

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050013

參展科別 動物學

作品名稱 初探渦蟲 RNAi 的作用機制與限制

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 陳怡旻、朱家瑩

作者姓名 蔡長頤

關鍵詞 渦蟲、RNAi、tgs-1

作者簡介



我是蔡長頤，就讀台北市立第一女子高級中學科學班，對於生命科學領域充滿興趣與熱情。我擁有自律甚嚴的性格，深知科學研究是個困難又嚴謹的工作。經由此次參加國際科展，我從中習得正確的研究方法，鍛鍊嫻熟的實驗技術，養成勤學不輟的意志力，更讓我認識志同道合的朋友，更進一步對於未來的研究之路，奠定良好的根基。感謝這段期間給予我指導與支持的老師、學長姐和教授，謝謝您們!!

摘要

核糖核酸干擾 (RNA interference, RNAi) 被廣泛應用在以渦蟲為模式生物的相關研究，其中一種進行 RNAi 方法是利用餵食渦蟲雙股 RNA (dsRNA) 的方式達到 RNAi 的目的，但所餵食的 dsRNA 只在渦蟲腸道中存在餵食後的 4 天內。dsRNA 究竟如何從渦蟲腸道進入組織中以及 RNAi 於渦蟲的詳細作用機轉尚不明確。

tgs-1 的表現限定於渦蟲成體幹細胞 (pluripotent stem cells, PSCs) 中的前驅幹細胞—cNeoblasts 中，可利用 RT-qPCR (Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction) 來定量檢測渦蟲 *tgs-1* 基因的表現差異。*tgs-1* 基因的產物是一種膜蛋白，為 cNeoblasts 的標記 (marker) 之一，因此選擇其作為探討 RNAi 基因緘默 (gene silencing) 效率的目標基因，未來可以應用於渦蟲幹細胞與再生相關研究。

本研究利用 RT-qPCR 檢測 *tgs-1* 的表現量，探討餵食 dsRNA 在東亞渦蟲 *Dugesia japonica* 的 RNAi 作用機制與效率。實驗發現，六次的 dsRNA 餵食比餵食 2 次或 4 次有更好的效率，餵食不同長度的 dsRNA 對 RNAi 效率沒有顯著影響。*tgs-1* 的基因緘默作用也會影響其他基因的表現，包括少量增加 *Ago2* 的表現量，明顯提升 *gata* 的表現量，然而 *piwi-1* 表現量明顯降低。除此之外，透過胺基酸序列比對發現渦蟲與線蟲 *SID-1* 同源基因具有相當高的相似度。

由實驗結果結論多次 dsRNA 餵食可提高基因緘默的效率和 dsRNA 的 3' 序列在 RNAi 中的關鍵角色。*tgs-1* RNAi 也影響 *Ago2*、*gata* 和 *piwi-1* 的表現，這些基因與 RNAi 的機制和 dsRNA 的攝入量有關。未來將進一步探討 dsRNA 是如何通過渦蟲腸道、是否透過 *SID-1* 蛋白攜帶進入體腔中、dsRNA 在渦蟲體內的切割與作用位置和胞吞作用在 RNAi 所扮演的角色等問題，相關實驗仍在進行中。

本研究結果將有助於了解餵食渦蟲 dsRNA 經由渦蟲腸道進入體內細胞引起 RNAi 現象的機制，除了能比較扁形動物 RNAi 系統與其他物種，例如哺乳類細胞、果蠅、以及線蟲 RNAi 的作用差異之外，更能有效應用於於探討基因參與渦蟲再生與體軸形成的發育的研究上。

Abstract

RNA interference (RNA interference, RNAi) has been widely used in studies related to the regeneration of planarians. Feeding a mixture of double-stranded RNA (dsRNA) and chicken liver is a convenient and easy way to produce an effect of transcriptional gene silencing, but dsRNA is only present in the intestines four days after feeding the planarian. How dsRNA enters the tissue from the planarian's intestines and the RNAi mechanism in planarians is unclear.

Tetraspanin group-specific gene-1 (tgs-1) is the target gene of this research. *tgs-1* is only expressed in the novel subtype of planarian stem cells, called cNeoblasts. cNeoblasts is pluripotent stem cells that sustain tissue homeostasis and regeneration of lost body parts in planarians. The product of *tgs-1* gene is a membrane protein, which is used as the markers of cNeoblasts.

To analyze the gene silencing efficiency of the target gene *tgs-1*, I used Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction as a method of exploring the mechanism and efficiency of RNAi in *Dugesia japonica*. The results showed feeding dsRNA 6 times significantly shows better efficiency of gene silencing than feeding 2 or 4 times. In addition, there is no significant difference in the RNAi efficiency between feeding different lengths of dsRNA. *tgs-1* RNAi increases the expression of *Ago2* and *gata* but inhibits the expression of *piwi-1*. Furthermore, alignments of systemic RNA interference defective-1 show high conservation between *D. japonica* and *C.elegans*.

In conclusion, multiple dsRNA feedings lead to better efficiency in gene silencing. The 3' sequence of dsRNA is the most crucial in RNAi. *tgs-1* RNAi also influences gene expressions including *Ago2*, *gata*, and *piwi-1*, which are related to the mechanism of RNAi and the intake of dsRNA. Further experiments are needed including how dsRNA is transported through the guts, whether systemic RNA interference defective-1 membrane protein is involved or not, the distribution of dsRNA in the planarian body, and the necessity of endocytosis in the RNAi mechanism will be conducted in the future.

