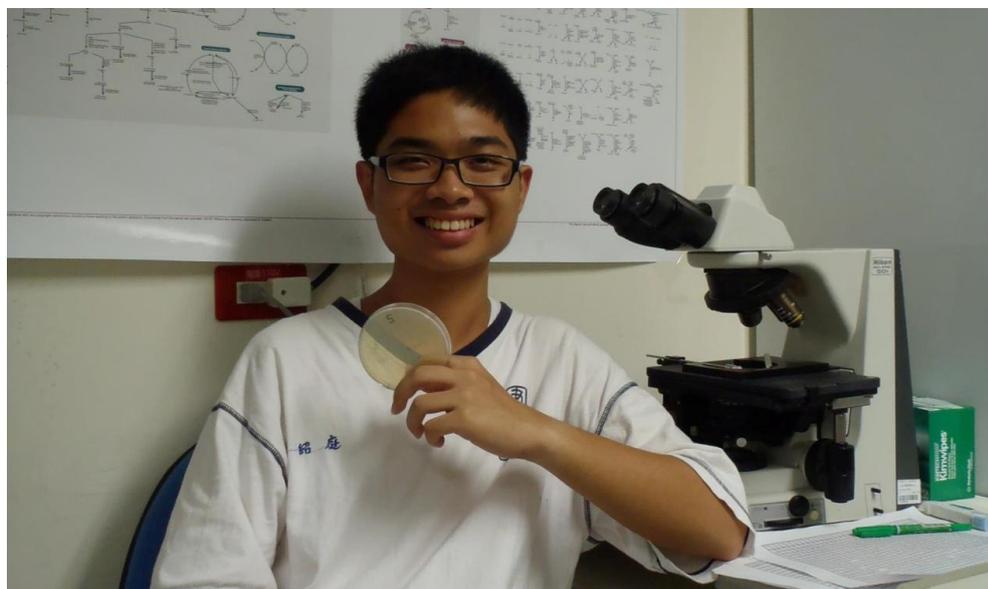




## 作者簡介



實驗是一條艱辛且少有收穫的苦路，一路上沒有太多驚喜，但每一次都令人難以忘懷。國中時，參加學校的數理彈性課程，培養了我對於實驗的興趣，我底心小小的科學夢從此發芽。高一時，因為一次意外的對話，靈光乍現，便開啟了研究的大門。由於實驗不易完成，每一次的失敗都讓我體會到接近真理的難度，但我不會停止追求，直到所有的謎團解開。

我是邱紹庭。。

## 摘要

*Saccharomyces cerevisiae* 藉由出芽生殖的方式產生子代，而執行的次數並非無所限制。酵母菌一生的分裂次數(壽命)稱為 Replicative Life Span ( RLS )，指的是母細胞在停止分裂前所產生的子代數目。本實驗將老單倍體細胞( RLS 中位數: 6 代 )和年輕單倍體細胞( RLS 中位數: 20 代 )透過有性生殖的方式形成合子，發現合子的 RLS ( 中位數: 10.5 代 )會受到老細胞的影響而縮短，並且接近兩單倍體親代 RLS 中位數的算術平均數( 13 代 )，而其 F1 子代的 RLS 卻能回復與雙倍體相似的壽命。發現單倍體親代老化導致合子短命，可進一步推測人類生殖細胞老化對受精卵的影響模式。

## **Abstract**

*Saccharomyces cerevisiae* produces offspring by budding; otherwise, there is a limitation in times of budding. The times of budding in the yeast whole life is called Replicative Life Span ( RLS ) which is defined as the number of daughter cells produced by a mother cell before the mother cell stops dividing. My project is mainly about the RLS of the old  $\times$  young zygote. I made old haploid cells ( RLS mean = 6 generations ) and young haploid cells ( RLS mean = 20 generations ) become zygotes, and I found that the RLS of these old  $\times$  young zygotes ( 11 generations ) decreases because of the old parent haploid cells, and the RLS of these old  $\times$  young zygotes is close to the average of the RLS of old haploid cells and young haploid cells ( 13 generations ) , and the RLS recovers in F1 of old  $\times$  young zygotes. Finding that the aging of parent haploid cells results in the decreasing of the survival ability of zygotes can predict how the aging of human sex cell affects the fertilized egg.

## 壹、前言

人會老，酵母菌也會老。酵母菌進行無性生殖的次數並非無所限制，隨著分裂次數越多，母細胞體內的老化因子也會隨之增加，最終導致死亡，雖然母細胞逐漸老化，但酵母菌會透過不對稱分裂( Asymmetric Segregation )的方式，將老化因子蓄積於母細胞體內，大幅減少老化對子代的影響。酵母菌的生命週期分為單倍體世代與雙倍體世代。藉由有性生殖，不同交配品系的單倍體細胞可以融合在一起成為具有新基因型組合的合子，而兩單倍體細胞變成一個雙倍體的細胞後，仍會進行出芽生殖。如果挑選經歷多次分裂的老細胞與未生過子代的年輕細胞進行有性生殖，新合子的分裂次數會如何受到親代的影響，究竟會呈現出老細胞、年輕細胞，或者是介於兩者之間的年紀，而其影響是否會進一步干擾 F1 子代的壽命。

探討酵母菌在老化遺傳上的問題，可以進一步思考人類精細胞與卵細胞的老化程度對於受精卵年紀的影響，意即單倍體親代的老化程度經過有性生殖後是否會造成其子代短命等生存能力下降的情形，為了瞭解此老化模型，使用啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 作為模式生物研究。

### 一、研究動機

一次參加中研院的研習課程，我和初次見面的指導教授一起吃飯聊天。聊著聊著不知不覺談到了酵母菌的生殖方式。在實驗室的菌落中，一個年輕的酵母菌細胞可以分裂大約二十次，而後就會因老化而導致無法分裂，但新生的細胞仍可以進行它的分裂旅程。另外，酵母菌可以因應環境的變動進行無性生殖或有性生殖，當環境不利時，酵母菌會進行減數分裂生成單倍體的孢子，而酵母菌也可在傳訊因子的作用下進行有性生殖。

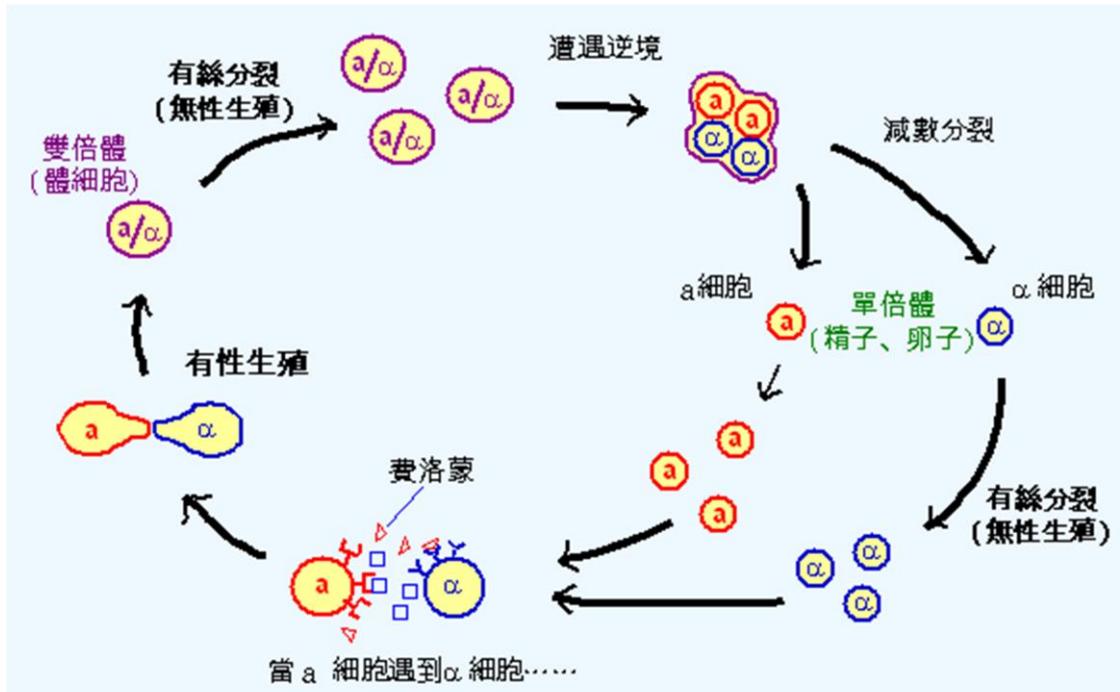
這時我想到：酵母菌在進行出芽生殖時，子細胞和母細胞在分離之前共用一個細胞質，那母細胞的老化程度會不會影響子細胞的分裂次數呢？經查詢資料，找到了「賈茲溫斯（Jazwinski）的酵母菌實驗」。藉由觀察酵母菌分裂次數，他提出的「螺旋滑梯模型」闡述新生細胞擁有與母細胞相同年齡的現象，帶給我很大的啟發。

最近出現一則關於年老男性所生的小孩其罹患亞斯伯格症、自閉症的可能性增加的報導，顯示親代的老化會影響子代。我認為將老細胞與年輕細胞進行有性生殖可以探討生殖細胞老化對於受精卵的影響，並發掘老化的奧秘，便決定用常見的啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）當作實驗生物

## 二、簡介

### （一）啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的生命周期

啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的生命週期分為雙倍體世代及單倍體世代（圖一），兩世代皆能用出芽生殖的方式進行無性生殖，出芽生殖與細菌二分裂法的不同在於二分裂法無法判定生殖後細胞的親屬關係，而出芽生殖可利用幼體成長的時間藉由體積判定，體積較大者為母細胞。其次數是有限制的。藉由計算一母細胞終其一生的出芽生殖次數，定義酵母菌的壽命，稱為 Replicative Life Span（簡稱：RLS）。酵母菌的單倍體世代有 a 和  $\alpha$  兩種交配品系，兩者相遇時，藉由化學訊息分子的溝通，進行有性生殖形成合子（zygote），zygote 具有獨特的雙瓣形（圖二）。



