

# 2018 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070003

參展科別 微生物學

作品名稱 在酵母菌中被熱休克蛋白 90 所保護的遺傳  
變異之探討

得獎獎項 大會獎：二等獎

就讀學校 臺中市立臺中第一高級中學

指導教師 龔雍任

作者姓名 林文德

關鍵詞 熱休克蛋白 90、遺傳緩衝、酵母菌

## 作者簡介



我是林文德，目前就讀台中一中數理資優班二年級，平時喜歡彈鋼琴及聽音樂。

從高一開始，生物無疑是我抱有最濃厚興趣的科目，在邏輯思考、建立實驗架構的時候，最能讓我感受到理性的魔力，特別是當在作實驗，能夠作出與實驗預期相同的結果的時候，更有一種成就感，而且還能增強我對一件事的印象，於是我秉著動手做的愛好，開始了生物專題的旅程。

## 摘要

基因型的改變會導致表現型的改變，然而，有一種稱為遺傳緩衝的效應，能隱蔽基因型變異，維持表現型穩定。由於某些遺傳變異不適合生物的原始環境，卻能被保護，使在各種環境中持續演化。從前人的果蠅研究發現，若剔除熱休克蛋白 90 能夠使其不同遺傳品系間的基因型變異被顯露出來；而在酵母菌的研究中，剔除熱休克蛋白 90 會增加在環境擾動時的生長差異，因此熱休克蛋白 90 被認為有參與遺傳緩衝效應。更重要的是，熱休克蛋白家族普遍存在於所有真核生物中。為一窺遺傳緩衝效應機制的原貌，本研究誘發釀酒酵母菌菌種 196 的突變、增加其基因型的多樣化，並以 **doxycycline** 環境及高溫環境營造環境壓力，以降低酵母菌 196 及其突變株的基因 Hsc82 之表現量，找出含有因為突變而被熱休克蛋白 90 所保護的基因的突變株。希望透過找到這些突變株以了解，有哪些基因突變會被熱休克蛋白 90 所保護，並進而推論人類基因的突變是否也能依循此機制被隱蔽。

## Abstract

Genetic change results in the change in phenotype. Nevertheless, a biological mechanism called “genetic buffering” have a surprisingly ability of maintaining a stable phenotype despite the genetic mutations. Some of the genotype don't fit in their original environment, but they can be buffered and become cryptic due to the potential intrinsic evolvability of Hsp90-buffered traits, which enable creatures to continuously evolve in all kinds of environment. According to the previous research with *Drosophila*, the Hsp90 gene knock-out revealed the cryptic genetic variations between different strains. On the other hand, according to the research in *S. cerevisiae*, the Hsp90 gene knock-out increased the growth differences under environmental stress. Therefore, Hsp90 is speculated to involve in genetic buffering. Most importantly, Hsp90 is an ubiquitous eukaryotic chaperone. To shed the light on the mechanism of genetic buffering, this research mutated *S. cerevisiae* strain 196 to create a variable genetic background. Furthermore, the environmental stress by using doxycycline and heat was established to lower down the expression of Hsc82 in 196 strain and mutants of 196 strain to find the mutants which contained mutant gene buffered by Hsp90. Eventually, these researches could be used to speculate that whether the mutations in human gene are also buffered with the aid of Hsp90.

# 壹、前言

## 一、動機

癌症，在國內已經連續 34 年蟬聯國人 10 大死因的首位，國際抗癌聯盟(UICC)指出，癌症每年在全球導致超過 800 萬人死亡，在未來的 20 年內，世界癌症死亡人數將達到每年 2400 萬人。換句話說，將 2035 年與現在相比，會有三倍的人口死於癌症。而全球癌症發生率亦逐年提升，根據世界衛生組織 2012 年最新資料顯示，全球癌症發生率在四年內增加了 11%，全球新發病例即高達 1,410 萬人。

癌症的成因有很多，其中大部分是由於基因突變造成的，但其背後的機制至今仍尚未明瞭，怎麼樣的基因突變會造就癌症，至今依舊是未解之謎。此時筆者在國際期刊 <Cell>上，看到了一篇在 2017 年 2 月 13 日，由 Karras 等人所共同發表的文章<HSP90 Shapes the Consequences of Human Genetic Variation>，其中的實驗已經確定，Hsp90 在疾病產生的過程中，扮演著相當重要的角色(Karras *et al.*, 2017)。於是，筆者開始起手查詢先前有關於 Hsp90 的研究，並找到了 Hsp90 的重要性是在於其具有遺傳緩衝效應 (Rutherford *et al.*, 2008)，但是其詳細的機制仍然不明；因此筆者打算利用釀酒酵母作為模式生物，以探討那些遺傳變異在酵母菌中，會被熱休克蛋白 90 所保護，進而更加了解遺傳緩衝效應的機制。

## 二、研究目的

- (一) 找出被熱休克蛋白 90 所保護的突變菌株
- (二) 確認所選菌株生長遲緩性狀是單基因遺傳或為多基因遺傳

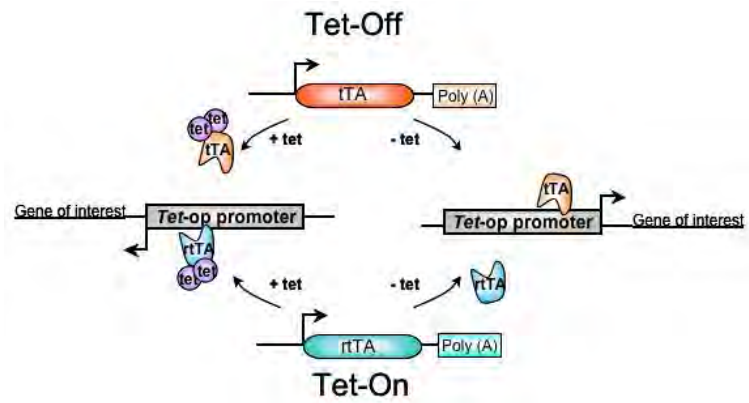
## 貳、研究方法與過程

### 一、固態培養基塗盤

實驗細胞取自中研院分生所 N411 實驗室所構造出的酵母菌株 169(R1158),196(JYL4196)。(如表一所示)169 為 WT，而 196 改自 169，但剔除了會因為熱休克而誘發(Inducible)的 Hsp82 基因，保留持續表現(Constitutive)的 Hsc82 基因，並在我們要調控的基因(Gene of interest)，Hsc82，其熱休克轉錄因子 1(Hsf1)上接上 Tet promoter，也就是四環素轉錄調控系統 (Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation) 的啟動子。四環素轉錄調控系統分為兩種類型：Tet-On 系統和 Tet-Off 系統。在 Tet-On 系統中，有四環素類化合物存在時，對應基因表達會打開。而在 Tet-Off 系統中，有四環素類化合物存在時，對應基因的表達會關閉。196 使用 Tet-off 的系統，並用去氧羥四環素(Doxycycline,簡稱 Dox)作為調控因子，來抑制 Hsc82 的表現量。(如圖一所示)

表一、實驗所使用的 169 及 196

Strain	Genotype	Reference or source
GFP-tagged library	Isogenic to ATCC 201388; <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ORF-GFP::HIS3</i>	(Huh et al., 2003)
R1158	Isogenic to BY4741; <i>URA3::CMV-tTA MATa his3-1 leu2-0 met15-0</i>	(Hughes, 2000)
JYL4196	Derived from R1158; <i>hsp82ΔNAT tetO7-HSC82::kanMX4</i>	This study



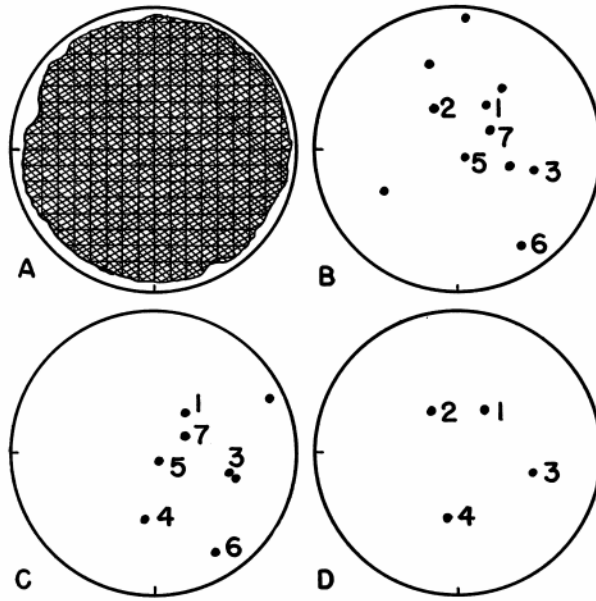
圖一、四環素轉錄調控系統

(Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation)

- (一) 種菌 169,196 在有 3c.c.YPD(Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) 培養液的試管當中，放入在 28°C 的 Incubator 的 Roller drum 中 15 小時。
- (二) 取 100  $\mu$ l 菌+900  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O(稀釋 10 倍)放入 cuvette 用吸光儀測量吸光值，計算出濃度為 10<sup>6</sup>cells/c.c.應取試管中多少菌再補多少 ddH<sub>2</sub>O 至 1c.c.於 1.5c.c. microfuge tube 中。
- (三) 每次取 100  $\mu$ l 再補 900  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O，補至 1c.c.到另外一個 microfuge tube，重複 3 次使最終濃度為 10<sup>3</sup>cells/c.c.。
- (四) 取 100  $\mu$ l, 10<sup>3</sup>cells/c.c.的菌，利用玻璃珠塗盤至 YPD 培養基上，放入不同溫度的 Incubator 中培養。

