

台灣二〇〇五年國際科學展覽會

科 別：生物化學

作品名稱：基因突變對線蟲(*Caenorhabditis elegans*)之神經系統
退化變異株的搜尋以及對其性狀之遺傳表現的
探討

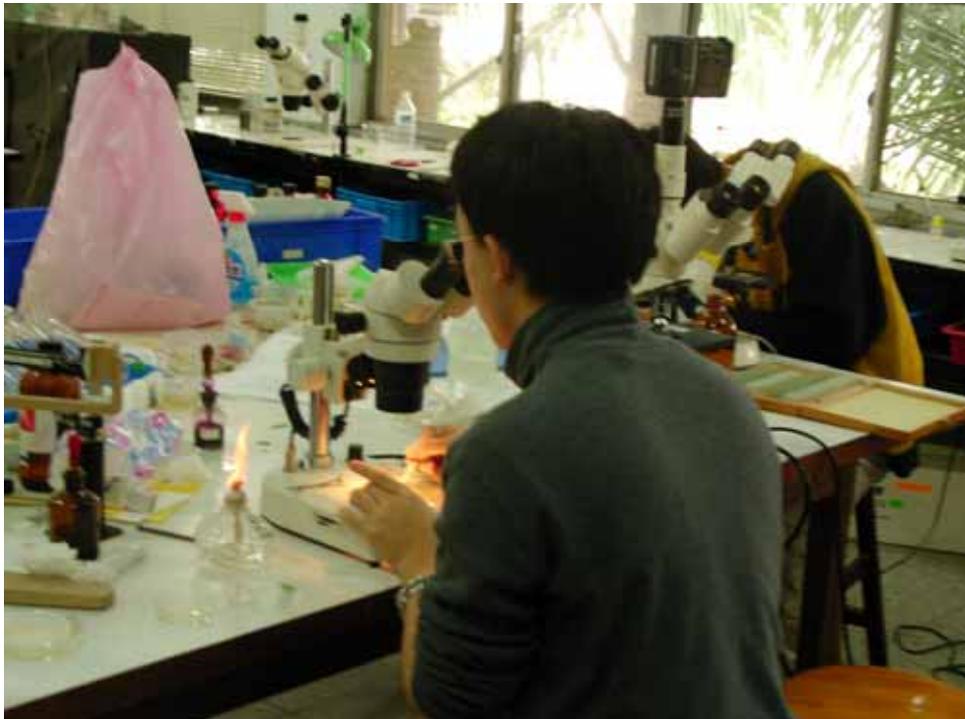
學 校：臺北市立建國高級中學

作 者：陳聖元

我叫陳聖元，就讀於建國中學二年級二十六班。

去年五月多在某個機緣下我偶然得知在台大的一個實驗室正進行著有關於線蟲方面的研究，在之前正好讀了有關於 2003 年諾貝爾獎有關於線蟲細胞凋亡的一篇報導，便對線蟲這個主題產生了極大的興趣。

在研究的過程中，從一開始的到實驗室去熟悉操作技術、開始自己準備實驗採購器材在建中的研究室裡自己進行實驗、到賽前兩週的密集資料整理以及到處找尋海報輸出的店家，多少次在實驗室待到管理員來趕人、多少次帶著疲憊的身體回家還得應付明天的考試，相信做過科展的人都深知箇中滋味。帶著三分緊張、七分興奮來參加這次國際科展，我希望能在接下來的幾天內把一路走來的努力成果以最完美的方式呈現給大家。



作品名稱：基因突變對線蟲(*Caenorhabditis elegans*)的神經系統退化突變株的搜尋以及對其性狀之遺傳表現的探討

英文摘要(Abstract)

Genetic Mutation with *Caenorhabditis elegans*'s Nerve System Degeneration and Searching of the Character Display in Heredity

This research is mainly in observation with *Caenorhabditis elegans*'s genetic mutation caused via nervous system abnormal character. In the study, I the sample have been cultivated purified and add some chemical material EMS to speed up *C.elegans* mutation. Then based on the character to further analysis what cause of gene deal with mutation and observe the effects in heredity.

