA helicase activity associated with the human p68 protein. *Nature* 339: 562-564.
72. 1990. Bidirectional RNA helicase activities of eukaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1134-1144.
73. Lain, S., Riechmann, J.L. and Garcia, J.A. 1990. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res.* 18: 7003-7006.
74. Lee, C.G. and Hurwitz, J. 1992. A new RNA helicase isolated from HeLa cells that catalytically translocates in the 3' to 5' direction. *J. Biol. Chem.* 267: 4398-4407.
75. Shuman, S. 1992. Vaccinia virus RNA helicase: an essential enzyme related to the DE-H family of RNA-dependent NTPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10935-10939.
76. Liang, L., Diehl-Jones, W. and Lasko, P. 1994. Localization of vasa protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* 120: 1201-1211.
77. Jones, P.G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W. and Inouye, M. 1996. Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 76-80.
78. Bøddeker, N., Stade, K. and Franceschi, F. 1997. Characterization of DbpA, an *Escherichia coli* DEAD box protein with ATP independent RNA unwinding activity. *Nucleic Acid Res.* 25: 537-544.
79. Ladomery, M., Wade, E. and Sommerville, J. 1997. Xp54, the *Xenopus* homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes. *Nucleic Acids Res.* 25: 965-973.
80. Gururajan, R., Mathews, L., Longo, F.J. and Weeks, D.L. 1994. An3 mRNA

- encodes an RNA helicase that colocalizes with nucleoli in *Xenopus* oocytes in a stage-specific manner. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2056-2060.
81. Gururajan, R. and Weeks, D.L. 1997. An3 protein encoded by a localized maternal mRNA in *Xenopus laevis* is an ATPase with substrate-specific RNA helicases activity. Biochim. Biophys. Acta. 1350: 169-182.
 82. Buchvarov, P. and Gantcheff, T. 1984. Influence of accelerated and natural aging on free radical levels in soybean seeds. Physiol. Plant. 60: 53-56.
 83. Hampton, J.G. Johnstone, K.A. and Eua-umpon V. 1992. Bulk conductivity test variables for mungbean, soybean and French bean seed lots. 20: 677-686.
 84. Li, S.C., H, J.W., Chen, K.C. and Chen, C.S. 2001. Purification and characterization of isoforms of β -galactosidases in mung bean seedlings. Phytochemistry. 57: 349-359.
 85. Liang, P., and Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257:967-971.
 86. Sokolov, B.P. and Prockop, D.J. 1994. A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. Nucleic Acids Res. 22: 4009-4015.
 87. O' brien, F.E.M. 1948. The control humidity by saturated salt solutions. J. Scient. Instrum. 25: 73-76.
 88. Gaff, D.F. and Okong' o-ogola, O. 1971. The use of non-permeating pigments for testing the survival cells. Journal of Experimental Botany. 1971. 72: 756-758.
 89. Katoh, H. and Esashi, Y. 1975. Dormancy and impotency of cocklebur seeds I. CO₂, C₂H₄, O₂ and high temperature. Plant and Cell Physiol. 16: 687-696.
 90. Sambrook, J., Fritch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Edn., Cold Spring Harbor, NY.
 91. Shirzadegan, M., Christie, P. and Seemann R. 1991. An efficient method for

- isolation of RNA from tissue cultured plant cells. *Nucleic Acids Res.* 19: 6055.
92. 行政院農委會編譯 1997 國際種子檢查規則。
93. Tai, C.L., Chi, W.K., Chen, D.S. and Hwang, L.H. 1996. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J. Virol.* 70: 8477-8484.
94. Oh, J.Y. and Kim, J. 1999. ATP hydrolysis activity of the DEAD box protein Rok1p is required for *in vivo* ROK1 function. *Nucleic Acids Res.* 27: 2753-2759.
95. Lin, C.Y., Kuan, C.C., Juang, R.H., Tsou, S.C.S., Kuo, C.G. and Chen, C.S. 1998. Rapid isolation of differentially expressed cDNAs from near isogenic lines of mungbean. *Botanical Bulletin of Academia Sinica.* 39: 87-91.
96. Moore, R.P. 1976. The tetrazolium seed testing developments in North America. *Journal of Seed Technology.* 1: 17-30.
97. McDonalds, M.B.J. Wilson, D.O. 1980. ASA-610 ability to detect changes in soybean seed quality. *Journal of Seed Technology.* 5: 56-66.
98. Hepburn, H.A., Powell, A.A. and Matthews, S. 1984. Problems associated with the routine application of electrical conductivity measurements of individual seeds in the germination testing of pea and soybean. *Seed Science and Technology.* 12: 403-413.
99. Gorecki, R.J., Ashino, H., Satoh, S. and Esashi, Y. 1991. Ethylene production in pea and cocklebur seeds of differing vigour. *Journals of Experimental Botany.* 42: 407-414.
100. RNA-helicase (Accession No. AF156667) from acceleratedly aged mung bean seeds (PGR00-019). *Plant Physiol.* 122: 619.

圖 與 表

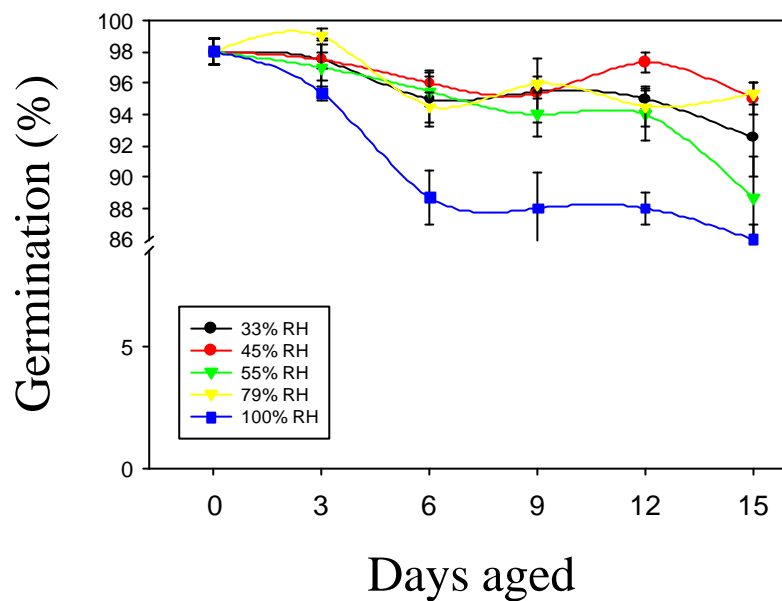


Figure 1. The relationships versus accelerated aging days at 25 under different relative humidity. 1994-T5 mung bean seeds were incubated at 25 in 33 %, 45 %, 55 %, 79 % and 100 % relative humidity for 3, 6, 9, 12 and 15 days and then germinated under standard conditions.

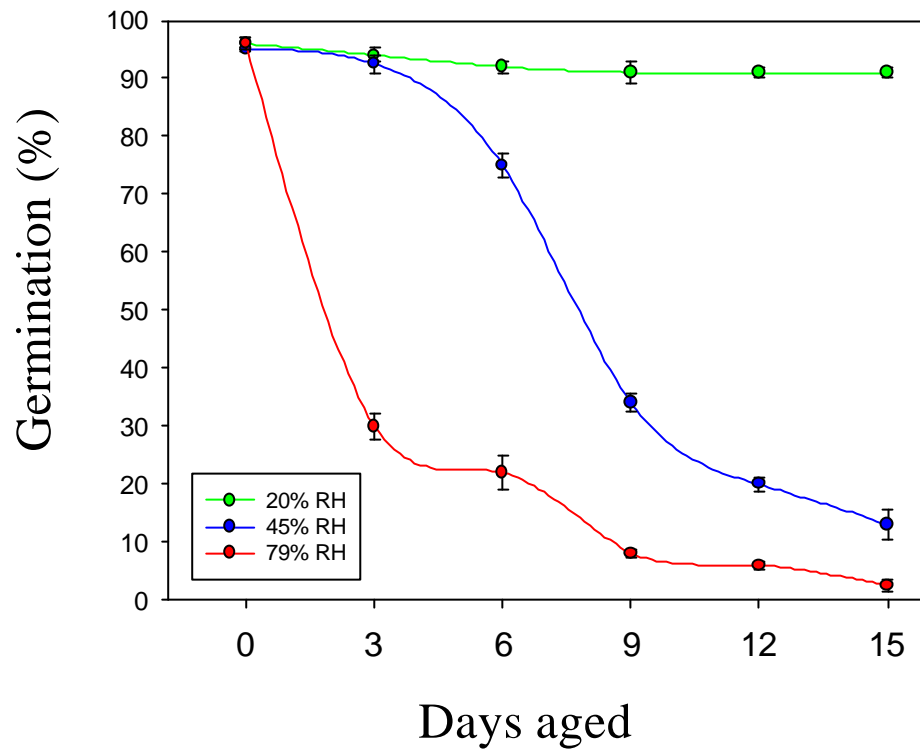


Figure 2. The germination versus days of accelerated aging at 25 °C under different relative humidity. 1994-T5 mung bean seeds were incubated at 50 °C in 20%, 45% and 79 % relative humidity for 3, 6, 9, 12 and 15 days and then germinated under standard conditions.

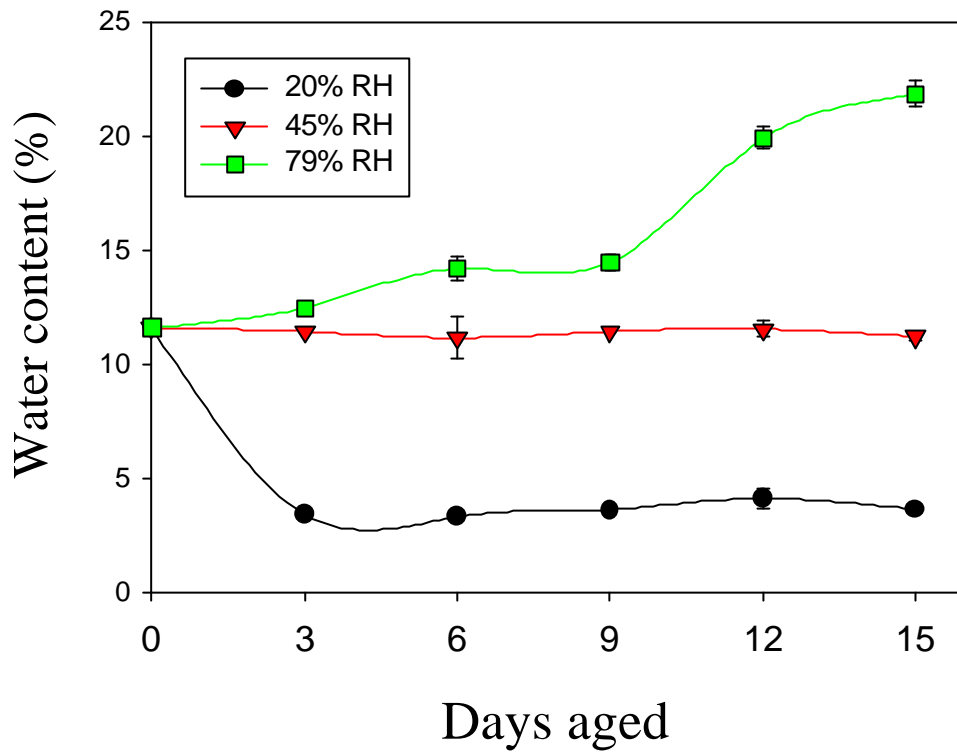


Figure 3. Changes in seed water content during accelerated aging at 50 °C and 45% relative humidity. 1994-T5 mung bean seeds were incubated at 50 °C in 20%, 45% and 79% relative humidity for 3, 6, 9, 12 and 15 days and the water content of seeds was measured as described in Materials and Methods

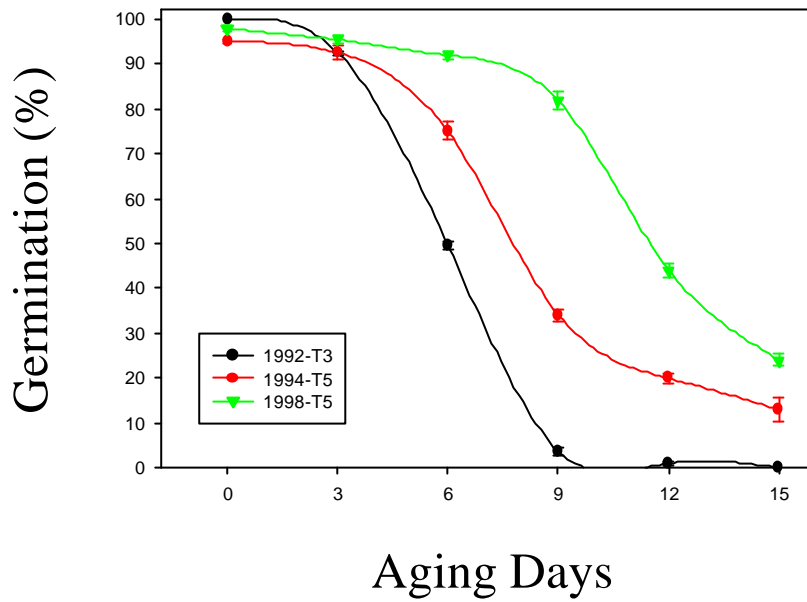


Figure 4. Germination of mung bean seeds, harvested in different years versus days of accelerated aging. Mung bean harvested in 1992, 1994 and 1998 were aged and examined for germination rate.

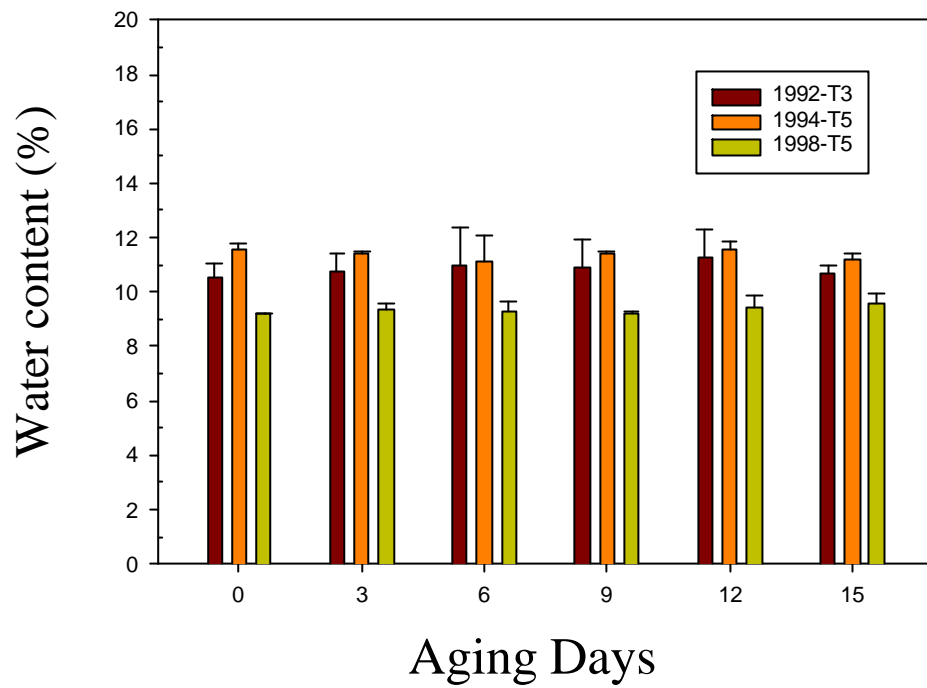


Figure 5. Water contents of mung bean seeds harvested in different years versus days of accelerated aging. 1992-T3, 1994-T5 and 1998-T5 mung bean seeds were acceleratedly aged for 3, 6, 9, 12 and 15 days and subjected to water content analysis.

