

2024年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號

080003

參展科別

生物化學

作品名稱

利用合成生物學重建酵母菌性別轉換系統

就讀學校

臺北市私立復興實驗高級中學

指導教師

呂毓蘋、馬瑪宣

作者姓名

戴妘珊、李胤彤

關鍵詞

合成生物學、酵母菌配型變換、生物運

作者照片



摘要

本研究旨在解決摩爾定律和庫梅定律的困境，利用合成生物學將酵母菌配型變換的特性改為一種運算機制。首先，以HO內切酶切割不同配型的酵母菌(MAT α 和MAT a)染色體使其進行配型變換，並用顯微鏡檢視是否達成交配和計算效率。其次，利用同源重組將製造必需胺基酸(TRP1和HIS3)的基因替換配型變換中會置換的配型基因(a 和 α)，將酵母菌配型變換改造為二進位生物運算單元。本實驗設計了引子用於PCR確認酵母菌第三條染色體中是否準確插入TRP1/HIS3序列。目前成功以HIS3基因轉殖重建酵母菌的配型。這項研究為隨後涉及不同配型變換以及利用CRISPR系統進行計算應用的更廣泛研究提供了基礎。

Abstract

Our research aims to tackle the existing challenges presented by Moore's Law and Koomey's Law, applying synthetic biology to yeast mating-type switching to create a computing platform. First, we induce mating-type switching in the yeast types MAT α and MAT a using HO endonuclease, followed by microscopic examination to confirm successful mating and evaluate efficiency. Subsequently, we employed homologous recombination to replace yeast mating genes with crucial for essential amino acid production (TRP1 and HIS3), substituting a and α during the mating-type switching. This allows us to transform the yeast mating-type switching into an innovative binary unit for biological computing. We have designed specific primers to facilitate PCR verification, guaranteeing the accurate integration of TRP1/HIS3 sequences into the third chromosome of yeast. We have effectively reconstructed one mating type by integrating the HIS3 gene. This study serves as a foundational step for subsequent alterations of mating types involving different genes, as well as for broader research utilizing CRISPR systems for computational applications.

壹、前言

一、研究動機

一直以來，半導體產業依據著摩爾定律與庫梅定律兩大定律發展，然而隨著半導體產業的發展，逐漸到達大小與能源效率的極限。為了因應晶片在體積、記憶容量和運算的限制，我們設想使用具相同能力的 DNA 作為突破，就摩爾定律而言，DNA 可突破硬體限制(Mary Muers, 2011)，而就庫梅定律而言，只要提供足夠養分供乘載 DNA 的生物生存即可持續達成運算。在確認使用 DNA 的方向後，卻忽略 DNA 過於穩定難以產生規律變化，本實驗討論多種可利用酵母菌配型變化機制建立的運算系統使在兼具 DNA 優點同時又較 DNA 變換容易。

表一、各項運算方式特性比較

材料	摩爾定律 (體積)	庫梅定律 (能源效率)	複雜性 (元件組起的容易性)	相融性 (可設計多組合)	醫療用途
光路計算	☆☆☆	☆☆☆	☆☆☆	☆☆☆	☆☆☆
	過度依賴物理性質導致物件大小固定	人工，能量需求大	人工操作，而非機器運算	無法結合應用	人工操作，應用有限
磁碟	☆☆☆	☆☆☆	☆☆☆	☆☆☆	☆☆☆
	儲存工具，物理性質限制大	能量會以熱的形式大量流失	只能儲存無法進行複雜運算	無法與現代機器相容	僅具備儲存功能 可儲存病歷資料
Semi-Conductor 半導體	★★☆	★★☆	★★★	★★☆	☆☆☆
	目前依然符合然而未來還是會有硬體上的限制	半導體具一定能源效率，然而效率隨使用時間明顯下滑	可以建立高複雜性的計算模式	雖可與許多機器相容，然而無法於生物體內運算	檢測儀器，非直接醫療
基因重組	★★★	★★☆	★★☆	★★★	★★★
	DNA 大小約 2.2~2.4nm	倘若設計得宜應不會有過多能量流失	因基因複雜性高，基因重組多元性理應也較多	凡是生物即有基因，而有基因即可進行運算	高相容性
Mating-Type Switch 配型變換	★★★	★★★	★★★	★★★	★★★
	由酵母菌配型變換的機制進行運算，大小視同 DNA 大小	供給足夠酵母菌生存能量即可，能源效率高	酵母菌種類多，多元性高，複雜性高	凡可使酵母菌生長，即可進行此運算	可用於人體疾病監測
量子電腦	★★★	★★★	★★☆	未知	未知
	量子大小約 10^{-8} Å，極小	量子運算，無能源效率問題	以量子來說，計算應快速、複雜而精確，但人處於研究階段	仍處於研發階段	仍處於研發階段