The results from this study will help people to understand the mechanism of how dsRNA gets into planarian's cells via intestines, and is an important key to improving the gene silencing effect of feeding dsRNA to planarians.

壹、研究動機

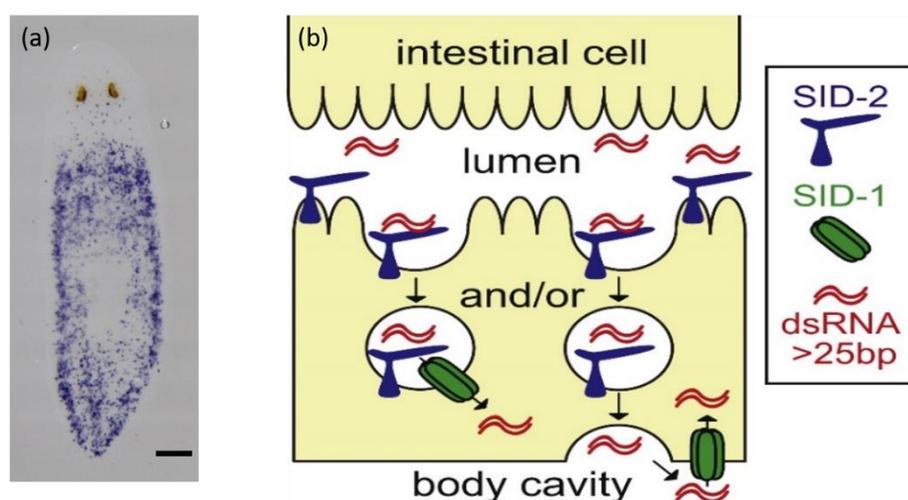
核糖核酸干擾 (RNA interference, RNAi) 是被廣泛應用的實驗技術，主要利用微型核糖核酸 (microRNA, miRNA) 和小干擾核糖核酸 (small interfering RNA, siRNA) 這兩種小 RNA (small RNA)協助控制基因表現的系統，透過與 Argonaute 蛋白 (Ago) 和 RISC (RNA induced silencing complex) 等多種胞內蛋白質分子合作，透過抑制細胞內 mRNA 的轉譯調節基因的表現，又被稱為基因後轉錄的沈默作用 (post transcriptional gene silencing)。

核糖核酸干擾 (RNA interference, RNAi) 是被廣泛應用於探討渦蟲再生能力時的實驗技術，多採用餵食 (feeding) 雙股RNA (dsRNA) 或顯微注射(microinjection)、浸泡於dsRNA溶液中 (soaking in dsRNA solution) 的方式(Rouhana, L., Weiss, J. A., Forsthoefel, D. J., Lee, H., King, R. S., Inoue, T., Shibata, N., Agata, K., & Newmark, P. A., 2013)。但是，研究指出RNAi在渦蟲體內不同的組織的基因緘默效果並不相同。渦蟲體內參與RNAi的多種蛋白質分子，Dicer和Ago蛋白等普遍存在於渦蟲細胞中。但是，這些只涉及細胞層級的基礎RNAi機轉不足以解釋基因緘默效果在渦蟲的歧異性，因此涉及dsRNA運輸的膜蛋白質可能是渦蟲RNAi作用機轉的重要關鍵。

*Tetraspanin group-specific gene-1 (tgs-1)*的表現限定於渦蟲再生幹細胞 (pluripotent stem cells, PSCs) 的前驅細胞—cNeoblasts 早期分化時(圖一(a))，因此在利用 RT-qPCR (Quantitative real time polymerase chain reaction) 定量的基因表現時能夠以渦蟲*tgs-1*的表現量作為cNeoblasts數量的指標。*tgs-1*基因的產物是一種膜蛋白，為 cNeoblasts 的標記 (marker) 之一，因此選擇其作為探討RNAi 基因緘默效率的目標基因，未來可以應用於再生相關研究。

RNAi 的技術也廣泛利用於不同的生物中。在線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 這樣的模式生物中，線蟲與渦蟲同樣能透過餵食 (feeding) 進入線蟲體內。進入線蟲體內的 dsRNA 可以透過 systemic RNA interference defective-1 (SID-1) 和 systemic RNA interference defective-2 (SID-2) (Jose, et al., 2007) 兩種膜蛋白經由腸道進入線蟲體內(圖一(b))。過去在線蟲的研究得知，SID-1 是一種 dsRNA 的被動運輸蛋白 (Joga, M, et al, 2016)，將 dsRNA 從細胞外運輸至細胞內。比起較短的 dsRNA，SID-1 對較長的 dsRNA (≥ 100 鹼基對) 有較佳的運輸功能，因此 SID-1 允許調控細胞基因表現的 dsRNA 進入細胞。SID-2 是表現於腸道細胞腸腔側的跨

膜蛋白，進行受器媒介胞吞而形成囊泡，負責將腸道中的 dsRNA 運輸至腸道細胞內。除此之外，相關研究在已知沒有 SID-1 膜蛋白的同源基因表現的果蠅 (*Drosophila*) 細胞中植入線蟲 SID-1 基因並使其表現後，果蠅細胞對非常低濃度的 dsRNA 擁有非常敏感且迅速的反應，顯示其在 RNAi 機制中的重要性，因此推測若渦蟲有 SID-1 同源蛋白，則該蛋白在渦蟲 RNAi 餵食機制可能扮演著重要的角色。