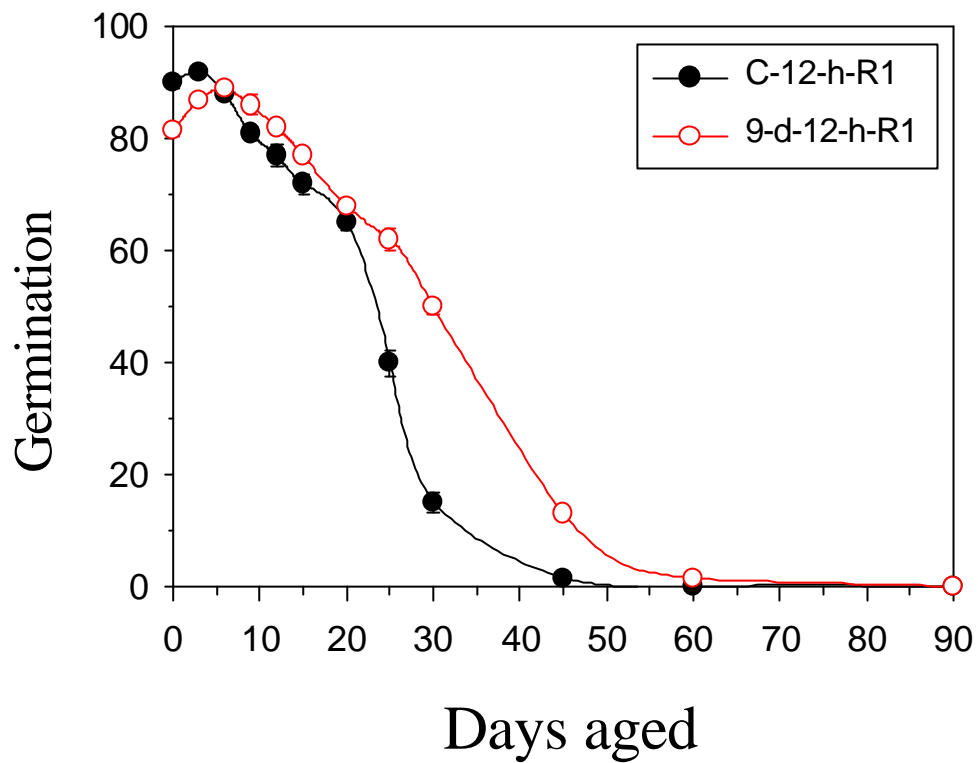


Figure 6. Comparison of germination rate of R1 seeds. Two kinds of R1 seeds, C-12-h-R1 and 9-d-12-h-R1, were acceleratedly aged for 90 days. Samples were taken for determination of germination rate at various time intervals. 12 h imbibed seedlings of mung bean that had been aged for 9 days were grown up to mature plants. Seeds of these plants are called 9-d-12-h-R1. While seeds of control mung bean are called C-12-h-R1.

A

B

Figure 7. Evaluation of seed vigour with TTC staining. A, control seeds (1994-T5). B, Seeds (1994-T5) aged for 15 days. 1994-T5 seeds were imbibed for 2 h, germinated for 12 h and stained with TTC

Figure 8. The aged seeds with different length of axis stained with TTC.
After 9 day accelerated aging, 1994-T5 mung bean were imbibed
for 2 h, germinated for 12 h and stained with TTC.

A

B

Figure 9. Examination of the viability of mung bean seedlings with Evan' s
Blue staining. A, control seeds. B, seeds aged for 15 days.

Figure 10. Evan's Blue staining patterns in axis between control (left) and 9 days acceleratedly aged (right) seeds. 1994-T5 control and aged seeds were imbibed for 2 hrs, germinated for 12 hrs and subjected to Evan's Blue staining.

Figure 11. Evan's Blue staining patterns in cotyledon between control (upper) and 9 days acceleratedly aged (lower) seeds. Experimental procedures were the same as that Fig. 10.

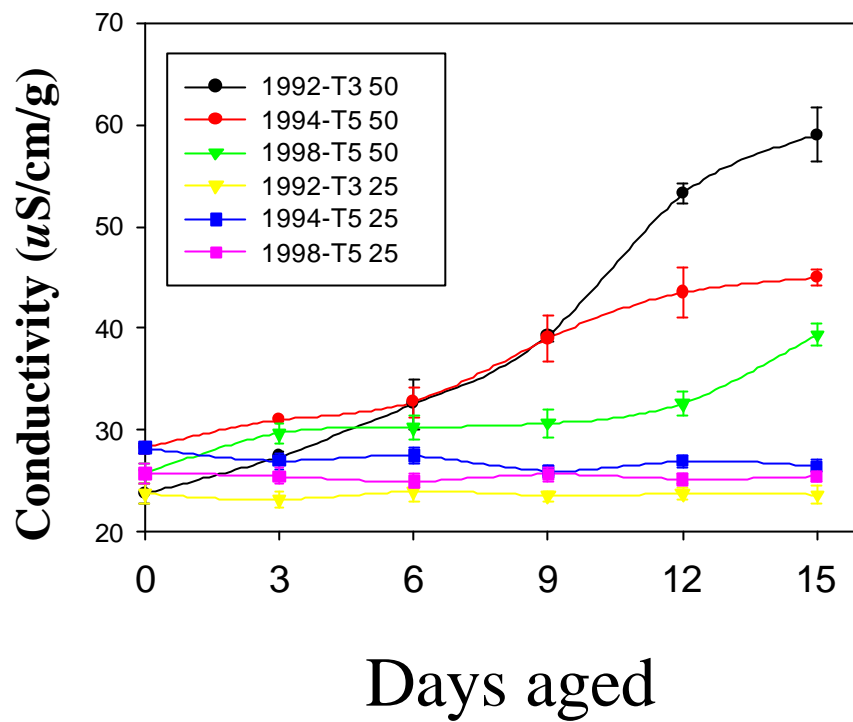


Figure 12. Conductivities of mung bean seeds harvested different years and aged for 3~15 days. Measurement of conductivity is described in Materials and Methods.

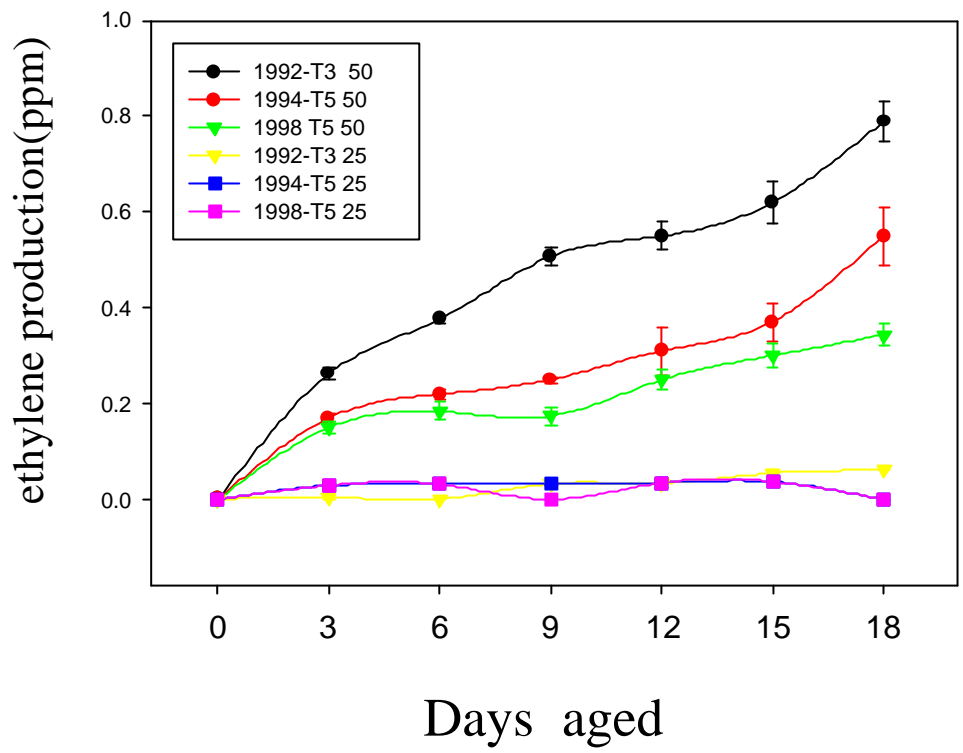
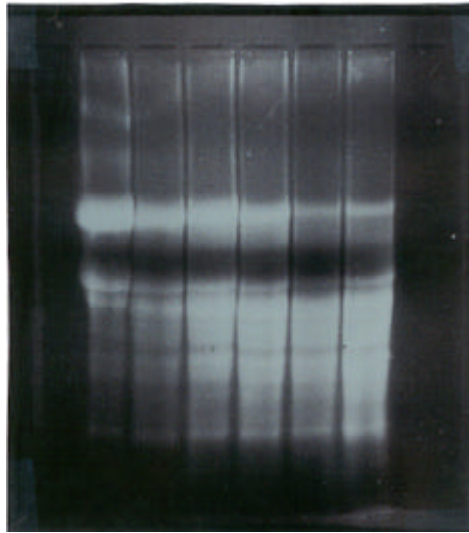


Figure 13. The ethylene production of acceleratedly aged mung bean seeds harvested in different years. Analysis of ethylene is described in Materials and Methods.



0 3 6 9 12 15 days aged

Figure 14. Electrophoresis of total RNA extracted from acceleratedly aged mung bean seeds. Total RNA was extracted from aged 1994-T5 seeds as described in Materials and Methods. 25 μ g total RNA were analyzed with agarose gel electrophoresis and stained with EtBr.



0 3 6 9 12 15 days aged

Fig. 15. Electrophoresis of total RNA of the seedlings of acceleratedly aged mung beans. After imbibition for 2 hrs and germination for 12 hrs, total RNA was extracted from aged 1994-T5 seeds as described in Materials and Methods. 25 μ g total RNA were analyzed with agarose gel electrophoresis and stained with EtBr.

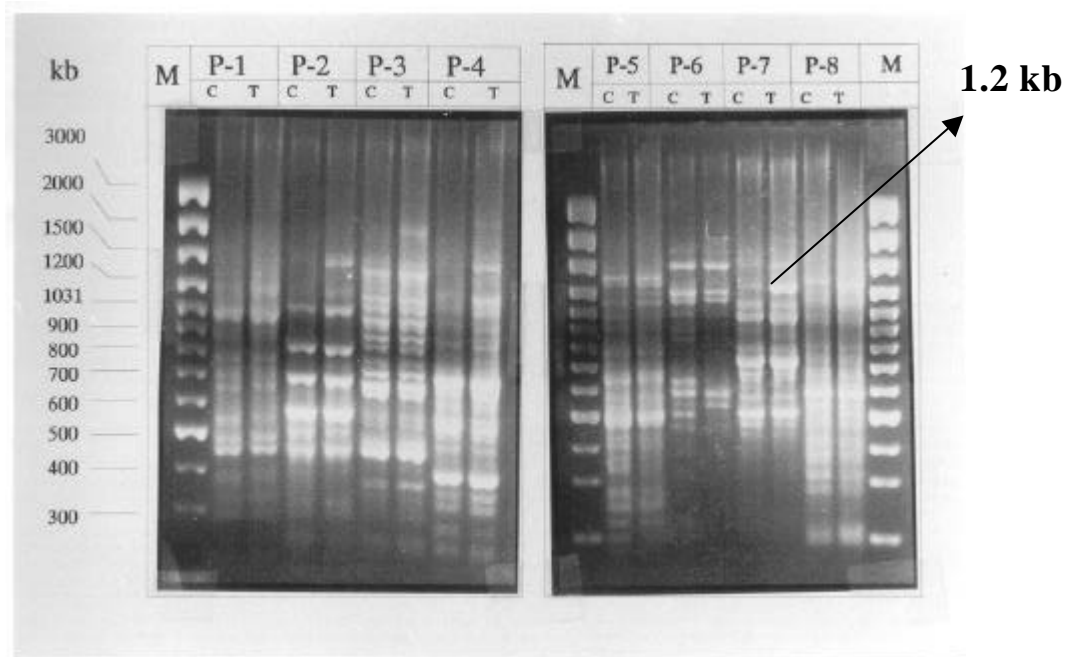


Figure 16. mRNA differential display analyses of non-aged (C) and aged (T) seedlings using designed primers. Arrow indicates a differentially expressed fragment (1.2 kb). The differentially expressed mRNAs were displayed by using designed primers (P-1 to P-8) in PCR. Arrow indicates the 1.2 kb fragment differentially expressed in accelerated aged seedlings.

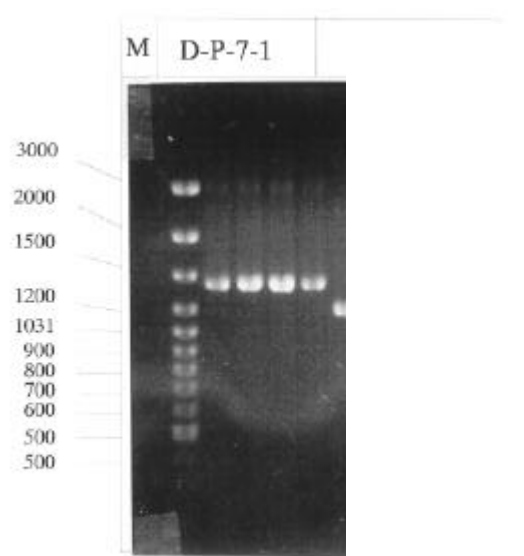


Figure 17. Screening of cDNA clones harboring the 1.2 kb fragment with colony PCR method. 1.2 kb fragments were isolated from agarose gel and then ligated into pGEM-T easy vector. After transformation, the positive clone was screened by using colony PCR.