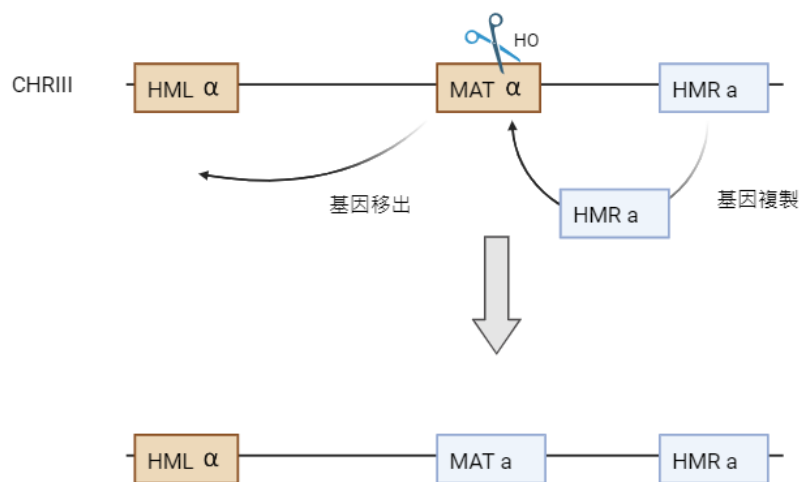
本表比較了光路計算、磁碟、Semi-conductor 半導體、Mating-type switch 配型變換、基因重組與量子電腦共五種方式後，可見 Mating-type Switch 相較其他運算方式更符合本實驗目標：打破用晶片儲存運算的限制，且已具有一定程度研究基礎，因此選擇 Mating-type switch 作為本實驗研究方向。

二、研究背景

(一) Mating-type switch方法

1. The Cassette Model of Mating Type Switch

當酵母菌染色體被破壞時，酵母菌會從兩端未顯現的基因序列中挑選與原本序列相似的另一序列做模仿。倘若本為MAT α 則從HMR複製a序列，由MAT α 變為MATa，倘若本為MATa則從HML複製 α 序列，由MATa變為MAT α ，稱為Mating-type switch (Astell et al., 1981)。自然界中的酵母菌具有活化的HO，可自由配型變換，而實驗室使用的m138、m139則不具HO，須轉入HO並活化才能配型變換。