圖一、(a)以原位雜合技術 (whole-mount in situ hybridization, WISH) 所偵測的 *tgs-1* 於渦蟲中的表現，顯色的藍點為 *tgs-1* 表現的細胞; (b) 線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 的 dsRNA 進入體腔作用機轉 (Jose, et al., 2007)

然而渦蟲體內 SID 膜蛋白的存在還未被證實，dsRNA 如何進入渦蟲體內作用的機制也尚不明瞭。dsRNA 的分子長度、SID 蛋白在渦蟲體內與線蟲 SID 同源基因的功能保守性和胞吞作用對餵食 RNAi 效果的影響，甚至 SID 蛋白不均勻分布於渦蟲體內，都是影響餵食 dsRNA 達到渦蟲基因靜默效果的重要關鍵。

渦蟲的再生幹細胞 (pluripotent stem cells, PSCs) 稱為 Neoblasts。Neoblasts 有許多種類，能分別分化成不同的組織。其中分化能力極佳的一種稱為 Nb2 細胞 (Zeng, A., et al, 2018)，是其他 Neoblasts 細胞的前驅細胞，具有最完全的再生能力，是一種全能幹細胞。*tgs1* 基因表現於 Nb2 細胞的再生期間，是 Nb2 細胞在分化早期明顯且容易辨認的標誌(marker)之一，並且在小鼠胚胎的發育具有關鍵性的角色 (Jia, Y. et al., 2012)。因此，本實驗選擇 *tgs-1* 做為探討 RNAi 作用的目標基因。

探討渦蟲 RNAi 作用機制和神經再生基因 *tgs-1* 的效率、SID 蛋白在渦蟲神經細胞和再生幹細胞的分布，將有助於未來更進一步探討渦蟲再生幹細胞的分化與演變，應用於渦蟲再生領域研究。

貳、研究目的

- 一、探討 dsRNA 不同的餵食次數對渦蟲 RNAi 效果的影響
- 二、探討不同長度的 dsRNA 對渦蟲 RNAi 效果的影響
- 三、對渦蟲 *tgs-1* 基因進行 RNAi 後對其他基因的影響
- 四、探討渦蟲體內與線蟲 SID-1 同源基因的功能保守性

參、研究動物、設備及器材

- 一、實驗動物: 東亞渦蟲 *Dugesia japonica*

東亞渦蟲(圖二)在分類上屬於扁形動物門 (Phylum platyhelminthes)，渦蟲綱 (Class turbellaria)。本實驗選用東亞渦蟲 *Dugesia japonica*，又稱日本三角渦蟲，是台灣的原生種，常見於東亞地區。



圖二、東亞渦蟲 *Dugesia japonica*

- 二、藥品

2x T7 polymerase Master mix、T7 polymerase primer、plasmid、ddH₂O、Agarose、TAE buffer、SyberSafe DNA gel stain、loading dye、QG Buffer、isopropanol、PE Buffer、NFH₂O、10x transcription buffer、rNTP、dsRNA template、T7 polymerase、RNA sin、DNase I、0.5M EDTA、4M Lice、ETOH、雞肝、dsRNA、dye、2% gel、RNase ZAP、TRIzol、Chloroform、RNA、NFH₂O、dNTP、Random Hexamer、5x FS Buffer、DTT、SSIII RT、RNase Out、primer、ddH₂O、SYBER green master mix、cDNA、粗海鹽

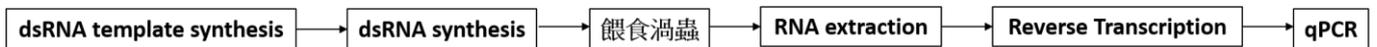
三、器材

離心機、移液管、核酸增值機、電泳槽、電子秤、Miniolute column、PCR tube、eppendorf、分光光度計 (Nanodrop 2000)、移液管、微量離心管 (eppendorf)、加熱板、水浴槽、恆溫箱、塑膠盒、研磨棒、qPCR 96 孔盤 (96- well qPCR plate)、qPCR 96 孔盤封膜

肆、實驗設計

一、探討 dsRNA 不同的餵食次數對 RNAi 效果的影響

(一) 實驗流程



(二) 實驗設計

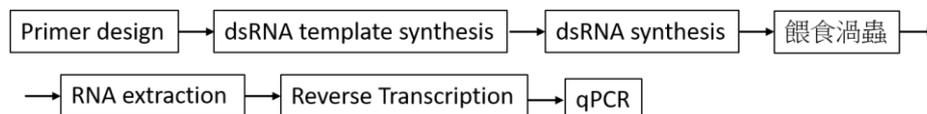
我們將 4ug 的 *tgs-1* 或 YFP dsRNA 混合於 16ul 的雞肝食物中，以不同的餵食次數：2 次、4 次、6 次為操縱變因，目標基因 *tgs-1* 為實驗組。由於渦蟲體內不表現 YFP 基因，因此餵食 YFP dsRNA 不影響渦蟲體內任何基因的表現，目標基因 *tgs-1* 的表現亦不受影響，故以其作為對照組，作為基因表現量的基準值 (表一)。

表一、探討 dsRNA 不同的餵食次數對 RNAi 效果的影響實驗中實驗組與對照組設計

	dsRNA 與雞肝混合物餵食次數(次)		
<i>tgs-1</i> knock down (實驗組)	2	4	6
YFP knock down (對照組)	2	4	6