TCGCCGCTTACTCCTCTTTCTTCTCCTGCTTACGCACCTCATAGCCACAACCCCAATTCAA60
61 GCAGGAGAAAATCTCTCTCTTTCTCTCTCCTTCTCTTTGTCTTACGCCGGCATCACC120
121 ATGGCCTCAGTCTCTCTCTCTGCCACTGACACCACCCTCCAAGAAACCAAGAAGCAAAGC180
1 M A S V S L S A T D T T L Q E T K K Q S 20

181 GCCAAGAAAGCCAAGAACCAATCCCCAACCATTGCAGAGAAGAAGAGTGCCTCCAAACTC240
21 A K K A K N Q S P T I A E K K S A S K L 40

241 CTTTCTGATCCCAACACCCCGATCCCGACCAAGATGGGGTTTTCGGGGAAGCTCCAGAAG300
41 L S D P N T P D P D Q D G V S G K L Q K 60

301 AAGGCGAAGAAGCGTAAGGCTTCAGACATAGAGGCTATGGCGGCGACCAACGATGCCGAC360
61 K A K K R K A S D I E A M A A T N D A D 80

361 GAAGACACTAGTTCCGAGCTGGTGGAGCCCGAATCTTCTAGAGAAGACGACCACAAGAAG420
81 E D T S S E L V E P E S S R E D D H K K 100

421 AAGAAAAAGAAGAAAAAGGCCAAGTCCGAGGAACAACCTTTGGTGATGGAAGCAGAGGAA480
101 K K K K K K A K S E E Q P L V M E A E E 120

481 AAAGAAGAGAAGAAGGAGGATCCTAATGCGGTCTCCAAACTCAGGATATCTGAACCGTTG540
121 K E E K K E D P N A V S K L R I S E P L 140

541 AGGCTAAAATTGAAGGAGAAGGGGATCGAATCCTTGTTTCTATTTCAGGCCATGACTTTTC600
141 R L K L K E K G I E S L F P I Q A M T F 160

601 GATTTAGTTCTCGACGGTTCTGATTTGGTTGGTTCGGGCTCGCACTGGTCAGGGTAAAAC660
161 D L V L D G S D L V G R A R T G Q G K T 180
(I)

661 CTGGCATTGTGCTACCCATATTGGAGTCTTTAATAAATGGTCCGACTAAATCTTCTAGA720
181 L A F V L P I L E S L I N G P T K S S R 200

721 AAGACAGGCTACGGGAGAACTCCAAGTGTTCTTGTGCTTCTACCAACTAGGGAATTGGCT780
201 K T G Y G R T P S V L V L L P T R E L A 220
(Ia)

781 TGTCGGGTGCATGCTGATTTTTGAAGTTTATGGTGGAGCGATGGGATTGAGTTCATGTTGT840
221 C R V H A D F E V Y G G A M G L S S C C 240

841 TTGTATGGTGGAGCTCCATATAACACTCAAGAAATCAAGCTTAGGAGAGGTGTTGATATT900
241 L Y G G A P Y N T Q E I K L R R G V D I 260

901 GTAATTGGCACACCAGGTCGTGTTAAGGATCATATCGAGAGGGGAAATATAGACCTGAGC960
261 V I G T P G R V K D H I E R G N I D L S 280

961 CAACTAAAATTCGGTGTCTTGGATGAAGCAGATGAAATGCTGAGGATGGGTTTTGTTGAA1020
281 Q L K F R V L D E A D E M L R M G F V E 300
(II)

1021 GATGTTGAGTTGATTCTAGGGAAGGTTGAAAATGTTAATAAAGTTCAGACTCTTCTTTTC1080
301 D V E L I L G K V E N V N K V Q T L L F 320

1081 AGCGCTACTTTACCAGACTGGGTTAAACATATTGCTGCACAATTTCTGAAGCCAGATAAG1140
321 S A T L P D W V K H I A A Q F L K P D K 340
(III)

1141 AAAACTGCTGACCTTGTTGGAAATACAAAAATGAAGGCTAGTACCAATGTGAGACATATT1200

341 K T A D L V G N T K M K A S T N V R H I 360
 1201 GTTCTCCCTTGTCTGCTCCTGCCAGGTCCCAACTTATCCCGGACATTATTCGCTGTTAT1260
 361 V L P C S A P A R S Q L I P D I I R C Y 380
 1261 AGCAGTGGAGGCCGACAATTATATTTACCGAGACAAAGGAGTCTGCTTCTCAGCTTGCA1320
 381 S S G G R T I I F T E T K E S A S Q L A 400
 (IV)
 1321 GGGTTGTTACCTGGAGCTAGAGCTCTCCATGGTGACATACAACAAGCACAACGTGAGGTT1380
 401 G L L P G A R A L H G D I Q Q A Q R E V 420
 1381 ACTCTGTTTGGCTTCAGGTCTGGGAAATTCATGACATTAGTTGCTACAAATGTGGCAGCT1440
 421 T L F G F R S G K F M T L V A T N V A A 440
 1441 CGAGGTCTTGATATAAATGATGTTTCAGTTAATTATCCAGTGTGAGTTCCCACGGGAGGTA1500
 441 R G L D I N D V Q L I I Q C E F P R E V 460
 (V)
 1501 GAGTCCTATATCCATCGTTCTGGACGAACAGGAAGAGCAGGTAATACTGGGGTTGCTGGT1560
 461 E S Y I H R S G R T G R A G N T G V A G 480
 (VI)
 1561 ACCCTTTATGATCCAAAAAGATCTAATATATCTAAAATAGAAAAGAGAGTCCGGTGTAAAA1620
 481 T L Y D P K R S N I S K I E R E S G V K 500
 1621 TTTGAGCACATATCTGCCCCACGGCCTGATGATATTGCTAAAGCTGTTGGTGGGGAAGCT1680
 501 F E H I S A P R P D D I A K A V G G E A 520
 1681 GCTGAAATGATTACCCAAGTTTCCGATAGTGTGATTCTCCTGCGTTCAAAGAAAACCGCAGAA1740
 521 A E M I T Q V S D S V I P A F K E T A E 540
 1741 GAGCTTTTGAAGAGTTCTGGTTTAAACAGTTGTTGAATTGCTAGCAAAGGCTCTTGCAAAG1800
 541 E L L K S S G L T V V E L L A K A L A K 560
 1801 GCTGTTGGCTATACCGAAATAAAGCAAAGATCACTTCTCACTTCCATGGAGAACTATGTT1860
 561 A V G Y T E I K Q R S L L T S M E N Y V 580
 1861 ACTTTGCTTCTTGAGATTGGGAAACCAATCTTCACTCCTTCTTTTGCCTATGGAATCCTG1920
 581 T L L L E I G K P I F T P S F A Y G I L 600
 1921 AGGAGATTTTTGCCTGAAGAGAAGGTGGAGGCTGTGAAAGGTCTTTCCCTCACTGCCGAT1980
 601 R R F L P E E K V E A V K G L S L T A D 620
 1981 GGAAATGGTGTCTGTTTTTGTATGTACCAGCTGAAGATTTAAATACATATCTTAGTGGTCAG2040
 621 G N G A V F D V P A E D L N T Y L S G Q 640
 2041 GAAAATGCTGCTAATGTAAGTTTGTAGAGGTATTGAAAGCTTTGCCACGTTTGCAACAGAGA2100
 641 E N A A N V S L E V L K A L P R L Q Q R 660
 2101 GATCAATCAAGAGGTGGCAGATTTGGTGACGGTGGTGGTCAAGGTGGTGGGAACAGGTTT2160
 661 D Q S R G G R F G D G G G Q G G G N R F 680
 2160 GGAAGAGGCGGGGGGAGGCAGAAAACGGTAGATTTTCAAATGATAGGTTTTCCAATGGTGGT2220
 681 G R G G G R N G R F S N D R F S N G G 700
 2221 GGAAGAGGTGGTTCGTGGAAACTGGGGTGGAAAAAGATGGTGAGTTTTTCTCACTCTGCACT2280
 701 G R G G R G N W G G K R W * 720
 2281GTCTGGTAGCATTACTGCATAGCTGCTTCGTGGAAAAAATAGTTGATGCTGGCTAGGC2340

Figure 18. (A) The nucleotide and deduced amino acid sequence of VrRH1.

VrRH1: 127 DPNAVSKLR ISEPLRLKLKEKGI E SLFPIQAMTFDLVLDGSDLVGRARTGQGGKTLAFVLP 186
+PNAVSKRISPLRKLK GIE+LFPIQA TFD+VLDG+DLVGRARTGQGGKTLAFVLP

A. t. : 94 NPNAVSKFRISAPLREKLKANGIEALFPIQASTFDMVLDGADLVGRARTGQGGKTLAFVLP 153
S. o. : 105 DPNSLSNFRISKPLKDVLSKGIKALFPIQAMTFDNVDGCDLVGRARTGQGGKTLAFVLP 164
(I)

VrRH1: 187 ILESLINGPTKSSRKTGYGRTPSVLVLLPTRELA CRVHADFEVYGGAMGLSSCCLYGGAP 246
ILES+NGP KS RK GYGR+PSVLVLLPTRELA +V ADF+ YGG++GLSSCCLYGG

A. t. : 154 ILESVNGPAKSKRKMGYGRSPSVLVLLPTRELA KQVAADFAYGGSLGSSCCLYGGDS 213
S. o. : 165 IVESLVNGRTKDLRRSGHGR LPSVLVLLPTRELA TQVLADFQVYGGAVGLTACSVYGGAP 224
(I a)

VrRH1: 247 YNTQEIKLRRGVDIVIGTPGRVKDHI ERGNIDLSQLKFRVLDEADEMLRMGFVEDVELIL 306
QE KL+RGVDIV+GTPGR+KDHIER N+D S KFRVLDEADEMLRMGFVEDVELIL

A. t. : 214 IPVQEGKLKRGVDIVVGTGPRIKDHIERQNLD FSYFKFRVLDEADEMLRMGFVEDVELIL 273
S. o. : 225 FHSQISSLTRGVDIVVGTGPRVKDLLEKGV LKLG SLLFRVLDEADEMLKMGFVDDVELIL 284
(II)

VrRH1: 307 GKVENVNKVQTL LFSATLPDWVKHIAAQFLKPKKTADLVGNTKMKASTNVRHIVLPCSA 366
GKVE+ KVQTL LFSATLP WVK+I+ +FLK D+KT DLVGN KMKAS +VRHI +PC+

A. t. : 274 GKVEDSTKVQTL LFSATLP SWVKNI SNRFLKRDQKTIDL VGNDKMKASNSVRHIAIPCNK 333
S. o. : 285 GKVDHVS KVQTL LFSATLP SWVKQI STRFLKSAKKTVDLVSDQKMKASISVRHIVIPCSA 344
(III)

VrRH1: 367 PARSQLIPDIIRCYSSGGRTIIFTEETKESASQLAGLLPGARALHGD IQQAQREVTLGFR 426
A ++LIPDII CYSSGG+TIIF ETK S+L+GLL G+RALHG+I Q+QREVTL GFR

A. t. : 334 AAMARLIPDIIRCYSSGGQTIIFAETKVQVSELSGLLDGSRALHGE IPQSQREVTLGFR 393
S. o. : 345 SARPDLIPDIIRCYSSGGRSIIIFTEETKESASQLAGLLTGARPLHGD IQQTQREVTLGFR 404
(IV)

VrRH1: 427 SGKFM TLVATNVAARGLDINDVQLIIQCEFPREVESYIHRSGRTGRAGNTGVAGTLYDPK 486
+GKF TLVATNVAARGLDINDVQLIIQCE PREVE+YIHRSGRTGRAGNTGV TLYD +

A. t. : 394 NGKFATLVATNVAARGLDINDVQLIIQCEPPREVEAYIHRSGRTGRAGNTGVPVTLYDSR 453
S. o. : 405 TGKFMTLVATNVAARGLDINDVQLIIQCEPPRDVEDYIHRSGRTGRAGNTGVAVMLYDPK 464
(V) (VI)

VrRH1: 487 RSNISKIERESGVKFEHISAPRPDDIAKAVGGEAAEMITQVSDSVIPAFKETA EELLKSS 546
+S++S+IE+E+G+KFEH++AP+PD+IA++ G EAAE + QV DSV+PAF E A+ELL++S

A. t. : 454 KSSVSRIEKEAGIKFEHLAAPQPDEIARSGMEAAEKVKQVCDSVVP AFLEAAKELLETS 513
S. o. : 465 RSSVTKIERESGVKFEHLSAPQPVDVAKAVGIEAAAAI LQISDSVIPAFKDAAEELLSTS 524

VrRH1: 547 GLTVVEXXXXXXXXXXVGYTEIKQRSLTSMENYVTLLEIGKPIFTPSFAYGILRRFLPE 606
GL+ G+TEIK+RSLTSMENYVTL LE GKPI++PSF YG+LRR LP+

A. t. : 514 GLSAEVLAKALAKTAGFTEIKKRSLTSMENYVTLHLEAGKPIYSPSFVYGLLRVLPD 573
S. o. : 525 GLSAVDILSKALAKAAGYS DIKERSLLTGM EGYVTL LLDAGRPFGQSFAYTVLKRFLPA 584

Figure 18. (B) VrRH1, *Vigna radiata* RNA helicase I; A. t., *Arabidopsis thaliana* PRH 75 (AtRH7); S. o., Spinach oleraceae PRH75.

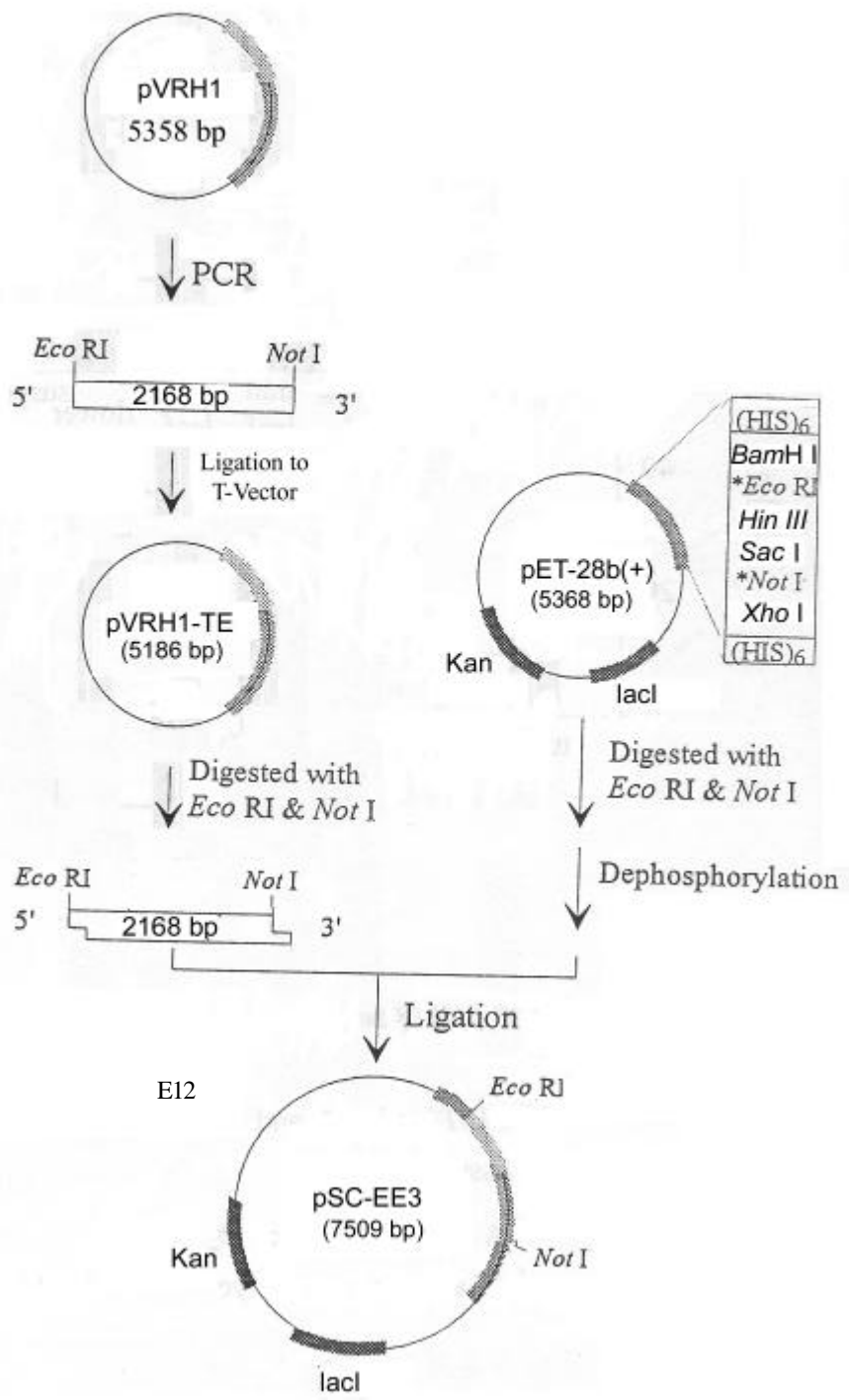


Figure 19. The flow chart of *VrRH1* expression vector (pSC-EE3) construction. The 2168 bp coding region of *VrRH1* was released from pVRH1-TE by *Eco*RI and *Not*I digestion and subcloned to pET-28b(+) expression vector digested with *Eco*RI and *Not*I. The positive clone of pSC-EE3 was screened by colony PCR.

