

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 植物學科

佳作

052113

探討鹼基錯配修復系統對相近物種雜交不孕的
影響

學校名稱：臺北市立永春高級中學

作者：

高二 王品涵

高二 黃暉旻

指導老師：

李映璇

關鍵詞：減數分裂、錯配修復基因、染色體交叉

摘要

本研究探討 DNA 鹼基錯配修復(mismatch repair，MMR)系統在釀酒酵母與奇異酵母雜交合子中的作用，並揭示其對雜交不孕的關鍵影響，具備了癌症研究及農工業菌株改良的潛在應用價值。由於兩物種之基因體序列差異大，雜交合子於減數分裂時產生大量鹼基錯配，活化 MMR 系統，導致過多具干擾性的同源重組產物，使染色體分離異常、孢子無法正常發育。本研究利用可在孢子壁表現三色螢光蛋白的酵母系統，並透過 *P_{CLB2}-MSH2* 專一性抑制 *MSH2* 於減數分裂期間之表現，有效降低干擾性重組、顯著提升孢子存活率。研究結果顛覆傳統認為雜交不孕源於重組不足的觀點，進一步釐清 MMR 系統在遺傳隔離中的角色。

壹、前言

一、研究動機

相近但不同物種交配後形成的雜交合子，雖然能進行減數分裂(meiosis)，但無法產生配子或形成不具生育能力的配子，此現象即是所謂「後合子生殖隔離」。過去 30 年，科學家們多認為後合子生殖隔離的成因之一是：雜交合子內來自親代雙方的基因體 DNA 序列差異過大，導致在減數分裂時，產生大量「鹼基錯配」。鹼基錯配被 DNA「鹼基錯配修復(mismatch repair; MMR)」系統的主控蛋白質 Msh2 辨識與結合後，啟動鹼基錯配修復(MMR)系統作用。這一系統會抑制同源染色體間發生同源重組反應，降低同源重組終產物的數目，導致同源染色體對在第一次減數分裂核分離(meiosis I, MI)時無法正常分離，最終產生大量染色體數目不正常的配子(Hunter, 1996; Spies, 2015; Chakraborty, 2016; Bozdag, 2021)。

不過我們實驗室最近研究發現，釀酒酵母與奇異酵母的異種雜交合子同源染色體間形成「過多」而非不足的同源重組終產物，最終導致同源染色體不正常分離(nondisjunction)，造成雜交不孕（圖一及圖二）。

為了進一步驗證我們的新假說，本研究中，我們利用有性孢子能產生三種不同顏色螢光蛋白的酵母菌，比較同種合子和異種合子孢子存活率與不同同源重組終產物發生頻率，再以 *P_{CLB2}-MSH2* 專一性地抑低負責啟動鹼基錯配修復(MMR)系統的 *MSH2* 基因在減數分裂時轉錄表現量，評估鹼基錯配修復(MMR)系統對減數分裂同源重組與雜交不孕的影響。

除了深入探討雜交不孕的分子機制外，本研究亦具有多重應用潛力。首先，雖然本研究以釀酒酵母為模式系統，MMR 系統在人類細胞中也具類似功能，其缺陷與大腸癌、子宮內膜癌等多種癌症密切相關，因此對 MMR 機制的理解，有助於未來開發癌症靶向療法。其次，MMR 系統亦可能限制人工雜交的成功率，若能調控此系統，將可應用於經濟作物或保育物種的繁殖策略，提升農業產量與生物多樣性。最後，酵母菌在食品發酵與生物燃料領域具廣泛應用，若能優化 MMR 系統，有潛力培育出更具工業價值的菌株，例如耐高溫或高效率的生產菌種。因此，本研究不僅有助於釐清雜交不孕的根本機制，亦為醫學與生技產業提供重要參考。

舊假說 (Hunter, 1996; Spies, 2015)

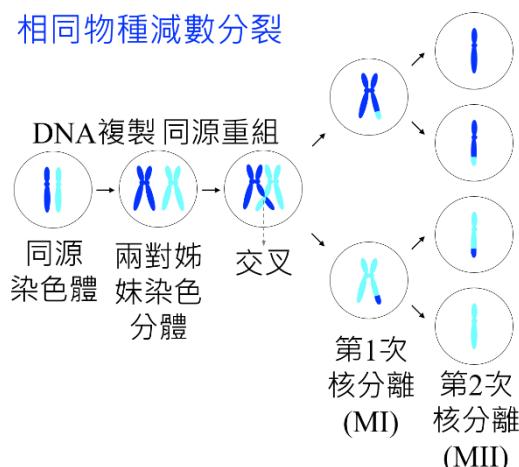
雜交合子內 MMR「抑制」所有同源重組反應產物生成，形成染色體非整倍體有性孢子。

新假說

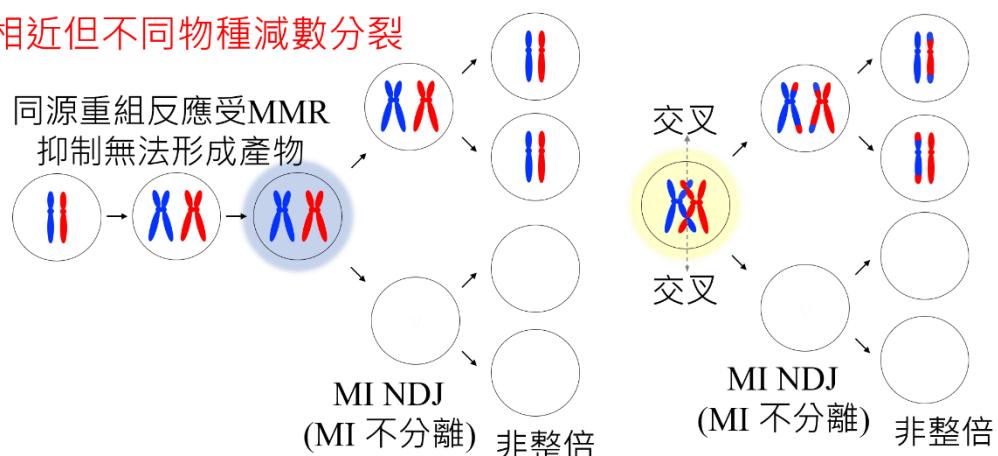
雜交合子內 MMR「促進」干擾性互換同源重組產物生成，形成染色體非整倍體有性孢子。

圖一、舊假說與新假說的比較（作者自製）

相同物種減數分裂



相近但不同物種減數分裂



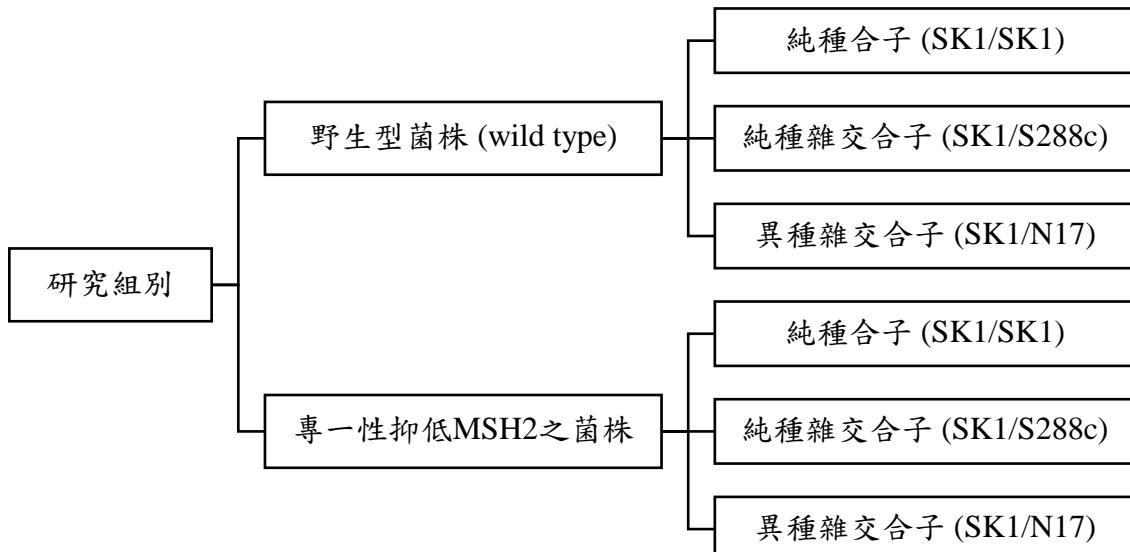
圖二、舊假說與新假說減數分裂過程比較（作者自製）

二、研究目的

- (一) 比較純種、同種和異種雜交合子及分別進行專一性抑低 *MSH2* 基因的合子之有性孢子存活率。
- (二) 計算各組合子進行減數分裂與產胞作用後，形成孟德爾分離(Mendelian segregation; MS)、非孟德爾分離(Non-Mendelian segregation; NMS)與第一次減數分裂核分離時不

正常分離(MI Nondisjunction; MI NDJ)四分體(tetrad)的數量。

(三) 進一步探討各組之「干擾性互換」、「非干擾性互換」與「基因替代」發生頻率，從而判定鹼基錯配修復(MMR)系統對減數分裂同源重組與雜交不孕的影響。



圖三、研究組別分類圖（作者自製）

三、文獻回顧

(一) 鹼基錯配修復系統

鹼基錯配修復(Mismatch Repair; MMR)系統是一種重要的 DNA 修復機制，負責修正 DNA 複製或修補過程中發生的「鹼基錯配」。Msh2 是真核細胞鹼基錯配修復(MMR)系統最核心蛋白質，它與 Msh3 和 Msh6 蛋白質分別形成 MutS α 與 MutS β 兩個雙異單元複合體，負責辨識 DNA 的鹼基錯配。出芽酵母菌(budding yeast; 本文主要研究對象)的 MutS α 專門負責檢測單一鹼基錯配及小型錯配，MutS β 主要負責辨識具較長錯配鹼基的序列。MutS α 與 MutS β 分別招募不同 MutL 蛋白複合體(MutL α 、MutL β 與 MutL γ)後，啟動一系列鹼基錯配修復(MMR)系統下游的修復反應，包括切除含鹼基錯配的 DNA 片段與填補正確的鹼基。

(二) P_{MSH2} 與 P_{CLB2}

P_{MSH2} 與 P_{CLB2} 分別是 $MSH2$ 與 $CLB2$ 的啟動子(promoter)， $CLB2$ 的 mRNA 僅在進行有絲分裂細胞轉錄表現，進入減數分裂後就其轉錄活性被抑低，大幅降低 mRNA 的表現量，

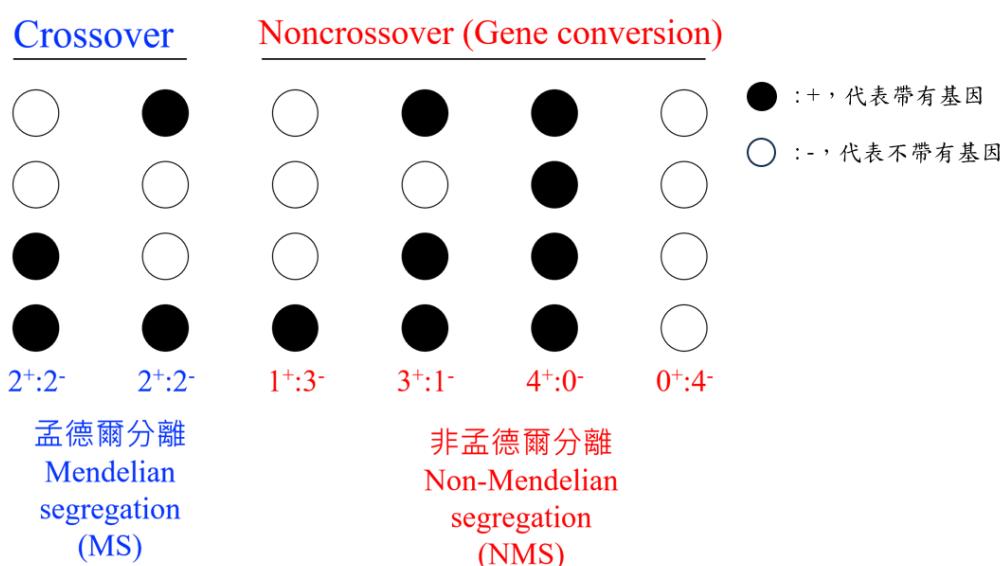
因此將 P_{MSH2} 更換為 P_{CLB2} 可以達到在減數分裂前期時啟動，中期後關閉，讓 MMR 系統活性暫時降低，此方式比直接敲落 $MSH2$ 具有更好的時間控制性。

(三) DNA 同源重組終產物

真核生物進行有性生殖時，生殖細胞或合子進行減數分裂。特色之一是來自親代雙方的同源染色體會發生一系列交互作用，包括配對(paring)、聯會(synapsis)與重組(recombination)，促成同源染色體的 DNA 進行序列交換，形成兩種 DNA 同源重組終產物(圖四)：

1. 互換(crossover; CO)：互換(CO)同源重組終產物交叉與互換親代雙方同源染色體 DNA 序列後，遵循孟德爾分離率(Mendel's law of segregation)，產生 $2^+ : 2^-$ 等位基因型。
2. 非互換(non-crossover; NCO)：非互換(NCO)同源重組終產物也被稱為「基因替換(Gene conversion; GC)」。NCO 或 GC 的形成不遵循孟德爾分離率。親代雙方同源染色體 DNA 序列發生一次單向 DNA 序列取代，形成 $3^+ : 1^-$ 或 $1^+ : 3^-$ 等位基因型。親代雙方同源染色體 DNA 序列發生兩次單向 DNA 序列取代，則形成 $4^+ : 0^-$ 或 $0^+ : 4^-$ 等位基因型。

因為這兩種 DNA 同源重組終產物，因此配子的基因體序列具新遺傳變異。



圖四、減數分裂同源染色體間同源重組反應產生二種終產物（作者自製）

(四) 測定互換(CO)發生機率與干擾交互作用

傳統遺傳學測定互換(CO)發生機率的方法是定量二個相鄰顯隱性等位基因對(allelic pair; 例如 A-B 與 a-b)的遺傳距離(genetic distance)。若同源重組終產物分離時，遵循「孟德爾分離(Mendelian segregation; MS)」，會形成三種不同 $2^+ : 2^-$ 等位基因對的「孟德爾分離(MS)型」四分體(tetrad)，其中：

A-B / A-B / a-b / a-b 四分體是「親代雙型(Parental Ditype ; PD)」；

A-B / a-b / a-B / A-b 四分體是「四本型 (Tetradtype, T)」；

A-b / A-b / a-B / a-B 四分體則是「非親代雙型 (Non-Parental Ditype; NPD)」。

計算此三種不同「MS 型」四分體的數量後，再利用美國遺傳學家 David Perkins 於 1949 推導的方程式決定遺傳距離(genetic distance)，如下。

$$\text{遺傳距離}(\text{genetic distance}) = \frac{100 (6\text{NPD} + \text{T})}{2 (\text{PD} + \text{NPD} + \text{T})}$$

遺傳距離單位是厘摩根或百分摩根(centimorgan, cM)。1 單位厘摩根等於 A/a 與 B/b 兩個等位基因對發生 CO 的機率是 1%。

傳統遺傳學也以三個相鄰等位基因對(例如 A-B-c 與 a-b-C)來定量「A/a-B/b」與「B/b-c/C」兩個遺傳區間分別產生的 CO 間是否發生「干擾(interference)」交互作用，來決定 CO 調控機制的性質與強度。

1. 正干擾(positive interference)：是指在三個相鄰基因測試時，「A/a-B/b 區間」內一個互換(CO)發生後會抑低鄰近「B/b-c/C 區間」再發生另一個互換(CO)的機率。
2. 負干擾(negative interference)：是指在第一個區間內互換(CO)發生後，增加鄰近第二個區間再發生另一個互換(CO)的機率。

干擾值(γ)等於 1 與併發系數(coefficient of coincidence; c.o.c.)的差，即 $\gamma = 1 - \text{c.o.c.}$ 。併發系數是相鄰兩個 CO 同時發生的觀測頻率值(Actual double CO frequency; ADCF)與期望頻率值(Expected double CO frequency; EDCF)之商，數學公式為 $\text{c.o.c.} = \text{ADCF}/\text{EDCF}$ 。

