新竹市第四十一屆中小學科學展覽會

作品說明書

科　　別：生物科

組　　別：國中組

作品名稱：在銅牆鐵壁中生存的水生植物-抗氧化物質對水蘊草之重金屬逆境的影響

關 鍵 詞：水蘊草、重金屬、抗氧化力

在銅牆鐵壁中生存的水生植物-
抗氧化物質對水蘊草之重金屬逆境的影響

摘要

本研究探討重金屬銅離子逆境下，水蘊草細胞的影響與抗氧化力的改變，並探討以抗氧化物質 Vitamin C(VitC)、N-Acetyl-L-Cysteine(NAC)及紫色高麗菜萃取液處理後，對於銅逆境下水蘊草細胞之影響。本研究顯示這 3 種抗氧化物質會些微影響重金屬銅離子逆境下水蘊草細胞內的葉綠素、花青素及葡萄糖的含量。紫色高麗菜萃取液會提高重金屬銅離子逆境下水蘊草細胞內的類黃酮含量，Vitamin C 與 N-Acetyl-L-Cysteine 會提高重金屬銅離子逆境下水蘊草細胞內的類黃酮含量及過氧化氫酶活性，其中以 Vitamin C 抗氧化效果最為顯著。水蘊草細胞內的抗氧化活性增加，可能提高水蘊草的生存機會與抵抗銅逆境的能力。

壹、研究動機

工廠的廢氣翳入了天際，廢水流入了小溪，近年來環保議題愈來愈受到重視，那些從工廠排放出的廢水，大多參雜了大量的重金屬，例如:銅、鐵、鑷.....，而這些廢水會流入下水道或是流入河中，那些原本生長在河中的水生植物將會受到很大的衝擊，這些水生植物是坐以待斃呢?還是有甚麼防禦機制呢?或是有什麼方式可以降低對水生植物的傷害呢?

新竹市是一個科技重地，我們在國一的生物課中也學習到重金屬銅離子汙染造成牡蠣事件，讓我們更加想要研究此議題，於是我們決定運用常見的水生植物－水蘊草來進行實驗。在查詢文獻後發現，有一篇研究顯示湖泊中的滿江紅藻類在遭受重金屬汙染的狀況下，會自身產生花青素來提高體內的抗氧化活性。而國內中小學科展2015年有篇研究中也顯示臺灣的原生種小米在逆境之下，也會在根部累積大量的花青素，而提高體內抗氧化活性酶(過氧化酶(Guaiacol Peroxidase, G-POD)、過氧化氫酶(Catalase, CAT))的活性。另一文獻指出生命豆在面對各項植物逆境時，花青素會累積於分生組織，且花青素的合成與具有光保護以及抗氧化的功能，花青素的合成需要使用葡萄糖及黃酮類化合物，這些化學分子均和植物光合作用機制有相關。也有文獻指出花青素可提高水蘊草植株細胞內的抗氧化物質活性、過氧化氫酶活性，並可讓已受到重金屬汙染的水蘊草內的抗氧化活性增加，也會影響水蘊草細胞內的葉綠體數量、大小與細胞質的流動速率。

花青素是一種類黃酮類的水溶性衍生物，是一種細胞內的抗氧化物質，可協助抵禦自由基電子，減少對於身體細胞的傷害，是細胞內一種相當重要的抗氧化養分。而花青素廣泛存在蔬果。總和以上文獻，我們認為可再擴充之方向為，銅離子汙染下，水蘊草細胞內葉綠素、花青素含量的變化與其葡萄糖生成量是否有關係? 除了花青素外，其他的抗氧化物質是否也能提高水蘊草細胞在重金屬銅汙染下的抗氧化力?希望能找到在重金屬銅離子汙染下，水蘊草的細胞變化與抗氧化機制的相關性。

貳、研究目的

一、觀察水蘊草在重金屬銅逆境下及不同抗氧化物質處理下的細胞差異

二、探討重金屬銅逆境下及不同抗氧化物質處理下之水蘊草細胞內的葉綠素含量的影響

三、探討重金屬銅逆境下及不同抗氧化物質處理下之水蘊草細胞內的花青素含量的影響

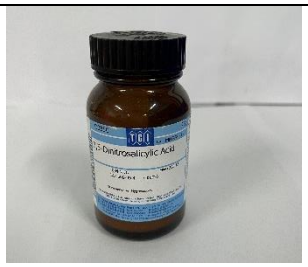
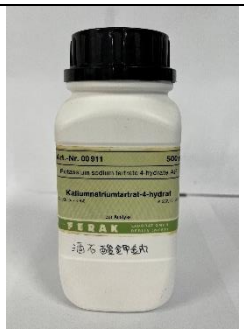
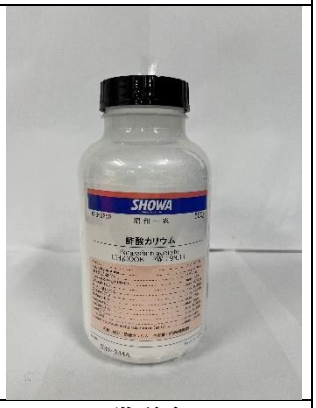
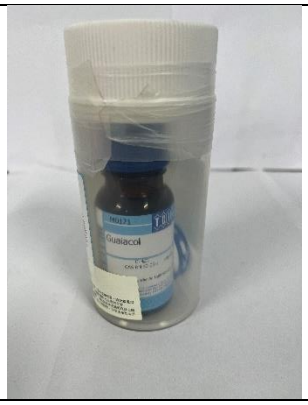
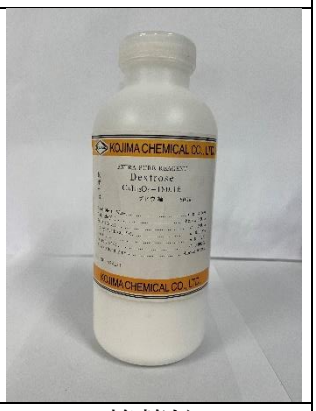
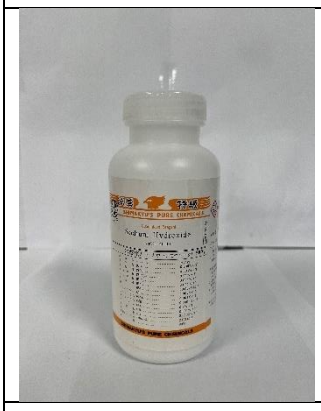
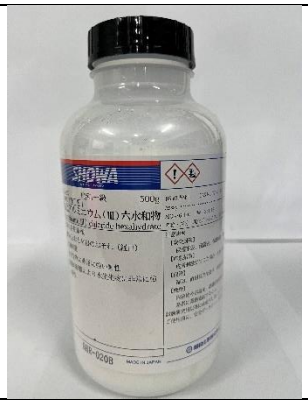
四、探討重金屬銅逆境下及不同抗氧化物質處理下之水蘊草細胞內的葡萄糖含量的影響

五、探討重金屬銅逆境下及不同抗氧化物質處理下之水蘊草細胞內的類黃酮含量的差異

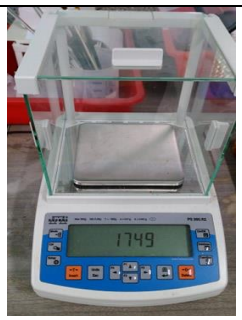
六、探討重金屬銅逆境下及不同抗氧化物質處理下之水蘊草細胞內的過氧化氫酶活性的差異

參、實驗設備及材料

一、藥品

乙醯半胱氨酸(NAC)	Vit C	$CuSO_4$	無水酒精
			
槲皮素（Quercetin）	二硝基水楊酸 (Dinitrosalicylic acid，DNS)	酒石酸鉀鈉 (Potassium sodium tartrate)	醋酸鉀（CH_3COOK）
			
