

2015 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050012

參展科別 動物學

作品名稱 Netrin 和 Frazzled 蛋白影響果蠅視網膜基
底膠細胞發育的相關研究

得獎獎項 大會獎：三等獎

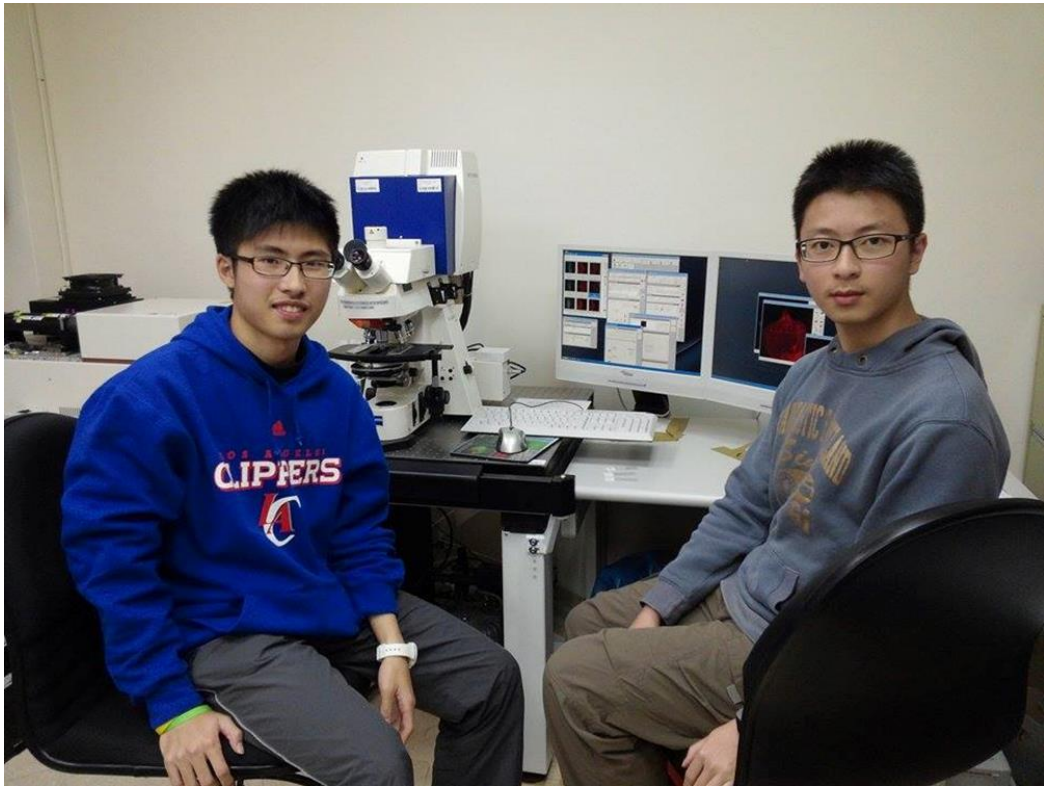
就讀學校 臺北市立建國高級中學

指導教師 孫以瀚、劉玉山

作者姓名 郭品言、劉奕辰

關鍵字 視網膜基底膠細胞(Retinal Basal Glia, RBG)、
Frazzled、Netrin

作者簡介



(左：郭品言，右：劉奕辰)

郭品言：

對於一個高中生而言，是何其有幸能進入中研院的實驗室，享受沉浸在實驗中的氛圍，為一份研究單純的努力著。身為科學班的學生，實驗研究一直都是我的熱愛，在一般的高中課程以外，能多接觸專業的知識，實驗的技巧，都豐富了我的每個現在。也感謝台灣國際科展給予的機會，讓我能把這份用熱情灌溉的研究分享出去。

劉奕辰：

憑著一股對科學實驗的熱忱，剛考上建中科學班的我，有幸能進入中研院生命科學人才培育計畫，得以接觸從未見過的實驗器材，做自己喜愛的實驗。自那時起，每次踏入實驗室的大門，都是新的驚奇的開始，也一次次加深我對實驗的熱愛。很高興能參加這次台灣國際科展，讓我大開眼界，學習更多科學新知，並觀摩更多出色的科展作品。

摘要

NetrinA 和 NetrinB 受質(ligand)會與 Unc-5 及 Frazzled(Fra)膜蛋白受體(receptor)結合，並在發育過程中參與神經與神經膠細胞的交互作用。根據前人的研究，*Unc-5* 與 *Tincar* 基因會表現在果蠅眼碟(eye disc)的視網膜基底膠細胞(Retinal Basal Glia, RBG)，神經膠細胞在發育過程中會經歷增殖(proliferation)、向感光細胞(photoreceptor)軸突方向移動(migration)、分化成 wrapping glia(differentiation)，並影響感光細胞軸突延長、生長的發育(projection)。我們利用果蠅的 GAL4/UAS 系統及 RNAi 技術，在 RBG 抑制 *Tincar*、*Unc-5* 基因。再利用免疫染色法，觀察神經膠細胞與感光細胞的發育過程。我們發現無論是用 RNAi 抑制 *Tincar*、*Unc-5* 及其受質 *NetrinA* 和 *NetrinB*，或觀察 *NetrinA* 及 *NetrinB* 個別缺失的突變，均無發現 RBG 數量和分化，以及感光細胞軸突發育上的改變。然而，*netrinA* 及 *netrinB* 共同缺失的突變(double mutants)或 *Frazzled* 的突變的 RBG 除了向感光細胞軸突方向移動，還發現異常地向沿著 Bowig's nerve 移動。推測 NetrinA/NetrinB-Frazzled 交互作用會影響 RBG 的移動，且 NetrinA 和 NetrinB 具有功能上的重複性(functional redundancy)。*Frazzled* 已知會表現在眼碟的感光細胞，之後我們會進一步釐清 NetrinA 和 NetrinB 為 RBG 或其他細胞釋放，及是否 *Unc-5* 亦在 RBG 移動扮演重要功能。

Abstract

NetrinA and NetrinB ligands can bind to Unc-5 and Frazzled receptors, and they are involved in the interaction between neurons and glial cells during embryonic central nervous system development. Our preliminary studies showed *Unc-5* and *Tincar* genes are expressed in Retinal Basal Glia (RBG) in *Drosophila* eye disc. RBG cells undergo proliferation, migration along photoreceptor axon and differentiation into wrapping glia during the photoreceptor development and also guide the photoreceptor projection. Here, we use GAL4/UAS and RNAi strategies to inhibit *Tincar* and *Unc-5* in RBG to observe the functions in the development of RBG and photoreceptor. Our results show glial cells and photoreceptor axon did not have any developmental defects neither in knock-down of *Tincar*, *Unc-5*, *NetrinA*, and *NetrinB*, nor in *NetrinA* and *NetrinB* mutants. However, RBG shows a mistargeting overmigration along Bowig's nerve in *NetrinA* *NetrinB* double mutant or *Frazzled* mutant. It indicates NetrinA/NetrinB-Frazzled interaction can orientate RBG's migration, and NetrinA and NetrinB show functional redundancy. *Frazzled* have been reported to be expressed in the photoreceptor in eye disc, we will further examine the expression pattern of NetrinA and NetrinB and the function of Unc-5 in RBG migration.

壹、研究動機與目的

在前人的研究中，我們發現 *Tincar* 表現在地毯神經膠細胞(carpet glia ; CG)中，*Unc-5* 表現在所有神經膠細胞(Glial cell)中，而 *Fra* 表現在感光細胞中。*NetrinA* 和 *NetrinB* 蛋白則為 *Unc-5* 蛋白及 *Fra* 蛋白的受質。但仍不確定 *NetrinA* 和 *NetrinB* 蛋白是由 RBG 或其他細胞所釋放。

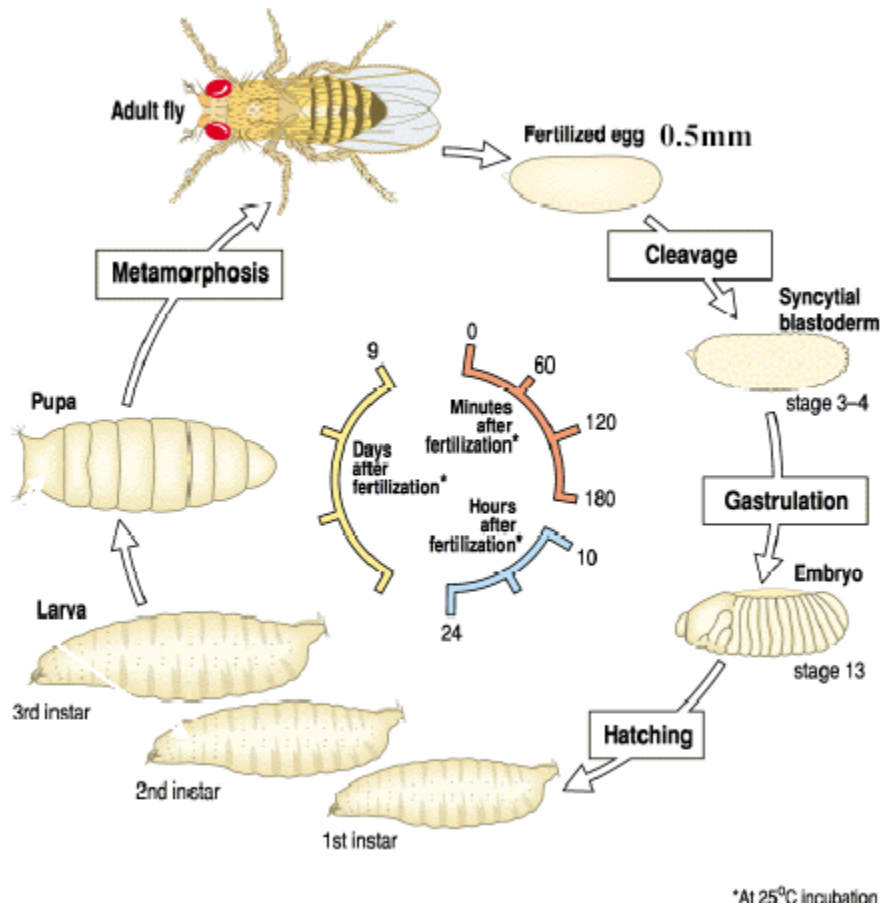
雖然果蠅的神經細胞和哺乳動物的解剖學分布不完全相同，但在生長、發育等過程則有許多相似之處，這些共同點使得果蠅可以被當作研究神經細胞發育等機制的重要工具。此外，果蠅和人類的基因都已被解碼，而人類的致病基因中，果蠅擁有大部分的同源基因，故約有百分之七十的人類神經相關疾病在果蠅身上都可以找到類似甚至相同的病徵。因此，藉由研究果蠅，我們將可以對神經的運作有更深入的了解。

我們的研究目的是，找出 *Tincar* 蛋白、*Unc-5* 蛋白、*Fra* 蛋白及 *NetrinA*、*NetrinB* 蛋白與果蠅的 RBG 與感光細胞之發育的關係，了解 *Unc-5* 蛋白及 *Fra* 蛋白(受體)與 *NetrinA*、*NetrinB* 蛋白(受質)的關係。

貳、研究背景

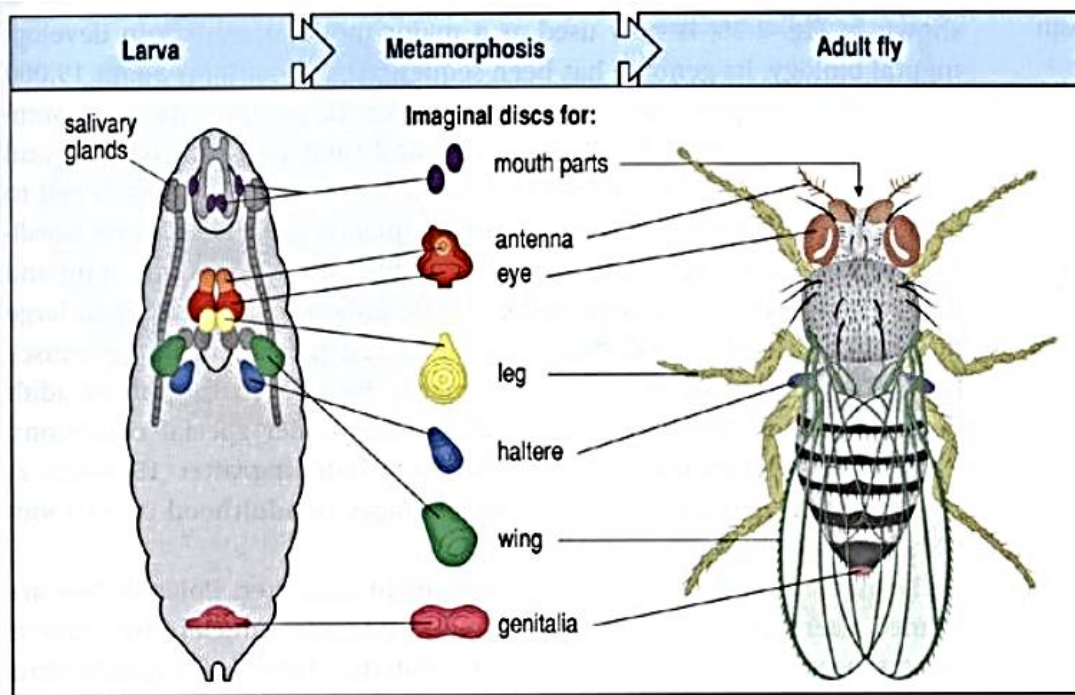
一、果蠅(*Drosophila melanogaster*)

果蠅(*Drosophila melanogaster*)是適合進行生物實驗的一種模式生物(圖一)。其體積小、生活史短、易於飼養，有許多突變或基因轉殖等基因工具之品系，且只有四對染色體，單純而容易進行研究。



(圖一)果蠅生活史

果蠅於室溫(25°C)下的生命週期大約為十天。卵經一天可孵化為一齡幼蟲(larva)，一齡幼蟲約經四天可形成白蛹(white pupa)，後再形成黑蛹(black pupa)，整個蛹期約五天，五天後羽化為成蟲。本研究中所觀察的部位為三齡晚期幼蟲的眼碟(eye disc)(圖二)，即未來會發育成果蠅眼睛的部位。



(圖二)果蠅幼蟲與成蟲部位對照

(一) 處女蠅(virgin)

果蠅在室溫（25°C）下羽化，約 8~12 個小時後性成熟，在此之前收集未受孕的雌果蠅稱為處女蠅。因雌蠅在交配過後會將精子儲藏起來，若將雄果蠅與非處女蠅的雌蠅交配，其子代可能並非擁有特定基因型。意即若使特定基因型的雄果蠅和處女蠅交配，就可以不斷產生擁有特定基因型的子代。

(二) 特殊外表型基因(marker)

Marker 是容易由外觀上區別的顯性基因突變(Dominant mutant)，如捲翅(*CyO*)、短身(*Tb*)、粗短背毛(*Sb*)等，藉由辨認這些 marker 即可判斷果蠅雜交後，各子代的基因型。

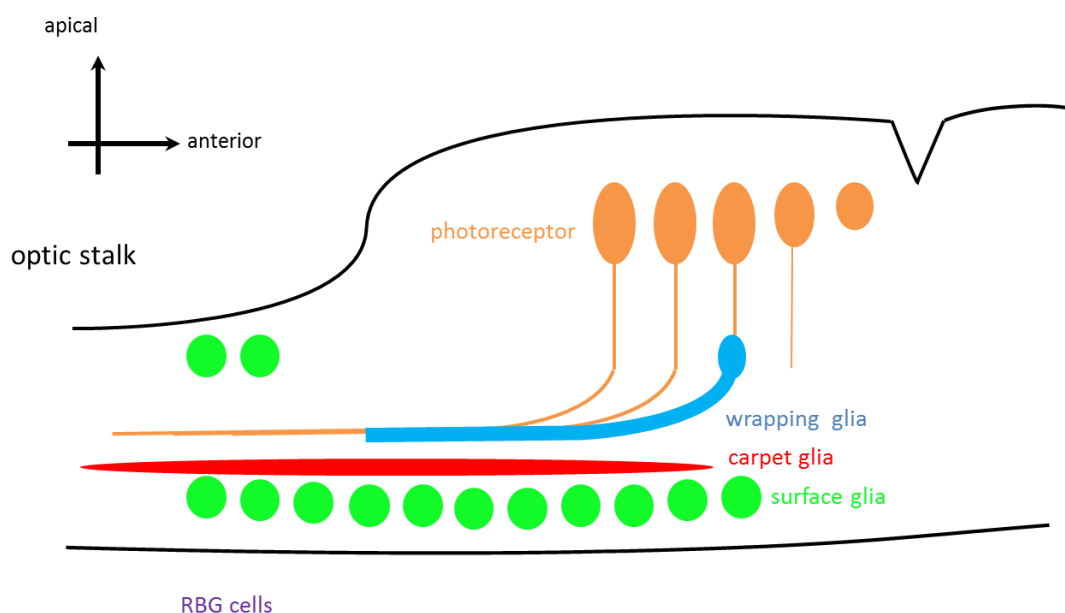
(三) 平衡子(balancer)

平衡子是染色體上一種特殊的基因，在欲保留基因同型會致死或發育不良的情況下(如 mutant 或 RNAi)，用以維持欲保留基因的基因頻率。有三項特點：同型致死、不發生基因重組、帶有 marker 易於辨認。當兩條帶有此平衡子的染色體同時存

在果蠅體內時，將導致個體的死亡 (homozygous lethal)。如此可以確保在繁殖多代以後，平衡子的基因頻率不會升高。有容易辨認的 marker，則可以由外觀上分辨子代幼蟲或成蟲的染色體帶有平衡子還是欲保留的基因。而由於平衡子上有許多倒位 (inversion)，和另一條染色體不會產生基因重組，如此可確保另一條染色體上的欲保留基因不會因代代繁衍而遺失，藉此保留住想要的基因，例如：*TM6B* 基因和 *FM7* 基因。

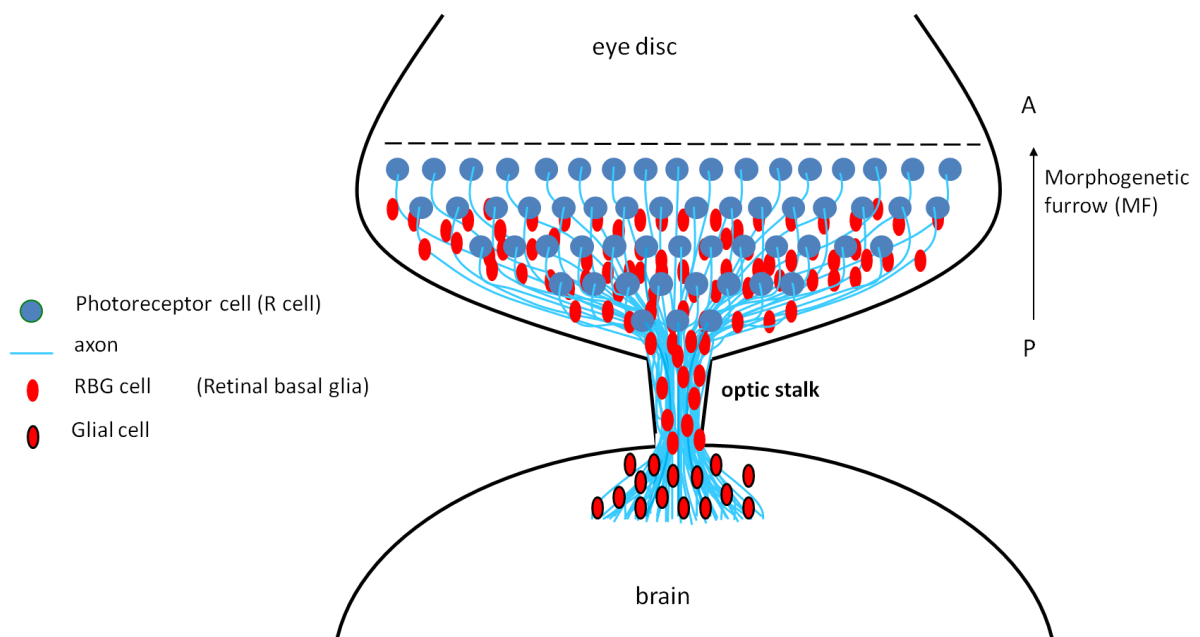
二、視網膜基底膠細胞(Retinal Basal Glial Cells ; RBG)

RBG 是一群特殊的神經膠細胞，可與感光細胞進行交互作用而維持視覺系統的正常功能。神經膠細胞可協助控制神經分化的分佈、引導神經的生長，在神經絕緣、提供養分也扮演了重要的功能。已知在果蠅三齡幼蟲時期主要有三大類的神經膠細胞，分別為表面神經膠細胞 (surface glia ; SG)、包裹神經膠細胞(wrapping glia ; WG)以及地毯神經膠細胞(carpet glia ; CG)。根據文獻資料顯示，RBG 會由果蠅腦部(brain)經視柄(optic stalk)向眼碟增殖。



(圖三)三種 RBG(SG, CG, WG)分布

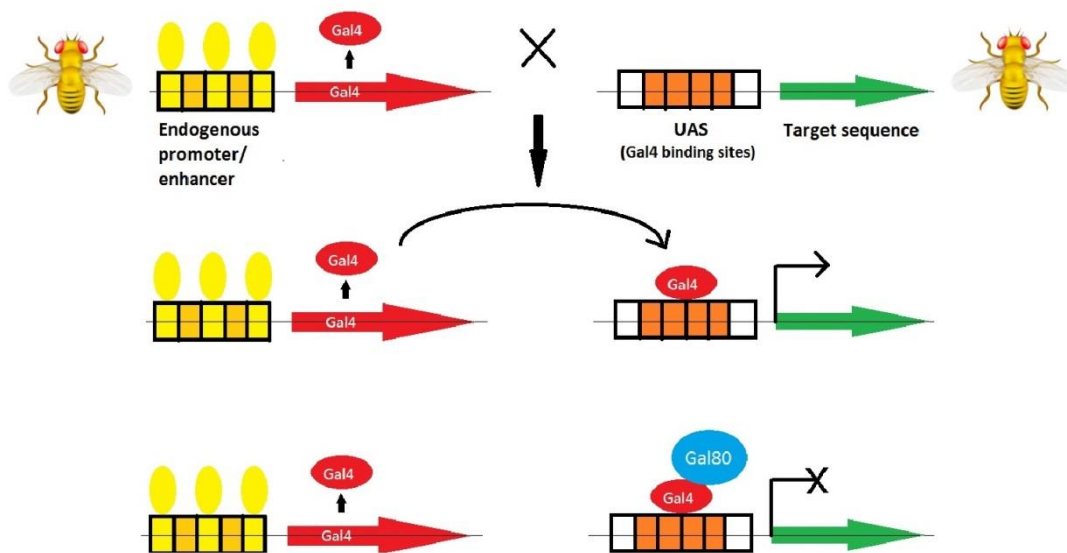
表面神經膠細胞(SG)會沿著感光細胞生長的方向增殖，而地毯神經膠細胞(CG)會阻隔表面神經膠細胞與感光細胞的軸突接觸，當表面神經膠細胞增殖到一定量之後，接觸到感光細胞，則會分化為包裹神經膠細胞(WG)，包覆在感光細胞軸突之外圍。