## 二、複製平皿 (replica plating)

將培養皿上所有的菌落以彼此相對位置不變的情況下轉移至另一固態培養基時，以一片絲絨布輕壓培養皿上的菌落，再將之輕壓至另一乾淨的培養基上，透過放置於不同的溫度及含藥物培養基中，即可篩選功能有缺陷的突變株，或是分辨對溫度或是對藥物敏感的菌株，例如將 A(母盤)複製到 B、C、D 盤挑出所選菌株。(如圖二所示)



圖二、複製平皿 (replica plating)

### 三、Spot assay

Spot assay 是一個可以用來測量生長速度差異的分析方法，比較酵母菌生長的格數差，格數差的定義為：每 24 小時觀察酵母菌株生長至第幾格，並於在大約第三天或第四天時觀察欲比較生長速度的兩種菌株，將其差異紀錄起來，比較其格數差，例如：196 生長至第 5 格時，突變株只生長至第 3 格，則稱突變株與 196 的格數差為 2；反之，若 196 生長至第 4 格時，突變株已生長至第 5 格，則稱此突變株與 196 的格數差為 -1，可以用來辨別是否有生長不良或是更佳的情況。

(一) 先配好 Spot assay 會用到之固態培養基。

(二) 種突變菌株在有 3c.c. 培養液的試管當中，放入在 28°C 的 Incubator 的 Roller drum 中 15 小時。

(三) 實驗當天取 100  $\mu$ l 菌 + 900  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O (稀釋 10 倍) 放入 cuvette 用吸光儀測量 OD<sub>600</sub> 的吸光值，計算出濃度為  $2 \times 10^7$  cells/c.c. 應取多少菌再補多少 ddH<sub>2</sub>O 至 100  $\mu$ l 於 96-well 細胞培養盤的第 1 欄的各格當中 (每欄 8 格)，並在 1~5 欄做出 5 欄 10 倍序列稀釋 (如表二所示)，並在培養基下墊一張 8x5 的方格紙 (如圖三所示)，用八排

pipetman 由右到左、濃度高到濃度低，點出  $5 \mu\text{l}/\text{spot}$  的點，使得同一列的細胞濃度皆為相等。(如圖三所示)

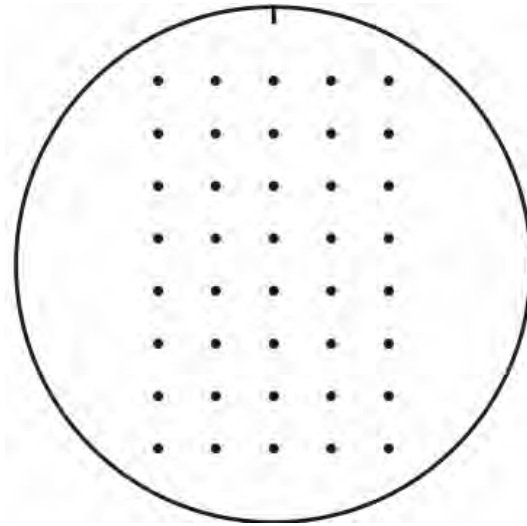
(四) 每 24 小時觀察酵母菌株生長至第幾格，並於在大約第三天或第四天時觀察欲比較生長速度的兩種菌株，將其格數差紀錄起來。

表二、序列稀釋濃度

$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10
$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10
$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10
$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10
$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10
$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10
$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10
$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10

(單位： $\text{cells}/5 \mu\text{l}$ )





圖三、Spot assay 8x5 方格紙

#### 四、基因轉型(transformation)

實驗前一天種突變菌株在有 3c.c.培養液的試管當中，放入在 28°C 的 Incubator 的 Roller drum 中 15 小時。取 300  $\mu$ l 的菌重新養在 5c.c.的 YPD medium 中，放入在 28°C 的 Incubator 的 Roller drum 中 Refresh cell，培養 3hr。取出 1.5ml 的菌液到 microfuge tube 中，以 13,000rpm 離心 1 分鐘後去除上清液。用 ddH<sub>2</sub>O 1c.c.重新懸浮細胞，以最高轉速離心 30 秒後用吸取的方式去除上清液。加入 60  $\mu$ l 的 LiAc/TE 用 pipetting 混和，加入 1  $\mu$ l 的質體 DNA 及 1  $\mu$ l 預先加熱至 100°C 5min 的 ssDNA，加入 350  $\mu$ l 的 PEG Mix，放入在 28°C Incubator 30min，加入 30  $\mu$ l 的 DMSO，Heat shock 42°C 15min，加入 1ml 的 YPD medium 使細胞復原，並離心去除上清液，將細胞塗盤在 CSM-Trp 的篩選用固態培養基上培養約 2 天。

#### 五、四分體分離(Tetrad dissection)

酵母菌為一種橢圓形的單細胞真核生物，可行無性的出芽生殖，也可行有性生殖。若是只有一種酵母菌並不會行有性生殖。當有性生殖時，兩種不同的酵母菌 a cell 和  $\alpha$  cell 分別會有各自的接收器和釋出費洛蒙。兩者要互相接收時，表面就會突起形成 shmoo formation，然後兩者越靠越近，開始 mating，產生二倍體和孢子，即為酵母菌的有性生殖。

一個四分體是一個  $2n$  的  $a\alpha$  cell 經由減數分裂產生的 4 個孢子，在 MATa X MAT $\alpha$  後形成  $a\alpha$  cell 時，持續觀察是否有 shmoo formation，用手動式-真菌四分體分離操作顯微鏡( Manual Yeast Tetrad Dissection Microscope )挑出並養在 YPD 固態培養基上，在 Sporulation medium 中培養三天，即會產生有子囊(ascus)的四倍體，取  $50\mu\text{l}$  的菌液到 microfuge tube 並加入  $10\mu\text{l}$  酵母裂解酶(Zymolyase) vortex 混和均勻等候 5min，讓四倍體的子囊壁裂開，並利用四分體分離操作顯微鏡分離四分體並排列成行，培養於 YPD 固態培養基上。

## 六、Mating type test

Mating type test 是用來測試酵母菌細胞的交配型為何， $1n$  的酵母菌分成兩種交配型，一種是 MATa，一種是 MAT $\alpha$ ，兩種各自會放出不同的費洛蒙，而在 Halo assay 中，先利用實驗室菌株  $bar1\Delta$  (MATa)塗盤在 YPD plate 上，以及用  $sst2\Delta$  (MAT $\alpha$ )塗盤在 YPD+ triton plate 上，接著將 196a,196 $\alpha$  和待測菌株用木籤畫在盤上，若與塗盤上的菌株不同 Mating type，待測菌株的周圍會有 Halo，反之則否，若是二倍體細胞則皆不會有 Halo。

目的有三，一是確定突變後的菌株是與 WT(196a)相同的  $a$  cell，二是確定 Mating 完後挑到的是二倍體細胞，三是確定四分體分離挑到的 4 個孢子，為各 2 個 MATa 和 MAT $\alpha$ ，以確認挑到同一組孢子。

## 七、劃線法(Streaking)

利用消毒過後的木籤挑起欲培養的菌株，將菌株畫在固態培養基上，劃四個區域，每劃一個區域就用木籤的一面，每個區域重疊到上一區域的  $1/2$ ，是菌數漸減之方法，沿區落在劃線之地方生長，以達到純化之效果，在愈後面之區域，其得到單一菌落的效果愈好。

## 八、統計分析

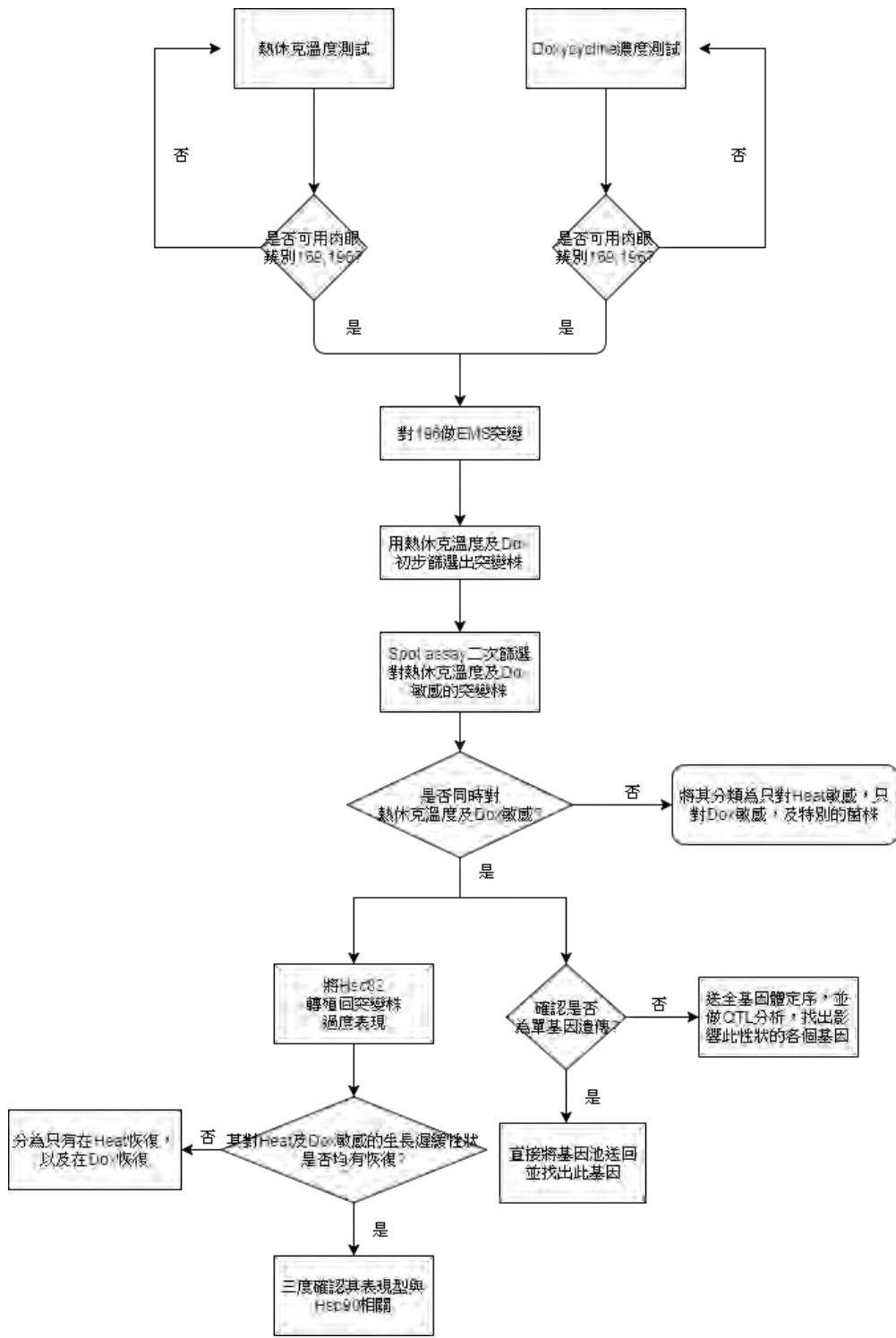
將各組重複實驗結果數據以平均值加減標準差表示。統計則 SPSS 軟體配合 Excel 軟體進行分析，以平均值之間的差異以 paired Student's t-test 計算。各處理組之間在  $p$  值

