

2024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 Down Syndrome Cell-adhesion Molecules 基因參與果蠅神經迴路發育的細胞機制

就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學
指導教師 周雅惠、謝育慈
作者姓名 王建翔

關鍵詞 黃腹果蠅、Dscam基因、嗅覺區域中介神經元

作者簡介



我是一位熱愛學習和不斷追求進步的個體。從小對於知識的渴望驅使我探索各種領域，培養了廣泛的興趣。在學業方面，我以積極的態度和堅韌的毅力克服種種挑戰，不斷提升自己的能力。我深信，學習不僅僅是為了取得好成績，更是為了培養解難能力和創新思維。

此外，我也積極參與社會服務和志願活動，希望透過自己的努力為社會做出一點貢獻。在人際交往中，我樂於合作，善於溝通，並樂意接受他人的建議和反饋，以不斷完善自己。

在未來，我將繼續追求卓越，發揮所學為社會創造價值。這不僅是對自己的要求，更是對生命的熱愛和對未來的無限期許。

壹、前言

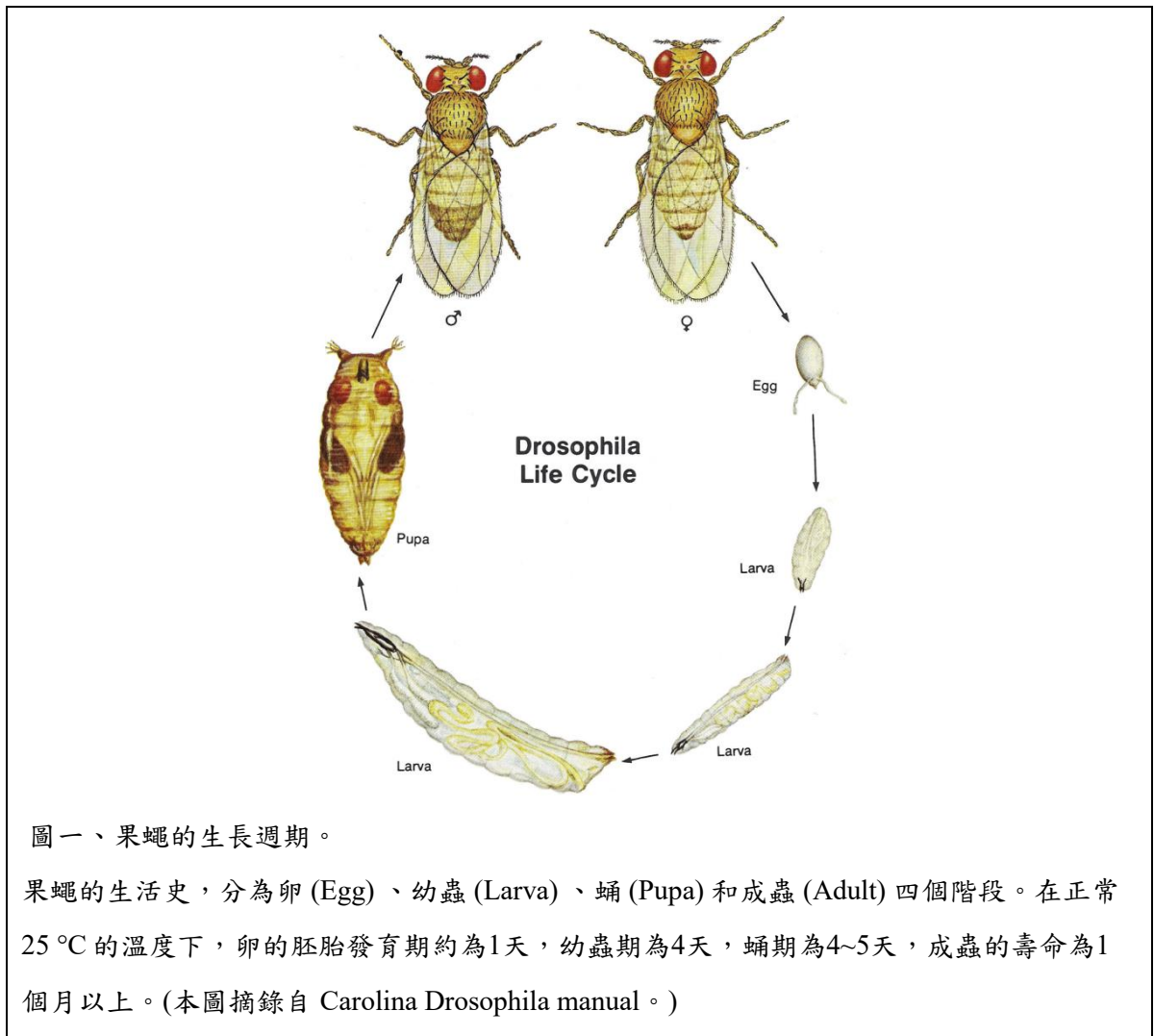
(一) 研究動機

人腦中約有一千億顆的神經細胞 (王希文, 2018), 他們之間的突觸錯綜複雜, 這些樹突與軸突皆連接到正確的位置, 讓人不禁好奇這些突觸的連接機制。在經過文獻的查詢過後, 才發現 *Dscam* 是控制大腦發育的蛋白質之一, *Dscam* 使得細胞能夠進行細胞辨識, 能夠使軸突及樹突在腦中進行特定的連結而不致於黏合。目前我們尚未知道, *Dscam* 會如何影響嗅覺區域中介神經細胞的生長及神經連結, 本研究針對黃腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 大腦中一小群被 *GMR51C07-GAL4* 標定的嗅覺區域中介神經元, 觀察在正常情況、*Dscam* 過度表現、*Dscam* 表現量受抑制下, 這群神經元的型態如何發生。

(二) 研究背景

2-1. 黃腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*)

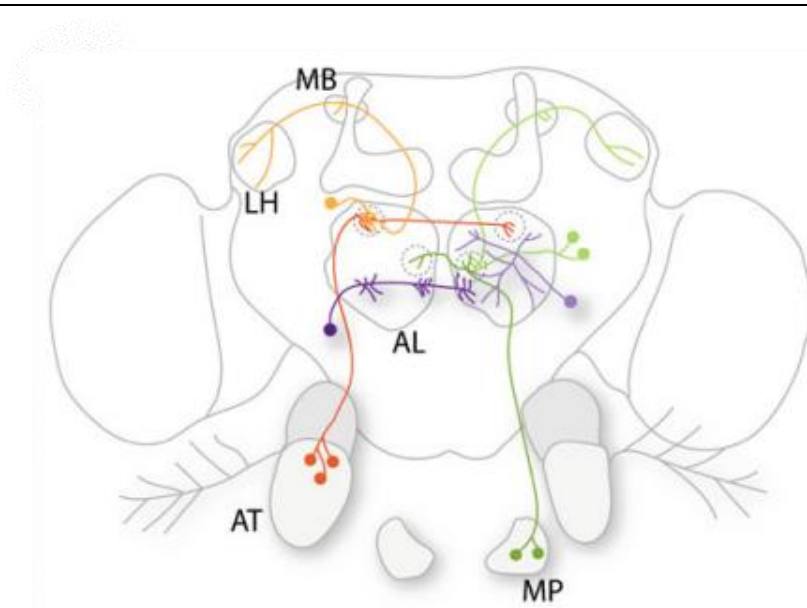
黃腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 為最著名的模式生物之一。與另一模式動物老鼠相較, 果蠅的生長週期相對較短, 從受精卵到成蟲只需約十天 (220 小時) (圖一)、其子代數目眾多、突變型多、而且目前已完成基因定序。果蠅的基因體在2000年時定序完成, 約75%與人類疾病相關的基因都於果蠅的基因體中存在同源基因, 因此果蠅也成為研究人類疾病的重要模式生物之一 (許一懿、張永達, 2009)。此外, 實驗所需的果蠅取得也十分便利, 國外的果蠅品系中心 (例如: Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC) 或 Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC)) 保有數萬株帶有各種突變及轉殖基因的果蠅株, 當研究一特定基因時, 可直接向這些品系中心訂購與此特定基因相關的果蠅。



圖一、果蠅的生長週期。

果蠅的生活史，分為卵 (Egg)、幼蟲 (Larva)、蛹 (Pupa) 和成蟲 (Adult) 四個階段。在正常 25 °C 的溫度下，卵的胚胎發育期約為1天，幼蟲期為4天，蛹期為4~5天，成蟲的壽命為1個月以上。(本圖摘錄自 Carolina Drosophila manual。)