圖一、The Cassette Model of Mating-Type Interconversion

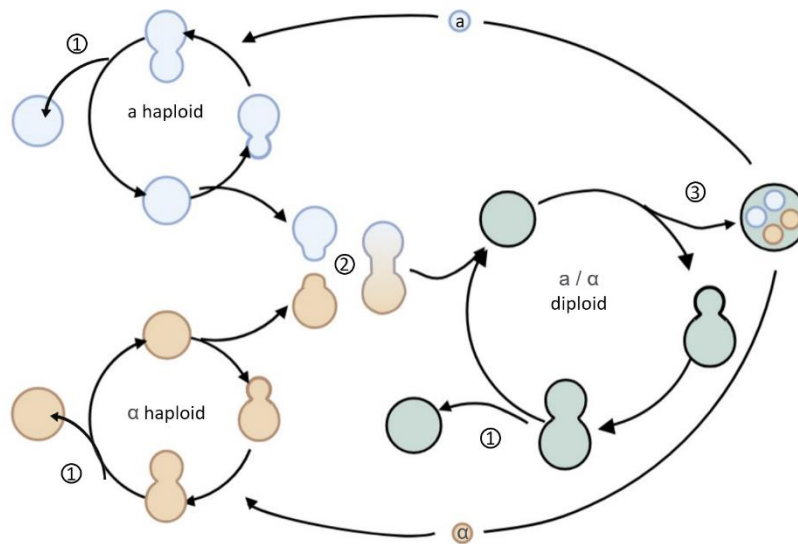
圖中所示為Mating-type switch，將MAT α 變換為MATa的過程。

[註解]

- HMR: 全名HoMothallism Right，為酵母染色體右端承載a基因的未表現基因
- HML: 全名HoMothallism Left，為酵母染色體左端承載 α 基因的未表現基因
- m138: 表現為a的MATa釀酒酵母菌
- m139: 表現為 α 的MAT α 釀酒酵母菌
- MATa: Mating type a，即為染色體表a(m138)的單套酵母
- MAT α : Mating type α ，即為染色體表 α (m139)單套酵母

2. The Homothallic Life Cycle of Yeast

釀酒酵母可利用MATA和MAT α 單倍體進行無性生殖，與相反交配類型的酵母菌交配可使單倍體酵母菌轉變為二倍體酵母，而與許多其他真菌一樣，釀酒酵母有將一種單倍體交配類型(Ex: MATa)轉變為另一種單倍體交配類型(Ex: MAT α)的能力，此特有特性將於本實驗突破DNA穩定的限制，有利達成變換。

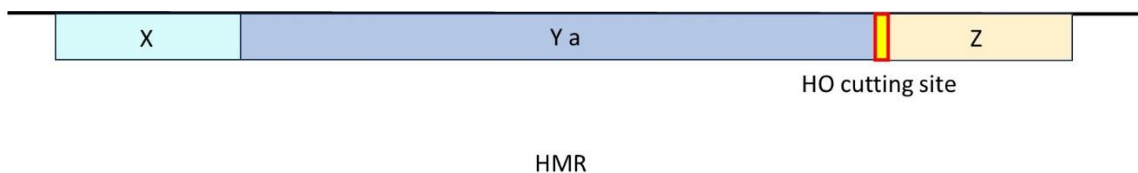


圖二、酵母菌具有交配類型a和 α ，並可互相交配由單倍體形成二倍體。

(二) HOmothallic switching endonuclease 與 Y基因

HO，取自HOmothallic switching endonuclease，為一段長586個胺基酸的內切酶，可切斷位於酵母菌特定序列，引發Mating-type Switch機制，切換該酵母菌的交配類型。HO須經轉化入酵母菌中，而活化啟動HO則需使酵母菌攝取galactose半乳糖。