The research has two stages, on the first stage of study the mainly target is to both search and purify the mutation of *C.elegans*. The second stage is based on the exploration of mutation's searching and purifying. Because the certain mutation bodies aren't easy to find out, the project is still on progress at the beginning of second stage, and we conclude some heredity special cases in preliminary of study.

中文摘要

這個實驗主要是觀察並針對線蟲因為基因的突變所產生的神經系統異常的變異性狀，在實驗中我先將樣品線蟲培養並純化至一定數量，並加入適當藥劑 EMS 造成其突變，經篩選並分析此性狀，進而找出造成其突變之基因，以及觀察此性狀對遺傳表現所造成的影響。

該計畫分成兩階段，第一階段的實驗重點是在突變株的搜尋以及純化上，第二階段則是在突變基因的探討上，由於特定突變株的搜尋並非容易，所以目前計畫只進展至第二階段的遺傳實驗初期，對於其遺傳特徵與突變形式上已有了初步的分析，但尚未定位出該基因的位置。

一. 研究動機

在閱覽過有關線蟲生殖腺引導細胞移動路徑因為突變而產生改變的論文後，對該主題產生興趣，也希望自己能從事與特定性狀突變相關的遺傳實驗。

於是，考慮到生物的生命週期長短及基因的複雜度，選擇了"線蟲"這種較易操作的物種作為實驗材料，也因為本身對神經系統方面且頗感興趣，加上較易觀察，便毅然決定以線蟲作為研究突變性狀的對象，希望能在一連串眾多突變株中，分離出選定的特殊性狀，並實驗探討之。

二. 研究目的及研究問題

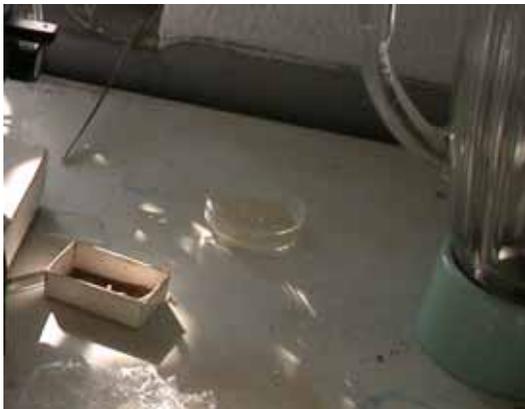
經由遺傳搜尋挑選出特殊突變性狀，並探討其遺傳性質及定位該基因在染色體上的位置，藉此更進一步討論及推測出此性狀之表現途徑，並藉由一系列的測試觀察線蟲在該種變異特性上是否會遺傳，然後作出完整的分類以及此突變種判斷之方法。

三. 研究設計

- (一)取得並培養線蟲
- (二)運用化學藥劑 EMS 使其突變
- (三)觀察、挑選出有神經異常的變異性狀，並加以純化培養
- (四)取得特定染色體變異的線蟲突變株
- (五)遺傳雜交測試欲研究之突變株的染色體位置
- (六)將後代歸納並作出完整的分析判斷表

四. 實驗器材(附圖)

(一)6cm 直徑培養皿(塑膠製)



(二)9cm 直徑培養皿(塑膠製)



(三)白金條



(四)顯微鏡(光學附項機鏡頭)



(四)顯微鏡(解剖)



(五)燒杯、玻璃管、等容器



(六)藥品(後列清單於附錄一)



(七)線蟲(後列種名以及簡介)



(八)離心機



(九)恆溫櫃



(十)循環抽氣櫃

(十一)抽氣櫃

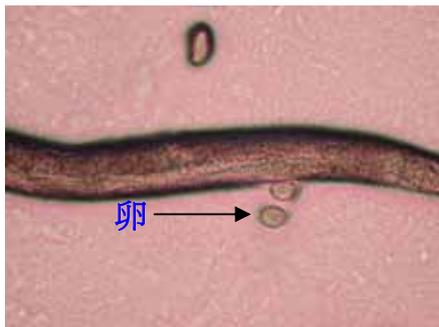


五. 研究過程

(一) 培養線蟲：

1. 先將 N2 的線蟲連大腸桿菌以及培養基一起切一小塊下來，倒置入種好菌的 6cm 直徑的培養皿中，並至於攝氏 20 度的恆溫箱內，待其生長，約兩日後可以看到培養好的蟲體。