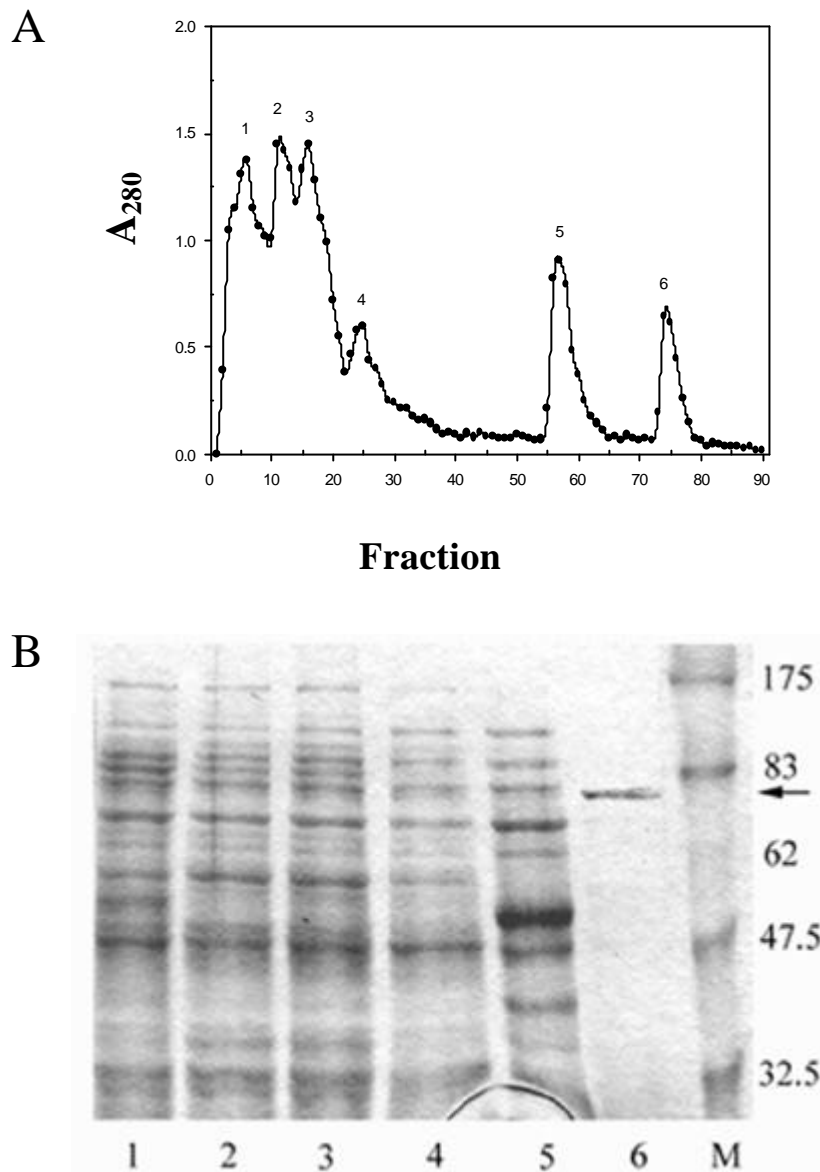


Fig. 20. Expression and purification of His-VrRH1.
 (A) Elution profiles of His-tagged VrRH1 protein on Ni^{2+} -Agarose column. Total proteins (103 mg) from cell free extract of *E.coli* BL21 (DL3) carrying pET-VrRH1 were loaded onto the column and washed sequentially with 5 mM imidazole in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)/0.2 M NaCl (fractions 1~50) and 30 mM imidazole in the same buffer (fractions 51~70). His-VrRH1 was then eluted with 300 mM imidazole in 50 mM Tris-HCl (pH7.5)/20 mM NaCl/14 mM β -mercaptoethanol / 50% glycerol (fractions 71~80). (B) Proteins purified from each step were analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Protein peaks: 1~6, lanes 1~6, respectively. An arrow indicates His-VrRH1 band.

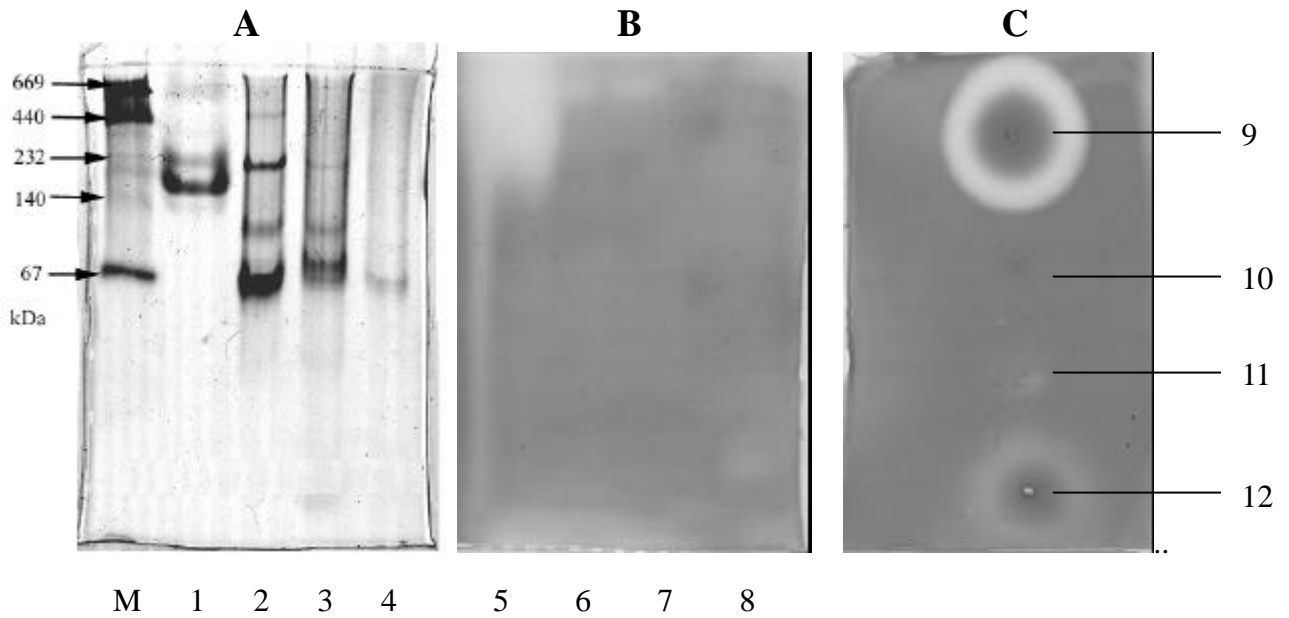


Figure 21. Proteinase activity of His-VrRH1. 5 μ g each of commercial protease and partially purified His-VrRH1 were separated on gelatin-containing native gel. 1~4, CBR staining of differentially of different fractions of purified His-VrRH1. 5~8, gelatin hydrolyzing activities of 1~4, respectively. 9~12, dot blot assays of 1~4, respectively.

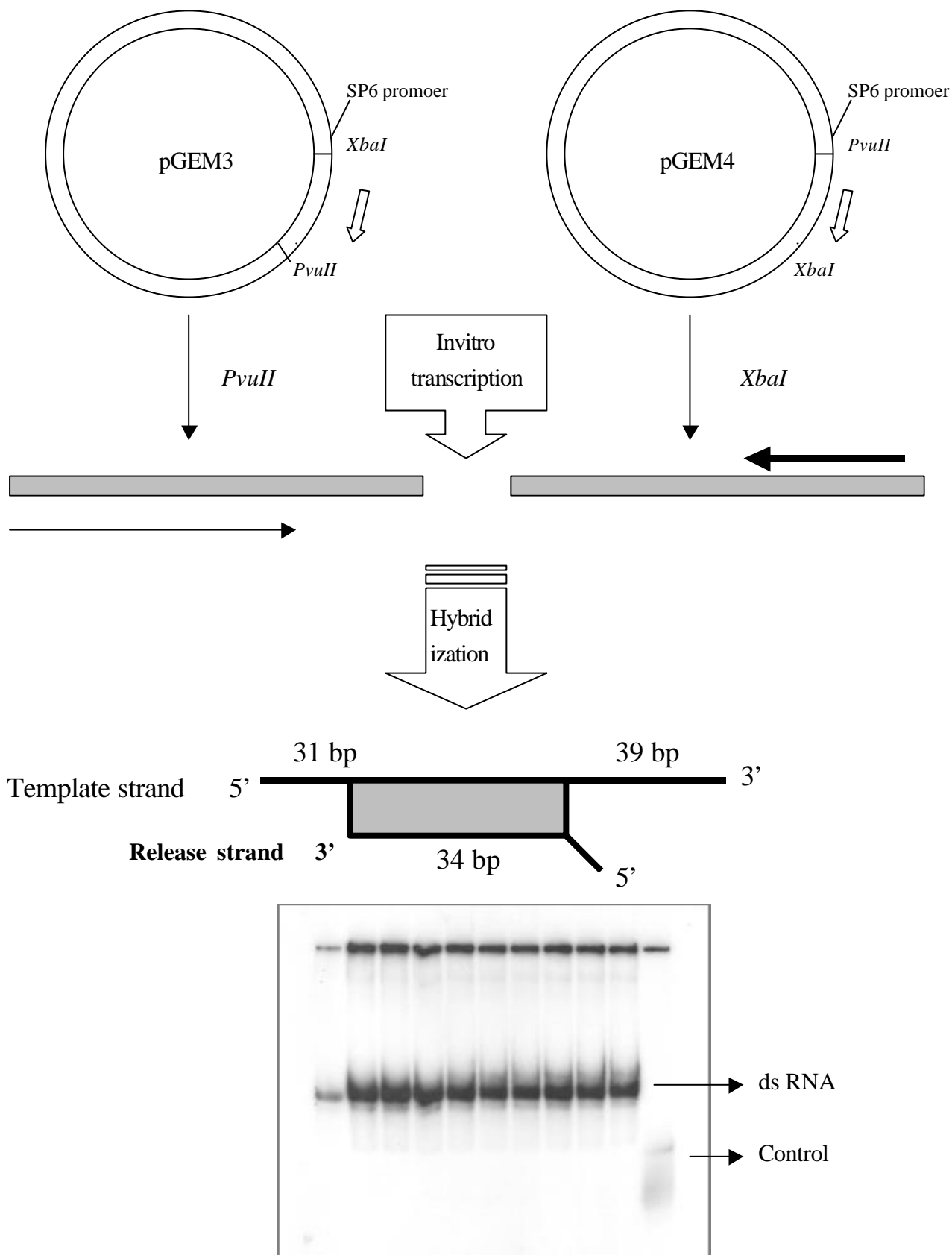


Figure 22. Schematic chart for double stranded RNA preparation.

A

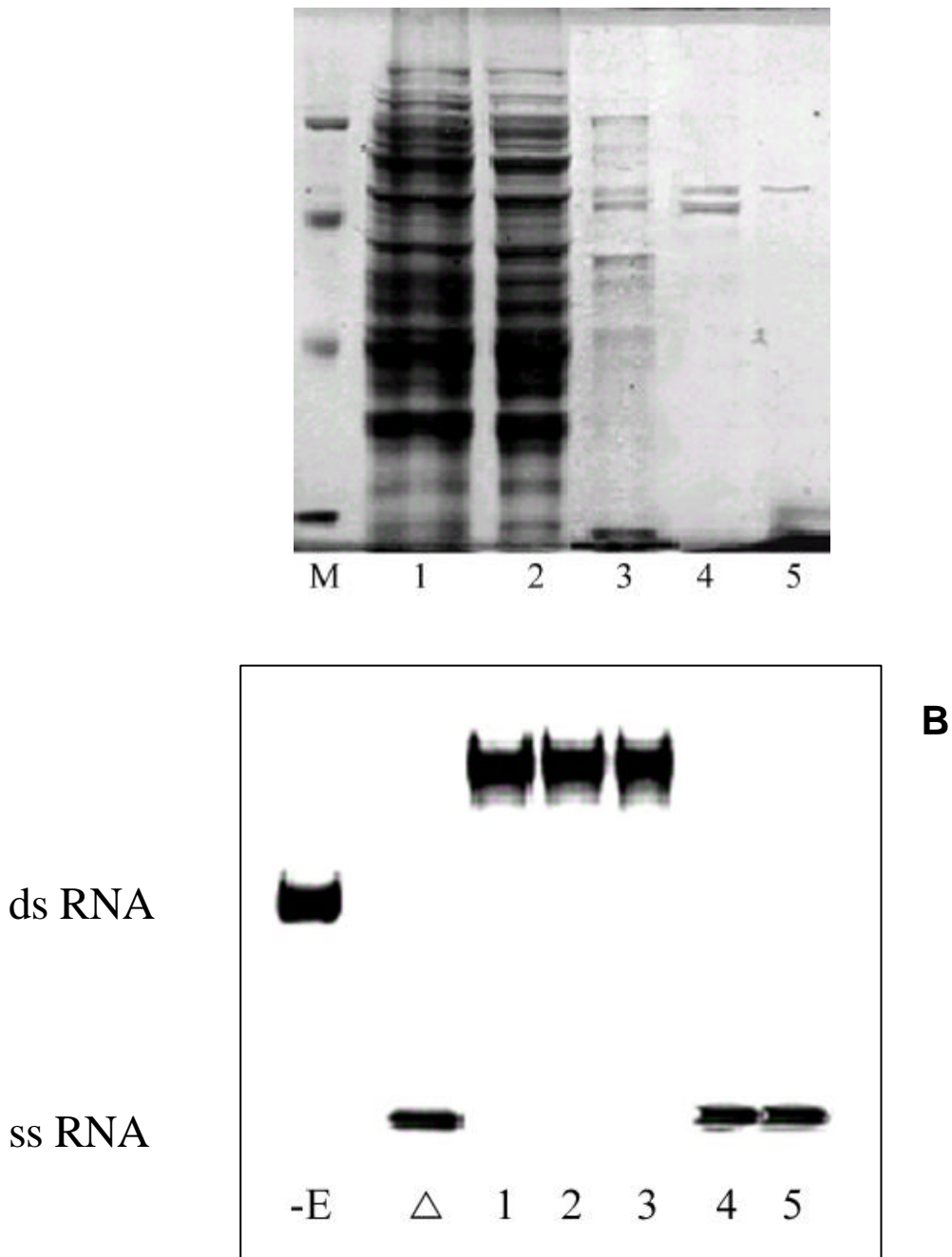


Figure 23. Double stranded RNA unwinding assay of His-VrRH1 recombinant protein. Recombinant proteins were extracted by sonication (lane 1), pass-through Ni^{2+} -column (lane 2), 5 mM imidazole washing (lane 3), 30 mM imidazole elution (lane 4) and finally 300 mM imidazole elution (lane 5). Panel A, the SDS-PAGE; Panel B, double stranded RNA unwinding assay. Δ indicates that the double stranded RNA substrates were heated at 95 °C for 5 minutes.