From 科學人雜誌

圖一 酵母菌的生命週期



From blogspot

圖二 zygote 形態

## (二) Replicative Life Span (RLS)

Replicative Life Span 簡稱 RLS，指的是一母細胞在停止分裂前所分裂的子代數目。研究酵母菌 RLS 使用顯微針挑選、移動細胞，每當母細胞分裂出子代，將女兒細胞挑走，避免女兒細胞的子代干擾觀察，並記錄母細胞的分裂次數。

### 三、研究目的

1. 探討單倍體世代及二倍體世代的 RLS
2. 比較 old × young zygote 與 young × young zygote 的 RLS
3. 比較 old × young zygote F1 子代與 young × young zygote F1 子代的 RLS
4. 分析 young × young zygote 和 F1 子代 RLS 的關係
5. 分析 old × young zygote 和 F1 子代 RLS 的關係

## 貳、研究方法和過程

### 一、實驗器材

1. 實驗生物: *Saccharomyces cerevisiae* : W303

基因型

Mating Type	MAT <sub>a</sub>	MAT <sub>α</sub>
Chromosomal Genotype	ura3-1      ade2-1	ura3-1      ade2-1
	his3-11,15    Leu2-3,112	his3-11,15    Leu2-3,112
	trp1-1      can1-100	trp1-1      can1-100
	ho::HPH ( hygromycin B )	ho::HPH ( hygromycin B )

2. 培養基

- (1) Yeast Extract Peptone Dextrose Medium ( YPED )

每公升溶液含 Yeast Extract 10g、Bacto-peptone 20g、Dextrose 20g(固態培養基含 20g agarose)

- (2) Complete Supplement Mixture –His agar plate ( CSM-His agar plate )

每公升溶液含 Yeast Nitrogen Base without amino acid 7g、Dextrose 20g、Bacto-agar 20g、CSM-His mix 1g

(3) Phosphate buffered saline PH8.0 ( PBS pH8.0 )

PBS pH7.0 濃縮液加 NaOH 調配至 pH8.0

### 3. 藥品

Sulfo-NHS-LC-Biotin、Streptavidin magnetic beads

### 4. 器皿用具

微量吸管、無菌塑膠培養皿、試管、錐形瓶、無菌木棒、無菌過濾  
器、強力磁鐵、載玻片、蓋玻片、玻璃珠、parafilm

### 5. 儀器設備

4°C 冰箱、恆溫培養箱、Dissection Microscope、震盪儀、吸光光度計、  
離心機、超音波震盪機、倒立式螢光顯微鏡

### 6. 統計

用 Mann–Whitney U 檢定不同 RLS 間是否有顯著差異

## 二、研究方法

### 1. 單倍體 RLS 測量

#### (1) 活化酵母菌

- a. 用無菌木棒刮下 a cell 及  $\alpha$  cell 菌落沾到裝有 3ml YPED 液態  
培養基的試管中
- b. 放在 28.1°C 培養箱中培養 1 日，過程中保持搖晃且斜放
- c. 稀釋 500 倍，繼續培養 12 小時

#### (2) RLS 測量

- a. 用無菌木棒將活化後的酵母菌液在 YPED agar plate 的一側  
塗一條水平的菌落 ( a cell 及  $\alpha$  cell 分開測量)

- b. 從菌落中挑出剛進行完出芽生殖而相連的母女細胞
- c. 輕敲載物台使母女細胞分離，觀察體積較小者為女兒細胞，作為樣本
- d. 利用 Dissection Microscope 將樣本細胞定位在培養基上的特定位置，在附近用顯微針打洞做記號
- e. 如樣本細胞有 Daughter cell，用顯微針使其分離，記錄母細胞出芽生殖的時間表
- f. 把 Daughter cell 收集至同一區置放
- g. 每 1.5 hr 觀察一次樣本細胞，檢查有無 Daughter cell

## 2. 雙倍體 RLS 測量

### (1) 製造 zygote

- a. 活化 a cell 及  $\alpha$  cell 菌落
- b. 取菌液各 50  $\lambda$  至 eppendorf 中，使用震盪儀充分混合
- c. 用微量吸管將溶液轉移到 YPED agar plate 上鋪平
- d. 在 28°C 恆溫培養箱靜置 2 小時
- e. 用無菌木棒刮下少許菌落，塗抹於 YPED agar plate
- f. 利用 Dissection Microscope 尋找菌落中具有雙瓣外型的細胞  
利用顯微針挑至培養基別處
- g. 置於 28°C 恆溫培養箱培養 2 到 3 日，雙倍體菌落長出

### (2) 活化雙倍體菌落

- (3) 測量雙倍體菌落的 RLS (半天放在 28°C 培養; 半天放到 4°C 冰箱保存)

## 3. young $\times$ young zygote RLS 實驗

### (1) 製造 zygote

- a. 活化 a cell 及  $\alpha$  cell 菌落
- b. 在 YPED agar plate 用木棒塗上 a cell 和  $\alpha$  cell 菌液，兩種菌液比鄰但不接觸
- c. 將 YPED agar plate 安裝在 Dissection Microscope，用顯微針在固態培養基上兩菌液相鄰之處打洞做記號
- d. 用顯微針從 a cell 和  $\alpha$  cell 菌液中挑出樣本細胞，放置於標記處，然後取 a cell 和  $\alpha$  cell 各兩個，4 個細胞排成田字草形
- a. 等待 2 小時，拆開田字草形的細胞團，呈雙瓣形的細胞就是 zygote

(2) 測量 young  $\times$  young zygote 及其 F1 子代的 RLS

- b. 將 zygote 挑到定點，在培養基上打洞定位
- c. 當 zygote 生出第二個子代時，分離相連的第一個子代作為 F1 樣本細胞
- d. 測量 young  $\times$  young zygote 及 F1 樣本細胞的 RLS

備註:

- a. 在分離 zygote 的女兒細胞時，必須等到另一個女兒細胞生出後，判定出芽生殖完成，才可分離前次的女兒細胞
- b. 半天放在 28°C 培養;半天放到 4°C 冰箱保存

4. 抽 a cell 老細胞

- (1) 用無菌微吸管頭從 YPED agar plate 刮下 a cell 菌落，混入裝有 50ml 的錐形瓶中
- (2) 放在 28°C 溫室中震盪培養 1 日
- (3) 測菌液的遮光率 X (O.D)
- (4) 取 1/X ml 的菌液，裝到 eppendorf 中

- (5) 離心 (12000 rpm 30 sec), 使菌沉澱到 eppendorf 底部
  - (6) 抽乾 YPED
  - (7) 加入 4°C 1X PBS pH 8.0 回溶至 1 ml, 震動混均勻, 清洗細胞
  - (8) 離心 (12000 rpm 30 sec)
  - (9) 抽乾 1X PBS pH 8.0
  - (10) 加入 Sulfo-NHS-LC-Biotin ( 濃度 2mg/ml, 溶劑為 1X PBS pH 8.0 震動混均勻
  - (11) 放置在 4°C 冰室中, 用迴旋式震盪機緩慢晃動 1 hr
  - (12) 離心 (12000 rpm 30 sec)
  - (13) 抽乾 Sulfo-NHS-LC-Biotin 溶液
  - (14) 用 4°C 100 mM Glycine 1X PBS pH 8.0 清洗細胞 2 次
  - (15) 將菌液裝到 50 ml YPED 錐形瓶中
  - (16) 在 28°C 溫室中震盪培養 48 hr
  - (17) 取出菌液分裝至 eppendorf 中
  - (18) 離心 (12000 rpm 30 sec)
  - (19) 用 1X PBS pH 8.0 清洗 1 次
  - (20) 離心 (12000 rpm 30 sec), 使菌液沉澱
  - (21) 抽乾溶液, 加入 1X PBS pH 8.0 回溶至 1ml
  - (22) 用超音波震盪機震盪 30 秒 (低能量)
  - (23) 加入 Streptavidin magnetic beads 5  $\lambda$
  - (24) 放置在 4°C 冰室中, 用迴旋式震盪機緩慢晃動 2 hr
  - (25) 用磁座吸引帶磁珠的細胞(老), 並用微吸管移除沒有磁珠的細胞 (年輕), 放至於另一管
  - (26) 用 1X PBS pH 8.0 清洗 3 次
5. Sulfo-NHS-LC-Biotin labeled a cells 的 RLS

執行步驟(四)抽老細胞實驗但取消步驟(四)之 15 等待 48hr 的過程，取得被 Sulfo-NHS-LC-Biotin 和 Streptavidin magnetic beads 標記的年輕細胞，了解藥劑對細胞 RLS 的影響(半天放在 28°C 培養;半天放到 4°C 冰箱保存)

## 6. 測量 a cell 老細胞的 RLS

### (1) 觀察 Bud scar 數

- a. 使用步驟(四)抽老細胞實驗所得之老細胞和年輕細胞比較
- b. 加入 Solophenyl Flavine 7 GFE 溶液( 濃度 1 mg/1 ml 1X PBS pH 8.0 )
- c. 在室溫等待 15 分鐘  
用 1X PBS pH 8.0 清洗細胞一次
- d. 製程標本用螢光顯微鏡觀察
- e. 對焦後用白光和綠色螢光在 z 軸分 25 層拍攝，記錄 Bud scar 數量

### (2) 測量 a cell 老細胞的 RLS

挑選步驟(四)抽老細胞實驗所得之老細胞進行 RLS 測量(半天放在 28°C 培養;半天放到 4°C 冰箱保存)

## 1. old × young zygote RLS 實驗

- (1) 活化  $\alpha$  cell 菌
- (2) 將步驟(四)抽老細胞實驗所得之老細胞和  $\alpha$  cell 菌液分別塗抹於 YPED agar plate 兩側
- (3) 將 YPED agar plate 安裝在 Dissection Microscope，用顯微針在固態培養基兩菌液相鄰之處打洞做記號