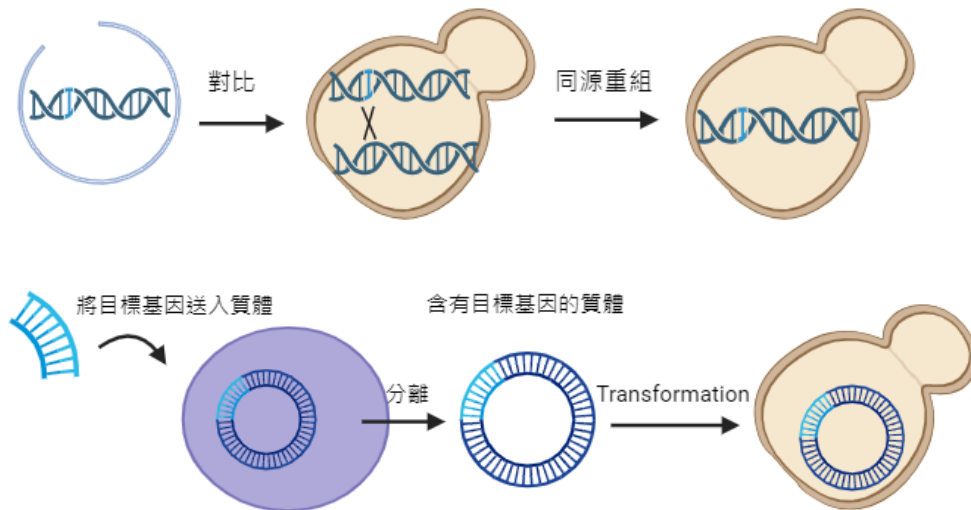
Y基因(Y region)為酵母菌MATA與MAT α 上的一段序列，Ya為於a1與a2兩個轉錄起始點中間，1350~1991上，一共642bp，而Y α 亦為於 α 1與 α 2兩個轉錄起始點中間，1799~2545上，一共747bp (Gietz et al., 1992)。



圖三、圖中所示為MAT α 的HO內切酶切點

(三) 將基因植入酵母菌的方法

方法一以質體DNA為載體，再將質體轉殖入酵母菌，而方法二為透過同源重組(homologous recombination, HR)，也就是指兩股具有相似序列的DNA重新排列，使遺傳物質發生自發性交換 (Klein et al., 2019)。



圖四、方法一：同源重組，也就是指兩股具有相似序列的DNA重新排列，使遺傳物質發生交換

方法二：將目標基因送入質體，再將質體transformation入酵母菌

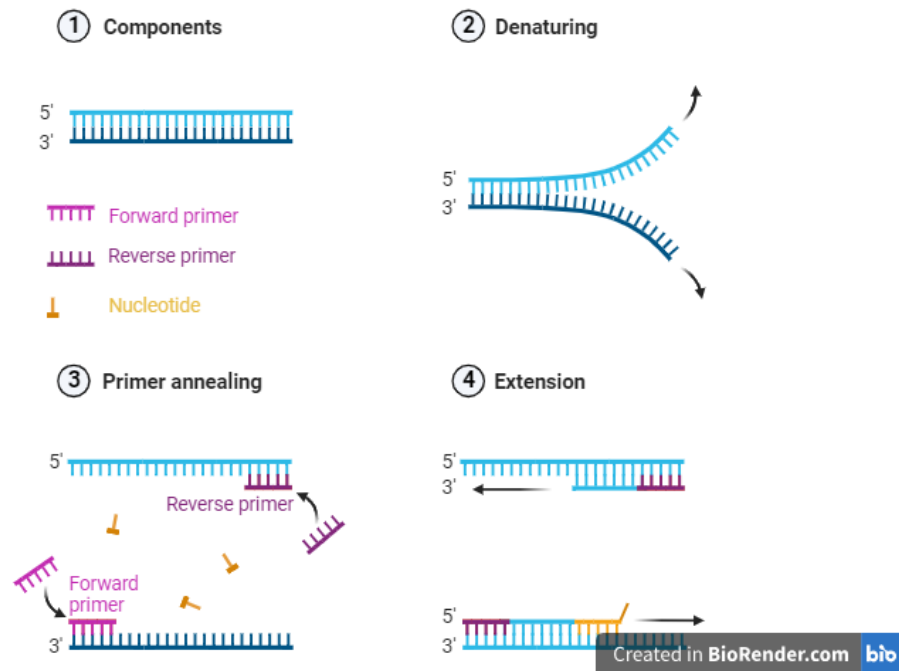
(四) Kapa PCR

PCR，全名Polymerase chain reaction，意為聚合酶連鎖反應，為複製目標plasmid的技術，執行方式為：1. Denature高溫打斷，2. Annealing of primers引子黏接，3. Extension of primers引子延展，重複以上步驟，而具體度仍需依使用primer而異。

