

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050014

參展科別 動物學

作品名稱 高基氏體如何在細胞中偏安一隅？

就讀學校 國立竹北高級中學

指導教師 李品賢

作者姓名 楊云萱、劉昱君、謝宗諺

關鍵詞 高基氏體、中心體、微管

作者簡介



我是謝宗諺(左)，目前是在就讀於竹北高中三年級的學生，高二的時候我決定和同學一起投入科展研究，透過實驗觀察高基氏體在細胞中的位置如何調控，剛開始接觸這些專業器材及化學試劑有點摸不著頭緒，但經過幾個月的操作後，我也漸漸地對這些實驗器材熟悉，並愛上了生物科技這方面的領域。

我是劉昱君(中)，目前是在就讀於竹北高中的三年級學生，在我上了高中之後漸漸的接觸了一些關於生物實驗的相關操作，又加上高一的暑假有參加醫學工程營隊，學習到了一些知識，使我對生物逐漸產生了興趣，促使我高二參加了科展，做了有關細胞的研究，在其中我享受到實作的樂趣，也喜歡三個人一起努力的參與感。

我是楊云萱(右)，目前是在就讀於竹北高中的三年級學生，在高一時參加了清大生命科學人才培育計畫，進而開啟了進入大學實驗室請教授指導我們研究的契機。我在團隊團隊中擔任的是領導的角色，研究過程中也獲得了實驗操作技巧、增強團隊合作和有邏輯的解決問題的能力，也期待能在未來的大學階段中在科學的世界裡有更進一步的延伸學習。

摘要

高基氏體為細胞內重要的胞器，可加工修飾蛋白質並運輸胞囊。我們利用螢光染色法觀察三種不同物種的細胞，高基氏體顯著地聚集在細胞一側。細胞分裂時如何平均分配高基氏體給子細胞？實驗利用基因重組轉殖螢光蛋白標記中心體、微管、內質網、粒線體，發現只有中心體與其延伸的微管會與高基氏體顯著地聚集在同一側，而破壞掉中心體延伸出的微管會使高基氏體無法聚集，由此可推測細胞利用中心體延伸的微管來聚集高基氏體。我們還發現細胞分裂時，高基氏體會先分散到細胞質各處，細胞分裂後再聚集到中心體周遭。在拍攝活細胞細胞分裂的實驗中，顯示中心體會藉由微管聚集高基氏體，以重新排列微管的方式來牽動平均分配高基氏體至兩側。本實驗確認高基氏體的位置與微管、中心體移動有高度相關。高基氏體移動並聚集一側有助於建立細胞極性，這與物質運送分泌、細胞爬行皆有關聯。

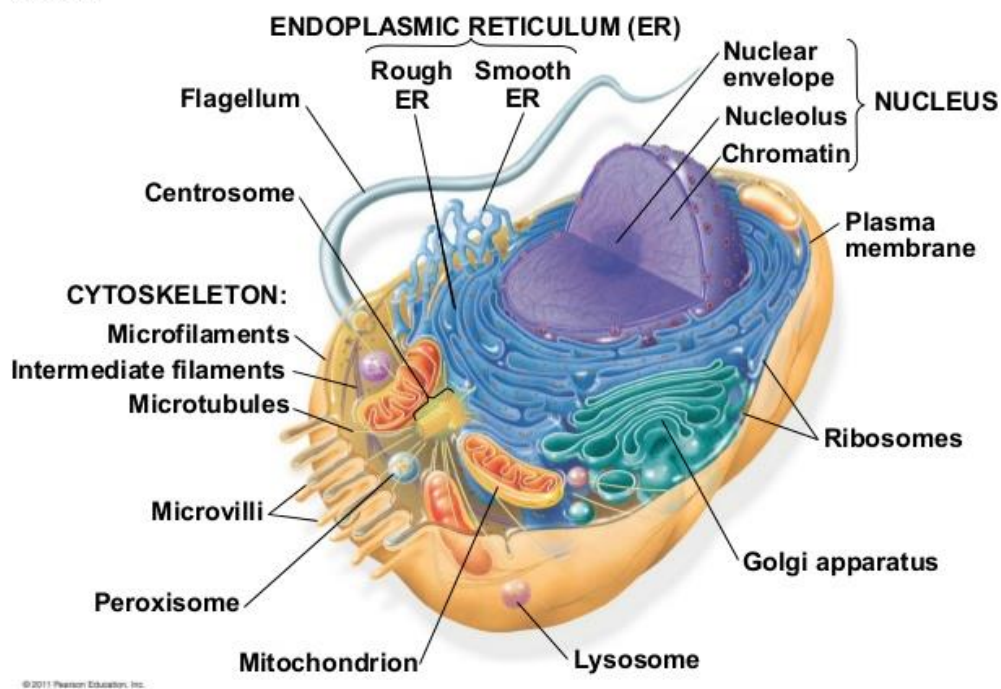
Abstract

Golgi apparatus is an important intracellular organelle, which can process and modify proteins and transport vesicles. We observed three different species of cells by fluorescent staining, and Golgi was significantly gathered on one side of the cells. We ask how mother cell evenly distribute Golgi to the daughter cells during cell division? We uses genetic recombination technique to label centrosome, microtubules, ER and mitochondria with fluorescent proteins. We found that only the centrosome and those “centrosome-extending” microtubules will gather on the same side as the Golgi. Disrupting the formation of the extending microtubules from the centrosome will make the Golgi unable to gather, verifying that the cells use the extending microtubules from the centrosome to gather Golgi. We also found that during the cell division, the Golgi will be dispersed throughout the cytoplasm. In the experiment of real-time photographing of cell division, we showed that the centrosome gathers Golgi through the action of microtubules, rearranges the microtubules, and facilitates Golgi to be evenly distributed. These experiments confirm that the position of the Golgi is highly correlated with the movement of microtubules and centrosomes. The moving and gathering side of Golgi helps to establish cell polarization, which is related to substance transport and cell crawling.

壹、研究動機：

從國中到高中的課本的細胞圖(圖一)都長得一樣，高基氏體的狀態和其它胞器不同，圖中的高基氏體總是畫在細胞的一側，而其他胞器卻是分散分佈，是實際狀況如此還是各版本恰好相同?於是我們在好奇心的驅使下便找了生科方面的老師詢問並進行實驗探討其原因。