(一) 線蟲產卵圖



(二) 恆溫櫃



(二) 突變：

1. 待其生長約兩天後，將位於 L4 生長期的線蟲挑出至培養皿上，再用 M9 (線蟲體細胞的等張液，用作搬移蟲體時的緩衝液) 將培養皿上的蟲體沖洗下來並連同 M9 溶液一起置入離心機內離心 (1000rpm, 30s)。
2. 將上清液吸去，並於 1.5ml tube 內置入蟲體與乾淨 M9 溶液至約 1ml 處，加入 EMS 20 μ l，震盪約 4hr 使蟲有充分時間暴露於突變劑中。
3. 將 EMS-M9 混合液吸去，再使用乾淨的 M9 反覆清洗蟲體，方法為先加入 M9 後充分搖晃再離心使蟲體沉澱，如此反覆進行五至六次以便將 EMS 沖洗乾淨。

(二)操作 EMS 之操作台



(三)再培養：

1. 將蟲液倒入種好菌的盤中，待其生長一天後取蟲體。
2. 取生長一天後的蟲體，是因為如果剛做完突變就取卵，可能在挑蟲時不小心挑進來的部份成蟲，其生殖腺細胞已經發育成熟，不易再突變，如此便達不到實驗的效果。
3. 挑出約 30 隻年輕成蟲(L4 期在經過約半天到一天)的蟲體三個一組放到 9cm 的培養皿中。
4. 每三小時將蟲體遷移到下一個培養皿中，持續做九小時後得到 30 個培養皿。
5. 九小時後將最後一個培養皿上的成蟲挑去(用火燒)。
6. 最後所獲得的 30 個培養皿上的蟲卵便為第一子代。
7. 詳細紀錄蟲卵生長的存活情形和個體數。

(三)挑蟲



(四)顯微鏡下的視野



(四)搜尋性狀：

1. 將所得出的第一子代篩選出所要的性狀和順利存活的個體後回到培養的步驟三進行培養純化。

2. 可由標過號的培養皿進行遺傳關係的追蹤，並進入第二階段的實驗，進行雜交與再培養，第二階段之實驗大部分為觀察並分析性狀較多，待日後有完整的第二階段成果後再另行補充第二階段之實驗過程細節)。

(五)挑蟲及遺傳觀察：

1. 用白金絲分別刺激其首部及尾部為挑選變異蟲體的方法，觀察蟲體是否會加速往反方向蜷曲行動，藉此得知此蟲體在受刺激時是否會做出反應，並觀察其一般型態是否與其他蟲體有所不同，例如蜷曲、軀體部份僵直等。
2. 遺傳性實驗的將具變異性狀之蟲體與標定好的樣本進行雜交，確定是否與已知樣本重覆；再與正常蟲體雜交，觀察其子代之性狀表現是否出現性別關聯之現象，再追蹤其子代之性狀表現等，並作出詳細表列。

六. 實驗結果

(一)正常線蟲的觀察

1. 正常線蟲蟲體圖片：

1. 正常的N2(Wild type第二代)年輕成蟲於 40*10x外加上1.7倍光學變焦下的照片 Nikon 300 萬畫素 Coolpix 995 型顯微用像機拍照，右端為首部左端為尾部，此圖所顯示畫面為光學顯微鏡下之視野。



2 . 正常的N2(Wild type第二代) 年輕成蟲於 40*10x外加上3.4倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素Coolpix 995 型顯微用像機拍照 ，右端為首部左端為尾部，為上圖之首端局部放大圖，此圖所顯示畫面為光學顯微鏡下之視野。