(五) 干擾性互換(interfering CO)與非干擾性互換(non-interfering CO)

上述提到的 CO 同源重組終產物又可分為「干擾性互換(interfering CO)」與「非干擾性互換(non-interfering CO)」兩種。在第一次減數分裂核分離(meiosis I, MI)時，「干擾性互換」會使同源染色體形成「染色體交叉(chiasma)」，這是一種可由細胞學染色法辯識與定量的特化結構。在第一次減數分裂核分離(MI)時，染色體交叉(chiasma)作為物理性「支點」，能平衡紡錘體對同源染色體間的張力，確保其正確分離。若同源重組不正常發生，使「干擾性互換」數量不足或過多，導致同源染色體對在第一次減數分裂核分離(MI)不正常分離(nondisjunction; NDJ)，再經第二次減數分裂核分離(meiosis II, MII)，最終產生不具生育能力或不能存活的染色體數目「非整倍」的配子。因此每一對同源染色體間至少要形成一個染色體交叉(chiasma)，確保正確分離。此外，染色體交叉(chiasma)數目不能太多，否則彼此間距離太短，易減弱姊妹染色體併黏強度與紡錘體的張力(Brown, 2014; Hunter, 2015; Ahuja, 2021)。

(六) 測定非互換(NCO)發生機率

非互換(NCO)發生的機率則是由定量進行「非孟德爾分離(non-Mendelian segregation; NMS)」所產生的「非孟德爾分離(NMS)」型四分體。如果 MI 時某一成對同源染色體發生不正常分離(NDJ)，再經 MII 後，四條姊妹染色分體只會均分到兩個配子，最終「不正常分離(MI NDJ) 型」四分體內只有兩個配子有兩條姊妹染色分體，另外兩個配子則無姊妹染色分體。

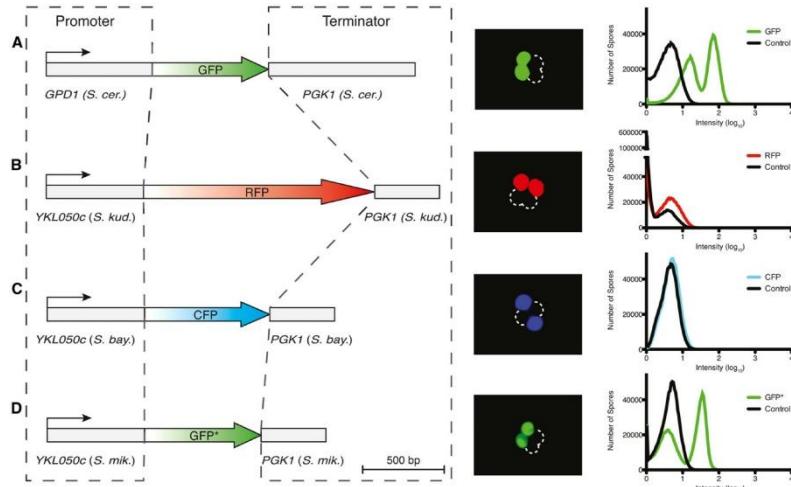
(七) 有性孢子自發性螢光蛋白酵母菌系統

本研究採用美國科學家 Scott Kenney 博士實驗室 2011 年所開發的「有性孢子自發性螢光蛋白酵母菌系統」(Thacker, 2011) (圖五)。這個系統的特色是在酵母菌第八對染色體的三個位點(*CEN8*、*ARG4* 與 *THR1*)上分別插入能專一性表現在有性孢子的孢子壁的三個不同顏色螢光蛋白基因：紅螢光蛋白[red fluorescent protein (*RFP*; *R*)]、綠螢光蛋白[green fluorescent protein (*GFP*; *G*)]與青螢光蛋白[cyan or blue fluorescent protein (*CFP*; *C*)]。然後建構三個相鄰等位基因對的雙套酵母菌，這三對等位基因對分別是 *CEN8(r)/CEN8::RFP(R)*、*ARG4(g)/ARG4::GFP(G)*與 *THR1(c)::CFP/THR1(C)*。*CEN8::RFP(R)*使孢子壁顯示紅色螢光，

*ARG4::GFP(G)*基因型使孢子壁顯示綠色螢光，*THR1::CFP(C)*基因型使孢子壁顯示青藍色螢光，*CEN8(r)*、*ARG4(g)*與 *THR1(c)*基因型的孢子壁不顯示任何有色螢光。

「有性孢子自發性螢光蛋白酵母菌系統」與其它研究方法相比，如傳統遺傳學、全基因體 DNA 定序法與免疫染色細胞學方法，有以下幾個優勢：

1. 融光蛋白質的基因可以被精確地引入到酵母菌特定染色體上的位點，專一性在有性孢子的孢子壁表達三個不同顏色螢光蛋白。
2. 可利用螢光顯微鏡，直接、快速且大量地觀測每個四分體內四個孢子的螢光顏色，然後判定它的基因型，不用再耗時且費力地進行四分體單孢子解析實驗。
3. 這個系統克服了有性孢子低存活率的問題。傳統遺傳學與全基因體 DNA 定序法都需要先利用四分體單孢子解析實驗分離各別有性孢子，再逐一讓其萌發與營養生長，產生大量子細胞，然後進行後續研究，鑑定每個有性孢子的基因型或表現型。因為本研究所探討的異種雜交合子無法產生能存活的有性孢子，上述兩個研究方法就不適用。
4. 免疫染色細胞學方法有多項先天性缺點，包括過程複雜繁瑣、技術門檻高、高度依賴優質的蛋白質抗體。此外，免疫染色細胞學方法最大的爭議點是不確定哪種蛋白質的抗體足以正確地代表不同類型的減數分裂同源重組產物。
5. 因「有性孢子自發性螢光蛋白酵母菌系統」能大量定量遵循或不遵循孟德爾分離率 (Mendel's law of segregation) 分別形成的「孟德爾分離(MS)型」、「非孟德爾分離(NMS)型」與「不正常分離(MI NDJ)型」四分體，因我們能準確地定量 CO 與 GC 發生頻率和判定干擾值。也能正確計算 MI 不正常分離(NDJ)發生頻率。



圖五、有性孢子自發性螢光蛋白酵母菌系統示意圖（Thacker, 2011）

貳、研究設備及器材

一、實驗試劑

表一、實驗試劑

Phusion PCR & Taq PCR & Colony-PCR		
純淨水 (ddH ₂ O)	5x Phusion HF 緩衝液 (5x Phusion HF Buffer)	
去氧核糖核苷酸 (dNTP)	Phusion 聚合酶 (Phusion DNA Polymerase)	
Taq 聚合酶 (Taq polymerase)	Taq 緩衝液 (10x 標準 Taq 反應緩衝液)	
氯化鎂溶液		-
凝膠電泳 (Gel electrophoresis)		
脂糖 (Agarose)	溴化乙錠 (EtBr)	染料 (6x Loading Dye)
凝膠純化 (Gel extraction)		
結合緩衝液 (Binding buffer)	清洗緩衝液 (Washing buffer)	
洗脫液 (Elution Buffer)	TE 緩衝液，成分：三羥甲基氨基甲烷 (Tris)，乙二胺四乙酸(EDTA)	
TAE 緩衝液，成分：三羥甲基氨基甲烷 (Tris)，醋酸，乙二胺四乙酸(EDTA)	TBE 緩衝液，成分：三羥甲基氨基甲烷 (Tris)，醋酸，乙二胺四乙酸(EDTA)	
建構酵母菌突變株		
1x LiAc/1xTE pH7.5 緩衝液，成分：100 mM Lithium acetate, pH7.5、10 mM Tris-HCl, pH7.4、1 mM EDTA, pH7.4	40% PEG4000 溶液，成分：100 mM Lithium acetate, pH7.5、10mM Tris-HCl, pH7.4、1 mM EDTA, pH7.4、40% Polyethylene glycerol)	
鮭魚精子 DNA (Salmon sperm DNA , ssDNA)	二甲基亞礦 (Dimethyl sulfoxide DMSO)	
四分體分離實驗		
酵母裂解酶緩衝液 (Zymolyase buffer) , 成分：	酵母裂解酶，成分：5 µg/ml 100T	

1 M sorbitol、50 mM K ₃ PO ₄ , pH 7.5、5 mM EDTA	Arthrobacter luteus Zymolyase) 2-巯基乙醇 (β -mercaptoethanol)
同步化酵母菌減數分裂週期	
2% 醋酸鉀溶液 (potassium acetate, KAc)	細胞固定溶液 (DAPI fix solution) , 成分： 0.1 M sorbitol, 40% Ethanol, 5 mM EDTA)
刀豆蛋白 A (Concanavalin A, ConA)	指甲油

二、設備與器材

表二、設備與器材

微量離心管 (eppendorf)	微量吸管 (pipet)	微量離心管 (eppendorf)
培養皿	酒精燈	玻棒
電子秤	乾浴槽	電泳槽
紫外光觀察箱	迴轉式振盪培養箱	恆溫培養箱 (incubator)
無菌操作台 (Sterile Operating Table)	倒立顯微鏡	
四分體解剖顯微鏡 (型號：Nikon eclipse 55i)	正立式全電動螢光顯微鏡 (型號：Zeiss Axio Imager, Z1)	
桌上型離心機 (型號：Eppendorf 5424R)	超音波震盪機 (型號：MISONIX XL-2000)	
聚合酶連鎖反應儀 (Polymerase chain reaction Thermo Cycler)		

三、實驗菌株

表三、酵母菌株基因型

酵母菌品系	基因型
SK1	<i>MATa, ho::LYS2, ura3, lys2, leu2::hisG, trp1::hisG, THR1::Cerulean(CFP)-TRP1, MSH2</i>
	<i>MATa, ho::LYS2, ura3, lys2, leu2::hisG, trp1::hisG, THR1::Cerulean(CFP)-TRP1, P_{CLB2}-MSH2::KanMX4</i>
	<i>MATa, ho::LYS2, ura3, lys2, leu2::hisG, trp1::hisG, CEN8::tdTomato(RFP)-LEU2, ARG4:: GFP*-URA3, MSH2</i>
	<i>MATa, ho::LYS2, ura3, lys2, leu2::hisG, trp1::hisG, CEN8::tdTomato(RFP)-LEU2, ARG4:: GFP*-URA3, P_{CLB2}-MSH2::KanMX4</i>
S288c	<i>MATa, ho, ura3, lys2, arg4-bg, leu2, his3, met15, trp1, THR1::Cerulean(CFP)-TRP1MSH2</i>
	<i>MATa, ho, ura3, lys2, arg4-bg, leu2, his3, met15, trp1, THR1::Cerulean(CFP)-TRP1P_{CLB2}-MSH2::KanMX4</i>
N17	<i>MATa, ho, lys2, cyh2r, trp1::NatMX, THR1::Cerulean(CFP)-TRP1,</i>

	<i>MSH2</i>
	<i>MATa, ho, lys2, cyh2r, trp1::NatMX, THR1::Cerulean(CFP)-TRP1, P_{CLB2}-MSH2::KanMX4</i>

SK1/SK1 為純種合子、S288c/SK1 基因體序列差異僅~2%屬同種雜交、N17/SK1 基因體序列差異>12%屬異種雜交。

四、 實驗培養基

表四、實驗培養基

培養基	配方	
YPD	2 % (w/v) Bacto peptone (Bacto, USA)	1 % (w/v) Tryptophan (Sigma, USA)
	2 % (w/v) Yeast extract (Bacto, USA)	2 % (w/v) Bacto agar (Bacto, USA)
	0.05 % (w/v) Adenine (DIFICO, USA)	2 % Glucose
YPA	2 % (w/v) Bacto peptone 1 % (w/v) Yeast extract	1 % (w/v) Potassium acetate (Merk, Germany)
YPG	2 % (w/v) Bacto peptone 2 % (w/v) Yeast extract 0.05 % (w/v) Adenine	1 % (w/v) Tryptophan 2 % (w/v) Bacto agar 3 % Glycerol
KAc	2 % (w/v) Potassium acetate	

參、研究過程與方法



圖六、實驗流程圖（作者自製）

一、 設計基因序列

首先，確定基因設計的預期功能和目標，選擇合適的基因序列來源，我們使用酵母菌基因組資料庫(SGD)進行查找。接著根據目標，設計 PCR 引物，並考慮引物的長度、確認限制酶位點以設計適合的起始子和終止子序列。最後進行實驗，確認基因設計是否達到預期效果。

二、 Phusion PCR

取一 PCR 反應管，依次加入 36.5 μL 二次蒸餾水(ddH₂O)、5x Phusion HF 緩衝液、1 μL 20 mM Primer (R)、1 μL 20 mM Primer (F)、0.4 μL 25 mM dNTP、1 μL DNA 模板和 0.5 μL Phusion 聚合酶，混合後離心數秒鐘。將試管放入聚合酶連鎖反應儀，設定溫度循環後待反應完成，再取出進行 DNA 電泳。

三、 凝膠電泳 (Gel electrophoresis)

取一段蠟紙，將 1 μL dye 滴於蠟紙上，然後加入 5 μL PCR 產物並混合。將混合後的 DNA 樣本注入膠體凹槽中，接著以 130 伏特進行 25 至 30 分鐘的電泳。將含有 EtBr 的凝膠置於紫外光觀察箱下進行觀察並拍攝紀錄。

四、 凝膠純化 (Gel extraction)

在完成 DNA 凝膠電泳後，使用乾淨的手術刀切下所需的 DNA 帶，將凝膠切片放入微量離心管稱重。加入等體積的 Binding Buffer，在 60°C 下培養 10 分鐘，直到凝膠切片完全溶解。將溶液轉移到離心柱中，插入收集管，以 12000 rpm 離心 1 分鐘，丟棄收集管中的液體。加入 600 μL 的 Washing Buffer，重複以 12000 rpm 離心 1 分鐘兩次。丟棄廢液後，在 12000 rpm 下再離心 3 分鐘。將離心柱轉移至新微量離心管，加入 15 μL TE 緩衝液，靜置 1-2 分鐘，再以 12000 rpm 離心 1 分鐘。最後，將 DNA 儲存在微量離心管中於-20°C 保存。

五、 建構酵母菌突變株

將待轉型的酵母菌株加入 5 ml YPDA 培養液中，在 30°C 培養箱中培養 1 天。次日，將昨日培養的菌液稀釋至新鮮 YPDA 培養液中，使其光密度達到 0.08~0.1 OD₆₀₀ 單位。每個實驗組以 10 ml 菌液作為單位，並在 30°C 的培養箱中培養 2 至 2.5 小時。以 2200 rpm 離心 5 分鐘，丟棄上清液以分離酵母菌和培養液。加入 10 ml 無菌水清洗酵母菌，再次離心。取兩個微量離心管，分別加入 100 μL 溶液 A (100 mM Lithium acetate, pH 7.5、10 mM Tris-HCl, pH 7.4、1 mM EDTA, pH 7.4)。將 2-4 μL 的目標基因片段與 6 μL 鮭魚精子 DNA 混合均勻，然後與之前準備好的 100 μL 菌液充分混合。在每管分別加入 600 μL 溶液 B (100 mM Lithium acetate, pH 7.5、10 mM Tris-HCl, pH 7.4、1 mM EDTA, pH 7.4、40% Polyethylene glycerol)。翻轉數次使內容物混合均勻。注意：40% PEG4000 非常黏稠，需充分混合，但勿過度攪拌。將菌液置於

30°C培養箱中培養 30 分鐘，過程中每 10 分鐘搖晃一次以保持混勻。隨後加 70 μ L 100 % DMSO，顛倒試管數次以混合均勻。接著將其置於 42°C 乾浴槽中 15 分鐘，此時細胞較脆弱，無需搖晃。使用 Eppendorf 5424R 桌上型離心機以 13000 rpm 離心 10 秒，小心去除上清液，保留沉澱的酵母菌。最後，加入 1 ml YPDA 培養液後，在 30°C 培養箱培養 2 小時。2 小時過後使用 Eppendorf 5424R 桌上型離心機以 13000 rpm 離心 10 秒後去除部分培養液將剩餘的培養液與酵母菌混合均勻，然後塗到具有特定抗生素或缺乏特定營養的培養基上，將培養基放入 30°C 的培養箱中，培養兩天等待菌落生長。培養基上出現的菌株表示轉型成功，而後利用 PCR 技術確認轉化菌株的基因型是否正確。