H_2O_2	Guaiacol	PBS buffer	葡萄糖
			
NaOH	氯化鋁 $AlCl_3$		

二、儀器及設備

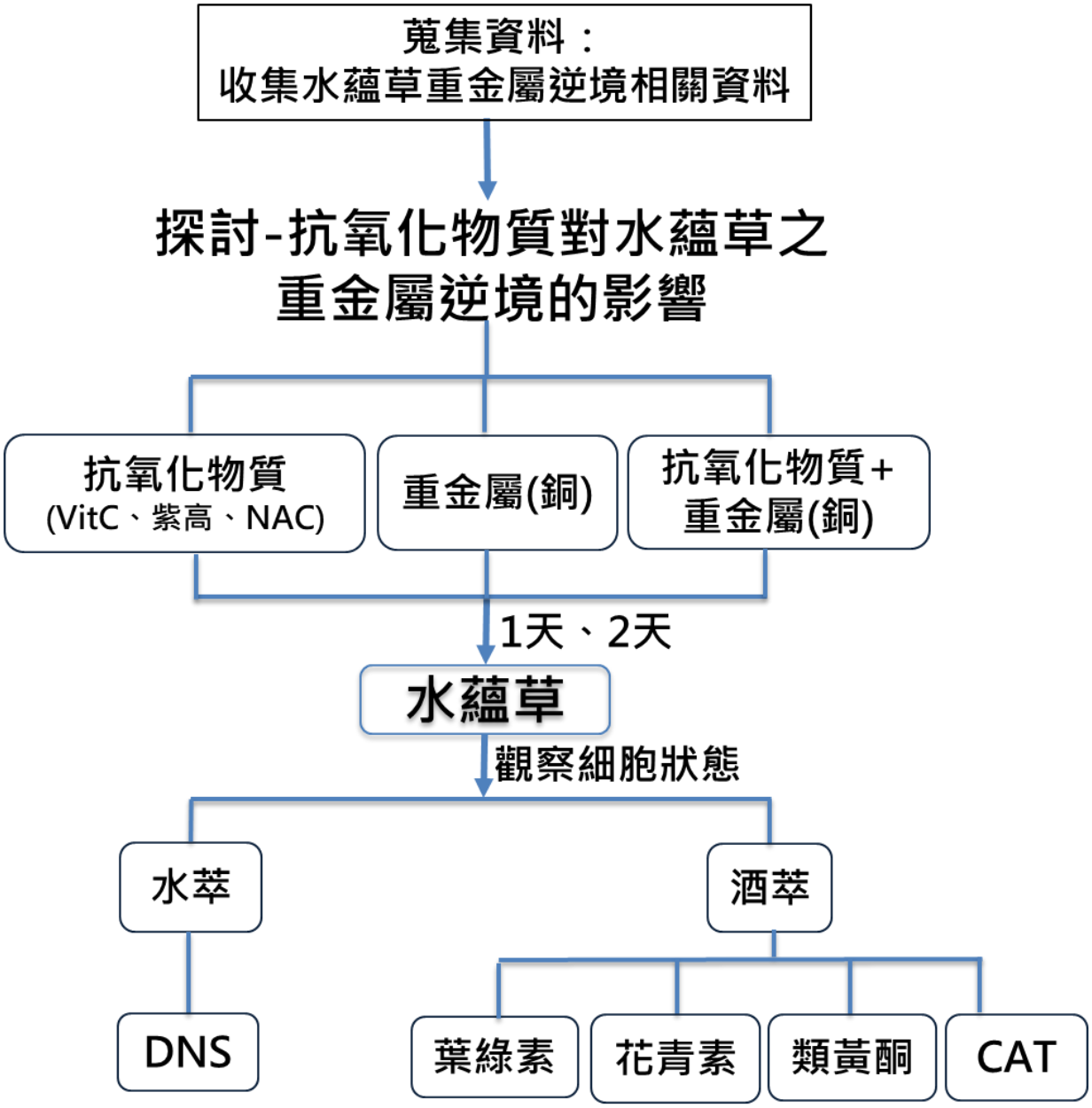
			
分光光度計 WPA Biowave DNA 80-3004-70	高速離心機 Eppendrof 5424R	電子天平 PS360.R2	水浴槽 JYU-10kg
加熱攪拌器 JLL ISANN	微量吸取器 DLAB	顯微鏡	光譜儀

三、其他

量筒、燒杯、研缽、杵、藥匙、秤藥紙、玻棒、紗布、試管、試管架、洗瓶、去離子水…等。

肆、研究過程及方法

一、 實驗架構圖

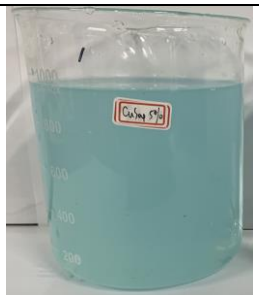


二、 各種溶液配置

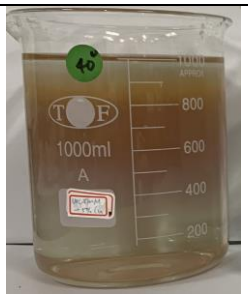
1. 50ml 1M $CuSO_4$：12.5g $CuSO_4$ 加 50ml 去離子水。
2. 紫色高麗菜萃取液(紫高萃取液)：取 700g 紫色高麗菜加 200ml 去離子水，煮沸後以紗布過濾。
3. 200ml VitC 500mM：17.613g 維他命 C 加 200ml 去離子水。
3. 200ml NAC 500mM：16.32g 維他命 C 加 200ml 去離子水。

三、水蘊草各實驗條件之處理

將整盆水蘊草放入 1L 各處理組別的溶液中，收取 1 天、2 天的葉片進行觀察與各項實驗測試。

組別	對照組	0.5% $CuSO_4$	5%紫高	5%紫高+0.5% $CuSO_4$
處理	1 公升的水	取 5 ml 1M $CuSO_4$，加入 995ml 的水	取 50 ml 紫高萃取液，加入 950ml 的水	取 50 ml 紫高萃取液及 5 ml 1M $CuSO_4$，加入 945ml 的水
0 天				
1 天 (24hr)				
2 天 (48hr)				

組別	5mM VitC	5mM VitC +0.5% $CuSO_4$	10mM VitC	10mM VitC +0.5% CuSO4
處理	取 10 ml 500mM VitC，加入 990ml 的水	取 10 ml 500mM VitC 及 5 ml 1M $CuSO_4$，加入 985ml 的水	取 20 ml 500mM VitC，加入 980ml 的水	取 20 ml 500mM VitC 及 5 ml 1M $CuSO_4$，加入 975ml 的水
0 天				
1 天 (24hr)				
2 天 (48hr)				

組別	5mM NAC	5mM NAC +0.5% $CuSO_4$	10mM NAC	10mM NAC +0.5% CuSO4
處理	取 10 ml 500mM NAC，加入 990ml 的水	取 10 ml 500mM NAC 及 5 ml 1M $CuSO_4$，加入 985ml 的水	取 20 ml 500mM NAC，加入 980ml 的水	取 20 ml 500mM NAC 及 5 ml 1M $CuSO_4$，加入 975ml 的水
0 天				

1 天 (24hr)				
2 天 (48hr)				

四、水蘊草細胞觀察

取一片水蘊草，置於複試顯微鏡下觀察並拍下細胞的狀態及葉綠體的分布情況。

五、水蘊草萃取液的製備：

將水蘊草葉片拔下並用衛生紙吸乾葉片並秤重，每 1g 的葉片 以 20ml 體積之無水酒精或去離子水，進行研磨萃取，每個樣本研磨 500 下，以雙層紗布過濾.萃取液去渣後離心 10000rpm 5 分鐘，取上清液即為無水酒精萃取液(簡稱：酒萃)或水萃取液(簡稱：水萃)進行下列各項測試。

(一)花青素含量測量

將各處理之酒萃樣本利用分光光度計，測量波長 520 nm 下之吸光值(Gitelson and Merzlyak,1996)。

(二)葉綠素含量測量

將各處理之酒萃樣本利用分光光度計，測量波長 645nm、663nm 之吸光值，來換算葉綠素含量。*葉綠素總量(mg)公式=(8.02*A663+20.2*A645)*萃取毫升數

(三)類黃酮含量測量

1.原理：本測定原理利用類黃酮和鋁離子會在鹼性環境下形成黃色錯合物，其吸收波段以412nm最為顯著，並且使用槲皮素（Quercetin）作為標準品。

2.作法：取500 μl各濃度之槲皮素及各處理之酒萃樣本，分別加入1M 醋酸鉀（CH_3COOK） 100 μl、10% $AlCl_3$ 100 μl及蒸餾水 2.8ml，使每個樣本之總體積為 3.5ml，均勻混合後置於室溫避光30 分鐘，測量波長412nm之吸光值。

(四)CAT (過氧化氫酶活性測試)

1.原理：過氧化氫酶催化過氧化氫分解，會產生水和氧氣。當 Guaiacol 遇到過氧化氫(H_2O_2)釋放的氧氣時，會結合產生紅色的化合物，在 435nm 左右有最大吸光度。故可利用吸光度 的上升快慢與數值高低來衡量樣品中的過氧化氫酶活性，活性越高，氧氣釋放 量越快，會造成 435nm 的吸光度上升較快。本實驗藉由觀察樣品在 435nm 的吸 光度隨時間的變化，可得知葉片中過氧化氫酶活性的相對高低

2.作法：取 25mM 的 Guaiacol 40 μl、35% H_2O_2 80 μl 和 PBS buffer 80 μl。混合均勻後加入 400 μl 的酒萃樣本，開始計時，並同時放入光譜儀(PASCO-spectrometer)中，每 5 秒記錄一次吸光值，連續紀錄 60 秒，以測量 60 秒之間的上升斜率作為過氧化氫酶活性的比較。

(五)葡萄糖含量測量

1.原理：3,5-dinitrosalicylic acid（DNS）試劑之反應是利用 DNS 具還原力之特性，因此碳水化合物只要具有游離或游離趨勢之醛或酮基，即能在鹼性溶液下有還原的能力而進行以下反應，於一定範圍內，顏色的深淺強度和還原糖濃度成正比。