- (4) 用顯微針從 a cell 和  $\alpha$  cell 菌液中挑出樣本細胞，放置於標記處，然後將 a cell 和  $\alpha$  cell 各兩個，4 個細胞排成田字草形
- (5) 等待 2 小時，拆開田字草形的細胞團，呈雙瓣形的細胞就是 zygote ( old  $\times$  young zygote )
- (6) 測量 old  $\times$  young zygote 及其 F1 子代的 RLS
  - a. 將 zygote 挑到定點，在培養基上打洞定位
  - b. 當 zygote 生出第二個子代時，分離相連的第一個子代作為 F1 樣本細胞
  - c. 測量 old  $\times$  young zygote 及 F1 樣本細胞的 RLS

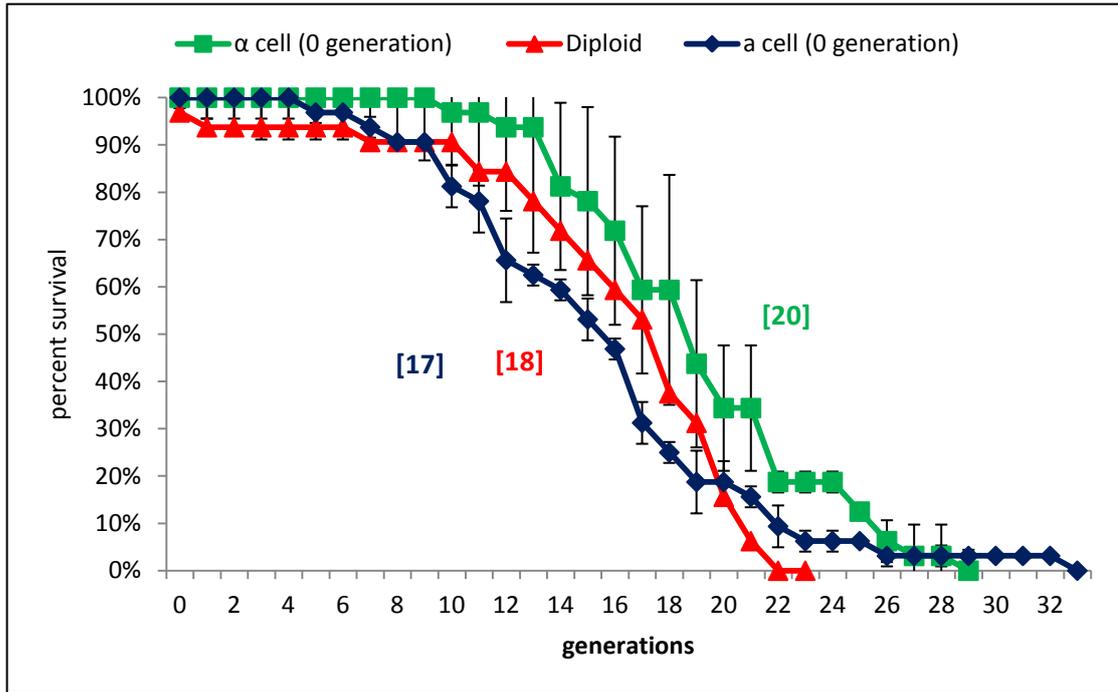
備註:

- a. 分離 zygote 的女兒細胞時，必須等到另一個女兒細胞生出後，判定出芽生殖完成，才可分離前次的女兒細胞
- b. 半天放在 28°C 培養;半天放到 4°C 冰箱保存

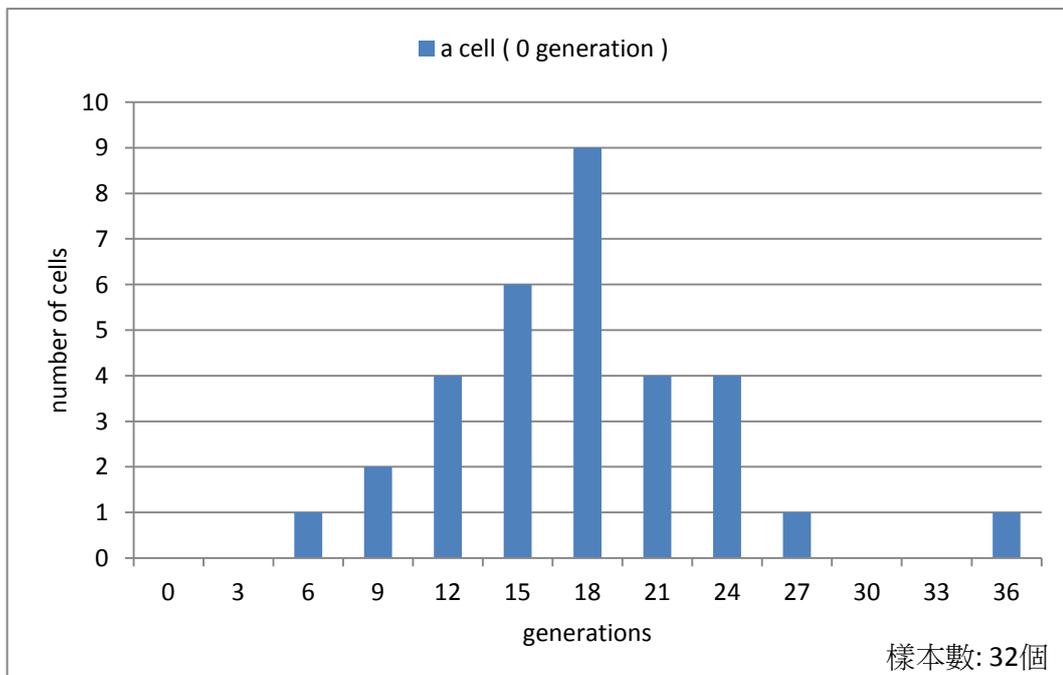
## 參、實驗結果

### 一、雙倍體的 RLS 介於單倍體 a cell 和 $\alpha$ cell 的 RLS 之間

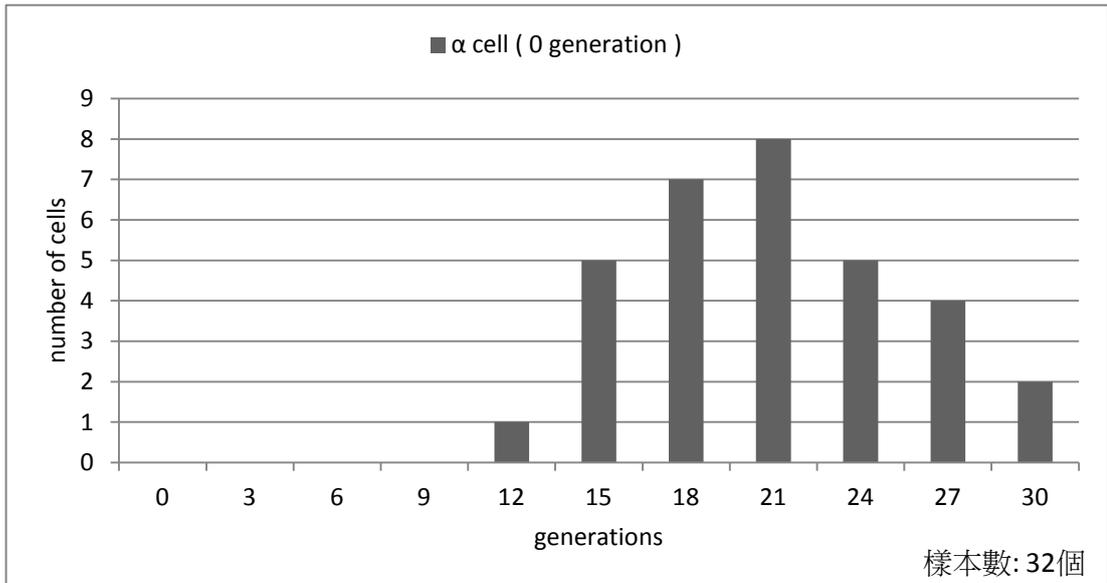
雙倍體來自於 a cell 和  $\alpha$  cell 有性生殖後的 zygote 在 YPED agar plate 上產生的菌落。其 RLS 以中位數表示，雙倍體介於兩親代的 RLS 之間，其衰退圖(圖三)顯示雙倍體的衰退線亦介於兩親代之間。雙倍體、a cell 和  $\alpha$  cell 的分佈都符合鐘型曲線(圖四、五、六)，且分布的高峰都十分接近 RLS 中位數。利用 Mann-Whitney U 檢定發現 a cell 與  $\alpha$  cell、雙倍體與  $\alpha$  cell、雙倍體與 a cell，都不呈現顯著差異( $P \geq 0.05$ )，三者的 RLS 十分雷同



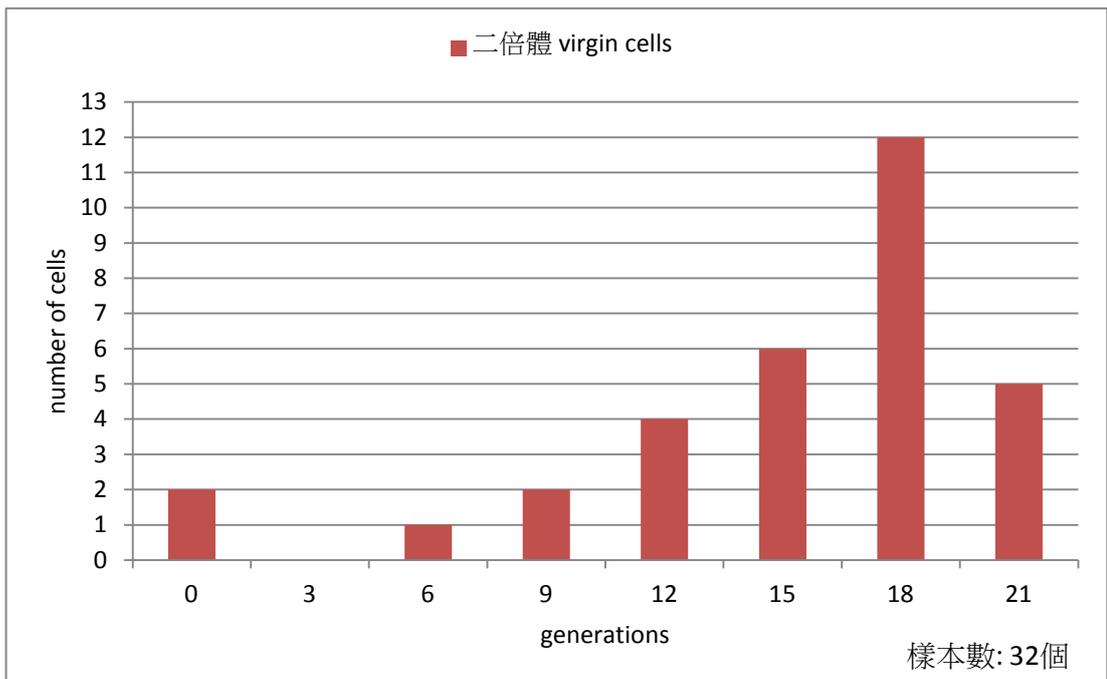
圖三 a cell, Diploid,  $\alpha$  cell, biotin labeled a cell 的 RLS 衰退圖。P value: a cell 和 Diploid (0.64), a cell 和  $\alpha$  cell (0.14), Diploid 和  $\alpha$  cell (0.38)。樣本數:  $\alpha$  cell: 32, Diploid: 32, a cell: 32。括弧內的數字為 RLS 中位數