(圖四)RBG 與感光細胞發育方向

當三齡早期幼蟲的感光細胞在眼碟(eye disc)表面開始分化形成 morphogenetic furrow(MF)時，神經膠細胞(glial cells)從視柄(optic stalk)移動進入眼碟(eye disc)。在發育過程中，神經膠細胞的數目隨著感光細胞的分化增加而增加，而當感光細胞往後伸出軸突，軸突必須藉由神經膠細胞的引導才可以進入到視柄(optic stalk)，並與腦的視覺區形成連結。

三、 GAL4/UAS system



(圖五) GAL4/UAS system 作用原理

此系統的原理，是利用基因轉殖技術，將 *GAL4* 基因轉殖入一個基因的強化子與啟動子之後，而那個基因會在特定部位表現，連帶使的那個部位可以表現 *GAL4* 基因，並轉錄轉譯

出 GAL4 蛋白。本研究使用在視網膜基底膠細胞表現的 *Repo* 基因。而 GAL4 蛋白會與 UAS(GAL4 binding site)結合，並轉錄轉譯出 UAS 的下游基因(target gene)。因此在實驗中，親代果蠅一方會帶有啟動子及 *GAL4* 基因，另一方則帶有 UAS 及目標基因。交配過後，其子代中 GAL4 蛋白會與 UAS 基因結合，使下游基因表現。

GAL80 蛋白會抑制 GAL4 蛋白的結合能力，高溫下 GAL80 作用會降低，因此實驗中將果蠅置於 29°C 恆溫箱中生長。

四、相關基因簡介

(一) *Tincar* : *Tincar* 是一個在果蠅胚胎時期成心肌細胞(cardioblast)表現的跨膜蛋白(transmembrane protein)。亦發現在三齡幼蟲的眼碟(eye disc)表現且具有促進感光細胞分化的功能。我們發現 *tincar-GAL4* 在地毯神經膠細胞(carpet glia)中表現，但仍不知 *Tincar* 在 RBG 中所扮演的功能。

(二)*Uncordinated-5(Unc-5)* : *Unc-5-GAL4* 會在 retinal basal glia (RBG)表現。*Unc-5* 是膜蛋白受體，可與外來的 *NetrinA* 或 *NetrinB* 受質結合，來引導 *Unc-5* 所表現的神經軸突(axon)的延伸方向。其中 *NetrinA, B* 與 *Unc-5* 的結合造成為一種抑制性的引導反應，會導致早期胚胎中樞神經系統(central nervous system)軸突的延伸方向遠離 *Unc-5* 所表現位置。此外，*Unc-5* 蛋白亦與神經膠細胞之移動(migration)有關。

(三)*Frazzled(Fra)* : *Fra* 會在感光細胞表現，是一種膜蛋白受體，可與外來的 *NetrinA* 或 *NetrinB* 受質結合，來引導 *Fra* 所表現的神經軸突的延伸方向。其中 *NetrinA, B* 與 *Fra* 的結合造成為一種促進性的引導反應，會導致早期胚胎中樞神經系統(central nervous system)軸突的延伸方向遠離 *Fra* 所表現位置。

(四)*NetrinA*、*NetrinB* : *NetrinA* 和 *NetrinB* 是 *Unc-5* 和 *Fra* 膜蛋白受體的受質，可以引導 *Unc-5/Fra* 所表現的神經軸突以及 *Fra* 所表現的樹突(dendrite)的延伸，亦可引導神經膠細胞(如：longitudinal glia；LG, embryonic peripheral glia；ePG)的移動(migration)。

參、研究方法

一、收處女蠅(virgin)

將帶有所研究基因(通常是帶有目標基因)的果蠅重新 transfer 至新管中，置於室溫下約

10 天，在羽化後 7~8 小時內收取的雌果蠅即為處女蠅，若置於 17°C 恆溫箱中，則 18 小時以內收取的果蠅皆為處女蠅。

二、 雜交

收集一定數量之處女蠅後與帶有 *GAL4* 基因的雄蠅進行雜交，一管中的雄雌比約 1:3 左右。由於本實驗的雄蠅帶有 *GAL80* 基因，因此雜交後需置於 29°C 恆溫箱中生長，以抑制 *GAL80* 蛋白之作用。

雜交約 7 天後，管內活動力較弱，但還未形成蛹的即為三齡晚期幼蟲。此時需確認取出的幼蟲不為短身，因本實驗中短身幼蟲帶有 *TM6B* 平衡子(balancer)，而非 *GAL4* 基因；長身的幼蟲需置於螢光解剖顯微鏡下，觀察眼睛部分是否有綠螢光蛋白(Green fluorescent protein；GFP)，確認 *GAL4/UAS system* 確實有被啟動。

三、 免疫染色法(Immunostaining)

(一)將果蠅的三齡幼蟲置於 1× PBS(phosphate-buffer-saline,pH7.4)中解剖，把分離出的組織置於 4% paraformaldehyde in PBS 固定 20~30 分鐘。

(二)用 1× PBST 沖洗三次，每次 10 分鐘。

(三)加入一抗(α -rat Elav or α -mouse Repo / 10% NGS(normal goat serum) /1×PBST, 1 : 100) 約 80~100 μ L，置於 4°C 冰箱，隔夜。

一抗種類	染色部位
α -rat Elav	感光細胞細胞核
α -mouse Repo	神經膠細胞細胞核
α -mouse Cut	包裹神經膠細胞(WG)細胞核

(四)用 1× PBST 沖洗三次，每次 10 分鐘。

(五)加入二抗(α -rat Cy5 or α -mouse Cy3 or HRP-Cy5(染感光細胞本體與軸突) /10% NGS /1×PBST, 1 : 300)約 80~100 μ L，避光，置於室溫 3 小時或 4°C 隔夜。

(六)用 1x PBST 沖洗三次，每次 10 分鐘。

(七)將組織解剖，只留下眼碟部分(eye-antenna disc)。置於載玻片上，滴加 6-8 μ L 50% 甘油(glycerol) / 1×PBS，蓋上蓋玻片，並用指甲油封邊。

(八)置於共軛焦顯微鏡下觀察感光細胞排數，以確認觀察對象是否為三齡晚期的幼蟲。
再觀察神經膠細胞數量與前緣平整度，以及感光細胞軸突的生長情形。

肆、研究過程

一、實驗一

處女蠅基因型		雄蠅基因型
<i>UAS-nls-LacZ</i>	X	<i>UAS-mCD8-GFP;</i> <i>repoGAL4,tubGAL80[ts]/TM6B</i>
<i>UAS-Tincar</i>		
<i>VDRC101175 UAS-Tincar-RNAi</i>		
<i>7723R-1 UAS-Tincar-RNAi</i>		
<i>7723R-3 UAS-Tincar-RNAi</i>		
<i>GD10208 UAS-Tincar-RNAi</i>		

一抗	α -mouse Repo 1 : 100
二抗	α -mouse Cy3, HRP-Cy5 1 : 300

二、實驗二

處女蠅基因型		雄蠅基因型
<i>UAS-nls-LacZ</i>	X	<i>UAS-mCD8-GFP;</i> <i>repoGAL4,tubGAL80[ts]/TM6B</i>
<i>8138 UAS-unc5-RNAi</i>		
<i>8937 UAS-unc5-RNAi</i>		
<i>UAS-Fra</i>		

一抗	α -mouse Repo 1 : 100
二抗	α -mouse Cy3, HRP-Cy5 1 : 300

處女蠅基因型	X	雄蠅基因型
<i>UAS-nls-LacZ</i>		<i>UAS-Dsred;GMR-GAL4</i>
<i>UAS-Fra(II)</i>		

一抗	α -mouse Repo 1 : 100
二抗	FITC, HRP-Cy5 1 : 200

處女蠅基因型	X	雄蠅基因型
<i>8813 w;G13Fra3/CyO-lacZ-nu</i>		<i>w;G13Fra4/CyO-lacZ-nu</i>
W(對照組)		

一抗	α -mouse Repo 1 : 50, α -mouse Cut 1 : 50
二抗	α -mouse Cy3, HRP-Cy5 1 : 300

三、實驗三

處女蠅基因型	X	雄蠅基因型
<i>UAS-nls-LacZ</i>		<i>UAS-mCD8-GFP;</i> <i>repoGAL4,tubGAL80[ts]/TM6B</i>
<i>31665 UAS- NetrinA-RNAi</i>		
<i>25861 UAS-NetrinB-RNAi</i>		
<i>34698 UAS-NetrinB-RNAi</i>		

一抗	α -mouse Repo 1 : 100
二抗	α -mouse Cy3, HRP-Cy5 1 : 200

處女蠅基因型	X	雄蠅基因型
<i>UAS-nls-LacZ</i>		<i>UAS-Dsred;GMR-GAL4</i>
<i>31665 UAS- NetrinA-RNAi</i>		
<i>25861 UAS-NetrinB-RNAi</i>		
<i>34698 UAS-NetrinB-RNAi</i>		

一抗	α -mouse Repo 1 : 100
二抗	α -mouse Cy3, HRP-Cy5 1 : 300

處女蠅基因型	X	雄蠅基因型
<i>NetrinA mutant/FM7,act-GFP</i>		<i>NetrinA mutant/FM7,act-GFP</i>
<i>NetrinB mutant/FM7,act-GFP</i>		<i>NetrinB mutant/FM7,act-GFP</i>
<i>NetrinAB mutant/FM7,act-GFP</i>		<i>NetrinAB mutant/FM7,act-GFP</i>
W(對照組)		

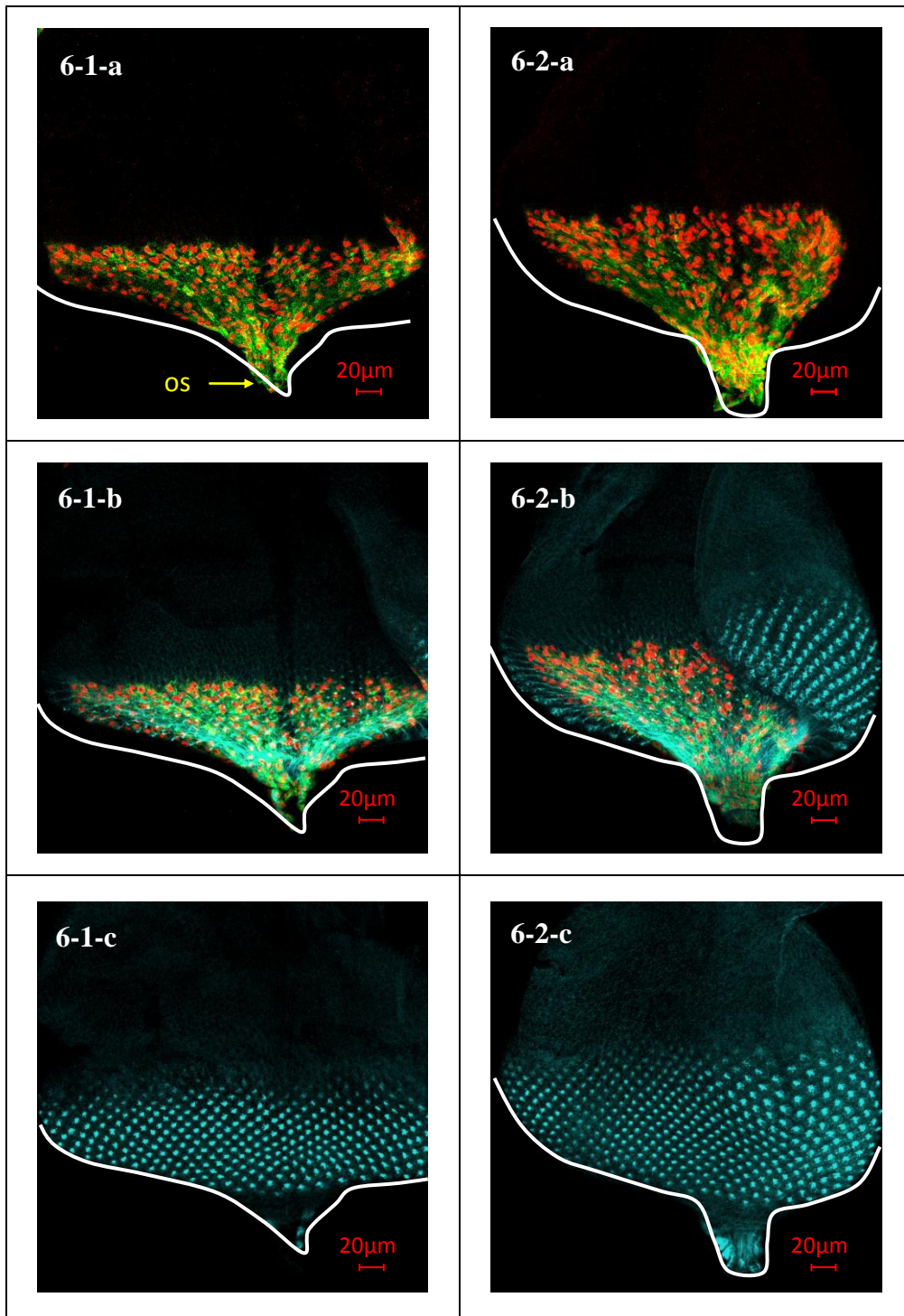
一抗	α -mouse Repo 1 : 100, α -mouse Cut 1 : 50
二抗	α -mouse Cy3, HRP-Cy5 1 : 200

伍、研究結果

一、實驗一

(一) *UAS-nls-LacZ X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* (對照組)

Disc1	Disc2
-------	-------



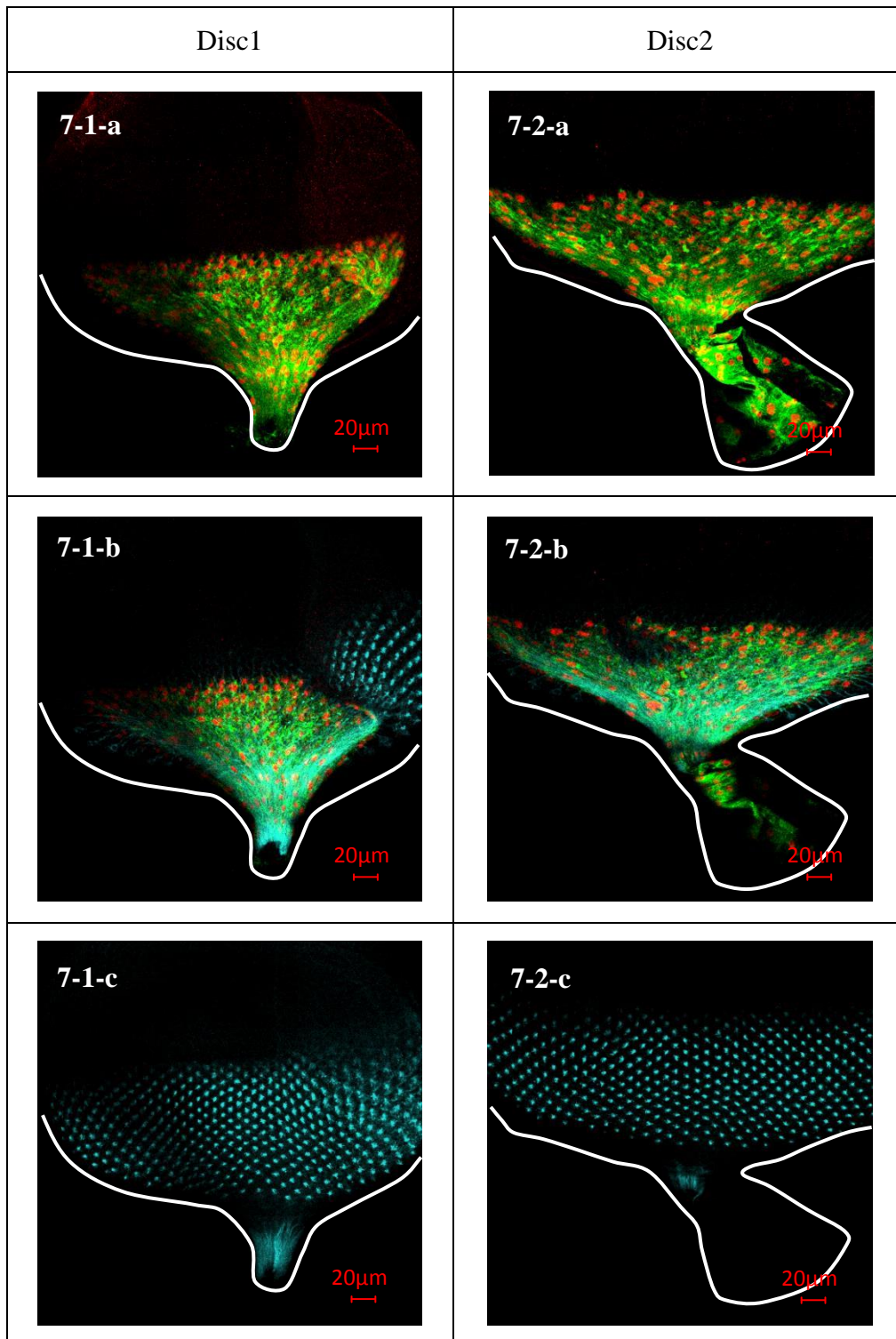
圖六、*UAS-nls-LacZ X UAS-mCD8-GFP; repoGal4*(對照組) 取三齡晚期非短身幼蟲(無 *TM6B* 基因)的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。(os : optic stalk)

6-1-a,6-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

6-1-b,6-2-b 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

6-1-c,6-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(二) *UAS-Tincar X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*



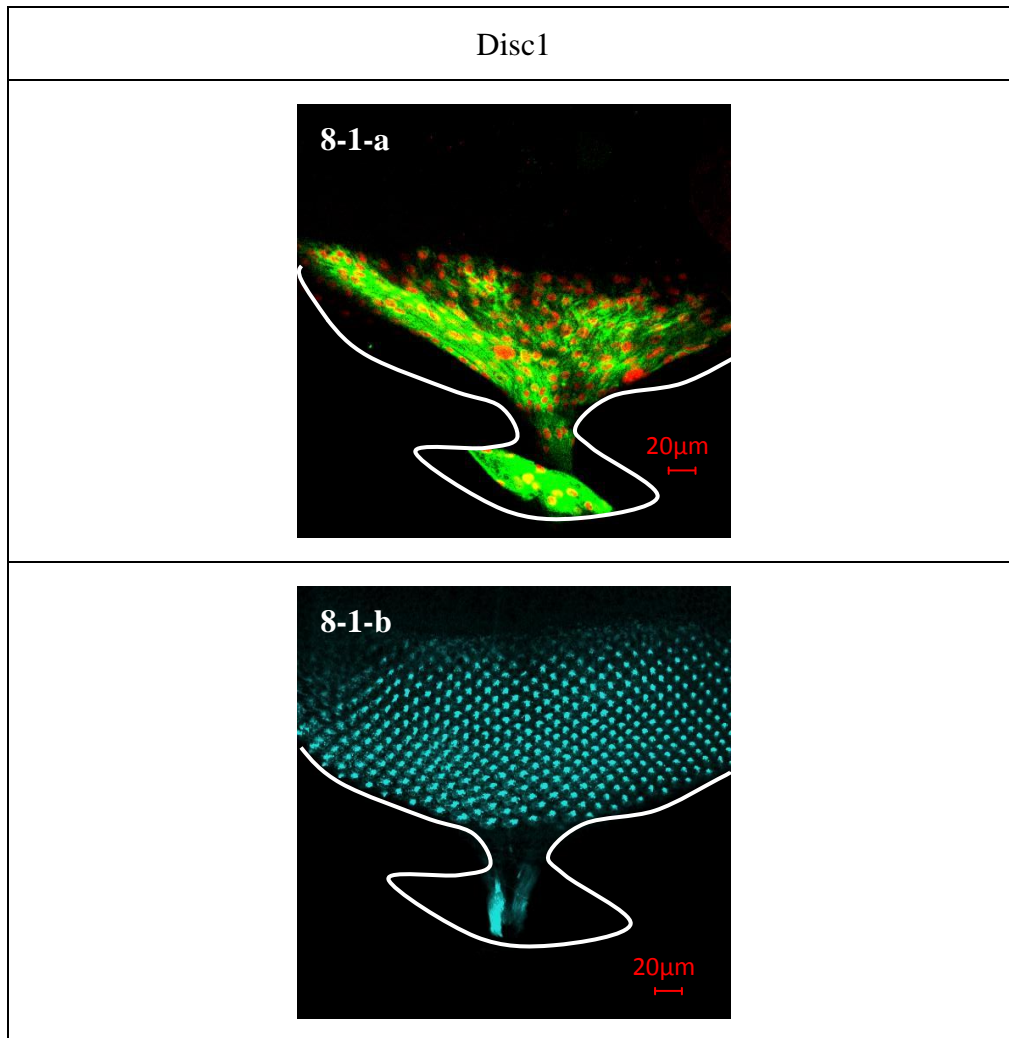
圖七、*UAS-Tincar X UAS-mCD8-GFP; repoGal4* 取三齡晚期非短身幼蟲(無 *TM6B* 基因)的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

7-1-a,7-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

7-1-b,7-2-b 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

7-1-c,7-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(三) *VDRC101175 UAS-Tincar-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

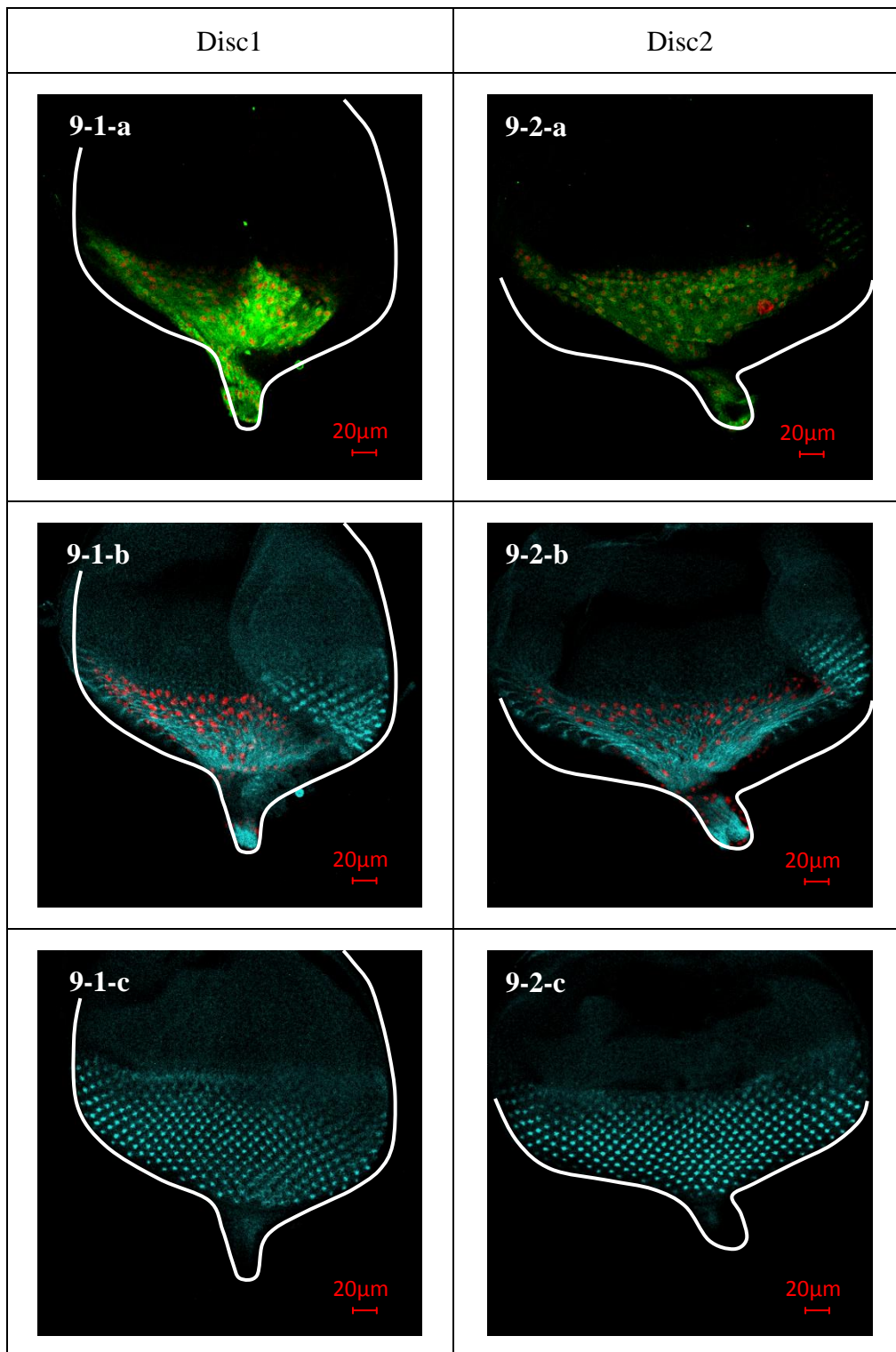


圖八、*VDRC101175 UAS-Tincar-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4* 取三齡晚期非短身幼蟲(無 *TM6B* 基因)的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