小於 0.05 時被認為是有意義的統計上顯著差異。

## 九、酵母菌 EMS 突變

種菌 169,196 在有 3c.c. YPD 培養液的試管當中，放入在 28°C 的 Incubator 的 Roller drum 中 15 小時。取 100  $\mu$ l 菌+900  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O(稀釋 10 倍)放入 cuvette 用吸光儀測量吸光值，計算出濃度為 10<sup>8</sup> cells/c.c. 應取試管中多少菌到 1.5c.c. microfuge tube 中。並各分到 2 個 microfuge tube 中。用 15,000rpm 離心在室溫離心細胞 10sec，倒掉上清液。將每管的細胞皆重新懸浮於 500 $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O 中，重複離心和洗滌一次。在第二次洗滌後將每管的細胞懸浮於 0.75ml 的 Sterile NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH7.0)中，接著將 0.35ml 的細胞懸浮液加到 500 $\mu$ l 的 Sterile NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH7.0)中(剩下 0.4ml 的細胞作為控制組使用)，加入 37.5 $\mu$ l 的 EMS，vortexing，放入在 28°C 的 Incubator 的 Roller drum 中 30 分鐘。取出後將所有溶液加入同體積的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(10%)中，使 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(10%)最終濃度為 5%，並用 ddH<sub>2</sub>O 洗滌一次。

十、實驗流程圖



圖四、實驗流程圖

## 參、研究結果與討論

### 一、找出被 Hsp90 保護的隱蔽突變株

#### (一) 找出能區別 169 及 196 的熱休克溫度

辨別 169 及 196 用的 Dox 濃度實驗室已找出，本實驗的目的為找到一個最適溫度，可減緩 196 的生長，但是對 169 沒有太大的影響(如表三所示)，找出此熱休克溫度之後，則使用此篩選用的熱休克溫度及 Dox 濃度來初步找出有可能含有被 Hsp90 所保護的基因突變的菌株。

表三、尋找用來篩選突變株的熱休克溫度簡圖

	169(WT, w/o tet-)	196(w/ tet-)
28°C	+++	+++
36°C	+++	++
37°C	++	+
38°C	+	-
39°C	-	--

+：生長速率快(越多表示越快)

-：生長速率慢(越多表示越慢)

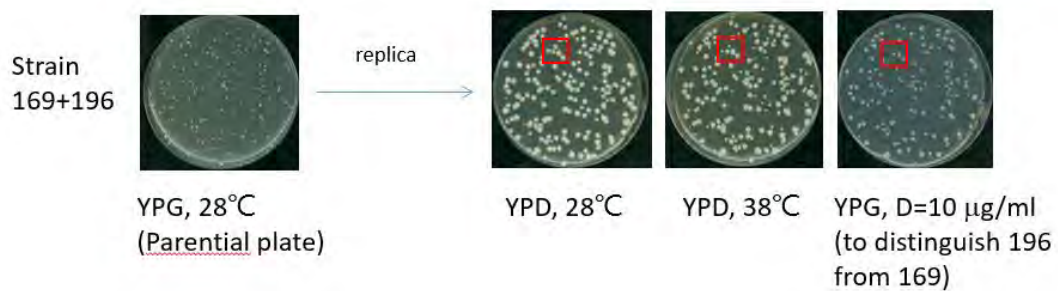
經過實驗後，我們確立 38°C 為最適熱休克溫度。

從圖五當中可看到，最左方的盤為 169 與 196 混和的母盤(Parental plate)，並養在 YPG plate(Yeast Extract Peptone Glycerol)中，使用 YPG plate 作為母盤的原因是，為了確認能生長出來的菌株都能正常行呼吸作用，即為粒線體無缺陷的菌株。而使用 YPD plate 做複製平皿的原因是，在 YPD 當中能明顯的用肉眼直接看出 169 及

196 大小的差別。(如圖五所示)

決定所選溫度的方法是，從 YPD, 28°C 及 YPD, 38°C 用肉眼觀察選出 10 對 (pairs)，比如紅色方框內的最左的菌株與的第二左的菌株 (如圖五所示)，而此 10 對必須是在 YPD, 28°C 中已可看出大小差別，而在 YPD, 38°C 中大小差異更加明顯，但不致 196 完全無法生長時，再把此對在 YPG, D=10µg/ml 上做對照，確認其為選的對為 169 及 196 (如圖五所示)。

找出此 Dox 濃度及溫度之後，則使用此溫度及 Dox 濃度來初步找出有可能含有被 Hsp90 所保護的基因突變的菌株。



圖五、熱休克溫度選擇

(二) 找出對熱休克溫度敏感、對 Dox 敏感、及對兩者皆敏感的突變株為了要找出含有被 Hsp90 保護的突變基因之突變株，使用了以下兩個策略：

1. 挑出在 Dox 中生長比 196 遲緩的突變株
2. 挑出在熱休克環境中生長比 196 遲緩的突變株

因 196 的 Hsf1 上接了 Tet promoter，導致在有加 Dox 的情況下，會將 Hsc82 的表現量降低，而因環境壓力會產生更多錯誤摺疊的蛋白，導致大部分的熱休克蛋白會去幫助其重新摺疊，進而導致用在訊號傳遞上的熱休克蛋白不足，而本地蛋白突變的表現型會顯現出來，使菌株生長遲緩(Rutherford *et al.*, 2008; Leach *et al.*, 2012)。

而突變後的菌株，若在沒有加 Dox 的正常情況下(YPG, Dox=0)，生長速度與 196 相同，但在加有 Dox 的環境壓力之下(YPG, Dox=2.5 $\mu$ g/ml)生長速度比 196 更加遲緩(稱為對 Dox 敏感，Doxycycline sensitive，標示為\*)，則可以合理推測此菌株應該含有某些基因，是在突變之後被 Hsp90 所保護著(Rutherford *et al.*, 2008)。

而在正常溫度環境(YPD, 28 $^{\circ}$ C)下生長速度與 196 相同，但在熱休克環境(YPD, 38 $^{\circ}$ C)的環境壓力下，生長速度比 196 更加遲緩(稱為對溫度敏感，Heat sensitive，標示為  $\Delta$ )，則可以合理推測此菌株應該含有某些，在突變之後被 Hsp90 所保護的基因(Rutherford *et al.*, 2008)。

之後我們會選出同時為對溫度敏感(Heat sensitive)及對 Dox 敏感(Doxycycline sensitive)的突變株，將帶有 Hsc82 的質體轉殖入突變株中，過度表現 Hsc82，觀察其生長遲緩的表現型是否有恢復，以做進一步的確認，其中是否含有在突變之後被 Hsp90 所保護的突變基因。(如圖六至圖十五所示，每張圖均為不同突變株)

有些反而在熱休克環境中長更好的突變株(稱為 Better growth in Heat，標示為藍色  $\Delta$ )，及有些在 Dox 環境中長更好的突變株(稱為 Better growth in Doxycycline，標示為藍色\*)。

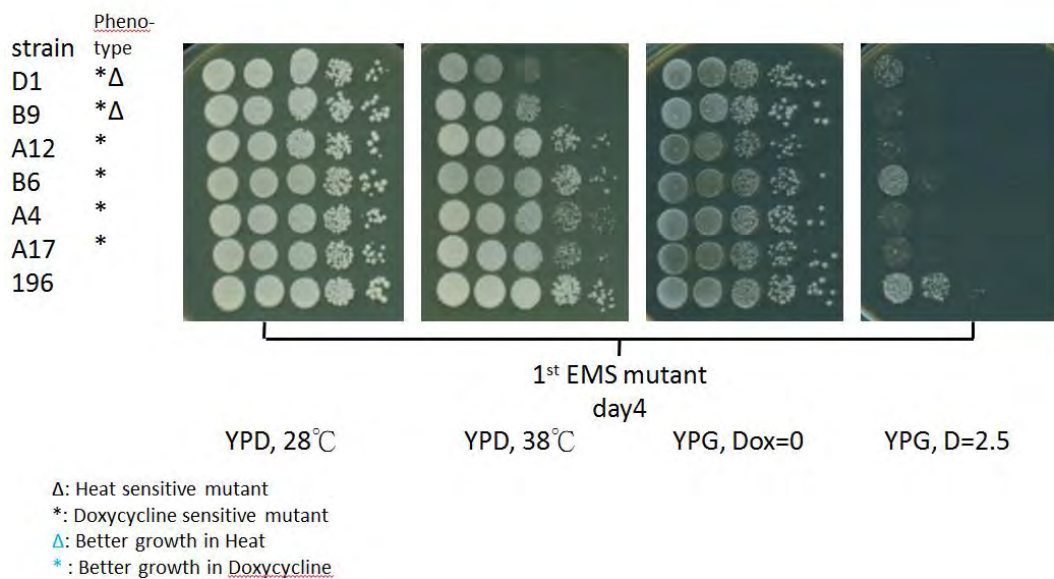
圖六至圖十五為 Spot assay 之結果，其每一盤由左至右均同一突變株，而依序經過 10 倍序列稀釋。詳細內容請參見研究過程與方法之第三點，Spot assay。因最初挑出菌株是從把 EMS 突變後的酵母菌塗盤 5 盤，並將其編碼 A~E 之後，再使用肉眼觀察並從盤中篩選並依序用數字命名，其數字前之英文字母即挑出菌株的培養基編碼，而圖中標記 1<sup>st</sup>EMS mutant、2<sup>nd</sup>EMS mutant 的意思為第一批、第二批實驗所產生之突變株，目的為提高樣本數增高找到含有被 Hsp90 保護的突變基因之突變株的機率。