六、 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

取一 PCR 反應管，依次加入 41.1 μ L ddH₂O、0.4 μ L 25 mM dNTP、1 μ L 20 mM Primer (R)、1 μ L 20 mM Primer (F)、5 μ L 10x Buffer、1 μ L DNA 模板和 0.5 μ L Taq 聚合酶，混合後離心數秒鐘。將試管放入聚合酶連鎖反應儀，設定溫度循環後待反應完成，再取出進行 DNA 電泳。

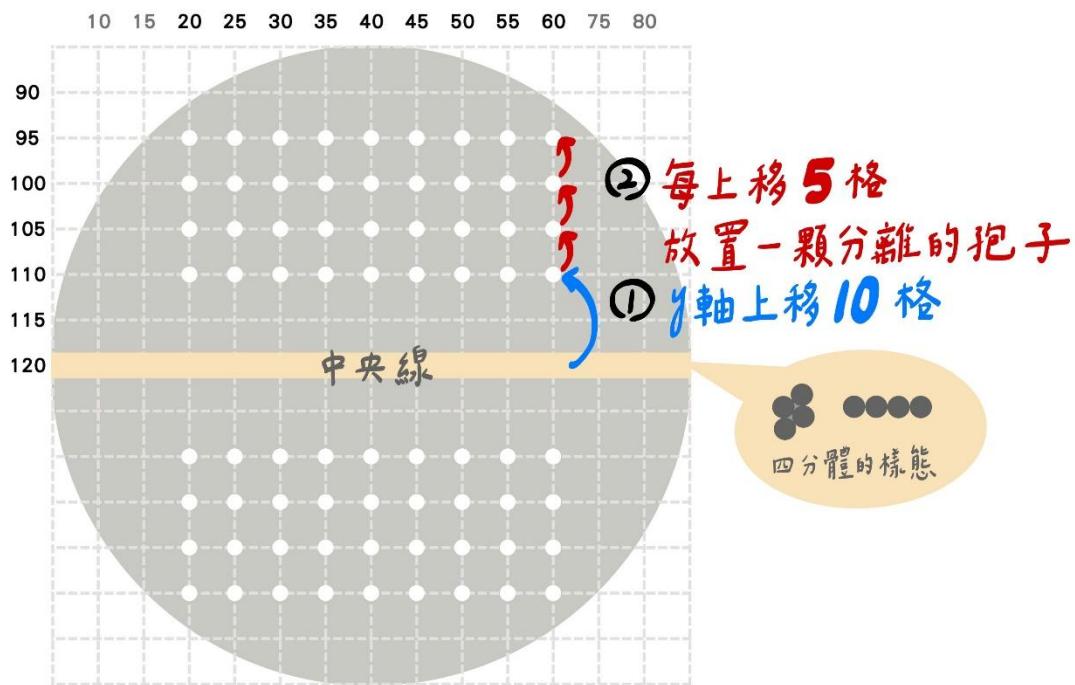
七、 利用 Colony-PCR 確認突變株建構

將 6 μ L ddH₂O 和少量細胞加入微量離心管中，於 95°C 加熱 10 分鐘後，定溫至 55°C。接著，調配每管所需的 24 μ L PCR 混合液。首先取一微量離心管，加入 18.81 μ L ddH₂O，1.2 μ L MgCl₂，0.3 μ L 20 μ M Primer (F)，0.3 μ L 20 μ M Primer (R)，0.24 μ L 25 μ M dNTP，3 μ L 10X Taq buffer，和 0.15 μ L Taq 聚合酶。完成混合後進行 PCR 反應，隨後進行電泳分析。

八、 利用四分體分離定量孢子存活率

取少量雙倍體菌落，將其放置於 2% KAc 培養盤中，並在 30°C 下培養超過 24 小時。然後刮取少量孢子(約米粒大小)加入 100 μ L 酵母裂解酶溶液(Zymolyase buffer，1 M sorbitol、50 mM K₃PO₄ pH 7.5、5 mM EDTA)、5 μ L 5 μ g/ml 100T Arthrobacter luteus Zymolyase 與 2 μ L 2-疏基乙醇(β -mercaptoethanol)，混合均勻。將混合物置於 37°C 加熱 20-30 分鐘，並置於冰上冷卻，以去除酵母菌的細胞壁，方便後續四分體的分離。取已去除細胞壁的菌液 10 μ L，垂直滴在 YPDA 培養盤的中央線上，並避免菌液碰觸培養盤邊緣。將培養盤置於無菌操作台上，等

待菌液完全乾燥。使用 Nikon Eclipse 55i 四分體解剖顯微鏡進行四分體分離。首先，調整針的位置，在液滴處找到四分體，並用針將四個孢子分離。為了將孢子整齊排列，y 軸上移 10 格，放置四分體後，再用針固定一顆孢子，並敲擊顯微鏡使孢子各自分離。接著，y 軸每上移 5 格，放置一顆分離的孢子，重複分離和放置的步驟，直至完成半盤培養皿的操作。然後，將培養皿旋轉 180 度，重複挑取和分離四分體的步驟，完成整盤的操作(圖六)。最後，將培養盤放在 30°C 培養箱中兩天，並計算孢子的存活率。存活率的計算公式為：(長出的孢子數/放置的孢子數) × 100%。



圖七、四分體分離實驗示意圖（作者自製）

九、同步化酵母菌減數分裂週期

將雜交成功的酵母菌以每分鐘 2200 轉的速度進行離心三分鐘，棄去培養液，並用等體積的滅菌水清洗兩次，確保菌體純淨。隨後，再次進行離心並棄去上清液。接著，將沉澱下來的酵母菌用 20 mL 2% 醋酸鉀溶液(potassium acetate, KAc)回溶沉澱的酵母菌，並將這些菌液置於 250 mL 的錐形瓶中。在 30°C 的環境下，以 200 rpm 的速度振盪培養。醋酸鉀作為酵母菌的碳源，會促使細胞進入同步化減數分裂細胞週期。此時，細胞會逐漸進入減數分裂的不同階段，我們定義此刻為第 0 小時為 T0，第 1 小時為 T1，以此類推。在實驗中設立的不

同時間點進行取樣，觀察和分析細胞週期的變化情況。這一過程稱為同步化減數分裂，因為所有細胞同時進入減數分裂週期，從而便於後續的分析與實驗。

十、 利用螢光顯微鏡拍攝四分體螢光孢子分布

首先，從燒瓶中取出 48 小時(T48)的 1 mL 菌液至微量離心管中，以 13200 rpm 離心 10 秒，去除 850 μL 的上清液。將剩餘的 150 μL 菌液使用 MISONIX XL-2000 超音波震盪機，以 6 瓦特均方根功率處理 5 秒。接著，在載玻片上均勻塗抹 5 μL 的 ConA，然後加入 5.5 μL 的菌液。小心地覆蓋蓋玻片，並在邊緣塗上透明指甲油以密封。準備好樣品後，將玻片置於 Zeiss AxioImager Z1 螢光顯微鏡下，使用紅、藍、綠和白光拍攝孢子影像。

十一、 利用四分體孢子螢光分布定量減數分裂交叉發生頻率與交叉干擾

我們使用 FIJI ImageJ 軟體分析四分體內不同顏色螢光的有性孢子分佈情形（圖八），以辨別四分體的四個有性孢子的基因型、螢光顏色與對應同源重組情況如下。

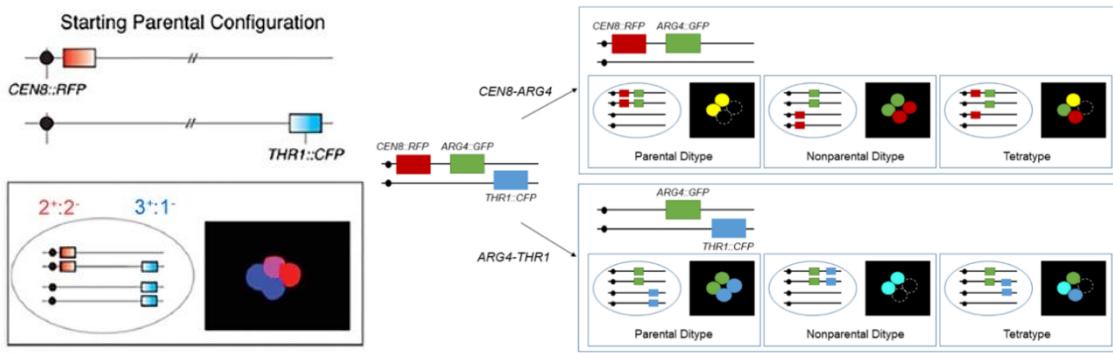
黃色 (R-G-c) 和藍色 (r-g-C) 表沒有發生重組或互換。

紫色 (R-g-C) 和綠色 (r-G-c) 表綠螢光發生互換。

白色 (R-G-C) 和黑色 (r-g-c) 表藍螢光發生互換。

紅色 (R-g-c) 和青色 (r-G-C) 表紅綠與藍綠螢光均發生重組。

根據四分體內四個孢子的螢光顏色，我們可定量「孟德爾分離(MS)型」、「非孟德爾分離(NMS)型」與「不正常分離(MI NDJ)型」四分體數目，由「孟德爾分離(MS)型」四分體再分類成 PD、NPD 與 T 三種四分體。計算這些的數量與比例進一步統計併發係數、干擾值、遺傳距離、GC 發生頻率與不正常分離(MI NDJ)。干擾值的計算是依照傳統遺傳學方法，計算方法詳見於網址(<https://reurl.cc/KdmEpR>)。干擾可分為三種情形：當一個交叉減少了附近另一個交叉的機率時，稱為正干擾($\gamma > 0$)；當一個交叉不影響另一個交叉發生的機率時，則為無干擾($\gamma = 0$)；負干擾($\gamma < 0$)則表示一個交叉會增加附近另一個交叉的機率。



圖八、不同型四分體判別方法(Thacker, 2011)

肆、研究結果

一、六種不同二倍體酵母菌四分體的孢子存活率

表五、統計與計算孢子孢子存活率

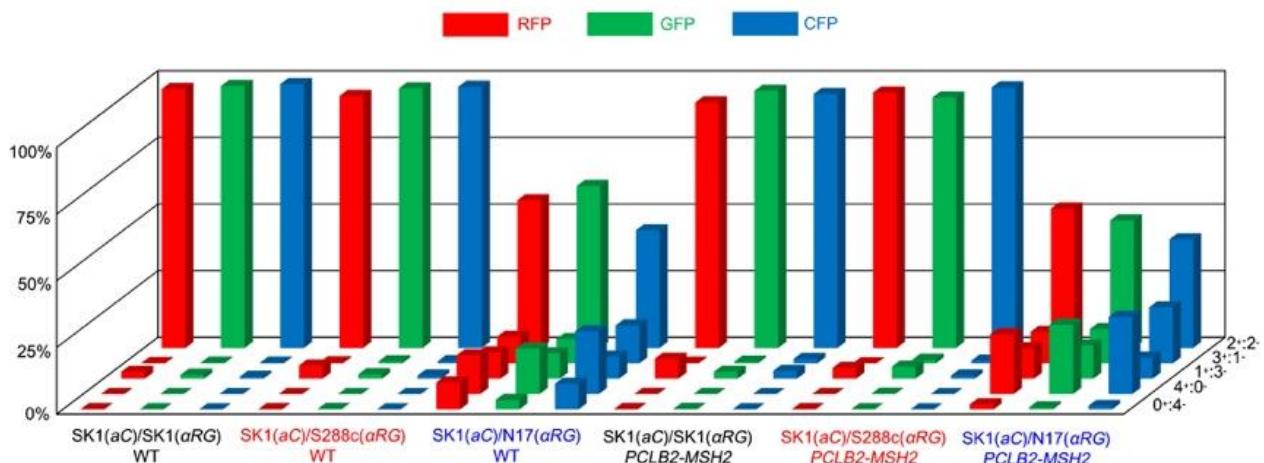
Diploid	Spore viability
SK1(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) <i>MSH2</i>	97.2±3.7%
SK1(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) <i>P_{CLB2}-MSH2</i>	86.6±7.7%
S288c(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) <i>MSH2</i>	77.8±5.0%
S288c(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) <i>P_{CLB2}-MSH2</i>	82.4±2.9%
N17(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) <i>MSH2</i>	1.4±1.4%
N17(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) <i>P_{CLB2}-MSH2</i>	5.6 ± 6.1%

我們發現純種酵母菌 SK1(*a,rgC*)/SK1(*α,RGc*) 與純種雜交酵母菌 S288c(*a,rgC*)/SK1(*α,RGc*) 時，無論是野生種(*MSH2*) 或攜帶 *P_{CLB2}-MSH2*，孢子皆有較高的存活率 (77.8-97.2%)。其中純種雜交酵母菌攜帶 *P_{CLB2}-MSH2* 的存活率更高於野生種(*MSH2*)。異種雜交酵母菌 N17(*a,rgC*)/SK1(*α,RGc*) 的野生種(*MSH2*) 孢子存活率僅 1.4% ± 1.4%，但攜帶 *P_{CLB2}-MSH2* 後，孢子存活率有效提升至 5.6 ± 6.1%。因此，*P_{CLB2}-MSH2* 可提高雜交酵母菌的存活率。

二、六種不同二倍體酵母菌四分體內三對等位基因分離情況、三種四分體百分比與干擾值

表六、統計與計算三種四分體百分比與干擾值

Diploid	Tetrads (N)	MI NDJ	NMS	MS	γ
SK1(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) <i>MSH2</i>	3045	0.1%	4.8%	95.1%	0.788
SK1(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) PCLB2-MSH2	2030	0.0%	12.9%	87.1%	0.669
S288c(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) <i>MSH2</i>	3045	0.2%	8.5%	91.3%	0.576
S288c(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) PCLB2-MSH2	2030	0.1%	10.1%	89.8%	0.348
N17(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) <i>MSH2</i>	2037	20.1%	62.4%	17.5%	-12.532
N17(<i>a,rgC</i>)/SK1(<i>α,RGc</i>) PCLB2-MSH2	1838	10.5%	65.1%	24.4%	-1.537

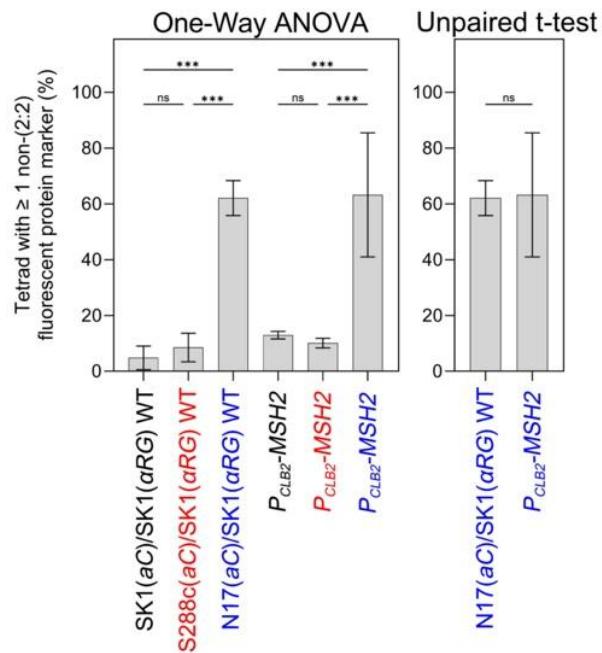


圖九、判定三個等位基因對是否不遵循孟德爾分離率（作者自製）

我們以螢光顯微鏡拍攝二倍體酵母菌株的四分體，觀察每個四分體中四個孢子的螢光顏色分布，先判定三個等位基因對是否不遵循孟德爾分離率，計算形成 $0^+ : 4^-$ 、 $1^+ : 3^-$ 、 $2^+ : 2^-$ 、 $3^+ : 1^-$ 與 $4^+ : 0^-$ 四分體的百分比(圖九)。一個四分體內只要有一對顯隱性螢光蛋白基因型對產生 $3^+ : 1^-$ 、 $1^+ : 3^-$ 、 $4^+ : 0^-$ 與 $0^+ : 4^-$ 等位基因型，我們就將之歸類為「非孟德爾分離(NMS)型」四分體。「不正常分離(MI NDJ)型」的四分體有兩個有性孢子發白光，另外兩個有性孢子不發出任何可見螢光。