Reduction

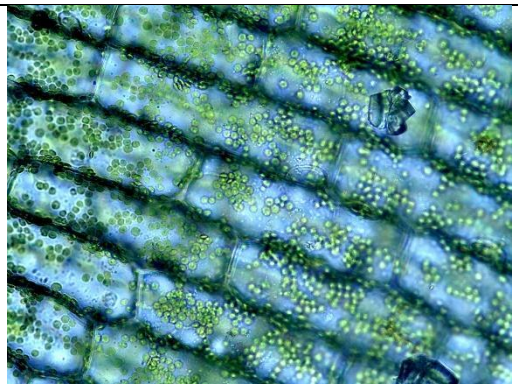
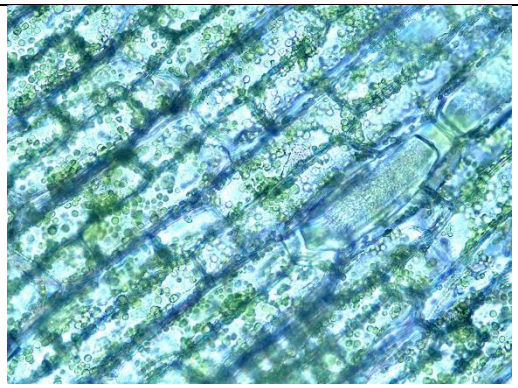
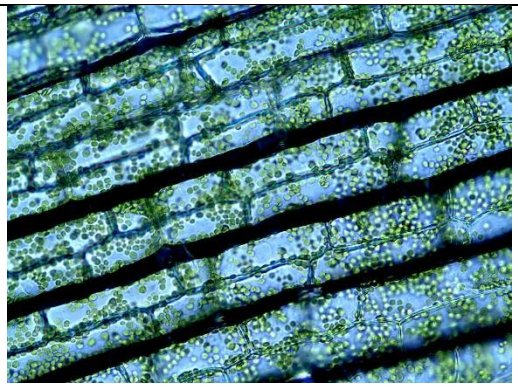
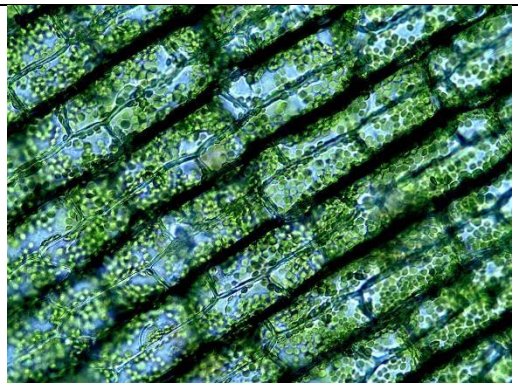
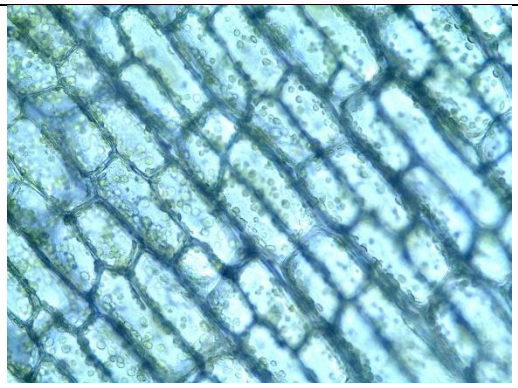
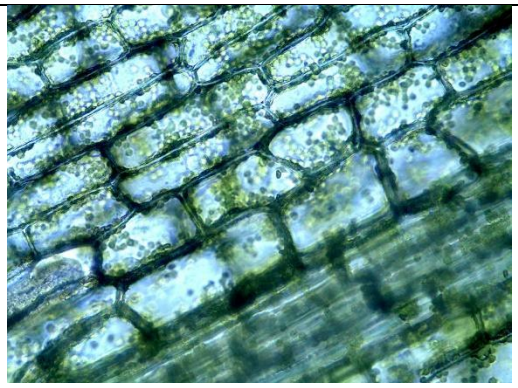
3,5-dinitrosalicylic acid（yellow）→ 3-amino-5-nitrosalicylic acid（orange-red）

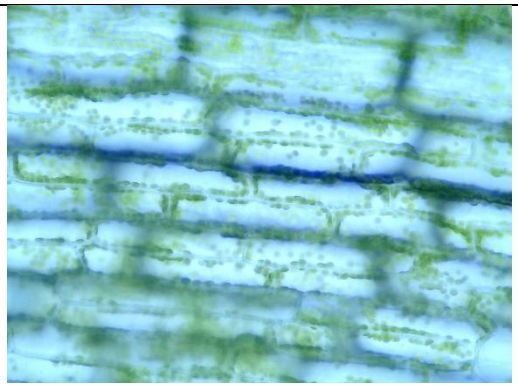
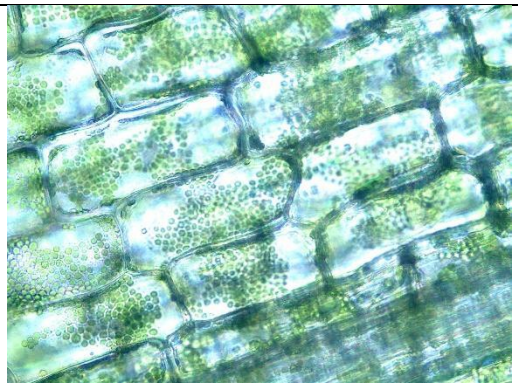
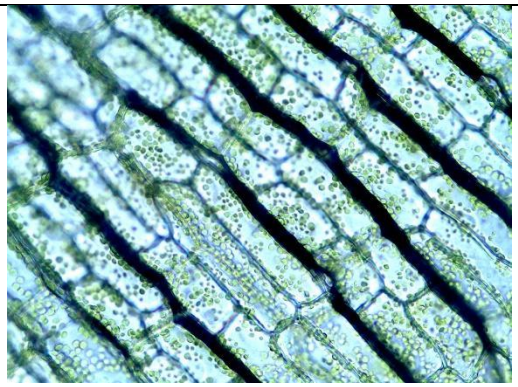
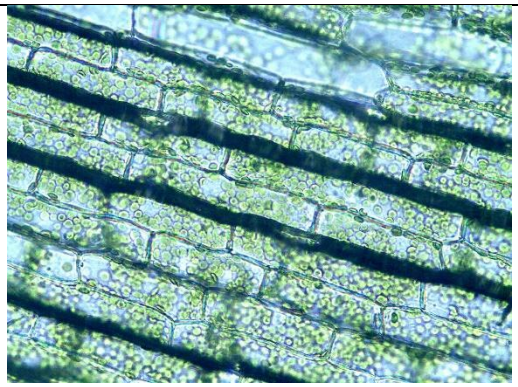
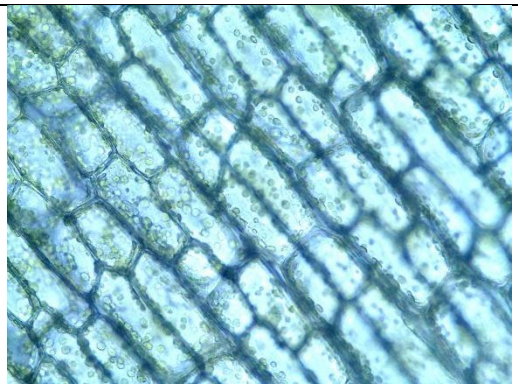
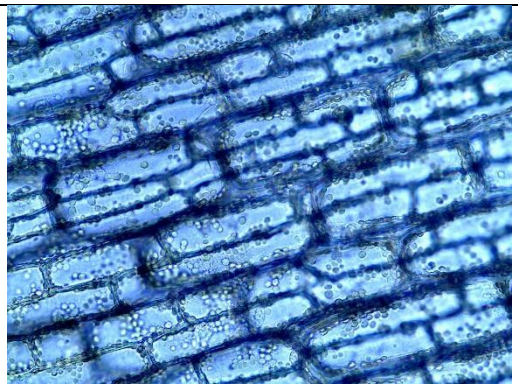
2.作法：取 1.5mL 各濃度之葡萄糖溶液做為標準品及各處理之水萃樣本、加入 1.5 mL 之二硝基水楊酸 (Dinitrosalicylic acid,DNS)試劑中，混合均勻後，將混合液在 100℃ 之水中加熱 10 分鐘後放至室溫，測量波長 540nm 之吸光值。