圖四 a cell 的 RLS 分佈圖



圖五  $\alpha$  cell 的 RLS 分佈圖



圖六 雙倍體的 RLS 分佈圖

二、old  $\times$  young zygote 的 RLS 比 young  $\times$  young zygote 短，且介於兩親代之間

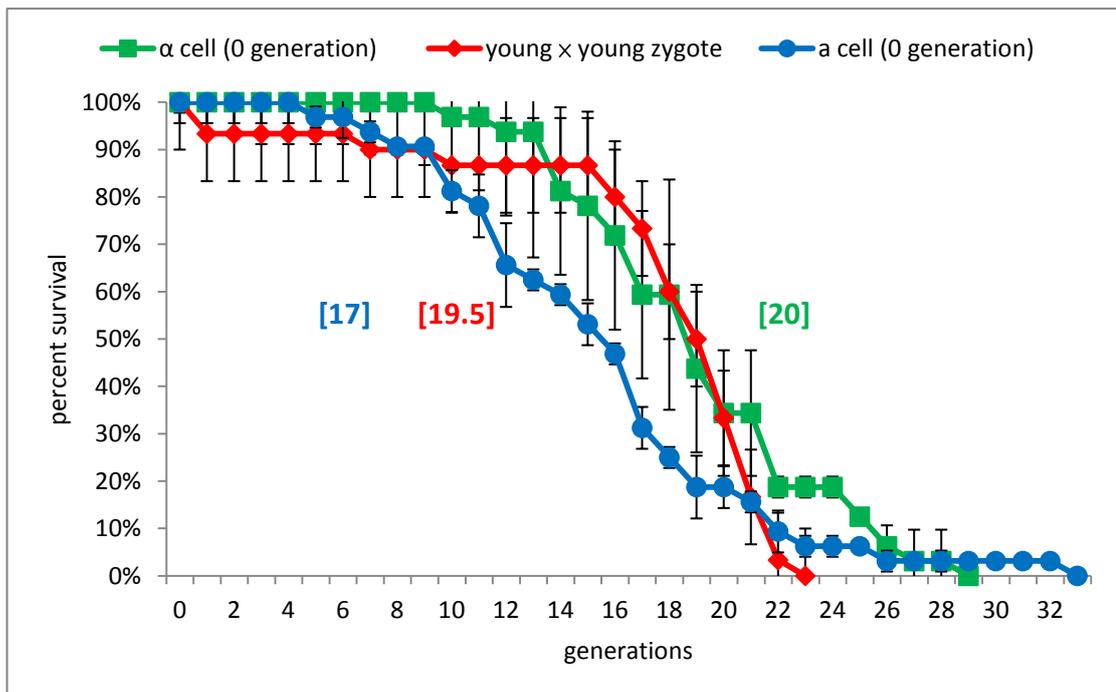
1. young  $\times$  young zygote 的 RLS 實驗

活化 a cell 及  $\alpha$  cell 之後，將菌液塗抹於 YPED agar plate 兩處，用顯微針挑出數十個 a cell 和  $\alpha$  cell 的 virgin cell (0 generation)，每兩個 a cell 配對兩個  $\alpha$  cell，排列成田字草形，促使有性生殖發生。置於 28°C 恆溫培養箱培養 2 小時，拆開田字草形，尋找 zygote 形的細胞，挑出的 zygote 是由 2 個 virgin cell 有性生殖而來的，故稱為 young  $\times$  young zygote。並測量 young  $\times$  young zygote 及其生下的第一個子代的 RLS ( F1 of young  $\times$  young zygote )

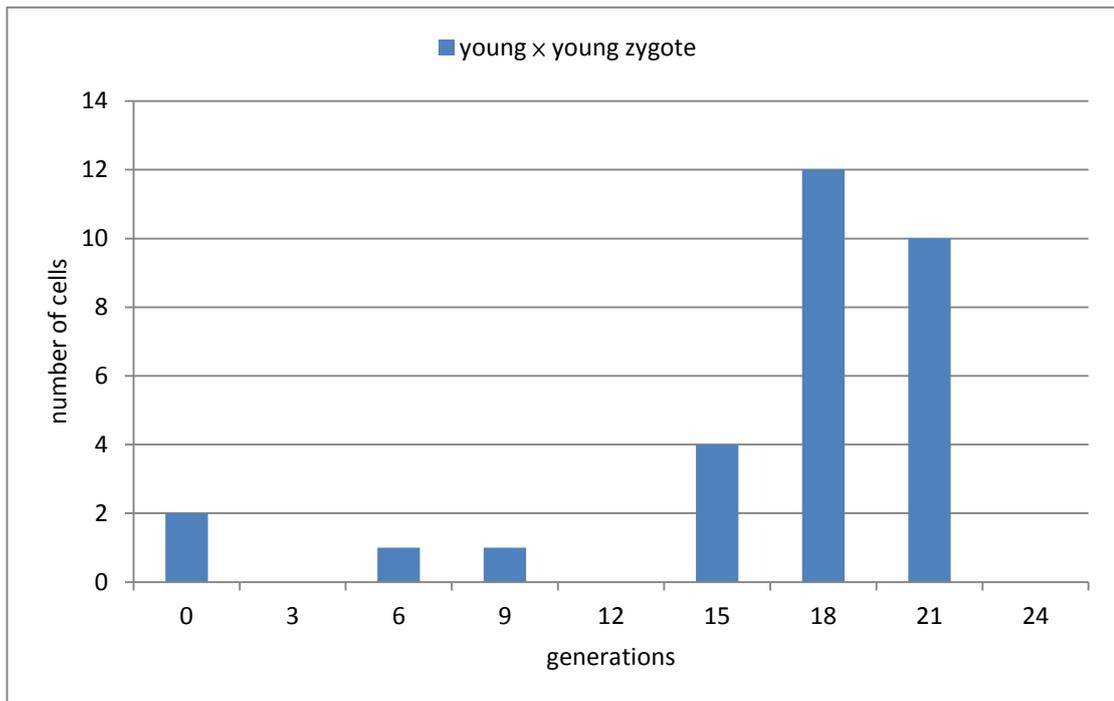
(1) young  $\times$  young zygote 的 RLS

young  $\times$  young zygote 的 RLS 中位數為 19.5 代(圖七)，與二倍體的中位數大小都在 a cell (17 代)和  $\alpha$  cell (20 代) 之間，分布上都以 18-20 代的區間為分布的高峰(圖六)。

young  $\times$  young zygote 的 RLS 呈現常態分布(圖八)，而 a cell 與 young  $\times$  young zygote、 $\alpha$  cell 與 young  $\times$  young zygote 的 P value 都呈現無顯著差異( $P \geq 0.05$ )



圖七 young × young zygote, α cell, a cell 的 RLS 衰退圖。 P value: a cell 和 young × young zygote (0.09), α cell 和 young × young zygote (0.47) (樣本數: young × young zygote: 40, α cell: 32, a cell: 32)



圖八 young × young zygote 的 RLS 分佈圖

(2) old × young zygote 的 RLS

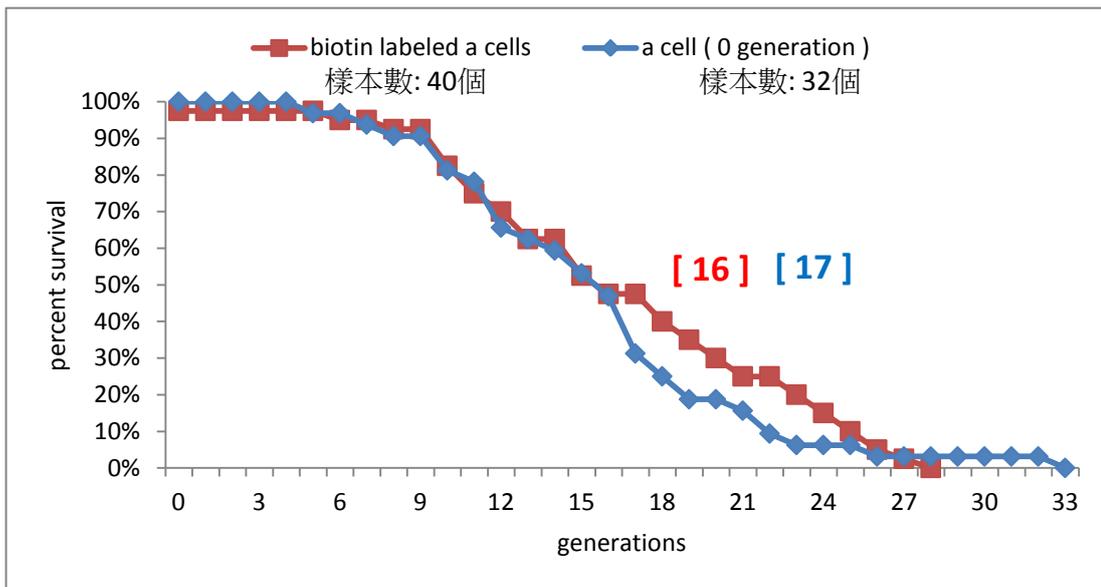
a. biotin labeled a cells 的 RLS

在抽老細胞的過程中使用 Sulfo-NHS-LC-Biotin 和 streptavidin-磁珠與細胞壁上的分裂疤痕(Bud scar)連接，藉由測量 biotin labeled a cells 的 RLS 探討這些實驗過程對細胞 RLS 的影響。