為避免菌株名稱重疊而混淆，圖六至圖十五下方有標示 1<sup>st</sup>EMS mutant、2<sup>nd</sup>EMS mutant 以利區分，除圖六至圖十五外，其餘之後所有代碼後均標記(1)表示第一批突變株，標記(2)表示第二批突變株，例如：A1(1)表從第一批 EMS 突變後的 A 盤得到

之突變株。

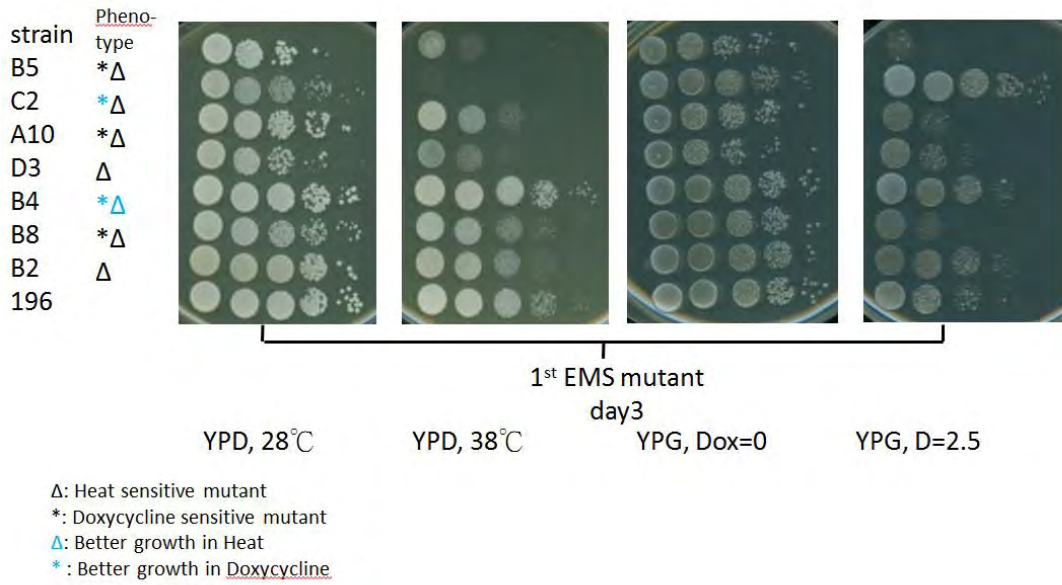
圖六至圖十五下方 day 數字表示其結果在 Spot assay 後第幾天被記錄，例如：day4 表示此圖之結果為在 Spot assay 後第 4 天被記錄。均將突變株與每張圖最下方的原生株 196 做格數差比較。

正常溫度環境(YPD, 28°C)為觀察對熱休克溫度敏感的控制組，而熱休克環境(YPD, 38°C)為對照組。沒有加 Dox 的正常情況下(YPG, Dox=0)為觀察對 Dox 敏感的控制組，在加有 Dox 的環境壓力之下(YPG, Dox=2.5µg/ml)為對照組。