果蠅擁有兩對嗅覺感覺器官，觸角 (antenna, AT) 和下顎鬚 (maxillary palp, MP)，這兩對感覺器官中有著許多嗅覺受體神經元 (olfactory receptor neuron, ORN)，當其受到刺激後，會將訊號傳遞至嗅葉 (antennal lobe, AL)，而表達相同氣味受體嗅覺受體神經元的軸突，會聚在嗅葉中的同一嗅小球 (glomerulus)，再將訊息由投射神經 (projection neuron, PN) 傳遞至更高的大腦中樞，包括：蕈狀體 (mushroom body, MB) 和側角 (lateral horn, LH) (Tsai and Chou, 2022)。此實驗運用的 *GMR51C07* 基因片段可用來將欲研究的特定基因，表現在嗅葉中的一組區域中介神經元 (local interneuron, LN)。



圖二、果蠅的嗅覺神經迴路

顯示了嗅覺受體神經元（橘色及綠色）、投射神經（淡橘色及淡綠色）、嗅小球（虛線圓圈）、區域中介神經元（紫色及淡紫色）、下顎鬚（MP）、觸角（AT）、嗅葉（AL）、側角（LH）、蕈狀體（MB）在成蟲果蠅腦中的剖面圖。（本圖摘錄自 Tsai and Chou, 2022）

2-2. *Down Syndrome Cell-adhesion Molecules (Dscam)* 基因家族

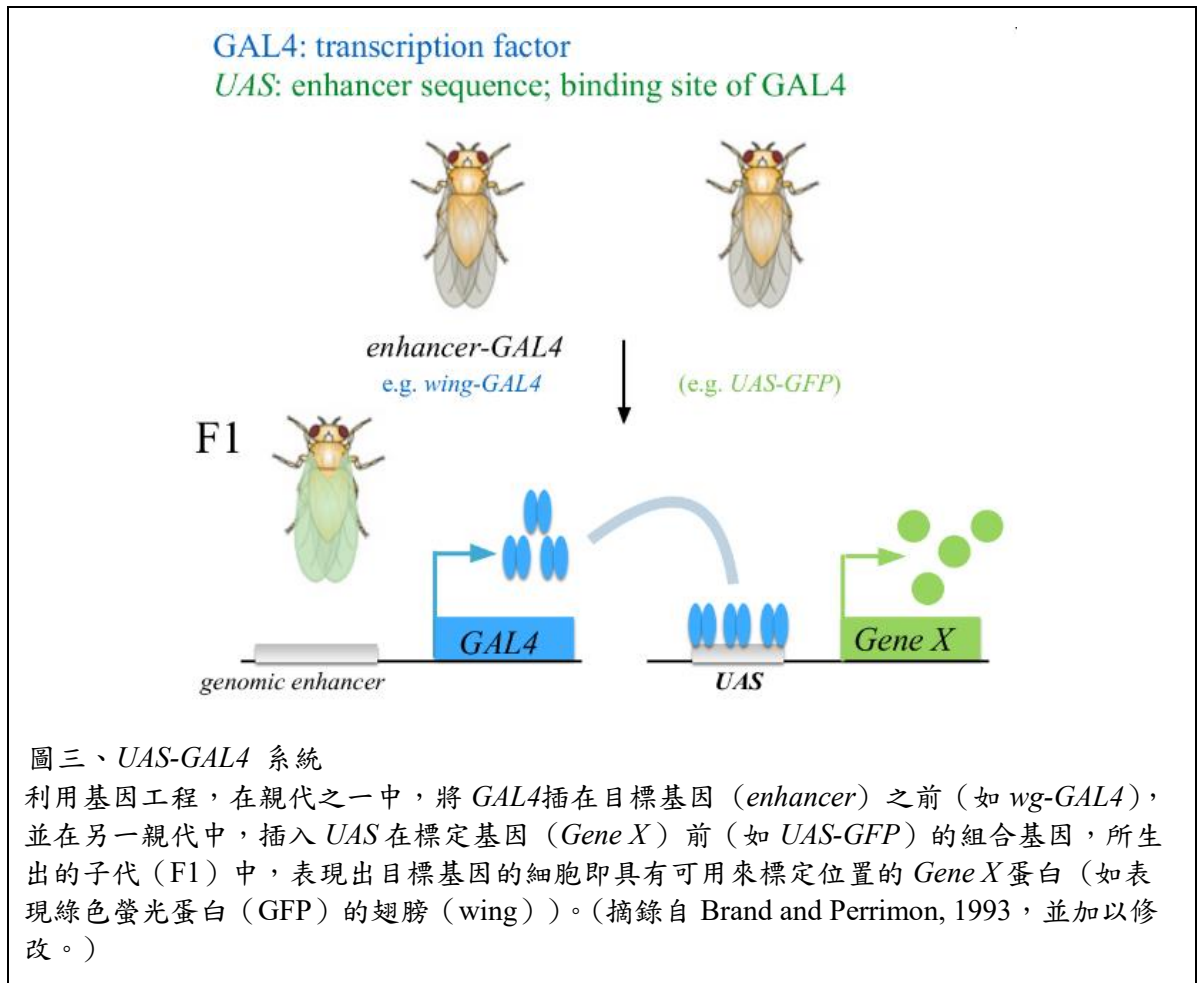
果蠅的 *Dscam* 基因家族總共有四個基因，分別為 *Dscam1*、*Dscam2*、*Dscam3*、以及 *Dscam4*。*Dscam* 基因首次在人類的第21對染色體中被發現，其會表現在發育中的神經系統。目前的研究得知，*Dscam* 會參與神經發育的細胞自我辨識、控制軸突導向及樹突的自我迴避，以創建不重疊的樹突和軸突，並使神經細胞在正確的位置形成軸突，使神經元在正常的位置連結起來。然而，*Dscam* 如何影響果蠅大腦中的嗅覺區域中介神經元的發育，目前知道的有限。

（三）實驗原理

3-1. *GAL4-UAS* 系統

GAL4-UAS 系統（圖三）是將 *GAL4* 基因插在一方親代中要觀察的目標基因後面；另一方面，將 *UAS* 插在標定基因前面，此一標定基因所表現的蛋白質可用來標定細胞的型態，例如：螢光蛋白（Green Fluorescent Protein (GFP)、Red Fluorescent Protein (RFP)）。接著，再把 *UAS-GFP* 插入另一方親代果蠅中，當兩方親代交配後，生下的子代便可同時具有 *GAL4* 和 *UAS*。當子代的部分細胞表現目標基因時，*GAL4* 也會被表現，並製造出 *GAL4* 蛋白。*GAL4* 蛋白再和 *UAS* 結合，並活化 *UAS* 後方的標定基因，

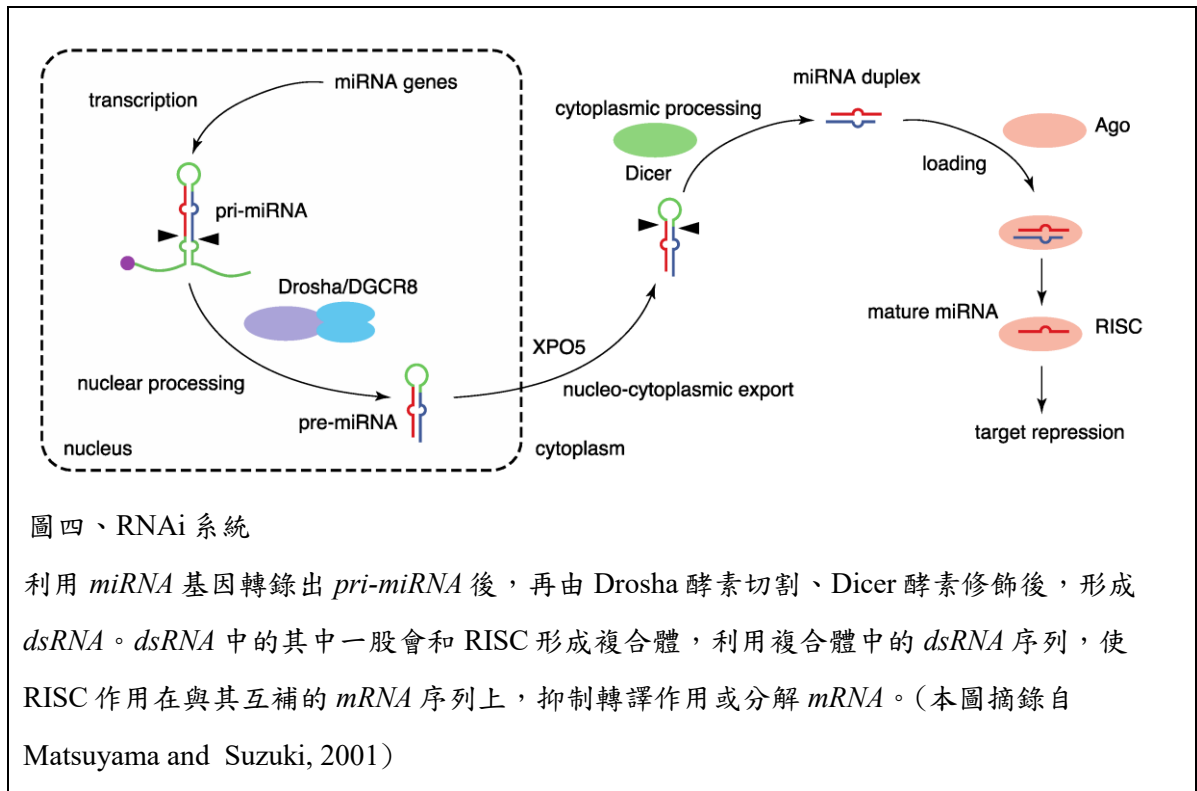
以製造出用來標定細胞型態的蛋白質。在這個實驗中，我們利用 *GMR51C07* 這段基因序列以使得 GAL4 表現在一小群特定的嗅覺區域中介神經元，再由此 GAL4 去驅動綠色螢光蛋白的表現，以使得這群神經細胞的型態得以被標定，觀察。之後，將果蠅大腦解剖、固定、染色後，放在共軛焦顯微鏡下觀察這群神經細胞的生長分布。以下會將這群 *GMR51C07-GAL4* 標定的區域中介神經細胞稱為「*GMR51C07* 區域中介神經細胞」。