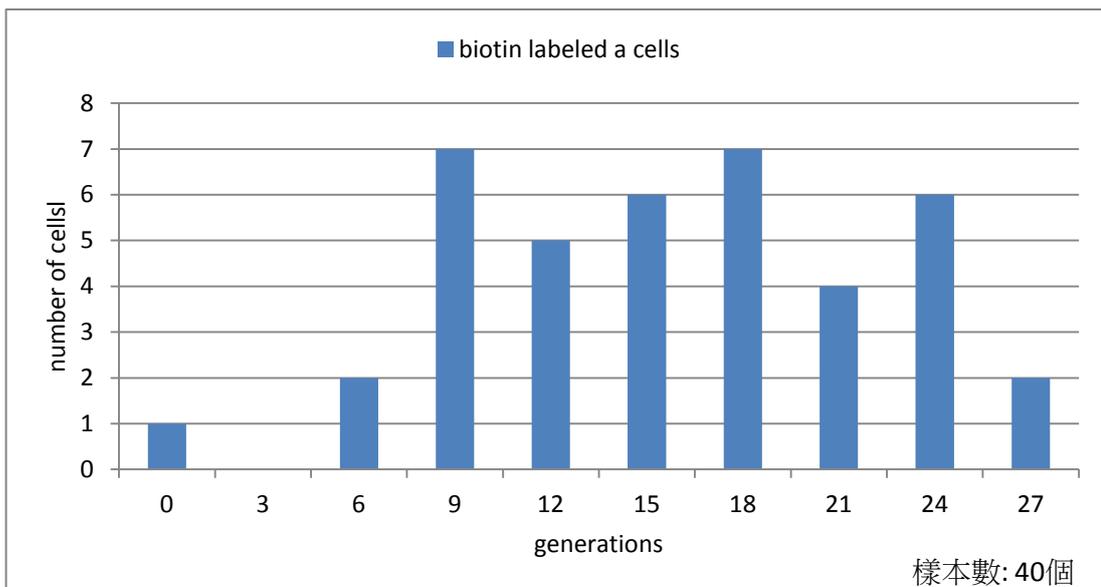
使用活化後的 a cell 菌液進行抽老細胞的處理，省去加入 Sulfo-NHS-LC-Biotin 藥劑後培養 48 小時的過程，直接加入 streptavidin-磁珠處理，暫且稱為 biotin labeled a cell，測量其 RLS

並與單倍體 RLS 測量實驗的 a cell 比較

biotin labeled a cells 的 RLS 的中位數為 16 代(圖九), 與未處理的細胞(17 代)差距一代。雖然 biotin labeled a cells 並不呈現常態分布(圖十), 但 biotin labeled a cell (實驗組)與 a cell (對照組)的 P value 呈現無顯著差異( $P \geq 0.05$ )。



圖九 biotin labeled a cells 的 RLS 衰退圖( $P$  value = 0.88)



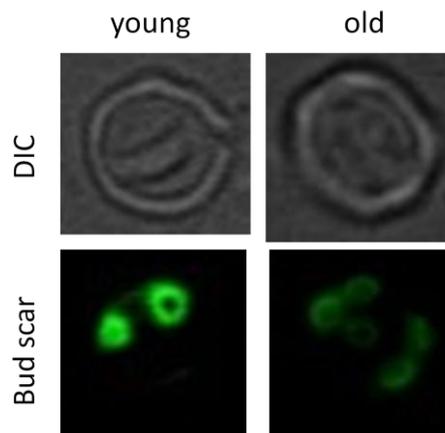
圖十 biotin labeled a cells 的 RLS 分佈圖

b. 測量 a cell 老細胞的 RLS

利用抽老細胞實驗將分離自 a cell 菌液的老細胞和年輕細胞進行 Bud scar 染色，初步判定分離的效率；接者測量其 RLS，深入了解 a cell 的老化程度，作為接下來 old × young zygote 實驗的老細胞來源

α. 觀察老細胞和年輕細胞的 Bud scar 數

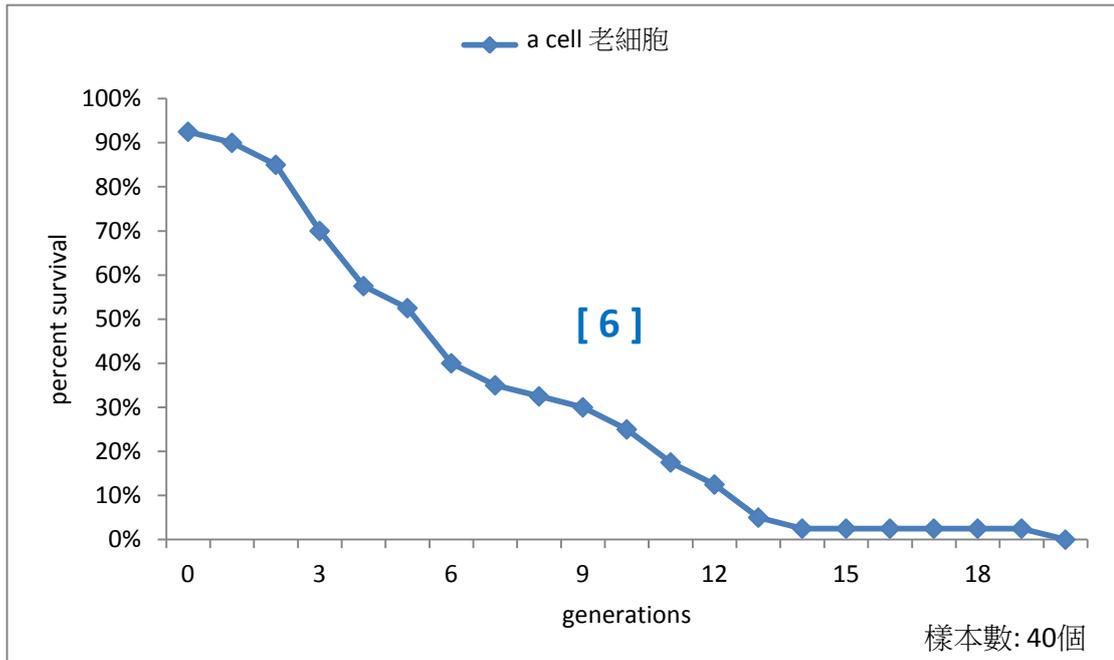
將分離的老細胞與年輕細胞用 Solophenyl Flavine 7 GFE 標記 Bud scar(圖十一)在綠色螢光的圖片中，可以看到酵母菌細胞壁上有綠色圓環，這些圓環就是 Bud scar，記下樣本細胞的 Bud scar 數，得知老細胞( old cell ) 的 Bud scar 平均數為 5.78(標準差 1.5)；年輕細胞的 Bud scar 平均數為 1.56(標準差 1.6)



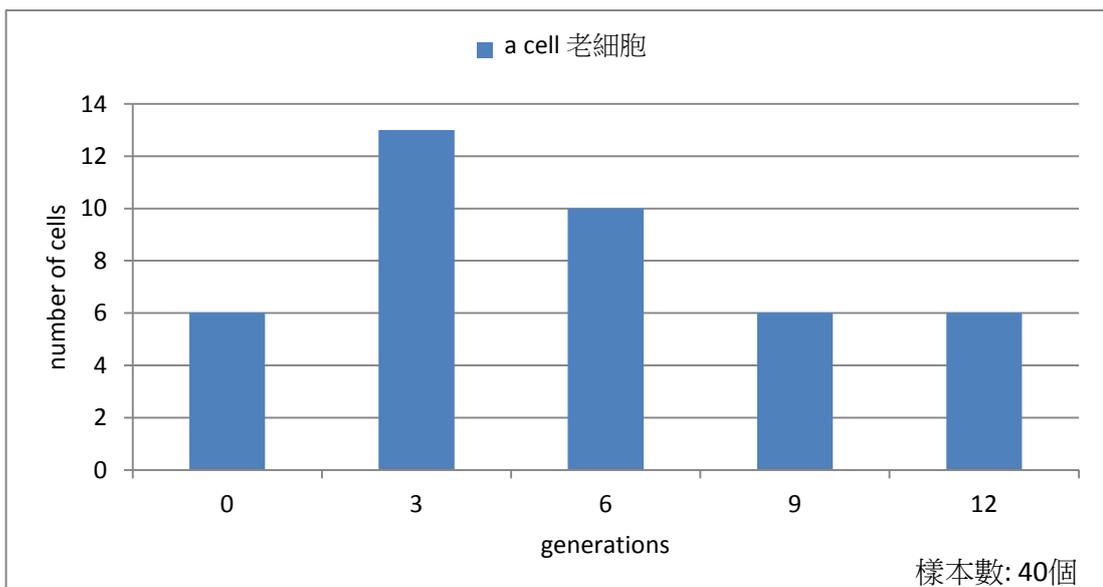
圖十一 Bud scar 圖片

β. a cell 老細胞的 RLS

a cell 老細胞的 RLS 的中位數為 6 代(圖十二)，其分佈高峰為 3-5 代區間。此次測量取得抽老細胞實驗的 a cell 樣本的 RLS，用於 old × young zygote 實驗