8-1-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

8-1-b 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(四) *7723R-1 UAS-Tincar-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*



圖九、7723R-1 *UAS-Tincar-RNAi* X *UAS-mCD8-GFP*; *repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* 取三齡晚期

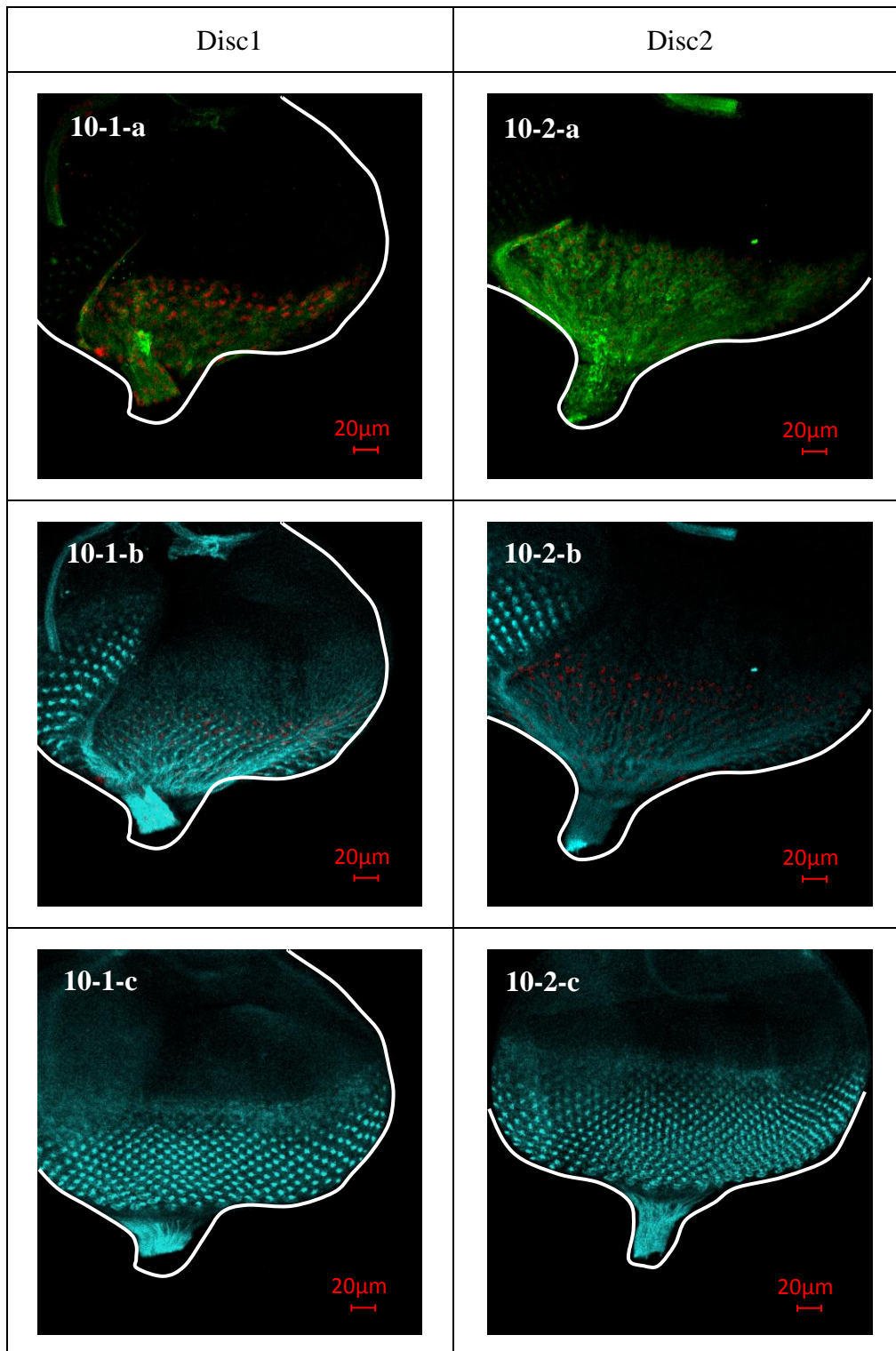
非短身幼蟲(無 *TM6B* 基因)的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

9-1-a,9-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

9-1-b,9-2-b 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

9-1-c,9-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(五) 7723R-3 *UAS-Tincar-RNAi* X *UAS-mCD8-GFP*; *repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*



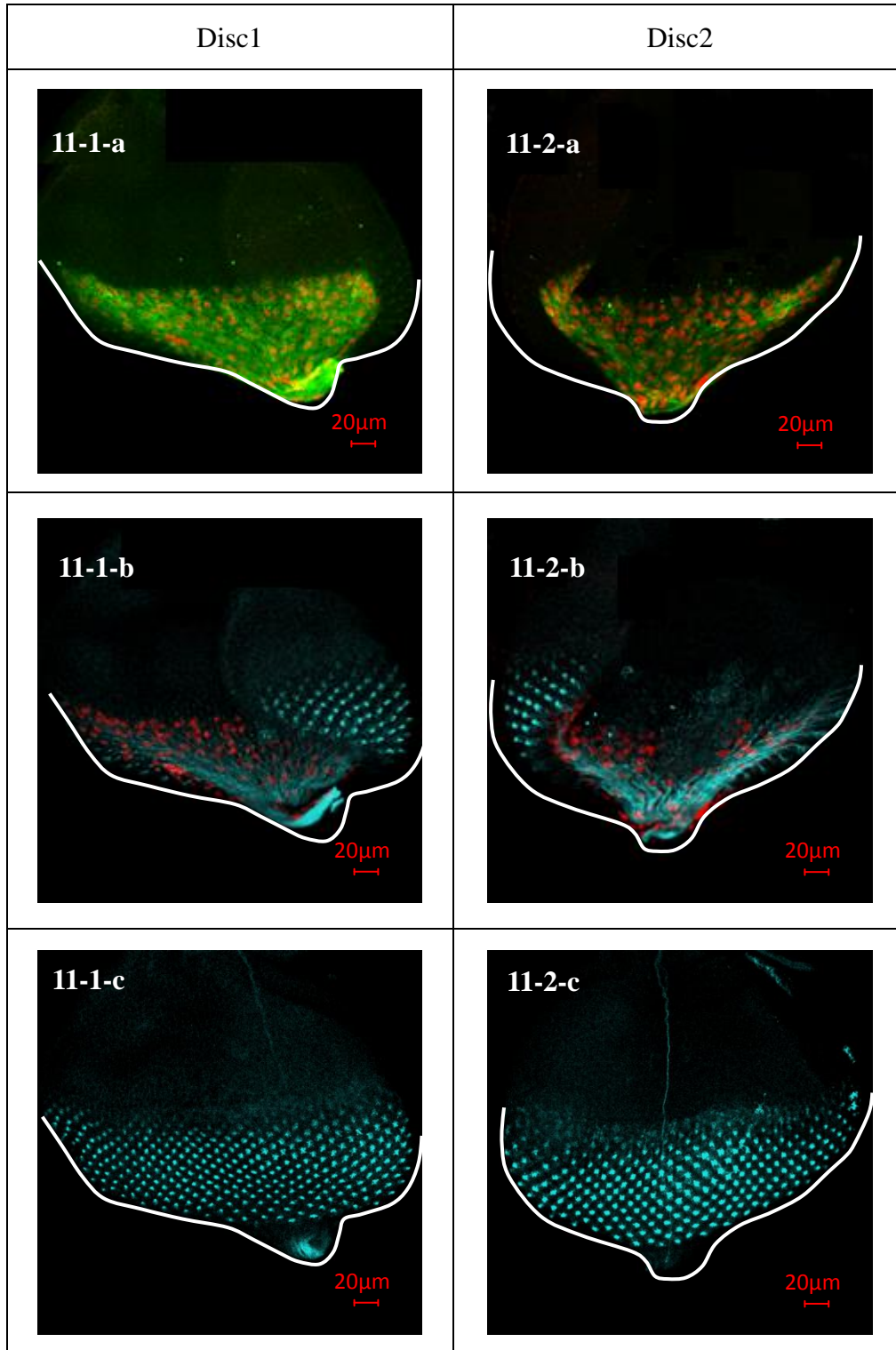
圖十、7723R-3 *UAS-Tincar-RNAi* X *UAS-mCD8-GFP*; *repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* 取三齡晚期非短身幼蟲(無 *TM6B* 基因)的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

10-1-a,10-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

10-1-b,10-2-b 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

10-1-c,10-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(六) *GD10208 UAS-Tincar-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*



圖十一、*GD10208 UAS-Tincar-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* 取三齡晚

期非短身幼蟲(無 *TM6B* 基因)的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

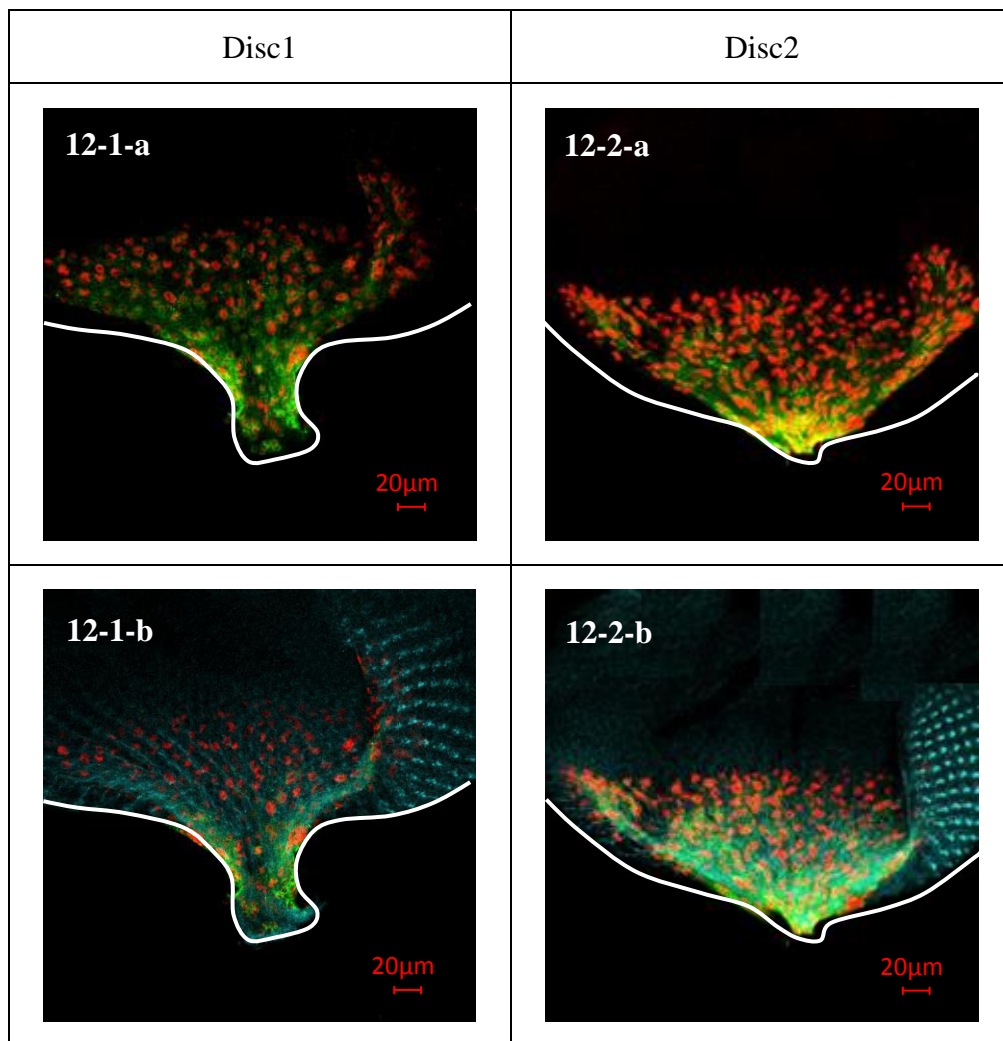
11-1-a,11-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

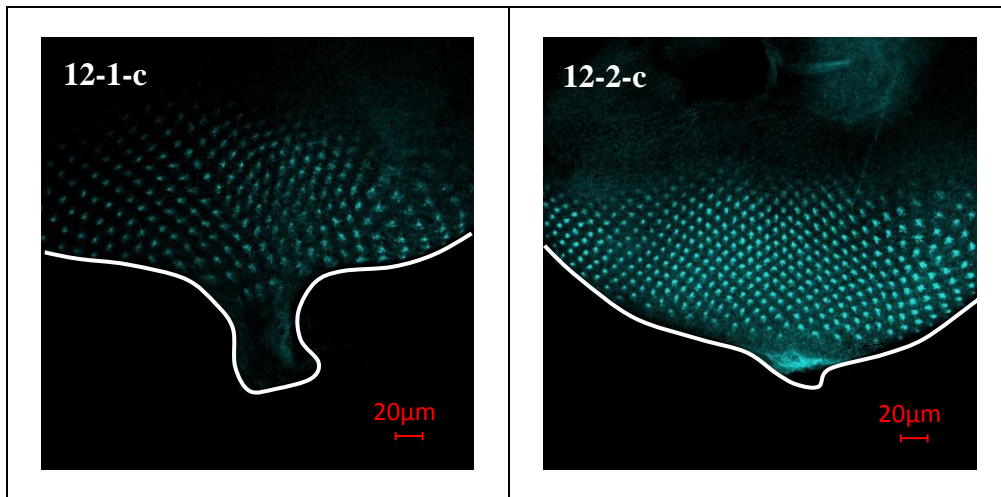
11-1-b,11-2-b 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

11-1-c,11-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

二、實驗二

(一) *UAS-nls-LacZ X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* (對照組)





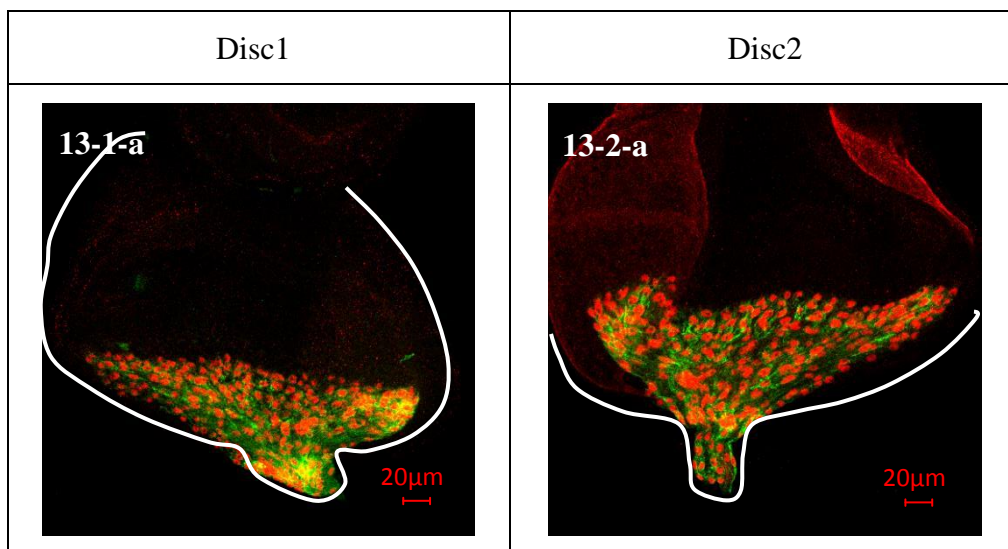
圖十二、*UAS-nls-LacZ X UAS-mCD8-GFP; repoGal4* 取三齡晚期非短身幼蟲(無 *TM6B* 基因)的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

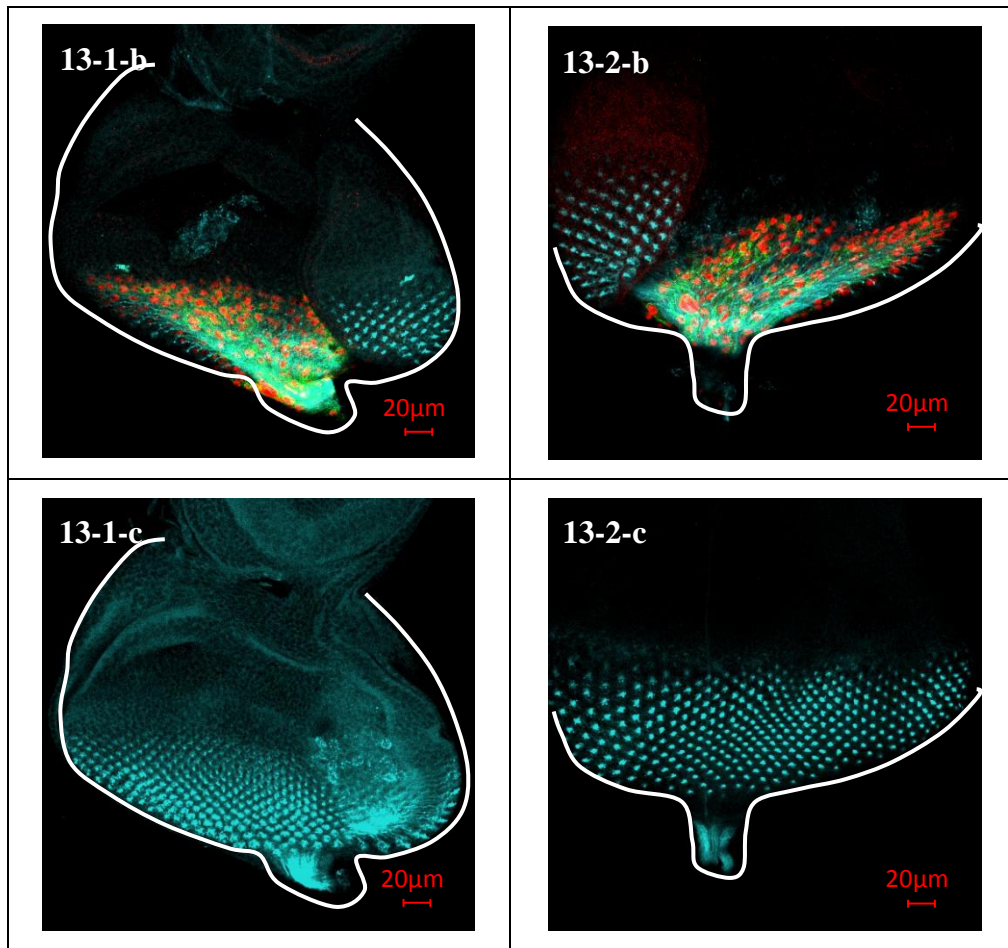
12-1-a,12-2-a 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

12-1-b,12-2-b 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

12-1-c,12-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(二) *8138 UAS-unc5-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*





圖十三、8138 *UAS-unc5-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4* 取三齡晚期非短身幼蟲(無 *TM6B* 基因)的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

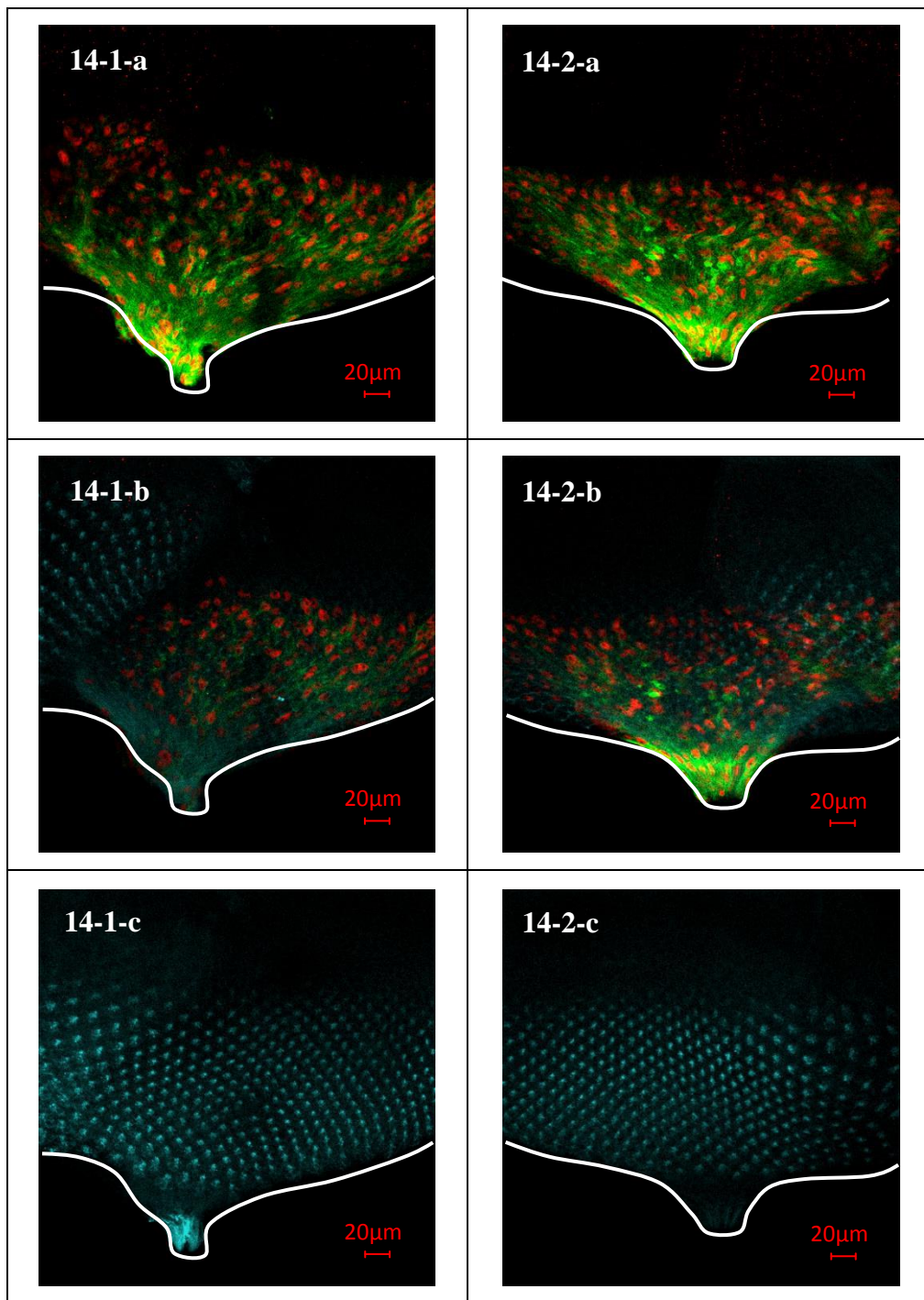
13-1-a,13-2-a 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