陸、實驗結果

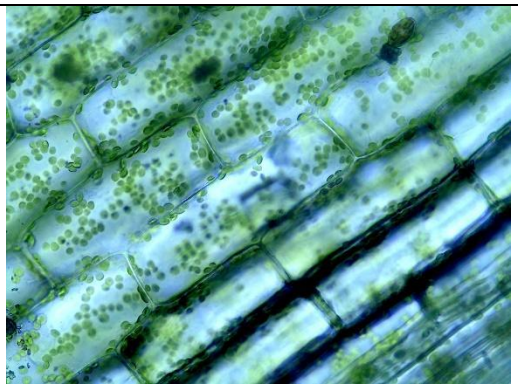
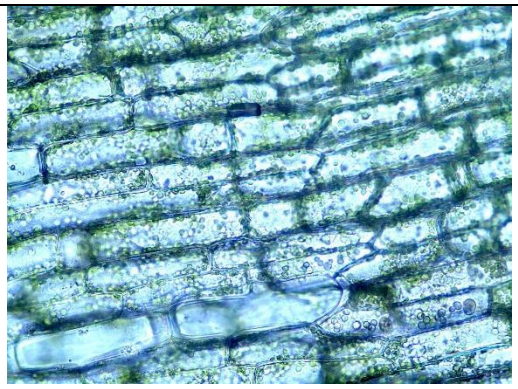
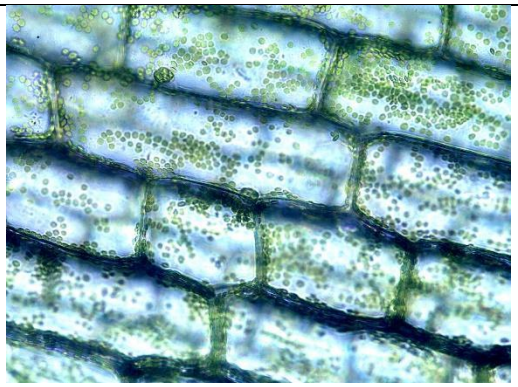
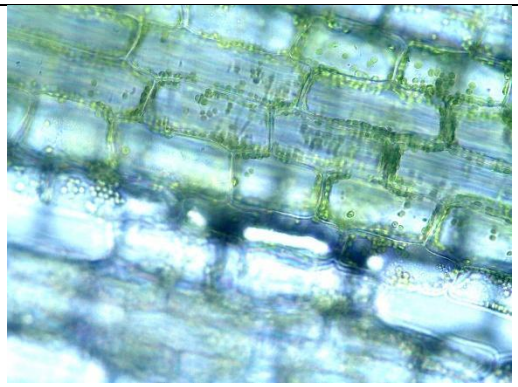
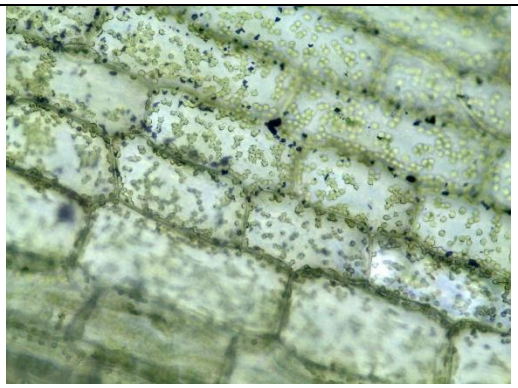
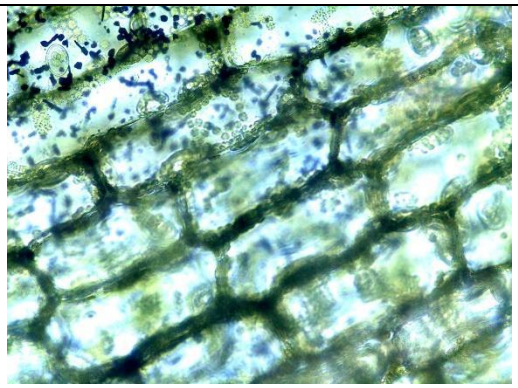
一、觀察在 0.5%$CuSO_4$(aq)及不同抗氧化物質處理下的水蘊草細胞內的細胞差異

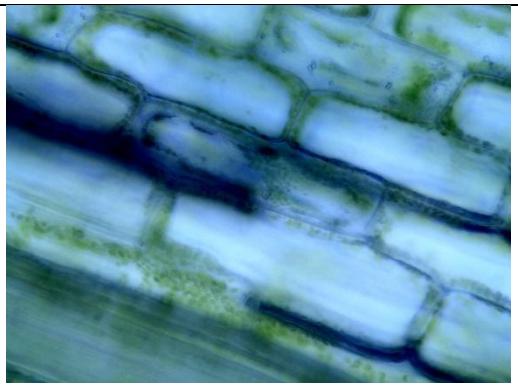
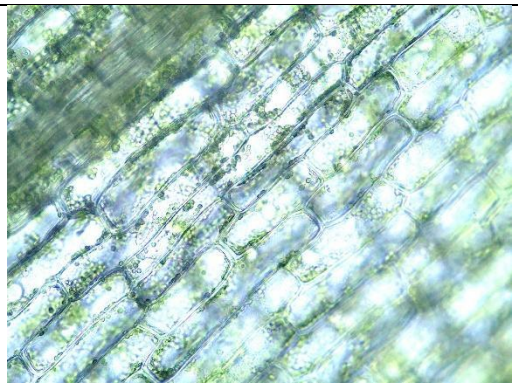
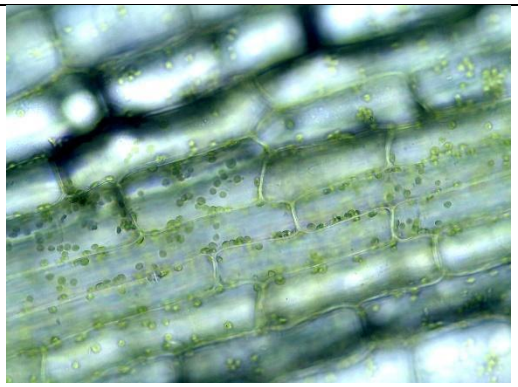
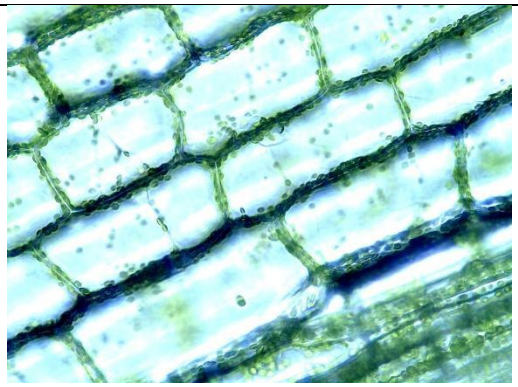
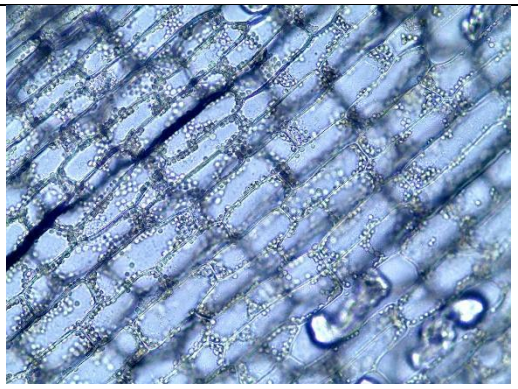
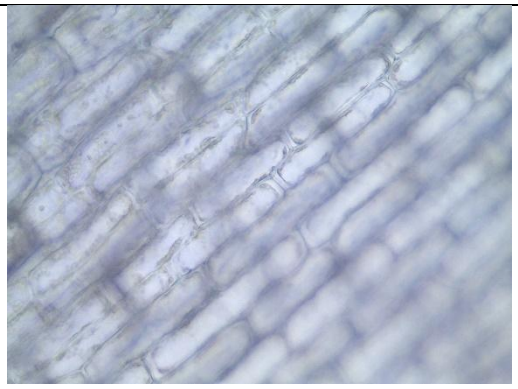
【表 1-1】： 純水、0.5%$CuSO_4$、抗氧化物質、0.5%CuSO4 及抗氧化物質處理 1 天的水蘊草細胞觀察