由於本實驗需精準的複製DNA，才可由HO辨認DNA序列並進行置換，因此選用較一般酵素準確度(百萬分之一)高約十倍的DNA聚合酶Kapa。

Primer是一小段單鏈DNA或RNA，作為DNA複製的起始點，設計primer有以下幾點要注意：

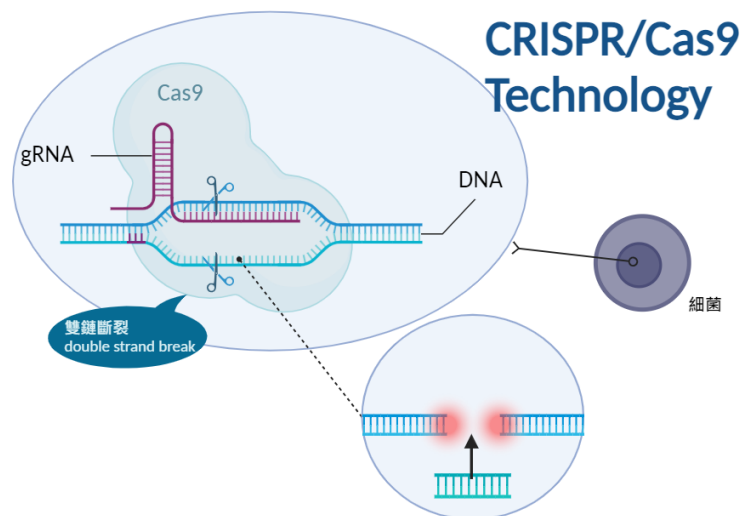
1. 引子長度一般在18~24bp，
2. G/C含量控制在40~60%，
3. 以1~2對G/C結尾，
4. T_m值控制在50~60°C左右且forward和reverse primer T_m值盡量相近。



圖五、PCR示意圖

(五) CRISPR/Cas9

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) 是一種細菌對抗外來質體或噬菌體的後天免疫系統。當致病原體感染微生物，細菌會捕捉一段外來序列並存放至自身基因內，當相同病原二次感染時，先前存放的序列與Cas9會共同被轉錄出來組成guide RNA再和Cas9蛋白結合，由guide RNA來辨識，Cas9蛋白破壞以抵禦外來病原。本實驗中將利用Cas9取代HO改造酵母菌，再透過設計使其達成二進位運算。