3-2. RNAi 系統

RNAi 系統分成兩種，微型核糖核酸 (microRNA, miRNA) 和小干擾核糖核酸 (small interfering RNA, siRNA)，兩者皆為干擾蛋白質的表現，以達到抑制基因表現的目的 (圖四)。miRNA 來自於基因組中的非編碼區，起初，非編碼區轉錄出初級轉錄產物 (pri-miRNA)，在 pri-miRNA 上有一些可互補的序列，使其可彎曲、形成許多髮夾狀的構造，再由一種稱為 Drosha 的酵素將髮夾狀構造切下來，切下來的構造經過 Dicer 酵素的修飾後，形成雙股核糖核酸 (double-stranded RNA, dsRNA)。接著，dsRNA 其中一股會嵌到一種名為 RNA-induced silencing complex (RISC) 的蛋白質上，

我們稱其為引導股，引導股會將 RISC 帶到與其基因序列互補的 mRNA 上，RISC 將利用酵素分解 mRNA 或抑制核糖體的作用，使該基因被抑制，無法表現其功能，以達到干擾蛋白質的目的（張雅菱、李冠群，2010）。本實驗所運用的 RNAi 為 miRNAi，其將被運用在抑制不同的 *Dscam* 基因上。



（四） 實驗目的

本實驗利用 *RNAi* 系統和基因過度表現技術，觀察當抑制或加強不同的 *Dscam* 基因時，其對果蠅嗅覺區域中介神經細胞發育的影響。目的如下：

1. 觀察在果蠅發育中的不同時期，對在嗅葉中表現 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的生長及被標定的細胞數的變化。
2. 觀察當不同的 *Dscam* 基因的過度表現後，這些 *Dscam* 蛋白在嗅葉 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的分布位置。
3. 觀察當不同的 *Dscam* 基因被抑制後，其對在嗅葉中 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的生長及細胞型態的影響。

貳、研究設備與器材

(一) 果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 品系 (fly strains)

1. *yw;UAS-nuclacZ UAS-mCD8GFP/CyO*
2. *w[1118];GMR51C07-GAL4(attP2)*
3. *w[1118] (RNAi-TK)*
4. *UAS-Dcr2 UAS-Mcd8GFP;UAS-GAL4/CyO;GMR51C07-GAL4/TM6B Tb*
5. *P{TRiP.JF03307}attP2*
6. *P{GD111}/TM3 (v1003)*
7. *P{GD74} (v6685)*
8. *P{GD2362} (v42882)*
9. *UAS-Dscam[17.1]-GFP; Pin/CyO[y+]*
10. *w; UAS-myr-mRFP[1]/CyO;GMR51C07-GAL4/TM6B Tb*
11. *UAS-Dscam[17.2]-GFP; Pin/CyO[y+]*
12. *yw; UAS-Dscam-CGFP/TM3, Sb*

表一、各基因型與其標定基因

發育型		<i>y w/w[1118] (or Y); UAS-nuclacZ UAS-mCD8GFP/+;GMR51C07-GAL4/+</i>
過度表現型	控制組	<i>y w/w[1118] (or Y); UAS-nuclacZ UAS-mCD8GFP/+;GMR51C07-GAL4/+</i>
	<i>Dscam1</i> 亞型17.1	<i>UAS-Dscam[17.1]-GFP/w (or Y); UAS-myr-mRFP[1]/CyO[y+];GMR51C07-GAL4/+</i>
	<i>Dscam1</i> 亞型17.2	<i>UAS-Dscam[17.2]-GFP/w (or Y); UAS-myr-mRFP[1]/CyO[y+];GMR51C07-GAL4/+</i>
	<i>Dscam1</i>	<i>y w/w (or Y); UAS-myr-mRFP[1]/CyO[y+];GMR51C07-GAL4/UAS-Dscam-CGFP</i>
抑制表現型	控制組	<i>UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/w[1118] (or Y);UAS-GAL4/P{attP, y[+], w[3]};GMR51C07-GAL4/+</i>
	<i>Dscam1</i>	<i>UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/+;GMR51C07-GAL4/P{TRiP.JF03307}attP2</i>
	<i>Dscam2</i>	<i>UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/+;GMR51C07-GAL4 (attP2)/P{GD111}</i>

	<i>Dscam3</i>	<i>UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/+;GMR51C07-GAL4 (attP2)/P{GD74}</i>
	<i>Dscam4</i>	<i>UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/P{GD2362}; GMR51C07-GAL4 (attP2)/+</i>

(二) 藥品溶液與材料

1. 10× 磷酸鹽緩沖生理食鹽水 (10× Phosphate buffered saline (PBS)) (友和貿易股份有限公司, UniRegion Bio-Tech, catalog number: UR-PBS001-1L)
2. 聚甲醛 (20% paraformaldehyde) (Electron Microscopy Sciences, catalog number: 15713-S)
3. Triton X-100 (Sigma-Aldrich, catalog number: X100)
4. 山羊血清 (Normal Goat Serum) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, catalog number: 005-000-121)
5. SlowFade™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen, catalog number: S36936)
6. 二次過濾水 (ddH₂O)
7. 活性乾酵母發酵粉 (active dry yeast, Red Star)
8. 果蠅管 (信德儀器有限公司, catalog number: PT10-30100)
9. 透明指甲油 (艾森絲護色光澤指甲油, Essence, catalog number:934927)
10. 二氧化碳 (板橋氣體有限公司)
11. 1× PBS (磷酸鹽緩沖生理食鹽水) (見溶液配方)
12. 4% 聚甲醛/磷酸鹽緩沖生理食鹽水 (見溶液配方)
13. PBST (3% Triton X-100/PBS; 1,000 ml) (見溶液配方)
14. 5% 山羊血清 (Normal Goat Serum) (見溶液配方)
15. 第一抗體溶液 (詳見溶液配方)
 1. Rat anti-DNcad (Developmental Study Hybridoma Bank (DSHB); DN-Ex#8)
 2. Rabbit anti-GFP (Invitrogen; A11122)
 3. Mouse anti-betaGAL (DSHB; JIE7)
 4. Rat anti-mCD8a (CALTAG Laboratories/Invitrogen; MCD0800)
 5. Rabbit anti-betaGAL (Invitrogen; A11132)
 6. Mouse anti-Brp (DSHB; nc82)
 7. Mouse anti-mCherry (DSHB; 3A11)
16. 第二抗體溶液 (詳見溶液配方)

1. Goat anti-rat IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 112-165-167)
2. Goat anti-rabbit IgG-Alexa488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 111-545-144)
3. Goat anti-mouse IgG-Alexa647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 115-605-166)
4. Goat anti-rabbit IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 111-165-144)
5. Goat anti-rat IgG-Alexa 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 112-605-167)
6. Goat anti-rat IgG-Cy5
7. Goat anti-mouse IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 115-165-166)

(三) 製備溶液

1. 1× PBS (磷酸鹽緩沖生理食鹽水)
用二次過濾水稀釋 10× PBS 至 1× PBS，可放置於室溫，一般可儲存數個月，但視環境而異。
2. 4% 聚甲醛-磷酸鹽緩沖生理食鹽水
以 1× PBS 稀釋 20% 聚甲醛至 4% 聚甲醛溶液，放置於碎冰上，必須新鮮配製。
3. PBST (3% Triton X-100/PBS, 1,000 ml)
以 1× PBS 調配 Triton X-100 的 3% 溶液，一般可放置於室溫數月，但會因環境而異，必須注意是否有黴菌生長，一但發現黴菌，必須立即丟棄。
4. 5% 山羊血清 (Normal Goat Serum)
以 1× PBST 稀釋 normal goat serum 至 5%，放置於碎冰上，必須新鮮配製。
5. 第一抗體溶液
用 5% 山羊血清稀釋第一抗體至特定濃度 (每種第一抗體適合的濃度都不同)，放置於碎冰上，必須新鮮配製。
6. 第二抗體溶液
以 PBST 稀釋成最終濃度 1:500，放置於碎冰上，必須新鮮配製。