Figure 6.8a

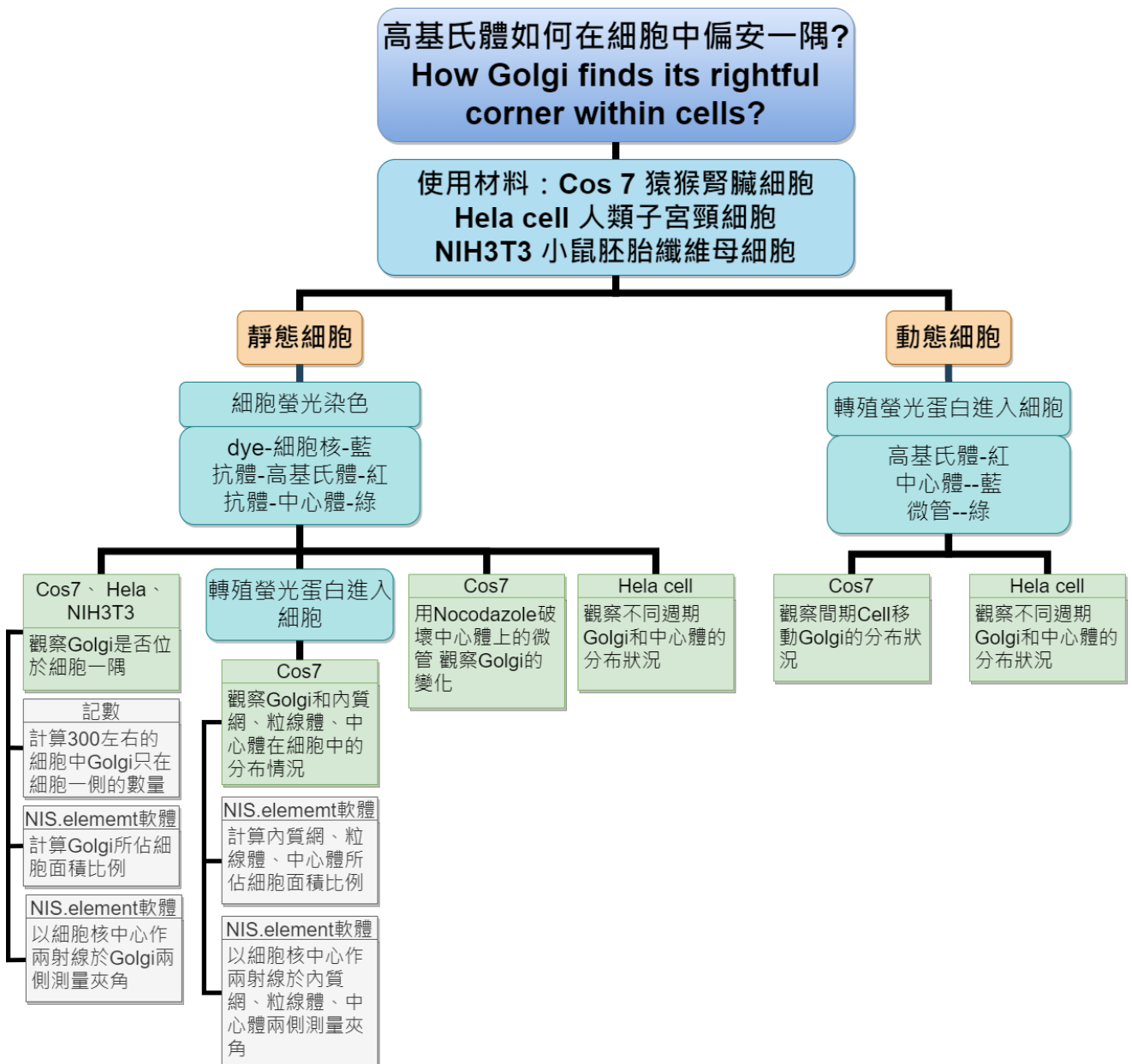


圖一、教科書上的細胞胞器分佈圖。

粒線體、內質網等胞器會散佈在細胞質中，但高基氏體會聚集在細胞的一側。

貳、研究目的：

- 一、觀察不同真核細胞中高基氏體的分佈位置。
- 二、觀察高基氏體與其他胞器的相對位置。
- 三、探討中心體和高基氏體的分佈位置的關係。
- 四、觀察高基氏體在細胞週期的各個階段中的分佈位置變化。



參、研究設備及器材：

一、設備：

活細胞螢光倒立式顯微鏡、細胞培養無菌操作臺、細胞培養箱、細菌培養箱、離心機、細胞影像分析平台、水浴槽、電泳槽、加熱器、細胞培養皿、8-well 活細胞觀察培養皿、血球計數器、定量吸管(Pipette)。

二、實驗細胞:

HeLa 細胞株(人類子宮頸細胞); COS7 細胞株(猿猴腎臟細胞); NIH3T3 細胞株(小鼠胚胎纖維母細胞)。

三、實驗試劑：

- (一)、細胞染色實驗：PBS (Phosphate buffered saline;磷酸鹽緩衝生理鹽水)、4% 福馬林、0.1% Triton X-100、2% BSA (Bovine serum albumin;牛血清球蛋白)、Rabbit anti-pericentrin 抗體、Mouse anti-GM130 抗體、Goat anti-rabbit 488nm 綠色螢光抗體、Goat anti-mouse 564nm 紅色螢光抗體、DAPI 去氧核糖核酸染劑。
- (二)、DNA 轉殖實驗：Poly D-lysine、Turbofect 轉殖試劑、OptiMEM 細胞培養液、mCherry-Giantin 重組 DNA(會生成紅色螢光高基氏體蛋白質)、CFP-PACT 重組 DNA(會生成藍色螢光中心體蛋白質)、EMTB-Neon 重組 DNA(會生成綠色螢光微管蛋白質)、YFP-Cb5 重組 DNA(會生成綠色螢光內質網蛋白質)、Tom20-YFP 重組 DNA(會生成綠色螢光粒線體蛋白質)、YFP-PACT 重組 DNA(會生成綠色螢光中心體蛋白質)。
- (三)、破壞細胞微管實驗：DMEM 細胞培養液、Nocadazole。
- (四)、細胞繼代培養：PBS、Trypsin (胰蛋白酶)、DMEM 細胞培養液。
- (五)、基因重組實驗：EcoRI 切割酶、AgeI 切割酶、Cutsmart 緩衝液、DNA 純化套組、DH5 α 細菌、基因接合酶、A 緩衝液、B 緩衝液。

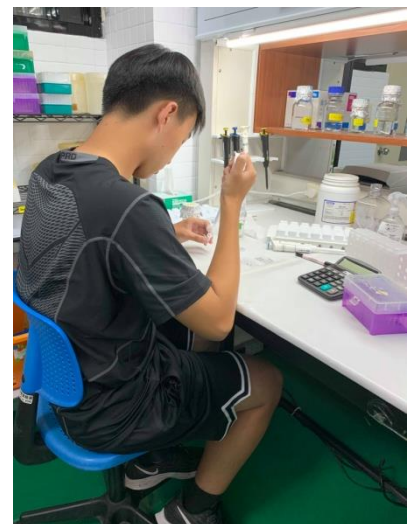
(六)、重組基因萃取實驗：PD1 緩衝液(EDTA、Glucose、RNaseA)、PD2 緩衝液(NaOH、SDS)、PD3 緩衝液 (Potassium acetate)、Isopropanol、99% EtOH。

肆、研究過程或方法：

一、觀察三種真核細胞株(人類 HeLa 細胞、猿猴 COS7 細胞及小鼠 NIH3T3 細胞)中高基氏體的分佈位置

(一)、螢光染色標定高基氏體：

1. 將三種細胞種在 8-well 培養皿中，並於細胞培養箱中 37°C, 5% CO₂ 培養過夜。
2. 吸除 8-well 培養皿內原有的培養液。
3. PBS 緩衝液沖洗培養皿三次。
4. 固定細胞：4% 福馬林，室溫 15 分鐘(圖二)。
5. PBS 緩衝液沖洗培養皿三次。
6. 細胞膜穿孔：0.1% Triton X-100，室溫 45 分鐘。
7. PBS 緩衝液沖洗培養皿三次。
8. Blocking：2% BSA，室溫 45 分鐘。
9. 用一級抗體(Rabbit anti-pericentrin 抗體 1:2000)標定中心體蛋白，一級抗體(Mouse anti-GM130 抗體 1:500)標定高基氏體，室溫 1 小時。
10. PBS 緩衝液沖洗培養皿三次。
11. 用二級抗體 Goat anti-Rabbit 488nm 綠色螢光抗體及 Goat anti-mouse 564nm 紅色螢光抗體去標定一級抗體，室溫 1 小時。
12. PBS 緩衝液沖洗培養皿三次。
13. 使用 DAPI(1:1000)染細胞核，室溫 10 分鐘。