為了統計比較不同雙套酵母菌合子發生互換(CO)、非互換(NCO)與不正常分離(MI NDJ)頻率，我們將樣本母體(N)均分成三個較小樣本(N/3)，再分別統計三種四分體百分比與計算干擾值。

三、六種不同二倍體酵母菌合子發生非孟德爾分離(NMS)比例

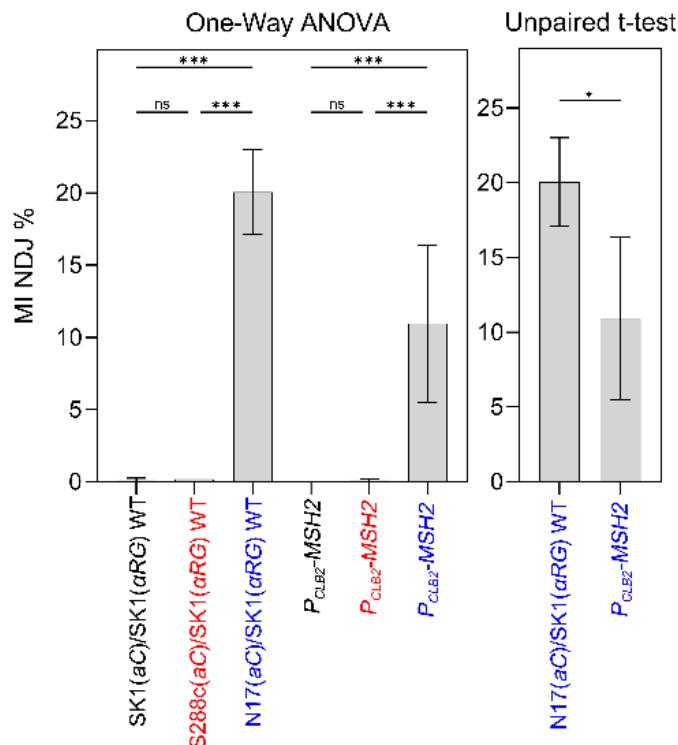


圖十、比較「非孟德爾分離(NMS)型」四分體百分比（作者自製）

我們發現純種酵母菌 SK1(α , rgC)/SK1(α , RGc) 與純種雜交酵母菌 S288c(α , rgC)/SK1(α , RGc)，無論是野生種($MSH2$)或攜帶 P_{CLB2} - $MSH2$ 發生非孟德爾分離(NMS)的頻率均非常低(4.8-12.9%)。野生種異種雜交酵母菌 N17(α , rgC)/SK1(α , RGc)發生非孟德爾分離(NMS)頻率顯著提升 62.4%。攜帶 P_{CLB2} - $MSH2$ 後，三種合子非孟德爾分離(NMS)平均頻率未明顯改變。野生異種雜交酵母菌因未知原因發生高頻率 GC 或 NCO，抑低鹼基錯配修復(MMR)系統是對 GC 或 NCO 發生率影響不顯著。

統計分析採用 ANOVA 檢定法和 Unpaired t-test 統計法計算 p 值。統計顯著性以以下標示：ns (non-significant, $p > 0.05$)、* ($p \leq 0.05$)、** ($p \leq 0.01$)、*** ($p \leq 0.001$)。

四、六種不同二倍體酵母菌合子發生不正常分離(MI NDJ)比例

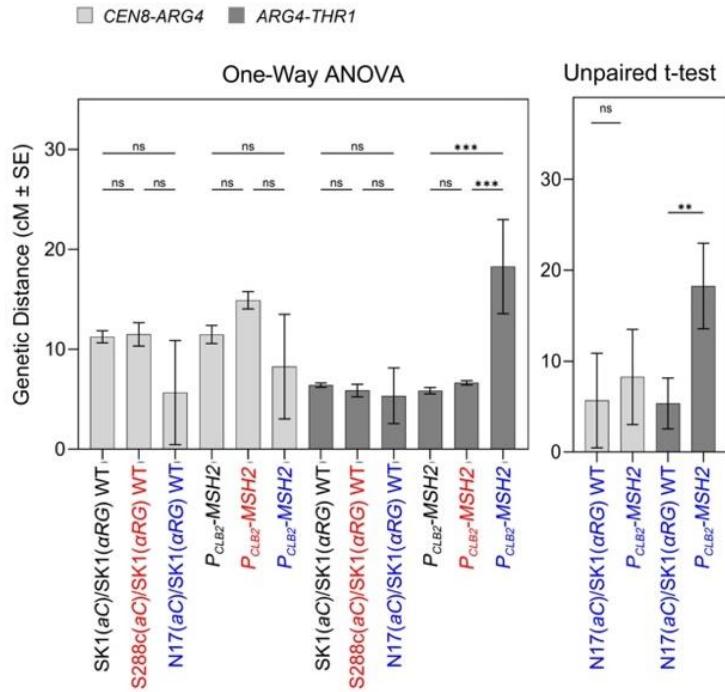


圖十一、比較「不正常分離(MI NDJ)型」四分體百分比（作者自製）

野生型與攜帶 $P_{CLB2}-MSH2$ 的 SK1(a,rgC)/SK1(α,RGc) 與 S288c(a,rgC)/SK1(α,RGc) 產生「不正常分離(MI NDJ)型」四分體的百分比均很低 ($\leq 0.2\%$)。野生型 N17(a,rgC)/SK1(α,RGc) 異種雜交合子發生不正常分離(MI NDJ)頻率非常高，「不正常分離(MI NDJ)型」四分體的百分比大幅上升至約 20%。攜帶 $P_{CLB2}-MSH2$ 後，「不正常分離(MI NDJ)型」四分體的比例稍減至 10.5%。因此，抑低 $MSH2$ 轉錄表現後能有效地減低不正常分離(MI NDJ)發生頻率。

統計分析採用 ANOVA 檢定法和 Unpaired t-test 統計法計算 p 值。統計顯著性以以下標示：ns (non-significant, $p > 0.05$)、* ($p \leq 0.05$)、** ($p \leq 0.01$)、*** ($p \leq 0.001$)。

五、六種不同二倍體酵母菌 *CEN8-ARG4* 與 *ARG4-THR1* 兩種基因區間的遺傳距離

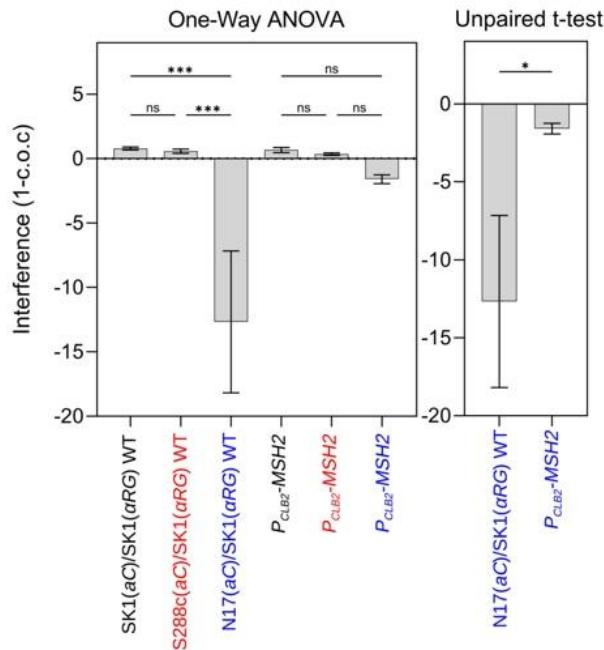


圖十二、在*CEN8-ARG4*與*ARG4-THR1*兩種基因區間的遺傳距離（作者自製）

在*CEN8-ARG4*基因區間，野生型與攜帶*P_{CLB2}-MSH2*的同種合子遺傳距離數據相近，而異種雜交合子N17(*a,rgC*)/SK1(*α,RGc*)的遺傳距離較兩種同種合子的遺傳距離稍低。在*ARG4-THR*基因區間，攜帶*P_{CLB2}-MSH2*異種雜交合子在*ARG4-THR*基因區間的遺傳距離遠大於其它四個同種合子或野生型異種雜交合子的遺傳距離。因此，鹼基錯配修復(MMR)對兩個基因區間生物效應不同。同種合子或異種雜交合子在*ARG4-THR*區間CO發生頻率相近，且未明顯受鹼基錯配修復(MMR)影響。反之，鹼基錯配修復(MMR)明顯抑低異種雜交合子在*CEN8-ARG4*區間CO發生頻率，但對同種合子的CO發生頻率幾乎沒有影響。

統計分析採用 ANOVA 檢定法和 Unpaired t-test 統計法計算 p 值。統計顯著性以以下標示：ns (non-significant, $p > 0.05$)、* ($p \leq 0.05$)、** ($p \leq 0.01$)、*** ($p \leq 0.001$)。

六、六種不同雙套酵母菌 *CEN8-ARG4* 與 *ARG4-THR1* 兩種基因區間的干擾值



圖十三、在*CEN8-ARG4*與*ARG4-THR1*兩種基因區間的CO干擾值（作者自製）

野生型與攜帶 $P_{CLB2}-MSH2$ 的同種合子 γ 值均為正值，因此發生「正干擾」，即一個CO發生後，周圍發生第二個CO機率明顯降低。鹼基錯配修復(MMR)未明顯抑低同種合子CO正干擾作用。反之，野生型與攜帶 $P_{CLB2}-MSH2$ 的異種雜交合子CO干擾值均為負值，前者的絕對值(~12.5)遠大於後者的絕對值(~1.6)。因此，野生型異種雜交合子*CEN8-ARG4*和*ARG4-THR1*兩個基因區間存在明顯的「負干擾」交互作用，意即一個CO發生後，周圍發生第二個CO機率明顯提高。 $P_{CLB2}-MSH2$ 有效地減弱了這種負干擾作用。此結果顯示鹼基錯配修復(MMR)可有效「增加」干擾性CO發生頻率。

統計分析採用 ANOVA 檢定法和 Unpaired t-test 統計法計算 p 值。統計顯著性以以下標示：ns (non-significant, $p > 0.05$)、* ($p \leq 0.05$)、** ($p \leq 0.01$)、*** ($p \leq 0.001$)。

伍、討論

在本研究中，我們利用純種酵母菌 SK1(*a, rgC*) / SK1(*a, RGc*)、純種雜交酵母菌 S288c(*a, rgC*) / SK1(*a, RGc*) 以及異種雜交酵母菌 N17(*a, rgC*) / SK1(*a, RGc*) 進行實驗，並分別進行專一性抑低 *MSH2* 基因，以探討其對減數分裂及重組的影響。

首先對於有性孢子存活率的影響，調控 *P_{CLB2}-MSH2* 確實發揮了一定作用，表示基因的調控方向也許是正確的。不過，不排除有其他更有效基因調控方式，未來研究會進一步探索更優良的方法。

其次，透過三螢光系統分析二倍體細胞減數分裂時的交叉狀況，發現野生異種雜交酵母菌的「非孟德爾分離(NMS)型」四分體比例較高，並且酵母菌因未知原因發生高頻率的NCO。這一現象是一開始設計實驗時沒有預期到的。加上 Perkins 方程式與傳統遺傳學方法不適用於計算「非孟德爾分離(NMS)型」四分體內的 CO 遺傳距離與干擾值，所以 CO 發生頻率可能被低估。但這個狀況同時促使之後研究減數分裂時交叉的狀況時，可以更全面探討在染色體中各個交叉結果，具體代表的影響原因和彼此間的關聯。

在不正常分離(MI NDJ)裡面，異種雜交品系的不正常分離(MI NDJ)發生率顯著高於同種雜交，即使進行基因調控後，仍沒有明顯降低其比例。這間接表示 不正常分離(MI NDJ) 可能不是異種間生殖隔離的主要因素，或是 不正常分離(MI NDJ) 確實影響異種間的生殖隔離，但本研究所調控的基因與 不正常分離(MI NDJ) 間的關聯性較低，僅能稍微改善此現象。

本研究探討 *CEN8-ARG4* 及 *ARG4-THR1* 兩個基因區間的重組產物頻率進行分析，但尚未涵蓋其他相鄰區間的同源重組反應，未來應擴大範圍，以獲得更完整的基因區間的重組產物頻率。並確定三種不同合子在 *CEN8-ARG4-THR1* 區間內的雙股斷裂 (DSB) 發生頻率是否存在差異，這可能進一步影響各區間的重組模式，因此未來應進一步探討 DSB 在不同合子內的分布情形。

在交叉干擾方面，現有數據顯示異種雜交酵母菌交叉頻率與干擾程度均高於純種酵母菌、純種雜交酵母菌。*P_{CLB2}-MSH2* 調控後，交叉干擾的狀況有所緩解。未來我們會分析 mRNA 確認 *P_{CLB2}-MSH2* 在三種不同合子內對抑低 *MSH2* 轉錄的程度更精細的基因調控與分析，進一步釐清異種間生殖隔離的機制及其可能的遺傳因子。

除此之外，雖然我們的研究對象是釀酒酵母，但 MMR 系統對人體也有相似的作用。當 MMR 系統異常，基因突變率會顯著升高，這與某些癌症，例如大腸直腸癌、子宮癌和前列

腺癌等有很大的關聯。因此，進一步了解 MMR 系統作用機制，對於 MMR 系統失效的癌細胞，開發特定的靶向藥物，是未來值得探索的方向。

另外，許多保育物種或經濟作物等人工繁殖計劃中，常遇到雜交失敗的難題。如果能進一步確認 MMR 系統在物種中對同源重組的影響，便能提高人工繁殖的成功率，以保護生物多樣性和增加農業產量。

陸、結論

綜合上述實驗結果，我們得到下列四點結論：

- 一、 同種合子因基因體序列差異較小，鹼基錯配修復(MMR)不影響減數分裂同源重組的產物生成。
- 二、 異種合子因基因體序列差異較大，產生大量「非孟德爾分離(NMS)型」四分體，顯示 GC 發生頻率遠高於同種合子，但鹼基錯配修復(MMR)系統對 GC 發生頻率影響不顯著。
- 三、 野生型同種合子與異種合子在兩個遺傳區間發生 CO 的總頻率相近。
- 四、 鹼基錯配修復(MMR)抑低異種合子在兩個遺傳區間 CO 發生的總頻率，卻增加「干擾性 CO」與 MINDJ 發生頻率。因此，在異種合子中，鹼基錯配修復(MMR)對「干擾性 CO」與「非干擾性 CO」有相反的生物效應。野生型異種合子因有過多「干擾性互換」重組產物，導致彼此間距離太短，減弱姊妹染色體併黏度與紡錘體的張力，造成同源染色體不正常分離(nondisjunction)，可能是雜交不孕的主要原因之一。

此外，我們認為本研究具有以下兩個實際應用之方向：

- 一、 實驗中使用的酵母菌廣泛應用於食品發酵和生物燃料等領域。如果能正確調控 MMR 系統，便有機會培養出更符合應用需求的菌種，例如耐高溫的酵母菌，進一步提升工業發酵的效率。
- 二、 透過調控 MMR 系統，提高不同品種之間的雜交成功率。我們認為這對農業育種方面有很大的幫助，特別是培育高產量或抗病害的農作物。

柒、參考資料

1. Brown, M.S. and Bishop, D.K. (2014) DNA strand exchange and RecA homologs in meiosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, a016659.
2. Hunter, N. (2015). Meiotic recombination: The essence of heredity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7.
3. Kolodner, R.D. and Marsischky, G.T. (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9, 89-96.
4. Hunter, N., Chambers, S.R., Louis, E.J. and Borts, R.H. (1996) The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *EMBO Journal*, 15, 1726-1733.
5. Spies, M. and Fishel, R. (2015) Mismatch repair during homologous and homologous recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7, a022657.
6. Chakraborty, U. and Alani, E. (2016) Understanding how mismatch repair proteins participate in the repair/anti-recombination decision. *FEMS Yeast Res*, 16.
7. Bozdag, G.O., Ono, J., Denton, J.A., Karakoc, E., Hunter, N., Leu, J.Y. and Greig, D. (2021) Breaking a species barrier by enabling hybrid recombination. *Current Biology*, 31, R180-R181.
8. Ahuja, J.S., Harvey, C.S., Wheeler, D.L. and Lichten, M. (2021) Repeated strand invasion and extensive branch migration are hallmarks of meiotic recombination. *Mol Cell*, 81, 4258-4270 e4254.
9. Thacker, D., Lam, I., Knop, M., & Keeney, S. (2011). Exploiting spore-autonomous fluorescent protein expression to quantify meiotic chromosome behaviors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 189(2), 423–439.