圖十二 a cell 老細胞的 RLS 衰退圖



圖十三 a cell 老細胞的 RLS 分佈圖

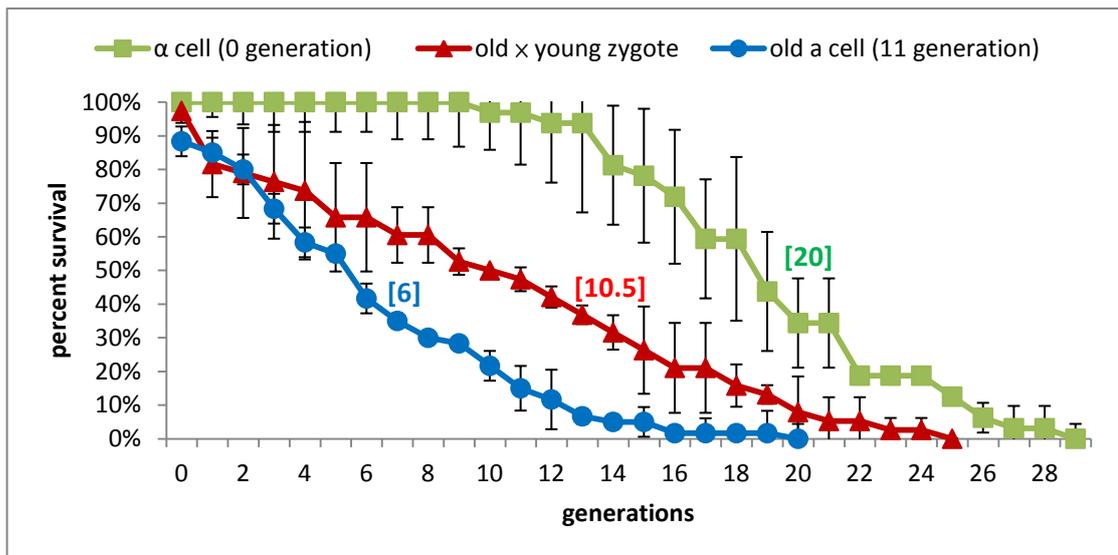
### (3) old × young zygote 的 RLS 實驗

酵母菌的老細胞體積一般大於年輕細胞，其 zygote 的雙瓣形呈現出[一大一小]的不對稱輪廓。old × young zygote 的 RLS 中位數為 10.5 代(圖十四)，小於其 F1 子代，其親代老 a cell (6 代)和年輕 a cell

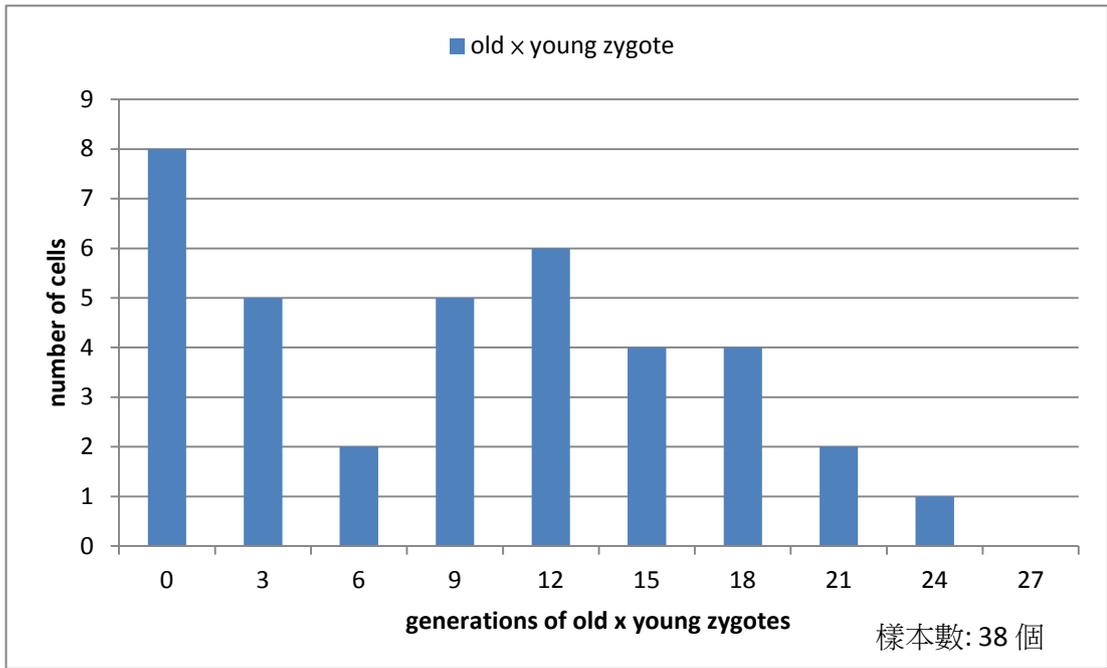
(20 代)中位數的算術平均數為 13，與 old × young zygote 的存活代數差 2.5 代。分部高峰在 12-14 代區間為親代老 a cell (3-5 代)和年輕 a cell (可存活 21-23 代)分部高峰的算術平均數。但其分佈並不符合鐘型曲線(圖十五)。

old × young zygote 與 old a cell、old × young zygote 與 young α cell 的 P value 都呈現顯著差異 (P < 0.05)

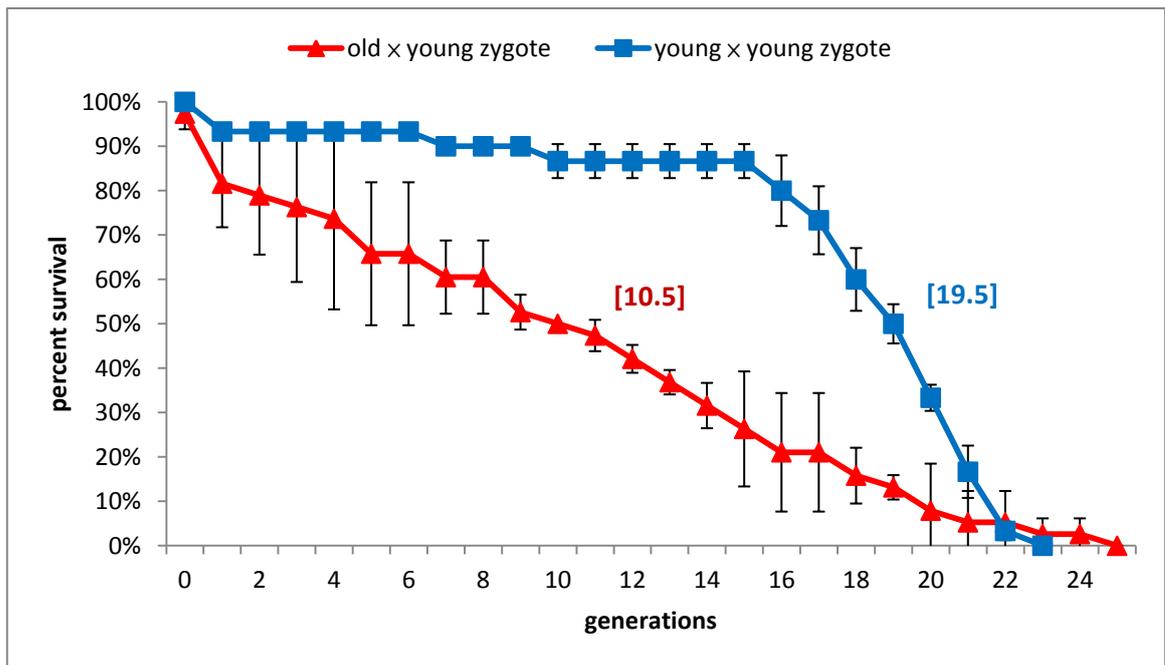
與 young × young zygote (19.5 代)相比，old × young zygote (10.5 代)的 RLS 中位數比其短(圖十六)，且兩者有顯著差異(P value < 0.001)。



圖十四 old × young zygote, a cell, α cell 的 RLS 衰退圖。P value: old a cell 和 old × young zygote (<0.001), a cell 和 old × young zygote (0.02) (樣本數 old × young zygote: 38 個、α cell: 32 個、old a cell: 60 個)



圖十五 old x young zygote 的 RLS 分佈圖



圖十六 old x young zygote 與 young x young zygote 比較圖。 P

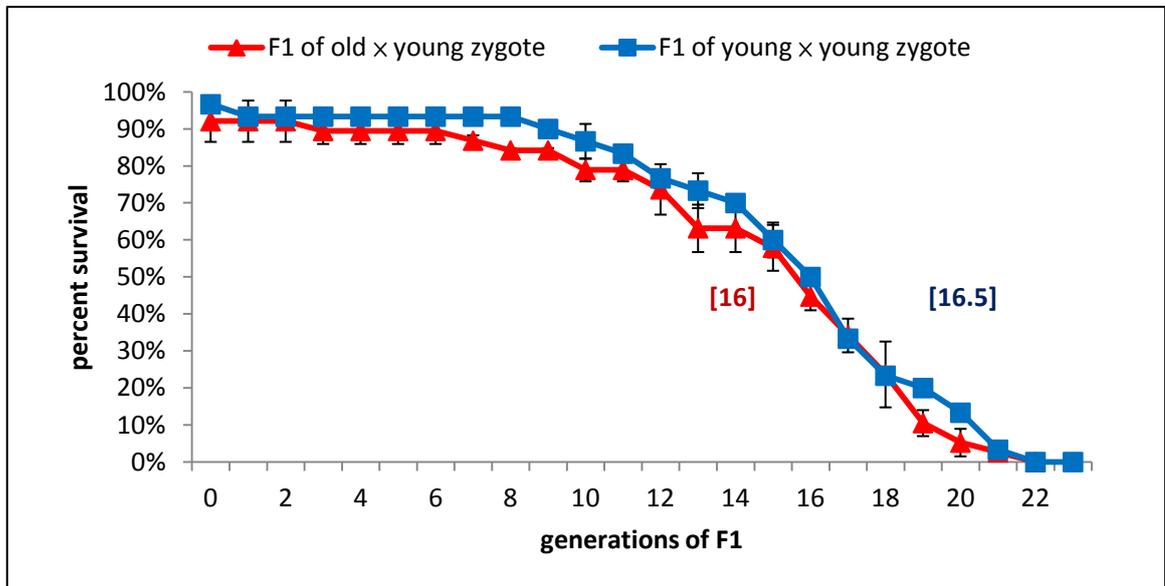
value < 0.001 (樣本數分別為: 38 與 40)