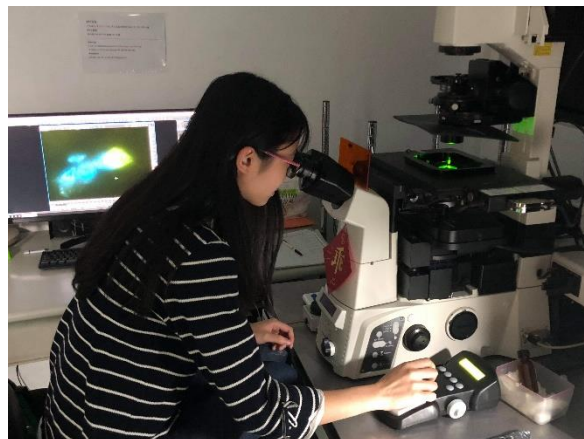


圖二

14. PBS 緩衝液沖洗培養皿三次。

(二)、將標定完成的細胞放置顯微鏡觀察高基氏體是否在細胞一側

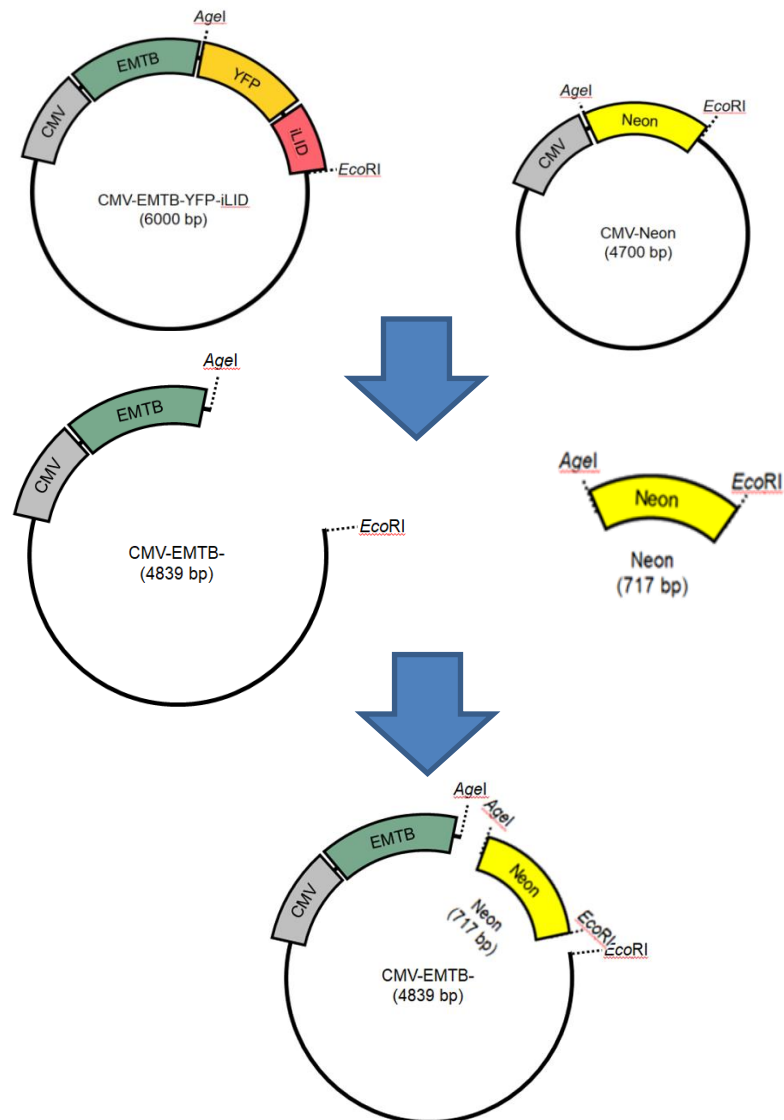
1. 選擇 60x 物鏡，使用 DAPI(激發光 340 nm/發散光 488 nm)及 mCherry(激發光 587 nm/發散光 610 nm)兩個螢光 channel 分別觀察三種細胞的細胞核及高基氏體的分佈位置。
2. 利用 NIS element AR 軟體控制顯微鏡將三種細胞拍攝存檔(圖三)，一總共拍攝 445 顆 HeLa 細胞、334 顆 COS7 細胞、120 顆 NIH3T3 細胞。利用 NIS element analysis、Photoscape 及 Powerpoint 軟體裁減及編排細胞螢光圖。進行以下三種方法來分析。
 - (1). 計算所拍攝的所有細胞，高基氏體只在細胞一側的比例。
 - (2). 利用 NIS element analysis 分析軟體觀察三種細胞高基氏體所佔的面積比例。
 - (3). 以細胞核為中心做兩輻射線於高基氏體兩側，測量兩線的夾角。
3. 利用 Excel 統計高基氏體在一側或不在一側(若高基氏體分布超過球面的 180 度則視為不再一側)的細胞各自所佔的比例，利用上述三種方式分析，並做成柱狀圖。



圖三

二、製作可生成『黃綠色螢光微管蛋白質』的重組 DNA：EMTB-Neon

(一)剪接接合出 CMV-EMTB-Neon 重組 DNA



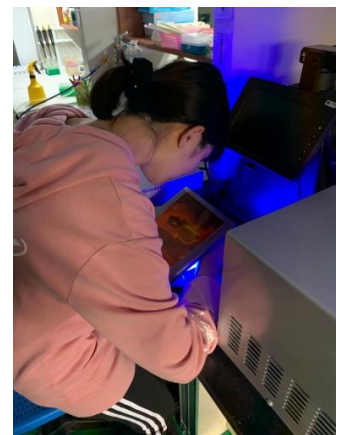
1. 將兩個重組 DNA(CMV-EMTB-YFP-iLiD 及 CMV-Neon)用限制酶 *AgeI* 及 *EcoRI* 切割成不同

DNA 片段，溶液配方如下：

CMV-EMTB-YFP-iLiD (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5 μl	CMV-Neon (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5 μl
<i>AgeI</i>			2 μl
<i>EcoRI</i>			2 μl
10 倍 Cutsmart 緩衝液			5 μl
ddH ₂ O			36 μl
Total			50 μl

- 將上述的藥品混合好後放入培養箱 37°C 兩個小時。
- 製備 1% TAE 洋菜膠。
- 將藥品加入洋菜膠跑膠 100 伏特 15 分鐘。
- 將切割後的 CMV-EMTB DNA 片段及 Neon DNA 片段收集起來(圖四)。
- 利用 DNA 純化套組純化收集的兩個 DNA 片段。
- 將 CMV-EMTB 與 Neon 兩個 DNA 片斷混合在一起,利用下述的配方藥品進行 DNA 接合,並置於室溫 15 分鐘。

CMV-EMTB DNA 片段	1.5 μ l
Neon DNA 片段	5 μ l
A 緩衝液	1 μ l
B 緩衝液	1 μ l
DNA 接合酶	0.5 μ l
Total	10 μ l



圖四

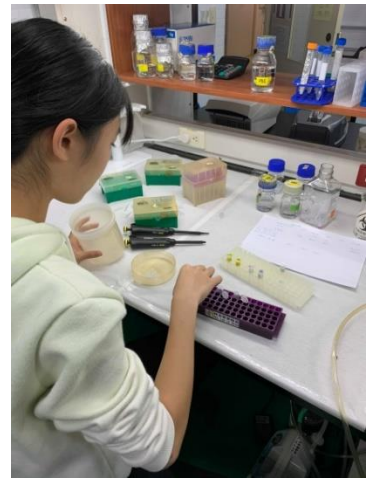
(二)、將接合好的重組 DNA 轉殖入大腸桿菌 DH5 α 中

- 將 30 μ l 的大腸桿菌 DH5 α 至於冰上靜置 20 分鐘。
- 取 3 μ l 接合好的重組 DNA 加入大腸桿菌 DH5 α , 靜置於冰上 15 分鐘。
- 42°C, 45 秒鐘將細菌打洞並讓重組 DNA 進入細菌中, 靜置於冰上 2 分鐘。
- 加上 200 μ l LB 培養液, 並放置培養箱 37°C 一個小時。
- 將滅菌的小塑膠珠放入帶有 Kanamycin 抗生素的洋菜膠盤, 以篩選轉殖成功的細胞。
- 將含有重組 DNA 的細菌培養液加到小塑膠珠上, 並搖動使其在洋菜膠盤上滾動數分鐘。倒掉小塑膠珠, 並將洋菜膠盤置於培養箱 37°C 16 個小時。

(三)、複製、倍增並萃取 EMTB-Neon 重組 DNA

- 把大腸桿菌 DH5 α 移植到懸浮液上 37°C, 250RPM 搖晃培養 16 小時。

2. 離心，使大腸桿菌 DH5 α 變成團塊。把上清液倒掉，加 PD1 緩衝液到菌液裡打散，讓它溶在 PD1 緩衝液裡。(圖五)
3. 加 PD2 緩衝液(強鹼，SDS) 把細胞膜和蛋白質去膜，雙股螺旋 DNA 間的氫鍵被破壞掉，變兩個單股 DNA，EMTB-Neon 重組 DNA 被分離成單股 DNA。
4. 加 PD3 緩衝液來酸鹼中和，使互補的單股 DNA 漸漸結合



圖五

5. 等 2 min 讓雙股 DNA 黏合。黏合的 EMTB-Neon 重組 DNA 是雙股 DNA，其為親水性，但因細菌本身的 DNA 非常大，沒有足夠時間結合回雙股而形成單股疏水性 DNA。
6. 離心，使親水性的雙股 EMTB-Neon 溶在上清液，細菌本身的 DNA 則因為是疏水性的特性被離心成底下團塊。
7. 將上清液抽出來，加異丙醇進 EMTB-Neon 重組 DNA，溶解後離心保留試管底部團塊，倒掉上清液。
8. 加酒精離心，倒掉上清液，保留試管底部團塊。
9. 加 20 μ l 的水，將實驗需要的 EMTB-Neon 重組 DNA 從大腸桿菌 DH5 α 取出。
10. 將 EMTB-Neon 重組 DNA 放入細胞中表現出蛋白質並拍成活細胞影像。

三、觀察 COS7 細胞中高基氏體與其他胞器的相對位置

(一)、利用微脂體 liposome 將 EMTB-Neon 重組 DNA 轉殖入細胞

1. 加 40 μ l OpiMEM 置於微量離心管中(OpiMEM 為一種適合將 DNA 與 liposome 形成複合物的培養液)，liposome 為微脂體，可與 DNA 結合成疏水性的複合物以順利攜帶

DNA 穿過細胞膜進入細胞。

2. 加入不同的重組 DNA 各 3 μ g 於微量離心管中，陸續加入的有
 - (1). EMTB-Neon 重組 DNA 會生成綠色螢光微管蛋白質
 - (2). mCherry-Giantin 重組 DNA 會生成紅色螢光高基氏體蛋白質
 - (3). CFP-PACT 重組 DNA 會生成藍色螢光中心體蛋白質
 - (4). YFP-Cb5 重組 DNA 會生成綠色螢光內質網蛋白質
 - (5). Tom20-YFP 重組 DNA 會生成綠色螢光粒線體蛋白質
 - (6). YFP-PACT 重組 DNA 會生成綠色螢光中心體蛋白質。
3. 加 3 μ l Turbofect 轉殖試劑與 DNA 混合均勻並靜置於室溫下 20 分鐘。
4. 將 COS7 細胞從細胞培養箱拿出，抽掉舊的培養液，接著用 PBS 沖洗培養皿 1 次，再加 1 ml Trypsin(胰蛋白酶)把細胞表面的黏附因子切除，使細胞懸浮於培養液中。
5. 收集含有 COS7 細胞的培養液，用血球計數器數懸浮細胞的數量。
6. 將一萬個 COS7 細胞與 DNA-Liposome 複合物混合，並將混合好的細胞種在 8-well 細胞培養皿上，置於細胞培養箱中 37°C、5% CO₂ 培養過夜。