【評語】052113

1. 本研究發現 DNA 鹼基錯配修復(mismatch repair, MMR)系統在釀酒酵母與奇異酵母雜交子中促成雜交不孕的關鍵角色，結果有助改變過去認為不孕源於重組不足的傳統觀點。
2. 成果豐富，結論有創新發現，但解說有進步的空間。
3. 此研究使用螢光蛋白方法，用來計算減數分裂交叉發生機率。建議詳列及圖示螢光蛋白基因型，即與孟德爾分離/非孟德爾分離型之關係，將可增進了解後面圖表結果及相關結論。
4. 釀酒酵母與奇異酵母雖是良好的實驗材料，但所得結果是否適用於高等生物（如植物、動物）或天然雜交族群仍需進一步驗證。

作品海報

探討鹼基錯配修復系統對相近物種
雜交不孕的影響

The Impact of Mismatch Repair System on
Hybrid Sterility Between Closely Related Species

摘要

對象：SK1/SK1（純種）、SK1/S288c（同種）、SK1/N17（異種雜交）

操作：使用 P_{CLB2} -MSH2 抑低鹼基錯配修復（mismatch repair, MMR），觀察互換（crossover, CO）、

非互換（non-crossover, NCO）、第一次減數分裂染色體不分離（MI Nondisjunction, MI NDJ）

發現：雜交不孕主因為 MMR 「抑制」 所有 → 「促進」 干擾性互換同源重組產物生成

應用：助於釐清物種遺傳隔離機制，具癌症發生機轉與工業菌株雜交育種應用價值

研究動機

P_{CLB2} -MSH2

$CLB2$ 啟動子：只在有絲分裂表現，進入減數分裂後轉錄活性迅速下降

策略：以 P_{CLB2} 取代 $MSH2$ 原啟動子

效果：①減數分裂前期 $MSH2$ 表現 → 保留早期 MMR 活性 ②中期後表現量下降 → 暫時關閉 MMR 活性

優點：時間控制精確、避免敲除帶來的生長缺陷

減數分裂後，同源重組反應產生二種終產物：互換（crossover）& 非互換（non-crossover）

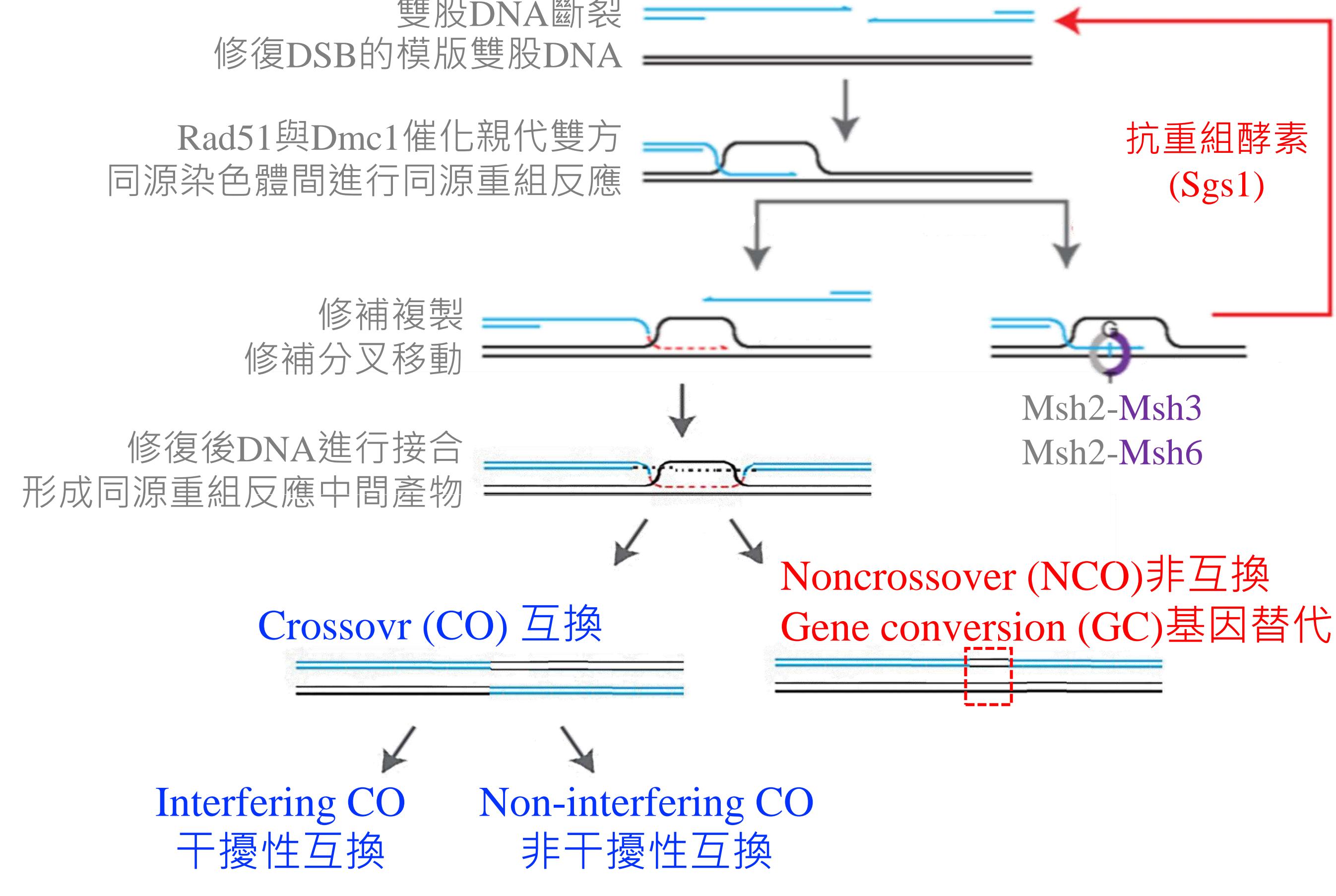


Fig.1 MMR修正鹼基錯配之過程

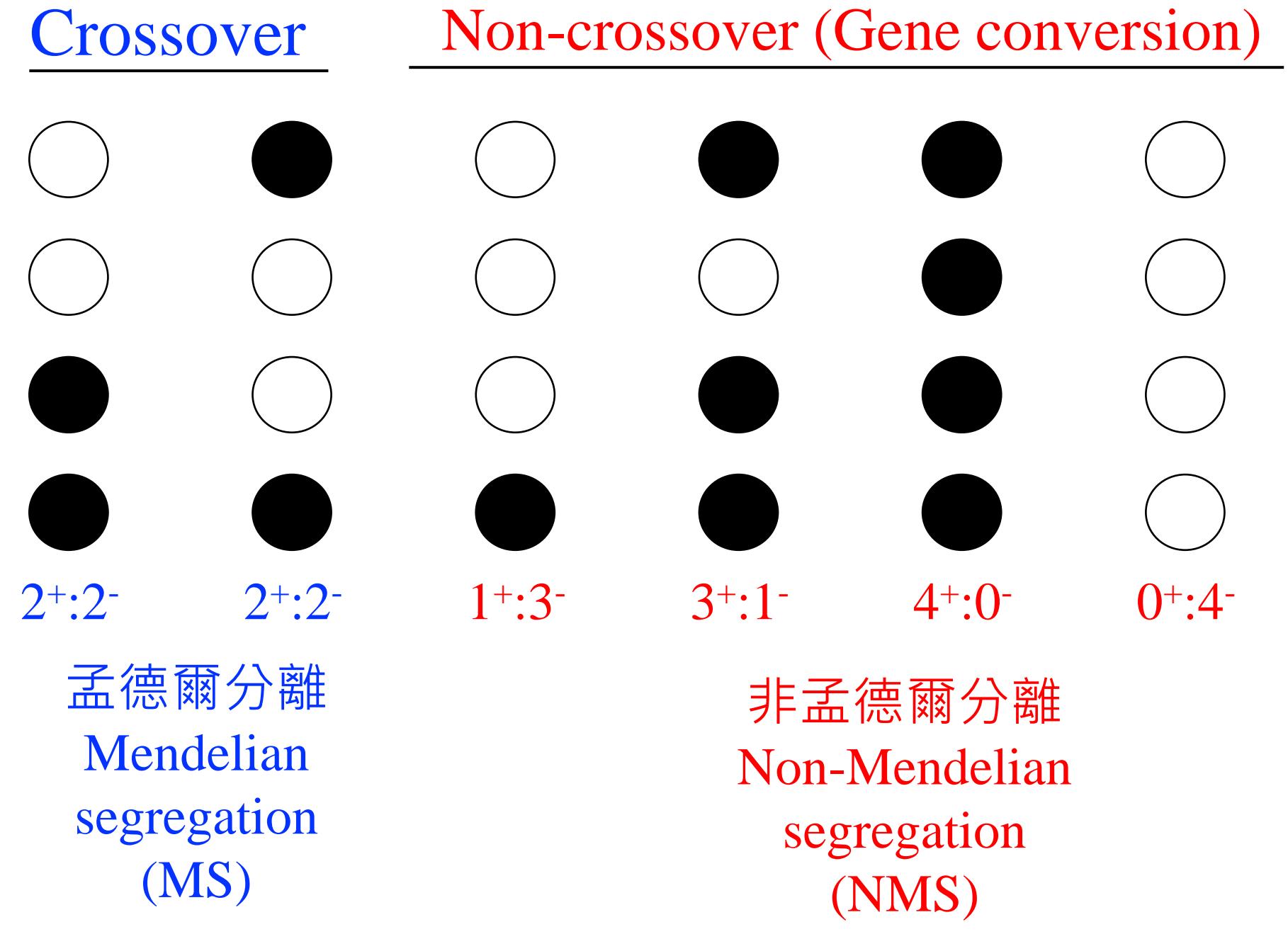


Fig.2 終產物表現

● : +, 來自親代A的等位基因
○ : -, 來自親代B的等位基因

本研究的新假說

舊假說 (Hunter, 1996; Spies, 2015)