13-1-b,13-2-b 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

13-1-c,13-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(三)8937 *UAS-unc5-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
-------	-------



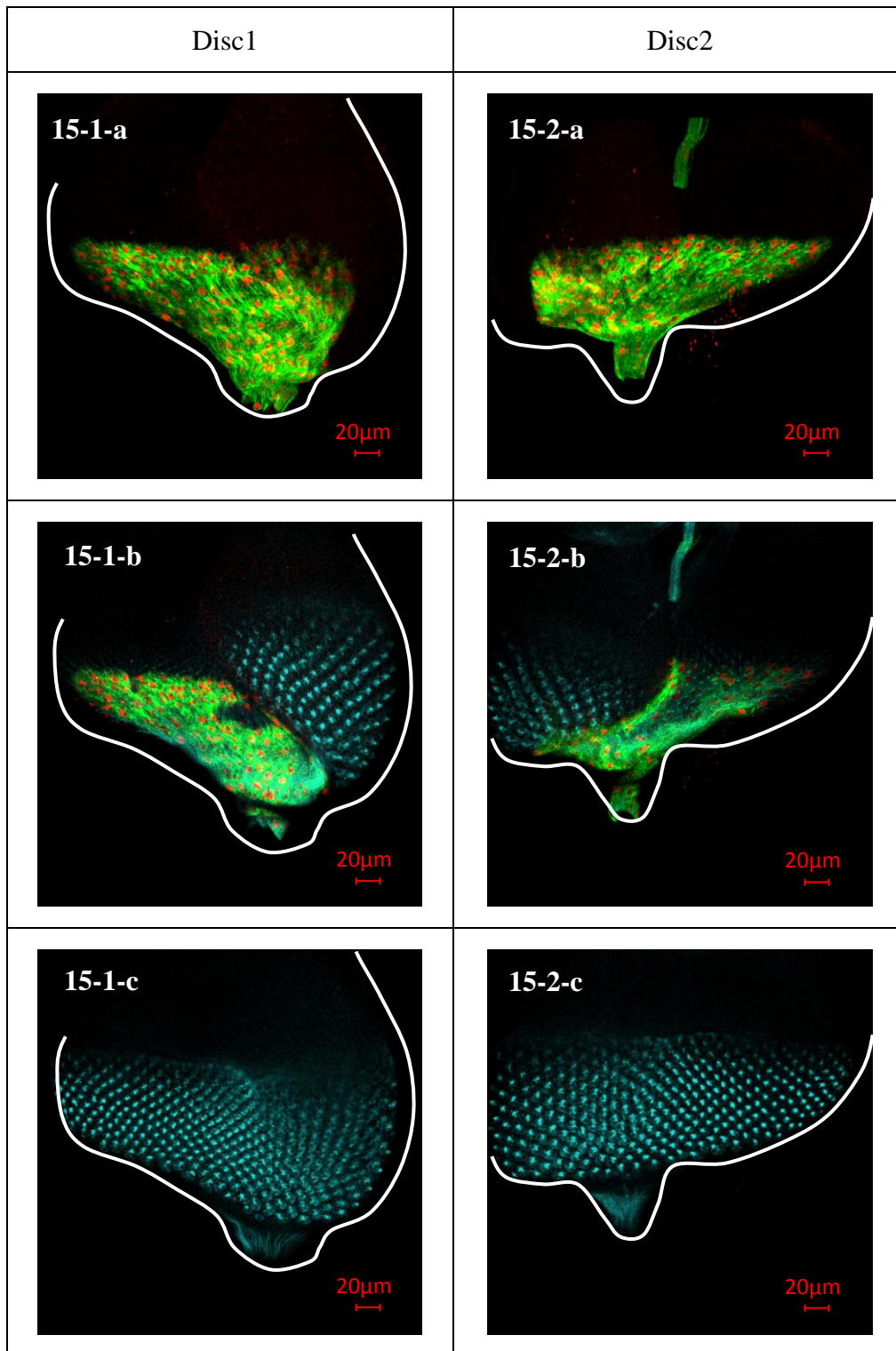
圖十四、8937 *UAS-unc5-RNAi* X *UAS-mCD8-GFP*; *repoGal4* 取三齡晚期非短身幼蟲(無 *TM6B* 基因)的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

14-1-a,14-2-a 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核,綠色(GFP):神經膠細胞本體。

14-1-b,14-2-b 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核,綠色(GFP):神經膠細胞本體,藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

14-1-c,14-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(四) *UAS-Fra X UAS-mCD8-GFP; repoGal4, tubGal80[ts]/TM6B*



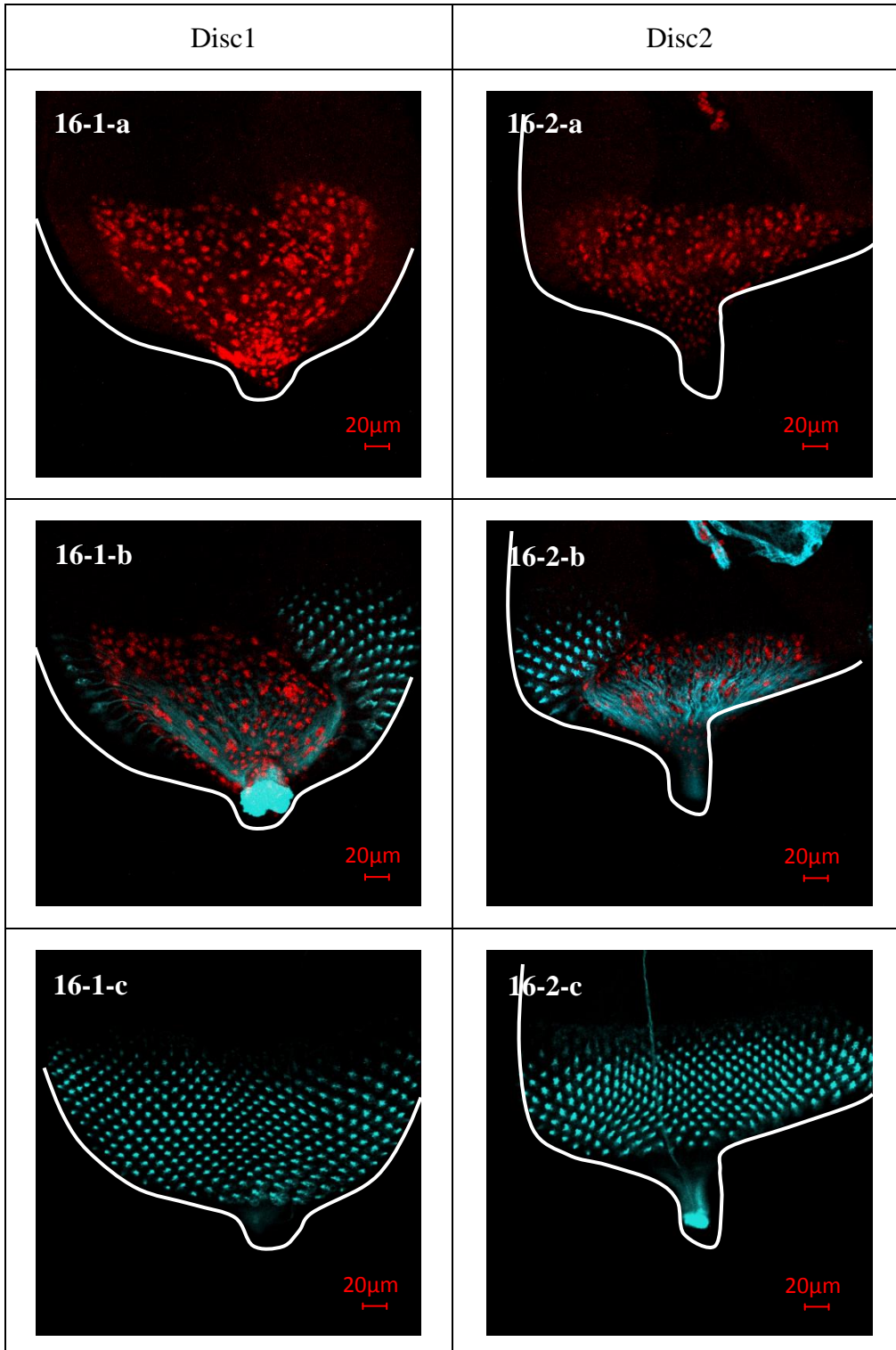
圖十五、*UAS-Fra X UAS-mCD8-GFP; repoGal4* 取三齡晚期非短身幼蟲(無 *TM6B* 基因)的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

15-1-a,15-2-a 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核,綠色(GFP):神經膠細胞本體。

15-1-b,15-2-b 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核,綠色(GFP):神經膠細胞本體,
藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

15-1-c,15-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(五) *UAS-nls-LacZ X UAS-Dsred;GMR-Gal4*(對照組)



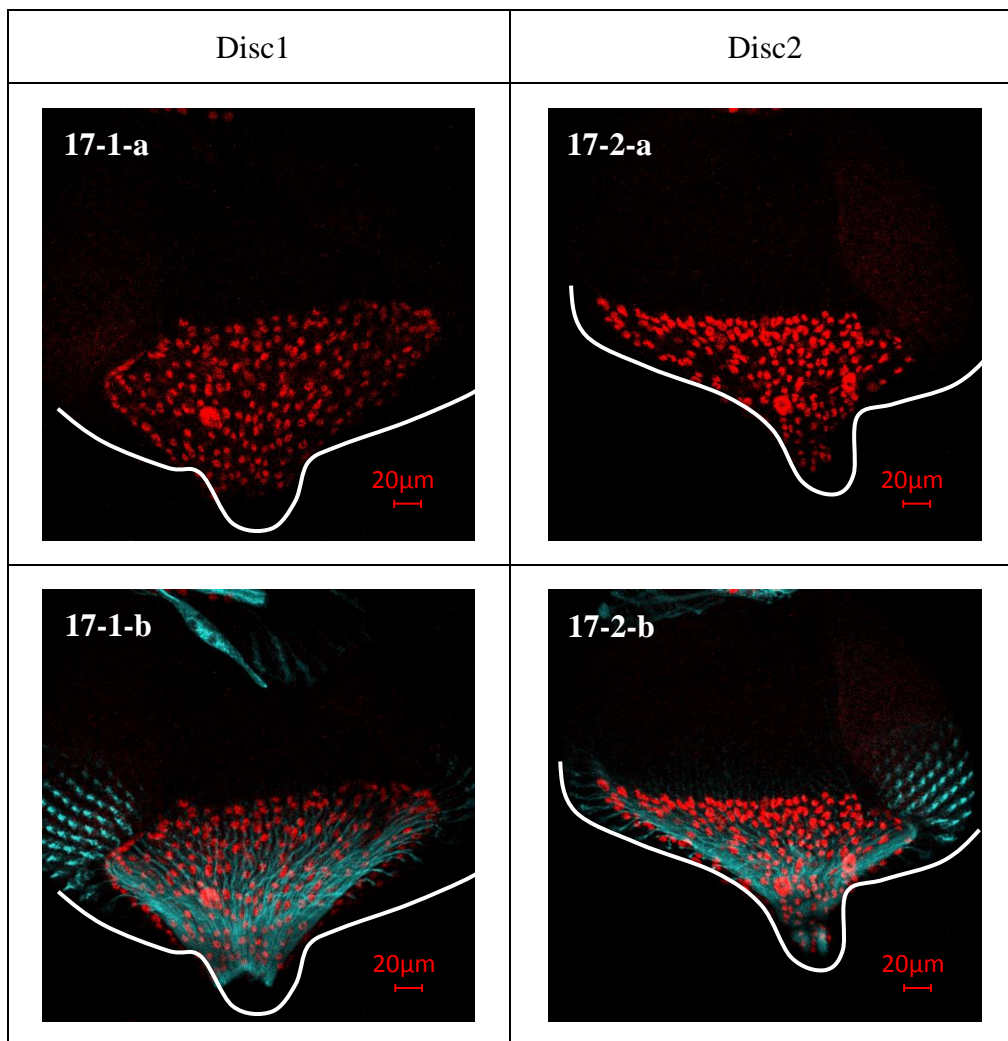
圖十六、*UAS-nls-LacZ X UAS-Dsred;GMR-Gal4*(對照組)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

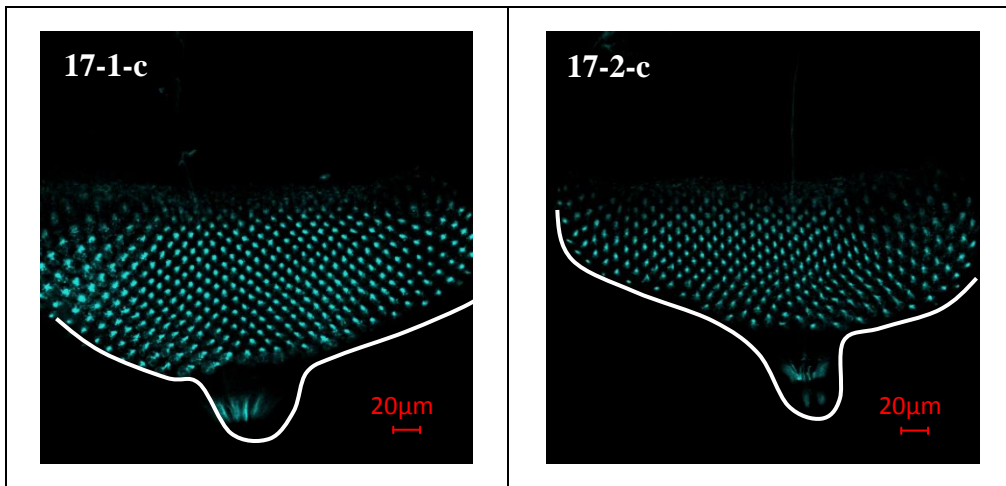
16-1-a,16-2-a 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核。

16-1-b,16-2-b 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

16-1-c,16-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(六)*UAS-Fra(II) X UAS-Dsred;GMR-Gal4*





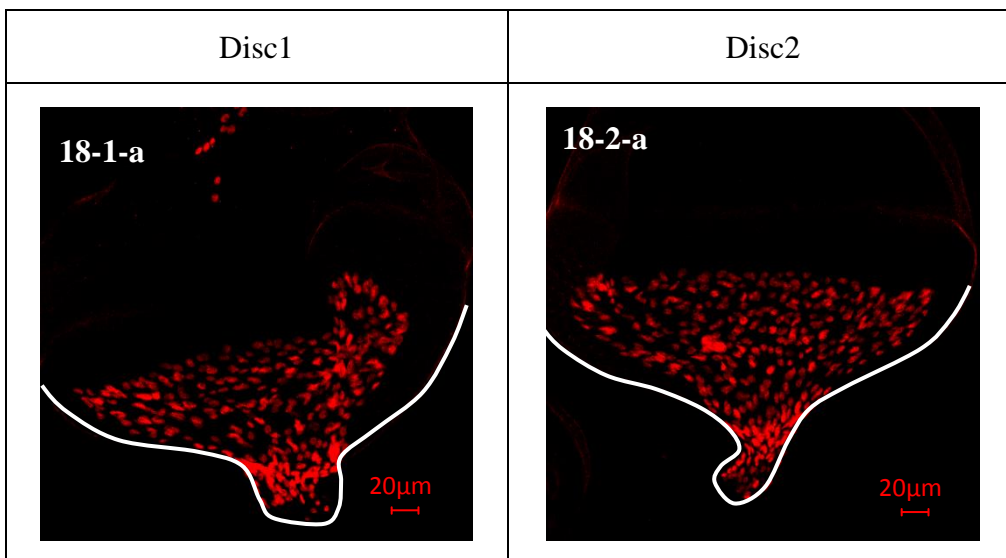
圖十七、*UAS-Fra(II) X UAS-Dsred;GMR-Gal4* 取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛
焦顯微鏡掃描圖。

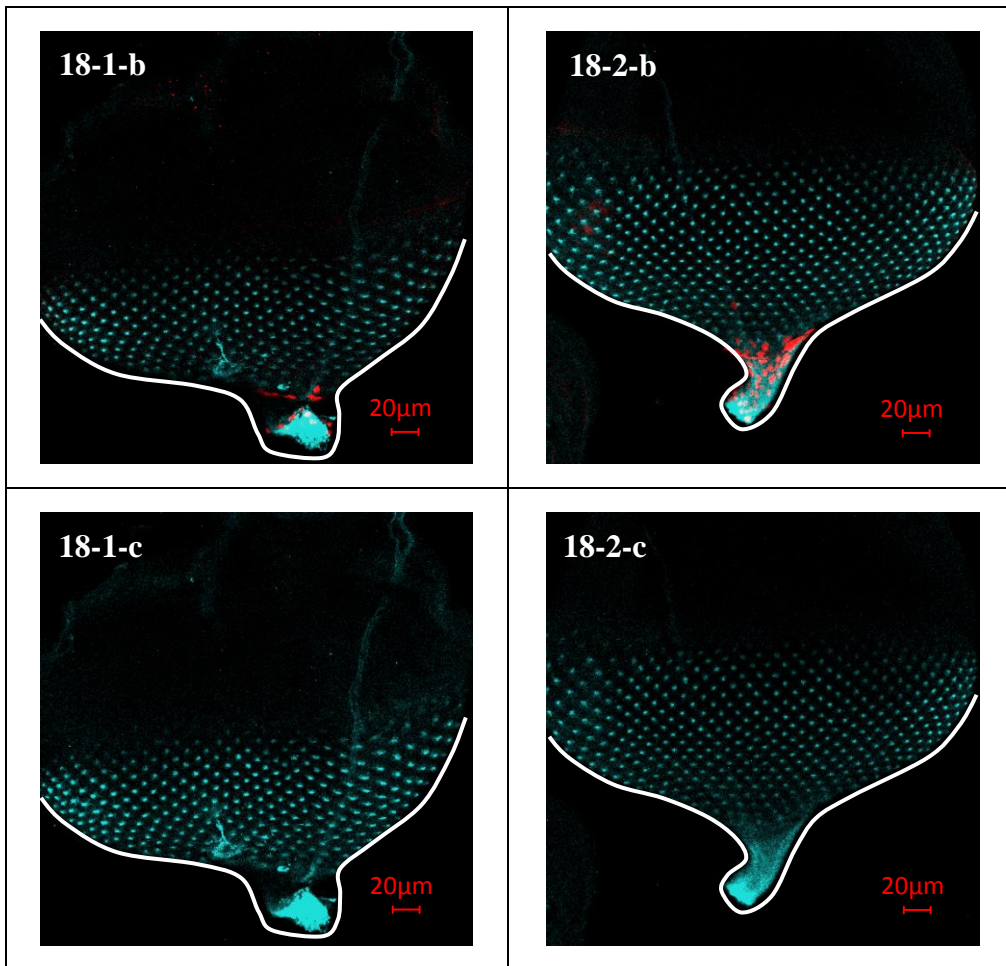
17-1-a,17-2-a 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核。

17-1-b,17-2-b 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

17-1-c,17-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(七) *W*(一抗：repo)(對照組)





圖十八、W(一抗:repo)(對照組)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

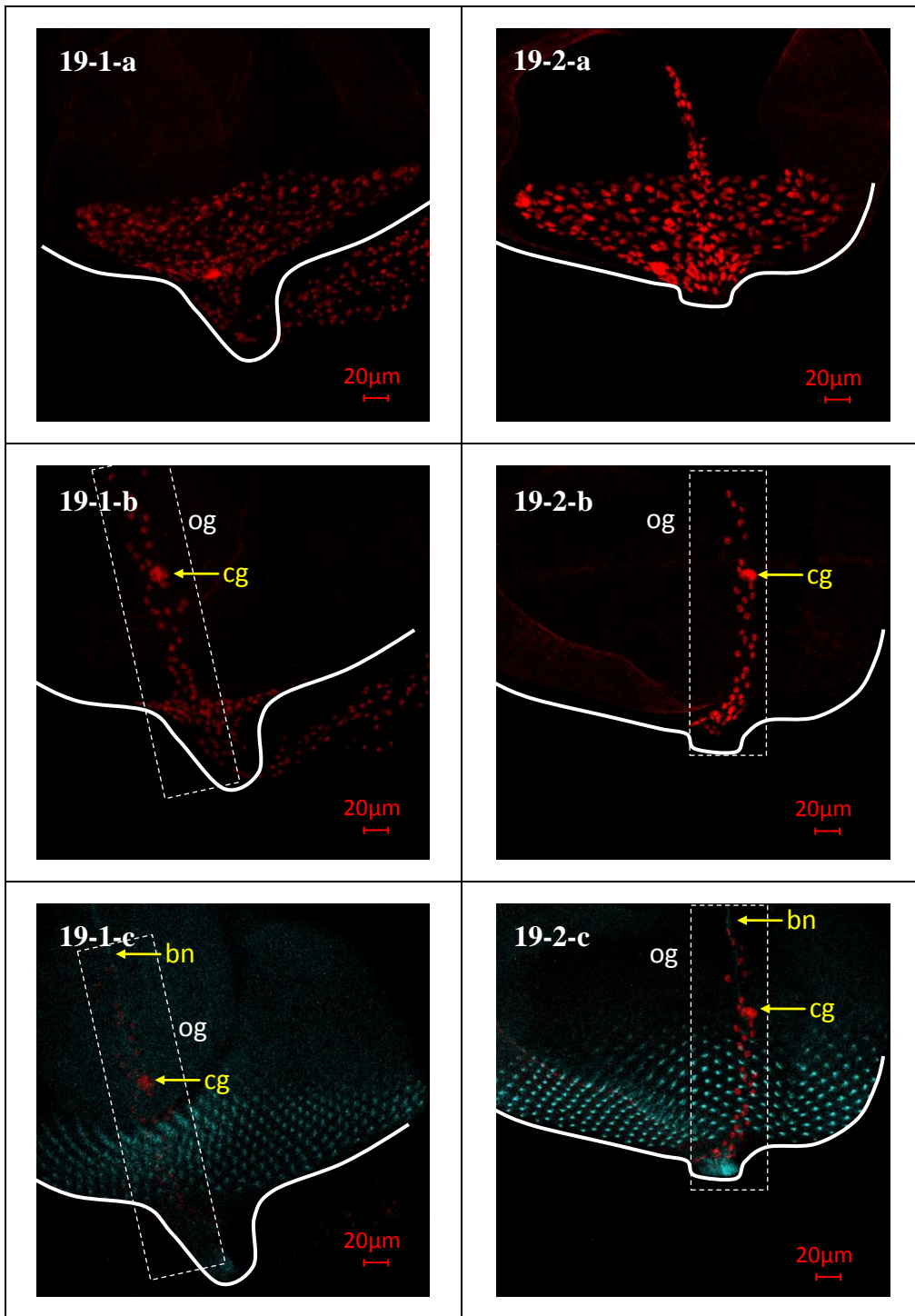
18-1-a,18-2-a 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核。