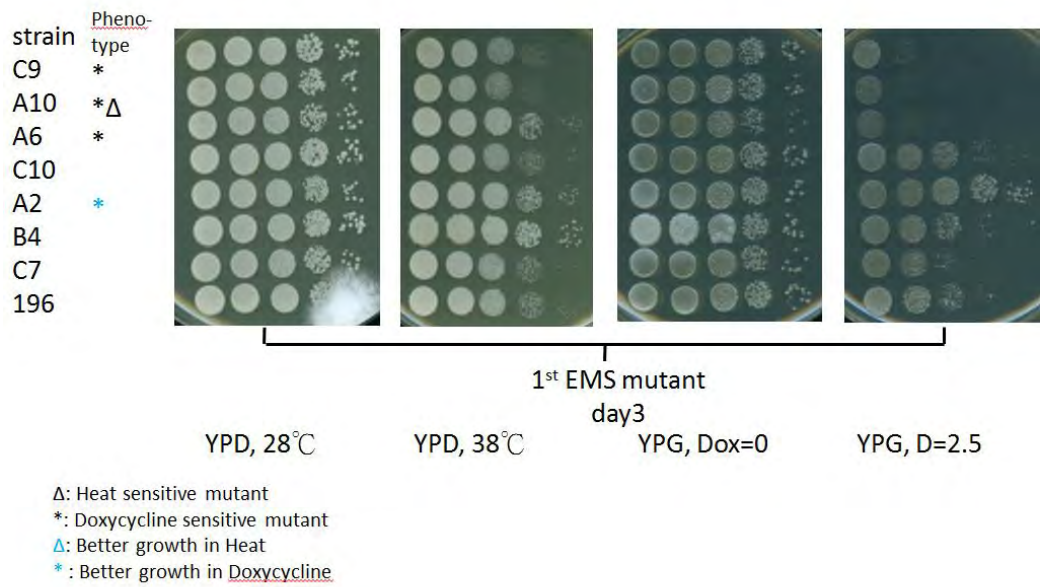


圖六、突變株的表現型

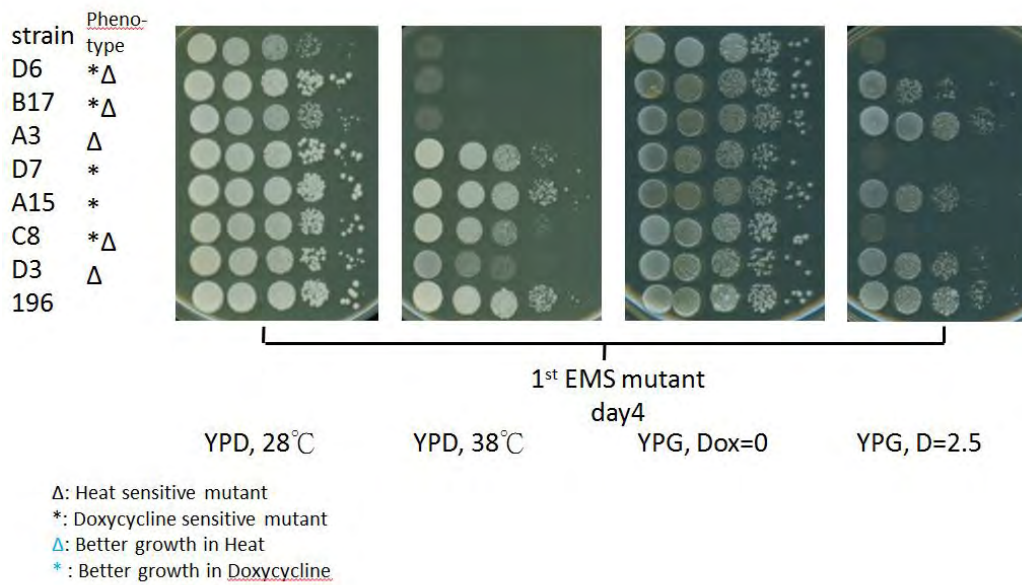




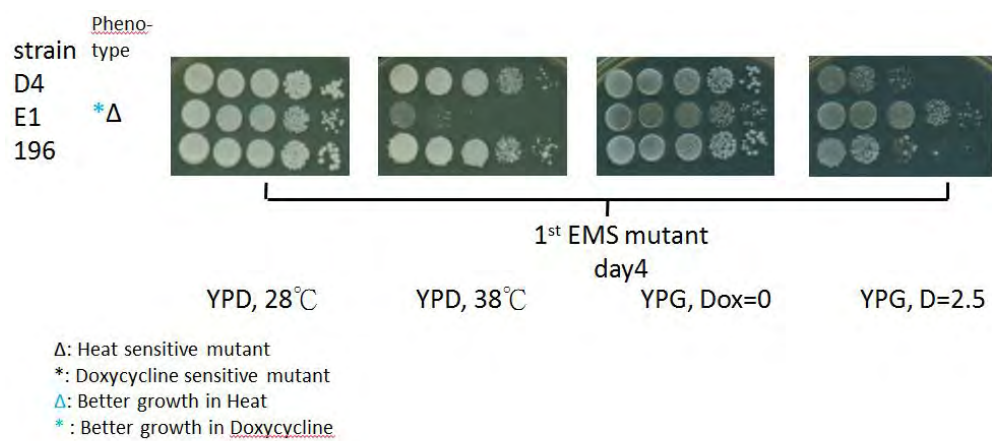
圖七、突變株的表現型



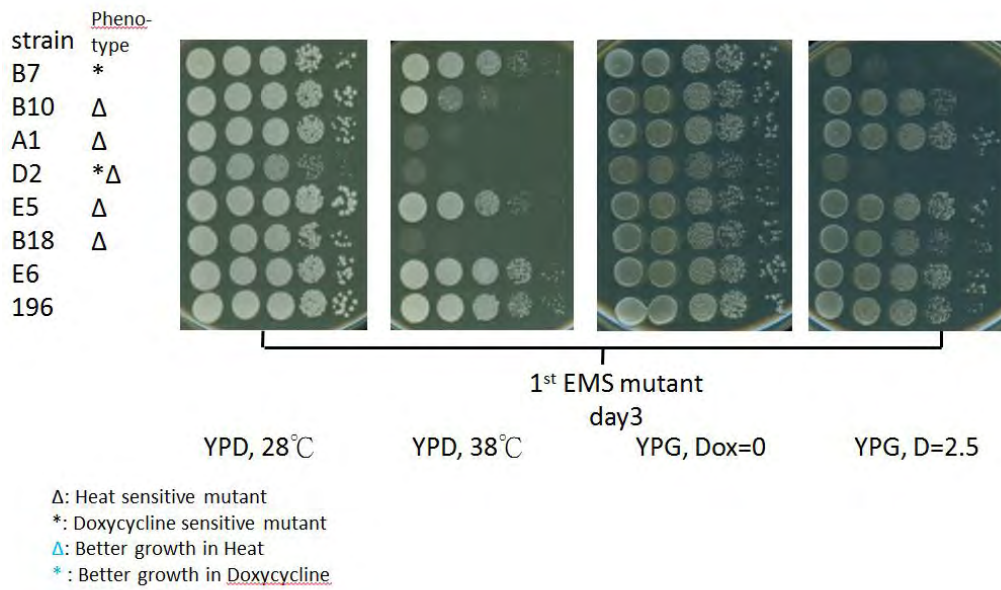
圖八、突變株的表現型



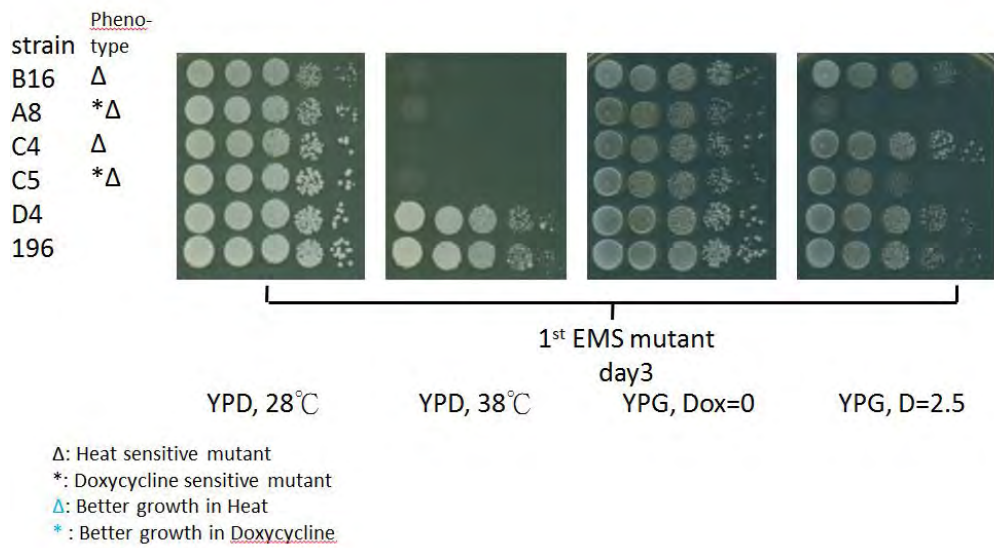
圖九、突變株的表現型



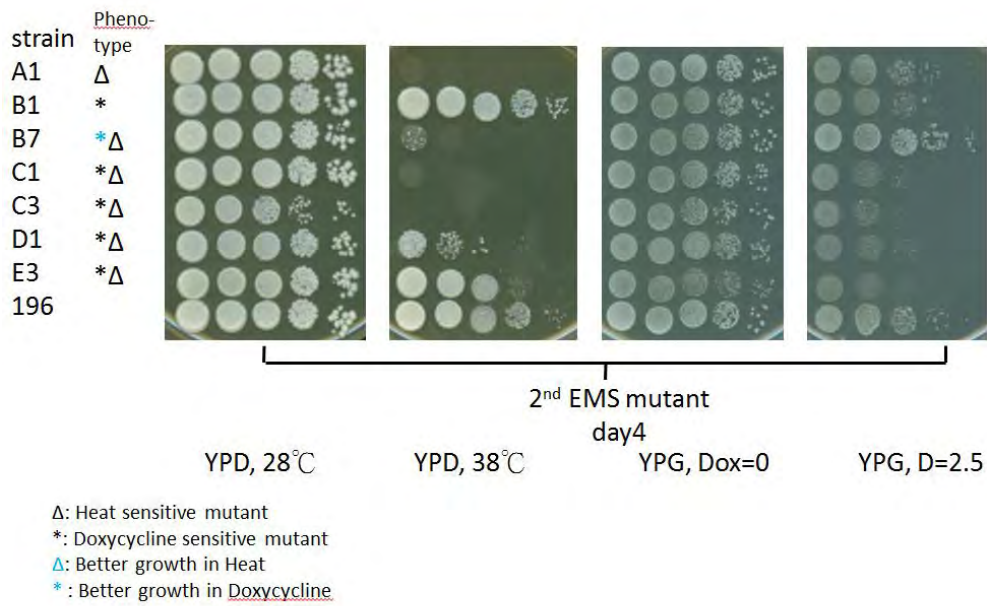
圖十、突變株的表現型



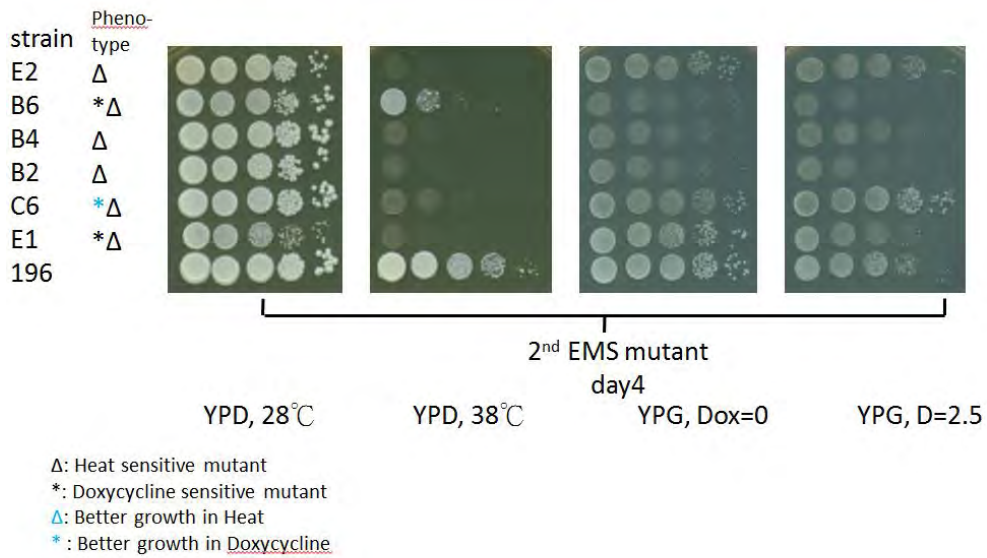
圖十一、突變株的表現型



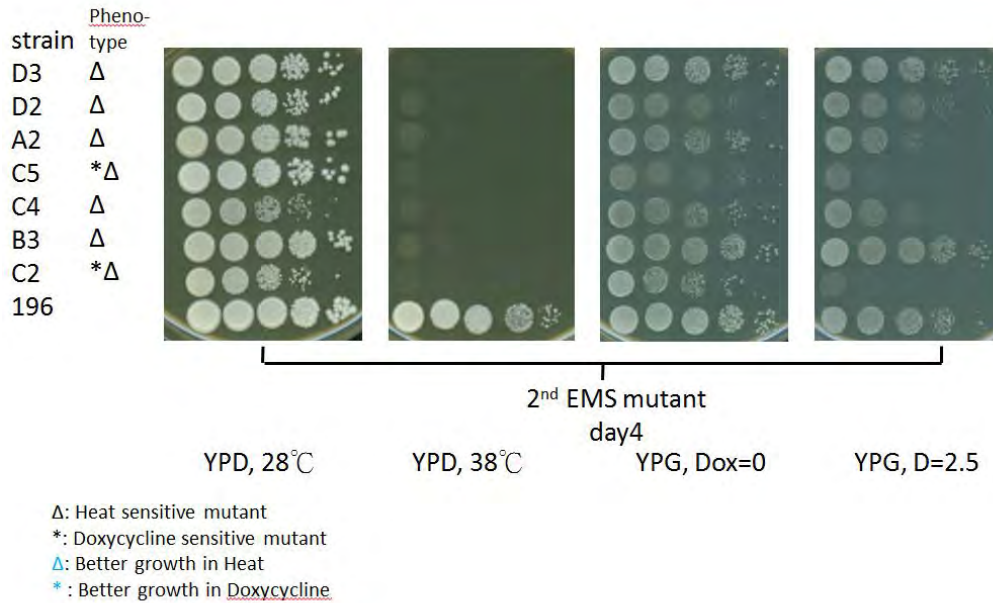
圖十二、突變株的表現型



圖十三、突變株的表現型



圖十四、突變株的表現型



圖十五、突變株的表現型

### (三) 突變株的表現型之探討

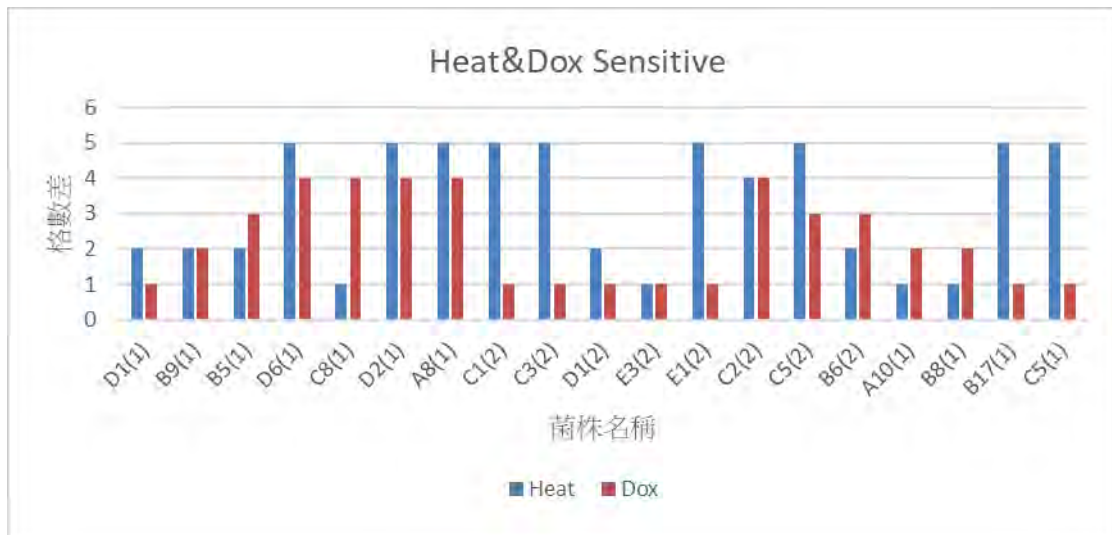
196 移除了會因為熱休克反應而誘發(Inducible)的 Hsp82 基因，只保留持續表現 (Constitutive)的 Hsc82 基因，並且其 Hsf1 上接了 Tet promoter，導致在有加 Dox 的情況下，會將 Hsc82 的表現量降低，而因環境壓力會產生更多錯誤摺疊的蛋白，導致大部分的熱休克蛋白會去幫助其重新摺疊，進而導致用在訊號傳遞上的熱休克蛋白不足，而本地蛋白的突變的表現型會因無法被足夠的熱休克蛋白 90 所保護而顯現出來，使菌株生長遲緩。因此理論上(Leach *et al.*, 2012)，若其同時較原生株 196 來的對溫度及 Dox 敏感(如圖十六所示)，便更能確信此菌株有被 Hsp90 所保護。

另一方面，若是只有對溫度(如圖十七所示)或是只有對 Dox 敏感(如圖十八所示)，我們猜測仍然有機會是 Hsp90 所保護的菌株(Leach *et al.*, 2012)。

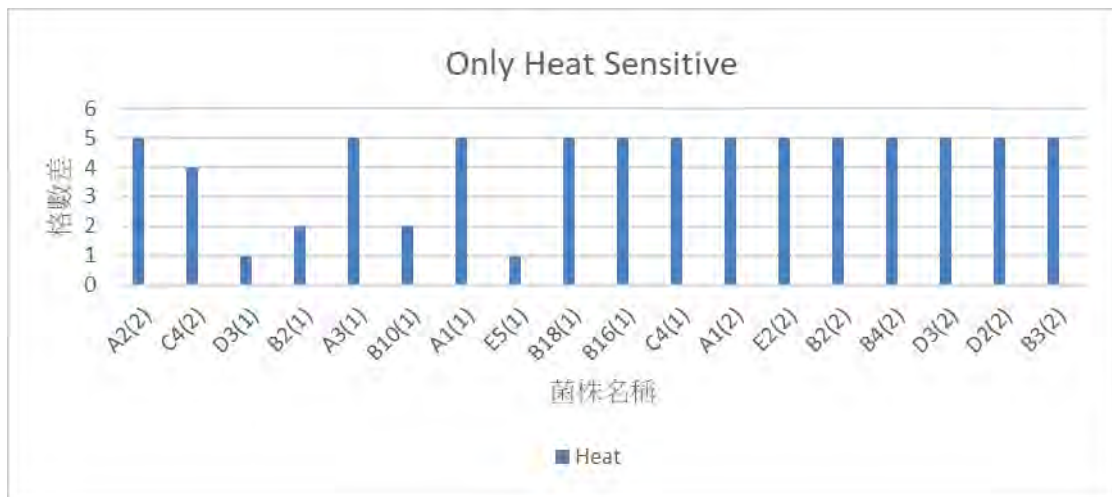