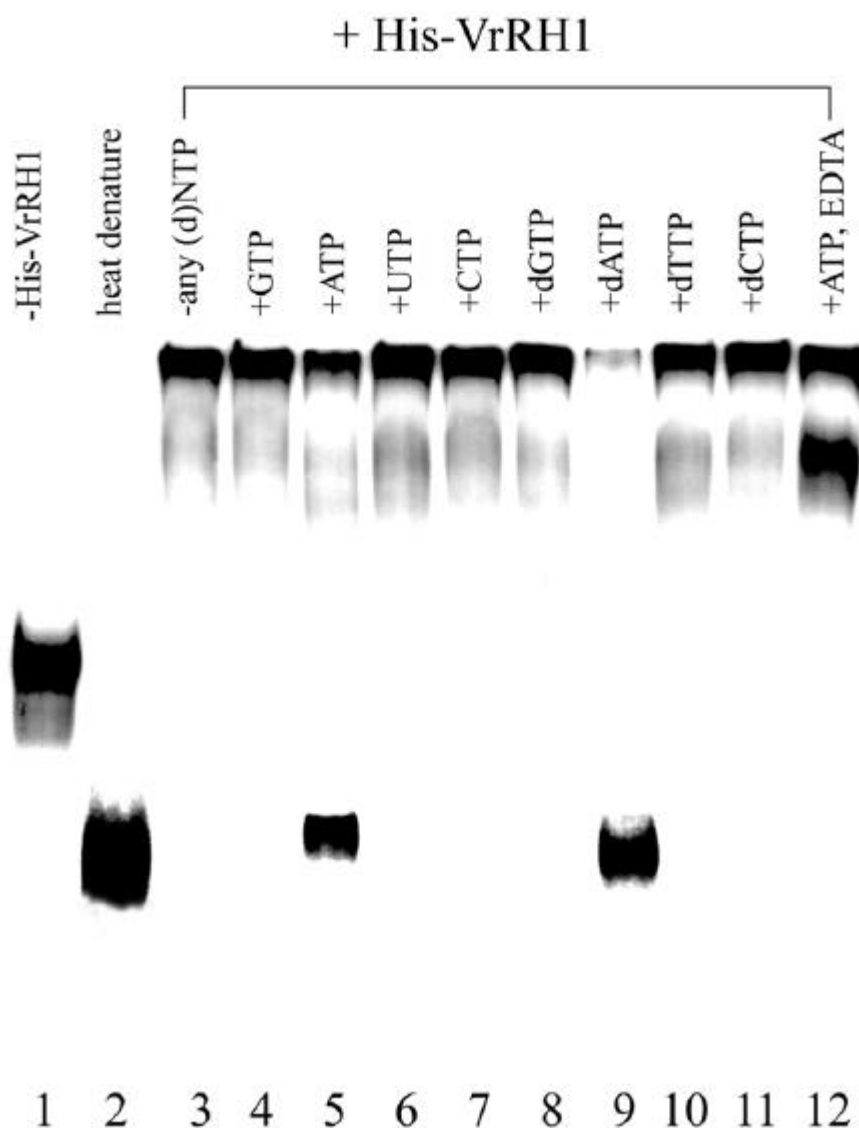


Fig. 24. RNA unwinding activity of VrRH1. The RNA substrate was incubated with His-VrRH1 the presence of (d)NTPs (lanes 4-11). The products of the reaction were separated by 8% native PAGE and the radiolabeled strand was visualized by autoradiography. Lane 1, the substrate RNA incubated under the enzyme assay conditions without His-VrRH1; Lane 2, the substrate incubated for 10 min at 95 without His-VrRH1; lane 3, reaction in the absence of (d)NTP.

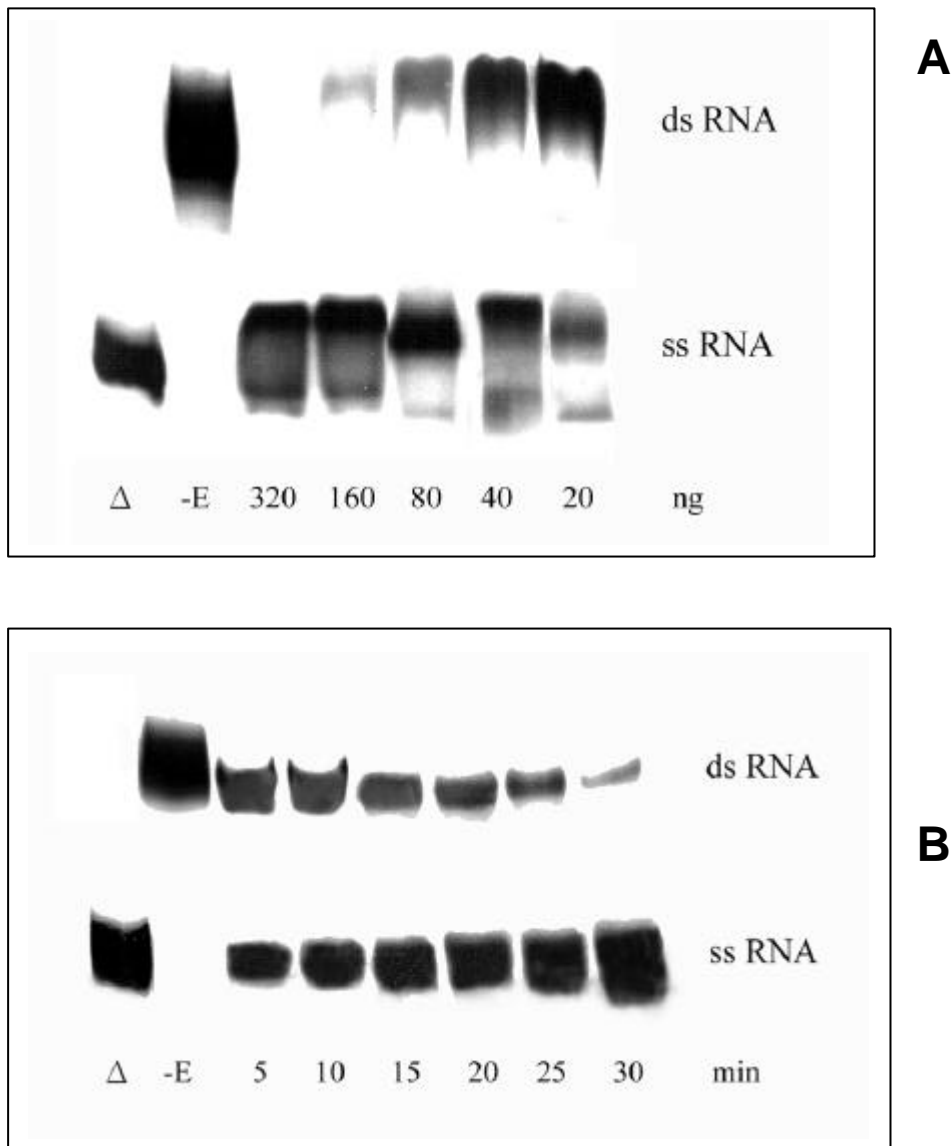


Fig. 25. Effect of His-VrRH1 concentration on unwinding activity (A) and time course of RNA helicase activity (B). In (A), various amounts of the recombinant His-VrRH1 (320-20 ng) were used for the assay of dsRNA unwinding activity. In (B), 160 ng His-VrRH1 was used for assaying the RNA unwinding activity. The reactions were carried out at different time intervals (5, 10, 15, 20, 25, 30 min). , heating at 95 for 10 min. - E, without His-VrRH1.

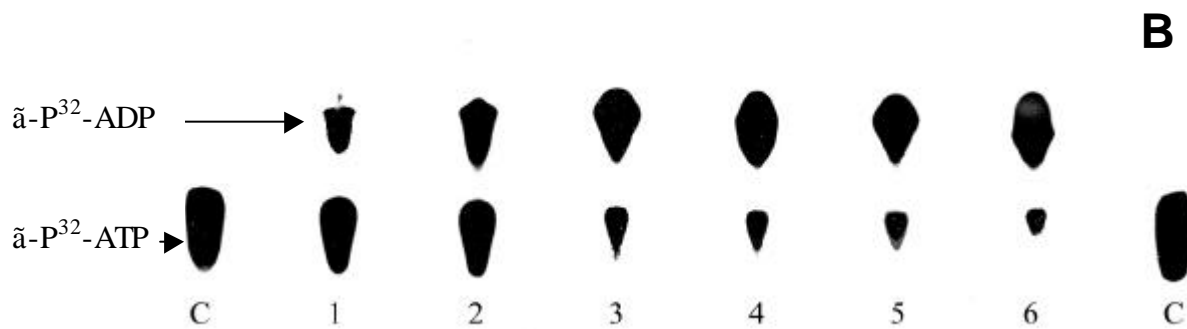
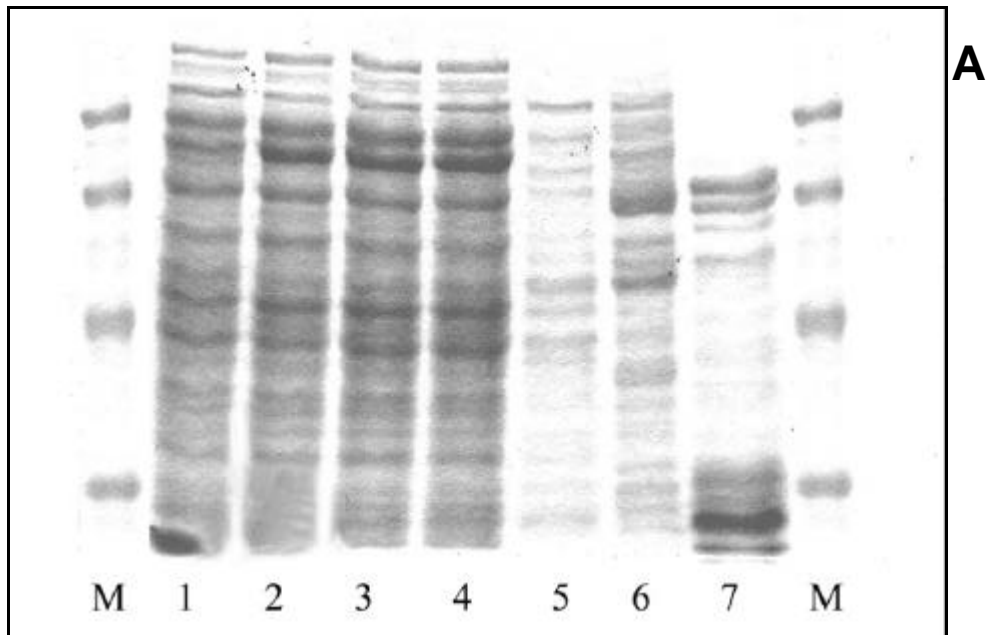


Figure 26. ATPase activity assay of His-VrRH1 recombinant protein. Panel A, the SDS PAGE; lane 1, crude extract; lane 2 to lane 7 indicate the samples collected from the peaks (1 to 6) mentioned as in figure 28. Panel B, the ATPase activity assay; lane 1 to 4 as mentioned above, lane 5 and 6 indicate the 30 and 300 mM imidazole elutions (peaks 5 and 6 respectively). C, assayed without protein.

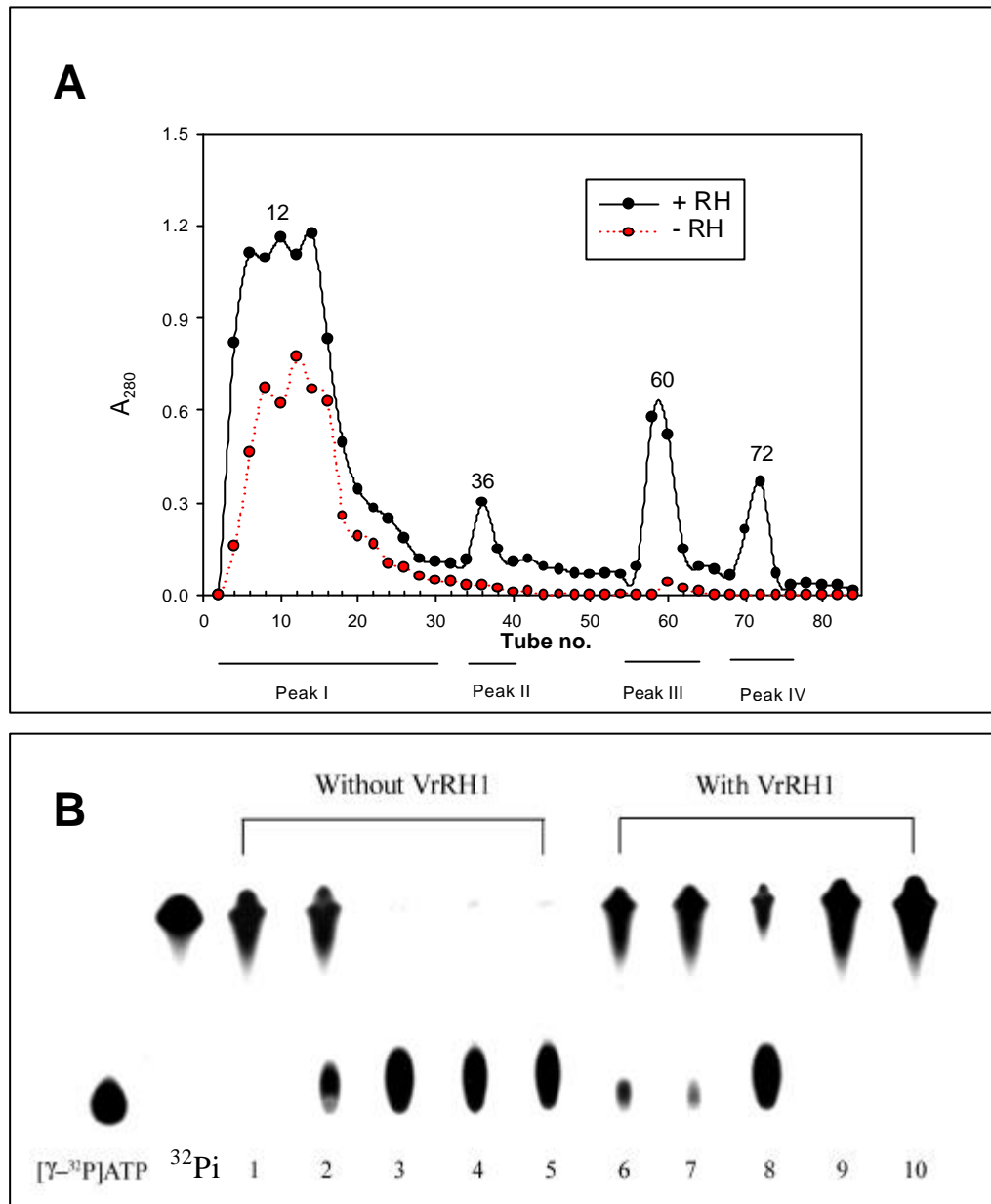


Fig. 27. The examination for non-specific ATPase activity. (A) Chromatography of cell-free extracts of *E. coli* harboring pET28b(+) with (CE + RH) and without VrRH insert (CE - RH) on Ni^{2+} -Agarose column. (B). ATPase activity of protein fractions obtained from the Ni^{2+} -Agarose chromatography shown in Fig. II. The reaction mixture in a final volume of 10 μl contained 80 μM ATP, 0.32 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol, Amersham), 50 mM HEPES (pH 7.5), 2.5 mM MgCl_2 and 160 ng protein each from Peaks I, II, III and IV.

