

2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070002

參展科別 微生物學

作品名稱 探討四膜蟲中一被推定為和 dsRNA 相互作用之蛋白質在發展方面的作用

得獎獎項 大會獎：三等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 孫譽真、姚孟肇

作者姓名 戴莉庭、謝宜庭

關鍵字 四膜蟲、Drb3p、RNAi

作者簡介



摘要

四膜蟲(*Tetrahymena*)進行有性生殖的特定階段中，有 RNA interference 調控 DNA 割除(DNA elimination)的核重組現象。 Drb3p 具有 dsRNA 結合區域，推測為一 dsRNA 結合蛋白，其表現時間和四膜蟲進行 IES(internal excision sequence)的時期重疊，Drb3p 可能參與 RNA interference 的調控。

本實驗在 *DRB3* 前接上 *GFP* 序列，以觀察 Drb3p 在四膜蟲中的作用位置，再以 RNA 干擾術進行 *DRB3* 基因沉默(knockdown)以了解 Drb3p 對四膜蟲核重組的影響。結果顯示，Drb3p 主要出現在有性生殖時的新大核，也就是核重組 RNA interference 調控機制主要發生的位置，但由於基因沉默後仍有少量 *DRB3* 表現，我們尚未確定其對四膜蟲所造成的影響。於是我們改用基因剔除(knockout) *DRB3*，探討 Drb3p 的功用，然而就目前的實驗結果來說，Drb3p 對子代的大核製造並沒有顯著的影響，但並不能排除 Drb3p 對子代數目與生理可能造成影響。

未來，我們希望能更進一步的使用免疫沈澱法等方式研究 Drb3p 所結合的 RNA，以期對 RNA interference 領域有更深入的發現

Abstract

When *Tetrahymena* is in a particular stage of sexual reproduction, DNA elimination that affects nuclear recombination will be regulated by RNA interference.

Drb3p, which has dsRNA binding domains, is presumed to be a dsRNA-binding protein. Moreover, its performance time overlaps with the period that *Tetrahymena* is producing IES (internal excision sequence). Therefore, Drb3p may be involved in the regulation of RNA interference.

In this experiment, we connected a *GFP* sequence before *DRB3* to observe the acting position of Drb3p in the *Tetrahymena*. Then we use knockdown to silence *DRB3* in order to understand the impact of the nuclear reorganization of *Tetrahymena* without Drb3p. The results show that Drb3p mainly appears in the macronucleus, which is the position of nuclear regulatory mechanisms, RNA interference, mainly occurs. On the other hand, however, because there is still a small amount of gene performance after silencing *DRB3*, we couldn't determine the cause of *Tetrahymena* impact. Therefore, we changed our method. We used knockout to silence *DRB3* to explore the function of it. Yet, until now, there is no significant result that shows the production of macronucleus will be impacted without Drb3p, but we can't eliminate the impacts on the number and the physiology of progeny.

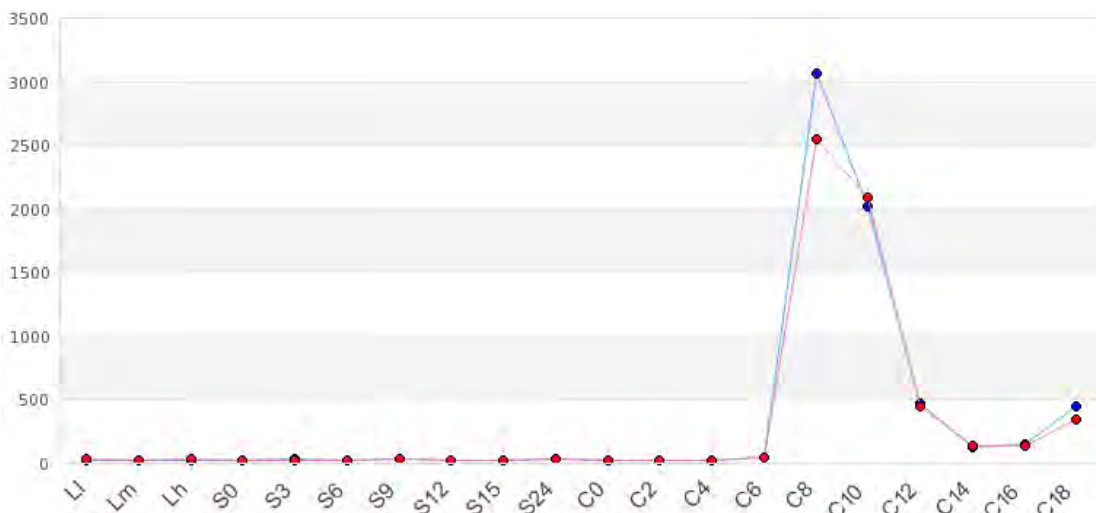
In the future, we hope that we can have some further exploration. For example, we will use immunoprecipitation to learn more about the RNA that bind to Drb3p. We expect that our research can make some deeper discovery in the field of RNA interference.

壹、前言

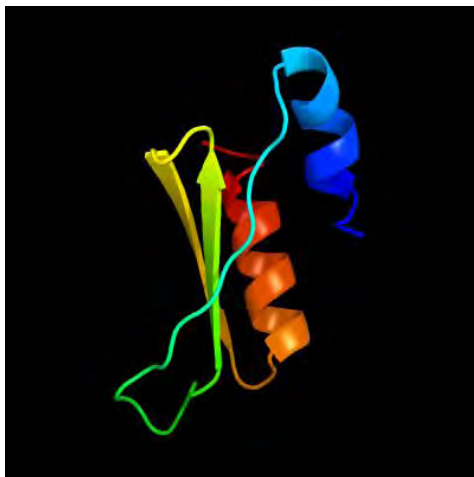
一、研究動機：

RNA 干擾 (RNA interference, RNAi), 是一種由雙股 RNA 所誘發的基因沈默現象。自 1990 年代於植物及線蟲中發現以來, 便被發現為許多遺傳機制的引發原因, 其中包括轉錄後基因沉默化 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)、轉座子 (transposon) 抑制、異染色質 (heterochromatin) 的形成等, 更有研究(Castel and Martienssen, 2013)指出, 動植物, 包括人體對於病毒的防禦, 也和 RNAi 息息相關。總的來說, RNAi 在維持基因體的穩定性上占了十分關鍵的地位, 也逐漸被應用於生物科技、癌症等疾病的治療, 是近年來生物學家反覆研究的一項重要發現。