(二)、將轉殖完成的細胞放置顯微鏡觀察不同胞器與高基氏體的相對位置

1. 顯微鏡選擇 60x 物鏡，使用 YFP(激發光 520 nm/發散光 546 nm)及 mCherry(激發光 587 nm/發散光 610 nm)兩個螢光 channels 分別觀察 COS7 細胞的高基氏體與內質網、粒線體、中心體這些不同胞器的分佈位置。
2. 利用 NIS element AR 軟體控制顯微鏡將標定不同胞器的細胞拍攝存檔。
3. 利用 NIS element analysis 及 Photoscape 軟體裁減及編排細胞螢光圖，分析觀察高基氏體與不同胞器於細胞中分佈位置、計算不同胞器於細胞中分佈面積比例及夾角。

4. 利用Excel統計不同胞器與高基氏體在同一側或不在同一側的細胞各自所佔的比例，並做成柱狀圖。

四、破壞中心體延伸出的微管對高基氏體分佈位置的影響

1. 將 1000 μ l 細胞培養液和 1 μ g 的 DNA 染劑(藍)混合，在四格培養皿中每隔加入 250 μ l 的配置溶液置 37°C 30 分鐘，
2. 加入 5 mM Nocadazole 至細胞培養液中，37°C 三個小時，使微管斷裂。
3. 放入活細胞影像台下觀測微管與高基氏體變動的關聯。

五、細胞繼代培養並觀察高基氏體在胞週期的各個階段中的變化。

1. 吸除培養皿內原有的培養液，加 5 ml PBS 沖洗培養皿。
2. 加 1 ml Trypsin 把細胞表面的黏附因子切除，使細胞懸浮於培養液中。
3. 加 5 ml 培養液使細胞懸浮在培養液中。離心 2000rpm，5 分鐘。
4. 離心完，吸掉上清液，保留試管底部的細胞團塊。
5. 將 1 ml 培養液加入離心管 把細胞團塊打散並使其懸浮於培養液中。
6. 將 0.1 ml 含細胞的培養液種到全新的 10 公分培養皿。
7. 補充 10 ml 培養液於培養皿中。
8. 將培養皿置於細胞培養箱中 37°C, 5% CO₂ 培養。

伍、研究結果：

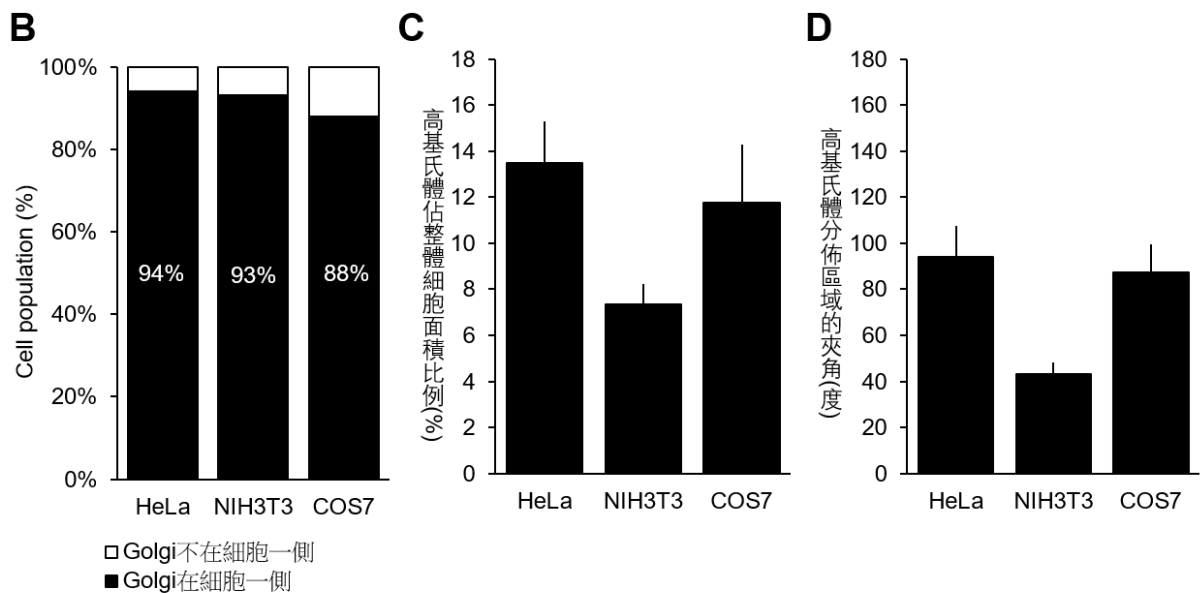
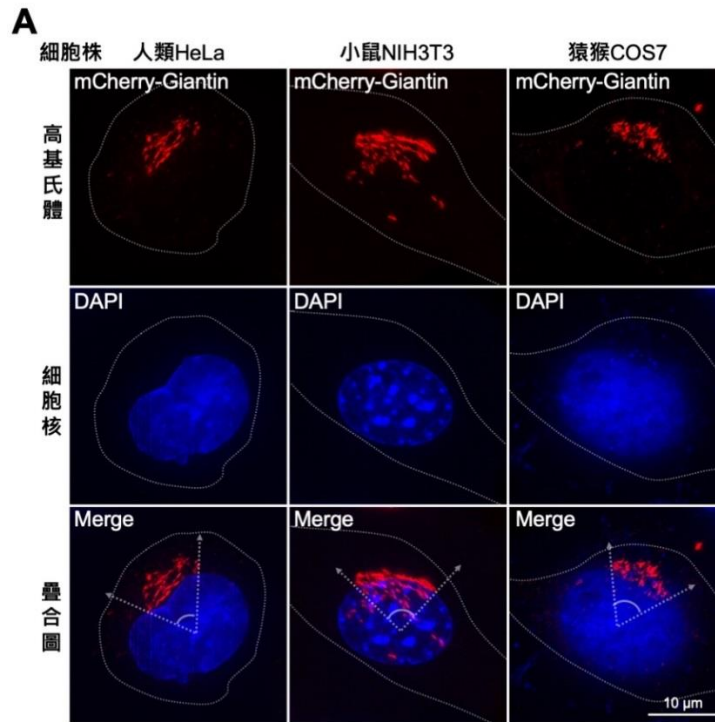
一、觀察不同真核細胞中高基氏體的分佈位置

為了探討此計畫所要研究的第一個重要問題：高基氏體是否位在細胞的一側？我們嘗試培養三種不同的真核細胞(HeLa:人類子宮頸細胞; COS7:猿猴腎臟細胞; NIH3T3:小鼠胚胎纖維母細胞)，接著再將這些細胞固定，並用特定的抗體標定它們的高基氏體，且用 DNA 染劑標定細胞核的位置（圖六 A），置於螢光顯微鏡下觀察後發現 COS7 細胞、HeLa 細胞及 NIH3T3 細胞的高基氏體位於細胞一側的比例分別高達 94%、93%及 88%(圖六 B)。

此外，我們還進一步利用兩種分析方式去精準地量化高基氏體聚集程度，首先我們測量高基氏體面積占比，結果在 COS7 細胞、HeLa 細胞及 NIH3T3 細胞的高基氏體分佈位置佔整個細胞面積為 $11.74\pm 2.55\%$ 、 $13.46\pm 1.82\%$ 、 $7.32\pm 0.91\%$ (圖六 C)，都為聚集在細胞內一小區域的胞器。

另外，我們以細胞核中心繪製兩條放射線並置於高基氏體分佈區域的兩端來測量其夾角，夾角小於 180° 代表此分析的胞器聚集在細胞的一側，量化結果發現在 COS7 細胞、HeLa 細胞及 NIH3T3 細胞的高基氏體分佈夾角為 $87.32\pm 12.13^\circ$ 、 $94.13\pm 13.49^\circ$ 、 $43.08\pm 4.97^\circ$ (圖六 D)，證明其高基氏體都會聚集在細胞一側。

綜合上述分析數據，我們發現高基氏體聚集在細胞一側此現象普遍存在於不同物種的細胞中，而且高基氏體只會聚集在約細胞體積 7~13%的面積中，並以 $43\sim 94^\circ$ 的夾角聚集在細胞的一側。



圖六、(A) 三種不同物種的真核細胞中，高基氏體(紅色)與細胞中分布的區域。細胞核(藍色)(B) 三種細胞中，呈現高基氏體於細胞一側的數量比例。(C) 三種真核細胞中，高基氏體佔整體細胞的面積比例。Data=mean±S.E.M.。(D) 三種真核細胞中，高基氏體分佈區域的夾角。藉由圖 A 的疊合圖中，以細胞核中心繪出放射的兩條線，分別置於高基氏體分佈區域的兩側，並計算出夾角。Data=mean±S.E.M.。(夾角小於 180° 代表高基氏體聚集在細胞的一側)