### 三、old × young zygote 的 F1 子代與 young × young zygote 的

#### F1 子代 RLS 無顯著差異

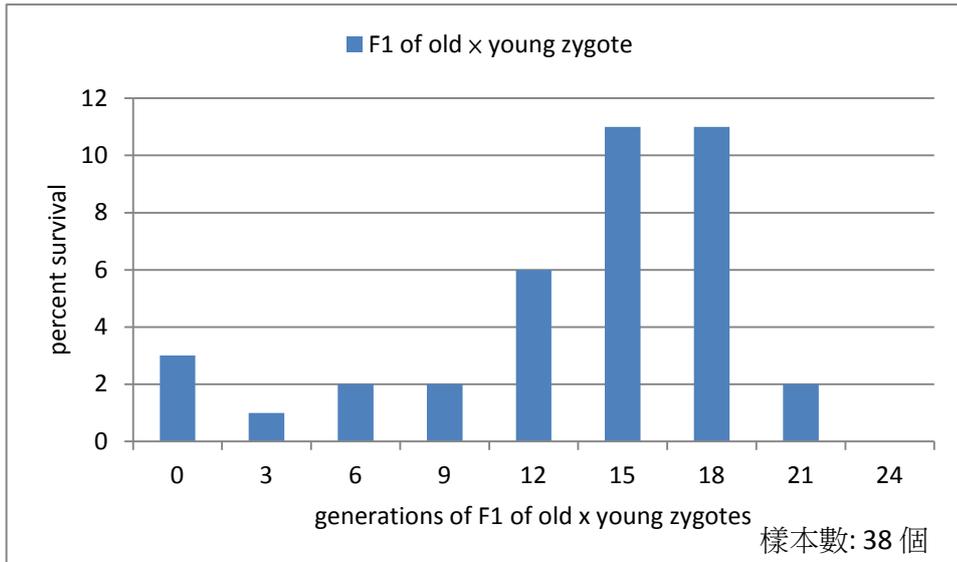
old × young zygote 與 young × young zygote 的 RLS 雖然呈現顯著差異，但兩者的子代卻十分雷同，都呈現約 16 代。且兩者並沒有顯著差異(P value > 0.05)。

兩者的衰退線十分接近(圖十七)，而且分佈都符合常態分布，有重疊的分佈高峰(18-20 代)

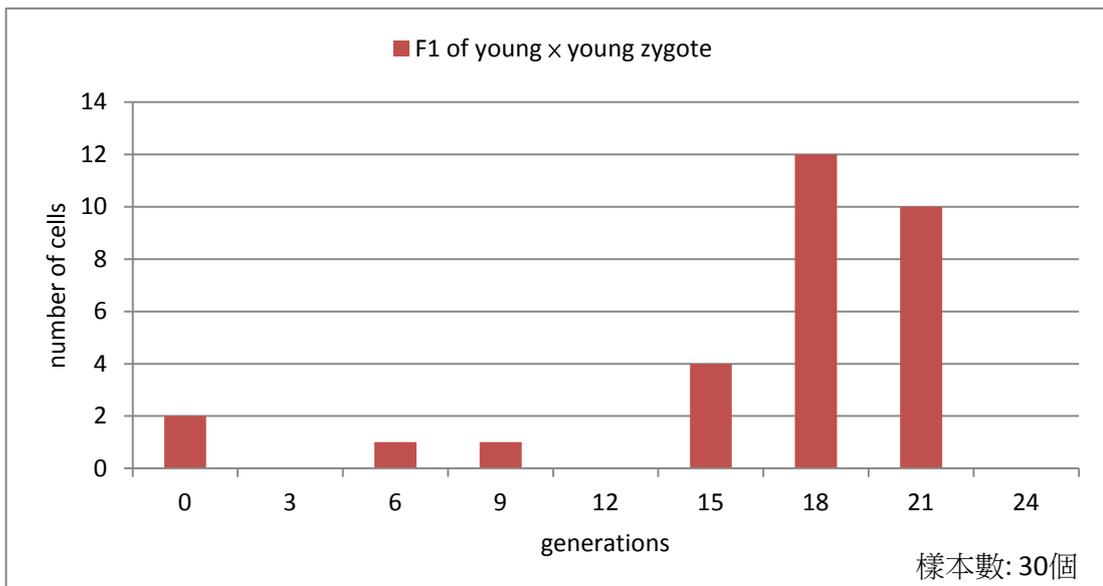


圖十七 old × young zygote 的 F1 子代與 young × young zygote 的

F1 子代比較圖。 P value = 0.58 (樣本數分別為: 38、40 個)



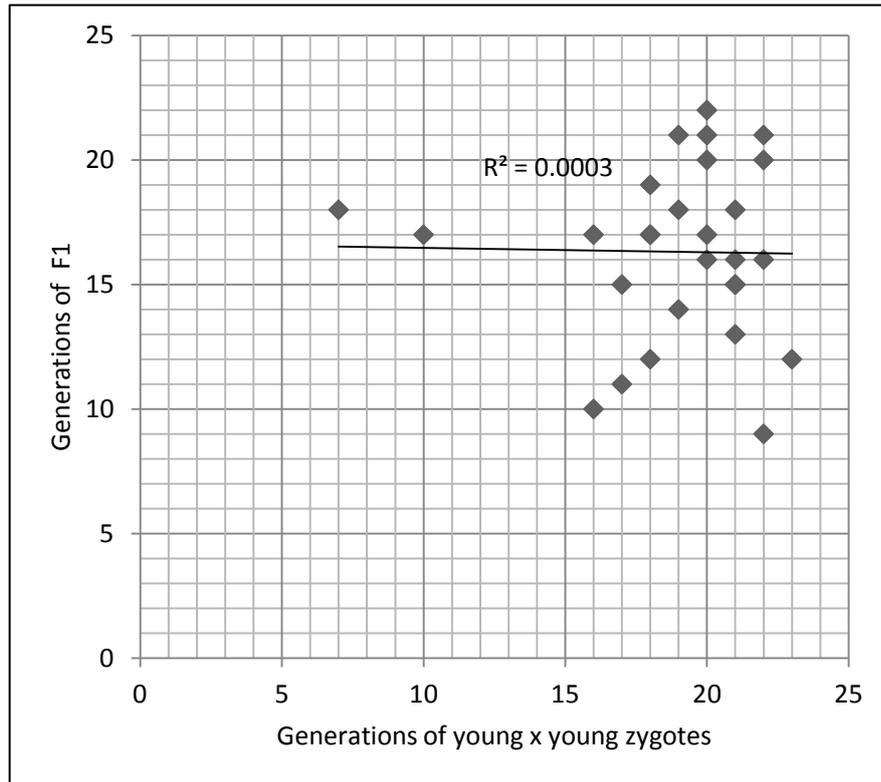
圖十八 F1 of old x young zygote 的 RLS 分佈圖



圖十九 F1 of young x young zygote 的 RLS 分佈圖

#### 四、Young x young zygote 和 F1 子代的 RLS 呈現低度相關

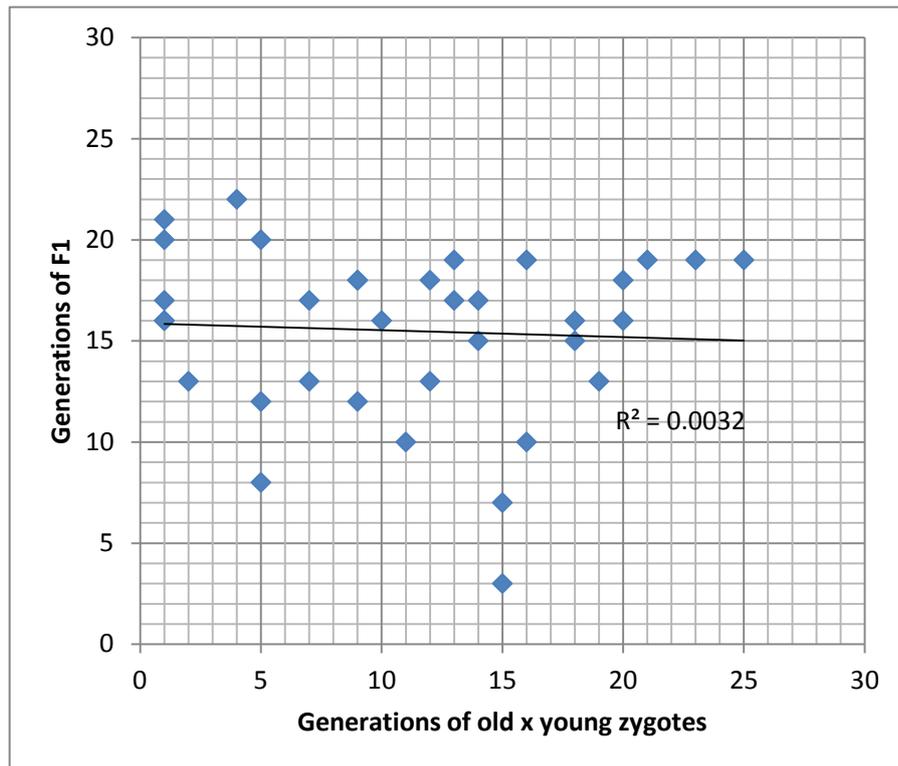
將 young x young zygote 的 RLS 數值作為 x 軸，其子代的 RLS 數值作為 y 軸，發現親代與子代的 RLS 在函數上為低度相關 (圖二十)



圖二十 young × young zygote 與其 F1 子代的二維陣列分析 (樣本數: 40 個)

### 五、 Old × young zygote 和 F1 子代的 RLS 呈現低度相關

將 old × young zygote 的 RLS 數值作為 x 軸，其子代的 RLS 數值作為 y 軸，發現親代與子代的 RLS 在函數上為低度相關 (圖二十一)



圖二十一 old x young zygote 與其 F1 子代的二維陣列分析 (樣本數: 38 個)