四膜蟲是非常適合用來研究 RNAi 的一種模式生物。當其進行有性生殖時, 會進行一連串如內部剪接序列之基因重組, 其基本的機制便是 RNAi。我們從文獻中(Motl and Chalker, 2011)讀到一蛋白質 Drb2p, 它是一種雙股 RNA 結合蛋白 (dsRNA binding protein), 在四膜蟲行有性生殖進行內部剪接序列時, 協助小核分化成大核。而在針對內部剪接序列發生時間點 (接合生殖開始後的 8 小時至 16 小時), 進行基因表現分析後, 我們發現有另一段基因, 其表現時間在接合生殖開始後的 8 小時 (圖一), 且轉譯後的蛋白質經過胺基酸序列結構分析, 與 Drb2p 相似, 都具有雙股 RNA 的接合區域, 故推測此蛋白質也是雙股 RNA 結合蛋白, 並命名為 Drb3p (圖二)。本實驗目的在於確定 Drb3p 在大核發生過程中產生作用的位置與了解此蛋白質對於四膜蟲進行內部剪接序列的影響。



(圖一)、由圖可知 DRB3 的作用時間集中在有性生殖的 8~10 小時, 正好為新大核進行 DNA 割除的時候。



(圖二)、Drb3p 中的 61 個胺基酸序列在經過分析後的結構，推測其為雙股 RNA 的接合區域。

二、研究目的及研究問題：

本研究希望能找出 Drb3p 在四膜蟲中的功能，因此我們的目標為

- (一) 確認 Drb3p 在四膜蟲中作用的位置
- (二) 使 DRB3 無法表現並觀察其對四膜蟲有性生殖的影響
- (三) 以免疫沈澱法標與 Drb3p 作用的 RNA

貳、研究方法或過程

一、研究設備與器材

(一) 實驗生物：*Tetrahymena thermophile*

基因型

Strain	Genotype	Mating type
BII	Wild type	II
A*III	ND	III
Cu438	pmr1-1/ pmr1-1	IV
A*V	ND	V
Cu427	chx1-1/ chx1-1	VI
Cu428	mpr1-1/ mpr1-1	VII

(資料來源：Methods in Cell Biology, VOL 62 (2000))

(二) 培養基

1. SPP

每公升溶液含 Proteose Peptone 10gms、Dextrose 2gms、Yeast Extract 1gm、Sequestrine 0.03gms

2. Neff

每公升溶液含 Proteose Peptone 2.5gms、Yeast Extract 2.5gms、Dextrose 5gms、Ferric Chloride($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.0088g

(三) 藥品

10mM Tris-HCl (pH 7.4) (每公升溶液含 Tris Base 1.21gms)、10mM Hepes buffer、1X Penicillin-Streptomycin、1X Fungizone、CdCl₂、PBS buffer、DNA dye、DNA extraction Kit、Gel elution Kit、paromomycin、cyclohexamide、CaCl₂、spermidine、酒精、Paraformaldehyde

(四) 器皿用具

培養皿、錐形瓶、試管、微量吸管、載玻片、蓋玻片、尖底離心管 (tube)、column、mini column、24 孔盤、6 孔盤

(五) 儀器設備

4°C 冰箱、恆溫培養箱、恆溫震盪培養箱、離心機、超音波震盪機、基因槍、直徑為 0.6 μm 的金子微粒、螢光顯微鏡

二、將含有螢光蛋白序列的基因片段植入細胞以觀察 DRB3 之作用位置

(一) PIGF-MTT-GFP-DRB3-GW 的基因槍轉染

Day1

- 1、準備養有 *Tetrahymena* Cu427 與 Cu428 的溶液各 50mL 一瓶並放入 30°C 恆溫震盪培養箱培養一日

Day2

- 1、將 *Tetrahymena* Cu427 與 Cu428 放入 10mM Tris buffer，使他們飢餓以促使他們 mating
 - (1) 將 *Tetrahymena* Cu427 與 Cu428 以 25°C、2000 轉離心 3 min
 - (2) 取出後將培養液倒掉
 - (3) 各倒入 50mL 的 10mM Tris buffer 於 tube 中
 - (4) 重複步驟 (2)、(3)
 - (5) 將兩 tube 中液體各倒入一培養皿培養一日
- 2、檢查基因槍、直徑為 0.6 μm 的金子微粒 (儲存於 -20 °C) 等儀器是否明天可以使用

Day3

- 1、將前一天做過 starvation 的 *Tetrahymena* Cu427 與 Cu428 (以下稱為目標細胞) 倒一起以 mating 8 小時
- 2、將金子微粒裹上 PIGF-MTT-GFP-DRB3-GW (劑量可打四槍)
 - (1) 加 4 μL 的 PIGF-MTT-GFP-DRB3-GW (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 至 40 μL 的金子微粒並震盪 2-3 秒
 - (2) 加入 40 μL 冰過的 2.5M 氯化鈣震盪 2-3 秒
 - (3) 加入 16 μL 冰過的 0.1M 亞精胺 (spermidine) 並於 4 °C 下震盪 10 分鐘
 - (4) 放入離心機 3-5 分鐘
 - (5) 加入 200 μL 冰過的 70% 酒精並使之均勻分散在液體中
 - (6) 離心幾秒
 - (7) 以冰過的 100% 酒精重複以上動作
 - (8) 加入 40 μL 冰過的 100% 酒精
 - (9) 為了使液體均勻混和，使用超音波震盪機震盪 2-4 秒
 - (10) 取出後，一次 10 μL 放置於 macrocarries 上 (共四組)
- 3、集中目標細胞 (在其 mating 8 小時後)
 - (1) 將 50mL 的目標細胞以 2000 轉離心 3 分鐘
 - (2) 將離心後的上澄液用微量吸管取出
 - (3) 加入 25mL 10mM HEPES buffer 並均勻混和
 - (4) 以 2000 轉離心 3 分鐘
 - (5) 將離心後的上澄液用微量吸管取出
 - (6) 加入 1mL 10mM HEPES buffer 並均勻混和
- 4、將步驟 3 的目標細胞放入培養皿，並放入一棉紙在培養皿中。將金子微粒放入基因槍，以 900psi 的高壓將金子微粒打入目標細胞 (共四劑，分四次)
- 5、將棉紙取出並放入裝有 50mL 10mM Tris buffer 的 250mL 錐形瓶
- 6、將錐形瓶放入 30°C 恆溫震盪培養箱震盪 30 分鐘
- 7、取出錐形瓶放置室溫一日

Day4

- 1、將錐形瓶內液體倒入 tube 中，以 2000 轉離心 3 分鐘
- 2、取出上澄液並加入 50mL 混合 1X Penicillin-Streptomycin 以及 1X Fungizone 的 1X SPP
- 3、放入 30°C 恆溫震盪培養箱震盪 6 小時
- 4、加入 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ paromomycin 以選擇出基因轉移成功的細胞
- 5、分裝至 96 孔盤中