二、探討不同長度的 dsRNA 對 RNAi 效果的影響

(一) 實驗流程



(二) 實驗設計

從 *tgs-1* 基因序列的 5'端開始縮短合成的 dsRNA 長度，將 *tgs-1* 基因序列三等分，能保留序列 3' 端中被 RNAi 作用分子: Argonaute 蛋白和 RISC (RNA induced silencing complex) 等多種蛋白質分子辨識並發生交互作用的序列，因此實驗分別設計引子，合成 *tgs-1* 基因全長 (1404 個核苷酸)、1023 個核苷酸和 500 個核苷酸長的 dsRNA (圖三)。同樣以 *YFP* 基因作為對照組，為基因表現量的基準值。



圖三、設計不同的引子，分別合成不同長度之 dsRNA 示意圖

三、對渦蟲 *tgs-1* 基因進行 RNAi 後對其他基因的影響

為了確保 *tgs-1* 基因緘默時並不影響渦蟲體內 RNAi 機轉相關蛋白基因的表現，因此檢驗在針對 *tgs-1* 的 RNAi 中，能與 siRNA 結合的 Argonaute 2 (Ago 2) 蛋白的基因表現量，確認 RNAi 作用機制的正常運作。

為了確保 *tgs-1* 基因緘默時並不影響渦蟲本身腸道的發育，實驗使用 GATA 轉錄因子來檢測渦蟲的腸道系統。GATA 轉錄因子大量表現於渦蟲的腸道細胞並少量於其即將分化為腸道細胞的 Neoblasts 再生細胞。檢驗 *gata* 的基因表現量可以了解腸道細胞和腸道的前驅細胞的分化情形，因為腸道細胞分化與健康程度也可能影響 dsRNA 進入渦蟲內部組織的效果。

此外，*piwi-1* 基因能在 Neoblasts 再生細胞中大量表現，並且與渦蟲 piRNA 的作用有關。檢測 *piwi* 的表現量可以檢視 Neoblasts 細胞在渦蟲的相對數量，作為基因緘默效率的參考。

四、探討渦蟲體內與線蟲 SID-1 同源基因的功能保守性

SID-1 在線蟲體內與 dsRNA 的運輸作用密切相關，因此我們猜測渦蟲可能與線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 同樣具有 SID-1、SID-2 等 dsRNA 運輸蛋白不平均地分布於腸腔細胞與體內細胞表面，影響 RNAi 的作用效率。

利用 NCBI GenBank 比對渦蟲與線蟲 SID-1 同源基因的保守性，並對其胺基酸序列進行比對，尋找渦蟲體內 SID 同源蛋白。

伍、研究過程與方法

一、渦蟲飼養

實驗所使用的渦蟲採樣於宜蘭礁溪。將渦蟲飼養於含有微量粗海鹽的水中，恆溫 18.0°C，每週餵食磨碎過濾後的雞肝一次，並每 1-2 天換水一次。

RNAi 實驗時所使用的渦蟲體長約為 0.5-1.0 公分，須空腹一週後，才能作為實驗用的渦蟲。

二、引子設計

使用分子生物工作平台 Benchling 設計引子，並在網站 Integrated DNA technology (IDT) 檢驗引子在 PCR 過程中的可行性。引子的限制條件包括胞嘧啶 (C) 和鳥嘌呤 (G) 在引子中的比例含量 (G,C content) 和引子自己形成二級結構的機率參數。

三、dsRNA template synthesis

首先合成 dsRNA 的 DNA 模板。混合 2x Taq polymerase Master mix、T7 primer、ddH₂O 於 PCR tube 後，實驗組和對照組分別加入 *tgs-1*-insert plasmid (PTA) 和 *YFP* (Yellow fluorescent protein)-insert plasmid (L440)，進行 PCR。

PCR 產物經過凝膠電泳後，利用 MinElute Kit (Qiagen) 純化萃取出目標產物 (dsRNA template)，再以分光光度計測量產物 DNA 濃度。

四、dsRNA synthesis

混合 NFH₂O (Nuclease-free water, 去核酸酶無菌水)、10x transcription buffer、rNTP、dsRNA template、T7 polymerase、RNasin (核酸酶抑制劑)，置入 37°C 水浴槽 4 小時後，

加入 DNase I 後放回水浴槽，去除起初加入溶液中加入的 DNA。接著，加入 0.5M EDTA、4M Lisc、ETOH，置於-20°C 冰箱中 1.5 小時。最後利用 75%ETOH 析出 RNA，以 NFH₂O 回溶，以分光光度計測量 RNA 濃度。

五、以 dsRNA 餵食渦蟲

以 dsRNA 與雞肝混合物餵食渦蟲，進行 RNAi。

dsRNA 與雞肝混合物除了 dsRNA 和雞肝外，還包括染劑和凝膠。實驗組餵食 *tgs-1* dsRNA，對照組餵食 *YFP* dsRNA。添加染劑，能使渦蟲在進食後顯現出染劑顏色，方便確認每一隻渦蟲的進食狀況；添加凝膠則可以幫助混合物凝固。

六、RNA extraction 和 Reverse Transcription (RT)