## 肆、討論

酵母菌進行無性生殖的次數並非無所限制，隨著分裂次數越多，母細胞體內的老化因子也會隨之增加，最終導致死亡，雖然母細胞逐漸老化，但酵母菌會透過不對稱分裂(Asymmetric Segregation)的方式，將老化因子蓄積於母細胞體內，大幅減少老化對子代的影響。酵母菌的生命週期分為單倍體世代與雙倍體世代。藉由有性生殖，不同交配品系的單倍體細胞可以融合在一起成為具有新基因型組合的合子，而兩單倍體細胞變成一個雙倍體細胞後，仍會進行出芽生殖。如果挑選經歷多次分裂的老細胞與未生過子代的年輕細胞進行有性生殖，新合子的分裂次數會如何受到親代的影響?在人類生命週期中，精卵單倍體細胞會進行受精作用成為具有長成完整個體能力的合子，而精子或卵子細胞的老化程度是否會對合子的分裂次數造成影響，透過酵母菌進行單倍體老少配的實驗探究受精作用與老化的關係，是本專題的核心問題。

比較單倍體與雙倍體的 RLS，實驗時使用的 a cell 和  $\alpha$  cell 形成的 zygote 進行實驗，雖然不知道最初合子的單倍體親代是老細胞還是年輕細胞，但經過兩天的生長，菌落中充滿了年輕細胞，原始細胞年紀的影響隨著代數增加而逐漸淡化。從研究結果一、二得知 *Saccharomyces cerevisiae* 的單倍體與雙倍體細胞具有相仿的壽命，而雙倍體 RLS 的中位數在兩單倍體親代之間。

透過混合不同交配品系的菌液可以得到數量龐大的合子，卻不知道親代單倍體細胞的年紀，因此為了確定單倍體親代為 virgin cell 或老細胞，必須藉由顯微針挑選正在分裂的細胞，分離體積較小的女兒細胞作為 virgin cell。在 young  $\times$  young zygote 的 RLS 實驗中，要將不同交配品系的 virgin cell 排列在一起形成 zygote，但在實驗的過程中，如果只是將 a cell 和  $\alpha$  cell 各一個排列在一起，30 對細胞都沒有形成 zygote，但如果將 a cell 和  $\alpha$  cell 各取兩個排列成田字草型，才有機會形成 zygote，大約有一半的田字草型細胞團會出現 zygote，而這些 zygote 都是由年輕的單倍體細胞經有性生殖而形成，這樣的做法雖然只能取得有限的 zygote，但可以明確的知道親代單倍體細胞的年紀。排列成田字草型的方法用於需要確定單倍體親代年紀的 zygote 合成實驗。

使用排列成田字草型的方法形成 young  $\times$  young zygote，並取得此細胞的第一個子代（簡稱:F1）；接著測量兩者的 RLS，測量 zygote 的 RLS 必須小心分離女兒細胞所造成的傷害，必須等到下一個女兒細胞生出後，才可以分離前一個女兒細胞，由於 zygote 為雙瓣型，比單倍體和雙倍體的卵圓狀脆弱，在分離細胞時，要避免手敲顯微鏡強迫分離，以周圍水分的內聚力吸引取代，減少傷害。young  $\times$  young zygote 與其 F1 子代的 RLS 中位數都介於兩單倍體親代的壽命之間，與雙倍體的實驗結果一樣。可以觀察到 young  $\times$  young zygote 的壽命與雙倍體 virgin cell 相同，而其 F1 子代亦然。由於兩者年齡集中在 18-20 區間，在二維陣列可見到集中於一側且接近圓形分佈，相關係數很小。壽命的中位數:單倍體 a cell(17 代)、

單倍體  $\alpha$  cell (20 代)、雙倍體(18 代)、young  $\times$  young zygote (19.5 代)、 F1 of young  $\times$  young zygote (16.5 代)，介於 16.5-20 代之間，大致相同。

進行 old  $\times$  young zygote RLS 測量實驗最大的障礙在於如何取得大量且年紀已知的老細胞。抽老細胞的技術藉由 Sulfo-NHS-LC-Biotin 標記細胞壁，由於子代的細胞壁是另外形成而不予親代共享，所以子代細胞不會得到 Sulfo-NHS-LC-Biotin 標記的細胞壁，搭配 streptavidin-磁珠，並可吸下 Sulfo-NHS-LC-Biotin 標記的老細胞，但必須確定此過程會不會縮短酵母菌的壽命。實驗發現，經過此過程處理的  $\alpha$  cell 除了 RLS 中位數比實驗一的  $\alpha$  cell 少了一代之外，其分布並不是常態分布。推測的原因可能在於挑選樣本細胞時由於新生的女兒細胞不帶有標記，所以並沒有選擇 virgin cell 進行測量，與實驗一的 virgin cell 實驗有所差別，因為即使經過活化酵母菌的過程，雖然菌液中充滿了年輕細胞，但不能保證，所有細胞都是沒有生過子代的 virgin cell，這可能是造成 biotin labeled  $\alpha$  cells 中位數僅差 1 代，但分布上不符合常態分佈的原因。但與對照組進行 Mann-Whitney U 檢定發現兩者的差異甚小，可以排除抽老細胞實驗造成細胞損害。將抽老細胞實驗所得的老細胞菌液和年輕細胞菌液(皆為  $\alpha$  cell)進行 Bud scar 染色分析其年齡差距。由於細胞的表面積有限且在顯微鏡下有半面是看不到的，所以老細胞最多只能看到 8 個 Bud scar。計算兩菌液細胞的 Bud scar，發現抽老細胞實驗確實能將老細胞與年輕細胞分離開來，老細胞 Bud scar 的平均數為 5.78(標準差 1.5)；年輕細胞的 Bud scar 平均數為 1.56(標準差 1.6)，可見老細胞菌液的年齡較年輕細胞大。但此方法仍無法確定老細胞的實際年齡，因此，直接測量其 RLS 發現其中位數為 6 代，且分布符合常態分佈。

利用抽老細胞實驗所得的老細胞菌液進行 old  $\times$  young zygote 的 RLS 實驗 old  $\times$  young zygote 的 RLS 分部高峰在 12-14 代區間為親代老  $\alpha$  cell (3-5 代)和年輕  $\alpha$  cell (可存活 21-23 代)分部高峰的算術平均數，從 old  $\times$  young zygote 和 young  $\times$

young zygote 的壽命發現，老單倍體細胞所形成的合子的壽命確實較短，而其壽命接近單倍體親代年紀的算術平均數，且 old × young zygote 對兩親代的 P value 都呈現顯著差異，可能是老化因子濃度的稀釋造成的，當老細胞與 virgin cell 融合在一起之後，稀釋作用導致合子的壽命介於兩者之間。然而究竟細胞質和細胞核哪一個影響較大呢？老細胞的體積比年輕細胞還大，或許是 old × young zygote 的 RLS 略低於 13 代的原因；但也不排除細胞核內基因體老化所造成的影響，其背後作用的機制，尚待進一步探討。old × young zygote 的 F1 子代壽命也有降低的情形，顯示其年紀受到其親代的拖累，令人懷疑不對稱分裂 (Asymmetric Segregation) 的機制有可能因為壽命增加而效率降低，無法完全避免子代的 RLS 受到親代老化的影響。

對 old × young zygote 及其 F1 子代的 RLS 進行二維陣列分析發現 old × young zygote 的壽命與其 F1 子代壽命的關係甚小。而 young × young zygote 與其 F1 子代的 RLS 呈現低度相關，顯示親代的年齡與子代壽命沒有強烈的關係。

實驗並未發現細胞經有性生殖後有返老還童的現象，老化在 *Saccharomyces cerevisiae* 不像是顯性遺傳 (dominance) 而像是不完全顯性 (incomplete dominance)，因為在 old × young zygote 的年齡與 old a cell 不相仿，反而比較接近中間型，有性生殖無法避免親代老化對合子分裂次數的影響。而 old × young zygote 和 young × young zygote 與其 F1 子代都呈現低度相關，且兩者的 RLS 相似，顯示老化對 F1 子代的影響甚小。

## 伍、結論

1. *Saccharomyces cerevisiae* 雙倍體 RLS 在單倍體 a cell 和  $\alpha$  cell 的 RLS 間。
2. Old × young zygote 較 young × young zygote 老，且其 RLS 接近單倍

體親代 RLS 的算術平均數。單倍體親代的老化會使合子的分裂次數下降，有性生殖會稀釋親代的老化程度。

3. 雖 old × young zygote 的壽命較 young × young zygote 短，但其 F1 子代的 RLS 無顯著差異。
4. Young × young zygote 與其 F1 子代的 RLS 無明顯關聯。
5. Old × young zygote 與其 F1 子代的 RLS 無明顯關聯。

## 陸、未來展望與應用

未來將探討內在機制的作用。使用 Hsp-GFP 標記細胞質中蛋白質凝聚的形態，觀察有性生殖後，此老化現象是否會遺傳給合子。

從老年單倍體細胞和年輕單倍體細胞經有性生殖後合子的分裂次數推測人類的生殖細胞的老化也可能造成受精卵老化。在醫學上，老年人容易生出具有先天疾病的小孩，除了減數分裂發生錯誤外，精卵細胞中的老化因子在受精之後對於受精卵有多少程度的影響，透過酵母菌的有性生殖作為研究單倍體親代老化因子在有性生殖過程中的改變，有助於了解此機制。

## 柒、參考資料

1. Elçin Ünal, et al.2011. Gametogenesis Eliminates Age-Induced Cellular Damage and Resets Life Span in Yeast. *Science* 332:1554-1557
2. Kristan K. Steffen, et al.2009. Measuring Replicative Life Span in the Budding Yeast. *JoVE*
3. Matt Kaerberlein, et al.2007. Recent Developments in Yeast Aging. *PLOS*

4. Murakami C & Kaerberlein M. 2009 Quantifying yeast chronological life span by outgrowth of aged cells. *JoVE*
5. Sung Sik Lee, et al. 2011. Whole lifespan microscopic observation of budding yeast aging through a microfluidic dissection platform. *PNAS*

## 評語

1. 本研究酵母菌單倍體親代 RLS 年齡對有性生殖後二倍體子代的影響，結果有趣，實驗設計也能回答要問的研究問題。
2. 實驗研究數據的呈現要有平均值±標準差，才能符合科學數據。