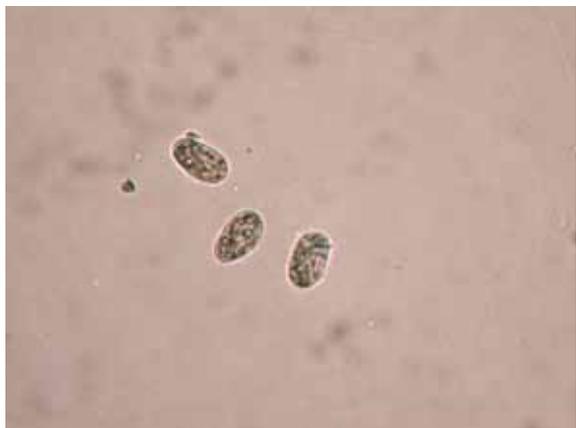
3 . 正常的N2(Wild type) 年輕成蟲於 40*10x外加上3.4倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素Coolpix 995 型顯微用像機拍照 ，右端為首部左端為尾部，為上圖之尾端局部放大圖，此圖所顯示畫面為光學顯微鏡下之視野。



4 . 正常的N2(Wild type後代) 年輕成蟲於 40*10x外加上3.4倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素Coolpix 995 型顯微用像機拍照 ，右端為首左端為尾，為上圖之尾端腹部放大圖，此圖所顯示畫面為光學顯微鏡下之視野。



5 . 正常的N2(Wild type後代) 蟲卵於 40*10x外加上3.4倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素Coolpix 995 型顯微用像機拍照 ，此圖所顯示畫面為光學顯微鏡下之視野。



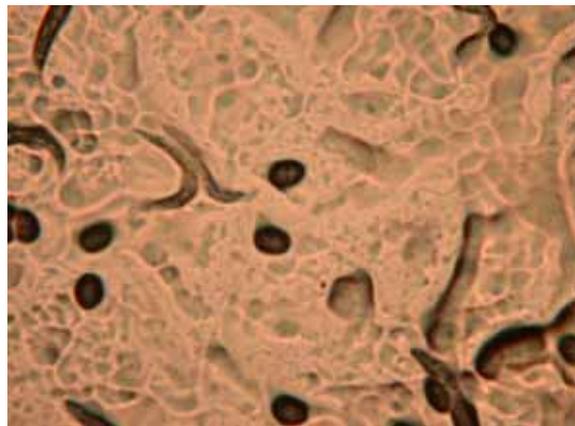
6 .正常的N2(Wild type後代) L1 至 L2 期幼蟲蟲體於 40*10x外加上3.4倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素 Coolpix 995 型顯微用像機拍照，左端為首部右端為尾部，此圖所顯示畫面為光學顯微鏡下之視野。



7 .正常的N2(Wild type後代) L1 至 L2 期幼蟲蟲體於 40*10x外加上3.4倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素 Coolpix 995 型顯微用像機拍照，內為首外為尾，此圖所顯示畫面為光學顯微鏡下之視野。



8 .正常的N2(Wild type後代) L1 至 L2 期幼蟲蟲體於 40*5x外加上6倍光學變焦下的照片Sanyo C1 300 萬畫素一般像機拍照，此圖所顯示畫面為解剖顯微鏡下之視野。

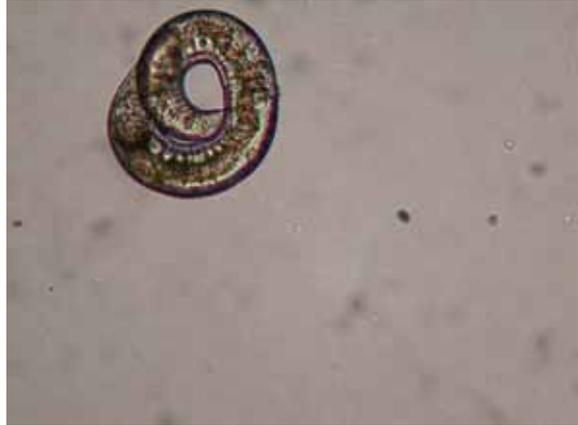


(二) 突變性狀一(侏儒)：

性狀簡介：此性狀如圖 1 所出現的外表特徵為身體短小、器官向內萎縮、生殖腺體中的卵明顯的分開排列，可藉此來做與正常種之區別，運動上的異常則為運動遲緩以及身體無法以蜿蜒方式前進，只能依靠摩擦力在原地作擺動，具侏儒性狀的個體共追蹤了 3 代，其子代所出現性狀之數量以及比例請見下表，表後附上此性狀之蟲體相片。