比較特別的是，我們在此有找到一些與理論不相符的特殊菌株(如圖十九所示)，這些菌株都有一個共通點，就是在 Dox 的環境壓力反而生長情況更佳，猜想可能是因為基因突變而產生對 Dox 的抗藥性，但仍有待商榷。

在此我們從圖十六選出 D1(1), B9(1)做為後續 Hsc82 過度表現實驗的實驗用菌

株，及選出 D1(1), B9(1), B5(1) 做為單基因或多基因遺傳確認的實驗用菌株。實驗本應針對所有同時對熱休克溫度敏感及對 Dox 敏感的菌株，所以自圖十六所選菌株中從頭依序檢驗。目前 Hsc82 過度表現實驗只檢驗至 D1(1), B9(1)，單基因或多基因遺傳確認只檢驗至 D1(1), B9(1), B5(1)。



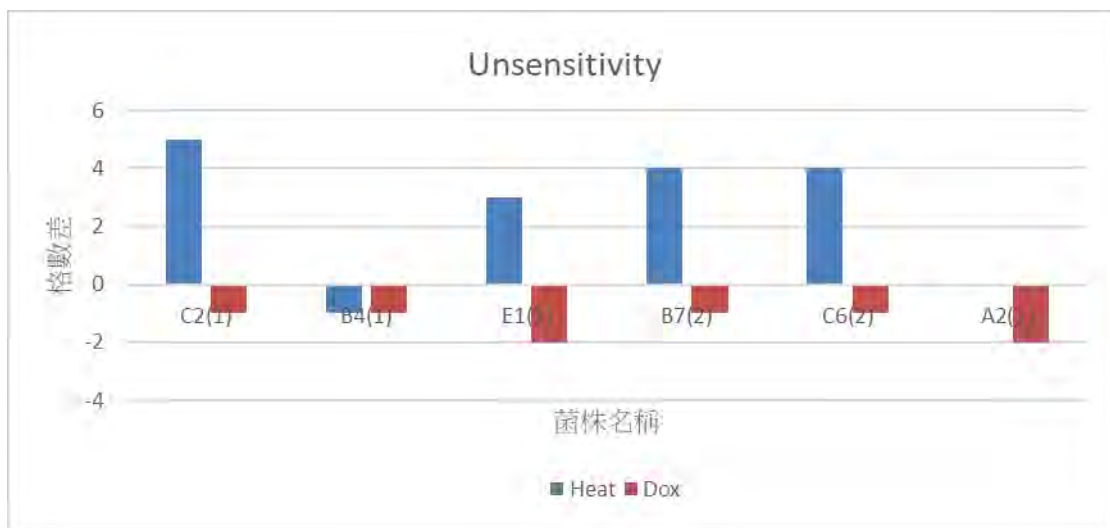
圖十六、同時對溫度及 Dox 敏感的菌株



圖十七、只對溫度敏感的菌株



圖十八、只對 Dox 敏感的菌株



圖十九、特殊菌株

## 二、確認生長遲緩性狀是單基因遺傳或為多基因遺傳

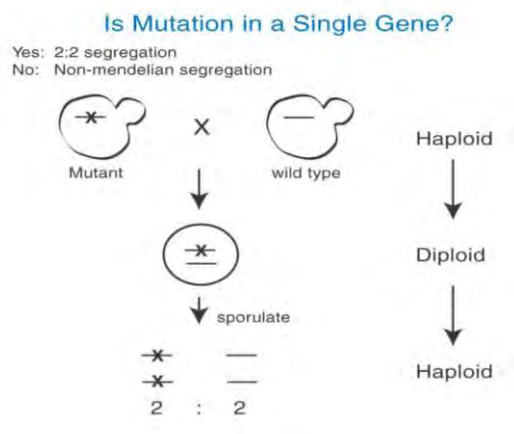
藉由孟德爾第二定律：獨立分配律可以得知，當酵母菌做減數分裂時，會先複製染色質，之後將複製後的染色體，分給一個四分體(Tetrad)內的四個孢子(Spore)。我們在此將交配型為 MAT<sub>a</sub> 的突變株和交配型為 MAT<sub>α</sub> 的 196<sub>α</sub> 做交配，並產出子代，若突變株性狀只由單個基因決定，則性狀會各平分給兩個孢子，出現的性狀會有 2 個生長速度 196<sub>α</sub> 相似，2 個與突變株相似，即 2 to 2(2:2)的情形(如圖二十所示)，若為多基因遺傳

則否(Lindegren CC., 1945)。

圖二十一至二十三當中，圖中同一列為同一突變株與 196  $\alpha$  回交後，得到的 3 個不同的四分體(Tetrad)，所產生的 4 個孢子(Spore)的 Spot assay 結果。在將每一突變株在確認過交配型為 2 個 MATa 及 2 個 MAT  $\alpha$ ，確定挑到的 4 個孢子均來自同一個四分體後，進一步將四個孢子與其親代，突變株及 196  $\alpha$ ，做生長速度比較，圖上方為 3 組孢子分別在(YPD, 28°C)正常環境的結果，圖下方為 3 組孢子均為(YPD, 38°C)熱休克環境壓力中。(如圖二十一至圖二十三所示)