Day 1	
對照組	0.5% Cu
	
葉綠體有流動	葉綠體沒有流動
5mM VitC	10mM VitC
	
葉綠體有流動，同對照組	葉綠體有流動，較對照組快、多
5mM VitC 5mM+0.5% Cu	10mM VitC +0.5%Cu
	
葉綠體沒有流動	葉綠體沒有流動

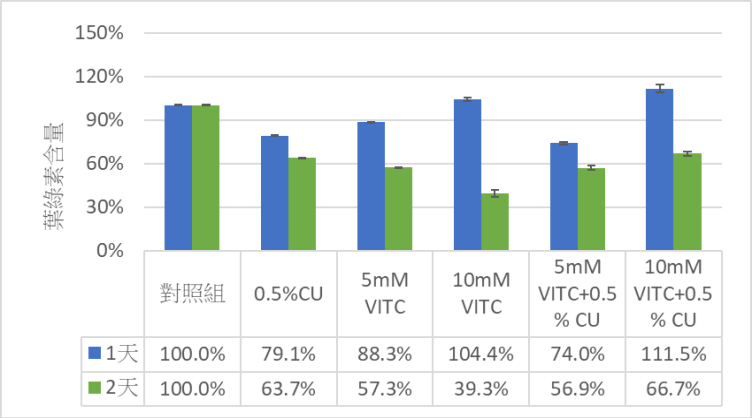
5%紫高	5%紫高 5%+0.5% Cu
	
葉綠體有流動(繞細胞邊緣)，較對照組、vitC 快、多(幾乎每一顆葉綠體都在動)	葉綠體沒有流動
5mM NAC	10mM NAC
	
葉綠體跟對照組一樣快、數量少；比紫高慢、少	葉綠體跟對照組一樣快、數量少；比紫高慢、少
5mM NAC +0.5% Cu	10mM NAC +0.5% Cu
	
葉綠體沒有流動，葉片枯黃	葉綠體沒有流動，葉片枯黃

【表 1-2】： 純水、0.5%$CuSO_4$、、抗氧化物質、0.5%$CuSO_4$及抗氧化物質處理 2 天的水蘊草細胞觀察

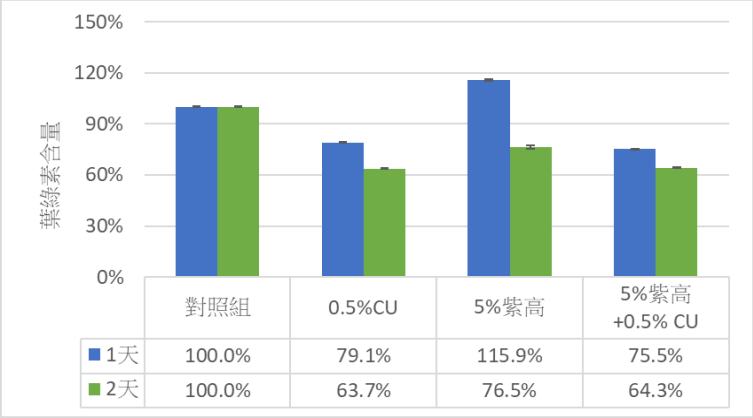
Day 2	
對照組	0.5% Cu
	
葉綠體有流動	葉綠體沒有流動
5mM VitC	10mM VitC
	
葉綠體流動快速(全部)，較對照組快、多	葉綠體流動快速(多在邊邊)，較對照組快、多
5mM VitC 5mM+0.5% Cu	10mM VitC +0.5%Cu
	
葉綠體沒有流動	葉綠體沒有流動

5%紫高	5%紫高 5%+0.5% Cu
	
葉綠體流動快速(多在細胞邊緣)，較對照組、vitC 快、多	葉綠體沒有流動
5mM NAC	10mM NAC
	
葉綠體跟對照組一樣快、數量少；比紫高、VitC 慢、少	葉綠體比對照組慢、數量少；比紫高、VitC 慢、少
5mM NAC +0.5% Cu	10mM NAC +0.5% Cu
	
葉綠體沒有流動	葉綠體沒有流動

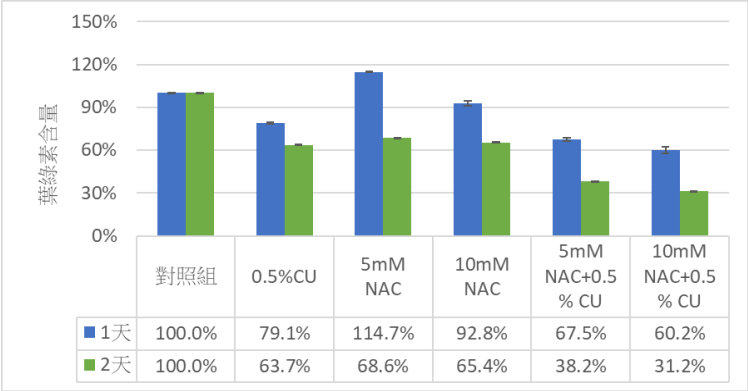
二、在 0.5%$CuSO_4$(aq)及不同抗氧化物質處理下的水蘊草細胞內的葉綠素含量差異比較



【圖 1】0.5%$CuSO_4$、不同濃度 Vitamin C 及 0.5% CuSO4 與不同濃度 Vitamin C 對水蘊草細胞內葉綠素含量的影響



【圖 2】0.5%$CuSO_4$、5%紫色高麗菜萃取液及 0.5% $CuSO_4$ 與 5%紫色高麗菜萃取液對水蘊草細胞內葉綠素含量的影響



【圖 3】0.5%$CuSO_4$、不同濃度 N-Acetyl-L-Cysteine 及 0.5%$CuSO_4$ 與不同濃度 N-Acetyl-L-Cysteine 對水蘊草細胞內葉綠素含量的影響

實驗數據分析(圖 1-3):

以上的數據皆是以對照組作為標準化的方式呈現，在葉綠素含量測試結果下顯示:

(1) 0.5% $CuSO_4$ 的處理 1 天與 2 天後，與對照組比較水蘊草葉綠素含量下降 20.9%與 36.3%。5mM VitC、10mM VitC 處理 1 天後水蘊草葉綠素含量分別下降 11.7%與上升 4.4%，處理 2 天後分別下降 42.7%與 60.7%，且統計後都具有顯著差異。

(2) 0.5% $CuSO_4$ 的處理下，同時添加 5mM VitC、10mM VitC，1 天後比較 5mM VitC+0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草葉綠素含量下降 4.4%，2 天後下降 6.8%。比較 10mM VitC+0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，1 天後水蘊草葉綠素含量上升 32.4%，2 天後上升 3%，且統計後都具有顯著差異。

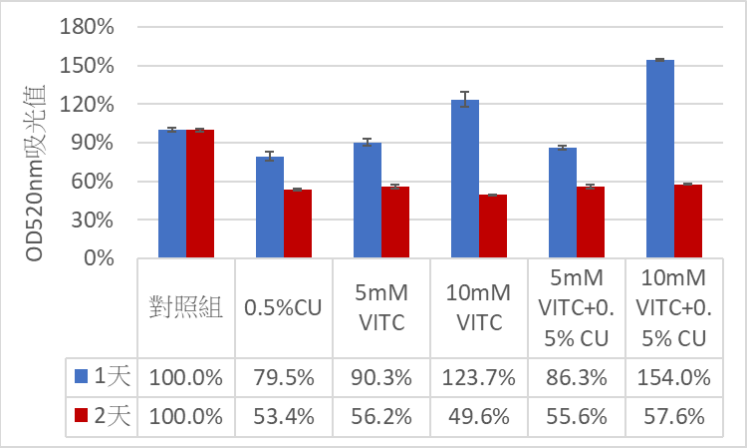
(3) 5%紫色高麗菜萃取液處理下，與對照組比較 1 天後水蘊草葉綠素含量上升 15.9%，2 天後下降 23.5%，且統計後都具有顯著差異。

(4) 0.5% $CuSO_4$ 的處理下，同時添加 5%紫色高麗菜萃取液，1 天後比較 5%紫色高麗菜萃取液+0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草葉綠素含量下降 3.7%，2 天後上升 0.6%，且統計後都具有顯著差異。

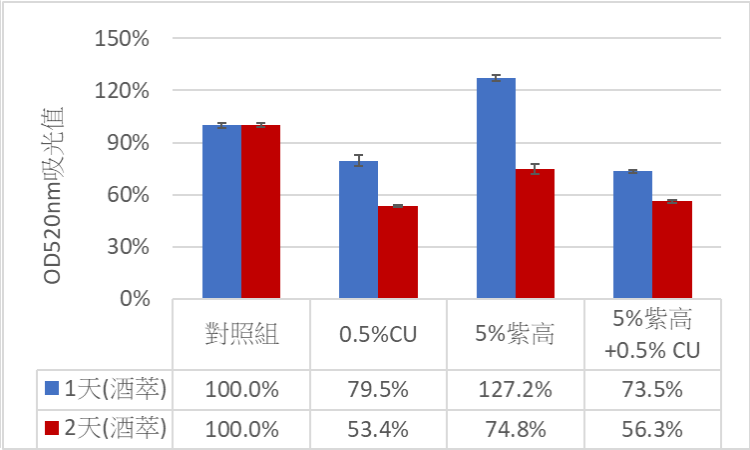
(5) 5mM NAC、10mM NAC 處理下，與對照組比較 1 天後水蘊草葉綠素含量分別上升 14.7%與下降 7.3%，2 天後下降 31.4%與 34.6%，且統計後具有顯著差異。

(6) 0.5% $CuSO_4$ 的處理下，同時添加 5mM NAC、10mM NAC，1 天後比較 5mM NAC +0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草葉綠素含量下降 11.6%，2 天後下降 25.5%。比較 10mM NAC +0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，1 天後水蘊草葉綠素含量下降 25.5%，2 天後下降 32.4%，且統計後都具有顯著差異。

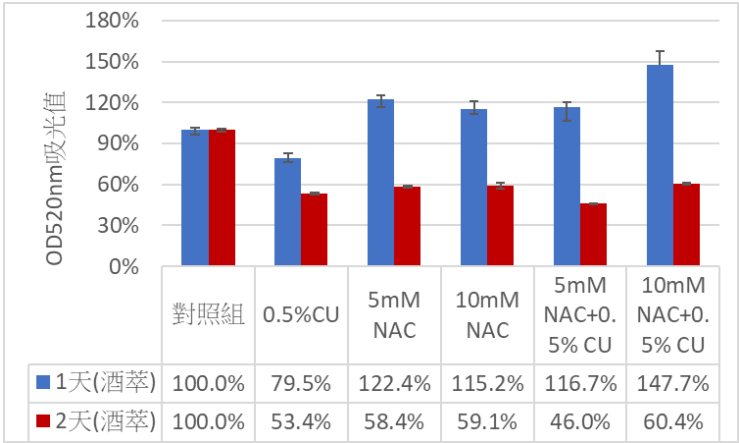
三、在 0.5%$CuSO_4$(aq)及不同抗氧化物質處理下的水蘊草細胞內的花青素含量差異比較