1. 性狀照片

1. 變異的侏儒蟲體(成熟成蟲)第3子代於40*10x外加上5.1倍光學變焦下的照片Nikon 300萬畫素Coolpix 995型顯微用像機拍照，此圖所顯示畫面為光學解剖顯微鏡下之視野。



2. 變異的侏儒蟲體(成熟成蟲)第3子代於40*10x外加上5.1倍光學變焦下的照片Nikon 300萬畫素Coolpix 995型顯微用像機拍照，此圖所顯示畫面為光學解剖顯微鏡下之視野。



3. 變異的侏儒蟲體(成熟成蟲)第3子代於40*10x外加上5.1倍光學變焦下的照片Nikon 300萬畫素Coolpix 995型顯微用像機拍照，此圖所顯示畫面為光學解剖顯微鏡下之視野。



4. 變異的侏儒蟲體(成熟成蟲)第3子代於40*10x外加上5.1倍光學變焦下的照片Nikon 300萬畫素Coolpix 995型顯微用像機拍照，此圖所顯示畫面為光學解剖顯微鏡下之視野。

另外，此圖為上圖同一蟲體經刺激後所照，證明其無法自由活動只能被探針所牽制。



5. 變異的侏儒蟲體(成熟成蟲)第3子代於40*10x外加上5.1倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素Coolpix 995 型顯微用像機拍照，此圖所顯示畫面為光學解剖顯微鏡下之視野。另外，此圖為上圖同一蟲體經刺激後所照，證明其無法自由活動只能被探針所牽制。



(三) 突變性狀二(泡泡)：

性狀簡介：此性狀表現的特徵主要為外表有不規則的皺折以及疣狀突起，其內部器官除了隨外表變形外與一般蟲體並無太大差異，此外，於運動障礙方面主要是蟲體僵直不能自由活動，可以正常繁殖子代，在與老師討論後主要認為並非神經系統變異所造成，但由於發現突變株的機會實在太珍貴，所以還是將其個體保留下來作一完整的研究。

1. 性狀照片

1. 變異的泡泡蟲體(成熟成蟲)第2子代於40*10x外加上5.1倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素Coolpix 995 型顯微用像機拍照，此圖所顯示畫面為光學解剖顯微鏡下之視野。

此圖為蟲體經刺激後所照，證明其無法自由活動只能被探針所牽制。



(四) 突變性狀三(下半身異常)：

性狀簡介：此性狀於蟲體外表上與一般蟲體完全相同，唯有在運動方面出現與其他蟲體不同的情形，在運動方面則為下半身無法正常活動，唯上半身可以蠕曲前進，可以正常繁殖，之後追蹤了三代，後面列出其中兩代的數據圖表。

1. 性狀照片

1. 變異的下半身異常蟲體(成熟成蟲)第 2 子代於 40*10x外加上3.4倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素 Coolpix 995 型顯微用像機拍照，此圖所顯示畫面為光學解剖顯微鏡下之視野，右端為尾左端為首。



2. 變異的下半身異常蟲體(成熟成蟲)第 2 子代於 40*10x外加上3.4倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素 Coolpix 995 型顯微用像機拍照，此圖所顯示畫面為光學解剖顯微鏡下之視野，上端為尾下端為首。



3. 變異的下半身異常蟲體(成熟成蟲)第 2 子代於 40*10x外加上3.4倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素 Coolpix 995 型顯微用像機拍照，此圖所顯示畫面為光學解剖顯微鏡下之視野，左端為尾右端為首。



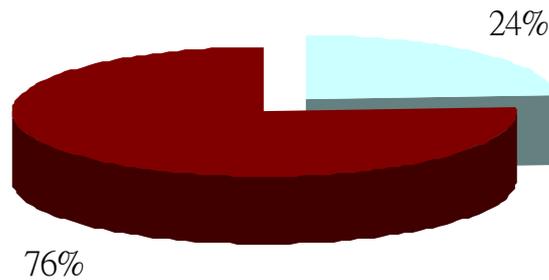
4. 變異的下半身異常蟲體(成熟成蟲)第 2 子代於 40*10x外加上3.4倍光學變焦下的照片Nikon 300 萬畫素 Coolpix 995 型顯微用像機拍照，此圖所顯示畫面為光學解剖顯微鏡下之視野，右端為首左端為尾。