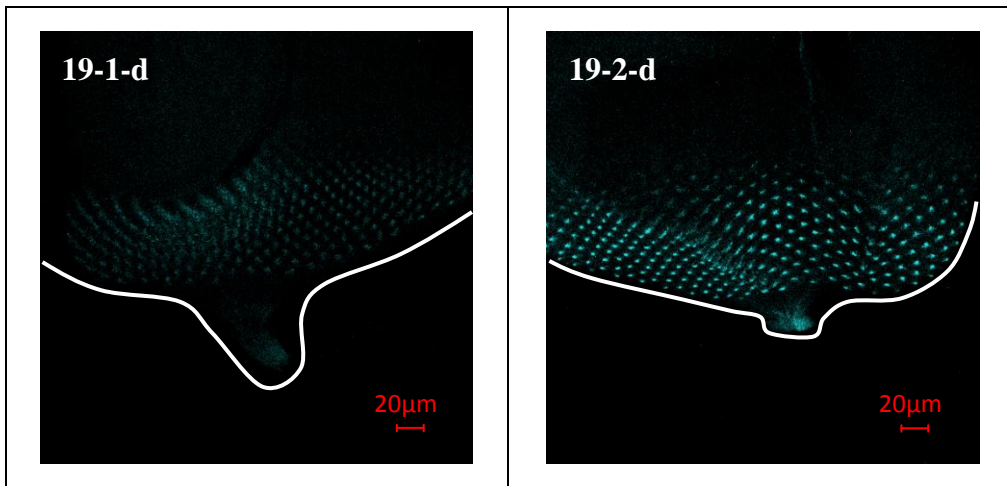
18-1-b,18-2-b 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

18-1-c,18-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(八) *8813 w;G13Fra3/CyO-lacZ-nu X w;G13Fra4/CyO-lacZ-nu*(一抗:repo)

Disc1	Disc2
-------	-------





圖十九、8813 *w;G13Fra3/CyO-lacZ-nu X w;G13Fra4/CyO-lacZ-nu*(一抗:repo)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。(bn: Bowig's nerve, og: overmigration glia, cg: carpet glia)

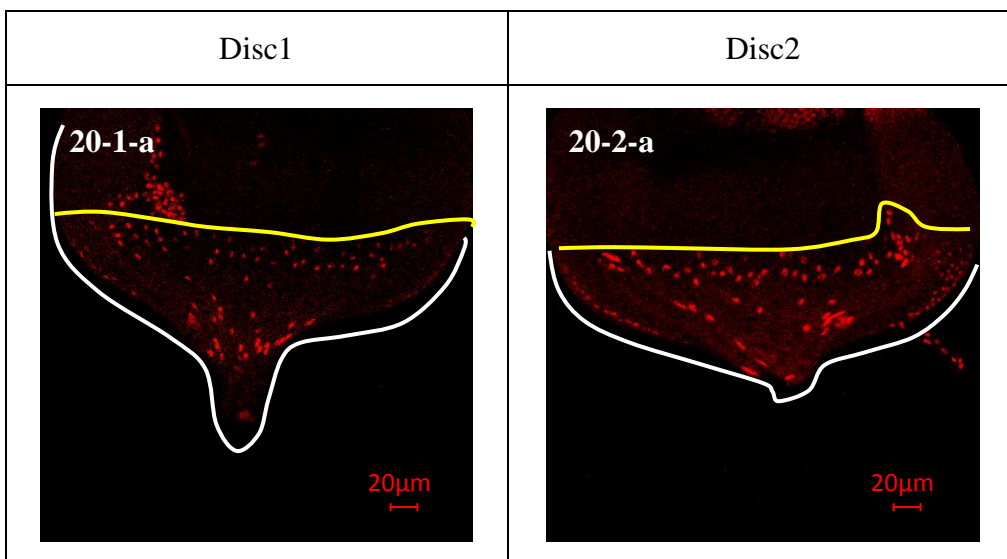
19-1-a,19-2-a 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核。

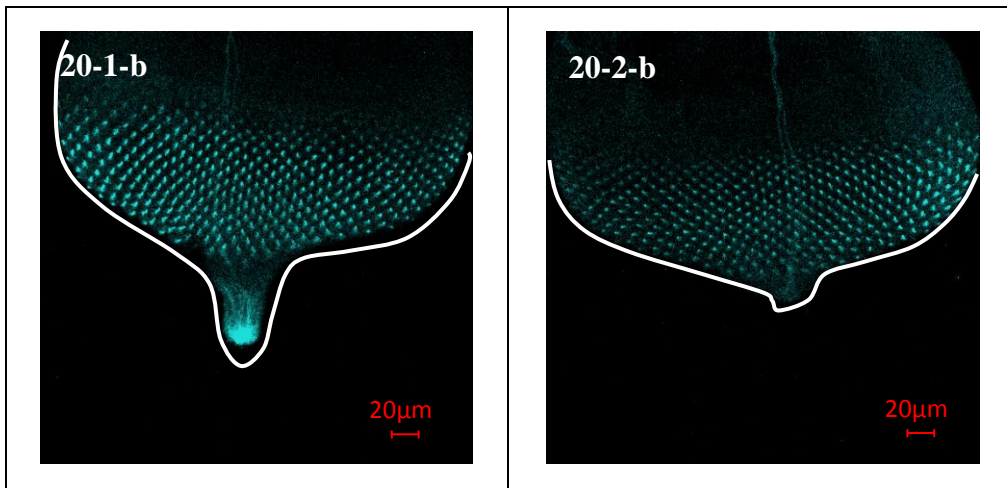
19-1-b,19-2-b 紅色(α -mouse Cy3):與感光細胞同層之神經膠細胞細胞核。

19-1-c,19-2-c 紅色(α -mouse Cy3):與感光細胞同層之神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

19-1-d,19-2-d 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(九) *W*(一抗:cut)(對照組)



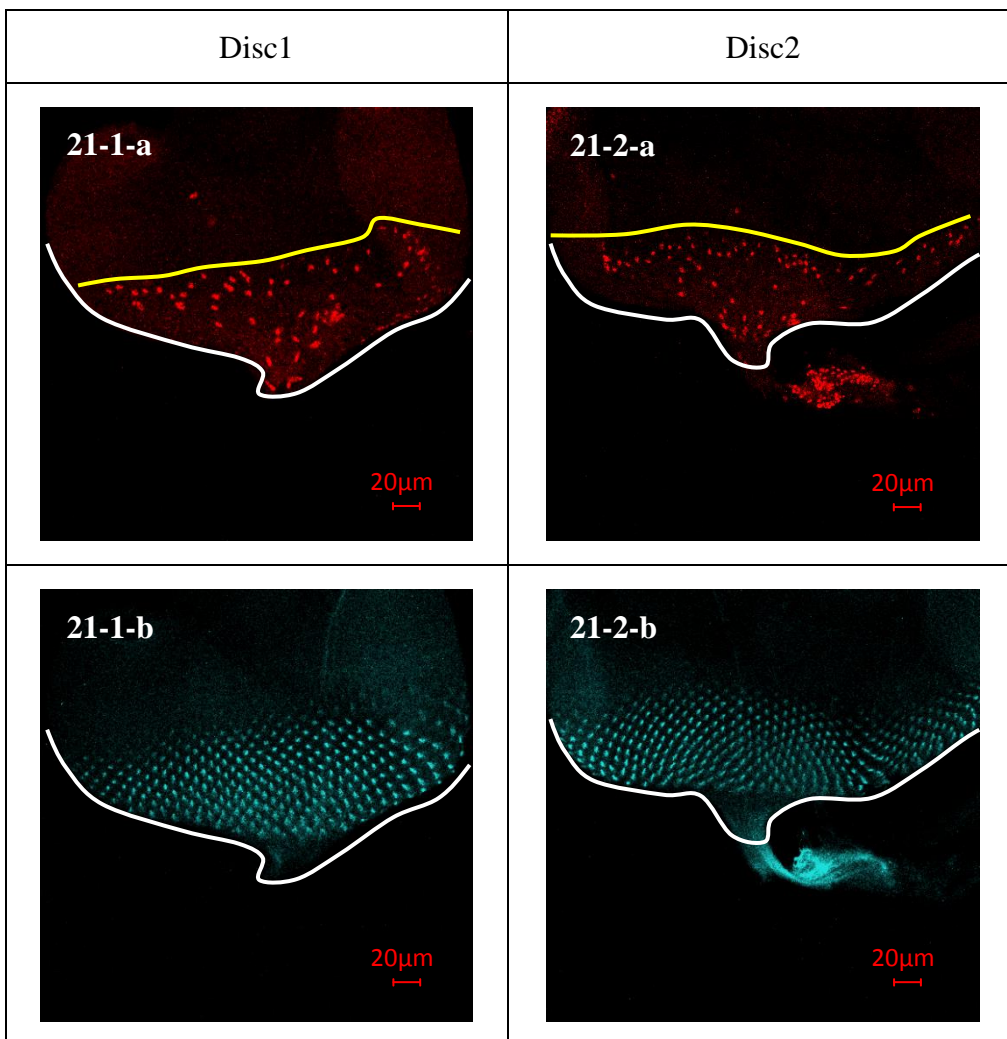


圖二十、W(一抗:cut)(對照組)取三齡晚期幼蟲的眼碟,經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

20-1-a,20-2-a 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核(黃線以下)。

20-1-b,20-2-b 紅色(α -mouse Cy3):藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(十) *8813 w;G13Fra3/CyO-lacZ-nu X w;G13Fra4/CyO-lacZ-nu*(一抗:cut)



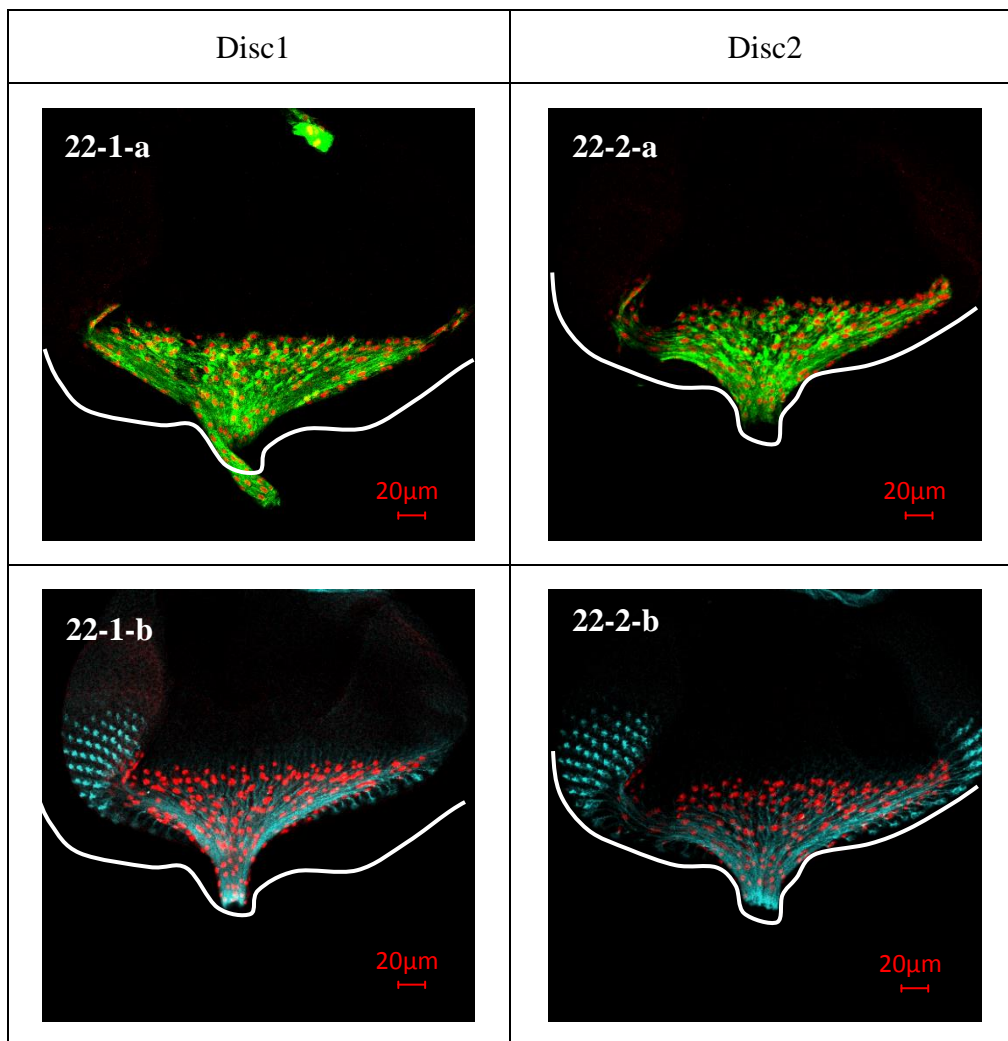
圖二十一、8813 *w;G13Fra3/CyO-lacZ-nu X w;G13Fra4/CyO-lacZ-nu*(一抗: cut)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

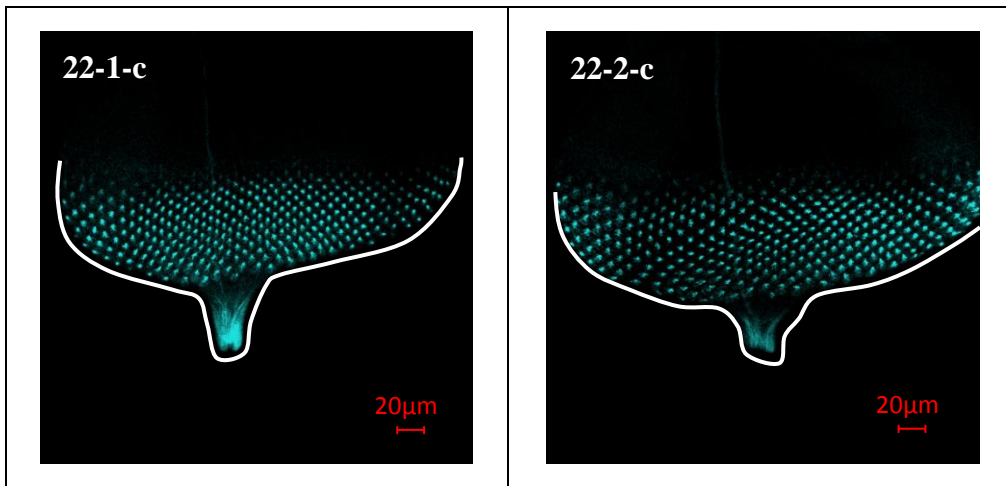
21-1-a,21-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核(黃線以下)。

21-1-b,21-2-b 紅色(α -mouse Cy3)：藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

三、實驗三

(一) *UAS-nls-LacZ X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* (對照組)





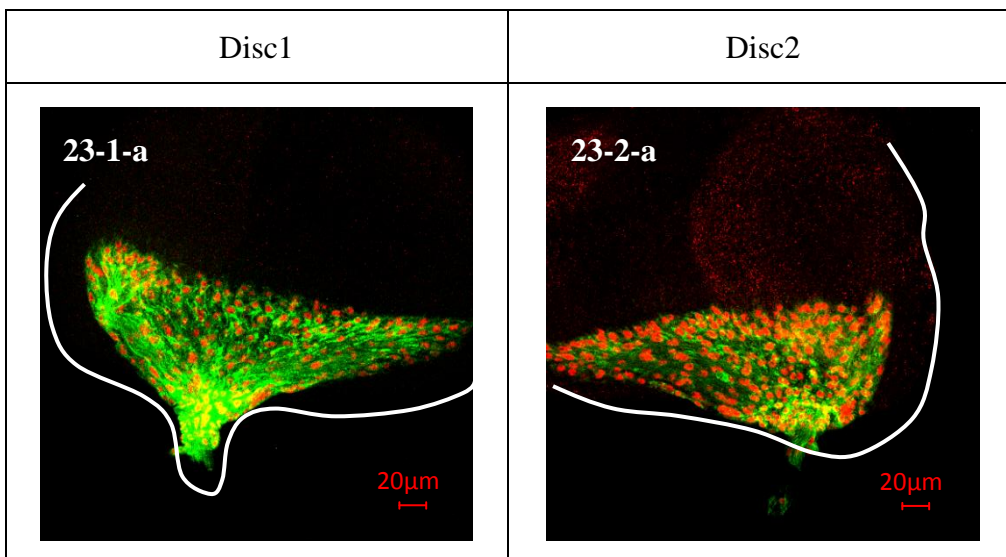
圖二十二、*UAS-nls-LacZ X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* (對照組)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

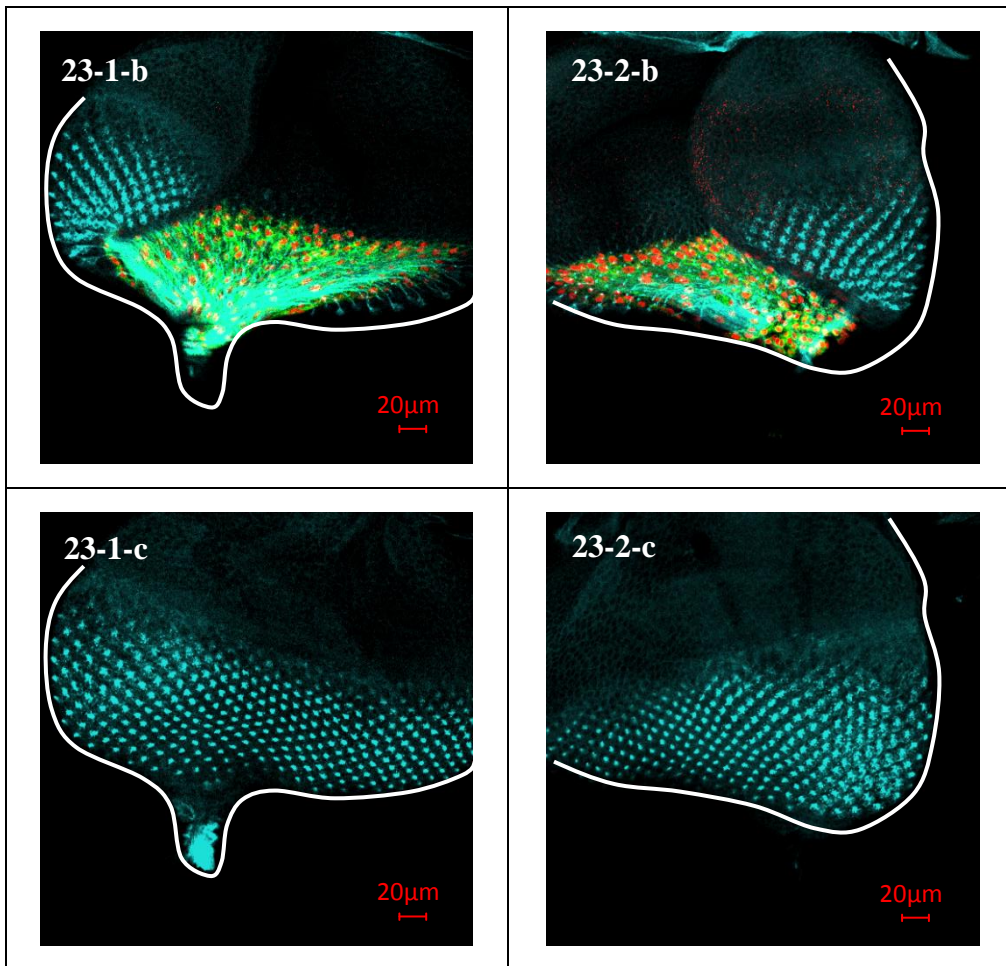
22-1-a,22-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

22-1-b,22-2-b 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

22-1-c,22-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(二) *31665 UAS- NetrinA-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*





圖二十三、*31665 UAS- NetrinA-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4* 取三齡晚期非短身幼蟲(無 *TM6B* 基因)的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

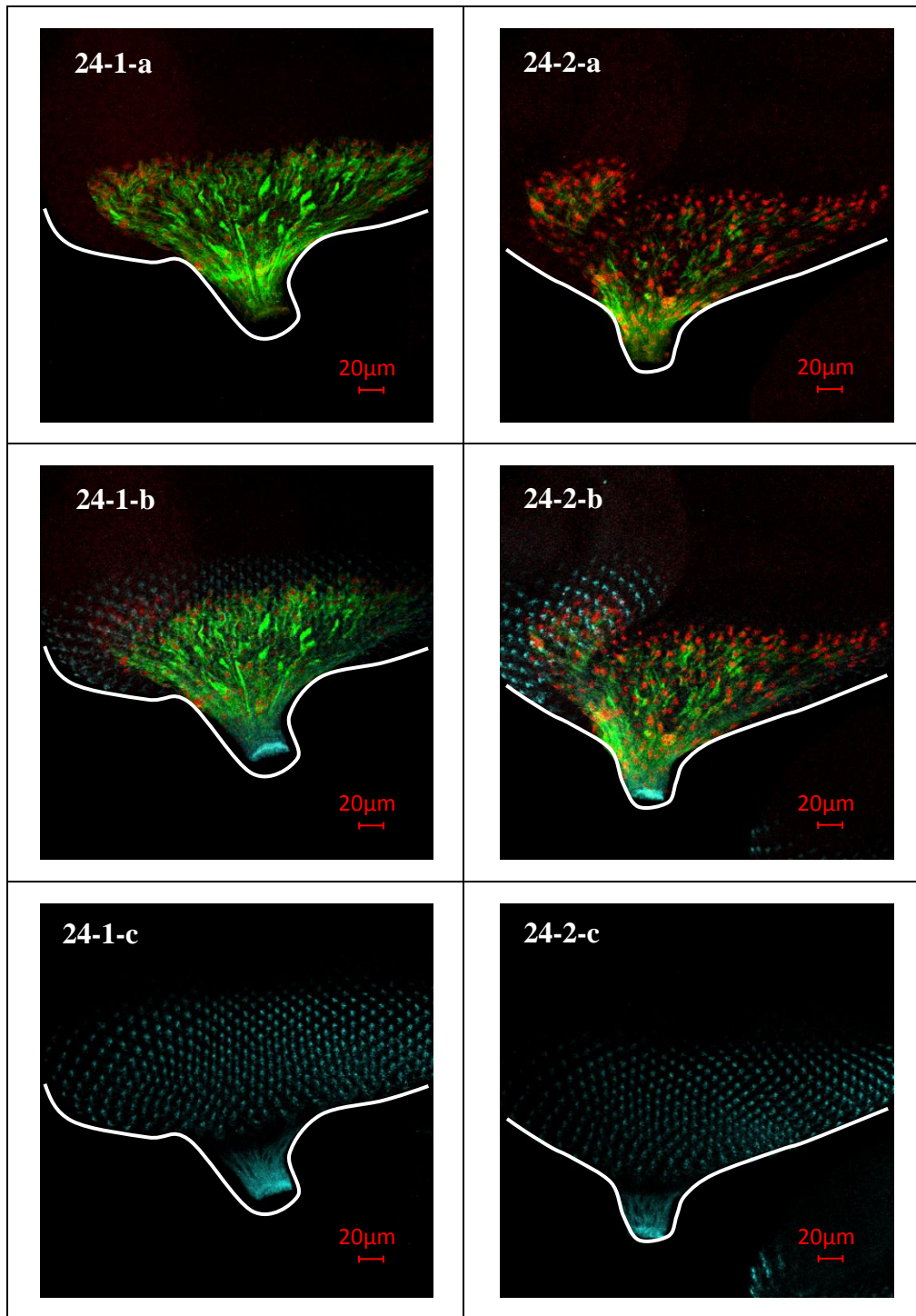
23-1-a,23-2-a 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