萃取渦蟲的 RNA，用它來檢測實驗組的目標基因 *tgs-1* 和對照組的 *YFP* 基因在渦蟲體內的表現量。

先挑選 3-5 隻體長約為 0.5-1.0 公分，將停止餵食 dsRNA 後再空腹一週的渦蟲，置入微量離心管中，加入紫紅色的 TRIzol 來分離 RNA、DNA 和蛋白質，同時殺死渦蟲。以研磨棒伸入微量離心管研磨渦蟲直到其無法為肉眼所見。接下來加入 Chloroform，劇烈搖晃之後離心(12000g, 20min)，即可得分為三層的液體。無色透明的上層水層為 RNA、中間層的白色絮狀物質為 DNA、以及最下方紫紅色的有機層。取出最上層無色透明的上清液後，用 isopropanol 和 ETOH 將 RNA 析出，以 NFH₂O 回溶，得到萃取出來的 RNA 溶液。萃取出來的部分 RNA 溶液最後利用反轉錄酶 SS III RT 反轉錄為 cDNA。

七、qPCR

利用 qPCR 檢測目標基因 *tgs-1* 在 RNAi 的基因緘默 (gene silencing) 效果與效率。對照組 *YFP* 是在比較其與實驗組 *tgs-1* 兩者基因表現量時的相對基準值，並且利用渦蟲體內表現量穩定的 *tubulin* 基因作為我們在萃取 RNA 時造成的 DNA 污染誤差校正，檢測樣品中全部的 DNA 含量，為 qPCR 時的第二組控制組。除此之外，我也同時設置沒有被反轉錄(no RT)的負控制組 (negative control)，檢測 RNA 萃取過程中的 DNA 污染程度 (表二)。

表二、qPCR 實驗的實驗組與對照組設計以及其作用對象與目的

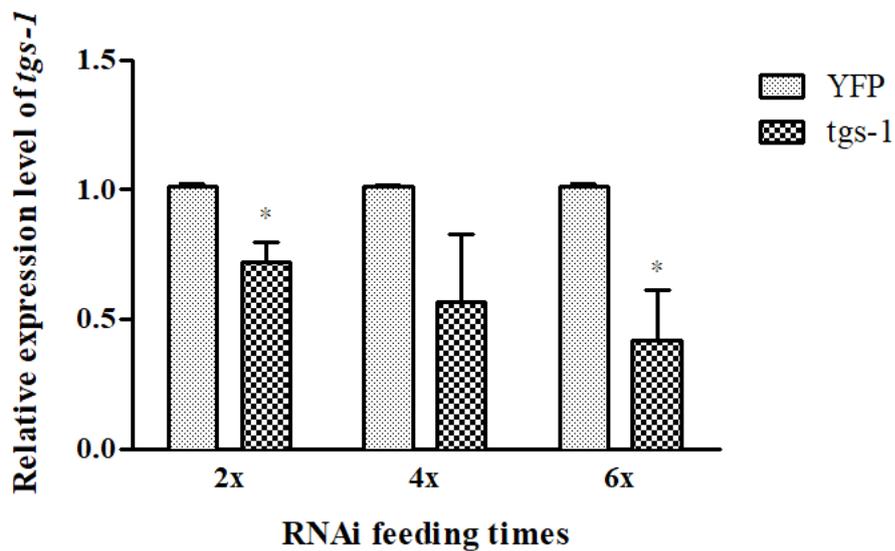
	實驗對象	目的
實驗組	<i>tgs-1</i>	RNAi 效率的觀察對象
對照組	<i>YFP</i>	<i>tgs-1</i> 基因表現量的相對基準值
	<i>tubulin</i>	檢測樣品中全部的 DNA 含量
	negative control	檢測 RNA 萃取過程中的 DNA 汙染程度

將 ddH₂O 和含螢光分子的 SYBER green master mix 與各個基因的 cDNA 和引子混合，進行 qPCR。

陸、研究結果與討論

一、探討 dsRNA 不同的餵食次數對 RNAi 效果的影響

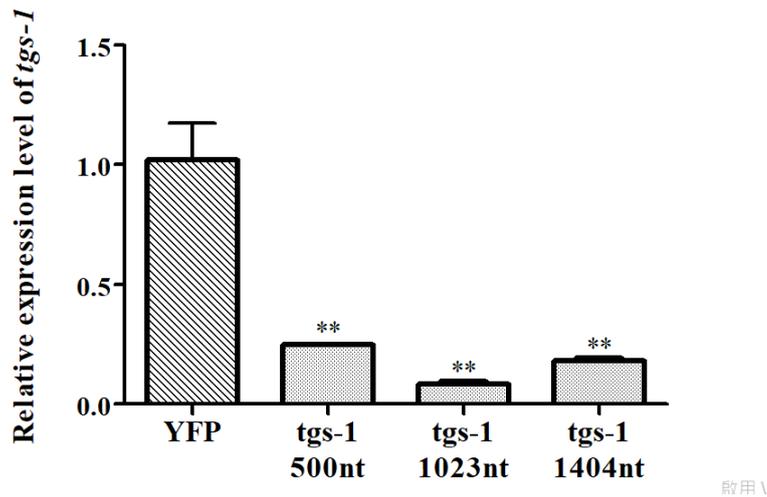
由 qPCR 實驗結果可以得知，六次的 dsRNA 餵食能對目標基因 *tgs-1* 達到最佳的基因緘默效果 (圖四)。