(二) 挑出擁有 PIGF-MTT-GFP-DRB3-GW *Tetrahymena* 的單一基因型

- 1、將已被基因槍轉染，養在加入 paromomycin 的 96 孔盤中的 *Tetrahymena* 放置約三天的時間。
- 2、挑選 96 孔盤中長得較多的 *Tetrahymena*，共計 12 株。每一株分別 transfer 到 24 孔盤中的一格，養 2~3 日左右。
- 3、用 drop marker 在培養皿蓋出數個 drop (buffer: SPP + paromomycin)，24 孔盤中的每一格各挑選 14 隻 *Tetrahymena*，各放到不同的 drop 中，不同的格子使用不同的培養皿，共 12 個培養皿，養 2~3 天。
- 4、每一個培養皿，各挑選一長滿 *Tetrahymena* 的 drop，將其 transfer 到 24 孔盤中，最後共挑出 12 株單一基因型的轉殖 *Tetrahymena*。
- 5、在 24 孔盤中養 5~6 天後，將 *Tetrahymena* transfer 到錐形瓶中 (buffer: SPP + paromomycin)

(三) 確認擁有 PIGF-MTT-GFP-DRB3-GW *Tetrahymena* 的 mating type

- 1、將實驗方法 2 所得之 12 種單一基因型的 *Tetrahymena* 以 Neff 培養基培養以減少養分的供給。1~2 天後，再將 1/10 體積的 *Tetrahymena* (100 μl) 置入 10mM Tris buffer 中做 starvation。
- 2、準備 tester，分別是 BII(II)、A*III(III)、Cu438(IV)、A*5(V)、Cu427(VI)、Cu428(VII)，括弧內為其交配型，並同樣以 buffer Neff 培養。
- 3、1~2 天後，再將 tester 放入 10mM Tris buffer 中做 starvation
 - (1) 各裝入 tube 中離心·2000 轉 3 分鐘
 - (2) 倒掉上層溶液，加入 buffer Tri-HCl
 - (3) 重複步驟 (1)、(2)
- 4、取上面步驟 1 所得之 12 種單一基因型的 *Tetrahymena*，使每一種基因型都分別和 6 種 tester 做 mating。
- 5、隔 5 小時後，觀察各基因型和 tester 的 mating 情形，無法成功 mating 的配對即代表該基因型的交配型與相配的 tester 相同，由此確定交配型。

(四) 確認 GFP 作用

- 1、做 starvation
 - (1) 將錐形瓶中每一基因型的 *Tetrahymena* 各 transfer 到 24 孔盤中，使用 buffer Neff 養 10 小時左右
 - (2) 各裝入 tube 中離心·2000 轉 3 分鐘
 - (3) 倒掉上層溶液，加入 buffer Tri-HCl

(4) 重複步驟 (2)、(3)

(5) 各放入 6 孔盤的一格中養 10 小時左右

2、加入 Cadmium 觀察

(1) 在 6 孔盤中加入 Cadmium，等待約一小時使其作用

(2) 每一格各滴一滴在載玻片上，蓋上蓋玻片

(3) 放到顯微鏡下觀察 GFP 訊號有無出現在細胞中

(五) 找出不同交配時段 Drb3p 於細胞中的分佈

1、做 starvation

(1) 將錐形瓶中每一基因型的 *Tetrahymena* 各 transfer 到 24 孔盤中，使用 buffer Neff 養 10 小時左右

(2) 各裝入 tube 中離心·2000 轉 3 分鐘

(3) 倒掉上層溶液，加入 buffer Tri-HCl

(4) 重複步驟 (2)、(3)

(5) 各放入 6 孔盤的一格中養 10 小時左右

2、找出不同交配時段 Drb3p 於細胞中的分佈

(1) 隨機挑選兩交配型不同的基因型進行交配，並在 buffer 中加入 Cadmium

(2) 於 4 小時後，將部分 *Tetrahymena* 加到小離心管中，以 PBS buffer wash 後加到有 2% Paraformaldehyde 的 PBS buffer 中作用 10 分鐘以固定細胞，離心，倒掉上層溶液，並用 PBS 重複清洗兩次，最後加入 DNA dye (DAPI)。

(3) 滴一滴到載玻片上，蓋上蓋玻片後封片

(4) 放到顯微鏡下觀察

(5) 於 6、8、10、12、14、16 小時重複 (2)、(3)、(4) 步驟

三、以 RNAi (基因沉默) 探討 DRB3 的作用方式

(一) pD5H8-MTT-DRB3-RNAi 的基因槍轉染

方法同二之 (一)

(二) 挑出擁有 pD5H8-MTT-DRB3-RNAi *Tetrahymena* 的單一基因型

方法同二之 (二)

(三) 確認擁有 pD5H8-MTT-DRB3-RNAi *Tetrahymena* 的 mating type

方法同一之 (三)

(四) 以 RNAi (基因沉默) 探討 DRB3 是否影響子代的產生

(此部分我們一共做兩組)

1、做 starvation

(1) 隨機選取上面步驟所得之兩基因型，以及 Cu427、Cu428 的 *Tetrahymena*

(2) 各裝入 tube 中離心·2000 轉 3 分鐘

(3) 倒掉上層溶液，加入 buffer Neff

(4) 重複步驟(2)、(3)

2、確認基因沉默作用

(1) 使兩基因型之 *Tetrahymena*，以及 Cu427 和 Cu428 交配

(2) 約 8 小時後，將一對對正在交配的 *Tetrahymena* 分別挑入用 drop marker 蓋過的培養皿的 drop 中，分成 3 個培養皿：

A. Cu427 和 Cu428 (對照組)，Neff 培養

B. 上一個步驟所挑之兩個基因型，以 Neff 培養

C. 上一個步驟所挑之兩個基因型，以 Neff 培養，並加入 Cadmium (0.05 $\mu\text{g/mL}$) 以引起 RNAi 作用

3、約 2~3 天後左右，準備另 3 個培養皿，用 drop marker 蓋上培養液 SPP 與 paromomycin

4、將上述 3 部分的 *Tetrahymena* 以 drop marker 分別蓋到新準備的 3 個培養皿中

5、隔天觀察 *Tetrahymena* 的存活情形

(五) 以 RT PCR 檢測 RNAi 結果

1、選擇 2 基因型的 *Tetrahymena*，在 starvation 後使之做 mating，分成兩組，一組加入 Cadmium，另一組沒有，作為對照組。