表二、各組別所使用抗體之種類與比例

		第一抗體	第二抗體(1:500)	
發育型		Rat anti-DNcad (1:20)	Goat anti-rat IgG-Cy3	
		Rabbit anti-GFP (1:500)	Goat anti-rabbit IgG-Alexa488	
		Mouse anti-betaGAL (1:100)	Goat anti-mouse IgG-Alexa647	
過度表現型	控制組	Rat anti-mCD8a (1:100)	Goat anti-rat IgG-Alexa488	
		Rabbit anti-betaGAL (1:200)	Goat anti-rabbit IgG-Cy3	
		Mouse anti-Brp (1:25)	Goat anti-mouse IgG-Cy5	
	<i>Dscam1</i> 亞型17.1	Rabbit anti-GFP (1:500)	Goat anti-rabbit IgG-Alexa488	
		Mouse anti-mCherry (1:10)	Goat anti-mouse IgG-Cy3	
		Rat anti-DNcad (1:20)	Goat anti-rat IgG-Cy5	
	<i>Dscam1</i> 亞型17.2	Rabbit anti-GFP (1:500)	Goat anti-rabbit IgG-Alexa488	
		Mouse anti-mCherry (1:10)	Goat anti-mouse IgG-Cy3	
		Rat anti-DNcad (1:20)	Goat anti-rat IgG-Cy5	
	<i>Dscam1</i>	Rabbit anti-GFP (1:500)	Goat anti-rabbit IgG-Alexa488	
		Mouse anti-mCherry (1:10)	Goat anti-mouse IgG-Cy3	
		Rat anti-DNcad (1:20)	Goat anti-rat IgG-Cy5	
	抑制表現型	控制組	Rabbit anti-GFP (1:500)	Goat anti-rabbit IgG-Alexa488
			Mouse anti-Brp (1:25)	Goat anti-mouse IgG-Cy3
		Dscam1	Rabbit anti-GFP (1:500)	Goat anti-rabbit IgG-Alexa488
Mouse anti-Brp (1:25)			Goat anti-mouse IgG-Cy3	
Dscam2		Rabbit anti-GFP (1:500)	Goat anti-rabbit IgG-Alexa488	
		Mouse anti-Brp (1:25)	Goat anti-mouse IgG-Cy3	
Dscam3		Rabbit anti-GFP (1:500)	Goat anti-rabbit IgG-Alexa488	
		Mouse anti-Brp (1:25)	Goat anti-mouse IgG-Cy3	

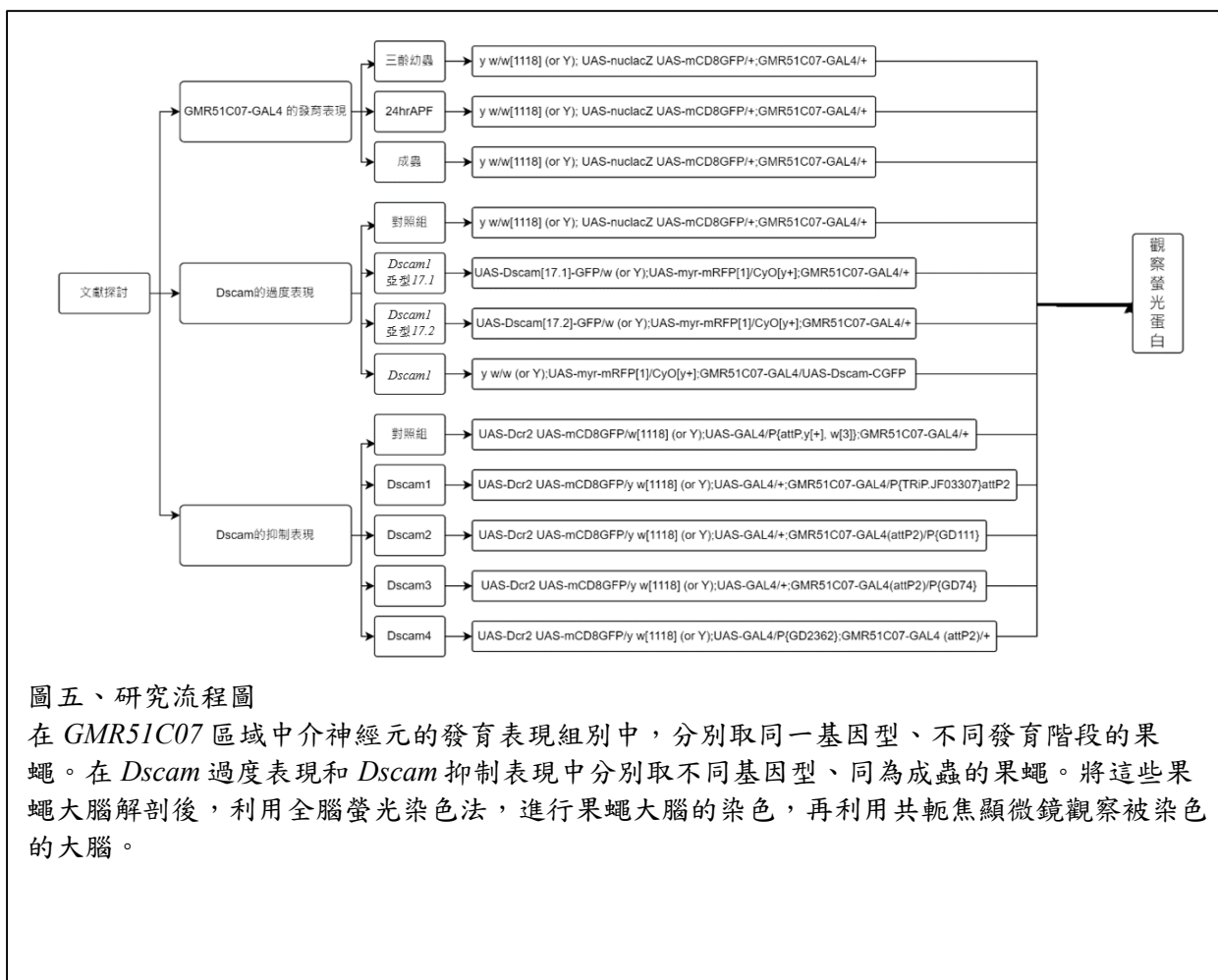
	Dscam4	Rabbit anti-GFP (1:500)	Goat anti-rabbit IgG-Alexa488
		Mouse anti-Brp (1:25)	Goat anti-mouse IgG-Cy3

(四) 研究器材

1. 鑷子 (Dumont #5 Forceps) (Dumont Switzerland, catalog number: 11252-20)
2. 微量吸管 (Pipetman) [Gilson, P1000 (F123602), P200 (F123601), P20 (F123600), P2 (F144801)]
3. 4 °C 冷藏櫃 (JunYang, model: JR-2-1100)
4. 載玻片 (Scientific™ Microscope Slides, Ground 45°, 76 × 26 mm) (Thermo Scientific™, catalog number: 10281711)
5. 蓋玻片 (cover glasses thickness No.1, 22 × 22 mm) (Marienfeld Superior, catalog number: 0101050)
6. 3D 旋轉震盪器 (Digisystem, model: SR-100)
7. 解剖顯微鏡 (Nikon, model: N-SMZ745)
8. 培養箱 (Firstek, model: RI-560)
9. 共軛焦顯微鏡 (Zeiss, model: LSM780)

參、研究過程或方法

(一) 實驗流程圖



圖五、研究流程圖

在 *GMR51C07* 區域中介神經元的發育表現組別中，分別取同一基因型、不同發育階段的果蠅。在 *Dscam* 過度表現和 *Dscam* 抑制表現中分別取不同基因型、同為成蟲的果蠅。將這些果蠅大腦解剖後，利用全腦螢光染色法，進行果蠅大腦的染色，再利用共軛焦顯微鏡觀察被染色的大腦。

(二) 果蠅的培養

1. $yw/w[1118] (or Y); UAS-nuclacZ UAS-mCD8GFP/+; GMR51C07-GAL4/+$

將未交配過的雌果蠅 ($yw; UAS-nuclacZ UAS-mCD8GFP/CyO$) 與雄果蠅 ($w[1118]; GMR51C07-GAL4 (attP2)$) 交配，以得到 $y w/w[1118] (or Y); UAS-nuclacZ UAS-mCD8GFP/+; GMR51C07-GAL4/+$ 子代以用於實驗。再收集三個不同發育階段的果蠅子代，分別是：(1) 三齡幼蟲、(2) 進入蛹期後24hr的果蠅 (24hr APF)、(3) 成蟲。