圖四、分別餵食渦蟲 2 次、4 次、6 次 dsRNA 進行 RNAi，*tgs-1* 與 *YFP* (實驗組) 的相對基因表現量 (* $p < 0.05$, *t*-test)

二、探討不同長度的 dsRNA 對 RNAi 效果的影響

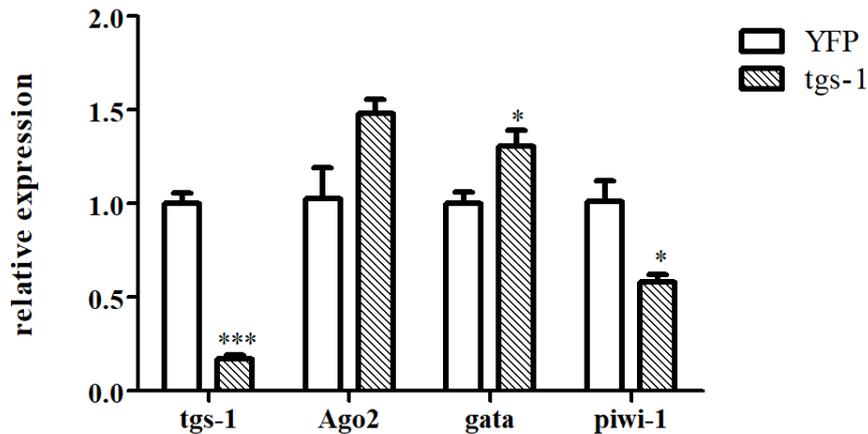
分別餵食六次 *tgs-1* 基因全長 (1404 個核苷酸)、1023 個核苷酸和 500 個核苷酸長的 dsRNA 進行 RNAi。各組餵食 *tgs-1* dsRNA 與 *YFP* dsRNA (實驗組) 的渦蟲中, *tgs-1* 表現量都有明顯下降, 顯示餵食的 dsRNA 在 3' 端的縮短並不顯著影響 RNAi 的基因沉默效果 (圖五)。



圖五、分別餵食 *tgs-1* 基因全長 (1404 個核苷酸)、1023 個核苷酸和 500 個核苷酸長的 dsRNA 進行 RNAi。
tgs-1 與 *YFP* (實驗組) 的相對基因表現量 (** $p < 0.005$, *t*-test)

三、對渦蟲 *tgs-1* 基因進行 RNAi 後對其他基因的影響

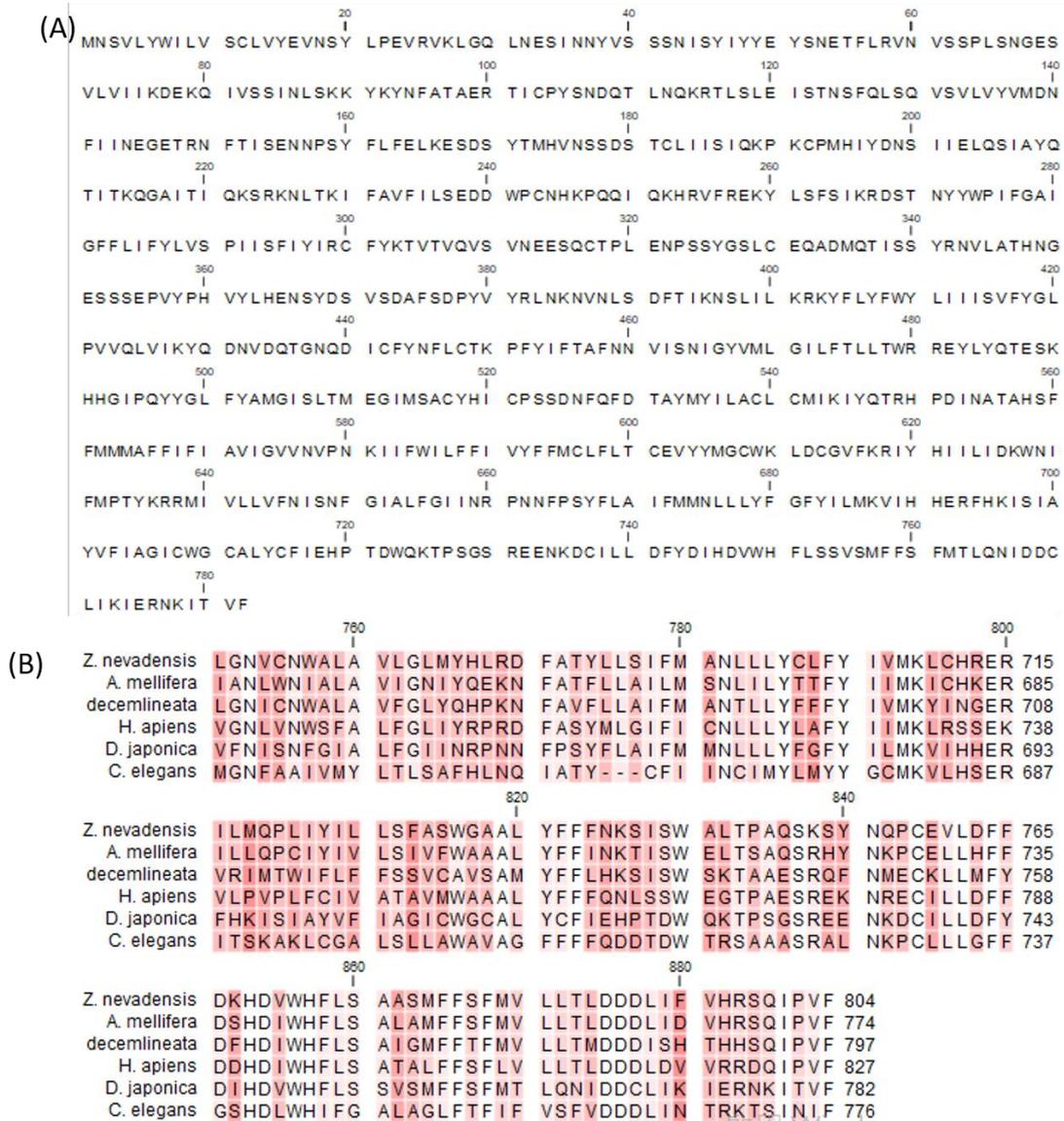
對目標基因 *tgs-1* 的基因緘默作用後少量增加了 *Ago2* 表現量; *gata* 的表現量明顯提升，顯示餵食 dsRNA 可以促進腸道細胞的分化，因此提升 RNAi 的效果，然而 *piwi-1* 表現量則明顯降低 (圖六)。