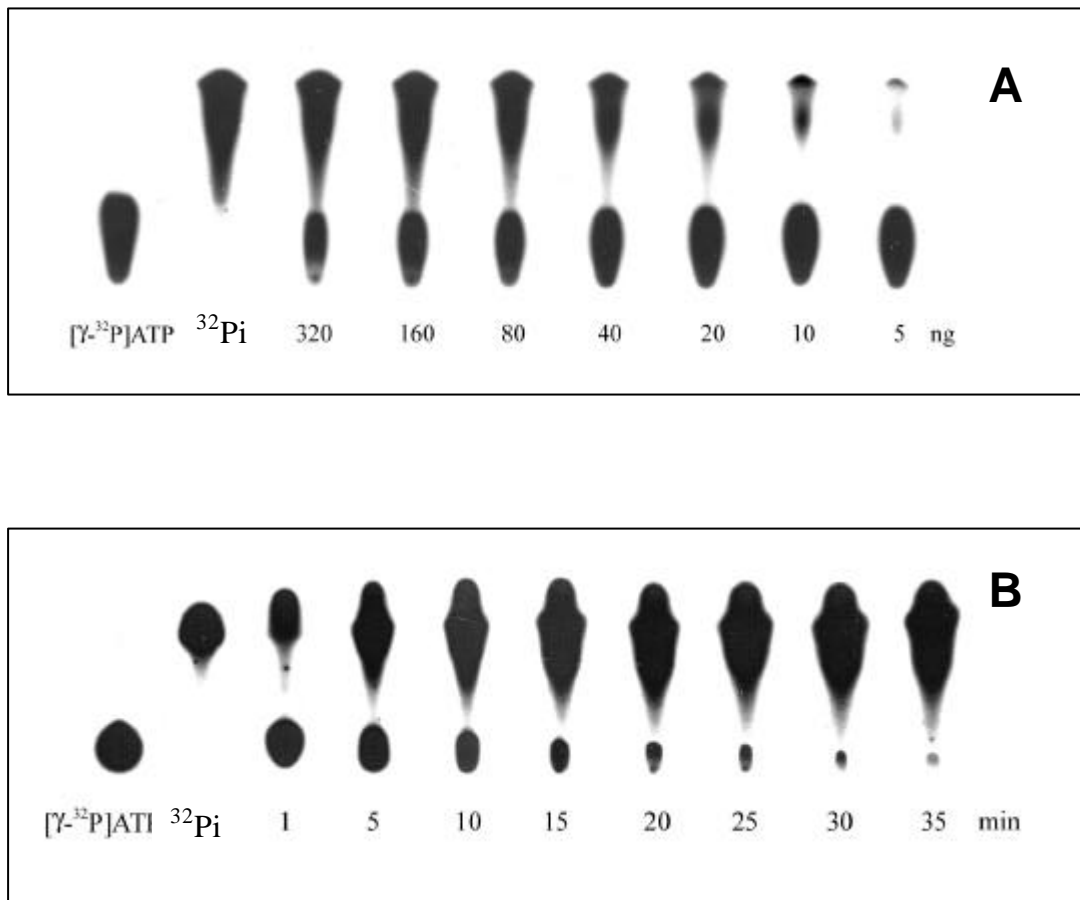


Fig. 28. Chromatograms showing the dependence of ATPase activity on His-VrRH1 concentration (A) and reaction time (B). The experimental details are described in Materials and Method. In (A), various amounts of the recombinant His-VrRH1 (320-5 ng) were used for the assay of ATPase activity. In (B), 160 ng His-VrRH1 was used for assaying the ATPase activity.

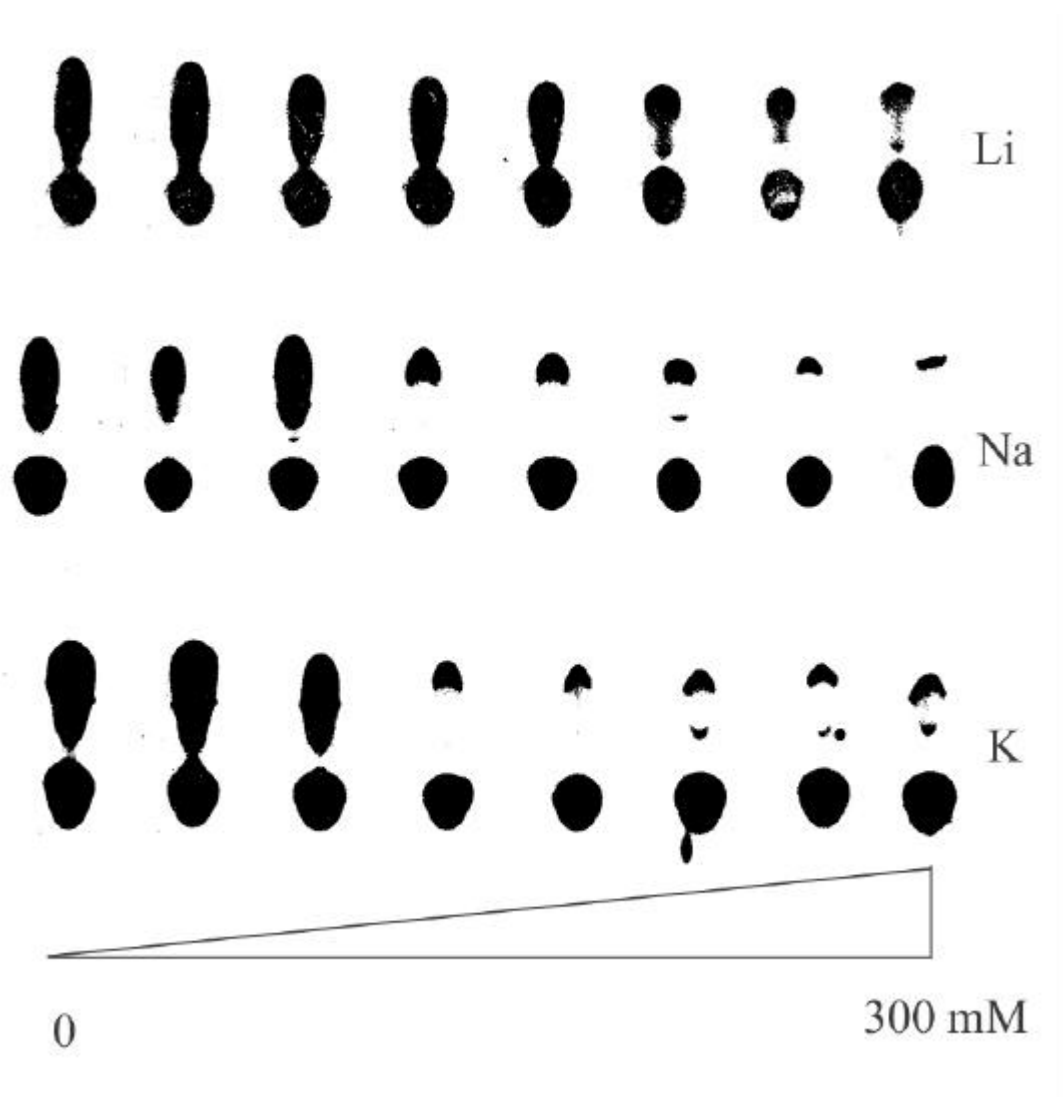


Figure 29. The inhibitory effect of Li^+ , Na^+ and K^+ on ATPase activity of VrRH1.

Series graded (0 to 300 mM in 50 mM interval) concentration of LiCl, NaCl and KC were separately applied in the reaction of ATPase activity assay

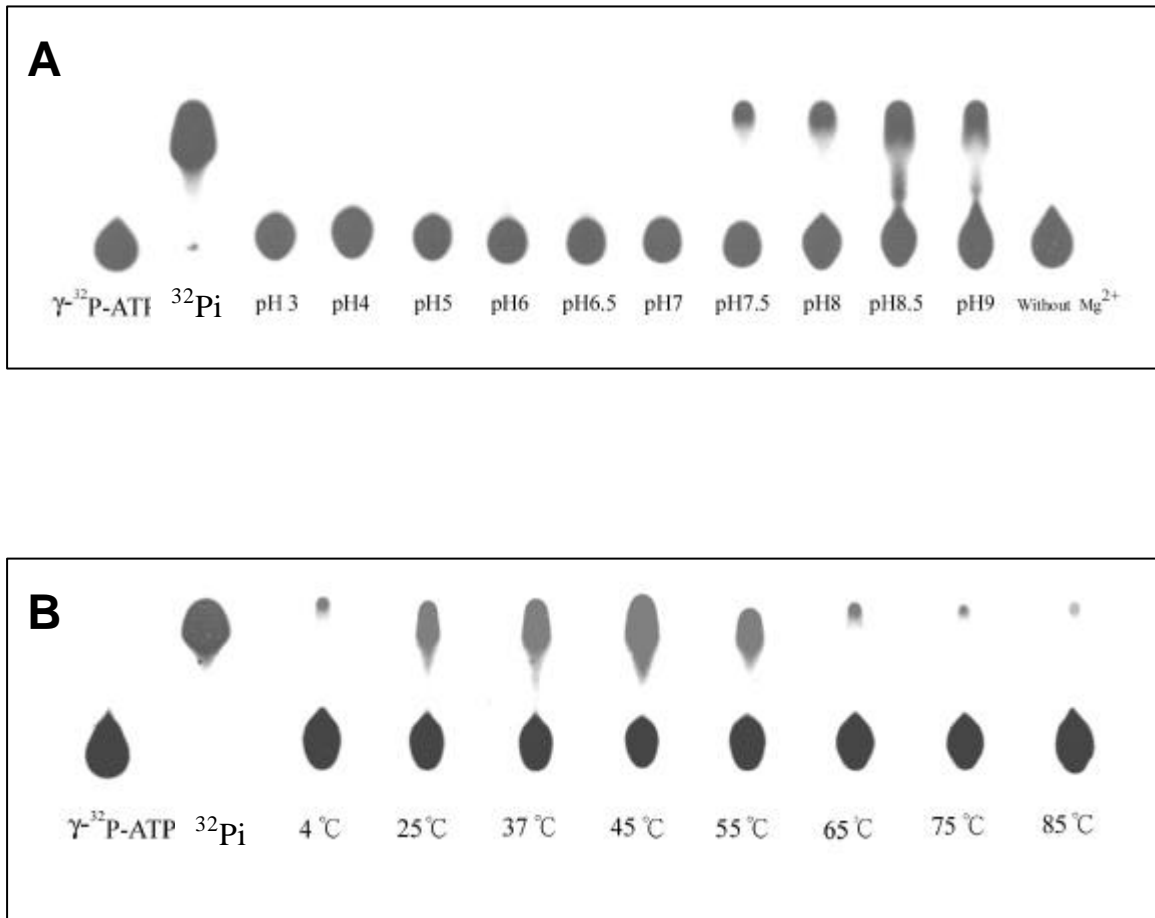


Figure 30. The optimal pH and temperature of ATPase activity in VrRH1. ATPase activity assays of VrRH1 were performed in different pHs ranging from 3 to 9 in different temperatures ranging from 4 to 85 °C. The assay conditions are given in Materials and Methods.

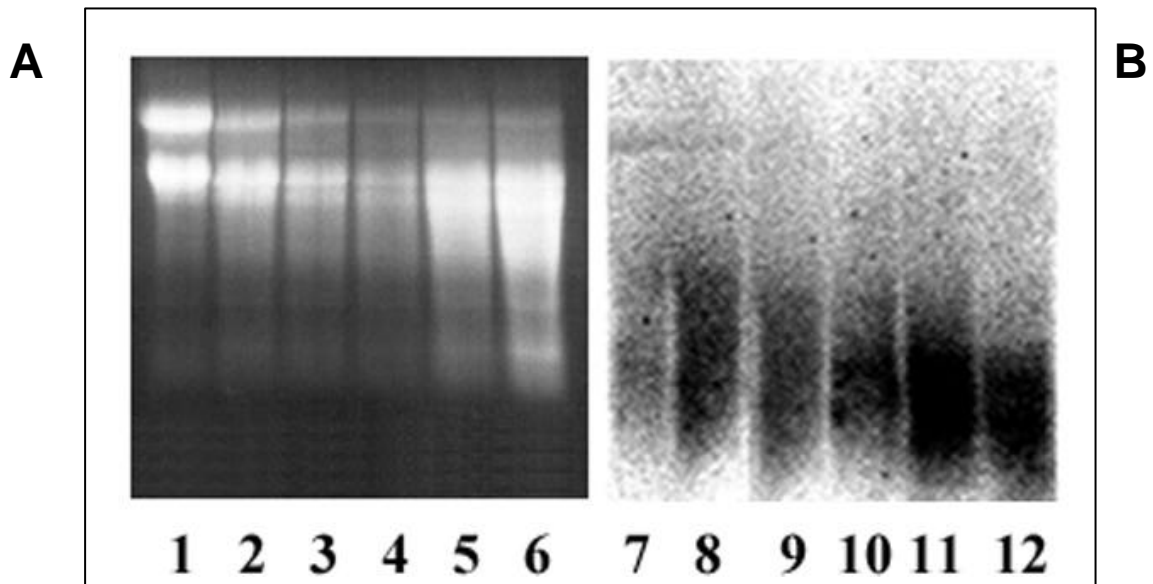


Fig. 31. Northern blot analysis of *VrRH* transcript in aged mung bean seeds. Seeds were aged at 50 and 45% RH and were taken for preparation of total RNAs, at 3-day intervals. 25 μ g of total RNAs was separated on a formaldehyde-1.2 % agarose gel. The gel was visualized by ethidium bromide staining (Fig. I, left) and Northern blotting using the 1.2 kb DNA fragment as a probe(Fig. I, right). Lanes 1-6 represent RNA samples from seeds aged for 0, 3, 6, 9, 12 and 15 days, and lanes 7-12 are Northern analyses of lanes 1-6, respectively.

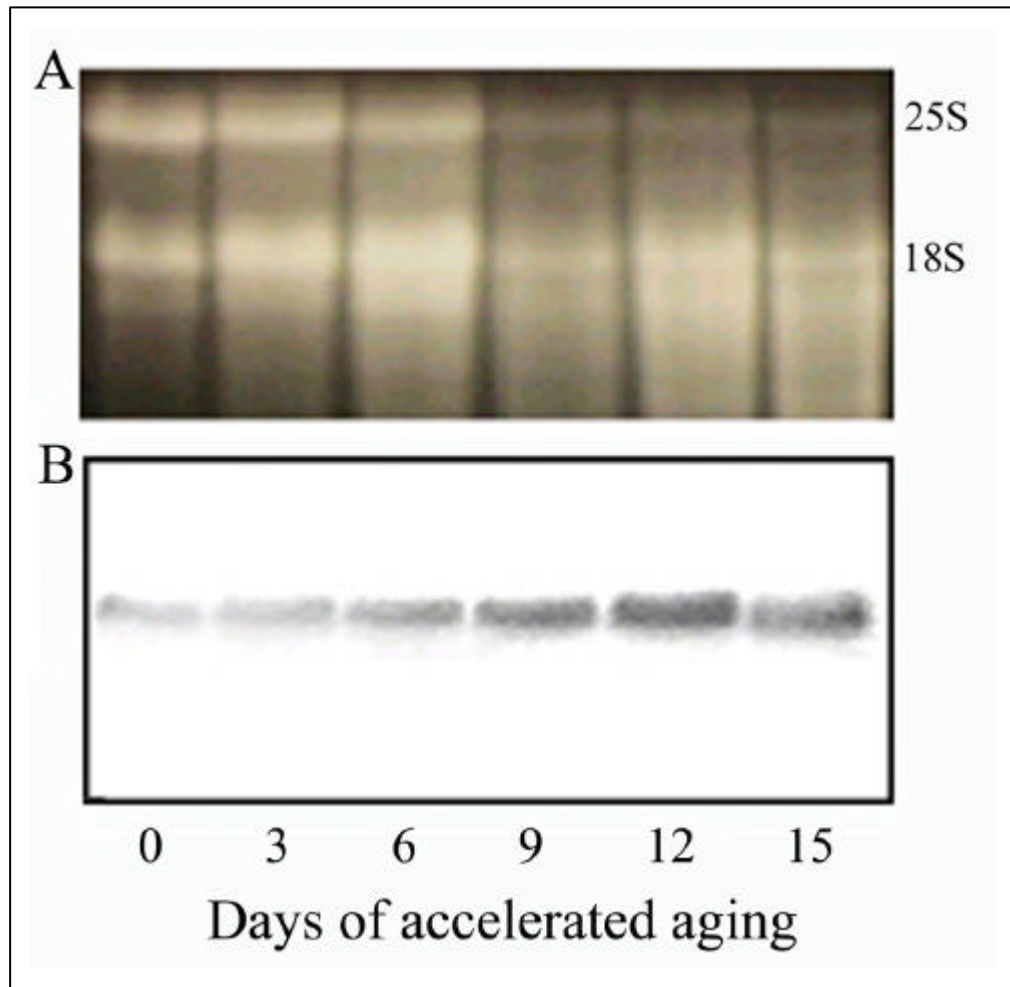


Fig. 32. Effects of the accelerated aging duration on the expression of VrRH in 12 h imbibed seeds. Mung bean seeds were acceleratedly aged for various time intervals up to 15 days at 50 and 45% RH. Total RNAs were prepared from seedlings with axis 0.5 cm that have been aged for 0, 3, 6, 9, 12 and 15 days, separated on a formaldehyde-1.2% agarose gel (A) and analyzed by Northern blotting (B).