一開始，母蠅會將蛋下在食物表面，等到孵化後，幼蟲會鑽進食物裡，直到三齡幼蟲晚期時，幼蟲便會爬出食物，來到管壁上方較乾處，接著就進入蛹期。在這之後，幼蟲的體色將由白色慢慢轉變為褐色。因此我們挑選在管壁上方較乾處，且體色為白色的幼蟲為剛進入蛹期的果蠅 (0hr APF)，將其放置在

25°C 的保溫箱 24hr，即可得到24hr APF 的蛹。

2. *UAS-Dscam[17.1]-GFP/w (or Y); UAS-myr-mRFP[1]/CyO[y+];GMR51C07-GAL4/+*
將未交配過的雌果蠅 (*UAS-Dscam[17.1]-GFP; Pin/CyO[y+]*) 與雄果蠅 (*w; UAS-myr-mRFP[1]/CyO; GMR51C07-GAL4/TM6B Tb*) 交配，便可得到 *UAS-Dscam[17.1]-GFP/w (or Y); UAS-myr-mRFP[1]/CyO[y+];GMR51C07-GAL4/+* 成蟲子代以用於實驗。
3. *UAS-Dscam[17.2]-GFP/w (or Y); UAS-myr-mRFP[1]/CyO[y+];GMR51C07-GAL4/+*
將未交配過的雌果蠅 (*UAS-Dscam[17.2]-GFP; Pin/CyO[y+]*) 與雄果蠅 (*w; UAS-myr-mRFP[1]/CyO; GMR51C07-GAL4/TM6B Tb*) 交配，便可得到 *UAS-Dscam[17.2]-GFP/w (or Y); UAS-myr-mRFP[1]/CyO[y+];GMR51C07-GAL4/+* 成蟲子代以用於實驗。
4. *yw/w (or Y); UAS-myr-mRFP[1]/CyO[y+];GMR51C07-GAL4/UAS-Dscam-CGFP*
將未交配過的雌果蠅 (*yw; ;UAS-Dscam-CGFP/TM3,Sb*) 與雄果蠅 (*w; UAS-myr-mRFP[1]/CyO; GMR51C07-GAL4/TM6B Tb*) 交配，便可得到 *y w/w (or Y); UAS-myr-mRFP[1]/CyO[y+];GMR51C07-GAL4/UAS-Dscam-CGFP* 成蟲子代以用於實驗。
5. *UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/w[1118] (or Y);UAS-GAL4/P{attP, y[+], w[3]};GMR51C07-GAL4/+*
將未交配過的雌果蠅 (*w[1118] (RNAi-TK)*) 與雄果蠅 (*UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP;UAS-GAL4/CyO;GMR51C07-GAL4/TM6B Tb*) 交配，便可得到 *UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/w[1118] (or Y);UAS-GAL4/P{attP, y[+], w[3]};GMR51C07-GAL4/+* 成蟲子代以用於實驗。
6. *UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/+;GMR51C07-GAL4/P{TRiP.JF03307}attP2*
將未交配過的雌果蠅 (*P{TRiP.JF03307}attP2*) 與雄果蠅 (*UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP;UAS-GAL4/CyO;GMR51C07-GAL4/TM6B Tb*) 交配，便可得到 *UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/+;GMR51C07-GAL4/P{TRiP.JF03307}attP2* 成蟲子代以用於實驗。
7. *UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/+;GMR51C07-GAL4 (attP2)/P{GD111}*

將未交配過的雌果蠅 (*P{GD111}/TM3 (v1003)*) 與雄果蠅 (*UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP;UAS-GAL4/CyO;GMR51C07-GAL4/TM6B Tb*) 交配，便可得到 *UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/+;GMR51C07-GAL4 (attP2)/P{GD111}* 成蟲子代以用於實驗。

8. *UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/+;GMR51C07-GAL4 (attP2)/P{GD74}*

將未交配過的雌果蠅 (*P{GD74} (v6685)*) 與雄果蠅 (*UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP;UAS-GAL4/CyO;GMR51C07-GAL4/TM6B Tb*) 交配，便可得到 *UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/+;GMR51C07-GAL4 (attP2)/P{GD74}* 成蟲子代以用於實驗。

9. *UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/P{GD2362}; GMR51C07-GAL4 (attP2)/+*

將未交配過的雌果蠅 (*P{GD2362} (v42882)*) 與雄果蠅 (*UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP;UAS-GAL4/CyO;GMR51C07-GAL4/TM6B Tb*) 交配，便可得到 *UAS-Dcr2 UAS-mCD8GFP/y w[1118] (or Y);UAS-GAL4/P{GD2362}; GMR51C07-GAL4 (attP2)/+* 成蟲子代以用於實驗。

(三) 果蠅的全腦染色

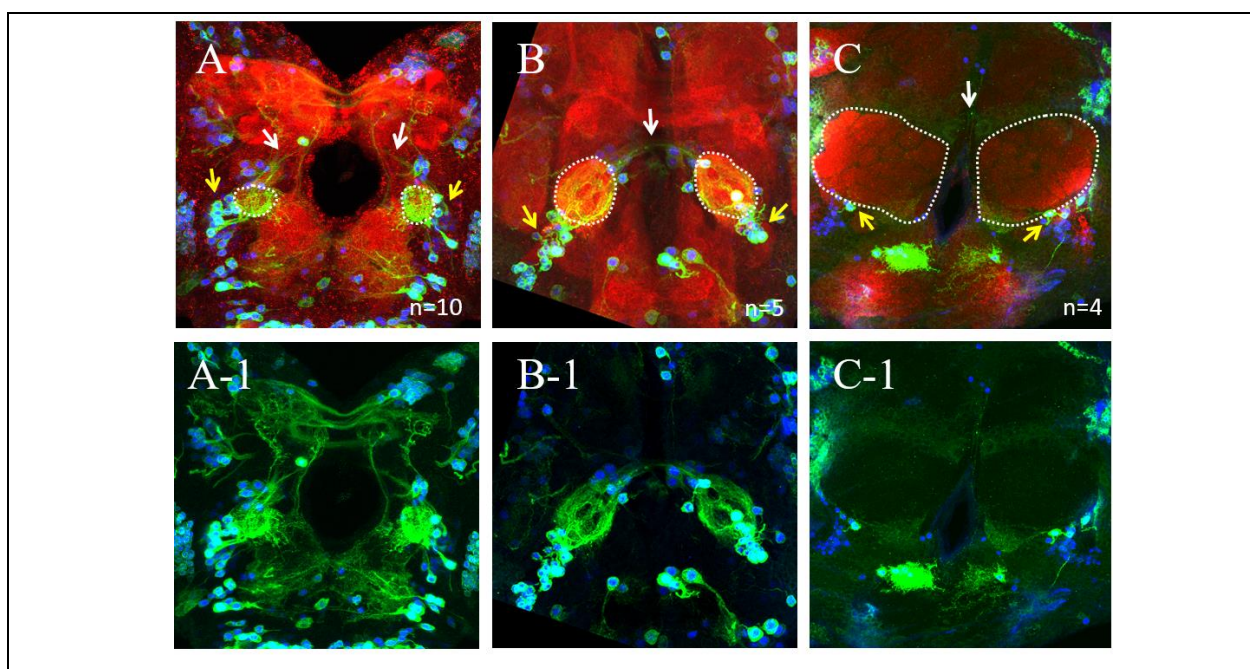
1. 實驗前配置 4% 聚甲醛-磷酸鹽緩沖生理食鹽水 (4% paraformaldehyde/PBS)，並在 500 μ l 微量離心管加入 500 μ l 4% 聚甲醛-磷酸鹽緩沖生理食鹽水，置於碎冰塊上。
2. 收集待解剖之果蠅，並在 4% 聚甲醛-磷酸鹽緩沖生理食鹽水中解剖果蠅，將其頭殼去掉只留下腦部。將解剖下來的腦部快速丟入放在冰上的 500 μ l 微量離心管。此離心管為了保持果蠅腦的新鮮度，所以在解剖的過程中，必須全程放在碎冰上。
3. 解剖完樣本後，將其放在 3D 旋轉震盪器上反應 20 分鐘。
4. 利用微量移液槍將 4% 聚甲醛-磷酸鹽緩沖生理食鹽水吸出，再裝入 500 μ l 0.3% Triton X-100 的磷酸鹽緩沖生理食鹽水混合溶液 (0.3% Triton X-100/PBS; PBST)，將其放在 3D 旋轉震盪器上反應 20 分鐘，重覆此步驟三次。
5. 取出 PBST 並裝入 400 μ l 5% 山羊血清 (normal goat serum)，將其放在 3D 旋轉震盪器上反應 30 分鐘。