圖六、*tgs-1*, *Ago2*, *gata*, *piwi-1* 的基因相對表現量 (***) $p < 0.005$; * $p < 0.05$, *t*-test)

四、探討渦蟲體內與線蟲 *SID-1* 同源基因的功能保守性

比對 NCBI database 以及實驗室過去定序的渦蟲轉錄體資料庫，我比對出渦蟲的 *SID-1* 基因，命名為 DjSID-1，其蛋白序列如圖七 A 所示。此外渦蟲體內與線蟲 *SID-1* 同源基因的胺基酸序列具有相當高的相似度 (圖七 B)，提供與其他物種同源且序列相近的證據。



圖七、(A)渦蟲 DjSID-1 序列; (B)渦蟲 (*Dugesia japonica*)、線蟲(*Caenorhabditis elegans*)、以及其他動物 SID-1 同源蛋白胺基酸序列比對分析 (粉紅色顏色越深代表同源性越低) (Z. nevadensis: termite; L. decemlineata: beetle; A. mellifera: bee)

柒、結論

由實驗結果顯示，在餵食六次 dsRNA 後的 RNAi 基因緘默效果最好，並且餵食的 dsRNA 在 3' 端的縮短並不顯著影響 RNAi 的基因緘默效果，推測此結果和與 siRNA 穩定結合的 Ago 蛋白在長時間的 RNAi 作用下已經累積足夠的濃度有關，並且顯示 dsRNA 在 3' 端在 RNAi 作用的重要性。不僅如此，*tgs-1* 的基因緘默作用後少量增加了 *Ago2* 表現量; *gata* 的表現量

明顯提升，顯示餵食 dsRNA 可以促進腸道細胞的分化，因此提升 RNAi 的效果，然而 *piwi-1* 表現量則明顯降低，顯示對 *tgs-1* 的緘默作用同時減少了 Neoblasts 的細胞數。

SID-1 初步的比對結果提供重要的證據，後續將進行 DjSID-1 基因的選殖並嘗試 RNAi，將有助於接下來進一步探討渦蟲體內與線蟲 SID 同源基因與膜蛋白的功能保守性、dsRNA 在渦蟲體內的分布與 RNAi 持續作用時間長短與 RNAi 作用時胞吞作用所扮演的角色等方向的研究。

捌、未來展望

本研究規劃在未來的實驗中進一步探討渦蟲體內與線蟲 SID-1 同源基因與膜蛋白的功能、胞吞作用在 RNAi 所扮演的角色、dsRNA 在渦蟲體內的分布與 RNAi 持續作用時間長短，目前正在進行部分的實驗，說明如下：

一、探討渦蟲體內與線蟲 *SID-1* 同源基因對餵食 RNAi 的影響

首先利用餵食 dsRNA 的方式，對渦蟲 *DjSID* 基因進行靜默作用後，再餵食摻雜螢光分子的 dsRNA，觀察 dsRNA 在渦蟲體內的分布與分布量。其次，運用 WISH (Whole-mount in situ hybridization)，了解 *SID-1* 基因在渦蟲組織中表現的準確位置，實際驗證 SID-1 在渦蟲腸腔扮演著運輸 RNA 分子的角色。

二、探討 dsRNA 在渦蟲體內的切割與作用位置

利用摻雜螢光分子的 dsRNA 和螢光分子的 quenching 技術，對渦蟲進行 RNAi。被切割成的 RNA 因為螢光分子與其吸光物質無法緊密結合，將顯現出螢光，如此便能了解 dsRNA 在渦蟲體內被切割的位置、dsRNA 的擴散時間與在渦蟲體內的分布。

三、探討胞吞作用在 RNAi 所扮演的角色

利用化學性的胞吞作用抑制分子 (endocytosis inhibitor) (Dutta, D., & Donaldson, J. G., 2012) (附錄一)，探討 dsRNA 在渦蟲體內胞吞作用的機制與運輸，探討 dsRNA 進入渦蟲體內時是否必須經過胞吞作用的路徑。

透過化學性胞吞作用抑制分子 (endocytosis inhibitor) 的作用，觀察渦蟲餵食 RNAi 的效果，了解胞吞作用對 RNAi 效果的重要性後，我們才能進一步探討 SID 等膜蛋白在 RNAi 中扮演的角色。