雜交合子內 MMR 「抑制」 所有同源重組反應產物生成，形成染色體非整倍體有性孢子

雜交合子內 MMR 「促進」 干擾性互換同源重組產物生成，形成染色體非整倍體有性孢子

相同物種

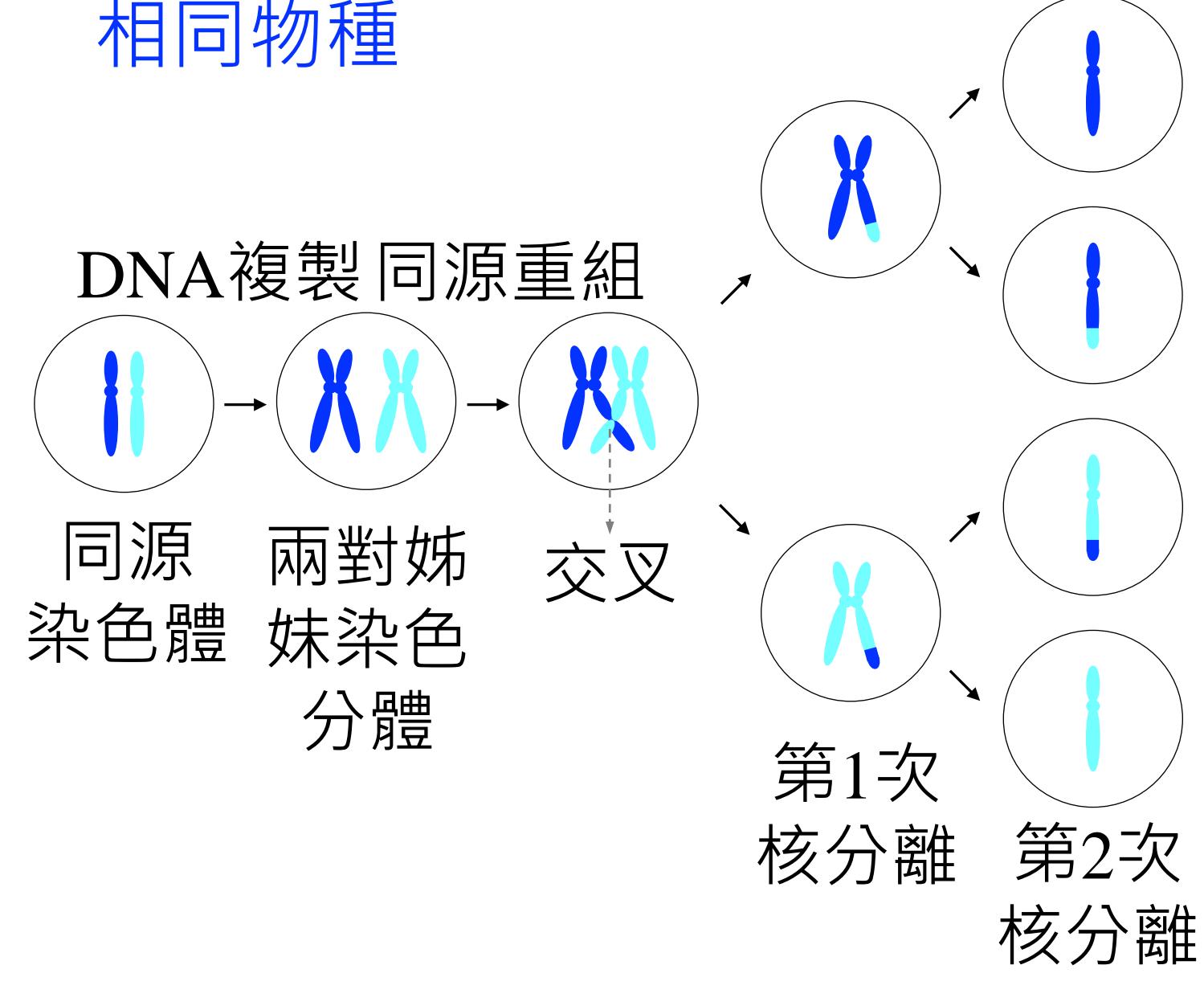


Fig.3 舊假說同種減數分裂過程

相近但不同物種

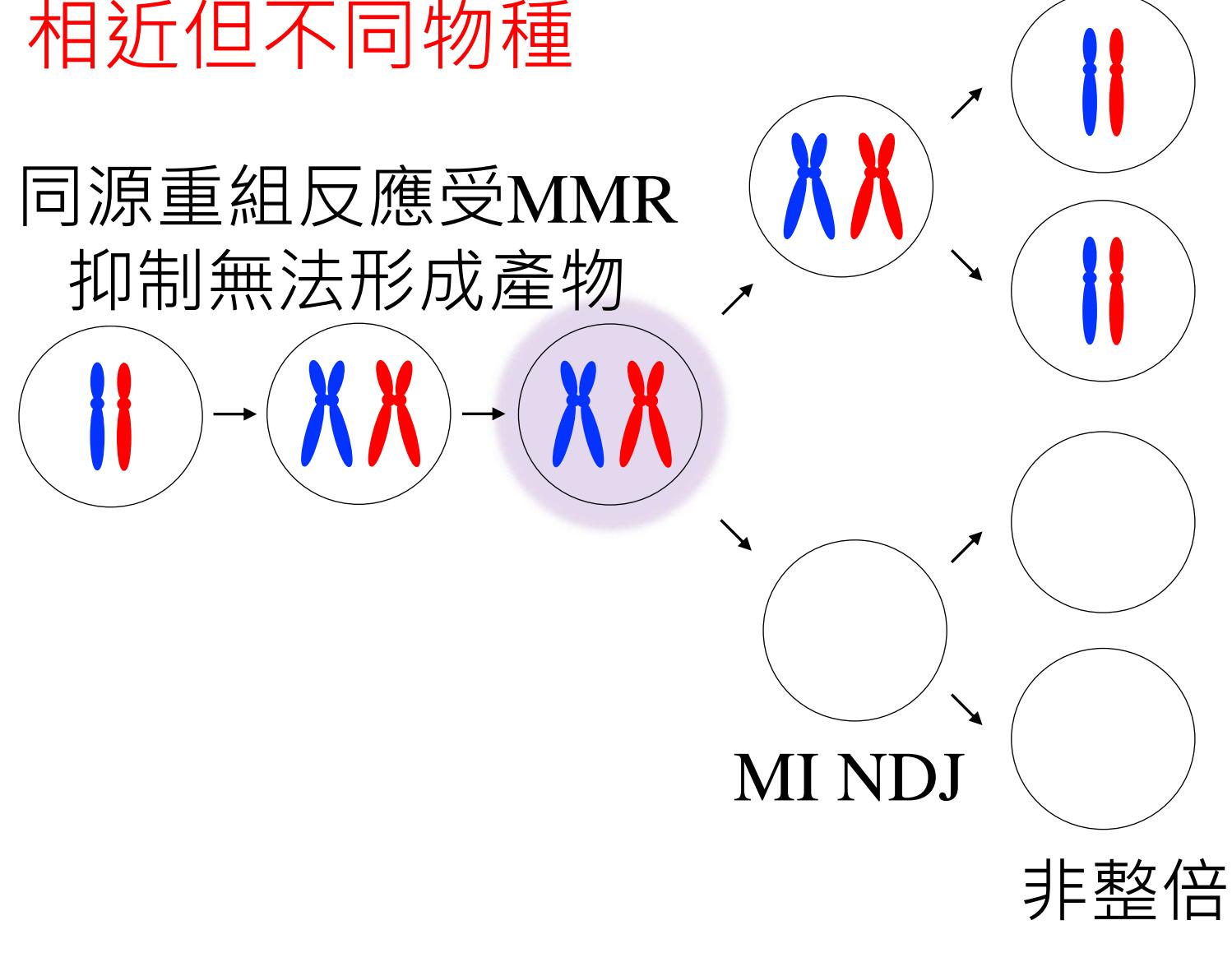


Fig.4 舊假說異種減數分裂過程

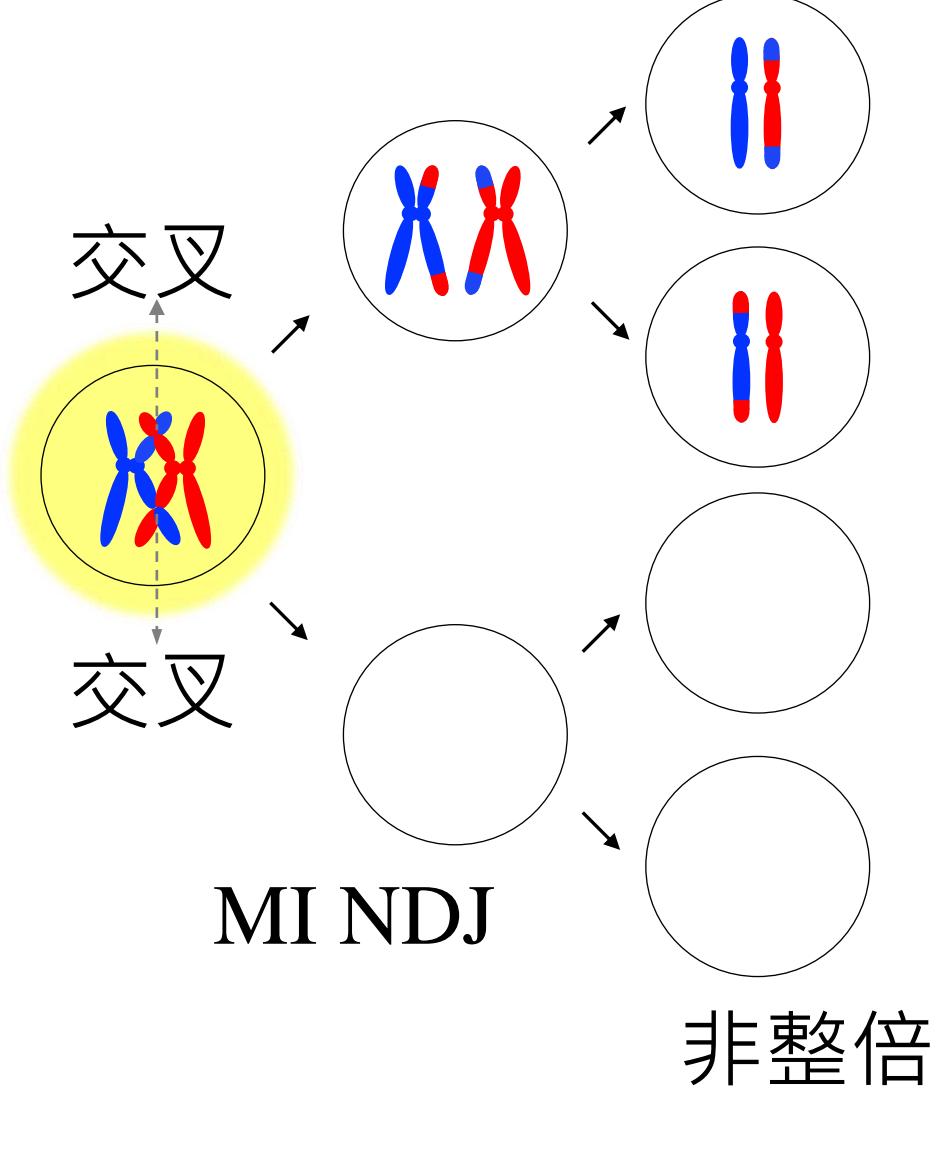


Fig.5 新假說異種減數分裂過程

研究目的

一. P_{CLB2} -MSH2 是否降低六組合子之有性孢子存活率？

二. P_{CLB2} -MSH2 是否參與干擾性互換、非干擾性互換與非互換的調控？

三. P_{CLB2} -MSH2 如何與 MMR 系統交互作用以影響減數分裂交叉造成雜交不孕？

研究組別

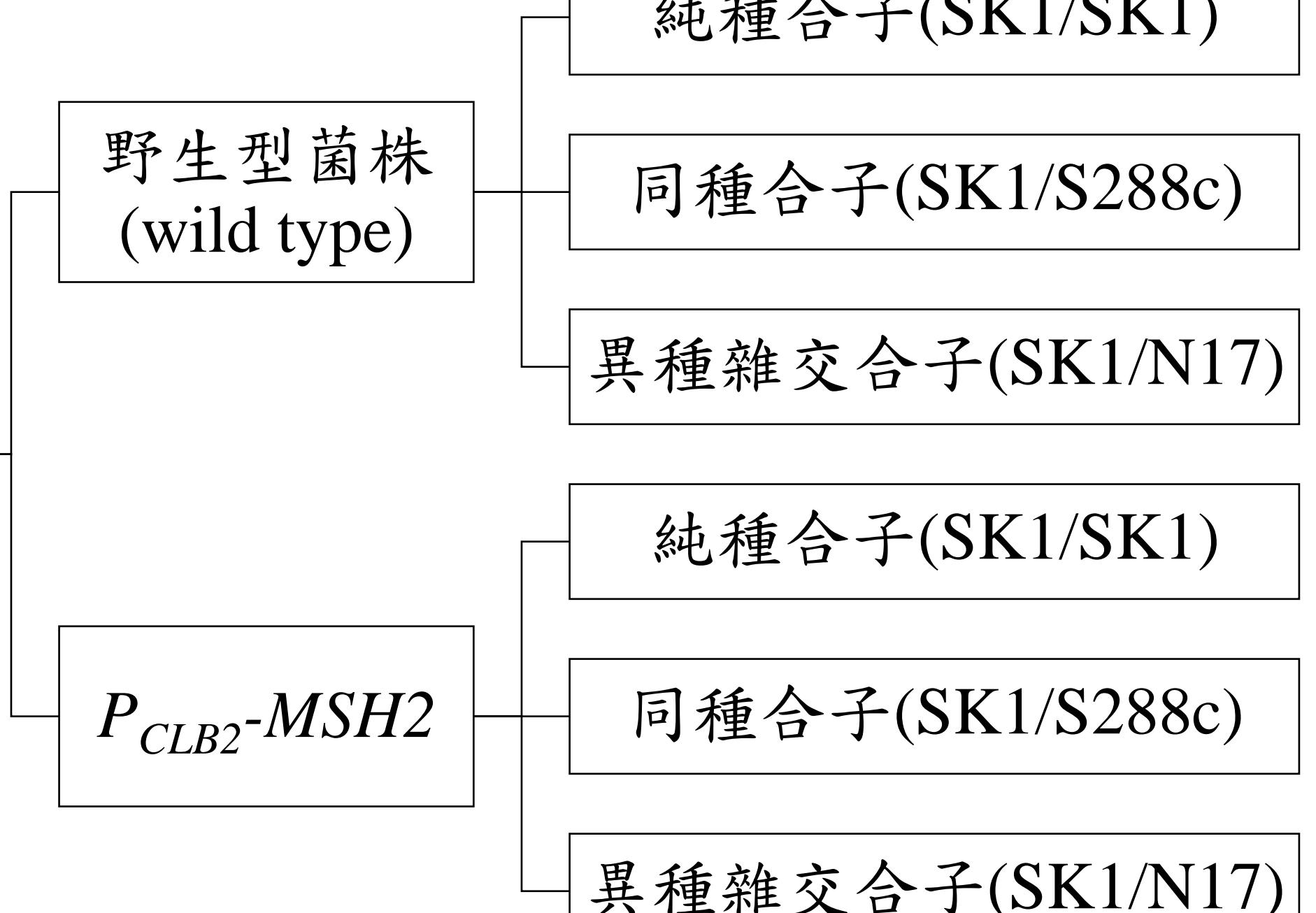


Fig.6 六組實驗組別分類圖

研究過程與方法

設計基因序列

Phusion PCR
建構基因區間

電泳
確認基因長度

純化凝膠
增加基因濃度

建構酵母菌
突變株

Colony-PCR
確認突變株建構

突變株建構成功

同步化酵母菌減數分裂

利用四分體分離實驗定量孢子存活率

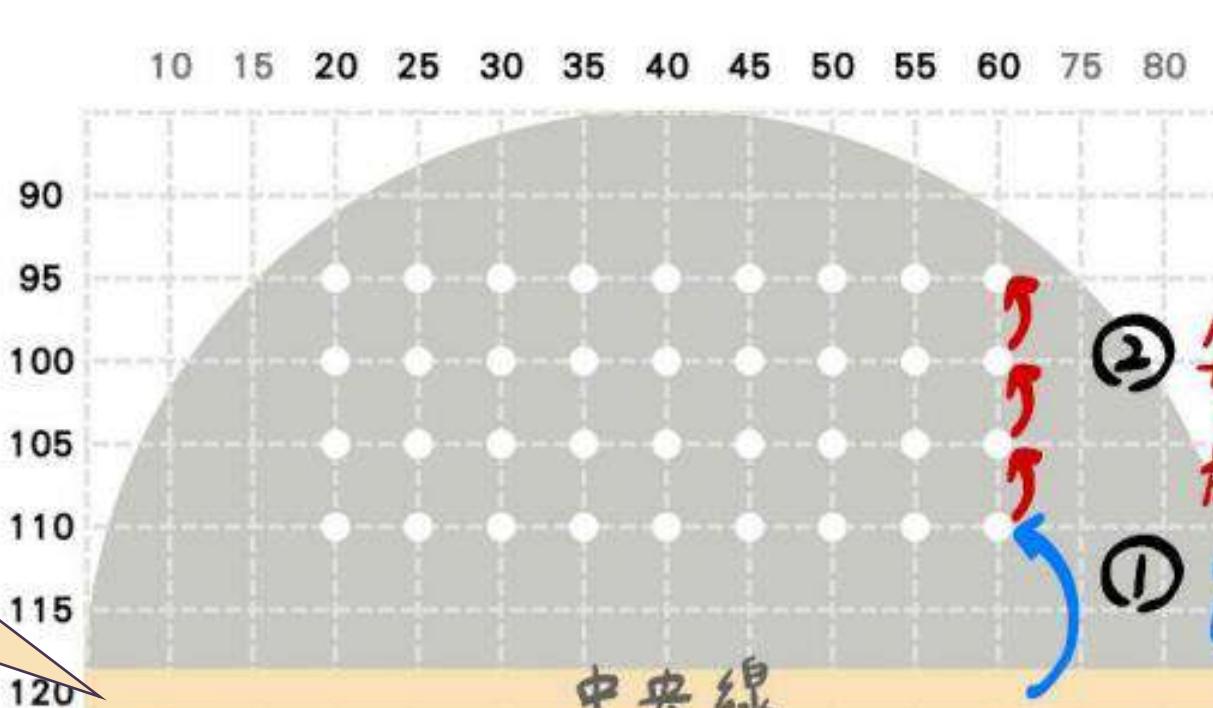
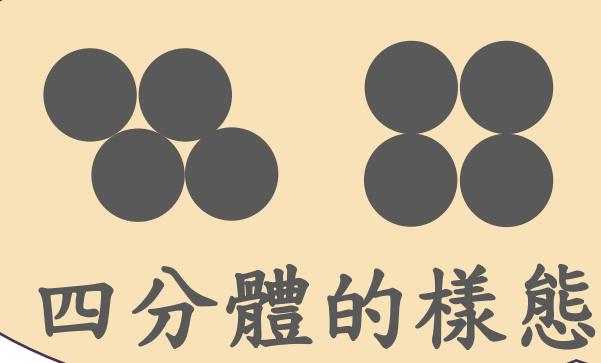


Fig.7 四分體分離實驗示意圖

拍攝四分體螢光孢子分布

定量減數分裂交叉發生頻率&干擾值

Intraspecies purebred zygote SK1(*a, rgC*) x SK1(*α, RGc*)

Intraspecies hybrid zygote S288c(*a, rgC*) x SK1(*α, RGc*)

Interspecies hybrid zygote N17(*a, rgC*) x SK1(*α, RGc*)