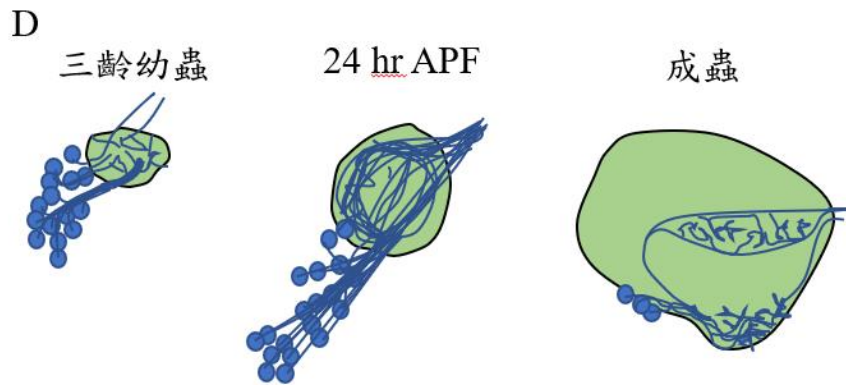
6. 取出5% 山羊血清，並加入 400 μ l 一級抗體 (primary antibody)，並將其放在 4 $^{\circ}$ C 冷藏櫃中的 3D 旋轉震盪器上反應至少兩個晚上。
7. 利用微量移液槍將 400 μ l 一級抗體吸出，再裝入 500 μ l PBST，將其放在 3D 旋轉震盪器上反應 20 分鐘，重覆此步驟三次。
8. 取出 PBST 並裝入 400 μ l 二級抗體，並將其放在 4 $^{\circ}$ C 冷藏櫃中的 3D 旋轉震盪器上反應至少一個晚上。
9. 利用微量移液槍將 400 μ l 二級抗體吸出，再裝入 500 μ l PBST，將其放在 3D 旋轉震盪器上反應 20 分鐘，重覆此步驟三次。
10. 取出 PBST 並裝入 SlowFadeTM Gold Antifade Mountant，並將其放在 4 $^{\circ}$ C 冷藏櫃中至少一個晚上。
11. 將一 200 μ l 微量吸管 (yellow tip) 的尖端剪掉 (防止吸取時傷到果蠅大腦)，再以此微量吸管將果蠅腦連同少量 Antifade Mountant 從離心管中吸出，置於乾淨的載玻片上，並在樣本周圍四個角落放置碎蓋玻片做為支撐 (防止蓋玻片下壓時傷及腦部)，最後以指甲油密封蓋玻片的周圍。

肆、研究結果

(一) 在嗅葉中 *GMR51C07* 細胞在發育過程中的生長型態

本研究欲觀察 *Dscam* 的缺失及過度表現對 *GMR51C07* 神經細胞在型態發育上的影響，所以必須先確認 *GMR51C07-GAL4* 在果蠅的發育時期即有表現在這群被標定的區域中介神經細胞，而且必須先瞭解這些被標定的區域中介神經元在發育過程中如何逐步建立其型態。因此，我先觀察在果蠅三齡幼蟲、結蛹後 24 hr (24 hr APF)、以及成蟲時，在嗅葉上 *GMR51C07* 中介神經元的生長型態 (圖六)。*GMR51C07-GAL4* 在三齡幼蟲的大腦中，表現在嗅葉附近大量的區域中介神經元 (圖六 A, 黃色箭號)。在這個階段，這些區域中介神經細胞已經在嗅葉中長出軸突及樹突，且有軸突伸出嗅葉，但尚未通過大腦中線 (圖六 A, 白色箭號)。在 24 hr APF 時，這些區域中介神經元即已建立起進入對側嗅葉的連合軸突 (commissural axons) (圖六 B, 白色箭號)，且也表現在嗅葉附近大量的區域中介神經元 (圖六 B, 黃色箭號)。但在成蟲時，嗅葉中表現 mCD8GFP 蛋白的 *GMR51C07* 細胞已較前兩個時期少 (圖六 C, 黃色箭號)。有趣的是，我們仍然看到許多附近的細胞表現 β -Galactosidase (圖六 C, 藍色)，這是因為 β -Galactosidase 蛋白在果蠅細胞中非常難被分解，所以儘管在已經不表現 *GMR51C07-GAL4* 的細胞中，依舊可在之後的好幾天偵測到 β -Galactosidase；而 mCD8GFP 蛋白 (圖六 C, 綠色) 在果蠅細胞中分解的速度較快 (約 6-12 小時)，因此只要當細胞不再表現 *GMR51C07-GAL4* 後，只要過了約 12 小時，細胞就不再具有 mCD8GFP，所以在成蟲組 (圖六 C) 中可看到有些細胞還有 β -Galactosidase 蛋白但已經沒有 mCD8GFP 蛋白了。*GMR51C07* 中介神經細胞在不同發育時期的細胞型態總結在圖六 D。



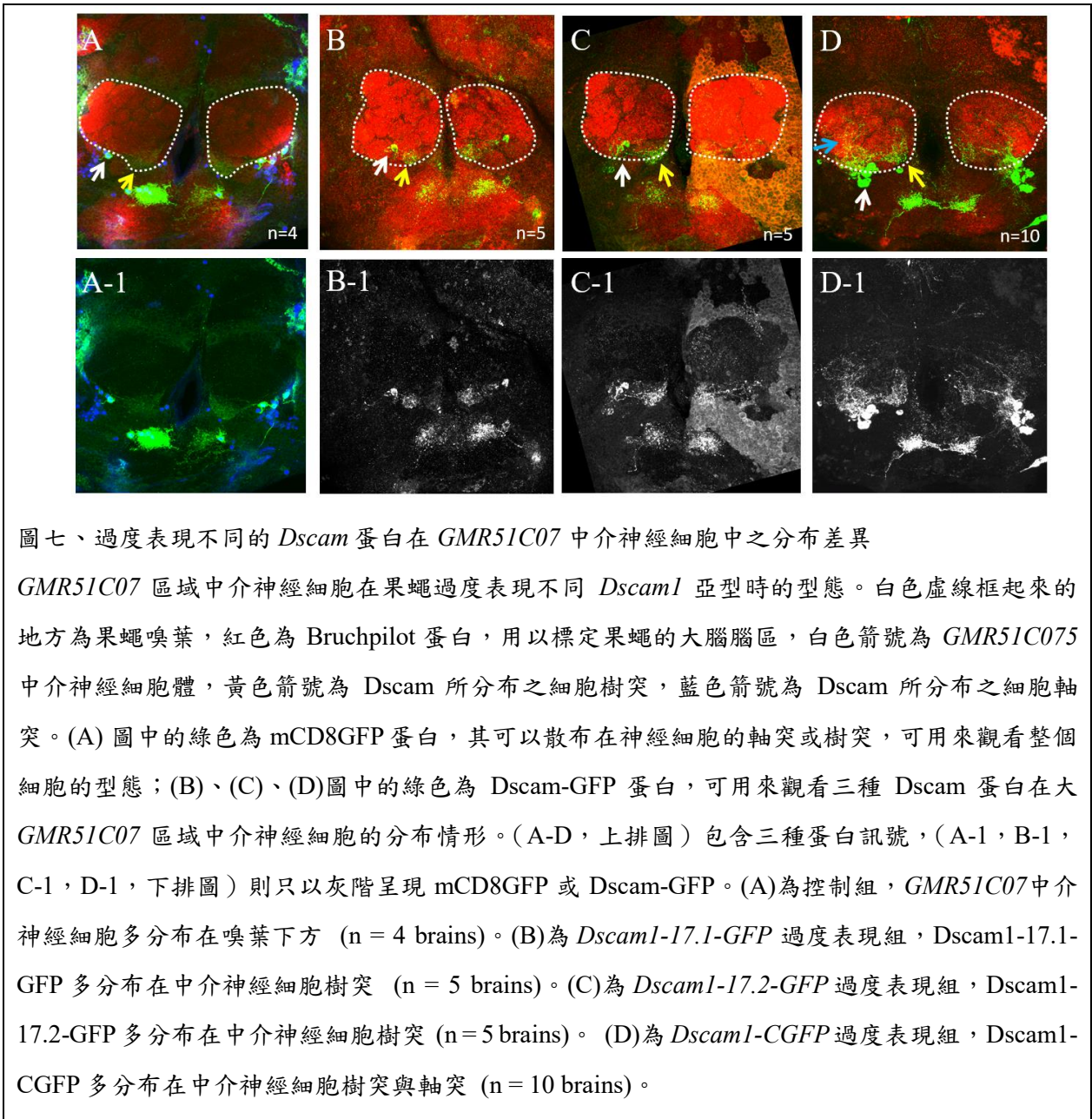


圖六、*GMR51C07-GAL4* 標定的區域中介神經細胞在發育過程中的型態

GMR51C07 區域中介神經細胞在果蠅三個發育時期的型態。白色虛線框起來的地方為果蠅嗅葉，黃色箭號 *GMR51C07* 區域中介神經元的細胞體 (soma)，白色箭號為連合軸突。紅色為 Bruchpilot 蛋白，用以標定果蠅的大腦腦區；藍色為 *lacZ* 所表現的 β -Galactosidase 蛋白，其會表現在 *GMR51C07* 細胞的細胞核；而綠色為 mCD8GFP 蛋白，其可以散布在神經細胞的軸突及樹突，可用來觀看整個細胞的型態。(A-C，上排圖) 包含三種蛋白訊號，(A-1，B-1，C-1，下排圖) 則只呈現 mCD8GFP 及 β -Galactosidase。(A) 為三齡幼蟲大腦，可明顯看出 *GMR51C07-GAL4* 在嗅葉有表現 (n = 10 brains)。(B) 為 24 hr APF 蛹期的大腦，可看出這些 *GMR51C07* 中介神經細胞已建立連合軸突 (commissural axons) (n = 5 brains)。(C) 為成蟲的大腦，可看出 mCD8GFP 在嗅葉中的表現量已變少 (n = 4 brains)。(D) 為 *GMR51C07* 中介神經細胞 (藍色) 在不同時期的細胞型態，每張示意圖只呈現左側的嗅葉 (綠色)。