【圖 4】0.5% $CuSO_4$、不同濃度 Vitamin C 及 0.5% $CuSO_4$ 與不同濃度 Vitamin C 對水蘊草細胞內花青素含量的影響



【圖 5】0.5% $CuSO_4$、5%紫色高麗菜萃取液及 0.5% $CuSO_4$ 與 5%紫色高麗菜萃取液對水蘊草細胞內花青素含量的影響



【圖 6】0.5% $CuSO_4$、不同濃度 N-Acetyl-L-Cysteine 及 0.5% $CuSO_4$ 與不同濃度 N-Acetyl-L-Cysteine 對水蘊草細胞內花青素含量的影響

實驗數據分析(圖 4-6):

以上的數據皆是以對照組作為標準化的方式呈現，在花青素含量測試結果下顯示:

(1) 0.5% $CuSO_4$ 的處理 1 天與 2 天後，與對照組比較水蘊草花青素含量下降 20.5%與 46.6%。5mM VitC、10mM VitC 處理 1 天後水蘊草花青素含量分別下降 9.7%與上升 23.7%，處理 2 天後分別下降 43.8%與 50.4%，且統計後都具有顯著差異。

(2) 0.5% $CuSO_4$ 的處理下，同時添加 5mM VitC、10mM VitC，1 天後比較 5mM VitC+0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草花青素含量上升 6.8%，2 天後上升 2.2%。比較 10mM VitC+0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，1 天後水蘊草花青素含量上升 74.5%，2 天後上升 4.2%，

且統計後都具有顯著差異。

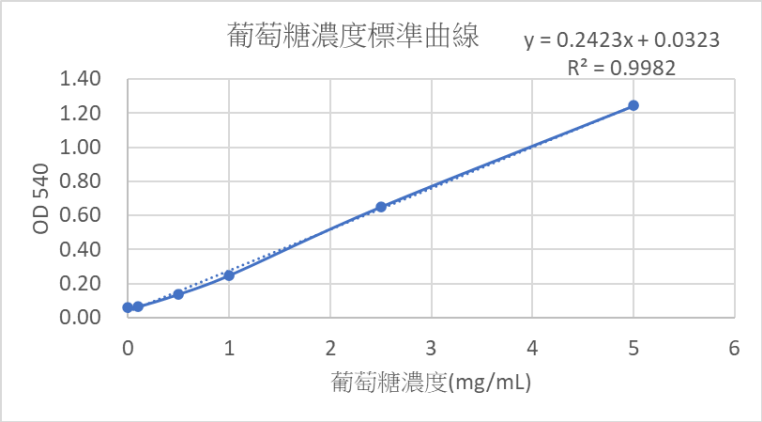
(3) 5%紫色高麗菜萃取液處理下，與對照組比較 1 天後水蘊草花青素含量上升 27.2%，2 天後下降 25.2%，且統計後都具有顯著差異。

(4) 0.5% $CuSO_4$ 的處理下，同時添加 5%紫色高麗菜萃取液，1 天後比較 5%紫色高麗菜萃取液+0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草花青素含量下降 5.9%，2 天後上升 2.9%，且統計後都具有顯著差異。

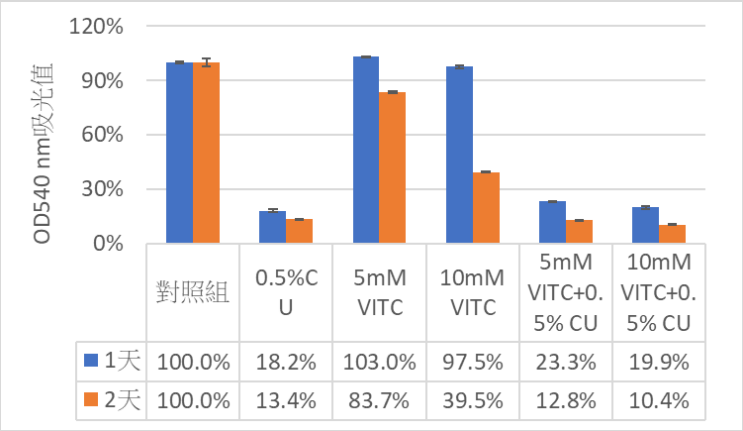
(5) 5mM NAC、10mM NAC 處理下，與對照組比較 1 天後水蘊草花青素含量分別上升 22.4%與 15.2%，2 天後下降 41.6%與 40.9%，且統計後具有顯著差異。

(6) 0.5% CuSO4 的處理下，同時添加 5mM NAC、10mM NAC，1 天後比較 5mM NAC +0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草花青素含量上升 37.2%，2 天後下降 7.4%。比較 10mM NAC +0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，1 天後水蘊草花青素含量上升 68.2%，2 天後上升 7%，且統計後都具有顯著差異。

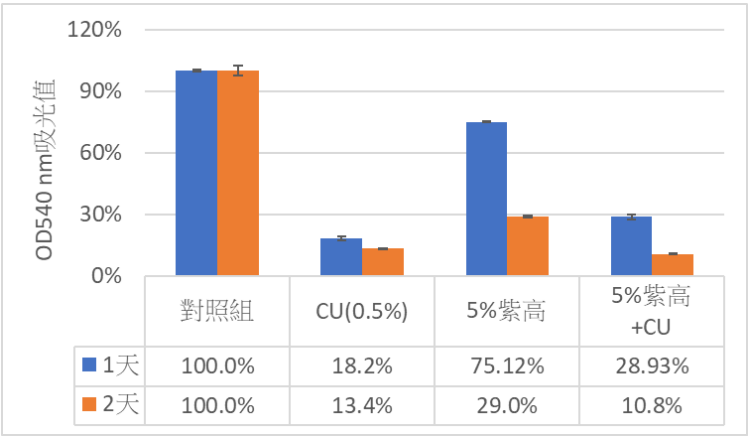
四、在 0.5% $CuSO_4$ (aq)及不同抗氧化物質處理下的水蘊草細胞內的葡萄糖含量差異比較



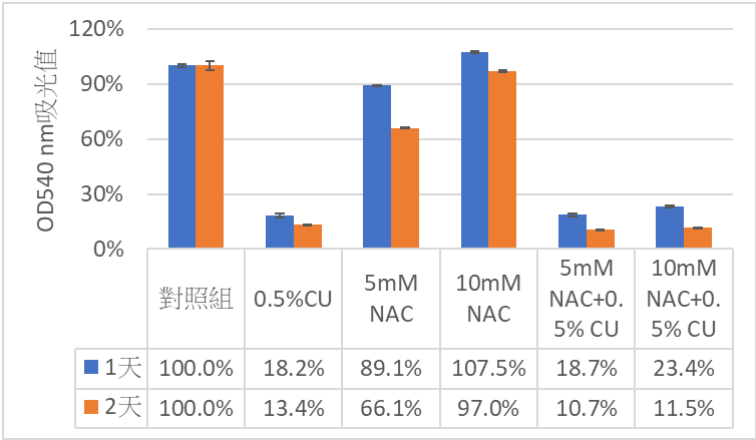
【圖 7】以 DNS 試劑量化水蘊草葉片內部葡萄糖含量



【圖 8】0.5%$CuSO_4$、不同濃度 Vitamin C 及 0.5% $CuSO_4$ 與不同濃度 Vitamin C 對水蘊草細胞內葡萄糖含量的影響



【圖 9】0.5%$CuSO_4$、5%紫色高麗菜萃取液及 0.5% $CuSO_4$ 與 5%紫色高麗菜萃取液對水蘊草細胞內葡萄糖含量的影響



【圖 10】0.5%$CuSO_4$、不同濃度 N-Acetyl-L-Cysteine 及 0.5% $CuSO_4$ 與不同濃度 N-Acetyl-L-Cysteine 對水蘊草細胞內葡萄糖含量的影響

實驗數據分析(圖 8-10):

以上的數據皆是以對照組作為標準化的方式呈現，在葡萄糖含量測試結果下顯示:

(1) 0.5% CuSO4 的處理 1 天與 2 天後，與對照組比較水蘊草葡萄糖含量下降 81.8%與 86.6%。5mM VitC、10mM VitC 處理 1 天後水蘊草葡萄糖含量分別上升 3%與下降 2.5%，處理 2 天後分別下降 16.3%與 60.5%，且統計後都具有顯著差異。

(2) 0.5% CuSO4 的處理下，同時添加 5mM VitC、10mM VitC，1 天後比較 5mM VitC+0.5% CuSO4 與 0.5% CuSO4，水蘊草葡萄糖含量上升 5.1%，2 天後下降 0.5%(統計後沒有顯著差異)。比較 10mM VitC+0.5% CuSO4 與 0.5% CuSO4，1 天後水蘊草葡萄糖量上升 1.7%(統計後沒有顯著差異)，2 天後下降 2.9%，且統計後具有顯著差異。