Fig.8 本次實驗菌株與其螢光蛋白位點

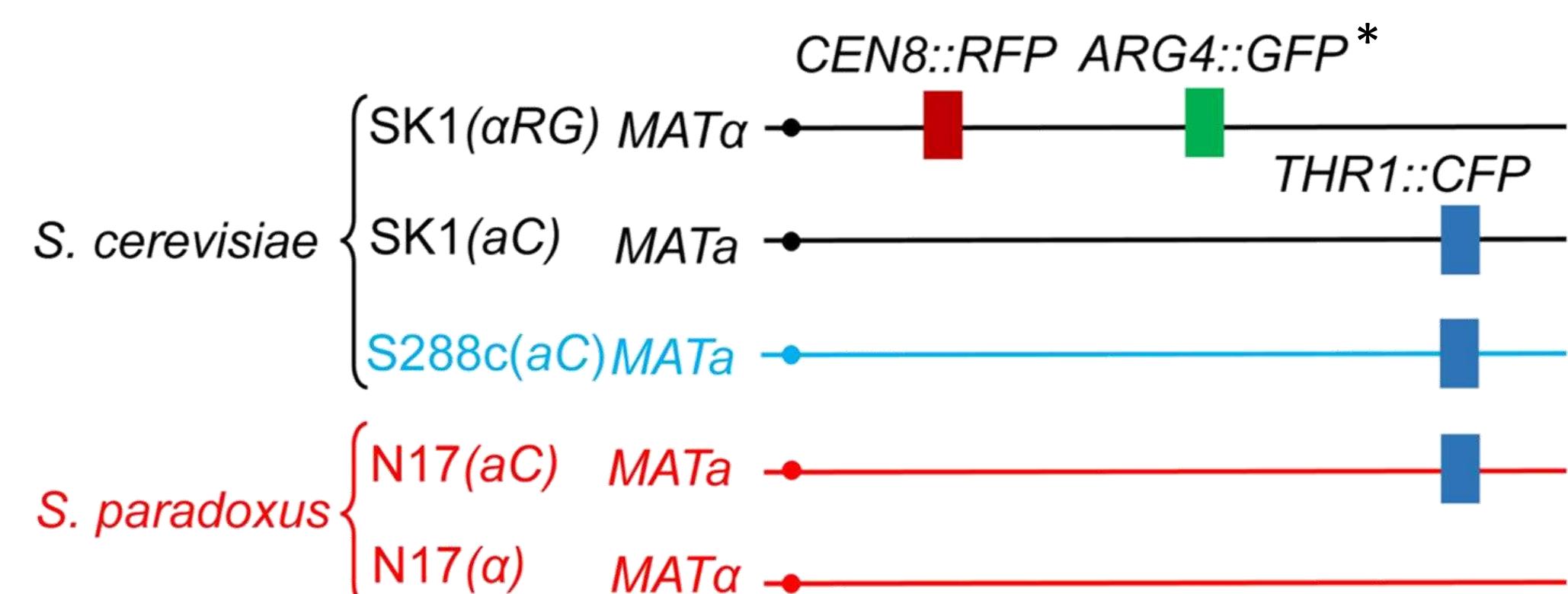


Fig.9 本次實驗菌株的螢光蛋白位點

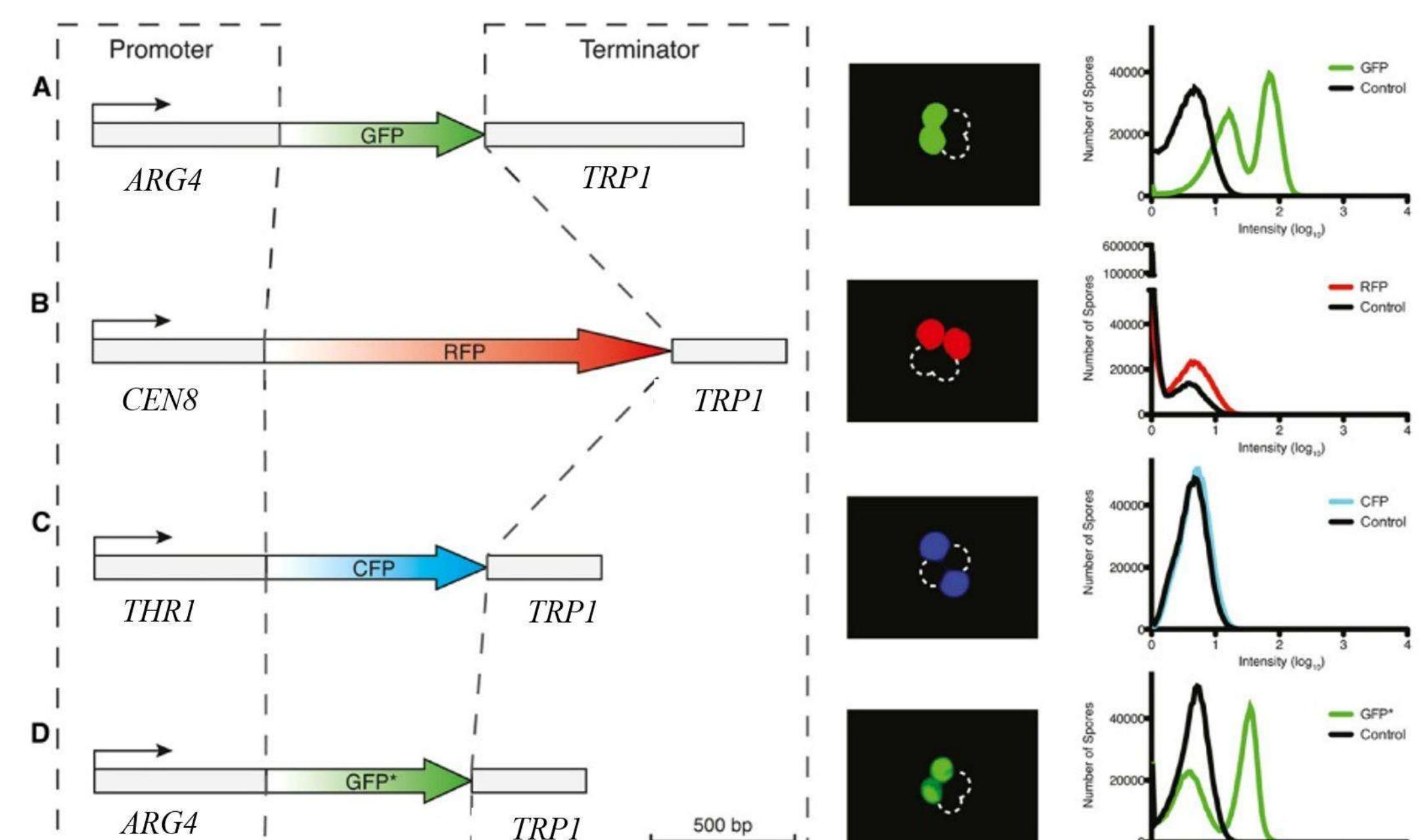


Fig.10 有性孢子自發性螢光蛋白酵母菌系統 (Thacker, 2011)

技術優點：

1. 自發性孢子螢光蛋白基因可被精準地引入特定位點。
2. 克服低孢子存活率技術瓶頸。
3. 以螢光顯微鏡判定四分體中遺傳模式。
4. 無需耗時進行四分體分離或複雜的免疫螢光染色實驗。
5. 確定非整倍體孢子中減數分裂染色體分離模式。

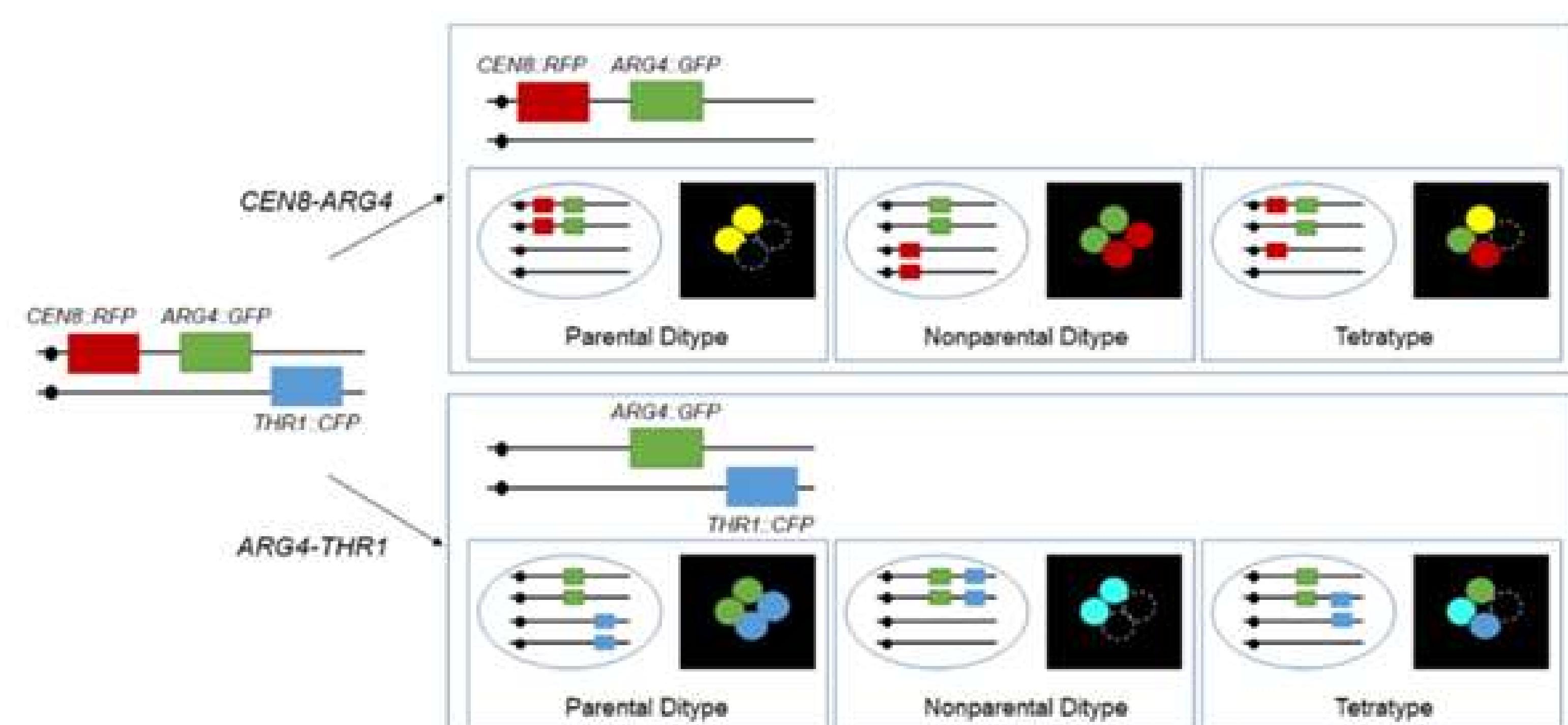
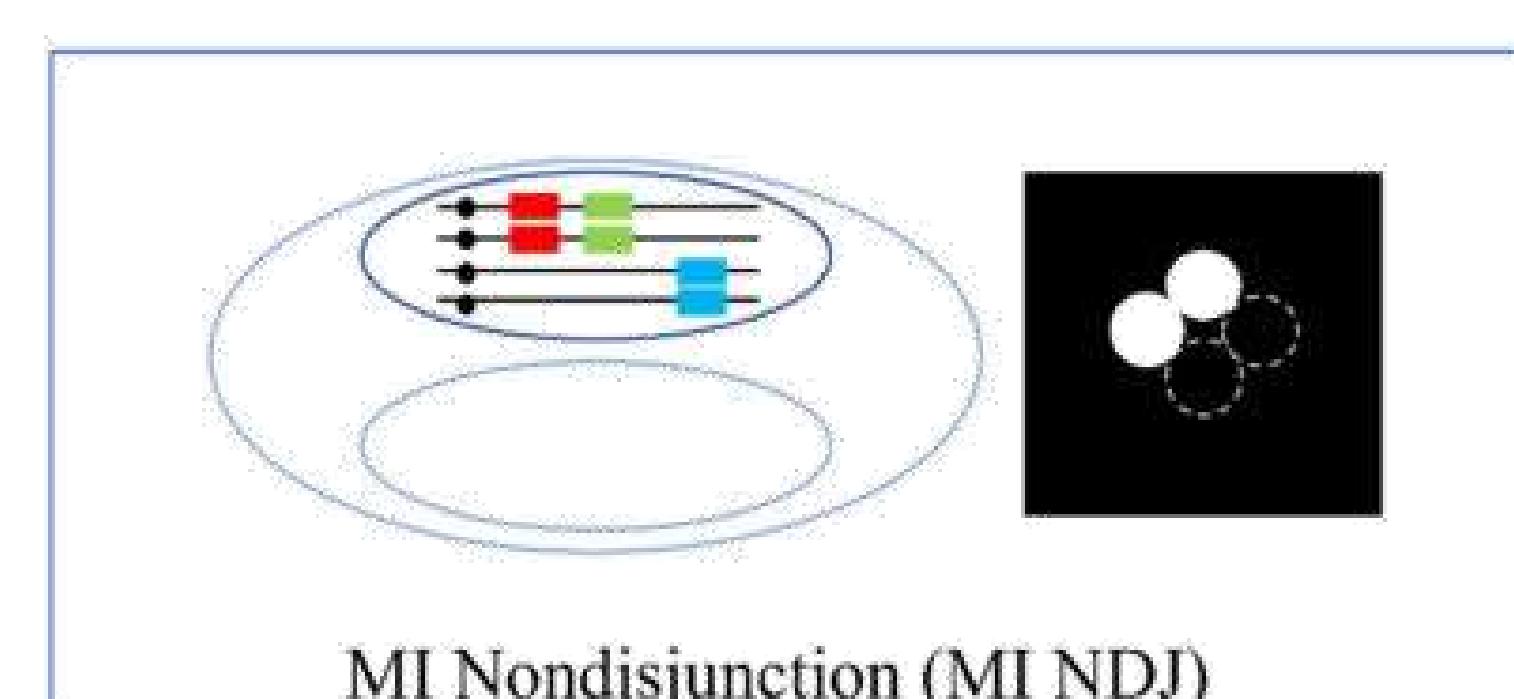


Fig.11 不同型四分體判別方法



Tbl.1 干擾值代表意義

正干擾 $\gamma > 0$	1個CO的發生減少附近另一個CO發生的概率
無干擾 $\gamma = 0$	1個CO的發生不影響附近另一個CO發生的概率
負干擾 $\gamma < 0$	1個CO的發生增加了附近另一個CO發生的概率

研究結果

Tbl.2 比較六種合子之有性孢子存活率(Spore viability)、MS、NMS與MI NDJ四分體的數量、干擾值

Diploid	Spore viability (%)	Tetrads (N)	MI NDJ (%)	NMS (%)	MS (%)	γ
(1) SK1/SK1	97.2±3.7	3045	0.1	4.8	95.1	0.788
(2) SK1/SK1 <i>P_{CLB2}-MSH2</i>	86.6±7.7	2030	0.0	12.9	87.1	0.669
(3) S288c/SK1	77.8±5.0	3045	0.2	8.5	91.3	0.576
(4) S288c/SK1 <i>P_{CLB2}-MSH2</i>	82.4±2.9	2030	0.1	10.1	89.8	0.348
(5) N17/SK1	1.4±1.4	2037	20.1	62.4	17.5	-12.532
(6) N17/SK1 <i>P_{CLB2}-MSH2</i>	5.6 ± 6.1	1838	10.5	65.1	24.4	-1.537

分析Spore viability：由(1)、(2)可知：純種合子的有性孢子存活率高

由(3)~(6)可知：同種合子及異種雜交合子攜帶*P_{CLB2}-MSH2*後，增加孢子存活率

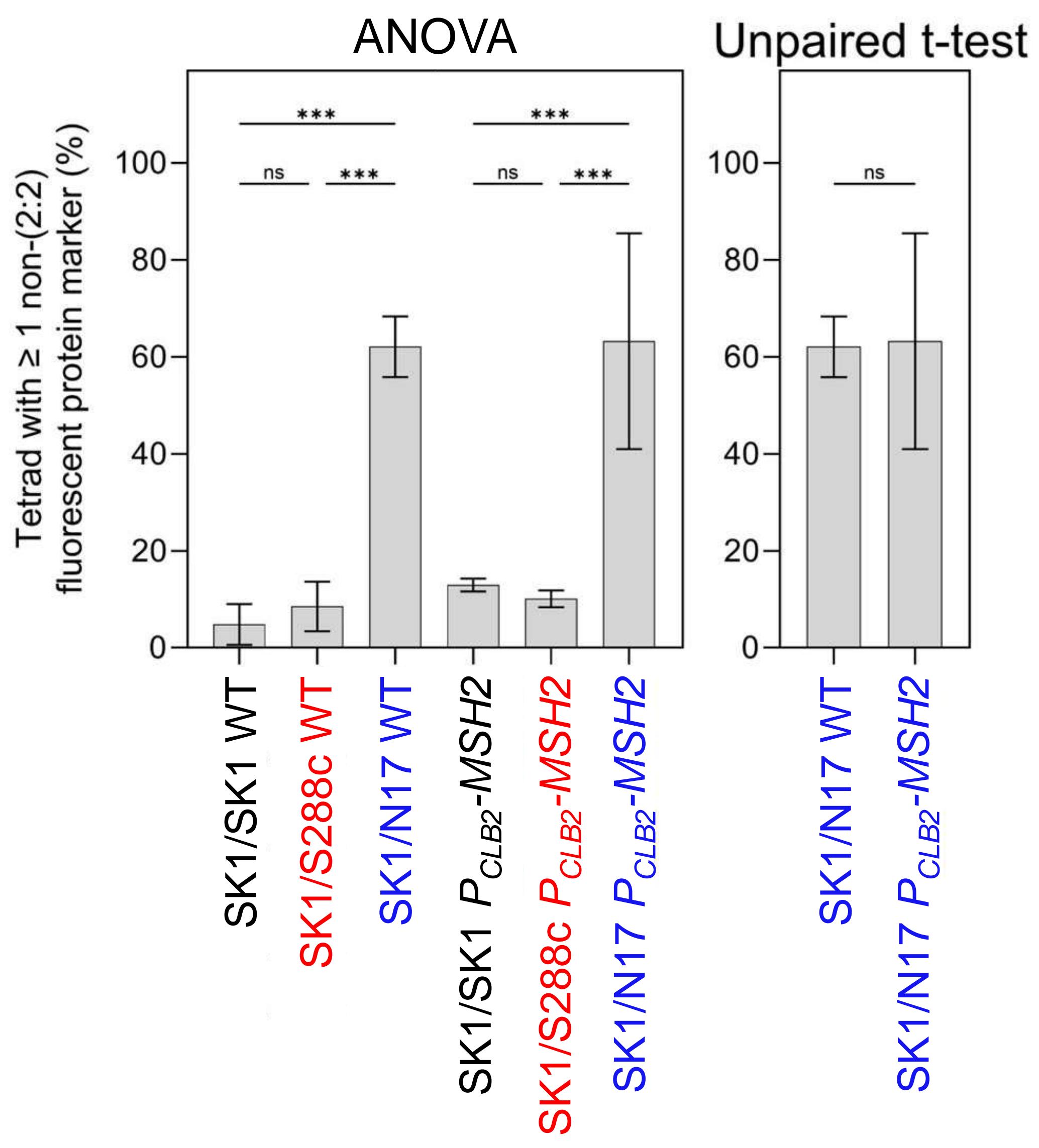


Fig.12 NMS型四分體百分比 ($n \geq 1838$)