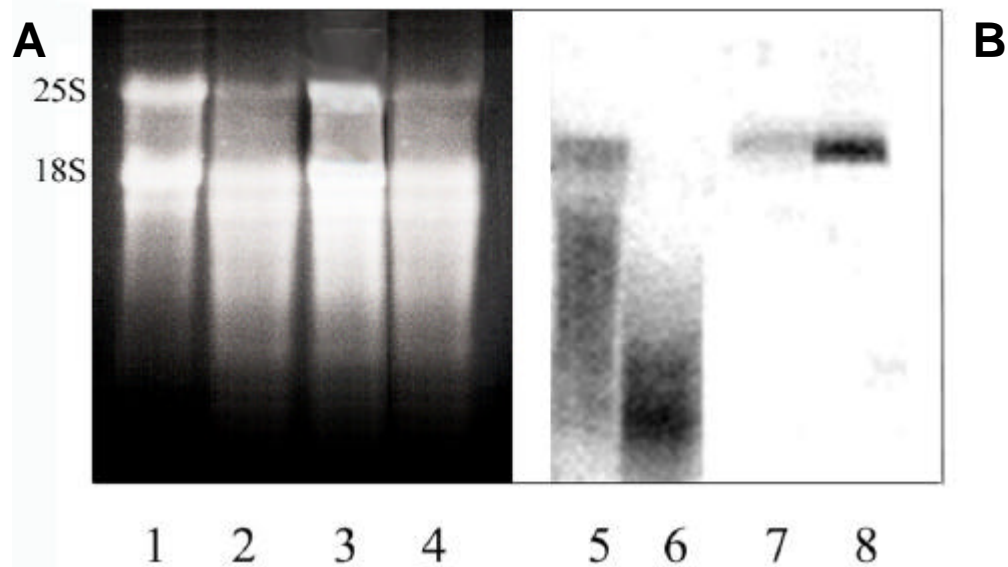


Fig. 33. Comparison of *VrRH1* expression between untreated and 9-d-aged seeds without or with imbibition. A: Twenty-five μg of total RNAs prepared from the following four mung bean samples were fractionated on a formaldehyde-1.2% agarose gel. 1, untreated seeds. 2, 9-d-aged seeds. 3, untreated seeds imbibed at 28 $^{\circ}\text{C}$ for 12 h. 4, 9-d-aged seeds imbibed at 28 $^{\circ}\text{C}$ for 12 h. B: The gel was transblotted to a nitrocellulose membrane and hybridization was performed using the 1.2 kb DNA fragment of *VrRH1* as a probe. 5~8: Northern analysis of lanes 1~4, respectively.

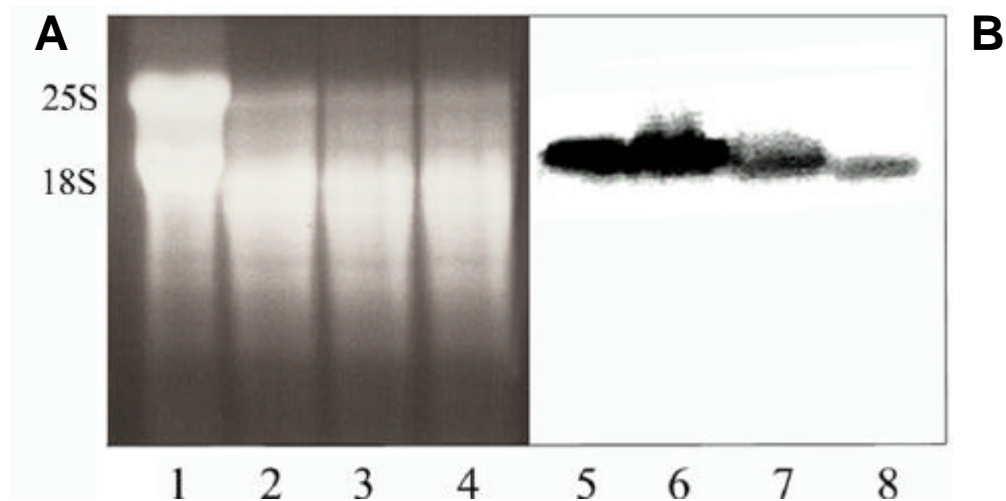


Fig. 34. Northern analysis of acceleratedly aged seeds after 12 h imbibition. Mung bean seeds were acceleratedly aged under the standard conditions (50 °C, 45% RH for 9 days). Total RNAs (25 µg) prepared from untreated seeds and acceleratedly aged seeds after 12 h imbibition were separated on a formaldehyde-1.2% agarose gel (A) and transblotted to a nitrocellulose membrane (B). 1, untreated seeds after 12 h imbibition; 2, aged seeds after 12 h imbibition (axis = 0.5 cm); 3, aged seeds after 12 h imbibition (axis = 0.5 cm); 4, aged seeds after 12 h imbibition (no germination). 5~8: Northern blot analysis of 1~4, respectively.

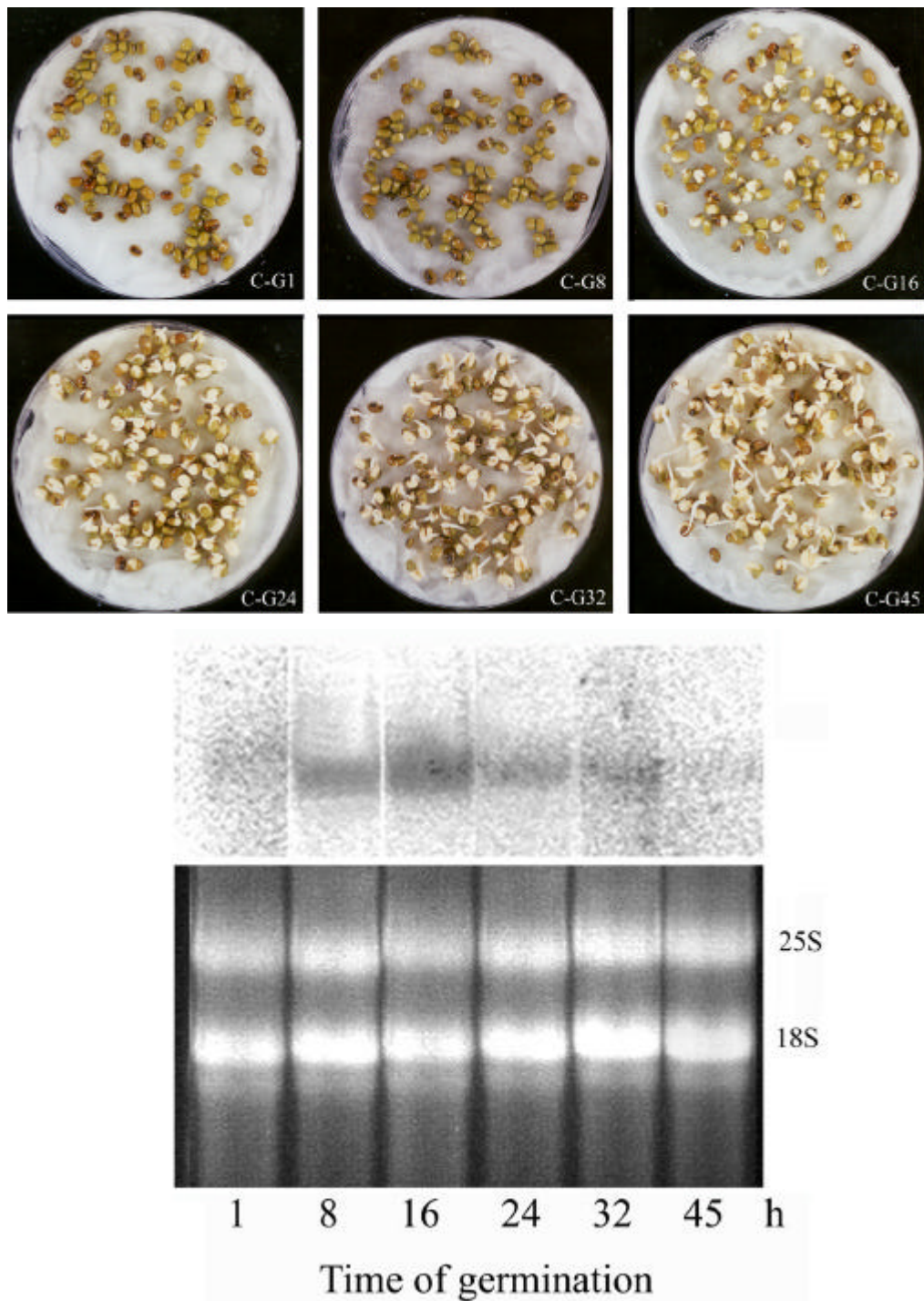


Fig. 35. Comparison of *VrRH* expression patterns during germination in untreated seeds. Mung bean seeds were acceleratedly aged under the standard conditions. Untreated seeds and the 9-d-aged seeds were germinated for various time intervals from 1 to 45 h at 28 and 100% RH. Total RNAs (25 μ g each) were prepared from seeds germinated for 1, 8, 16, 24, 32 and 45 h, separated on a formaldehyde-1.2% Agarose gel and subjected to Northern analysis using the full length *VrRH1* as a probe.

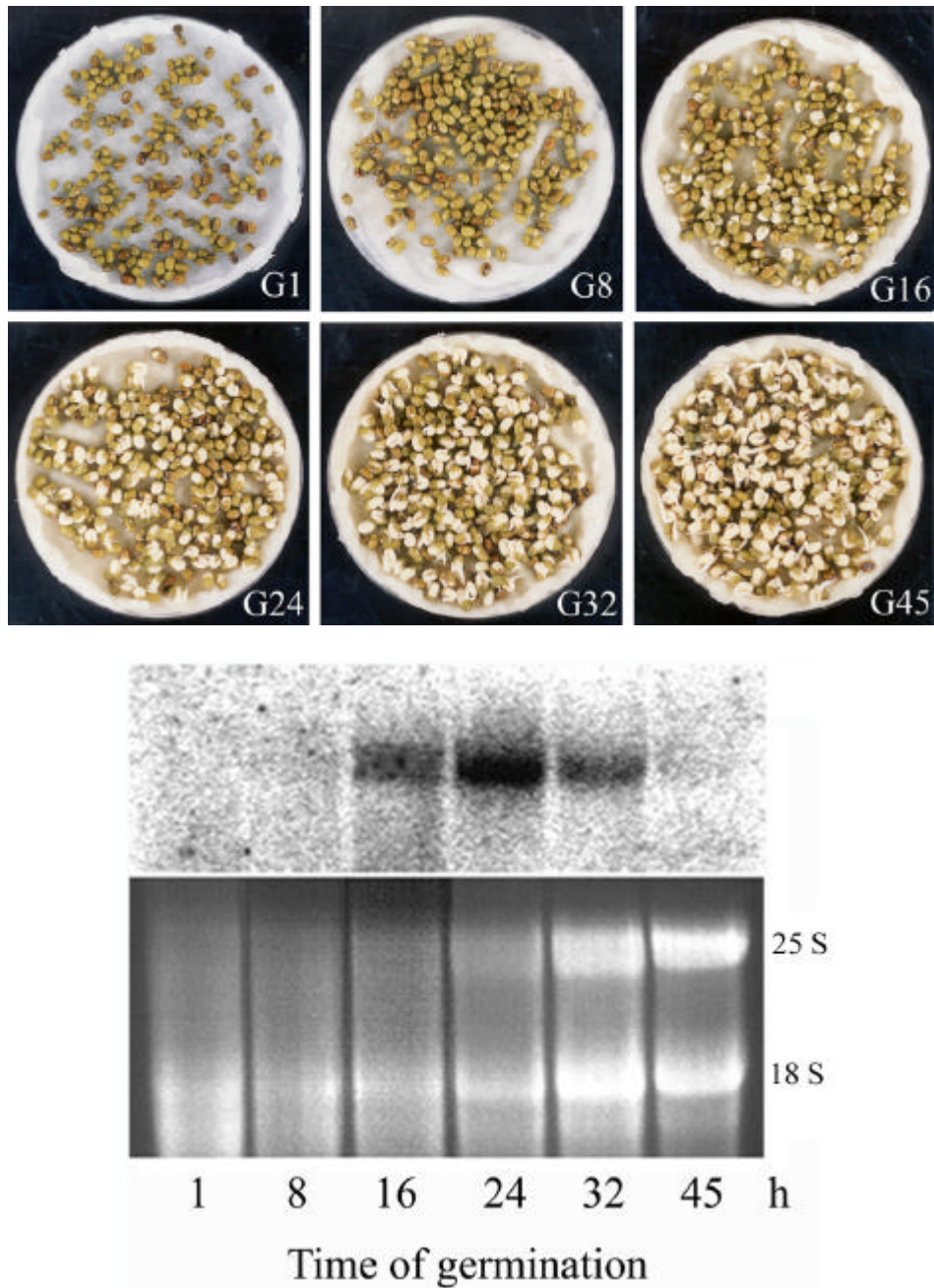


Fig. 36. Comparison of *VrRH* expression patterns during germination in untreated seeds. Mung bean seeds were acceleratedly aged under the standard conditions. Untreated seeds and the 9-d-aged seeds were germinated for various time intervals from 1 to 45 h at 28 and 100% RH. Total RNAs (25 μ g each) were prepared from seeds germinated for 1, 8, 16, 24, 32 and 45 h, separated on a formaldehyde-1.2% Agarose gel and subjected to Northern analysis using the full length *VrRH1* as a probe.

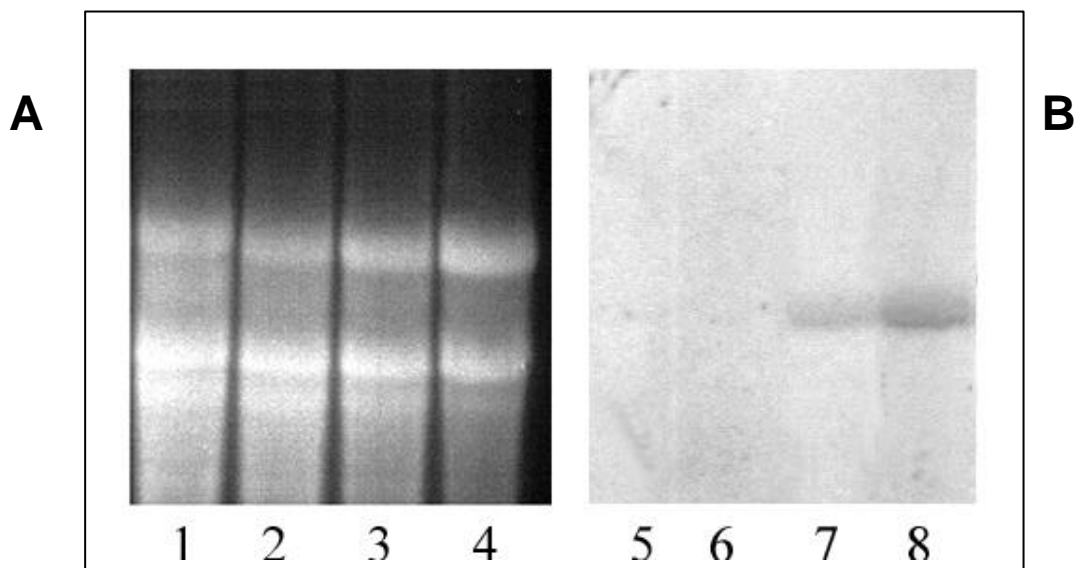


Figure 37. Northern blot analyses of VrRH1 in different parts of seedlings with or without accelerated aging. Mung bean seeds aged (lane 2, 4, 6 and 8) for 9 days and control seeds (lane 1, 3, 5 and 7), were germinated for 24 hrs. Cotyledons (lanes 5 and 6) and embryo axis (lanes 7 and 8) were collected for total RNA isolation. 25 g total RNAs were applied for agarose-formaldehyde gel electrophoresis (Panel A) and then transferred onto Nylon membrane (Panel B). Full-length cDNA of VrRH1 was used as probe for Northern blot analysis.