(五)遺傳實驗：

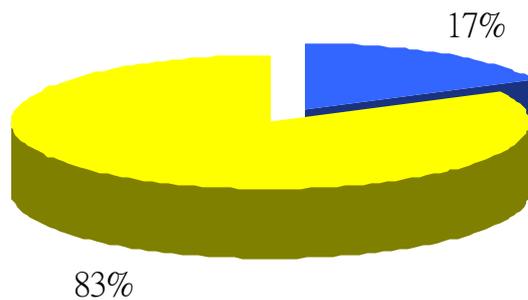
1. 突變性狀一(侏儒)可以經由遺傳傳給下一代，在遺傳表現中無分性別，所生殖之子代大多可以順利成長，子代之突變數量以及追蹤見表一及表二。

親代所產第二子代



表一：變異個體共 65 隻，總個體數 273 隻

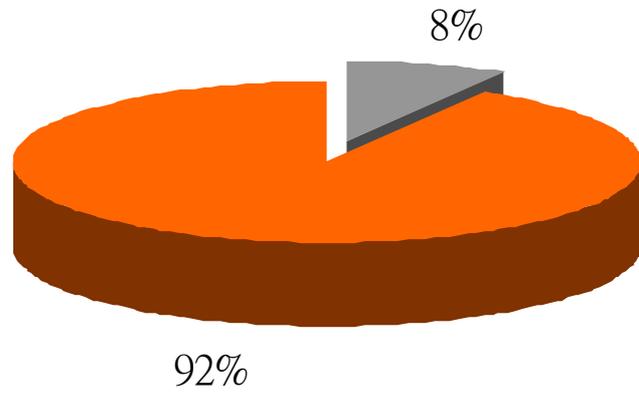
親代所產第三子代



表二：變異個體共 47 隻，總個體數 225 隻

2. 突變性狀二(泡泡)可以正常繁殖也可以經由生殖來傳給下一代，但所造成之運動障礙似乎只是因為外表突變所造成之軀體運動受阻，並非所尋找的神經系統退化，子代之突變數量以及追蹤見表三。

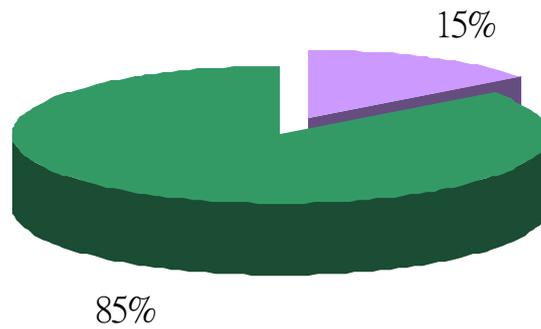
親代所產第二子代



表三：變異個體共 5 隻，總個體數 61 隻

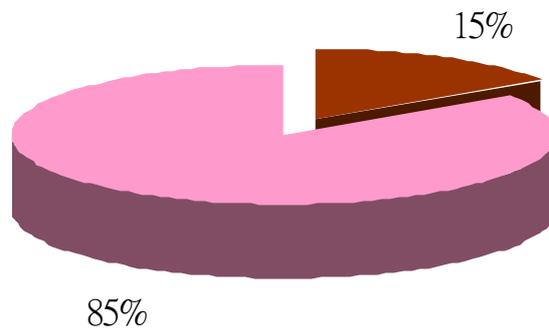
3. 突變性狀三(下半身異常)可以遺傳方式傳給下一代，於性狀遺傳中子代個體出現機率與性別無關，遺傳所得此性狀之子代可以正常生長及生殖，子代之突變數量以及追蹤見表四及表五。