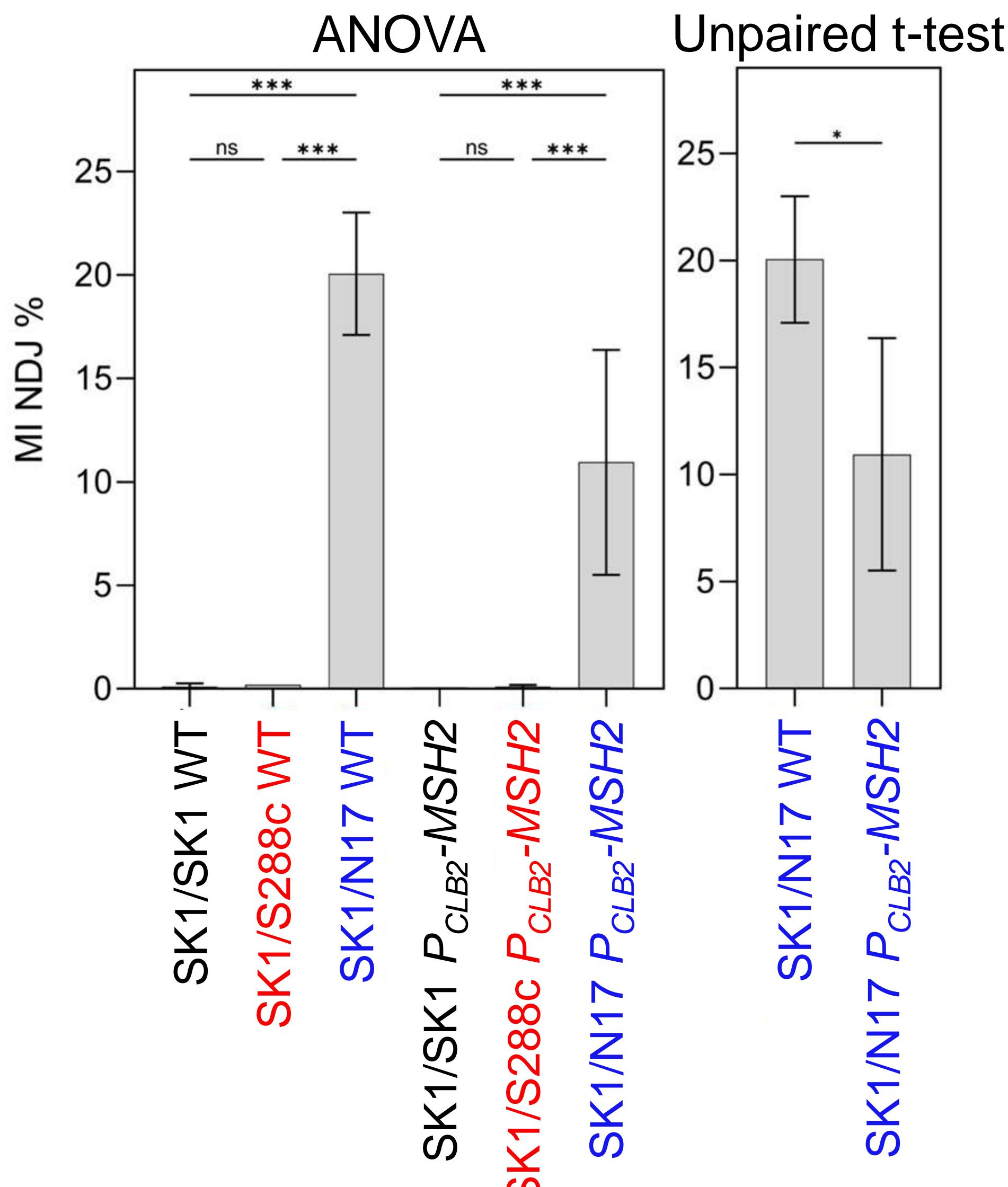


Fig.13 MI NDJ型四分體百分比 ($n \geq 1838$)

異種雜交合子

有無攜帶 P_{CLB2} -MSH2，發生NMS頻率無明顯改變
→抑低MSH2轉錄表現，不顯著影響 NCO(GC)發生頻率

異種雜交合子

攜帶 P_{CLB2} -MSH2，發生MI NDJ頻率稍減約10%
→抑低MSH2轉錄表現，有效降低 MI NDJ 發生頻率

二. 探討六組之「干擾性互換」、「非干擾性互換」發生頻率，從而判定MMR系統對減數分裂同源重組與雜交不孕的影響。

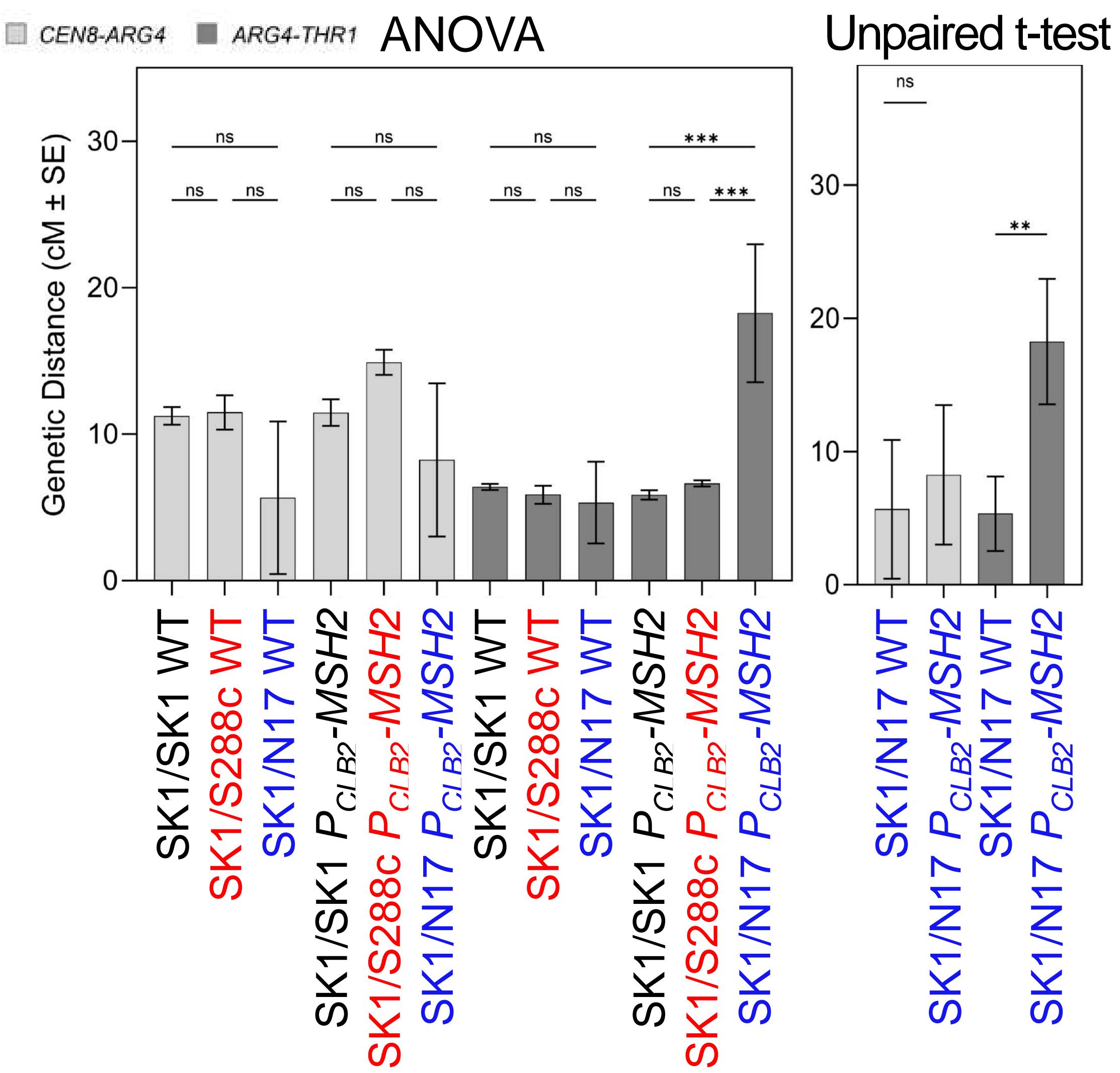


Fig.14 兩基因區間的遺傳距離 ($n \geq 1838$)

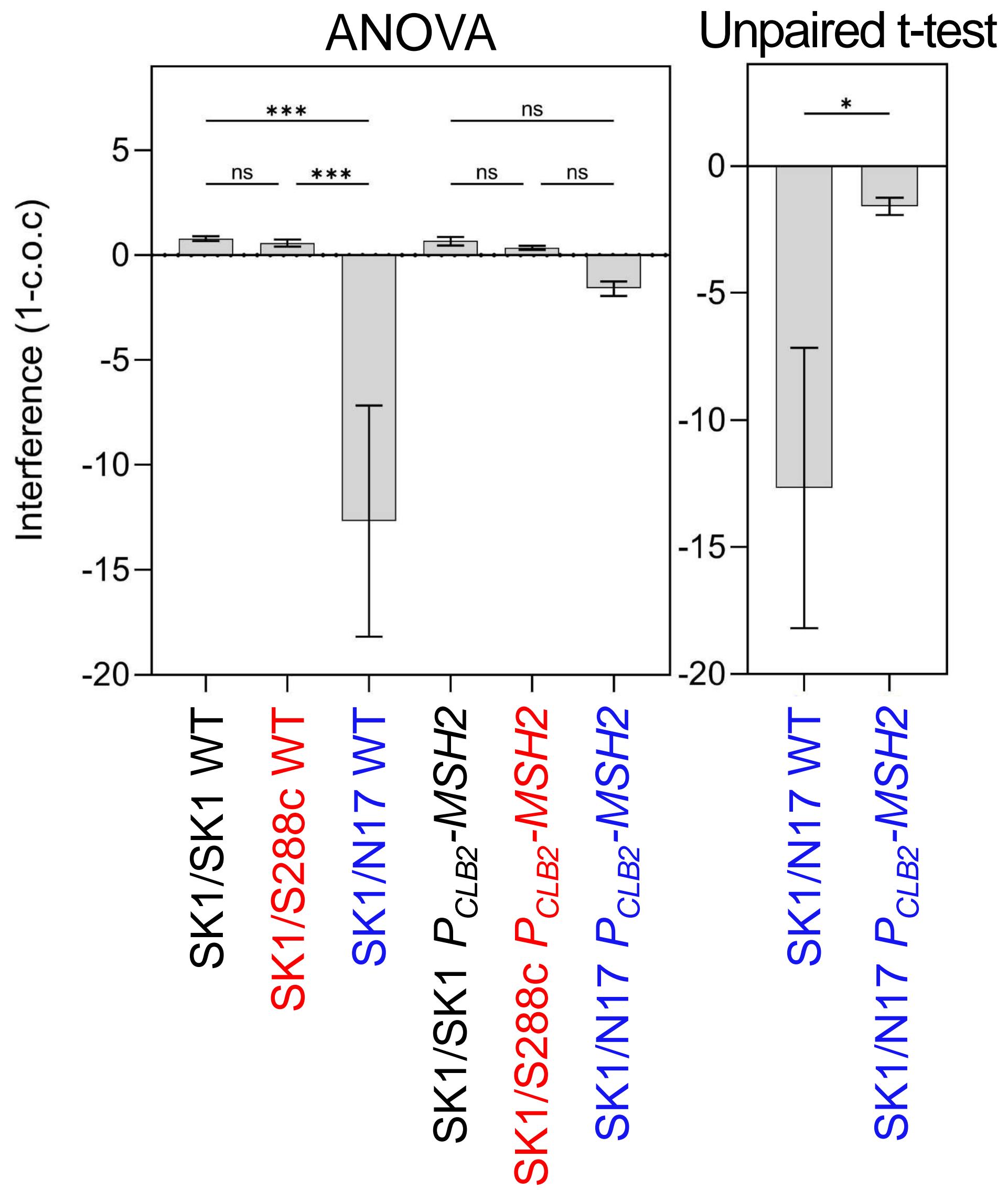


Fig.15 兩基因區間的CO干擾值 ($n \geq 1838$)

CEN8-ARG4

純種合子 同種合子 MMR對CO發生頻率影響不大
異種雜交合子 MMR明顯抑低CO發生頻率

ARG4-THR1

純種合子 同種合子 MMR對CO發生頻率影響不大
異種雜交合子

純種合子 γ 值均為正值

同種合子 γ 值均為正值，MMR稍微抑低CO正干擾

野生型異種合子 γ 值為負值，約-12.5

異種雜交合子(P_{CLB2} -MSH2) γ 值為負值，約-1.6

→ P_{CLB2} -MSH2有效減弱異種雜交合子負干擾作用。
顯示MMR可增強「干擾性CO」發生頻率。

討論及結論

- 純種合子 同種合子 基因體序列差異較小，MMR不影響減數分裂同源重組的產物生成。
- 異種雜交合子 基因體序列差異較大，產生大量「NMS型」四分體，顯示GC發生頻率遠高於同種合子，且MMR系統可有效減低 GC發生頻率。
- 野生型同種合子與異種合子在兩個遺傳區間發生CO的總頻率相近。
- MMR抑低 異種雜交合子 在兩個遺傳區間CO發生的總頻率，卻增加「干擾性CO」與MI NDJ發生頻率。
→在異種合子中，MMR對「干擾性CO」與「非干擾性CO」有相反的生物效應。
- 野生型異種雜交合子 有過多「干擾性互換」重組產物 → 染色體間距太短，減弱併黏強度與紡錘體的張力
→ 同源染色體不正常分離，為雜交不孕主因之一

參考文獻（節錄）

- Bozdag, G.O., Ono, J., Denton, J.A., Karakoc, E., Hunter, N., Leu, J.Y. and Greig, D. (2021) Breaking a species barrier by enabling hybrid recombination. *Curr Biol*, 31, R180-R181.
- Chakraborty, U. and Alani, E. (2016) Understanding how mismatch repair proteins participate in the repair/anti-recombination decision. *FEMS Yeast Res*, 16, 4-8.
- Thacker, D., Lam, I., Knop, M. and Keeney, S. (2011) Exploiting spore-autonomous fluorescent protein expression to quantify meiotic chromosome behaviors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 189, 423-439.