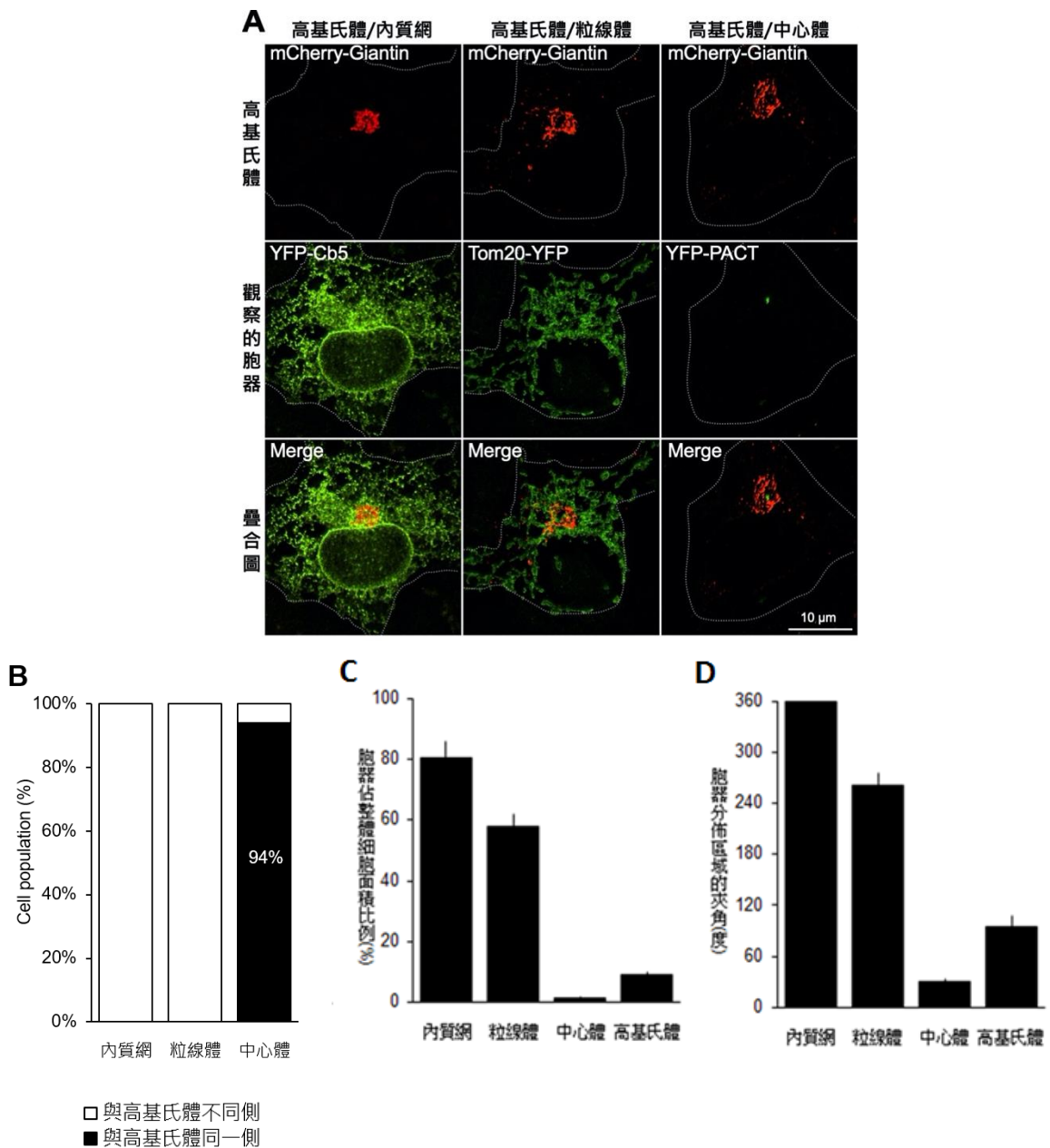
二、觀察高基氏體與其他胞器的相對位置

接著我們想要進一步探討高基氏體聚集在一側是否與其他胞器有關?為了回答此問題，我們先嘗試觀察是否其他胞器也會聚集在細胞的一側，若同樣有聚集現象，是否分佈在高基氏體同一側或是反側?藉此可能能夠找出與高基氏體分佈相關的重要胞器。

我們將會表達內質網螢光蛋白質(綠色)(YFP-Cb5)、粒線體螢光蛋白質(綠色) (Tom20-YFP)及中心體螢光蛋白質(綠色) (YFP-PACT)的重組基因轉殖進 COS7 細胞，待細胞培養 24 小時後表現出這些不同胞器的螢光蛋白後，再將細胞固定並用抗體標定高基氏體位置，並使用螢光顯微鏡觀察不同胞器跟高基氏體的相對位置 (圖七 A)。

結果發現內質網的分佈面積為整體細胞的 $80.35\pm 5.39\%$ ，且分佈夾角為 360° ，說明內質網廣泛分佈在細胞質中且沒有聚集於一側的現象。粒線體的分佈面積為整體細胞的 $58.06\pm 3.96\%$ ，且分佈夾角為 $260.86\pm 14.50^\circ$ ，說明粒線體廣泛分佈在細胞質中且沒有聚集於一側的現象。中心體的分佈面積佔整體細胞的 $1.62\pm 0.32\%$ ，其分佈夾角為 $29.54\pm 3.40^\circ$ ，顯示中心體高度聚集於細胞一側的一個小區域 (圖七 C、D)。

我們進一步比對此三個胞器與高基氏體(紅色)的相對位置，發現內質網跟粒線體不會與高基氏體分佈於細胞一側，中心體則會與高基氏體及高度分佈在細胞同一側(圖七 B，94%細胞其中心體跟高基氏體在同一側)，我們推測在這些胞器中，中心體可能與高基氏體聚集在細胞一側的機制有關，並會在後續實驗做進一步驗證。



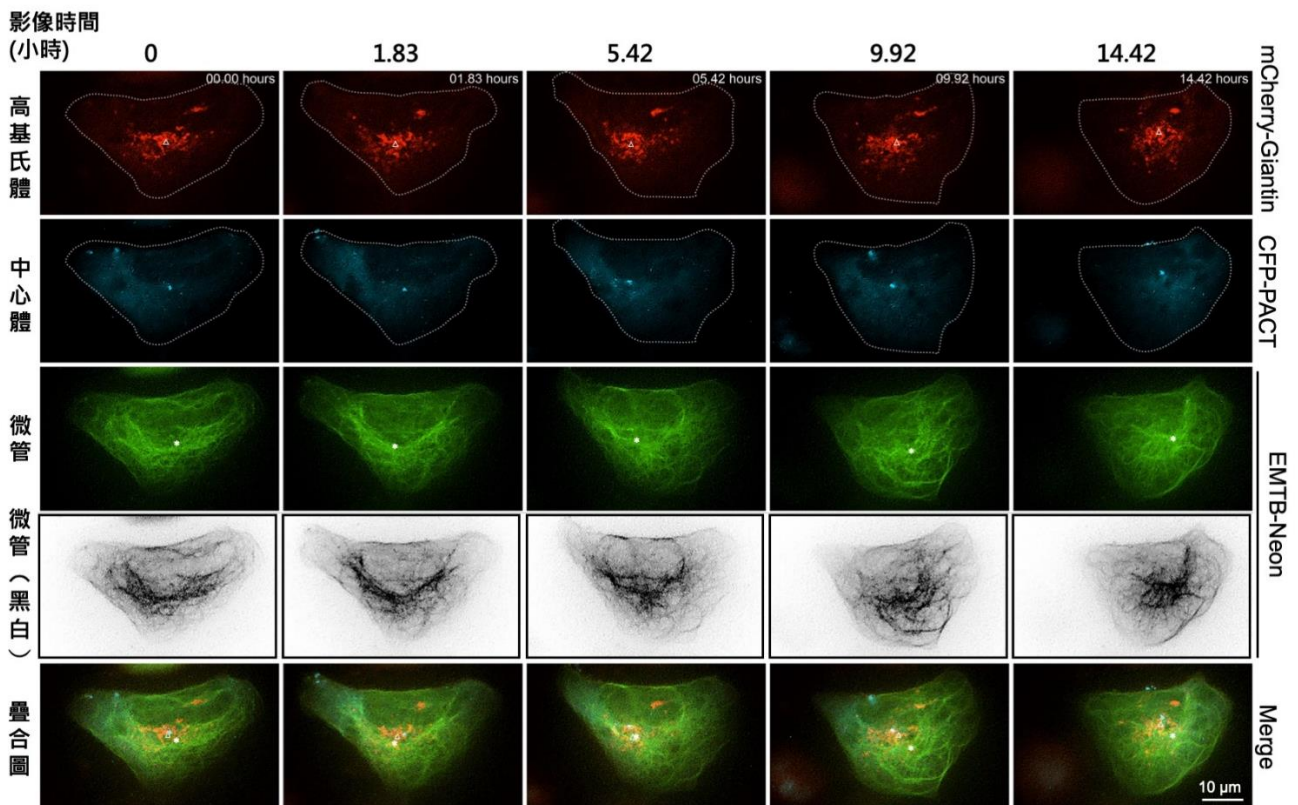
圖七、(A) COS7 細胞中，三種不同胞器（內質網、粒線體、中心體;綠色)與高基氏體(紅色)的分佈位置。(B)COS7 細胞中，三種胞器(內質網、粒線體、中心體)與高基氏體在細胞同一側的數量比例。(C)COS7 細胞中，不同胞器佔整體細胞的面積比例。 Data=mean±S.E.M.。(D)COS7 細胞中，不同胞器分佈區域的夾角。 Data=mean±S.E.M.(夾角小於 180° 代表此分析的胞器聚集在細胞的一側)。