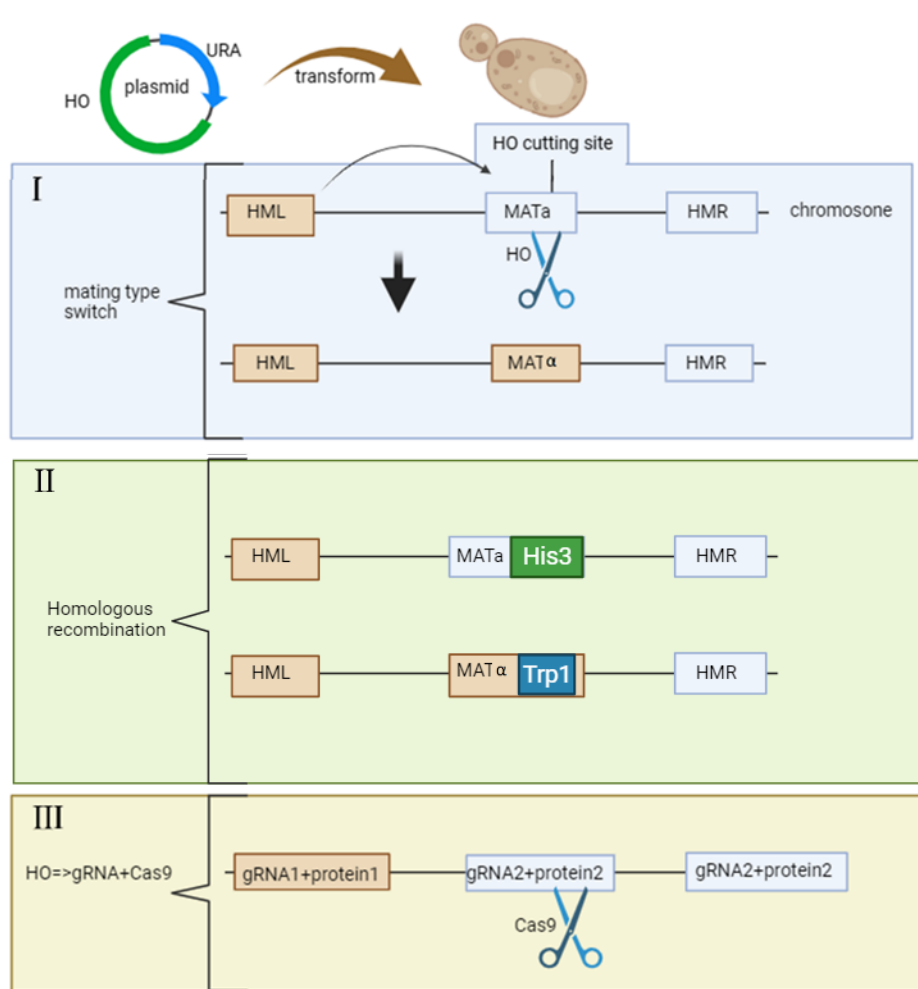


圖六、CRISPR/Cas9技術示意圖

貳、研究過程與方法

一、實驗設計

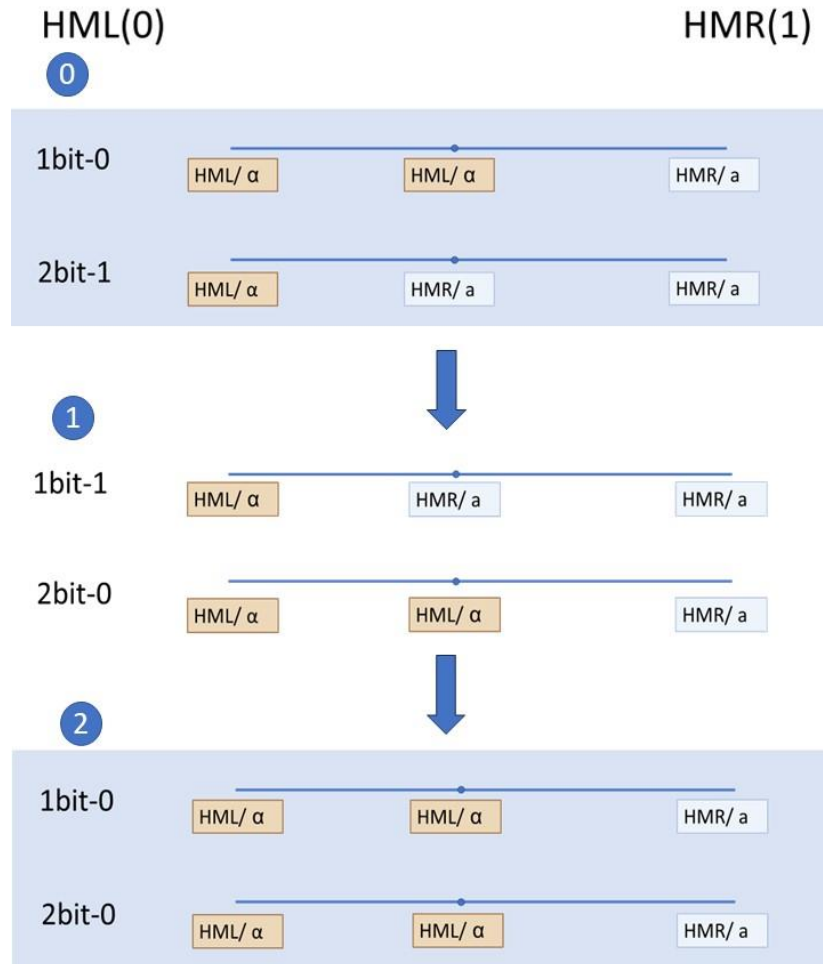
(一) 實驗流程



圖七、配型變換 (yeast mating type switching) 是一種由HO啟動的酵母菌染色體改變性別的機制。在確認其可行且提升成功率後，我們將會把HO改為gRNA和Cas9以調控。