2、於 8 小時分別抽出 *Tetrahymena* 的 mRNA，再將其反轉成 cDNA，以 Random Hexamer 和 Oligo dT 兩種方式

3、做 PCR，分成 3 組：

A. 第一段 intron 兩旁的片段

B. 第二段 intron 兩旁的片段

C. 包含兩 intron 的片段

每一組再分成 5 部分：

a. ddH₂O

b. 沒有加 Cadmium，以 Random Hexamer 方式轉成的 cDNA

c. 有加 Cadmium，以 Random Hexamer 方式轉成的 cDNA

d. 沒有加 Cadmium，以 Oligo dT 方式轉成的 cDNA

e. 有加 Cadmium，以 Oligo dT 方式轉成的 cDNA

總共 15 管，做 PCR

4、15 管分別加入 DNA dye，然後跑 gel 以觀察結果

三、以基因剔除探討 DRB3 的作用方式

(一) DRB3 基因剔除 (DRB3 neo5 KO construction)

1、得到 5' fragment 以及 3' fragment

(1) 加入下列物品至 column：

Temple 427 genomic DNA	2 λ
Primer For	2 λ
Primer Rev	2 λ
5X Buffer	4 λ

MgCl ₂	2 λ
dNTP	2 λ
ddH ₂ O	5 λ
Enzyme	1 λ

(2) 進行 PCR

2、Cloning 接到 pCR II

(1) 加入下列物品至 column 中：

PCR 產物	4 λ
Salt	1 λ
PCR II 載體	1 λ

(2) 放置於室溫作用 1 小時

3、放入 E. coli 大量生產

(1) 以熱激法 (heat shock transformation) 放置 42°C, 45 秒

(2) plating carb/LB plate

(3) 以 37 °C 培養

4、隔天後取出質體

(1) 取 1.5mL 的 E. coli 菌液至離心小管中，並離心 9000rpm, 1 分鐘，去除上層液體，依序加入 MX1 buffer 200 μ L、MX2 buffer 250 μ L 以及 MX3 buffer 350 μ L，並離心 9000rpm, 10 分鐘

(2) 取出上澄液並將之放入 mini column 中，並離心 9000rpm, 1 分鐘

(3) 加入 WN buffer 500 μ L，並離心 9000rpm, 1 分鐘

(4) 倒出廢液後，加入 WS buffer 700 μ L，並離心 9000rpm, 1 分鐘

(5) 倒出廢液後，離心 9000rpm, 1 分鐘

(6) 倒去廢液後，加入 elute Buffer 20 μ L 至 mini column 中，並再離心 13000rpm, 1 分鐘

(7) 測量質體 DNA 濃度

5、確認是否為正確的 5' fragment 與 3' fragment

(1) 放置 37°C 1 小時以待 enzyme EcoRI 作用

(2) 跑膠

6、準備含有 Neo5 cassette 的 vector, 用限制酶將其切斷並做 gel eluted 取出我們要的片段

(1) 加入下列物品作用

DNA	20 λ
10X BSA	3 λ
BamHI	1.5 λ
ACC65I	1.5 λ
Buffer	3 λ
ddH ₂ O	1 λ

(2) 加入 DNA dye 後跑膠

(3) 切下膠中我們需要的片段

(4) 用 QG buffer 使之溶解並放入 mini column 中

- (5) 以 13000 轉離心 1 分鐘
- (6) 倒掉上清液，加入 PE buffer
- (7) 以 13000 轉離心 1 分鐘
- (8) 加入 EB buffer 30 μ L
- 7、用 ligase 使之和 5' fragment 連接
- 8、放入 E. coli 中，檢測其存活情形
 - (1) 以熱激法 (heat shock transformation) 放置 42°C，45 秒
 - (2) plating carb/LB plate
 - (3) 以 37 °C 培養
- 9、從 E. coli 中取出 vector，並以之重複步驟 (6) ~ (8)

(二) DRB3 neo5 KO construction 的基因槍轉染
同二之 (一)

(三) 挑選出基因剔除成功的細胞

- 1、將以 paromomycin 篩選過的 transformed 細胞到加有 cyclohexamide 的培養液中以挑選出小核成功被植入 DRB3 neo5 KO construction 的細胞
- 2、隔 1~2 天後，挑選出能在 cyclohexamide 的培養液中存活的細胞，並從中挑 single 培養

(四) 取得大小核都為 DRB3 neo5 KO construction 的細胞

- 1、將步驟 3 基因剔除成功的細胞分別與 B*6 與 B*7 做有性生殖 (共有 4 組，G01-G04)
- 2、進行有性生殖 5 小時後挑 pair (各取 6 個 pair)
- 3、進行有性生殖 8 小時後將無法完成有性生殖的細胞分別獨立至培養液中培養
- 4、與 Cu427、Cu428、BII 分別進行有性生殖以檢測它大核的基因型
- 5、將 DRB3 neo5 KO construction 基因型為 Cu427 與 Cu428 進行有性生殖 (G11-G16)
- 6、將加入 pm 以辨別 G11-G16 有哪些細胞大小核具有 DRB3 neo5 KO construction

(五) 以南方墨點法檢測 DRB3 neo5 KO construction 是否在染色體上正確的位置

- 1、從細胞或組織中用酚/氯仿反覆抽提蛋白質並用無水乙醇沉澱的方法製備基因組 DNA (gDNA)
- 2、限制性酶切基因組 DNA
- 3、將酶切產物電泳分離 (electrophoretic separation)
- 4、毛細轉印或電轉印並固定於 NC 膜或尼龍膜上
- 5、在膜上與標記探針雜交

6、洗膜後可觀察雜交結果

(六) 將大小核具有 DRB3 neo5 KO construction 的細胞進行數次有性生殖，觀察其對細胞的影響

1、使挑選出來之細胞饑餓，以促使其交配

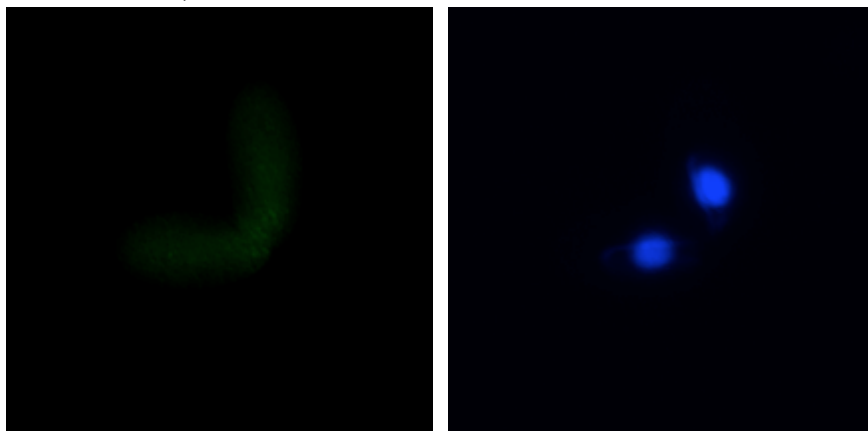
2、將交配後的細胞放入含有 cyclohexamide 及 6mp 的藥物中以觀察是否為子代