若只為單基因遺傳，則目前已經有釀酒酵母的全基因池，並且可將基因池送回釀酒酵母中，找出其性狀為哪一基因所控制。若為多基因遺傳，則將突變株送全基因體定序，並利用 QTL(Quantitative trait loci)，比對出造成此性狀的基因(Rutherford *et al.*, 2008; Chandler *et al.*, 2013)。

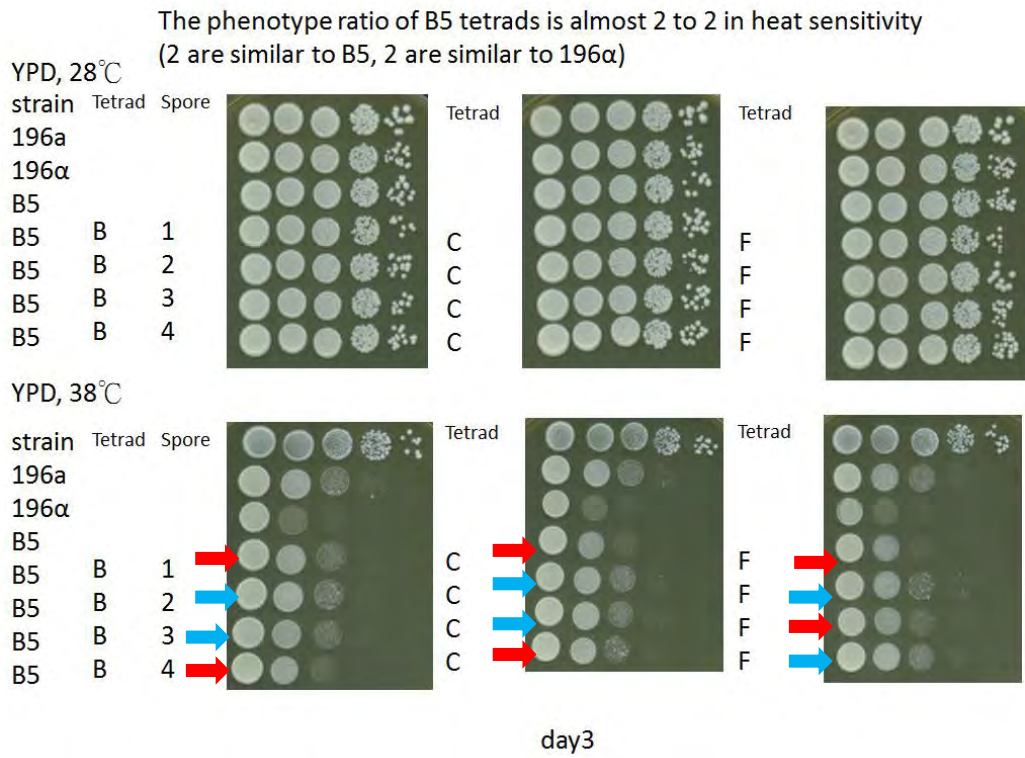
選擇 D1(1), B9(1), B5(1)的原因為，此實驗本應針對所有同時對熱休克溫度敏感及對 Dox 敏感的菌株，所以自圖十六所選菌株中從頭依序檢驗，目前只檢驗 D1(1), B9(1), B5(1)。(如圖十六所示)



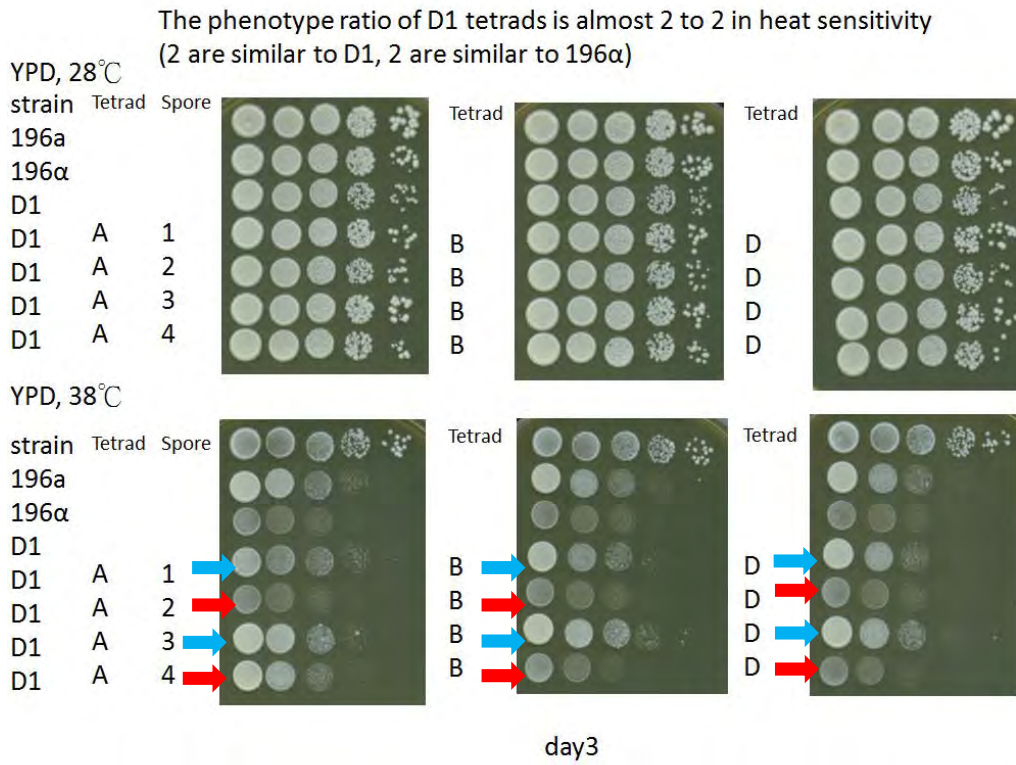
圖二十、單基因遺傳



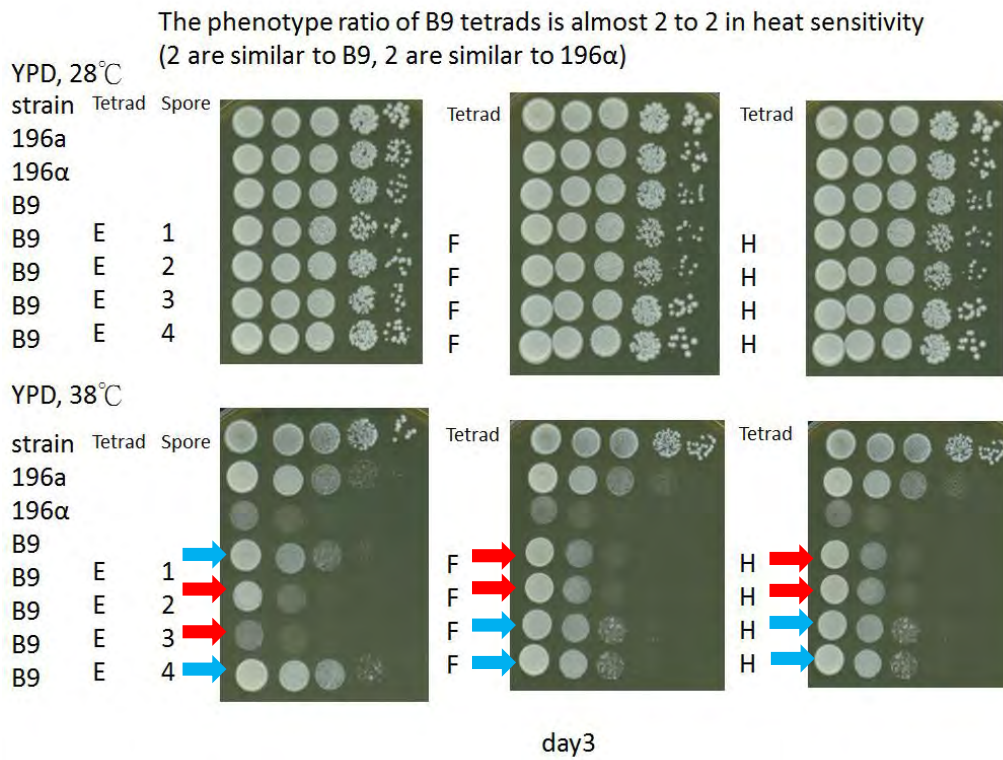
紅色箭頭表示，性狀與突變株相像的孢子；藍色箭頭表示，性狀與 196 $\alpha$  相像的孢子。(如圖二十一至圖二十三所示)



圖二十一、B5(1)的子代及其親代的比較



圖二十二、D1(1)的子代及其親代的比較



圖二十三、B9(1)的子代及其親代的比較

### 三、證實 B9(1),D1(1)突變株的性狀與 Hsp90 相關

先前已經說明 196 移除了會因為熱休克反應而誘發的 Hsp82 基因，只保留持續表現的 Hsc82 基因，在此我們做 Hsc82 過度表現的實驗，驗證此突變株生長遲緩的性狀是否與 Hsp90 有關。