23-1-b,23-2-b 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

23-1-c,23-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(三)*25861 UAS-NetrinB-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
-------	-------



圖二十四、25861 *UAS-NetrinB-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* 取三齡

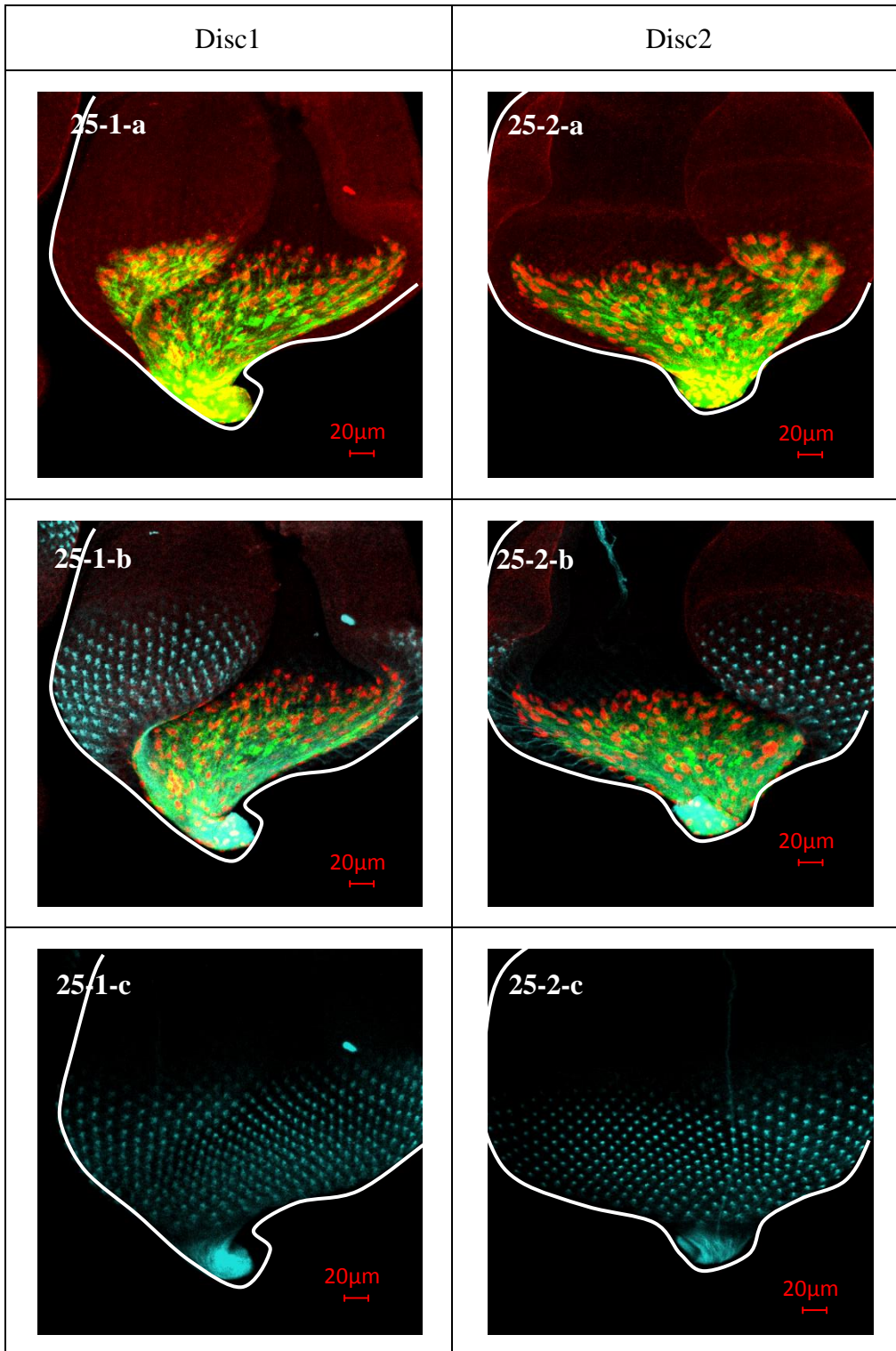
晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

24-1-a,24-2-a 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

24-1-b,24-2-b 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

24-1-c,24-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(四) 34698 *UAS-NetrinB-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*



圖二十五、34698 *UAS-NetrinB-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* 取三齡

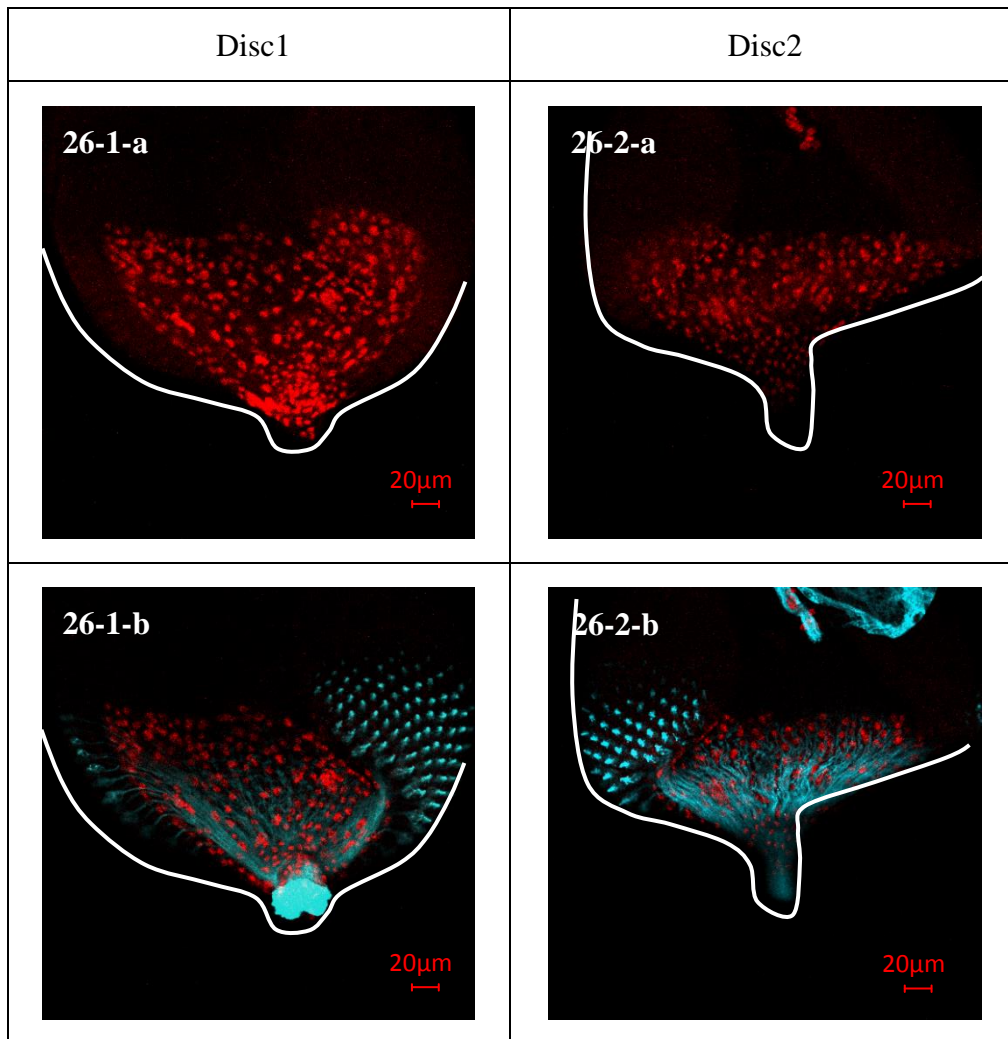
晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

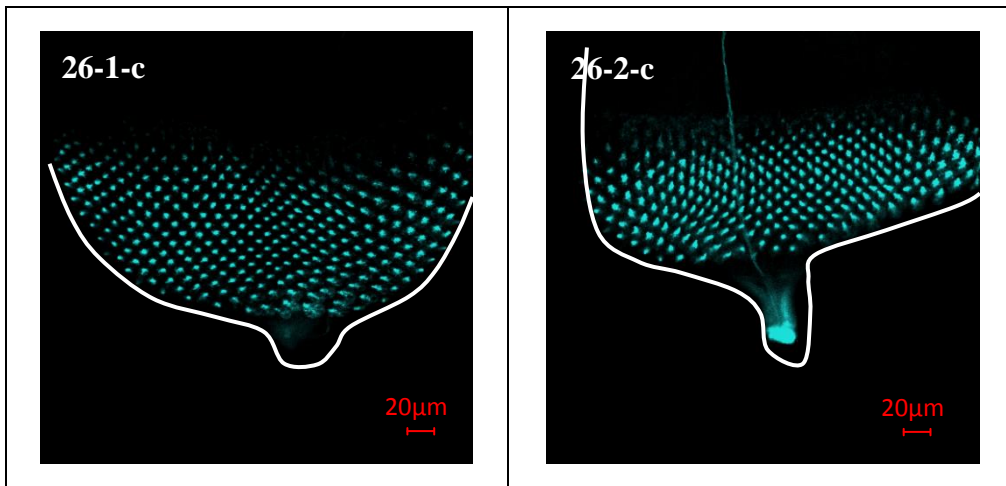
25-1-a,25-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體。

25-1-b,25-2-b 紅色(α -mouse Cy3):神經膠細胞細胞核，綠色(GFP):神經膠細胞本體，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

25-1-c,25-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(五) *UAS-nls-LacZ X UAS-Dsred;GMR-Gal4*(對照組)





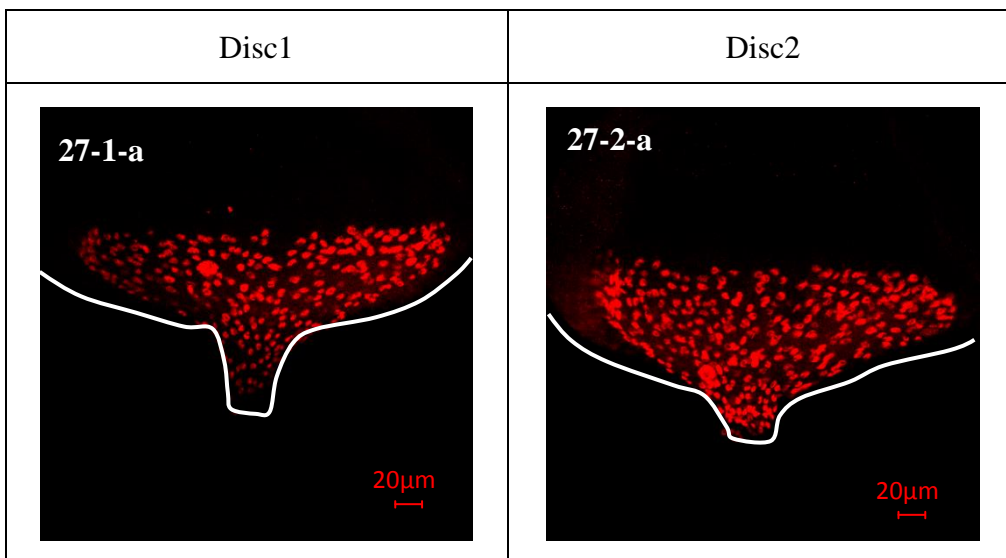
圖二十六、*UAS-nls-LacZ X UAS-Dsred;GMR-Gal4* (對照組)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

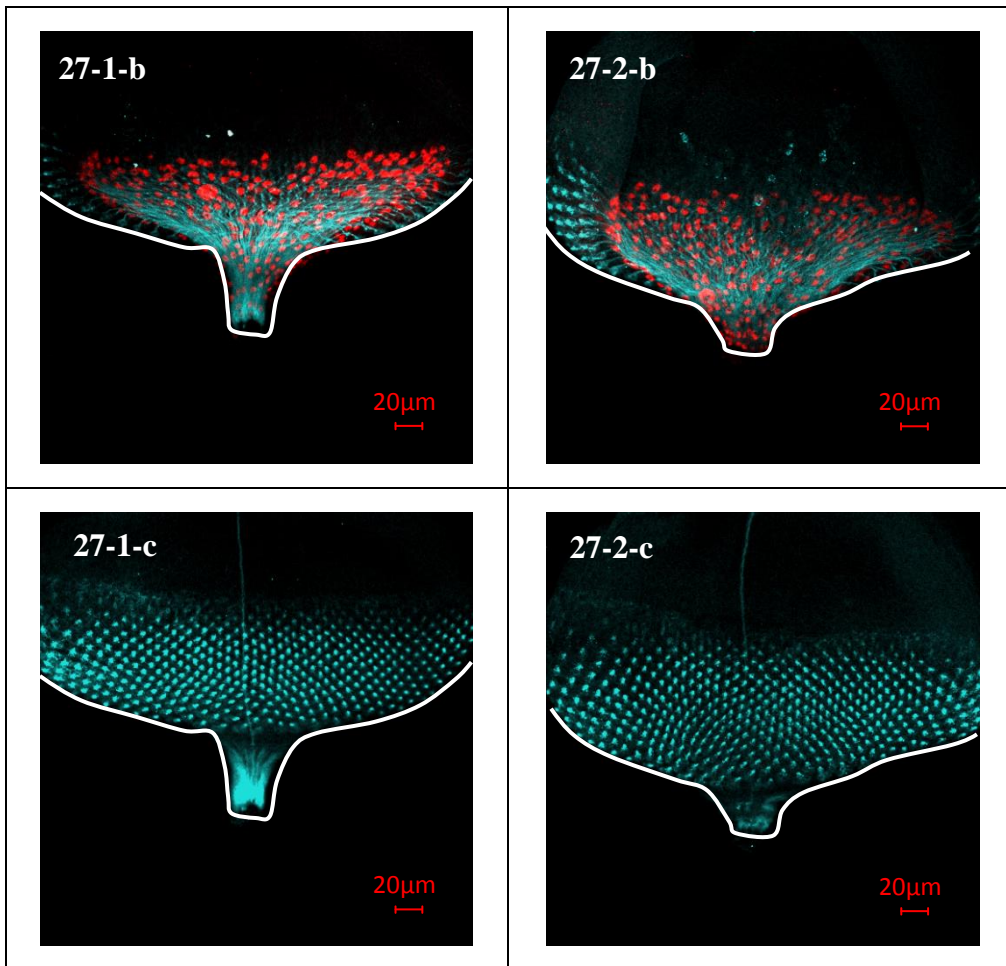
26-1-a,26-2-a 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核。

26-1-b,26-2-b 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

26-1-c,26-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(六)*31665 UAS- NetrinA-RNAi X UAS-Dsred;GMR-Gal4*





圖二十七、*31665 UAS- NetrinA-RNAi X UAS-Dsred;GMR-Gal4* 取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

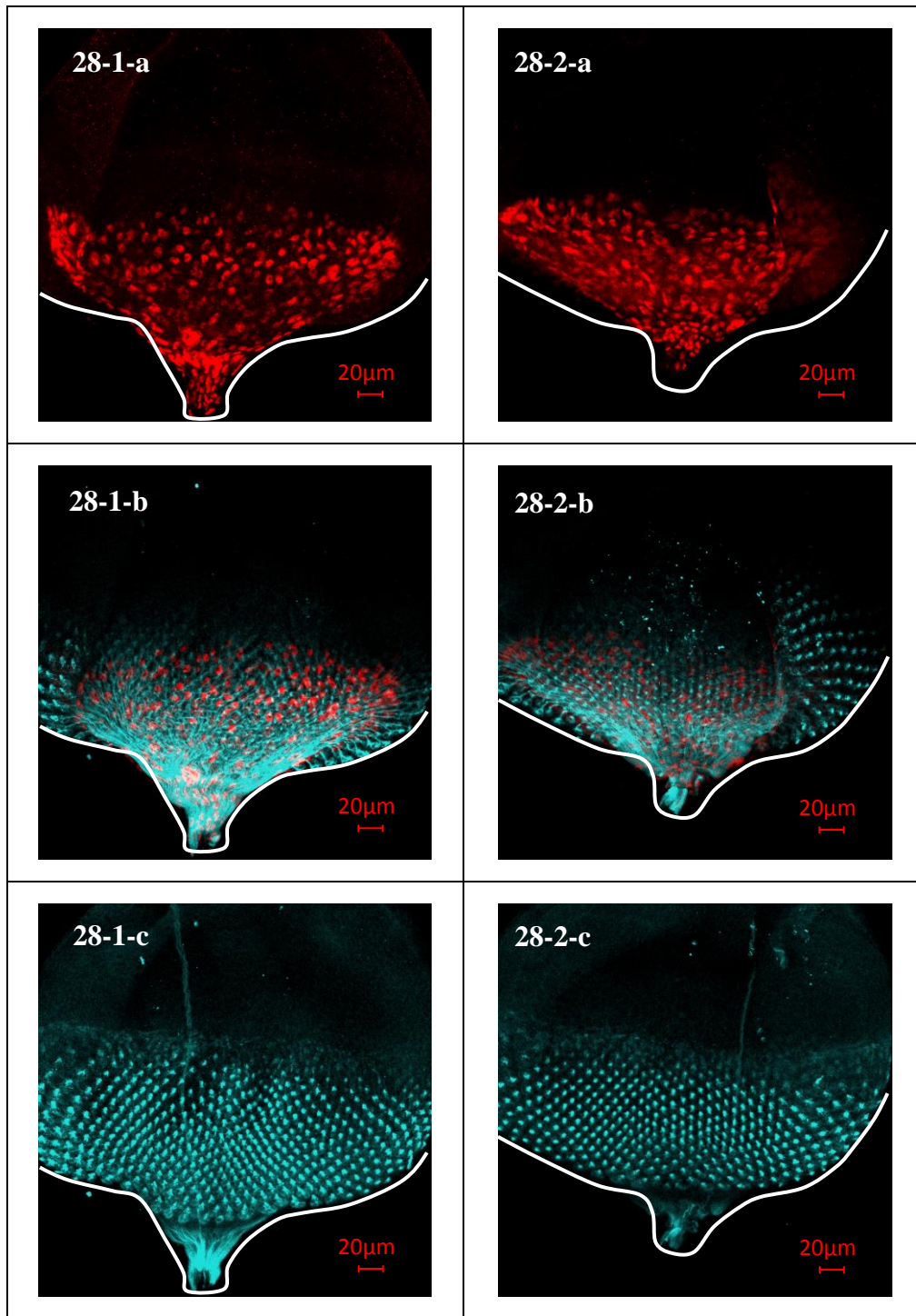
27-1-a,27-2-a 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核。

27-1-b,27-2-b 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

27-1-c,27-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(七)*25861 UAS-NetrinB-RNAi X UAS-Dsred;GMR-Gal4*

Disc1	Disc2
-------	-------



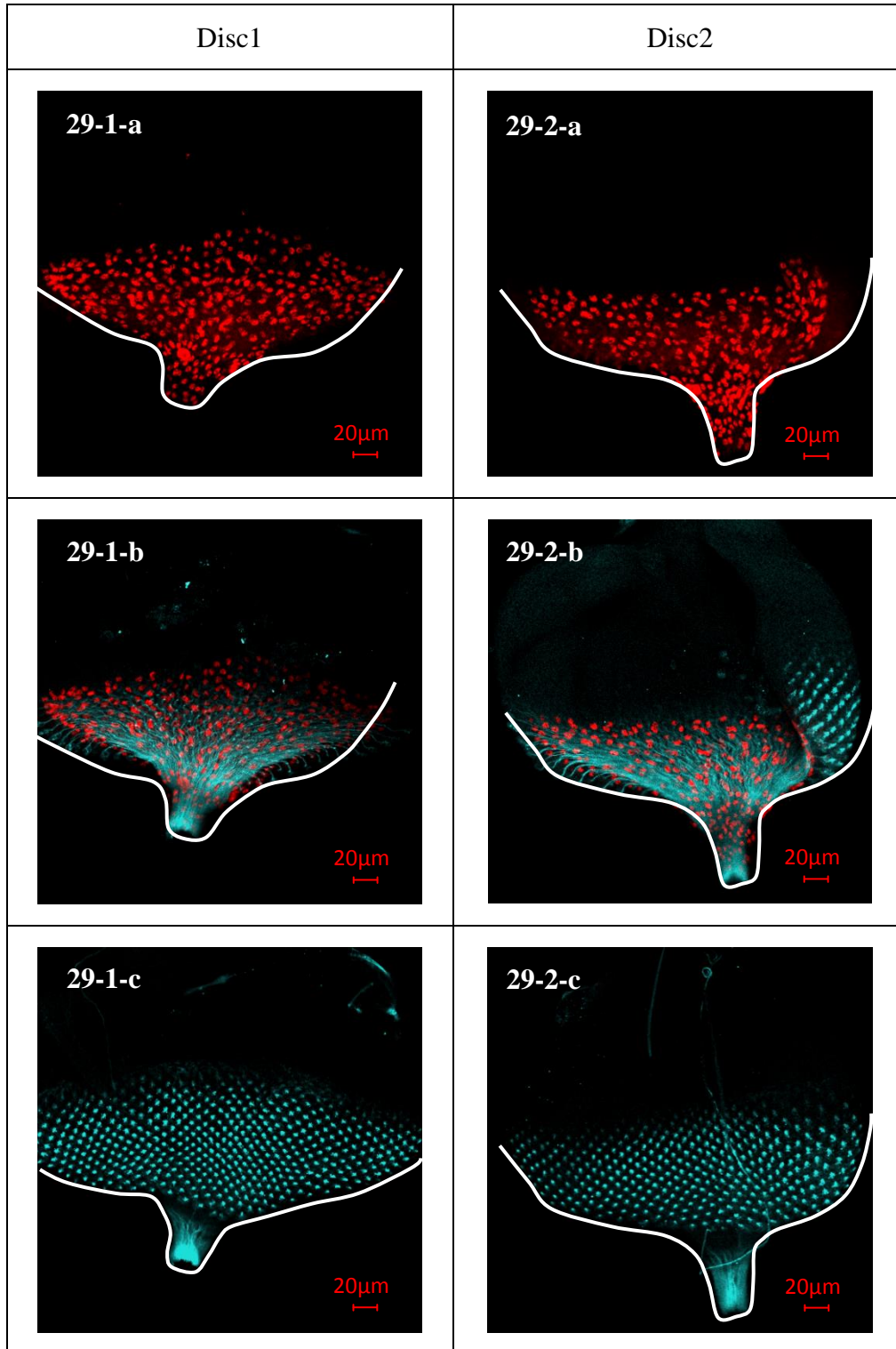
圖二十八、25861 *UAS-NetrinB-RNAi X UAS-Dsred;GMR-Gal4* 取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

28-1-a,28-2-a 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核。

28-1-b,28-2-b 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

28-1-c,28-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(八) *34698 UAS-NetrinB-RNAi X UAS-Dsred;GMR-Gal4*