三、探討中心體、微管與高基氏體之間的關係

以往的研究知道中心體可以作為微管形成中心，並且會有大量微管從中心體為中心放射延伸出去（參考文獻 1）。平時細胞只有一個中心體，而從實驗二結果發現高基氏體大多與其同側但不直接接觸（圖七 A 右列），因此想要繼續探討中心體是否依靠其所長出來的微管去控制高基氏體的分佈位置。為了解答此問題，我們嘗試去觀察高基氏體、中心體、及微管在細胞中的相對分佈位置。

為了標定活細胞中微管結構，我們必須要建構出能夠表現微管螢光蛋白質的重組 DNA，藉由限制酶切割實驗，我們收集了一個微管結合蛋白質 EMTB 的片段，並利用 DNA 接合酶將此片段與綠色螢光 Neon 接合成 EMTB-Neon 重組 DNA，將此重組 DNA 轉殖進 COS7 細胞中可將微管用綠色螢光標定出來。

此外我們還用相同方法去用藍色螢光及紅色螢光分別標定中心體及高基氏體(圖八)。將轉殖好的活細胞置於螢光顯微鏡下觀察其三種結構的即時動態，結果發現微管會聚集在中心體周遭(綠色螢光,反白圖的黑色結構),而高基氏體(紅色螢光)也會分佈在中心體及微管聚集處。用顯微鏡觀察活細胞動態時，視野下的細胞漸漸自主地往右方移動，中心體及微管也會隨之轉移到細胞右側的位置，同時間高基氏體也會跟著轉移至同樣區域(圖八)，我們利用分析軟體指出高基氏體及微管分佈位置的中心點，可以發現其中心點會一直跟著中心體移動。根據此三個結構的即時動態螢光圖(影片連結：<https://youtu.be/7565oA7KO0w>)，我們推測三者可能有極高的連帶關係，中心體可能藉由其延伸出的微管帶動高基氏體的分佈情形。

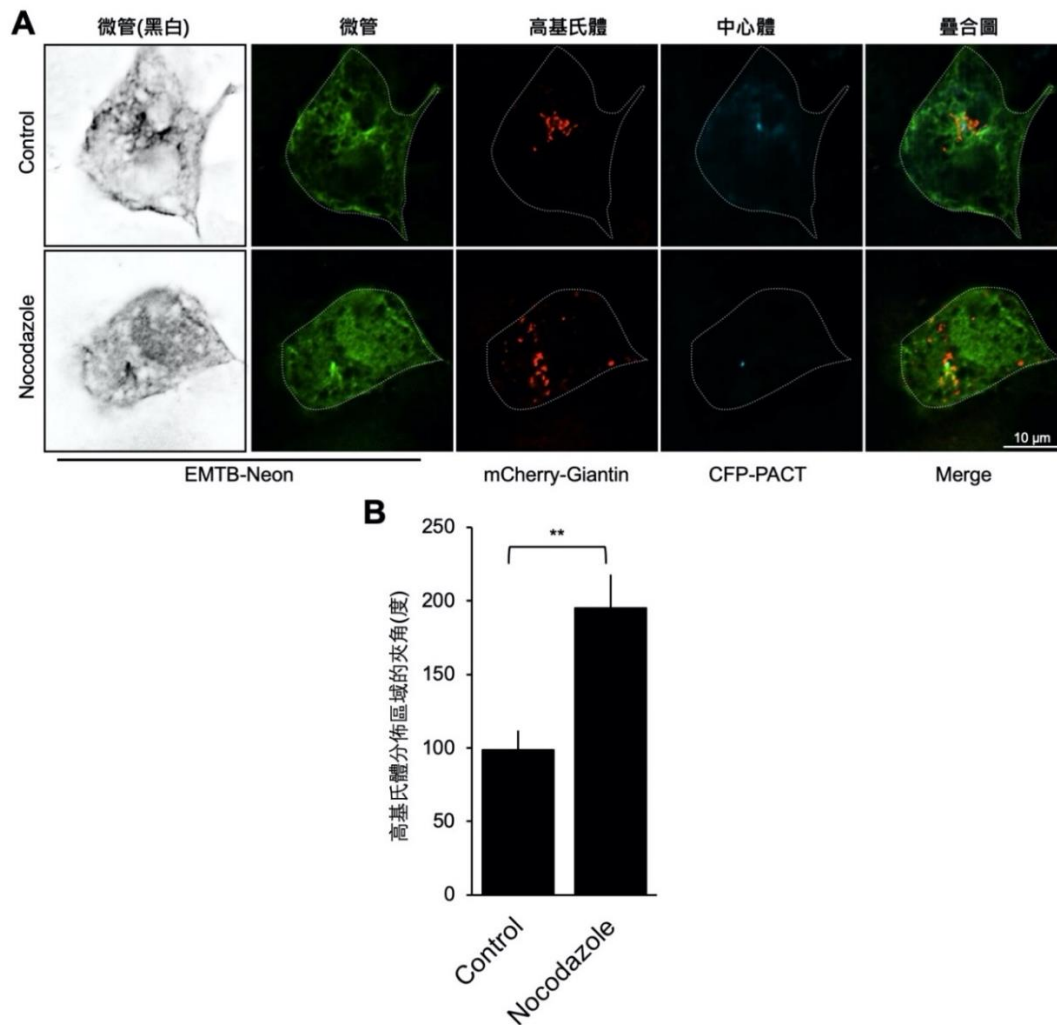


圖八、利用活細胞影像觀察高基氏體(紅色)、中心體(藍色)、微管(綠色)的即時動態分佈位置。將 mCherry-Giantin(會表現紅色螢光高基氏體蛋白)、CFP-PACT(會表現藍色螢光中心體蛋白)及 EMTB-Neon(會表現綠色螢光微管蛋白)重組 DNA 轉殖進 COS7 細胞，並觀察其分佈的即時動態。影片連結：<https://youtu.be/7565oA7KO0w>。

四、破壞中心體延伸出的微管對高基氏體分佈位置的影響

圖八的結果推測中心體可能藉由其延伸出的微管帶動高基氏體的分佈，為了驗證此假說，我們利用 Nocodazole 藥物去破壞掉細胞中的微管(參考文獻 2)，並探討其對高基氏體分佈情形的影響。我們轉殖會表現綠色螢光的微管蛋白質、紅色螢光的高基氏體蛋白質及藍色螢光的中心體蛋白質的重組 DNA 進 COS7 細胞中，並且加入 Nocodazole 藥物去破壞掉細胞中的微管，再置於螢光顯微鏡下觀察其結構變化。

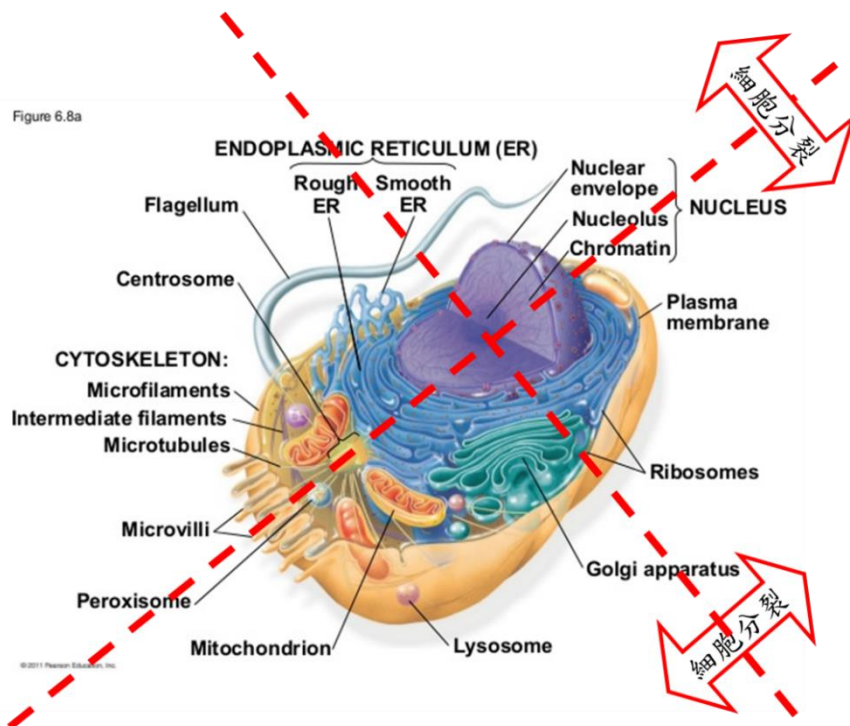
在未處理 Nocodazole 的對照組細胞中，可以觀察到中心體周遭有微管極高基氏體的聚集（圖九 A;上排），其高基氏體分佈夾角為 $98.69 \pm 13.29^\circ$ ，但細胞經過 0.5 mM Nocodazole 處理三小時後，中心體周遭的微管都已經被破壞掉，可能導致高基氏體無法聚集在細胞一側（圖九 A;下排），其高基氏體分佈夾角擴大為 $195.17 \pm 22.74^\circ$ ，經過統計的 Ftest 及 Ttest 分析證明使用 Nocodazole 破壞掉中心體周遭的微管會極顯著地讓高基氏體無法聚集在細胞一側(圖九 B)，兩組數據顯示其 p 值為 0.0041。中心體自身會分佈在細胞一側（圖七 A 右列），會將高基氏體帶到與其同一側的細胞區域。這個實驗結果驗證中心體會藉其所延伸的微管將高基氏體帶動到其週邊位置。