3、再將第一代子帶進行交配，再放入含有 cyclohexamide 及 6mp 的藥物中以觀察是否會產生第二代子代

參、研究結果與討論

一、將含有螢光蛋白序列的基因片段植入細胞以觀察 DRB3 之作用位置不同的交配時段 Drb3p 於細胞中的分佈：

四小時後：

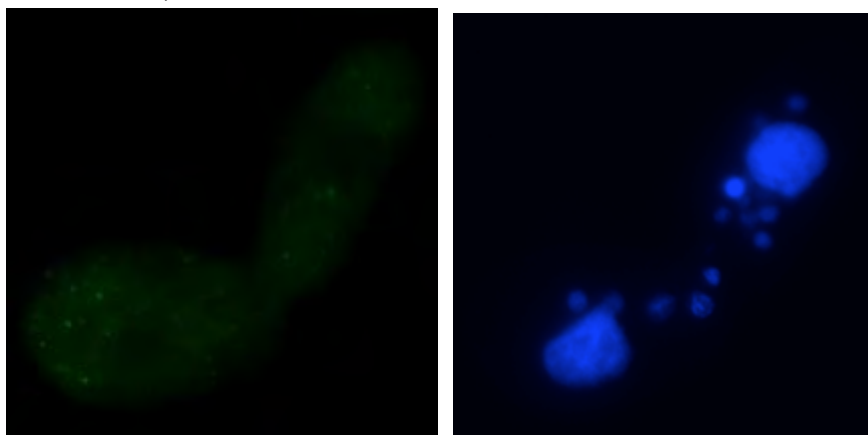


(GFP-Drb3p)

(DAPI)

從右圖可知出現線狀舊小核以及舊大核。從左圖可知 Drb3p 尚未明顯作用。

六小時後：

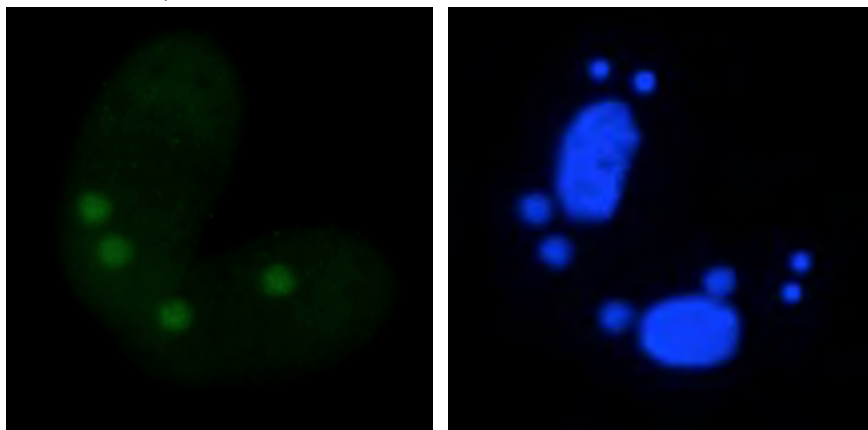


(GFP-Drb3p)

(DAPI)

從右圖可知舊小核經過減數分裂後形成四個小核。從左圖的亮點可知 Drb3p 尚未明顯作用。

八小時後：

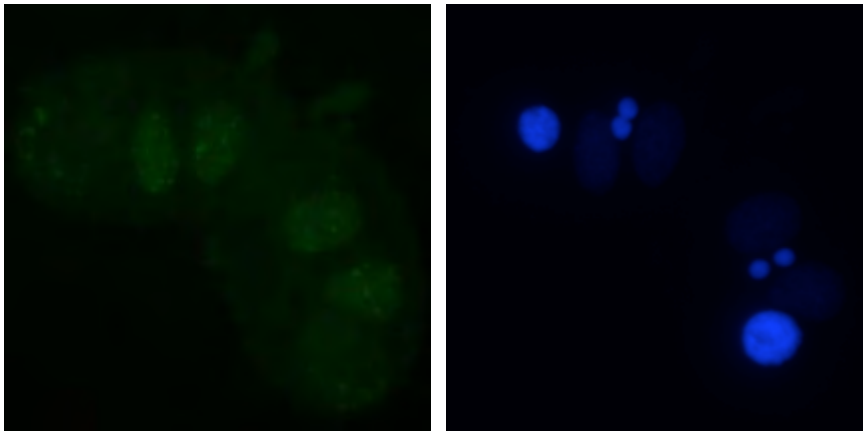


(GFP-Drb3p)

(DAPI)

比對左圖和右圖，可以發現在此時段，Drb3p 主要作用於四個小核中的其中兩個。

十小時後：

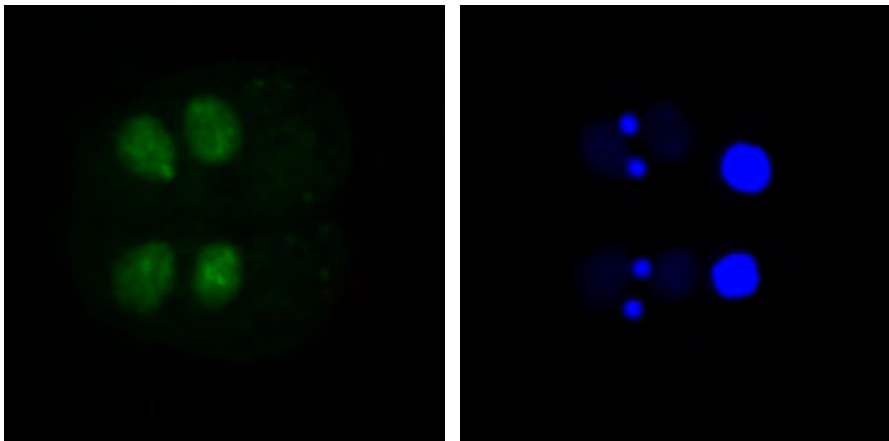


(GFP-Drb3p)

(DAPI)