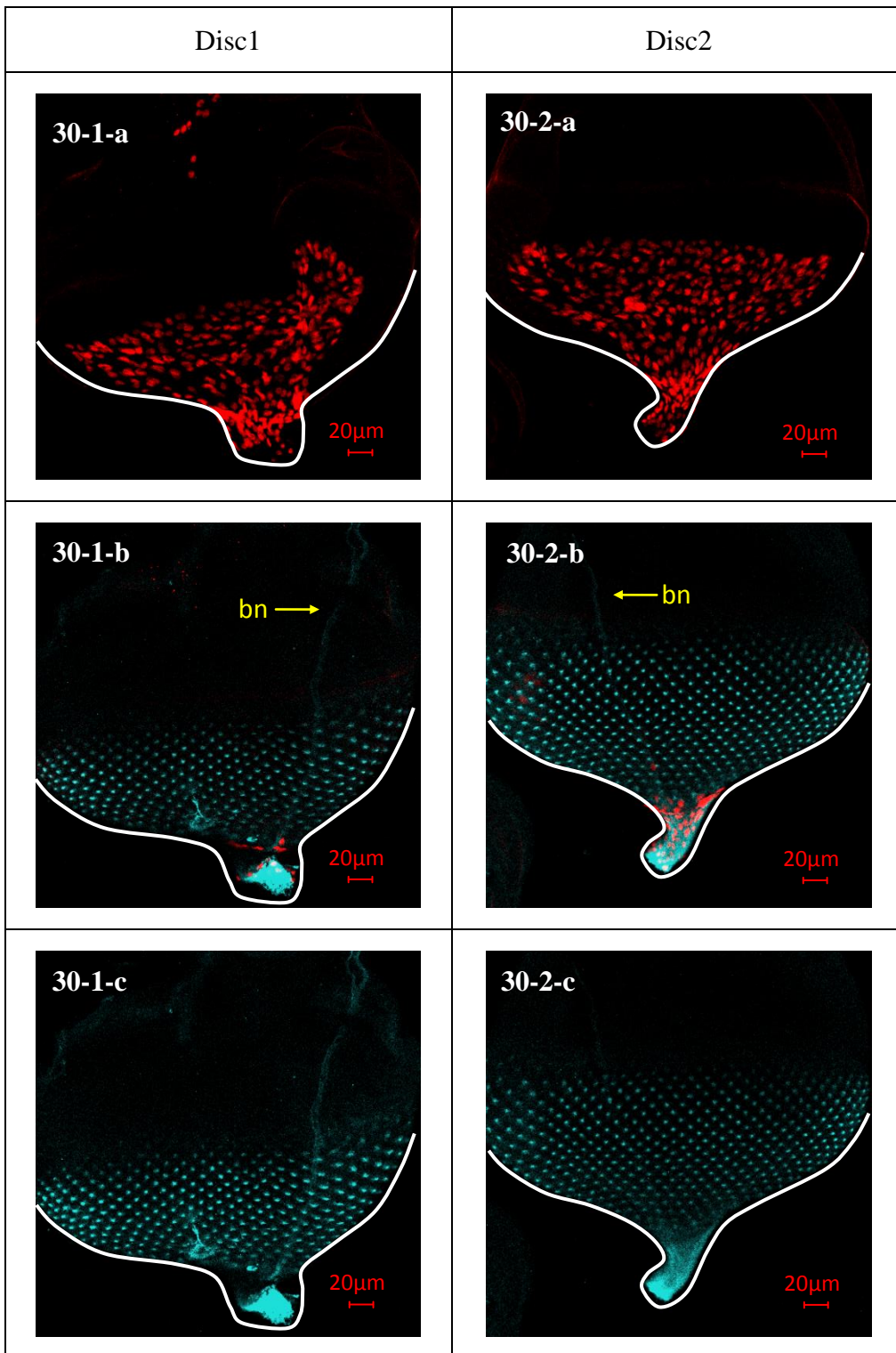
圖二十九、*34698 UAS-NetrinB-RNAi X UAS-Dsred;GMR-Gal4* 取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

29-1-a,29-2-a 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核。

29-1-b,29-2-b 紅色(FITC)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞。

29-1-c,29-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(九)W(一抗:repo)(對照組)



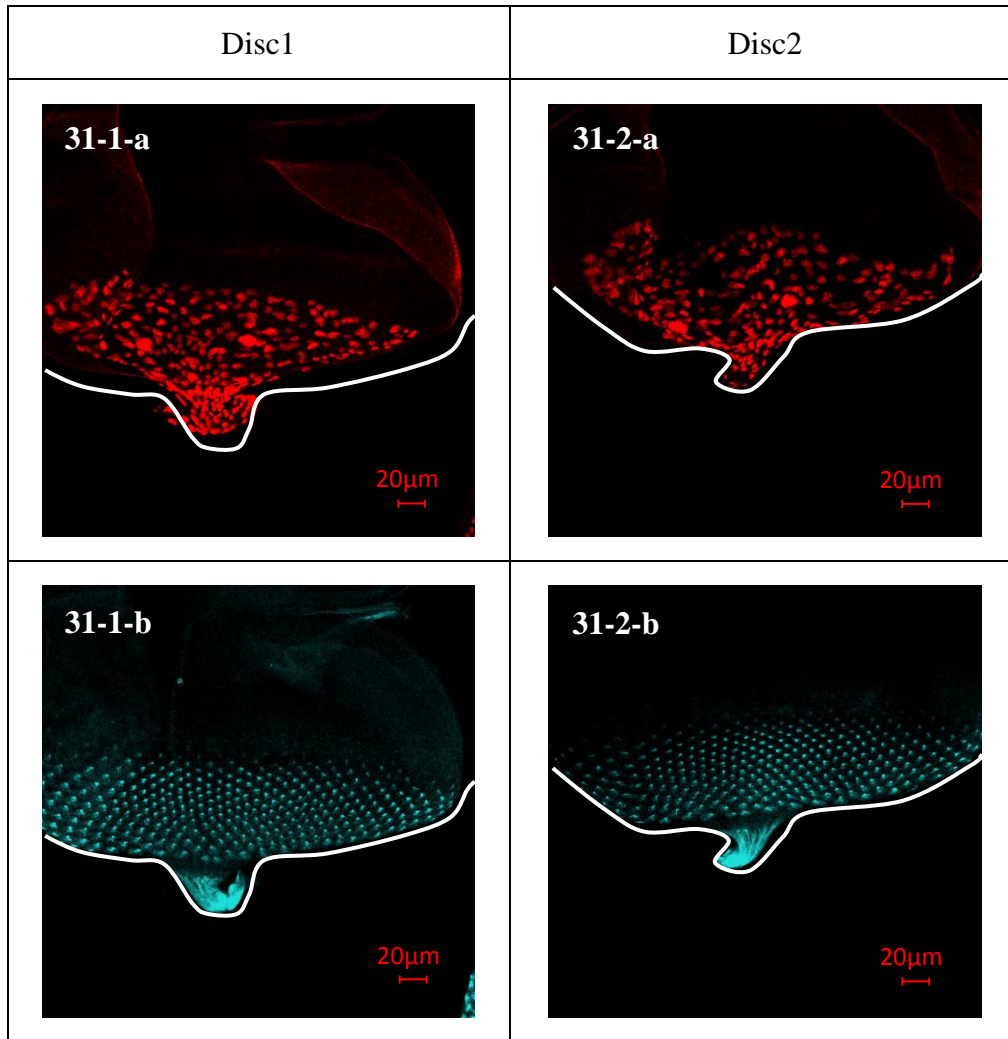
圖三十、W(一抗:repo)(對照組)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。(bn: Bowig's nerve)

30-1-a,30-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核。

30-1-b,30-2-b 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

30-1-c,30-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(十)*NetrinA mutant/FM7,act-GFP X NetrinA mutant/FM7,act-GFP*(一抗：repo)

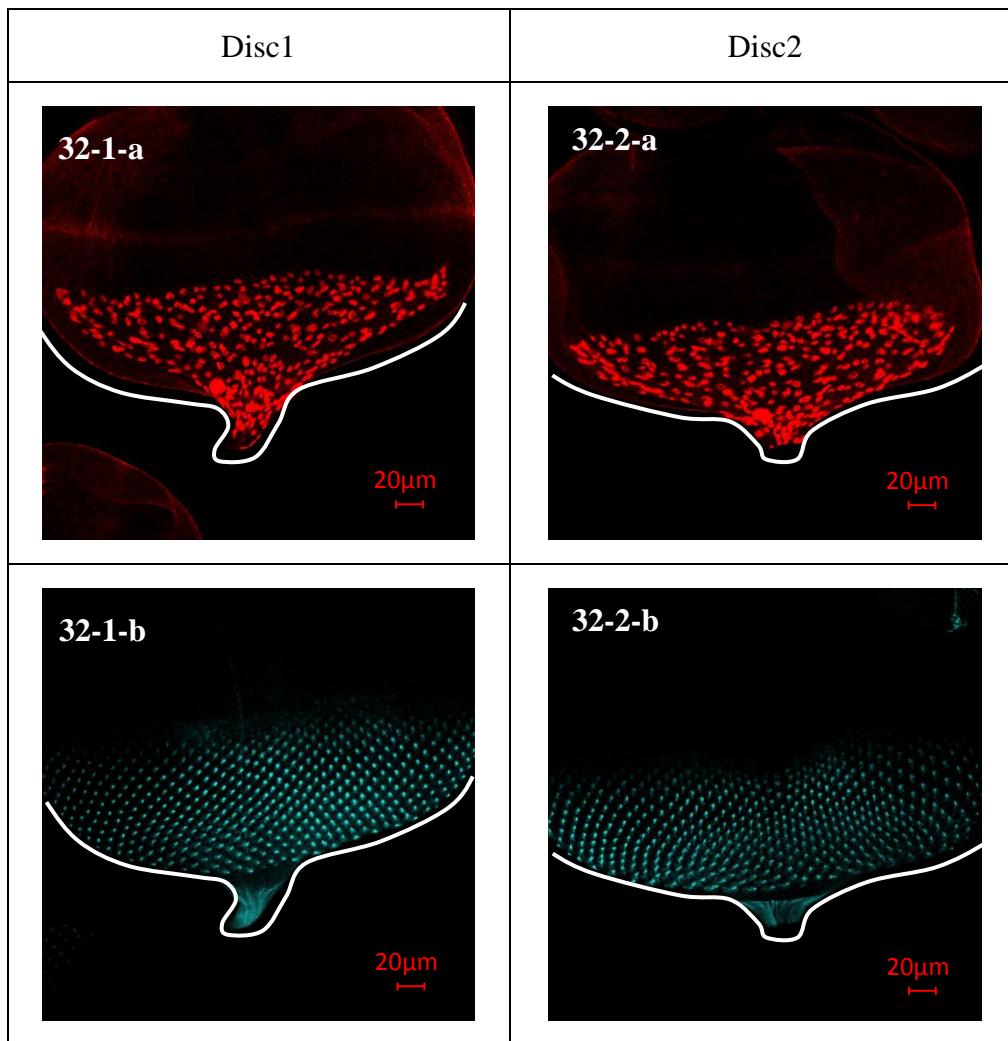


圖三十一、*NetrinA mutant/FM7,act-GFP X NetrinA mutant/FM7,act-GFP*(一抗：repo)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

31-1-a,31-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核。

31-1-b,31-2-b 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(十一)*NetrinB mutant/FM7,act-GFP X NetrinB mutant/FM7,act-GFP*(一抗：repo)

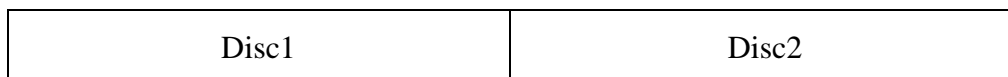


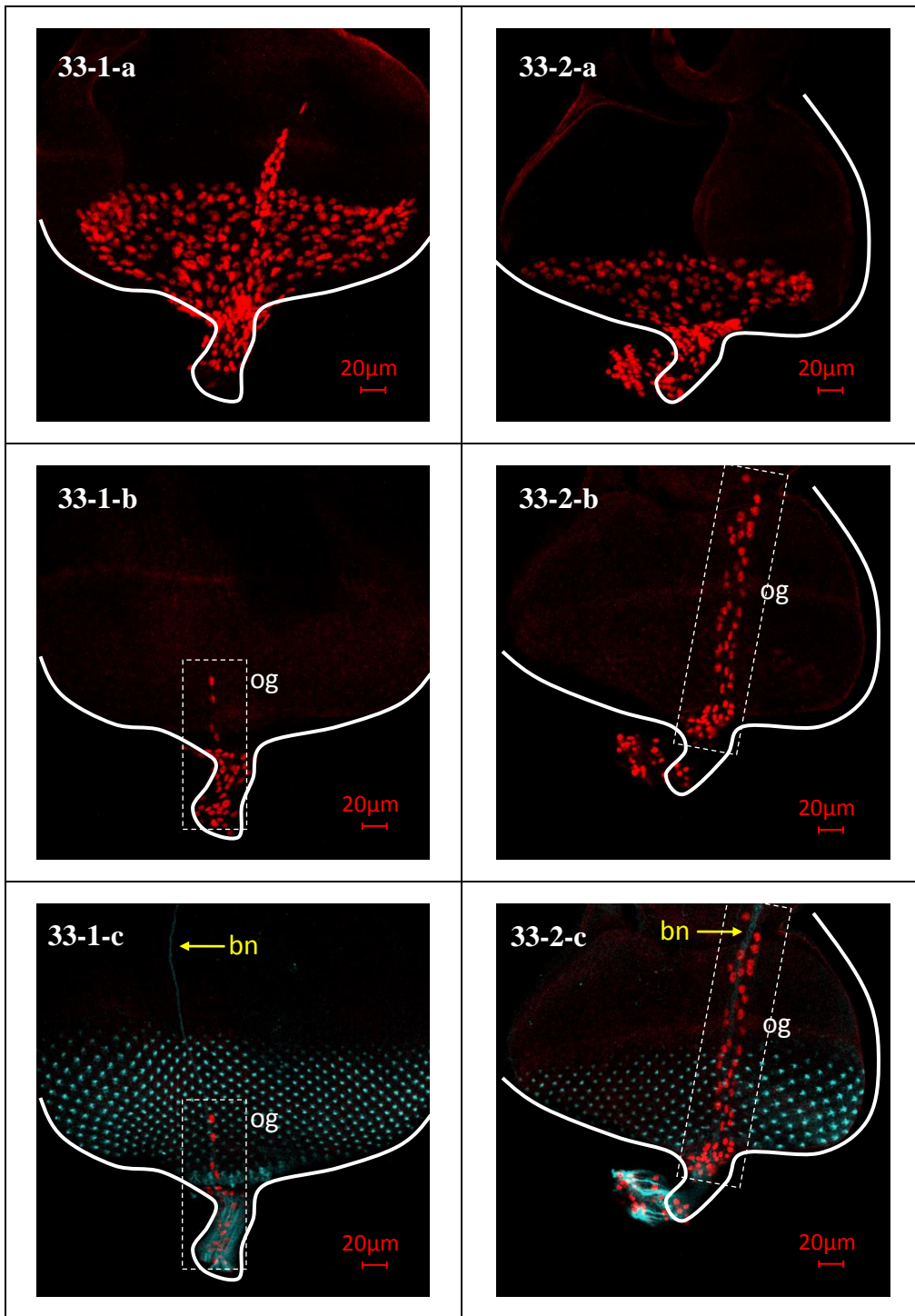
圖三十二、*NetrinB mutant/FM7,act-GFP X NetrinB mutant/FM7,act-GFP*(一抗：repo)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

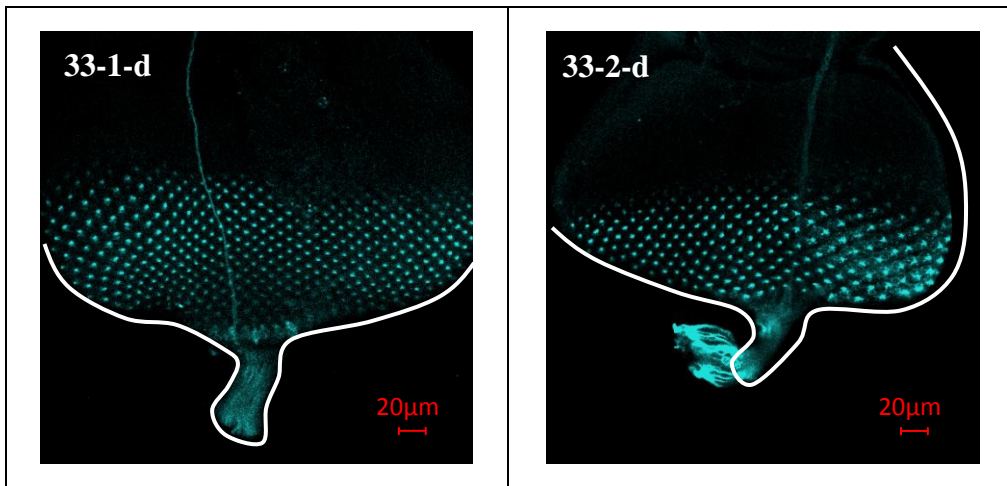
32-1-a,32-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核。

32-1-b,32-2-b 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(十二)*NetrinAB mutant/FM7,act-GFP X NetrinAB mutant/FM7,act-GFP*(一抗：repo)







圖三十三、*NetrinAB mutant/FM7,act-GFP* X *NetrinAB mutant/FM7,act-GFP* (一抗：repo) 取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。(bn: Bowig's nerve, og: overmigration glia)

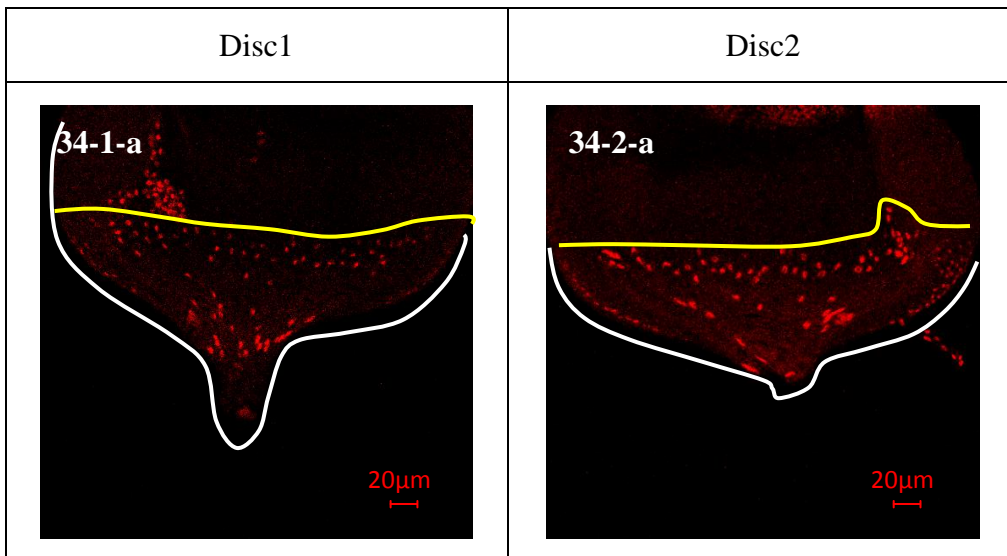
33-1-a,33-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核。

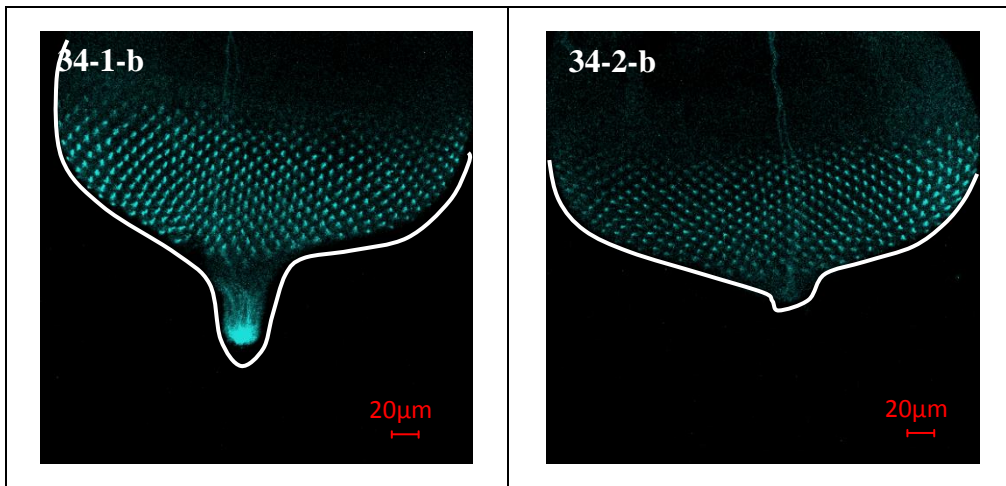
33-1-b,33-2-b 紅色(α -mouse Cy3)：與感光細胞同層之神經膠細胞細胞核。

33-1-c,33-2-c 紅色(α -mouse Cy3)：與感光細胞同層之神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

33-1-d,33-2-d 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(十三)W(1 抗：cut)(對照組)



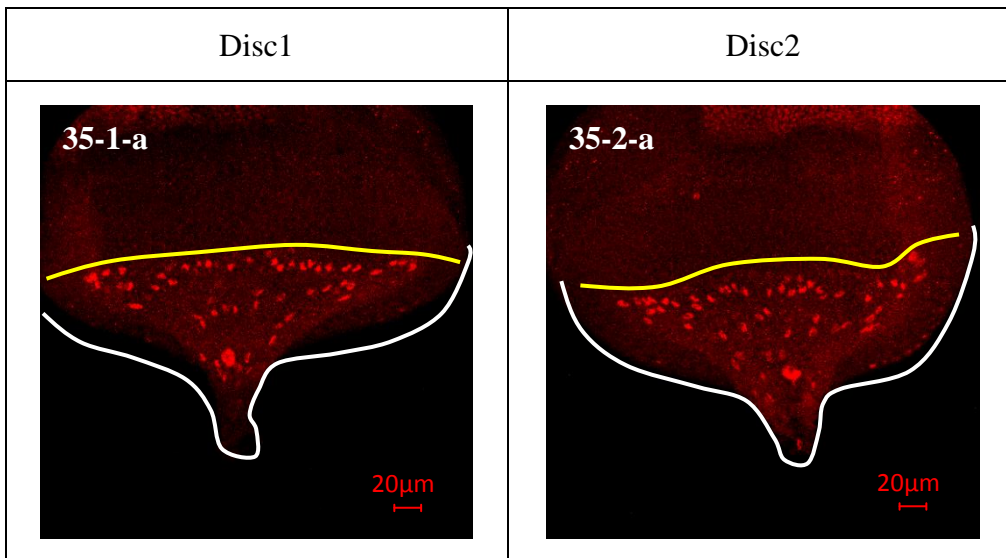


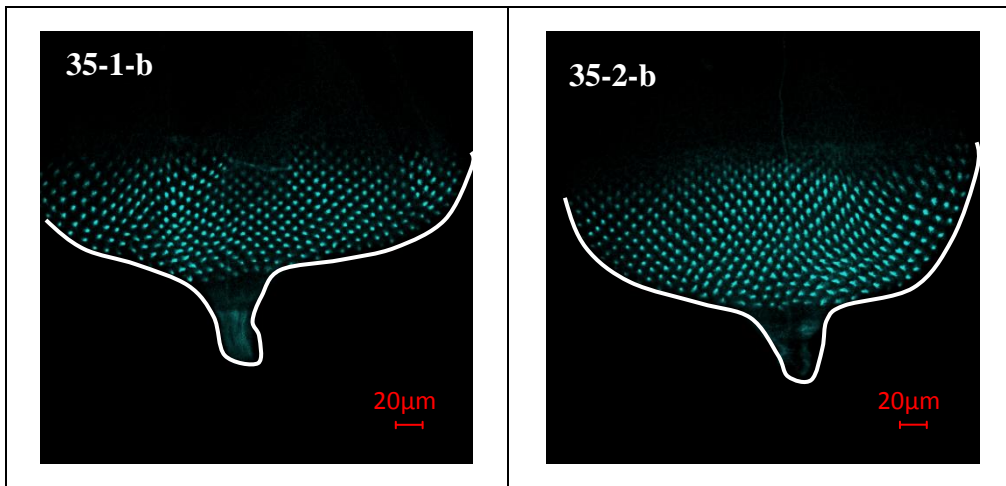
圖三十四、W(1 抗：cut)(對照組)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