玖、參考文獻

- Dutta, D., & Donaldson, J. G. (2012). Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cellular logistics*, 2(4), 203–208.
- Jia, Y., Viswakarma, N., Crawford, S. E., Sarkar, J., Sambasiva Rao, M., Karpus, W. J., Kanwar, Y. S., Zhu, Y. J., & Reddy, J. K. (2012). Early embryonic lethality of mice with disrupted transcription cofactor PIMT/NCOA6IP/Tgs1 gene. *Mechanisms of development*, 129(9-12), 193–207.
- Jose, A. M., & Hunter, C. P. (2007). Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annual review of genetics*, 41, 305–330.
- Joga, M. R., Zotti, M. J., Smaghe, G., & Christiaens, O. (2016). RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Frontiers in physiology*, 7, 553.
- Rouhana, L., Weiss, J. A., Forsthoefel, D. J., Lee, H., King, R. S., Inoue, T., Shibata, N., Agata, K., & Newmark, P. A. (2013). RNA interference by feeding in vitro-synthesized double-stranded RNA to planarians: methodology and dynamics. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 242(6), 718–730.
- Zeng, A., Li, H., Guo, L., Gao, X., McKinney, S., Wang, Y., Yu, Z., Park, J., Semerad, C., Ross, E., Cheng, L. C., Davies, E., Lei, K., Wang, W., Perera, A., Hall, K., Peak, A., Box, A., & Sánchez Alvarado, A. (2018). Prospectively Isolated Tetraspanin⁺ Neoblasts Are Adult Pluripotent Stem Cells Underlying Planaria Regeneration. *Cell*, 173(7), 1593–1608.e20.

壹拾、附錄

Endocytosis inhibitors	Pathways targeted	Mode of action	Comments
Chemical inhibitors			
Hypertonic sucrose ¹³	CME	Traps clathrin in microcages	Nonspecific; interferes with fluid phase macropinocytosis ¹⁵
Potassium depletion ¹¹	CME	Aggregates clathrin	Nonspecific; affects actin cytoskeleton ⁴⁸
Cytosol acidification ¹³	CME	Inhibits the scission of the clathrin pits from the membrane	Interferes with macropinocytosis and actin cytoskeleton ^{16,17}
Chlorpromazine ¹⁸	CME	Translocates clathrin and AP2 from the cell surface to intracellular endosomes	Inhibits CIE in some cells ¹⁹
Monodansylcadaverine ⁴⁹	CME	Stabilizes CCVs	Global changes in actin dynamics ⁵⁰
Phenylarsine oxide ⁵¹	CME	Not clearly known.	Inhibits macropinocytosis ⁵² and phagocytosis ⁵³
Chloroquine ¹⁸	CME	Affects the function of CCVs	
Monensin ⁵⁴	CME	Affects the proton gradient	
Phenothiazines ^{55,56}	CME; phagocytosis	Affects the formation of CCVs	
Methyl- β -cyclodextrin ²⁰	Lipid raft	Removes cholesterol out of the plasma membrane	Interferes fluid phase endocytosis ²¹ and CME ²²
Filipin	CIE	Binds to cholesterol in the membrane	Toxic at higher concentration; inhibits CME ²²
Cytochalasin D, latrunculin	Phagocytosis; macropinocytosis	Depolymerizes F-actin	Affects most endocytic pathways ⁸
Amiloride	Macropinocytosis	Inhibits Na ⁺ /H ⁺ exchange	May affect actin ⁵⁷
Pharmacological inhibitors			
Dynasore ²⁹	CME	Blocks GTPase activity of dynamin	Interferes with actin ³¹
Dynoles, dyngoes ³⁰	CME	Blocks GTPase activity of dynamin I	Interferes with actin
Pitstop 2 ³⁴	CME	Interferes with binding of proteins to the N-terminal domain of clathrin	Most forms of CIE affected; causes decrease in PM mobility ²⁵
Genetic approaches			
Dynamin mutant, Dyn K44A ³⁷	CME	Defective in GTP hydrolysis	Enhances fluid phase uptake
AP180C ⁴⁰	CME	Sequesters clathrin	
Eps15 mutant ⁴¹	CME	Inhibits clathrin pits assembly	Other secondary effects (e.g., changes in gene expression) might occur due to overexpression and knocking down for several days
Clathrin Hub mutant ⁴²	CME	Dominant negative mutant of clathrin	
siRNA of clathrin	CME	Blocks formation of clathrin pits	
siRNA of AP2	CME	Blocks formation of AP2-dependent clathrin pits	

CME, clathrin-mediated endocytosis; CIE, clathrin-independent endocytosis.

附錄一、化學性胞吞作用抑制分子 (endocytosis inhibitor) (Dutta, D, et al, 2012)

【評語】 050013

1. 此作品利用 tgs-1 基因當 marker 來探討渦蟲的餵食不同次數 dsRNA 後的基因靜默效率。所得結果應有助於了解餵食渦蟲 dsRNA 經由渦蟲腸道進入體內細胞的機制，並且可藉此得知提升餵食 dsRNA 達到渦蟲基因靜默效果的關鍵。
2. 因為結論是利用餵食法有比注射法及浸泡法有更好的效果，作品中應該呈現比較並呈現此比較的結果，以強化此研究的價值性。
3. 目前所使用的 primer 長度仍然相當長，仍可試驗較短的效果。