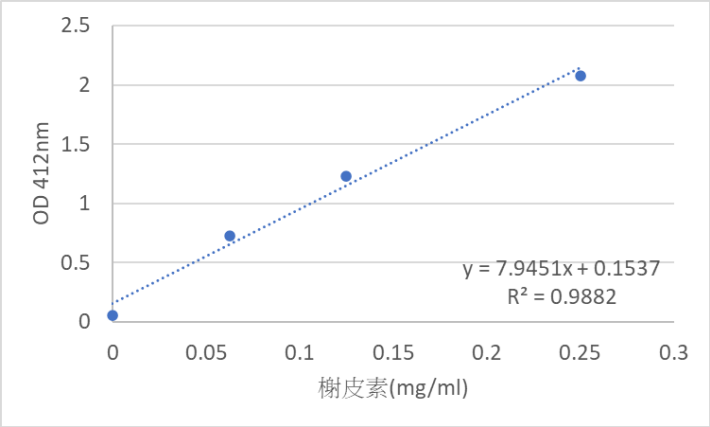
(3) 5%紫色高麗菜萃取液處理下，與對照組比較 1 天後水蘊草葡萄糖含量下降 24.9%，2 天後下降 71%，且統計後都具有顯著差異。

(4) 0.5% CuSO4 的處理下，同時添加 5%紫色高麗菜萃取液，1 天後比較 5%紫色高麗菜萃取液+0.5% CuSO4 與 0.5% CuSO4，水蘊草葡萄糖含量上升 10.7%，2 天後下降 2.5%，且統計後都具有顯著差異。

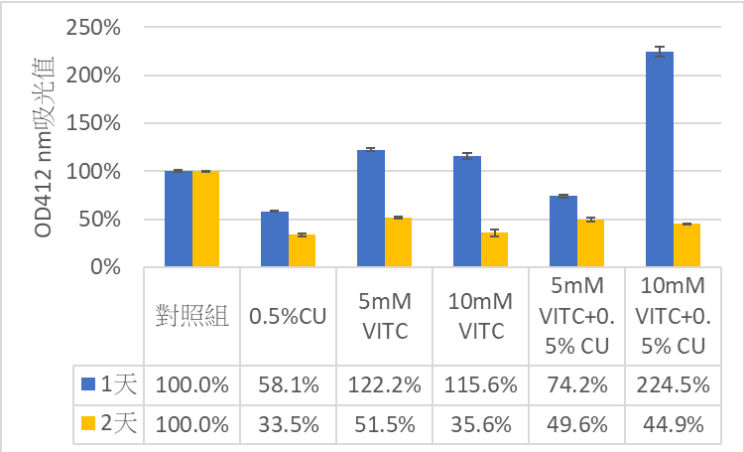
(5) 5mM NAC、10mM NAC 處理下，與對照組比較 1 天後水蘊草葡萄糖含量分別下降 10.9%與上升 7.5%，2 天後下降 33.9%與 3%，且統計後具有顯著差異。

(6) 0.5% CuSO4 的處理下，同時添加 5mM NAC、10mM NAC，1 天後比較 5mM NAC +0.5% CuSO4 與 0.5% CuSO4，水蘊草葡萄糖含量上升 0.4%(統計後沒有顯著差異)，2 天後下降 2.7%。比較 10mM NAC +0.5% CuSO4 與 0.5% CuSO4，1 天後水蘊草葡萄糖含量上升 5.1%，2 天後下降 1.9%，且統計後都具有顯著差異。

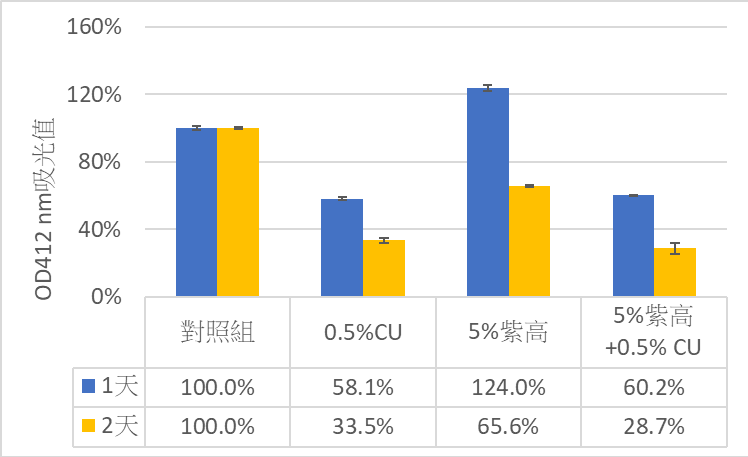
五、在 0.5%$CuSO_4$(aq)及不同抗氧化物質處理下的水蘊草細胞內的類黃酮含量差異比較



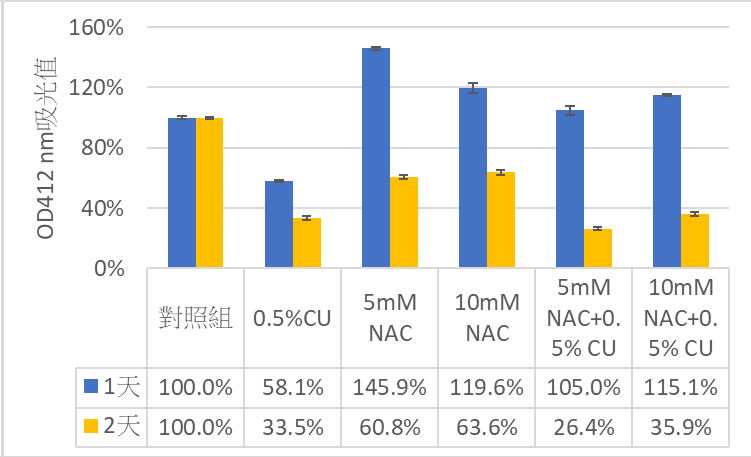
【圖 11】槲皮素標準曲線



【圖 12】0.5%$CuSO_4$、不同濃度 Vitamin C 及 0.5% $CuSO_4$ 與不同濃度 Vitamin C 對水蘊草細胞內類黃酮含量的影響



【圖 13】0.5%$CuSO_4$、5%紫色高麗菜萃取液及 0.5% $CuSO_4$ 與 5%紫色高麗菜萃取液對水蘊草細胞內類黃酮含量的影響



【圖 14】0.5%$CuSO_4$、不同濃度 N-Acetyl-L-Cysteine 及 0.5% $CuSO_4$ 與不同濃度 N-Acetyl-L-Cysteine 對水蘊草細胞內類黃酮含量的影響

實驗數據分析(圖 12-14):

以上的數據皆是以對照組作為標準化的方式呈現，在類黃酮含量測試結果下顯示:

(1) 0.5% $CuSO_4$ 的處理 1 天與 2 天後，與對照組比較水蘊草類黃酮含量下降 41.9%與 66.5%。5mM VitC、10mM VitC 處理 1 天後水蘊草類黃酮含量分別上升 22.2%與 15.6%，處理 2 天後分別下降 48.5%與 64.4%，且統計後都具有顯著差異。

(2) 0.5% $CuSO_4$ 的處理下，同時添加 5mM VitC、10mM VitC，1 天後比較 5mM VitC+0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草類黃酮含量上升 16%，2 天後上升 16.1%。比較 10mM VitC+0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，1 天後水蘊草類黃酮含量上升 166.3%，2 天後上升 11.5%，且統計後皆具有顯著差異。

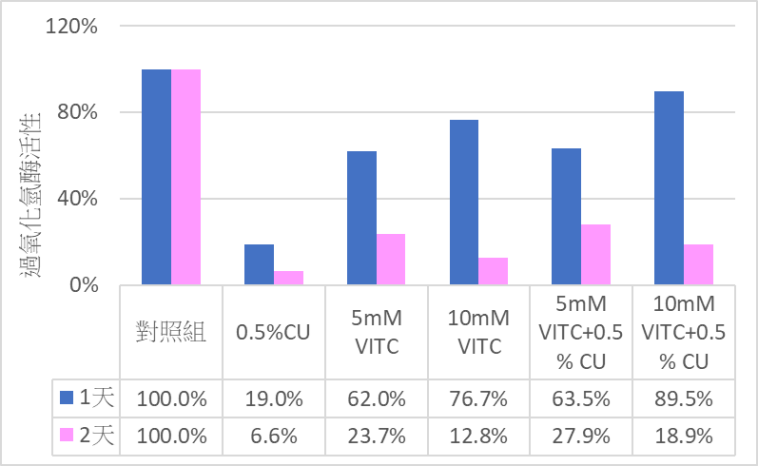
(3) 5%紫色高麗菜萃取液處理下，與對照組比較 1 天後水蘊草類黃酮含量上升 24%，2 天後下降 34.4%，且統計後都具有顯著差異。

(4) 0.5% $CuSO_4$ 的處理下，同時添加 5%紫色高麗菜萃取液，1 天後比較 5%紫色高麗菜萃取液+0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草類黃酮含量上升 2.1%，2 天後下降 4.8%，且統計後都具有顯著差異。