(二) 在 *Dscam* 過度表現下，不同的 *Dscam* 蛋白在 *GMR51C07* 中介神經細胞中的分布位置

Dscam1 蛋白具有超過三萬八千種以上的亞型 (Schmucker et al, 2000)，為了瞭解不同的亞型是否有不一樣的功能，我們利用 *Dscam-GFP* 以觀察在發育階段即開始過度表現不同亞型的 *Dscam1* 時，這些 *Dscam* 蛋白在 *GMR51C075* 中介神經細胞中的分布差異。在下圖 (圖七 A，A-1) 可看到，*Dscam* 所分布的 *GMR51C07* 中介神經細胞體多分布在嗅葉下方 (白色箭號)。在過度表現 *Dscam1-17.1-GFP* 組中，*Dscam1-17.1-GFP* 蛋白多分布在 *GMR51C07* 中介神經細胞樹突上 (圖七 B，黃色箭號)，在過度表現 *Dscam1-17.2-GFP* 組中，*Dscam1-17.2-GFP* 蛋白也多分布在 *GMR51C075* 中介神經細胞樹突上 (圖七 C，黃色箭號)，但在過度表現 *Dscam1-CGFP* 組中，*Dscam1-CGFP* 蛋白則分布在 *GMR51C075* 中介神經細胞樹突和軸突上 (圖七 D，黃色和藍色箭號)。由此可知，過度表現 *Dscam* 後，*Dscam1-17.1-GFP*、*Dscam1-17.2-GFP* 傾向分布在 *GMR51C075* 中介神經細胞樹突位置，而 *Dscam1-CGFP* 則傾向分布在 *GMR51C075* 中介神經細胞樹突和軸突位置。



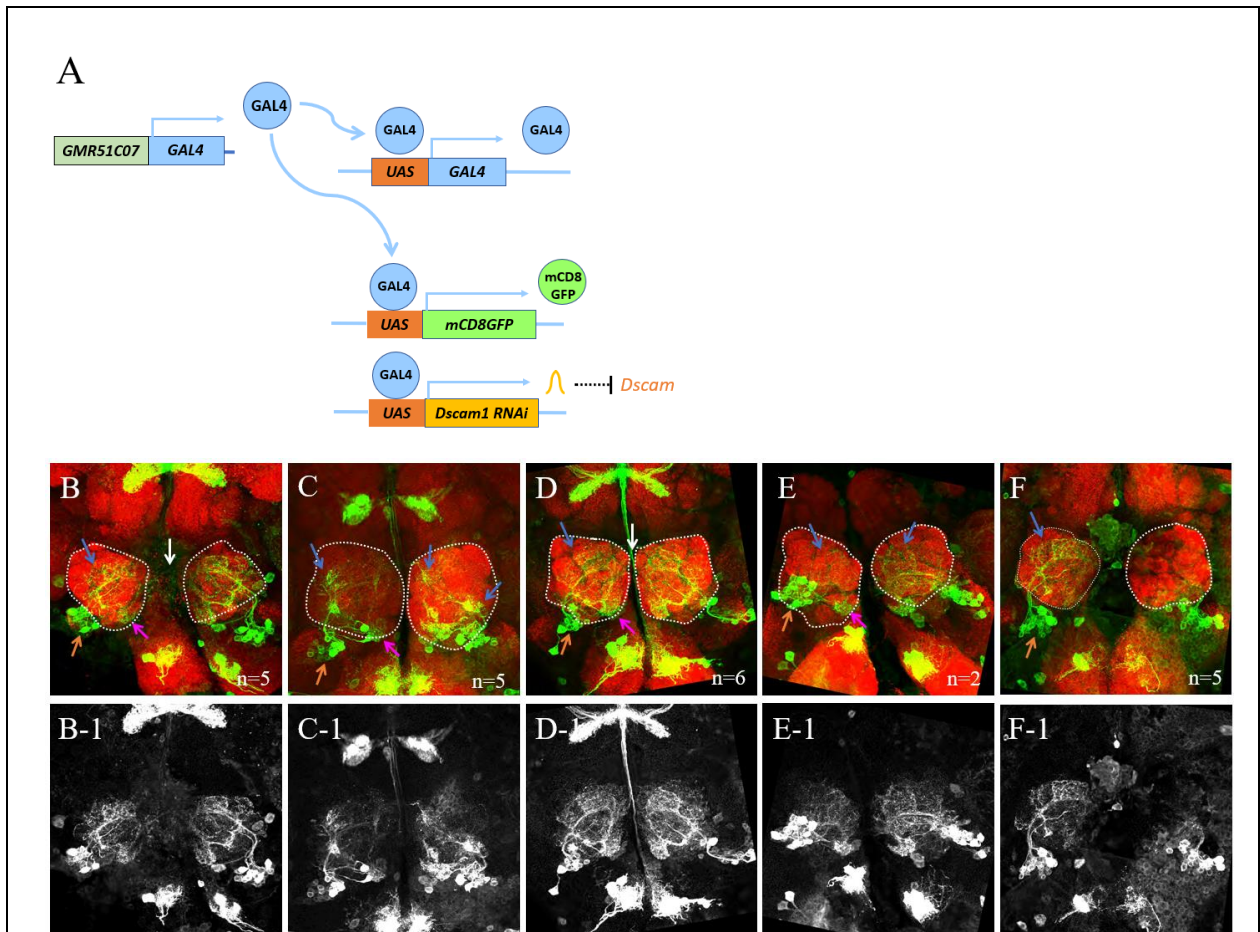
圖七、過度表現不同的 *Dscam* 蛋白在 *GMR51C07* 中介神經細胞中之分布差異

GMR51C07 區域中介神經細胞在果蠅過度表現不同 *Dscam1* 亞型時的型態。白色虛線框起來的地方為果蠅嗅葉，紅色為 Bruchpilot 蛋白，用以標定果蠅的大腦腦區，白色箭號為 *GMR51C07* 中介神經細胞體，黃色箭號為 *Dscam* 所分布之細胞樹突，藍色箭號為 *Dscam* 所分布之細胞軸突。(A) 圖中的綠色為 mCD8GFP 蛋白，其可以散布在神經細胞的軸突或樹突，可用來觀看整個細胞的型態；(B)、(C)、(D) 圖中的綠色為 *Dscam*-GFP 蛋白，可用來觀看三種 *Dscam* 蛋白在大 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的分布情形。(A-D, 上排圖) 包含三種蛋白訊號，(A-1, B-1, C-1, D-1, 下排圖) 則只以灰階呈現 mCD8GFP 或 *Dscam*-GFP。(A) 為控制組，*GMR51C07* 中介神經細胞多分布在嗅葉下方 (n = 4 brains)。(B) 為 *Dscam1-17.1-GFP* 過度表現組，*Dscam1-17.1-GFP* 多分布在中介神經細胞樹突 (n = 5 brains)。(C) 為 *Dscam1-17.2-GFP* 過度表現組，*Dscam1-17.2-GFP* 多分布在中介神經細胞樹突 (n = 5 brains)。(D) 為 *Dscam1-CGFP* 過度表現組，*Dscam1-CGFP* 多分布在中介神經細胞樹突與軸突 (n = 10 brains)。