從上兩張圖可知，Drb3p 所作用的兩小核在這個期間轉變成兩個新大核。

十二小時後：

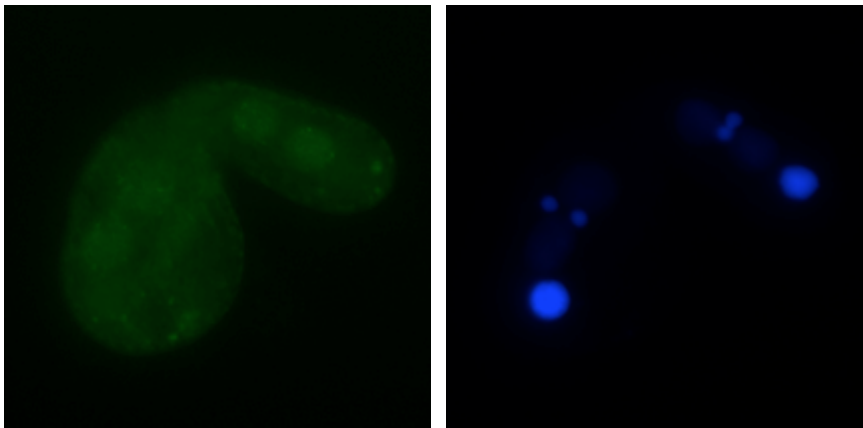


(GFP-Drb3p)

(DAPI)

從上兩張圖可知，Drb3p 仍作用於新大核中。

十四小時後：

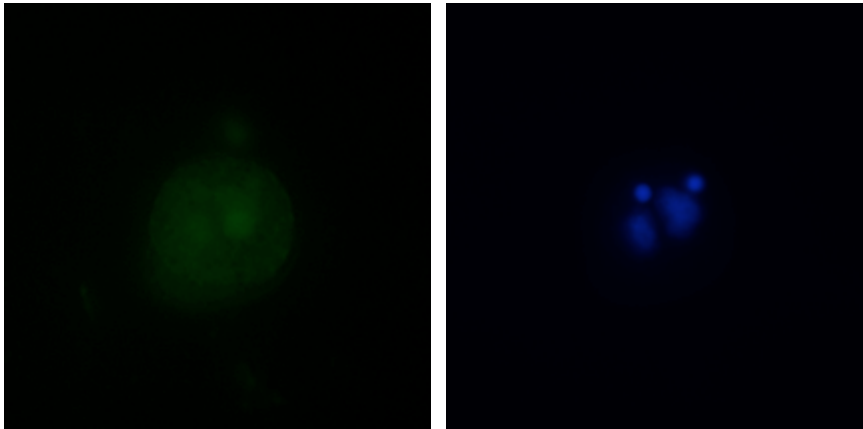


(GFP-Drb3p)

(DAPI)

從十二小時後與十四小時後的圖可知，兩新小核與兩新大核已經成形，而 Drb3p 的作用也已不明顯。

十六小時後：



(GFP-Drb3p)

(DAPI)

從十六小時的圖可知，有性生殖大致結束，而 Drb3p 的作用也已不明顯。

由上面數張圖可知，Drb3p 於 mating 8~12 小時的時候作用較為明顯，此階段也正好是新大核形成的時候。而再對比 DAPI 的圖可明顯看出，Drb3p 正好也作用於新大核中，與我們所做的推論，Drb3p 有可能會影響大核生成時的 RNAi 機制，在表現位置上是一致的。另外，由於 promoter 為我們加入 Cadmium 後強制開啟，因此會發生 overexpression 的現象，使整隻四膜蟲都分佈著 Drb3p。而我們所認定的 Drb3p 作用位置，為圖中亮點聚集的地方，那才是在正常情況下 Drb3p 會作用的地方。

二、以 RNAi (基因沉默) 探討 DRB3 的作用方式

(一) 確認 Drb3p 對有性生殖的影響

第一次確認：

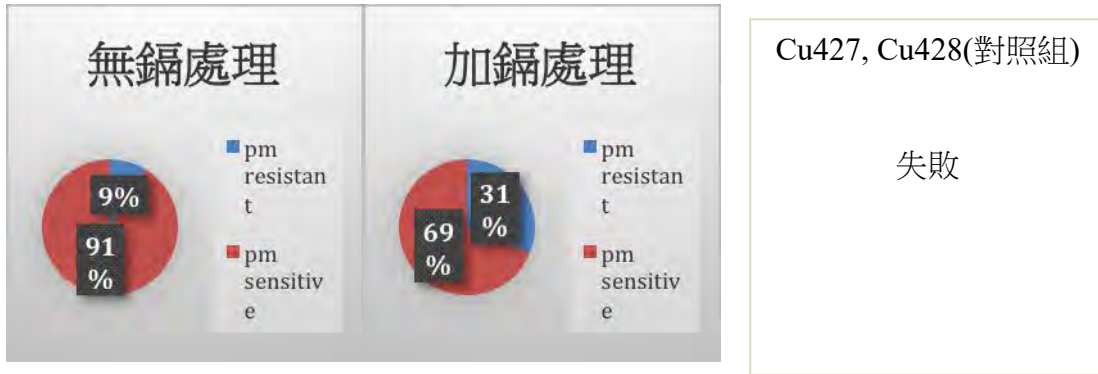
隨機選擇第一組的 4、5(A 組)以及第二組的 3、6(B 組)進行 mating

細胞濃度： 3×10^8 cells/mL

A 組：



B 組：



pm resistant 為可以抵抗而活下來的四膜蟲，pm sensitive 為無法抵抗而死亡的四膜蟲。此外，無鎘處理為沒有誘發基因沉默的部分，加鎘處理為誘發基因沉默的部分，Cu427, Cu428 則為沒有經過任何處理的對照組。

在我們的實驗中，原本每一隻四膜蟲都被植入了質體，因此都應該能抵抗 pm，但在我們使之 mating，進行有性生殖後，含有質體的舊大核被分解，由小核複製而成的新大核取代，因此將不會含有質體，無法抵抗 pm。而按照我們的假設，假如 Drb3p 確實和新大核的生成有有關係，那被我們基因沉默 DRB3 的四膜蟲將無法完成有性生殖，其舊大核就會保留，可以抵抗 pm。但由上表可知，儘管 B 組在加鎘處理部分，pm resistant 的比例確實比無鎘處理還要多，但 pm resistant 的比例比 pm sensitive 還要低；而在 A 組的部分，甚至出現無鎘處理的 pm resistant 的比例比較高的不同情況，我們認為實驗在操作時可能出現失誤，因此決定重新進行一次此實驗。另外，B 組的 Cu427, Cu428 部分因為操作技術原因失敗。

第二次確認：

隨機選擇第一組的 1、6(C 組)以及第二組的 1 與第一組的 2(D 組)分成兩組，各有兩盤進行 mating

C 組之一：



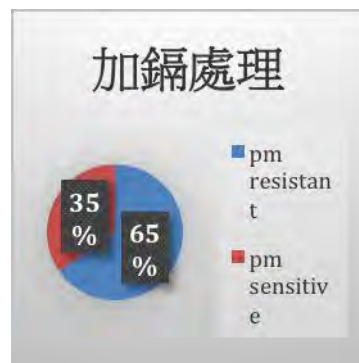
C 組之二：



D 組之一：



D 組之二：



由表中可知，就 C 組部分，不管有沒有加鎘，大部分的四膜蟲皆成功地完成有性生殖。而從 D 組結果來看，不管有沒有加鎘，其完成有性生殖的比例都不高，我們推測 D 組產生之後代的小核並不健全，此結果不足以採信。