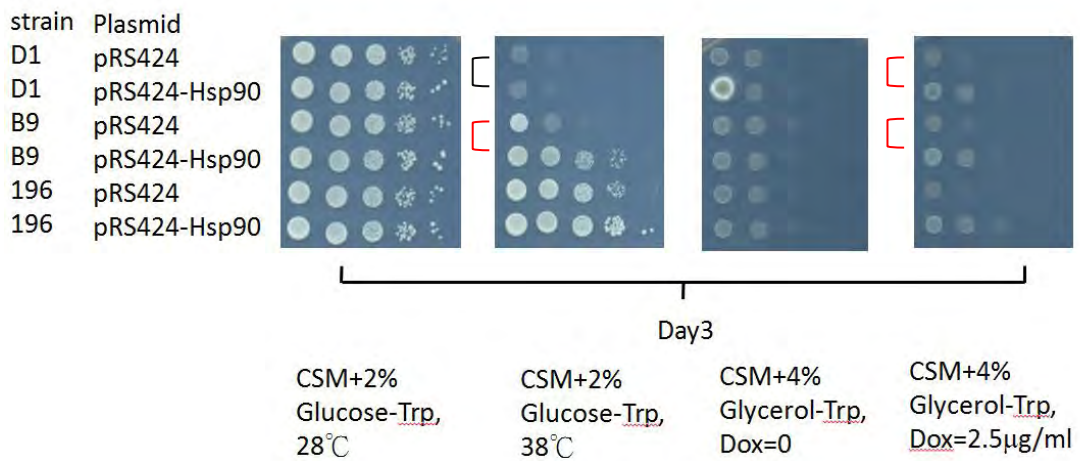
為了過度表現 Hsc82 基因，我們必須利用轉殖入帶有 Hsc82 的質體以達成此目的。而 196 未帶有在釀酒酵母中可以合成必需胺基酸色胺酸(Tryptophan)的基因 Trp1，因此我們將帶有 Hsc82 的質體 pRS424(pRS424-Hsp90)及未帶有 Hsc82 的質體 pRS424(pRS424)，送回所選擇之突變株，做 Hsc82 過度表現，而為了要確定 Hsc82 有成功轉殖入突變株中，我們將其在 Hsc82 過度表現的 Spot assay，做在能篩選含有 Trp1 的菌株的 CSM-Trp plate(Complete Supplement Mixture -Trp +Ade +Leu +Ura +His +Tyrosine +YNB plate)上。(如圖二十四所示)

因為 B9(1), D1(1)之前在熱休克環境以及 Dox 環境中與 196 比較已確認有生長遲緩的情形，若將 pRS424-Hsp90 轉殖到突變株 D1(1), B9(1)當中時，與只轉殖入 pRS424 的突變株相比，成功改善了突變株生長遲緩的情況，則第三次驗證此突變株生長遲緩的性狀與 Hsp90 有關。

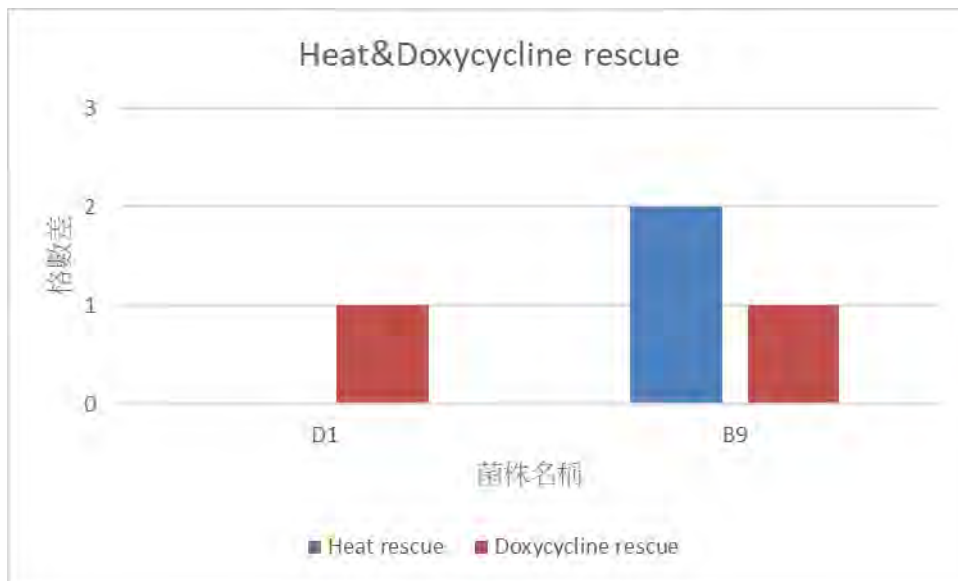
目前結果為，B9(1)生長遲緩的性狀較有可能與 Hsp90 有關，因其在熱休克溫度及 Dox 環境中，其性狀均有恢復(Heat rescue 及 Dox rescue)；而 D1(1)只有在熱休克溫度中，其生長遲緩的性狀有恢復。(如圖二十五所示)

選擇 D1(1), B9(1)的原因為，此實驗本應針對所有同時對熱休克溫度敏感及對 Dox 敏感的菌株，所以自圖十六所選菌株中從頭依序檢驗，目前只檢驗至 D1(1), B9(1)(如圖十六所示)

紅色括弧表示生長遲緩性狀有恢復，黑色括弧表示生長遲緩性狀並未恢復。(如圖二十四所示)



圖二十四、轉殖回 pRS424-Hsc82 的突變株與轉殖回 pRS424 的突變株之比較



圖二十五、轉殖回 pRS424-Hsc82 的突變株與轉殖回 pRS424 的突變株之生長速度恢復比較

## 肆、結論與應用

### 一、結論

#### (一) 找出被熱休克蛋白 90 所保護的突變菌株 D1(1), B9(1)

本實驗利用初步肉眼觀察、Spot assay 及將 Hsc82 過度表現的恢復性狀實驗等三種不同方法，增加實驗結果的可信度。找出了最有可能被 Hsp90 所保護的突變菌株 B9(1)，其在熱休克環境及 Dox 環境中均呈現出生長遲緩的性狀，並於 B9(1)中過度表現其 Hsc82 之後，與實驗預期相同地，在兩個環境壓力下，皆恢復了其生長遲緩的性狀。

其次是 D1(1)，其在熱休克環境及 Dox 環境中呈現出生長遲緩的性狀，但是於 D1(1)中過度表現其 Hsc82 之後，只在 Dox 的環境中，恢復了其生長遲緩的現象。

再者是，找出目前只經由二次確認得到符合對溫度及 Dox 敏感的突變株 D6(1), C8(1), D2(1), A8(1), C1(2), C3(2), D1(2), E3(2), E1(2), C2(2), C5(2), B6(2), A10(1), B8(1), B17(1), C5(1)。

以及只有對熱休克環境敏感的 A2(2), C4(2), D3(1), B2(1), A3(1), B10(1), A1(1), E5(1), B18(1), B16(1), C4(1), A1(2), E2(2), B2(2), B4(2), D3(2), D2(2), B3(2)。

還有只有對 Dox 敏感的 A4(1), A17(1), A15(1), B7(1), D7(1), A12(1), B6(1), B1(2), C9(1), A6(1)。

以及可能具有 Dox 抗藥性的 C2(1), B4(1), E1(1), B7(2), C6(2), A2(1)。

#### (二) 初步確認 D1(1), B9(1), B5(1)生長遲緩的性狀可能為單基因遺傳

從 D1(1), B9(1), B5(1)與其親代 196  $\alpha$  回交得到的孢子，藉由提高孢子數目至 12 個(3 組四分體)來擴充取樣範圍，使得用以判斷是否為單基因遺傳的性狀比例實驗更加具有可信度，在熱休克環境中的 Spot assay 結果得知，其生長遲緩性狀皆為 2:2，符合單基因控制性狀的特徵，但因在 Dox 的環境中，由於藥效過強導致無法辨認出其性狀比例，仍無法確定是否為單基因遺傳。

## 二、應用

藉由找出被熱休克蛋白保護的突變株，之後將性狀為單基因遺傳的突變株的基因池送回，以及將性狀為多基因遺傳的突變株送全基因體定序，並利用 QTL(Quantitative trait loci)，比對出造成此性狀的基因(Rutherford *et al.*, 2008; Chandler *et al.*, 2013)，再進一步研究，什麼樣的基因突變會被熱休克蛋白 90 所保護。不僅能更了解遺傳緩衝機制的原貌，並且如果利用同一方法，在誘發人類細胞的突變後，藉此找出哪些基因突變會受到人類的熱休克蛋白 90(HSP90AA1 及 HSP90AB1)所保護，未來或許可從另一個新的角度，探究基因突變導致癌症產生的原因。

## 伍、參考文獻

- [1] Christopher H. Chandler, Sudarshan Chari, and Ian Dworkin, 2013, Does your gene need a background check? How genetic background impacts the analysis of mutations, genes, and evolution, *Trends Genet*, 2013 June, 29(6): 358 – 366
- [2] Karras GI, Yi S, Sahni N, Fischer M, Xie J, Vidal M, D'Andrea AD, Whitesell L, Lindquist S., 2017, *Cell*, 2017 Feb 23, 168(5):856-866.e12.
- [3] Lindegren CC, 1945, YEAST GENETICS : Life Cycles, Cytology, Hybridization, Vitamin Synthesis, and Adaptive Enzymes., *Bacteriol Rev.*, 1945 Sep, 9(3-4):111-70.
- [4] Mario A. Fares, 2015, The origins of mutational robustness, *Trend in Genetics*, July 2015, 31(7):373-81
- [5] Michelle D. Leach, Edda Klipp, Leah E. Cowen and Alistair J. P. Brown, 2012, Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs, *Nature Reviews Microbiology*, Oct 2012, 10, 693-704
- [6] Rutherford SL, Lindquist S., 1998, Hsp90 as a capacitor for morphological evolution, *Nature*, 1998 Nov 26, 396(6709):336-42.
- [7] Suzannah Rutherford, Yoshikazu Hirate & Billie J. Swalla, 2007, The Hsp90 capacitor, developmental remodeling, and evolution: the robustness of gene networks and the curious evolvability of metamorphosis, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2007 Sep-Oct, Volume 42, 2007 - Issue 5, 42:355-372

## 【評語】 070003

本研究利用酵母菌遺傳實驗去探討在降低酵母菌 Hsc82 的表達量後，並以 doxycycline 及高溫環境營造壓力，找出因突變而被熱休克蛋白 90 保護的基因突變株。作者以不同的研究方法反覆印證也得到多個基因突變株，雖然還沒確定出是那個基因突變所造成，但整個研究過程很完整，是一完整的作品，令人鼓舞。