圖九、Nocodazole 藥物破壞微管後，細胞中高基氏體的分佈情形(A)及其於細胞中的夾角變化 (B)。Data=mean±S.E.M.; **代表控制組及 Nocodazole 處理組間有極顯著差異。

五、觀察細胞如何於細胞分裂時平均分配高基氏體給兩個子細胞

實驗四的結果發現中心體會藉由其延伸的微管將高基氏體聚集在細胞一側，此特殊的分佈位置會引發另一個問題，細胞如何於細胞分裂時平均分配高基氏體給兩個子細胞，如果只根據細胞分裂的軸線不同，有可能會將有高基氏體的一側及沒有高基氏體的另一側分別分裂成兩個子細胞，這樣經過幾次的細胞分裂後將導致有一定比例的細胞沒有分配到高基氏體(圖十)。但在我們的細胞染色結果中(實驗一)，我們發現 100%的細胞都有高基氏體(圖六)，因此便好奇細胞如何於細胞分裂時平均分配高基氏體到兩個子細胞？



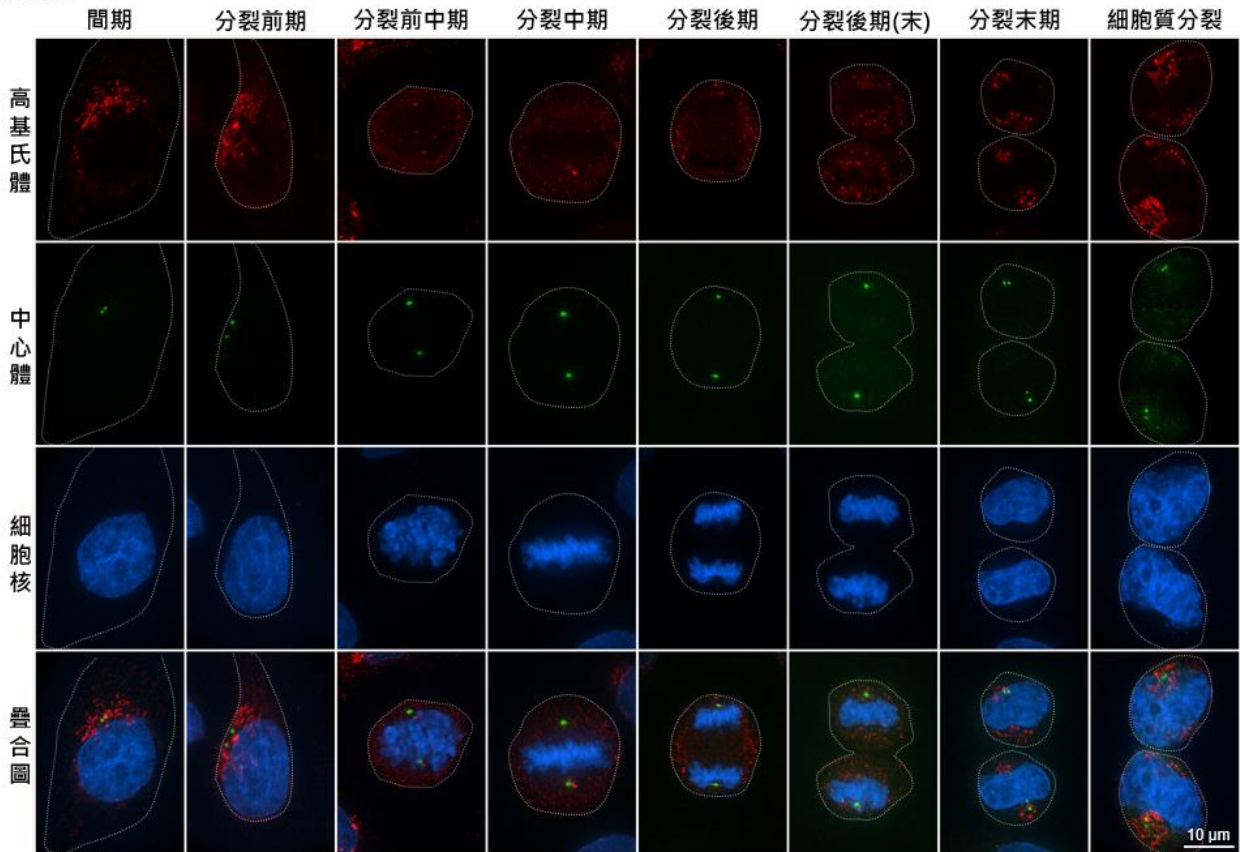
圖十、細胞分裂與高基氏體的分佈示意

我們嘗試去觀察細胞分裂不同時期高基氏體分佈的位置。實驗分成兩方面進行，在靜態細胞的觀察，發現當細胞準備分裂時（分裂前期;圖十一 A），中心體會複製成兩套並且開始分離，此時高基氏體也會開始跟著發散開來，其分佈面積會從間期的 $7.79\pm 1.12\%$ 增加到分裂前期的 $10.29\pm 1.18\%$ ，而其夾角也會從 $94.13\pm 13.49^\circ$ 增加為 $103.66\pm 5.65^\circ$ ，之後到分裂中期時，高基氏體會發散成許多微小的結構平均散佈在細胞質中（面積 $43.86\pm 14.65\%$ ，夾角 $214.82\pm 51.49^\circ$ ），到了分裂後期高基氏體會再聚集成可見的結構，並於末期時聚集在新生成的細胞核兩側，最後於分裂的最後一個步驟，細胞質分裂時開始聚集在中心體附近。

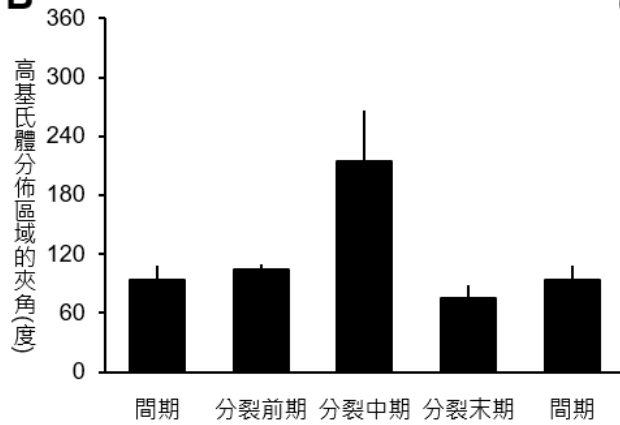
除了使用不同時間的去固定細胞並觀察其高基氏體及中心體的分佈位置外，另一方面我們利用動態活細胞影像觀察細胞分裂時高基氏體的連續即時動態(圖十二)(影片連結：<https://youtu.be/hEoYsrOHKak>)。同樣地，高基氏體於細胞準備分裂前會先分散成許多微小結構於細胞質中，以利細胞分裂時平均分裂其細胞質及高基氏體給兩個子細胞，之後等細胞分裂末期，高基氏體會逐漸聚集在細胞分裂軸線外側（有中心體的那一側）。藉此我們觀察到的高基氏體“聚集(間期)-發散(細胞分裂)-聚集(間期)”的變化，細胞可將原本聚集在一側的高基氏體平均分配給兩個子細胞，更在分裂完將高基氏體再次聚集在細胞的一側。發現高基氏體和微管會同步移動。