經過兩次實驗後，結果皆和我們的假設不同，我們推測有下列幾項原因：

1. 我們的基因沉默沒有成功的抑制 DRB3 的表現。
2. 除了 Drb3p，尚有許多蛋白參與四膜蟲中的 RNAi 機制，而其並非關鍵。
3. 假設錯誤，Drb3p 和 RNAi 並無關係。

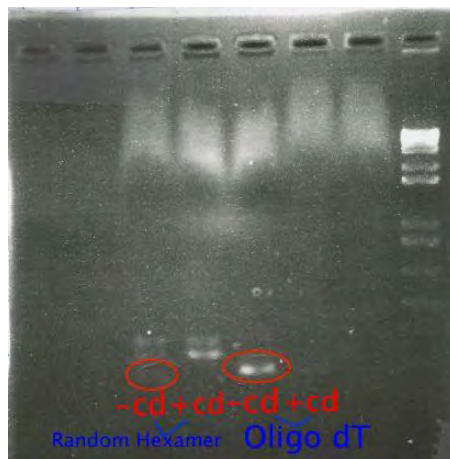
(五) 反轉錄 PCR

為了檢驗實驗 (四) 失敗的第一種可能原因，我們誘發基因沉默後抽出 RNA，做 RT-PCR



(圖六)

圖六為以第一段 intron 兩旁片段為起始做 PCR 所得的結果。為了增加實驗成功的機率，我們分別使用 Random Hexamer 以及 Oligo dT 兩種 primer 將 RNA 轉成 cDNA，每一種都分為加鎊處理以及無鎊處理。由圖中可看出，無鎊處理比加鎊處理在大約 300bp 的區域有較明顯的一個片段（如圖中紅圈裡的部分），和 DRB3 扣掉 intron 後的 321bp 符合。因此可知，我們的基因沉默確實是有效果的。可是在加鎊處理的部分，仍然可看出些許該片段，可見基因沉默並沒有完全抑制住 DRB3 的表現。



(圖七)

圖七為以第二段 intron 兩旁片段為起始做 PCR 所得的結果，在操作上與第一段 intron 兩旁片段為起始的相同，得到的結果也一樣。基因沉默的確減少了 DRB3 的表現，不過並不完全。



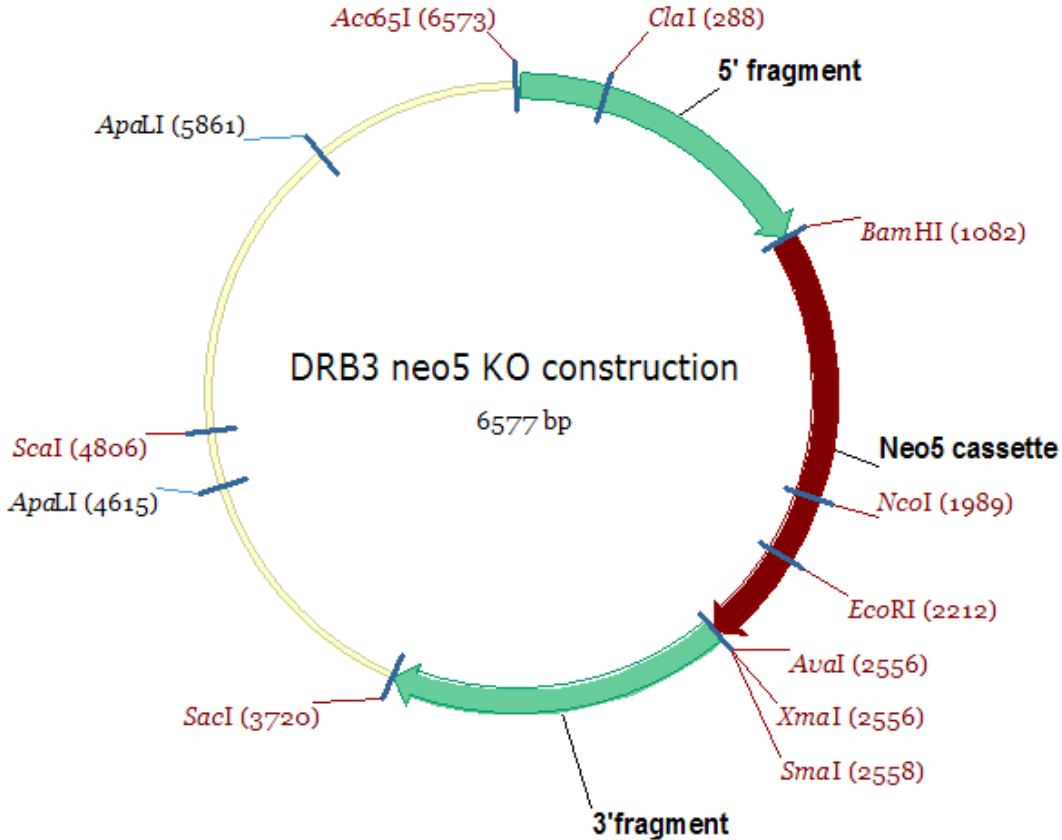
(圖八)