34-1-a,34-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核(黃線以下)。

34-1-b,34-2-b 紅色(α -mouse Cy3)：藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(十四)*NetrinA mutant/FM7,act-GFP X NetrinA mutant/FM7,act-GFP*(一抗：cut)



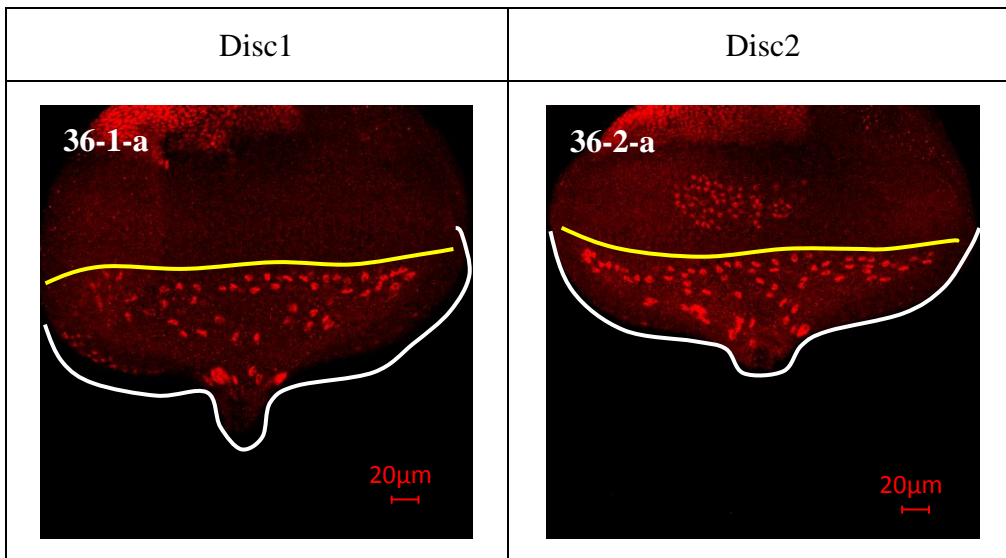


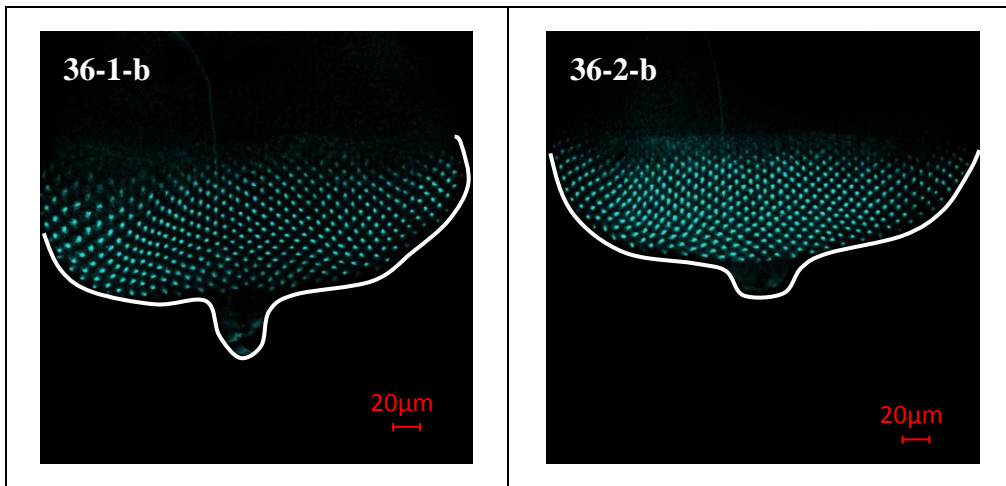
圖三十五、*Netrina mutant/FM7,act-GFP* X *Netrina mutant/FM7,act-GFP*(一抗：cut)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

35-1-a,35-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核(黃線以下)。

35-1-b,35-2-b 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(十五)*NetrinB mutant/FM7,act-GFP* X *NetrinB mutant/FM7,act-GFP*(一抗：cut)



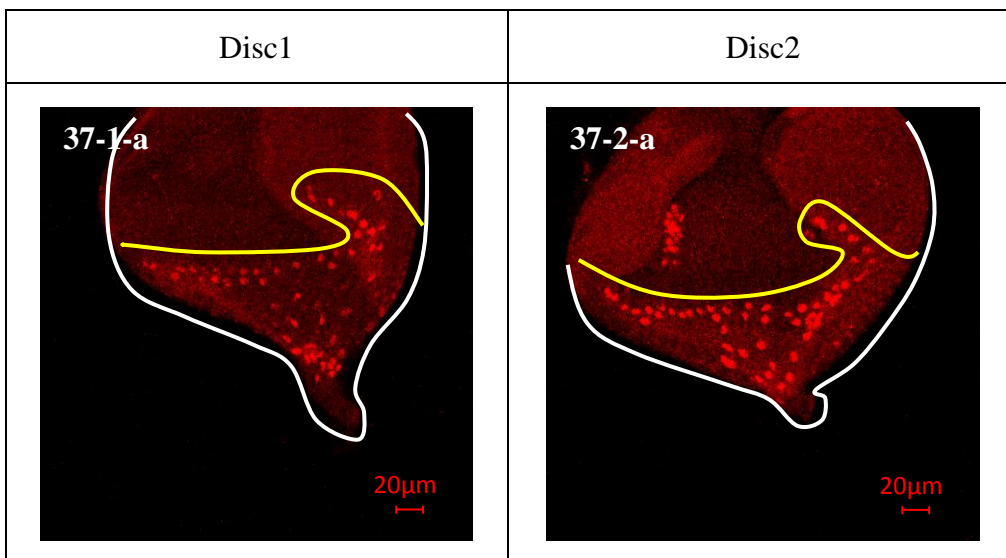


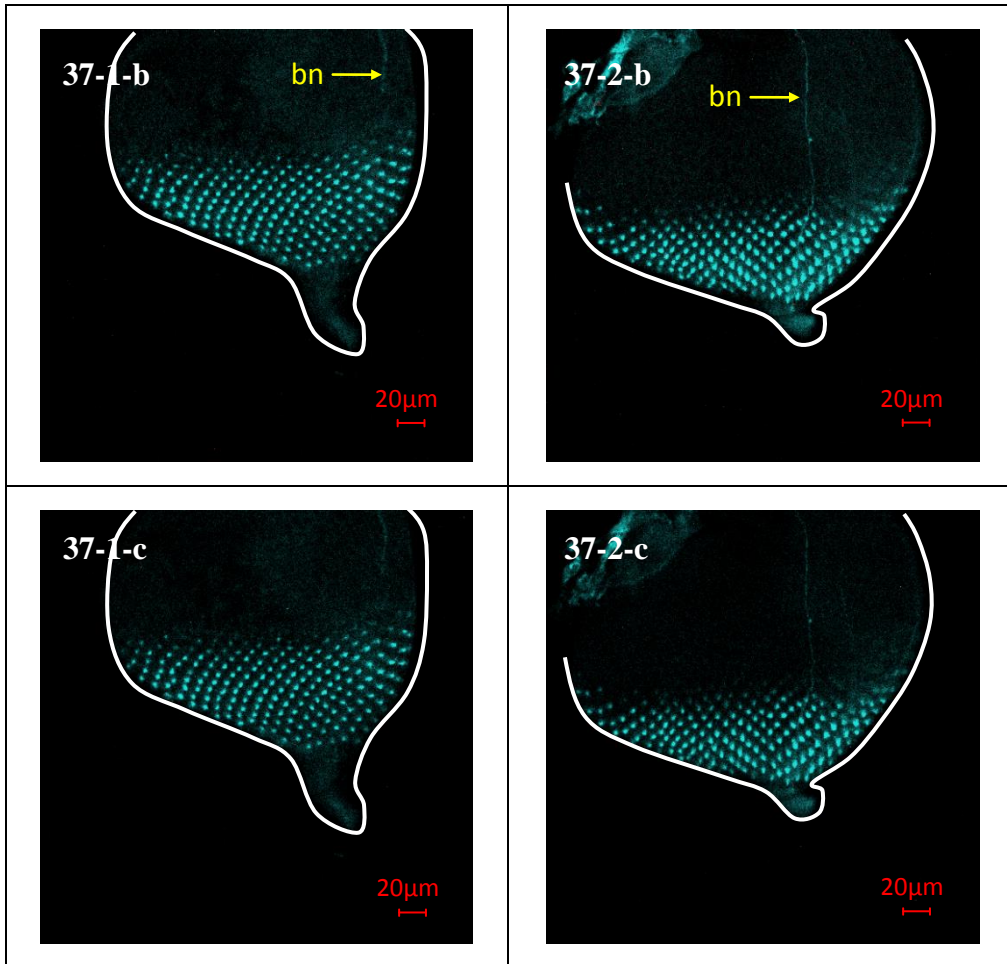
圖三十六、*NetrinB mutant/FM7,act-GFP X NetrinB mutant/FM7,act-GFP*(一抗：cut)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。

36-1-a,36-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核(黃線以下)。

36-1-b,36-2-b 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

(十六)*NetrinAB mutant/FM7,act-GFP X NetrinAB mutant/FM7,act-GFP*(一抗：cut)





圖三十七、*NetrinAB mutant/FM7,act-GFP X NetrinAB mutant/FM7,act-GFP*(一抗：cut)取三齡晚期幼蟲的眼碟，經免疫染色後的共軛焦顯微鏡掃描圖。(bn: Bowig's nerve)

37-1-a,37-2-a 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核(黃線以下)。

37-1-b,37-2-b 紅色(α -mouse Cy3)：神經膠細胞細胞核，藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

37-1-c,37-2-c 藍色(HRP-Cy5):感光細胞本體。

陸、討論

一、實驗一

(一) *UAS-nls-LacZ X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* (對照組)

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常，	RBG 均勻分化，RBG 數量正常，

感光細胞軸突平行無空隙。	感光細胞軸突平行無空隙。
--------------	--------------

(二) *UAS-Tincar X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

(三) *VDRC101175 UAS-Tincar-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1
RBG 均勻分化，RBG 數量正常，感光細胞軸突平行無空隙。

(四) *7723R-1 UAS-Tincar-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

(五) *7723R-3 UAS-Tincar-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

(六) *GD10208 UAS-Tincar-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

由(一)~(六)可知，*Tincar* 在 RBG 被 RNAi 抑制，對 RBG 與感光細胞並無造成影響。

二、實驗二

(一) *UAS-nls-LacZ X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* (對照組)

Disc1	Disc2

RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。
------------------------------------	------------------------------------

(二) *8138 UAS-unc5-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

(三) *8937 UAS-unc5-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

由(一)~(三)可知，*Unc-5* 在 RBG RNAi 抑制，對 RBG 與感光細胞並無造成影響。

(四) *UAS-Fra X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

(五) *UAS-nls-LacZ X UAS-Dsred;GMR-Gal4*(對照組)

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

(六) *UAS-Fra(II) X UAS-Dsred;GMR-Gal4*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

(七) *W*(一抗：repo)(對照組)

Disc1	Disc2
-------	-------

RBG 數量正常，無 RBG 沿著 Bowig's nerve overmigrate。	RBG 數量正常，無 RBG 沿著 Bowig's nerve overmigration。
--	--

(八) *8813 w;G13Fra3/CyO-lacZ-nu X w;G13Fra4/CyO-lacZ-nu*(一抗：repo)

Disc1	Disc2
由圖 19-1-a，RBG 數量正常。由圖 19-1-b、19-1-c，RBG 沿著 Bowig's nerve overmigrate。Overmigration 的 RBG 中有一個 carpet glia。	由圖 19-2-a，RBG 數量正常，但在同一平面有 Overmigration 之現象。由圖 19-2-b、19-2-c，RBG 沿著 Bowig's nerve overmigrate。Overmigration 的 RBG 中有一個 carpet glia。

由(七)~(八)可知，*Fra* 突變會有 RBG overmigration 之現象。

由(五)~(八)可知，增強 *Fra* 基因表現量對 RBG migration 並無影響，但 *Fra* 突變會有 RBG overmigration 之現象。由此推論，*Fra* 蛋白為 RBG 正常 migration 的必要條件，但其量的增加不會影響 migration，可能需要 *Unc-5* 蛋白的同時增加才能影響之。

(九) *W*(一抗：cut)(對照組)

Disc1	Disc2
已分化(Differentiating)RBG 數量正常。	已分化(Differentiating)RBG 數量正常。

(十) *8813 w;G13Fra3/CyO-lacZ-nu X w;G13Fra4/CyO-lacZ-nu*(一抗：cut)

Disc1	Disc2
已分化(Differentiating)RBG 數量正常。	已分化(Differentiating)RBG 數量正常。

三、實驗三

(一) *UAS-nls-LacZ X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B* (對照組)

Disc1	Disc2

RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。
------------------------------------	------------------------------------

(二) *31665 UAS- NetrinA-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

(三) *25861 UAS-NetrinB-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

(四) *34698 UAS-NetrinB-RNAi X UAS-mCD8-GFP; repoGal4,tubGal80[ts]/TM6B*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

由(一)~(四)可知，*NetrinA*、*NetrinB* 在 RBG 被 RNAi 抑制，對 RBG 與感光細胞並無造成影響。

(五) *UAS-nls-LacZ X UAS-Dsred;GMR-Gal4*(對照組)

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

(六) *31665 UAS- NetrinA-RNAi X UAS-Dsred;GMR-Gal4*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

(七) *25861 UAS-NetrinB-RNAi X UAS-Dsred;GMR-Gal4*

Disc1	Disc2
-------	-------

RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。
------------------------------------	------------------------------------

(八) *34698 UAS-NetrinB-RNAi X UAS-Dsred;GMR-Gal4*

Disc1	Disc2
RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。	RBG 均勻分化，RBG 數量正常， 感光細胞軸突平行無空隙。

由(五)~(八)可知，*NetrinA*、*NetrinB* 在感光細胞被 RNAi 抑制，對 RBG 與感光細胞並無造成影響。

(九) *W*(一抗：repo)(對照組)

Disc1	Disc2
RBG 數量正常，無 RBG 沿著 Bowig's nerve overmigrate。	RBG 數量正常，無 RBG 沿著 Bowig's nerve overmigrate。

(十) *NetrinA mutant/FM7,act-GFP X NetrinA mutant/FM7,act-GFP*(一抗：repo)

Disc1	Disc2
RBG 數量正常，無 RBG 沿著 Bowig's nerve overmigrate。	RBG 數量正常，無 RBG 沿著 Bowig's nerve overmigrate。

(十一) *NetrinB mutant/FM7,act-GFP X NetrinB mutant/FM7,act-GFP*(一抗：repo)

Disc1	Disc2
RBG 數量正常，無 RBG 沿著 Bowig's nerve overmigrate。	RBG 數量正常，無 RBG 沿著 Bowig's nerve overmigrate。

(十二) *NetrinAB mutant/FM7,act-GFP X NetrinAB mutant/FM7,act-GFP*(一抗：repo)

Disc1	Disc2
由圖 33-2-a，RBG 數量正常，但在 同一平面有 Overmigration 之現象。 由圖 33-2-b、33-2-c，RBG 沿著 Bowig's nerve overmigrate。	由圖 33-1-a，RBG 數量正常。由圖 33-1-b、33-1-c，RBG 沿著 Bowig's nerve overmigrate。

由(九)~(十二)可知，*NetrinA* 及 *NetrinB* 共同突變(double mutants) 會有 RBG 的 overmigration 之現象。但 *NetrinA* 及 *NetrinB* 個別突變並不會有 RBG 的 overmigration 之現象。由此推論，*NetrinA* 和 *NetrinB* 具有功能上的重複性(functional redundancy)。

(十三)*W(1 抗：cut)*(對照組)

Disc1	Disc2
已分化(Differentiating)RBG 數量正常。	已分化(Differentiating)RBG 數量正常。

(十四)*NetrinA mutant/FM7,act-GFP X NetrinA mutant/FM7,act-GFP*(1 抗：cut)

Disc1	Disc2
已分化(Differentiating)RBG 數量正常。	已分化(Differentiating)RBG 數量正常。

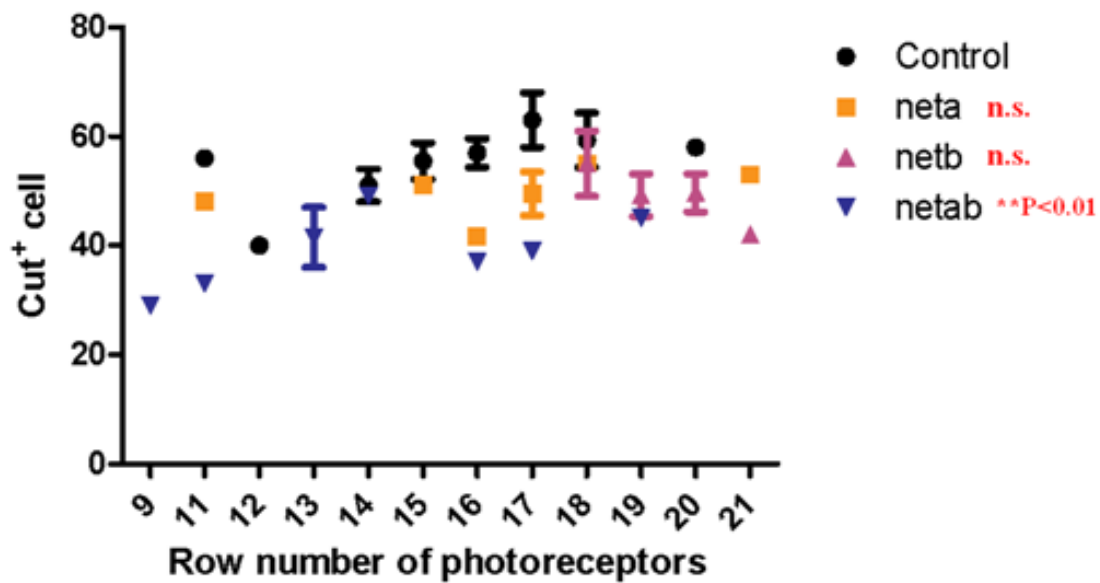
(十五)*NetrinB mutant/FM7,act-GFP X NetrinB mutant/FM7,act-GFP*(1 抗：cut)

Disc1	Disc2
已分化(Differentiating)RBG 數量正常。	已分化(Differentiating)RBG 數量正常。

(十六)*NetrinAB mutant/FM7,act-GFP X NetrinAB mutant/FM7,act-GFP*(1 抗：cut)

Disc1	Disc2
已分化(Differentiating)RBG 數量正常。Bowig's nerve 周圍無 overmigration RBG。	已分化(Differentiating)RBG 數量正常。Bowig's nerve 周圍無 overmigration RBG。

由(十三)~(十六)可知，*NetrinA*、*NetrinB* 共同突變(double mutants) 的 Bowig's nerve 周圍無 overmigration 的 RBG，因此 overmigration 的 RBG 皆非已分化(Differentiating)之 RBG。



圖三十八、*NetrinA* mutant, *NetrinB* mutant, *NetrinAB* double mutants 已分化神經膠細胞數(n.s. : non significance)

由(十三)~(十六)，計數已分化(differentiation)神經膠細胞數目，與其感光細胞排數作圖。由 non-normal distribution Kruskal-Willis test 分析，*NetrinAB* double mutants 有顯著差異，*NetrinA* 與 *NetrinB* mutant 皆無顯著差異。*NetrinAB* double mutants 不但可使 RBG 產生 overmigration，亦會減少已分化神經膠細胞(如：wrapping；WG)數量。由上述結果可推論，*NetrinAB* double mutants 可能會影響神經膠細胞的分化(differentiation)、增殖(poliferation)或兩者皆有影響，此部分須再進一步釐清。

由實驗二、三，推測 *NetrinA/NetrinB-Fra* 交互作用會影響 RBG 的移動。*NetrinA/NetrinB-Unc-5* 交互作用仍需要近一步實驗確認。又因 RBG 本會沿著感光細胞的軸突生長，*NetrinAB* double mutants、*Fra* mutant 的 RBG 會沿著 Bowig's nerve 的軸突生長。推測非 mutant 時可能存在某物質抑制 RBG 沿著 Bowig's nerve 的軸突生長，*NetrinAB* double mutants、*Fra* mutant 後造成某物質失去活性或消失，使得 RBG 沿著 Bowig's nerve 的軸突生長。

柒、結論

- 一、 RNAi 抑制 *Tincar*、*Unc-5* 及其受質 *NetrinA* 和 *NetrinB*，以及 *NetrinA* 及 *NetrinB* 個別缺失的突變，均無發現 RBG 和 photoreceptor 發育上的變化。
- 二、 *NetrinA* 及 *NetrinB* 共同缺失的突變(double mutants)或受體 *Frazzled* 的突變均會造成 RBG 產生 overmigration。包括沿 Bowig's nerve 的 overmigration 及與其他 RBG 同平面的 overmigration。但 overmigration 的 RBG 中並無已分化(differentiated)的 RBG。
- 三、 *NetrinA* 及 *NetrinB* 共同缺失的突變(double mutants)可能會影響神經膠細胞的分化(differentiation)、增殖(poliferation)或兩者皆有影響。
- 四、 *NetrinA/NetrinB-Frazzled* 交互作用會影響 RBG 的移動，而 *NetrinA* 和 *NetrinB* 具有功能上的重複性(functional redundancy)。

捌、未來展望

- 一、 釐清 *NetrinA* 和 *NetrinB* 為 RBG 或其他細胞釋放。
- 二、 釐清 *Unc-5* 是否亦在 RBG 移動扮演重要功能。

玖、參考文獻

1. Franzdóttir SR, Engelen D, Yuva-Aydemir Y, Schmidt I, Aho A, Klämbt C. Switch in FGF signalling initiates glial differentiation in the *Drosophila* eye. *Nature* **460**, 758-761(2009).
2. Marion Silies, Yeliz Yuva, Daniel Engelen, Annukka Aho, Tobias Stork, and Christian Klämbt Glial Cell Migration in the Eye Disc. *The Journal of Neuroscience* **27**, 13130-13139(2007)
3. Hummel T, Attix S, Gunning D, Zipursky SL. Temporal control of glial cell migration in the *Drosophila* eye requires gilgamesh, hedgehog, and eye specification genes. *Neuron* **33**,193-203(2002)
4. Rangarajan R, Gong Q, Gaul U. Migration and function of glia in the developing *Drosophila* eye. *Development* **126**, 3285-3292(1999)

【評語】 050012

定性分析做得很好，但部分結果可設法量化呈現較有說服力。

統計方式應加強背景知識。