A

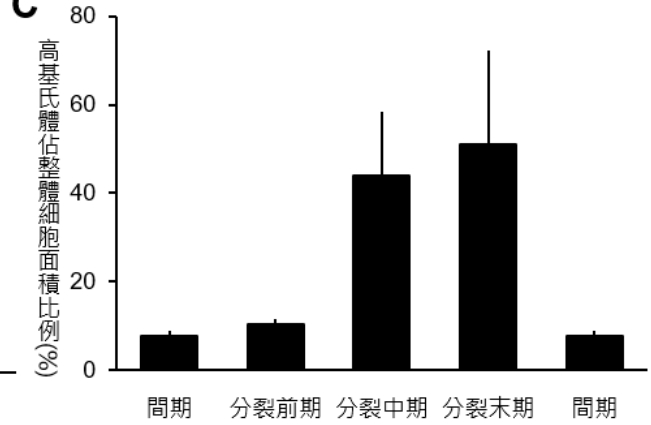
細胞週期



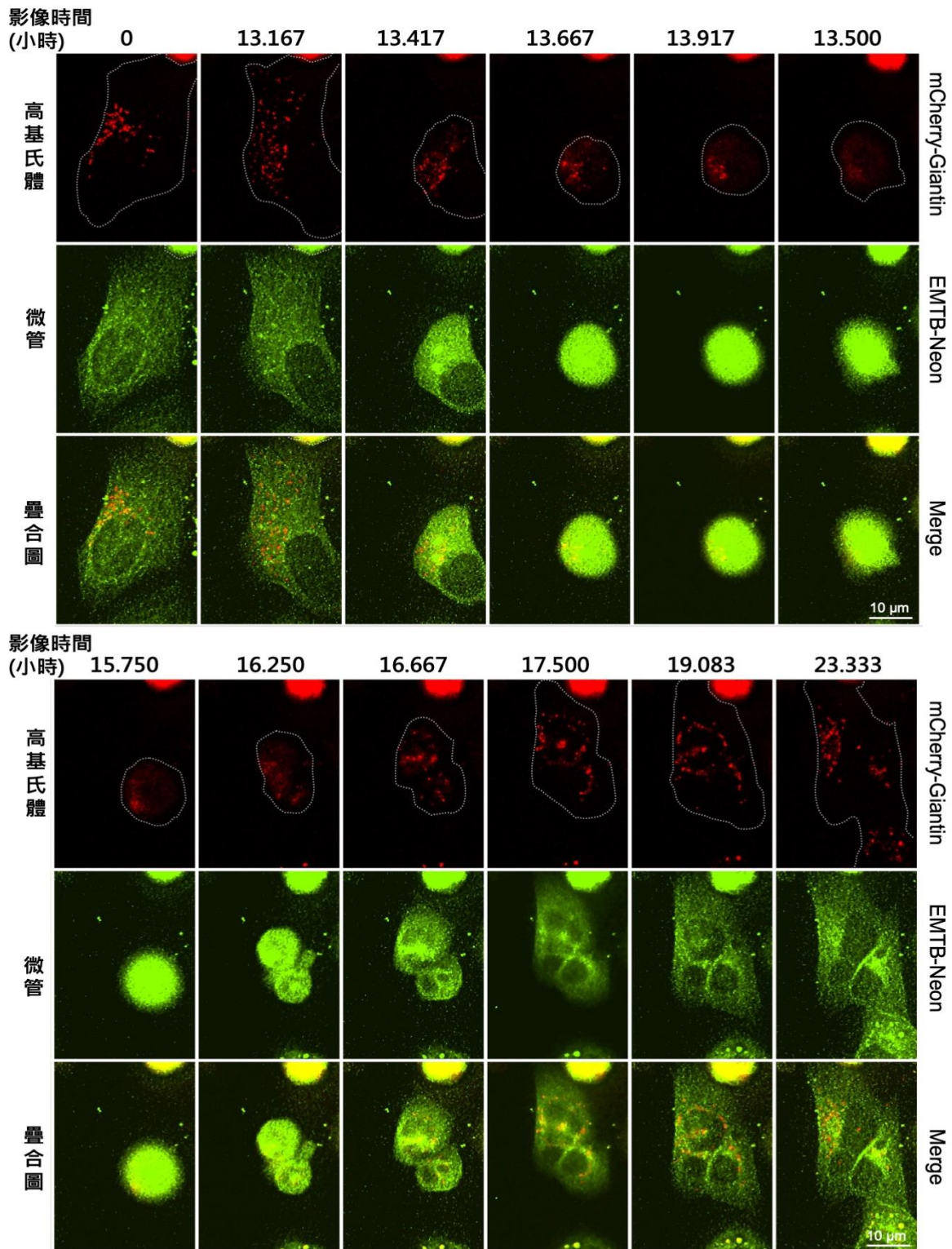
B



C



圖十一、(A) 使用重組 DNA 分別標定不同細胞週期 HeLa 細胞中的微管、高基氏體及中心體 (細胞外圍由虛線繪出)。(B) HeLa 細胞中，不同細胞週期高基氏體分佈區域的夾角，Data=mean ± S.E.M.。(C) HeLa 細胞中，不同細胞週期高基氏體佔整體細胞面積比例(%), Data=mean ± S.E.M.。



圖十二、將 mCherry-Giantin(會表現紅色螢光高基氏體蛋白質)及 EMTB-Neon(會表現綠色螢光微管蛋白質)重組 DNA 轉殖進 COS7 細胞，並用螢光顯微鏡觀察其活細胞動態。影片連結：

<https://youtu.be/hEoYsr0HKak>

陸、討論：

我們的研究發現中心體會藉由其延伸的微管將高基氏體聚集在其周圍（圖八、九），但究竟微管如何移動高基氏體？之前的研究發現有許多的驅動蛋白，可以附在微管上並移動囊泡等細胞內的物質（參考文獻 3），我們推測某些驅動蛋白可能會結合高基氏體並且附在中心體所延伸出的微管上，藉此牽動高基氏體到中心體周遭，未來若能進一步發現相關的驅動蛋白將有助釐清此推測。

植物細胞內有高基氏體，但是卻缺乏中心體，我們查了之前的文獻發現高基氏體在植物中也會聚集在細胞的一側(參考文獻 4)，很明顯其與我們所提出在動物細胞中的以中心體為主的相關調控機制不同，究竟植物如何聚集高基氏體在細胞中非常值得未來繼續研究。

我們的實驗結果得知，細胞分裂時中心體會藉由微管將高基氏體拉至細胞兩側,藉此細胞可以於細胞分裂前平均地去分開高基氏體於兩個子細胞中。我們觀察到分裂中期時，高基氏體會片段化變成更小的結構，之前的研究發現細胞分裂時會提高細胞內一些分裂激素的活性，而這些分裂激素會將高基氏體的扁平囊結構破壞成小囊泡(參考文獻 5)，這與微管牽動高基氏體之間的相關性，可以再進一步研究。

將高基氏體聚集於一側的目的在於建構「細胞極性」:細胞能進行有方向性的工作。比如細胞移動時需產生前端和後端、小腸上皮細胞的一側需吸收養分(參考文獻 7)，另一側則須將養分傳送至血液循環系統、酵素分泌細胞須將酵素蛋白質有方向性地運送到細胞外的管腔處以利器官去遞送酵素(參考文獻 8)。若無法正常建立細胞極性，推測生物在發育過程中會發生嚴重缺陷而死亡，也有可能導致細胞異常變成癌細胞。

柒、結論：

- 一、在三種不同真核細胞中，高基氏體都會位於細胞中的一側。觀察不同胞器(內質網、粒線體、中心體)發現只有中心體與高基氏體聚集在同一側。
- 二、高基氏體和中心體、微管分布位置成高度相關，高基氏體在細胞中分布的位置會帶動細胞移動往那個方向。若利用Nocodazole破壞後，高基氏體則無法分布於細胞中的一側。
- 三、細胞間期時，中心體會藉由微管聚集高基氏體；分裂時，中心體移動到細胞兩側並重新排列微管且分散高基氏體以利平均分配高基氏體；分裂後，中心體會藉由微管再聚集高基氏體於其周遭。

捌、參考資料及其他：

1. 醫學百科網站的微管介紹(<http://cht.a-hospital.com/w/%E5%BE%AE%E7%AE%A1>)
2. 小小整理網站的微管介紹
(<https://smallcollation.blogspot.com/2013/06/microtubule-mt.html#gsc.tab=0>)
3. Youtube: Motor proteins: Tiny pirates in your cells
(https://www.youtube.com/watch?v=SgR4oJtPw5Q&feature=emb_logo)
4. Cell Structure and Function
(<https://www.blendspace.com/lessons/o5t6ceCBqM1NSw/cell-structure-and-function>)
5. Ayala I, Colanzi A. Mitotic inheritance of the Golgi complex and its role in cell division. Biol Cell. 2017, 109(10):364-374.
6. 維基百科之細胞遷移介紹
(<https://zh.wikipedia.org/zh-tw/%E7%BB%86%E8%83%9E%E8%BF%81%E7%A7%BB>)
7. 上皮細胞極性的奧秘

(<https://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=69714>)

8. The Endocrine Pancreas

(<https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/the-endocrine-pancreas/>)

【評語】 050014

1. 此作品探討高基氏體會聚集於細胞中中心粒的位置。藉由觀察高基氏體的位置與微管、中心粒移動，證實高基氏體的聚集與微管有關。
2. 胞器在細胞中的移動與微管的關係已有相當多的研究，建議研究應可更深入探討高基氏體聚集於細胞中一處的功能性，以增加此議題研究的新穎性。