(三) 在抑制 *Dscam* 表現下，嗅葉中 *GMR51C07* 中介神經細胞的生長型態

觀察嗅葉附近的 *GMR51C07* 中介神經細胞，當其 *Dscam1*、*Dscam2*、*Dscam3*、*Dscam4* 分別被抑制後，與控制組的可能差異。為了在細胞發育的過程中可以盡量抑制 *Dscam* 的表現，我們在所有的果蠅多加了 *UAS-GAL4* 轉殖基因，以增加 *GMR51C07* 中介神經細胞中 GAL4 蛋白的表現量。其作用原理詳見圖八 A。也因為增加了 GAL4 蛋白的表現量以及延續其表現的時間，所以可以看到 mCD8GFP 表現在比較多的 *GMR51C07* 中介神經細胞。在下圖(圖八)可看到，以 *RNAi* 分別抑制不同的 *Dscam* 後，控制組中(圖 B, B-1)，*GMR51C07* 中介神經細胞具有軸突(藍色箭號)和樹突(粉色箭號)，並且在兩嗅葉間也具有聯合軸突(白色箭號)，但在抑制 *Dscam1* 組(圖 C, C-1)中，雖仍具有 *GMR51C07* 中介神經細胞的樹突(粉色箭號)，

但其軸突卻呈現不正常的聚集(藍色箭號)，而且聯合軸突也消失了。不過，在抑制 *Dscam2* 組(圖 D, D-1)中，*GMR51C07* 中介神經細胞的軸突(藍色箭號)和樹突(粉色箭號)和對照組的軸突、樹突非常相似，而且兩嗅葉間也具有聯合軸突(白色箭號)。在抑制 *Dscam3* 組(圖 E, E-1)中，雖然和抑制 *Dscam1* 組的結果很像，都具有 *GMR51C07* 中介神經細胞的樹突(粉色箭號)，並且也都不具有聯合軸突，但是抑制 *Dscam3* 組中的軸突分布卻被推到在二嗅葉靠近大腦中線的地方，而且較分散在嗅葉中。最後，在抑制 *Dscam4* 組(圖 F, F-1)中，不只兩嗅葉間的聯合軸突消失，就連 *GMR51C07* 中介神經細胞樹突也變少而接近消失，只剩下 *GMR51C07* 中介神經細胞軸突(藍色箭號)。由此可知，*Dscam2* 可能對 *GMR51C07* 中介神經細胞型態之影響較其他 *Dscam* 小，而且不同的 *Dscam* 基因可能參與 *GMR51C07* 中介神經細胞不同部位的發育及連結(表三)。



圖八、抑制果蠅不同的 *Dscam* 基因對 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的發育之影響

在果蠅 *GMR51C07* 區域中介神經細胞抑制不同 *Dscam* 而造成的型態改變。白色虛線框起來的地方為果蠅嗅葉，橘色箭號為各組的 *GMR51C07* 中介神經細胞，藍色箭號為各組嗅葉中形成的突觸型態，白色箭號為各組中的連合軸突。紅色為 Bruchpilot 蛋白，用以標定果蠅的大腦腦區；綠色為 mCD8GFP 蛋白。(A-E, 上排圖) 包含三種蛋白訊號，(A-1, B-1, C-1, D-1, E-1, 下

排圖) 則以灰階只呈現 mCD8GFP。(A) 為控制組 (n = 5 brains)。(B) 為抑制 *Dscam1* 組 (n = 5 brains)。(C) 為抑制 *Dscam2* 組 (n = 6 brains)。(D) 為抑制 *Dscam3* 組 (n = 2 brains)。(E) 為抑制 *Dscam4* 組 (n = 5 brains)。

表三、抑制不同 *Dscam* 所造成之 *GMR51C07* 區域中介神經細胞型態差異

	軸突	樹突	聯合軸突
抑制 <i>Dscam1</i>	不正常聚集	擁有	消失
抑制 <i>Dscam2</i>	擁有，且與控制組相似	擁有，且與控制組相似	擁有
抑制 <i>Dscam3</i>	擁有	擁有	消失
抑制 <i>Dscam4</i>	擁有	變少或消失	消失

伍、結論

本實驗之實驗目的為觀察嗅葉中 *GMR51C07* 區域中介神經細胞在不同的 *Dscam* 基因過度表現及抑制下，所造成的細胞型態差異。我們利用 *UAS-GAL4* 系統，觀察 *GMR51C07* 區域中介神經細胞在不同發育時期的細胞型態，以及過度表不同現 *Dscam1* 亞型時，*Dscam* 在嗅葉的 *GMR51C07* 區域中介神經細胞中的分布，最後再觀察抑制不同 *Dscam* 基因對嗅葉中 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的細胞型態發育的影響。

在觀察不同發育時期嗅葉中 *GMR51C07* 區域中介神經細胞之型態可發現，*GMR51C07-GAL4* 在三齡幼蟲即表現在很多的區域中介神經細胞，而在 24hr APF 時，這些神經細胞即建立起兩嗅葉間的聯合軸突，由此可知，*GMR51C07* 區域中介神經細胞可能會參與嗅葉神經迴路的發育。

在 *Dscam* 過度表現的實驗中，我們觀察到 *Dscam1-17.1-GFP*、*Dscam1-17.2-GFP* 蛋白多分布在嗅葉 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的樹突，而 *Dscam1-CGFP* 蛋白則多分布在嗅葉 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的軸突和樹突。由此可推測 *Dscam1-17.1*、*Dscam1-17.2* 蛋白可能會參與 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的樹突發育，而 *Dscam1* 蛋白則可能會參與 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的樹突和軸突發育。

觀察抑制不同 *Dscam* 基因對 *GMR51C07* 區域中介神經細胞之細胞型態的影響後發現，抑制 *Dscam1*、*Dscam3* 皆會使得 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的聯合軸突消失，剩下軸突和樹突，而且軸圖會有不同的變異；抑制 *Dscam4* 會使得 *GMR51C07* 區域中介神經細胞的聯合軸突和樹突消失，剩下軸突而已；抑制 *Dscam2* 後，*GMR51C07* 區域中介神經細胞的聯合軸突、樹突和軸突，皆和控制組的差不多；抑制 *Dscam1* 後，會使得 *GMR51C07* 區域中介神經細胞軸突形成不正常的聚集。

柒、參考資料與其他

1. 王希文(2017)。神經的運作與圖譜。國家科學及技術委員會，科學史沙龍網址 <https://case.ntu.edu.tw/scisalon/biological/071017-1/>
2. 許一懿、張永達(2009)。模式生物(Model Organisms)-中。取自國立台灣大學，科學 Online 網址 <https://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=926>
3. Flagg, R.O. (2005) Carolina Drosophila manual. Carolina Biological Supply Company. Burlington, NC, U.S.A.
4. Tsai, K.T., Chou, Y.H. (2022) Drosophila as a Model to Explore Individuality. In: Yamamoto, D. (eds) Behavioral Neurogenetics. *Neuromethods*, v181, 223-255. Humana, New York, NY. Springer Protocols.
5. FlyBase; <https://flybase.org>
6. A.H. Brand, N. Perrimon (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes [Electronic version]. *Journal of Development*, 118, 401-415.
7. 李冠群、張雅菱 (2010)。核醣核酸干擾(RNA interference, RNAi)-上。取自國立台灣大學，科學 Online 網址 <https://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=7998>
8. 李冠群、張雅菱 (2010)。核醣核酸干擾(RNA interference, RNAi)-下。取自國立台灣大學，科學 Online 網址 <https://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=8002>
9. H. Matsuyama, Hiroshi I. Suzuki (2019) Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis [Electronic version]. *Journal of Molecular Sciences*, 132, 2
10. Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Zipursky, S.L. (2000) Drosophila Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. *Cell*. 101, 671-684.

【評語】 050012

這項研究聚焦於細胞核在神經膠細胞發育中的位置及其對神經細胞功能的影響，利用了果蠅作為研究模型並應用了 GAL4 UAS 系統和 GrabGFP 技術。特定細胞核移動的研究：專注於神經膠細胞核的位置變化，這是神經生物學中一個相對未被深入探討的領域。

1. 深入理解細胞核位置的重要性：這項研究有助於理解細胞核位置變化對神經細胞發育的影響，拓寬了我們對細胞發育的認識。
2. 潛在的疾病治療應用：研究成果可能有助於理解某些神經退化性疾病的機制，並為未來的治療策略提供新的思路。
3. 果蠅模型的局限性：雖然果蠅是一個有用的模型生物，但其研究結果不一定能直接應用於人類或其他高等動物。
4. 潛在的非預期效應：限制細胞核移動可能對細胞的其他方面產生未知的影響，這些非預期效應需要進一步研究。建議討論可以更深入，例如神經膠細胞在神經細胞軸突形成的過程與位置引導（axon transportation, axon guidance）中扮演著重要角色，

其背後的意義。未來可更深入探討神經膠元核移動為什麼會影響神經細胞的軸突發育。

綜上所述，這項研究在探討細胞核位置對神經細胞發育的影響方面顯示出創新性和潛力。它不僅提供了新的科學見解，也為未來的疾病治療研究提供了可能的方向。然而，其技術複雜性和果蠅模型的局限性是需要進一步克服的挑戰。