親代所產第二子代



表三：變異個體共 15 隻，總個體數 101 隻

親代所產第三子代



表四：變異個體共 23 隻，總個體數 149 隻

七. 問題討論

- (一)在第一次實驗與第二次實驗中均發現一個問題，就是在操作無菌操作台上培養大腸桿菌時，偶爾會有部分空氣中的細菌混入其中造成污染，或在液態培養基培養菌庫操作時遭污染，如此一來將會污染大量固態培養基，進而造成觀察蟲體與洗蟲上的實驗誤差。
- (二)製作固態培養基時所倒入的 agar 厚薄不同，倒的太厚時容易造成解剖顯微鏡對焦不易。

八. 結論與應用

目前人類對於遺傳性的神經疾病(例如:阿茲海莫症及帕金森氏症)早期症狀的鑑別診斷上，並未完整發展出優良且有系統的診斷法，在閱讀過神經系統性遺傳疾病的相關文獻及報導後，發現此類疾病由於症狀相似，在早期判別上無法做到很精準的判斷，因而在病情的掌控與診治上造成一定程度的負面影響，有鑑於此，希望能藉由觀察歸納簡單的物種在有性生殖時可能產生的遺傳變異，發展出一套有效率的鑑別方法。

九. 文獻探討

- (一)Mutations Affecting Symmetrical Migration of Distal Tip Cells in *Caenorhabditis elegans* Kioji Nishiwaki
- (二)Science Monthly 396 期 翻開閻羅王的生死簿 黃方才 吳益群
- (三)Science Monthly 396 期 細胞凋亡話從頭 李奇璋
- (四)高中生命科學下冊 國立編譯館
- (五)高中生物下冊 國立編譯館
- (六)生物學上冊 Campbell 著 偉民圖書

附錄一(藥品清單)

M9 medium：線蟲體細胞之等張離子溶液。

NGM plate：養大腸桿菌之固態培養基。

LB medium：養大腸桿菌之液態培養基。

M9 medium		NGM plate	(1L)	(5L)
Na ₂ HPO ₄	5.8g	NaCl	3g	15g
KH ₂ HPO ₄	3.0g	Agar	17g	85g
NaCl	0.5g	Peptone	2.5g	12.5g
NH ₄ Cl	1.0g	Cholesterol	1ml	5ml
bring to 1L H ₂ O		(5mg/mlEtOH)		
		D ₂ W	975ml	4875ml

CaCl ₂ (1M)	1ml	5ml
MgSO ₄ (1M)	1ml	5ml
K Phosphate	25ml	125ml

LB medium		K Phosphate	
Tryptone	10g	KH ₂ HPO ₄	23g
Yeast Extract	5g	K ₂ HPO ₄	125g
NaCl	5g	D ₂ W	add to 1L
NaOH(1N)	1ml		
D ₂ W	add to 1L		

附錄二(線蟲簡介摘錄)

線蟲(*C. elegans*)屬於線形動物門，在自然情況下是生活在土壤間水層中。有兩種性別，雌雄同體(hermaphrodite; XX)和雄性(male; XO)。雄性個體的產生係肇因於配子形成時(減數分裂)X染色體(性染色體)的無分離(non-disjunction)，自然發生的機率約0.1%。在實驗操作中如欲使用大量雄性個體時，可以用熱刺激(heat shock)的方式提高X染色體無分離的機率。

一隻成蟲約可產下300多個卵，卵細胞在通過儲精囊後即完成受精，接著受精卵會覆上一層卵殼，受精卵經多次細胞分裂變成胚胎，14小時後孵出成為第一期幼蟲(Larva one; L1)，擁有588個體細胞。經過四次蛻皮(L1→L2→L3→L4)變為成蟲，含有959個體細胞。第四期幼蟲(L4)有明顯的特徵，蟲體發育中的產卵孔(vulva)會在體側形成一個略似蠶豆形的斑點。利用L4可以進行遺傳雜交的實驗(如同果蠅實驗中選用處女蠅)。由受精卵發育至成蟲能產下受精卵所需的時間隨著溫度會有些許變化，溫度有限制的增加可以加快線蟲生長發育的速度。一般而言，20°C環境下線蟲生活史約三天一代；25°C時約兩天半。

當環境中食物短缺時，L3、L4和成蟲會死亡，而L2會進入一個特殊的滯育時期(dauer)以度過困境，滯育時期約二個月，當食物供應回復正常時，L2便會從滯育回復到正常的發育。