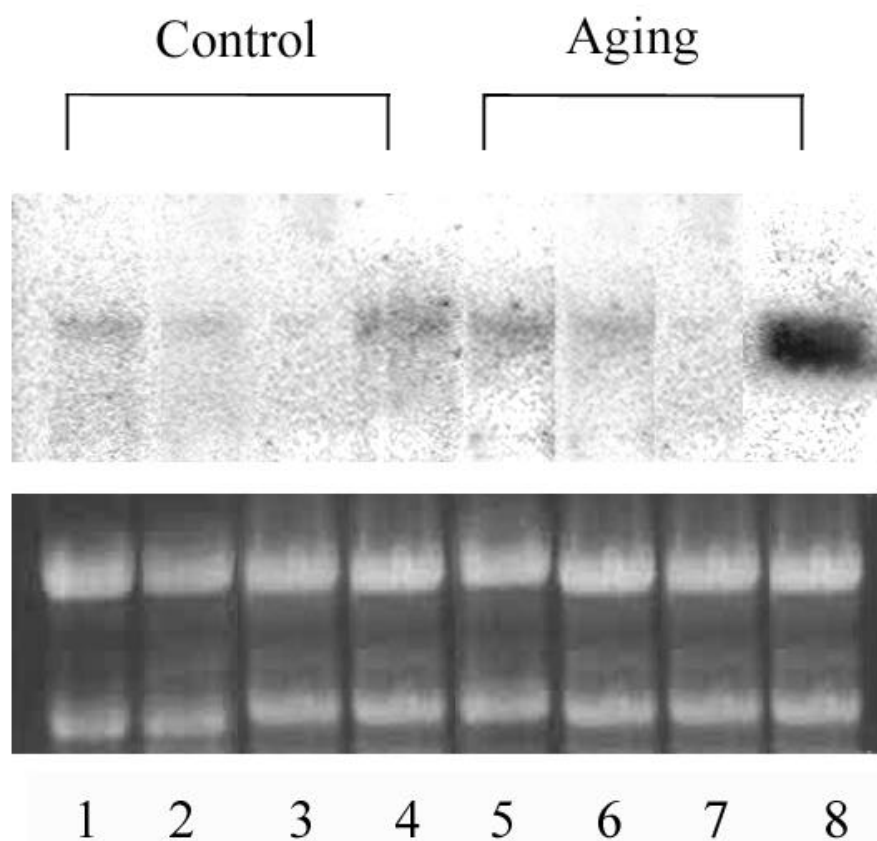


Figure 38. Northern blot analyses of VrRH1 in different organs from generations of control seeds and accelerated aged seeds. Mung bean seeds aged for 9 days (lane 5 to 8) or control seeds (lane 1 to 4) were germinated for 24 hrs (lane 4 and 8) and grown in green house. Immature leaves (lane 1 and 5), mature leaves (lane 2 and 6) and flowers (lane 3 and 7) were collected. 25 g total RNA were separated on 1.2 % agarose-formaldehyde gel (lower panel) and transferred onto Nylon membrane (upper panel). Full-length cDNA of VrRH1 was used as probe for Northern blot analysis.

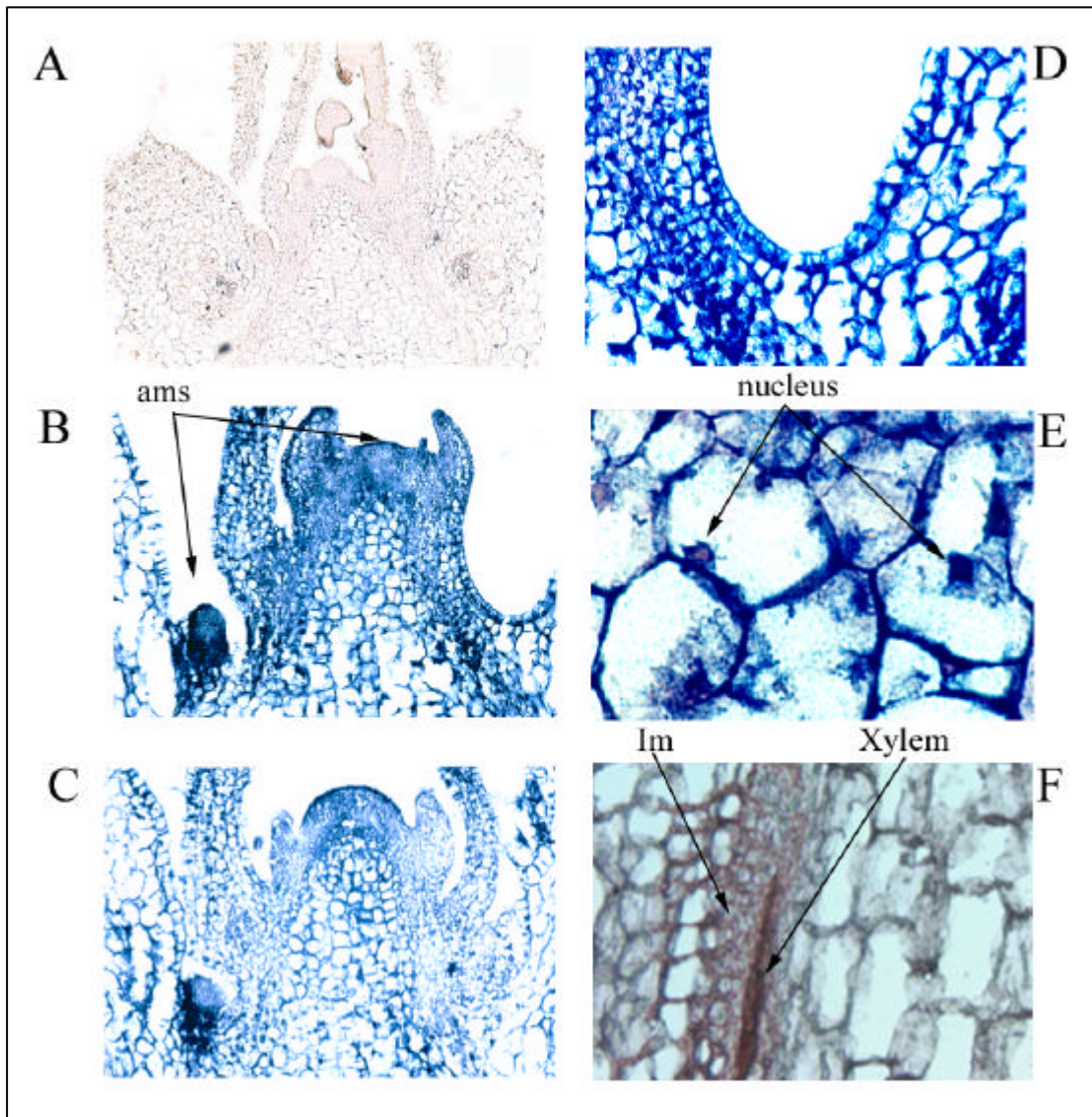


Figure 39. Immunolocalization of VrRH proteins in longitudinal section of mung bean seedlings. Mung bean seeds were acceleratedly aged under the standard condition for 9 days, then germinated for 3 days. Samples were fixed, embedded in paraffin and then longitudinal sectioned for observing the localization of VrRH protein. Panel A, the control section without primary antibody reaction. Panel B to F, detection of VrRH in different locations by anti-VrRH1 antibody. Ams, apical meristem of shoot; Im, lateral meristem.

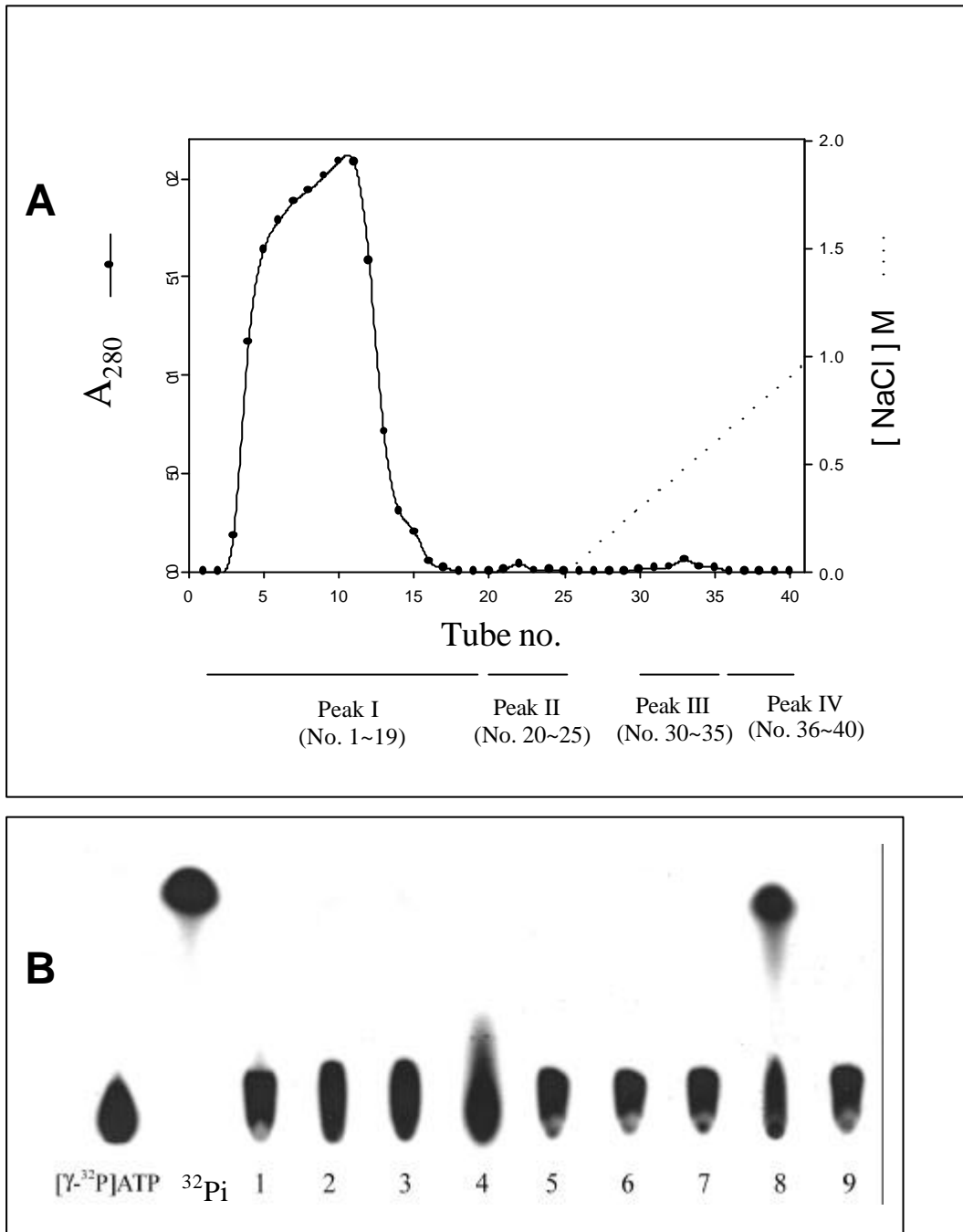


Figure 40. CM-Sephrose CL 6B chromatography of native form of VrRH. After crude extraction, 40 % to 60 % ammonium sulfate fraction was dialysed against CM Sephrose loading buffer and then applied into the column. The column was eluted by a 0 to 1 M NaCl gradient (Panel A). ATPase activity assay was used for identifying the fractions containing VrRH (Panel B). lane 1, crude extract; lane 2, 0~40 %; lane 3, 40~60 %; lane 4, 40~80 % ammonium sulfate fraction; lanes 6 to 9 indicate Peak I to IV respectively.

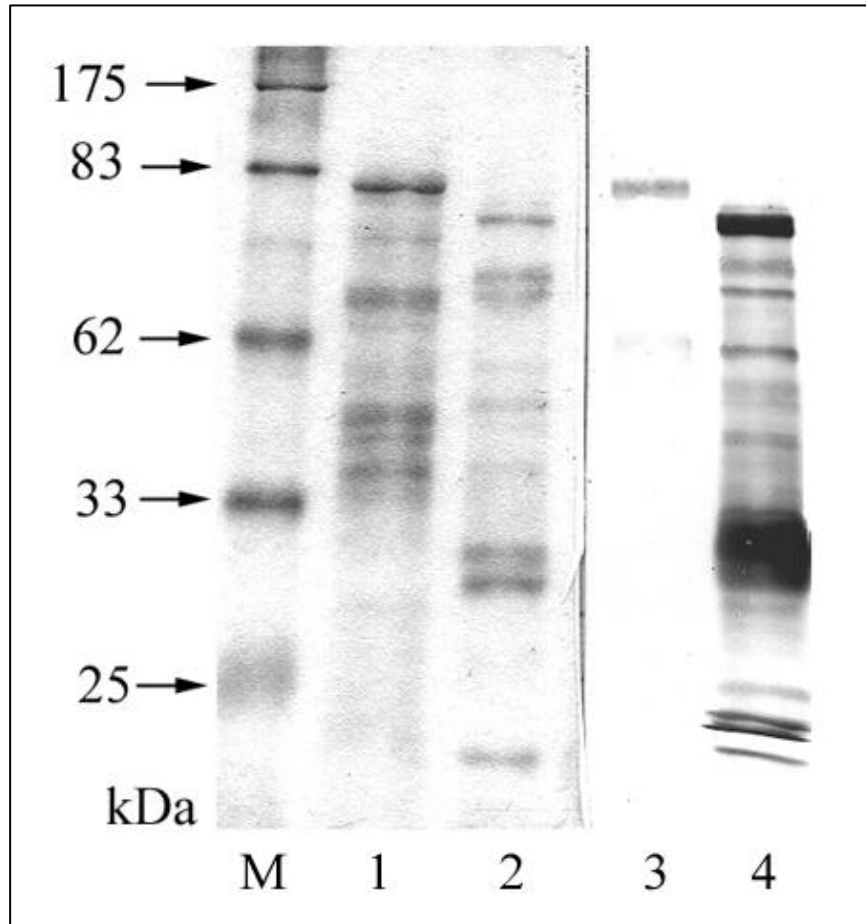


Figure 41. Western blot analysis of native and expressed forms of VrRH. 5 μ g protein of activity fraction from CM-Sepharose (lane 1 and 3) and expression form of VrRH1 (lane 2 and 4) were separated on 12.5 % SDS-PAGE (lane 1 and 2) and transferred onto PVDF membrane (lane 3 and 4). Western analysis was performed by anti-VrRH1 antibody.