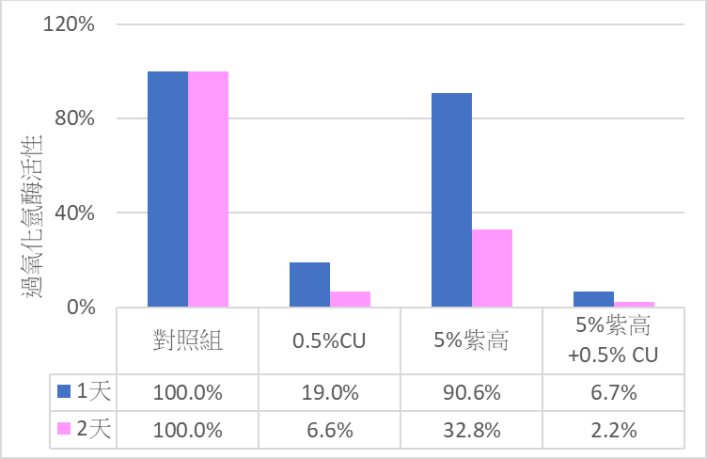
(5) 5mM NAC、10mM NAC 處理下，與對照組比較 1 天後水蘊草類黃酮含量分別上升 45.9%與 19.6%，2 天後下降 39.2%與 36.4%，且統計後具有顯著差異。

(6) 0.5% $CuSO_4$ 的處理下，同時添加 5mM NAC、10mM NAC，1 天後比較 5mM NAC +0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草類黃酮含量上升 46.8%，2 天後下降 7.1%。比較 10mM NAC +0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，1 天後水蘊草類黃酮含量上升 57%，統計後具有顯著差異，2 天後上升 2.4%。

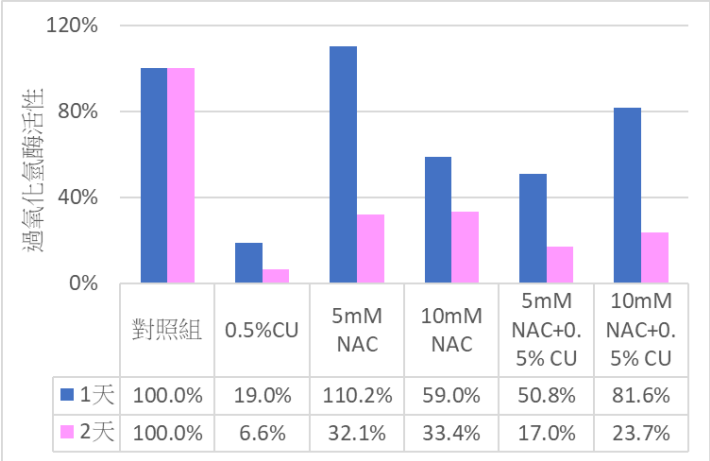
六、在 0.5%$CuSO_4$(aq)及不同抗氧化物質處理下的水蘊草細胞內的過氧化氫酶活性差異比較



【圖 15】0.5%$CuSO_4$、不同濃度 Vitamin C 及 0.5% $CuSO_4$ 與不同濃度 Vitamin C 對水蘊草細胞內過氧化氫酶活性的影響



【圖 16】0.5%$CuSO_4$、5%紫色高麗菜萃取液及 0.5% $CuSO_4$ 與 5%紫色高麗菜萃取液對水蘊草細胞內過氧化氫酶活性的影響



【圖 17】0.5%$CuSO_4$、不同濃度 N-Acetyl-L-Cysteine 及 0.5% $CuSO_4$ 與不同濃度 N-Acetyl-L-Cysteine 對水蘊草細胞內過氧化氫酶活性的影響

實驗數據分析(圖 15-17):

以上的數據皆是以對照組作為標準化的方式呈現，在過氧化氫酶活性測試結果下顯示:

(1) 0.5% $CuSO_4$ 的處理 1 天與 2 天後，與對照組比較水蘊草過氧化氫酶活性下降 81%與 93.4%。5mM VitC、10mM VitC 處理 1 天後水蘊草過氧化氫酶活性分別下降 38%與 23.3%，處理 2 天後分別下降 76.3%與 87.2%。

(2) 0.5% $CuSO_4$ 的處理下，同時添加 5mM VitC、10mM VitC，1 天後比較 5mM VitC+0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草過氧化氫酶活性上升 44.5%，2 天後上升 21.3%。比較 10mM VitC+0.5% $CuSO_4$ 與 0.5% $CuSO_4$，1 天後水蘊草過氧化氫酶活性上升 70.5%，2 天後上升 12.3%。

(3) 5%紫色高麗菜萃取液處理下，與對照組比較 1 天後水蘊草過氧化氫酶活性下降 9.4%，2 天後下降 67.2%。

(4) 0.5% $CuSO_4$ 的處理下，同時添加 5%紫色高麗菜萃取液，1 天後比較 5%紫色高麗菜萃取

液+0.5% $CuSO_4$與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草過氧化氫酶活性下降 12.3%，2 天後下降 4.4%。

(5) 5mM NAC、10mM NAC 處理下，與對照組比較 1 天後水蘊草過氧化氫酶活性分別上升 10.2%與下降 41%，2 天後下降 67.9%與 66.6%。

(6) 0.5% $CuSO_4$的處理下，同時添加 5mM NAC、10mM NAC，1 天後比較 5mM NAC +0.5% $CuSO_4$與 0.5% $CuSO_4$，水蘊草過氧化氫酶活性上升 31.8%，2 天後上升 10.4%。比較 10mM NAC +0.5% $CuSO_4$與 0.5% $CuSO_4$，1 天後水蘊草過氧化氫酶活性上升 62.6%，2 天後上升 17.1%。

柒、討論

一、原本推測在葡萄糖含量與葉綠素含量會成正相關關係，但是結果並無明顯相關性，在銅逆境下葡萄糖含量顯著減少，但在添加抗氧化物下也只有維他命C有些微提升銅逆境下造成葉綠素含量之減少。三種抗氧化物質都只能稍微提高銅逆境下造成葡萄糖含量之減少。故推測重金屬銅逆境下，葉綠素的減少不是造成葡萄糖減少的主因，可能是破壞葡萄糖的生成相關酵素所導致。

二、花青素為黃酮類化合物，是一種強力的重金屬螯合物，可以降低自由基與重金屬的危害。雖然水蘊草本身並無大量的花青素，可是透過抗氧化物質的處理下，可以增加水蘊草細胞內花青素與類黃酮的含量，可能藉由與細胞內的重金屬形成螯合物，降低細胞內部的重金屬含量，同時也可以清除清除細胞內自由基的分子，增加水蘊草細胞的抗氧化力，增加水蘊草抵抗銅逆境的能力。

三、在銅逆境下，以維他命C與NAC處理，皆可提高銅逆境下造成過氧化氫酶含量之減少，未來可以往相關機制做更深入研究。

四、本次研究只有在重金屬銅例子逆境下，同時添加抗氧化物質2天，未來可以做更長期的添加，探討抗氧化物質是否能真正復甦重金屬銅例子逆境下的水蘊草，增加在水汙染上的實際應用性。

捌、結論

一、水蘊草在重金屬銅逆境下，葉綠素含量、花青素含量、葡萄糖含量、類黃酮含量、過氧化氫酶活性皆會下降。

二、在抗氧化物質處理下對銅逆境下造成水蘊草細胞內葉綠素含量之減少，沒有太大的改變或上升。

三、在抗氧化物質處理下，對銅逆境下造成水蘊草細胞內花青素含量之減少，有改善的效果，NAC>VitC。

四、在抗氧化物質處理下，對銅逆境下造成水蘊草細胞內葡萄糖含量之減少，有些微改善的效果，紫色高麗菜萃取液> VitC > NAC。

五、在抗氧化物質處理下，對銅逆境下造成水蘊草細胞內類黃酮含量之減少，有改善的效果，VitC > NAC >紫色高麗菜萃取液。

六、在抗氧化物質處理下，對銅逆境下造成水蘊草細胞過氧化氫酶活性之減少，有改善的效果，VitC > NAC。

綜合上述結論，維他命C在本研究中的確最有利於受重金屬銅逆境下的水蘊草提高體內的抗氧化物質生成與抗氧化活性，推測可以藉由這樣的改變提高水蘊草抵抗重金屬銅逆境下的生存機會。

玖、參考文獻

一、養我育我的部落勇士—探討小米(becenge)的生存之秘，2013，楊茜雯、巴洛克、陳奕婷、江芝韻、林恆生。中華民國第 54 屆中小學科展國中組生物科第三名。

二、「重」「花」了喔!--探究花青素對於重金屬環境下的水生植物之抗氧化活性--，2015，蔡欣蓉、潘怡君、陳盈吉、鍾梅英。中華民國第 56 屆中小學科展國中組化學科佳作。

三、「蕨」處逢生，陳昀竺、陳梓寧、陳俐蓉。中華民國第60 屆中小學科學展覽會生物科第三名。

四、藥學雜誌電子報 103 冊 抗氧化劑及常見之抗氧化活性評估方法
https://jtp.taiwan-pharma.org.tw/103/132-137.html