圖八為包含兩 intron 的片段所 PCR 出的結果，不過並沒有看到東西。推測是因為 PCR 時的溫度不正確，導致實驗失敗。

三、基因剔除 DRB3 以確認其在四膜蟲的作用

(一) 構築轉殖基因質體

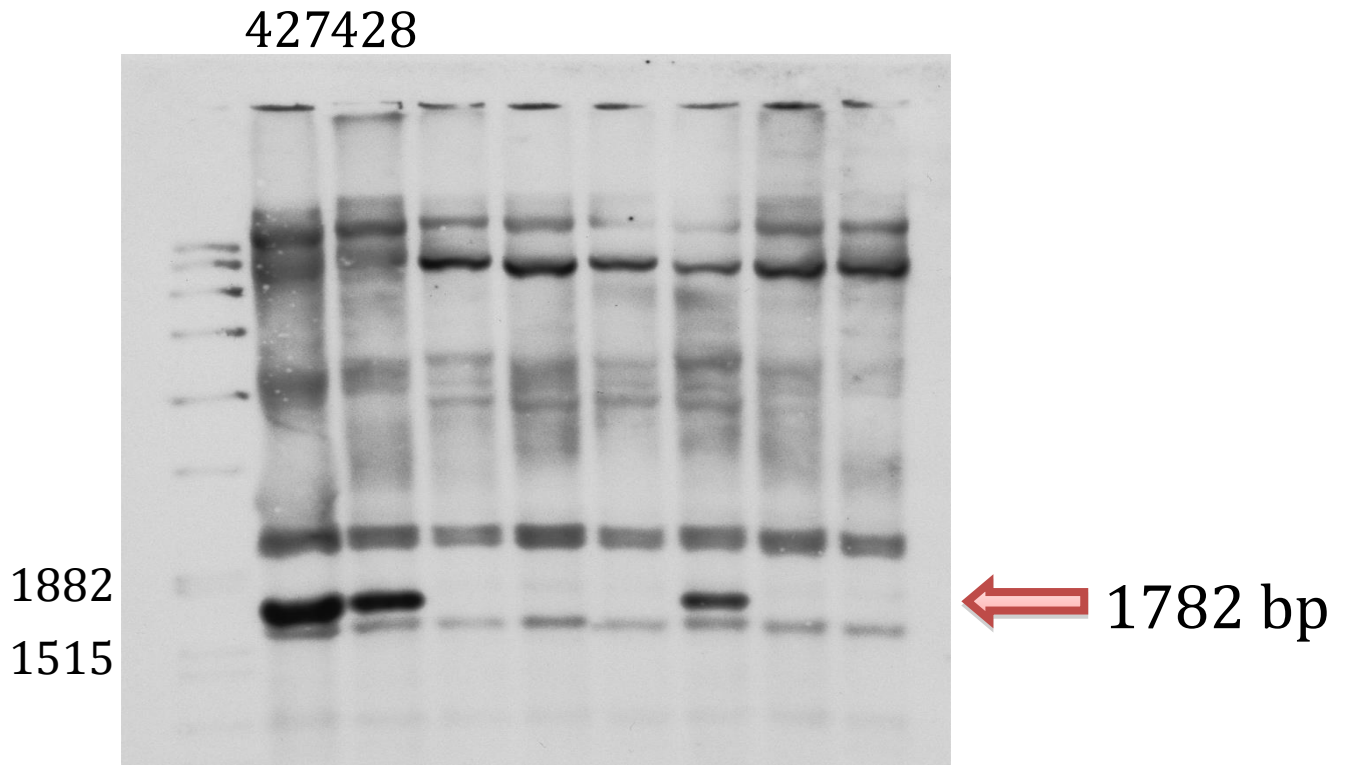
我們使用此自製之轉殖基因質體 (圖九)。如圖所示，此質體包含 DRB3 之 5' 端及 3' 端之部分，讓我們可以進行同源重組互換以基因剔除 DRB3



(圖九)

(二) 以 Southern Blot 確認基因剔除之結果

我們從經過交叉交配後所選擇出的大核、小核皆為無 DRB3 之同型核子的細胞當中選出六種基因型，也就是第一子代，分別命為 1~12，其中 1 和 2、3 和 4、5 和 6、7 和 8、9 和 10、11 和 12 為同一，挑出 1、3、5、7、9、11 做南方墨點法以確認基因剔除之成果



(圖十)

圖十為南方墨點法之結果。如圖所示，427、428 為對照組，而 7 跟對照組一樣在 1782bp 左右的位置有檢驗出 DNA，其他組則沒有。而 1782 正好是 DRB3 的大小，由此我們推斷，除了 7 之外的其他基因型皆為我們成功完全剔除掉 DRB3。

(三) 將被成功基因剔除的細胞進行交配，觀察其是否會產生子代

最初我們進行基因轉染的細胞 Cu427 帶有可以抗 cy 藥物的基因，Cu428 中則含有抗 6mp 藥物的基因，因此我們所篩選出的第一子代(1~12 號)，只能抗 cy 或者是 6mp。而我們將第一子代進行雜交後，如若有可同時抗 cy 和 6mp 的細胞，我們就可以確定其為第二子代，即下表中紅色數字所呈現之狀況：

strain	viable	cy	6mp	cy, 6mp
427X428	72/88	50/72	24/72	23
4X427	84/88	72/84	58/84	58
6X427	60/88	42/60	23/60	23
10X428	77/88	43/77	14/77	14
4X10	79/88	37/79	23/79	11

6X10	59/88	29/59	13/59	8
------	-------	-------	-------	---

由上表可知，在我們剔除 DRB3 後，四膜蟲仍能順利產生子代。因此我們無法由此判斷其和有性生殖的關係。

(四) 推論

我們利用基因沉默與基因剔除降低與消除 DRB3 的作用，對四膜蟲有性生殖產生子代仍沒有明顯的影響，故推論 DRB3 不為 DNA 割除的主要調控基因，有其他同家族的基因能代替或協助 DRB3 進行調控。

肆、結論與應用

- 一、在四膜蟲進行有性生殖，小核轉變成新大核的過程中，Drb3p 的作用位置在形成中的新大核裡。
- 二、以 RNA 干擾術進行基因沉默來降低 DRB3 影響的結果並不顯著。
- 三、以 RT-PCR 檢測，DRB3 並未完全被抑制，仍有少量表現。
- 四、以基因剔除去除 DRB3，對子代的產生目前沒有顯著的影響，但其他功能性的分析如子代數量與生理影響等還在進行中。
- 五、目前推測剔除 DRB3 對 DNA 割除並沒有顯著的影響。

伍、參考資料及其他

1. 鄭朝營、吳泰霆、趙如蘭、姚孟肇 (2013)。雙核的奧秘—四膜蟲。科學人，131，82-87。
2. Jason A. Motl and Douglas L. Chalker (2011). Zygotic Expression of the Double-Stranded RNA Binding Motif Protein Drb2p Is Required for DNA Elimination in the Ciliate *Tetrahymena thermophile*. *Eukaryot Cell*; 10(12): 1648 - 1659.
3. D. Chalker and M. C. Yao (2011) DNA elimination in Ciliates: Transposon Domestication and Genome Surveillance. In *Annual Review of Genetics Vol. 45*, (p227-246) (2011).
4. Denis H. Lynn and F. Paul Doerder (2012). The Life and Time of *Tetrahymena*. In *Methods in Cell Biology*, Vol 109 (p11-27).
5. Katherine M. Karrer (2012). Nuclear Dualism. In *Methods in Cell Biology*, Vol 109 (p29-52)
6. Stephane E. Castel and Robert A. Martienssen (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet.* 2013 Feb;14(2):100-12

【評語】 070002

成果的顯現有限，更重要的生物功能不明顯，Drb3p 到底是結合哪些 dsRNA，這些 dsRNA 的序列有沒有共同的問題有進一步探討空間。Drb3p knock down 與 knockout 有 Western blot 的結果會更有說服力。