(二) 二進位運算設計

本實驗欲將配型變換 (mating-type switch) 作為生物運算的基礎，並且以酵母菌的第三條染色體作為位元二進位運算。其中，本實驗所使用的菌株為單套的酵母菌，只具有一個能運用與運算的位元，因此將利用單套染色體能交配並形成雙套的特性增加運算位元。



圖八、運算設計示意圖

圖中以 MAT_a 代表 1，MAT_α 代表 0，兩者變換形成二進位運算。

二、研究設備和器材

實驗材料及藥品	酵母菌Saccharomyces cerevisiae、Lithium acetate(乙酸鋰)、PEG(聚乙二醇)、ddH ₂ O、Salmon or Herring Sperm DNA(single strand DNA)、SCM medium/plate、YPD medium/plate、raffinose、galactose、KAPA2G、
實驗器皿及耗材	SCM(Synthetic Complete Medium)、YPD(Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)、tip
實驗儀器	恆溫水槽、微量分注器、微量吸管分注器(pipette)、電動吸管、微量吸管尖(pipette tip)、微量離心管、離心機、微波爐、電泳照膠UV機台、電腦、電泳槽、分光光度計(nanodrop)、PCR機器
軟體	Snagene

三、研究方法及步驟

(一) 細胞培養-yeast culture

1. 酵母菌培養

將酵母菌MAT α 、MAT α 培養於YPD 中，並放置於30度的培養箱overnight。

(二) 細胞繼代培養-self-culture

1. 由於酵母菌複製DNA有極限，複製的效率會隨時間衰減。因此我們每周會將原本生長在SCM-URA plate中一部分的酵母菌轉移至新的SCM-URA plate,使其繼續生長，並保持在適合做實驗的狀態。

(三) 酵母菌的轉型-Yeast transformation

1. 在 3mL YPD medium中過夜用culture tube培養酵母菌株(MAT α 和MAT α)以進行轉化。
2. 5000rpm 離心 3 分鐘收集細胞。用1mL dH₂O 回溶兩次並再次收集細胞。
3. 用 800 μ L dH₂O 回溶細胞並轉移到新的 eppendorf 管中。以 5000rpm 的轉速減速 3 分鐘。
4. 先把上清液吸掉。在 1mL 0.1M LiAc 中回溶細胞,通過pipetting and vortexing混和均勻。離心5000rpm旋轉3分鐘收集細胞，重複三次。
5. 30°C養細胞30分鐘，每15分鐘搖晃一次。

6. 準備transformation mix。下列為一份的量：
 - dH₂O 65 μ L
 - 1M LiAc 36 μ L
 - 10mg/mL ss-DNA (denature) 5 μ L
 - 50%PEG 240 μ L
7. 5000rpm離心3分鐘，加50 μ L的ddH₂O。
8. 在 eppendorf 管中，加入 DNA、100 μ L細胞和 350 μ L transformation mix。vortex混合均勻。
9. 30°C 養40 分鐘，並在恆溫水槽 42°C 下熱休克(heatshock)20 分鐘。
10. 以 5000rpm 的速度將細胞離心 1 分鐘。在 100 μ L dH₂O 中resuspends，然後在SCM-URA上用玻璃珠塗盤。

(四) HO 的活化

1. 藥劑製備

配置raffinose 20%水溶液galactose20%水溶液和 SCM-URA(no glucose)

SCM-URA(no glucose)配方：

(1) 1000ml dH₂O

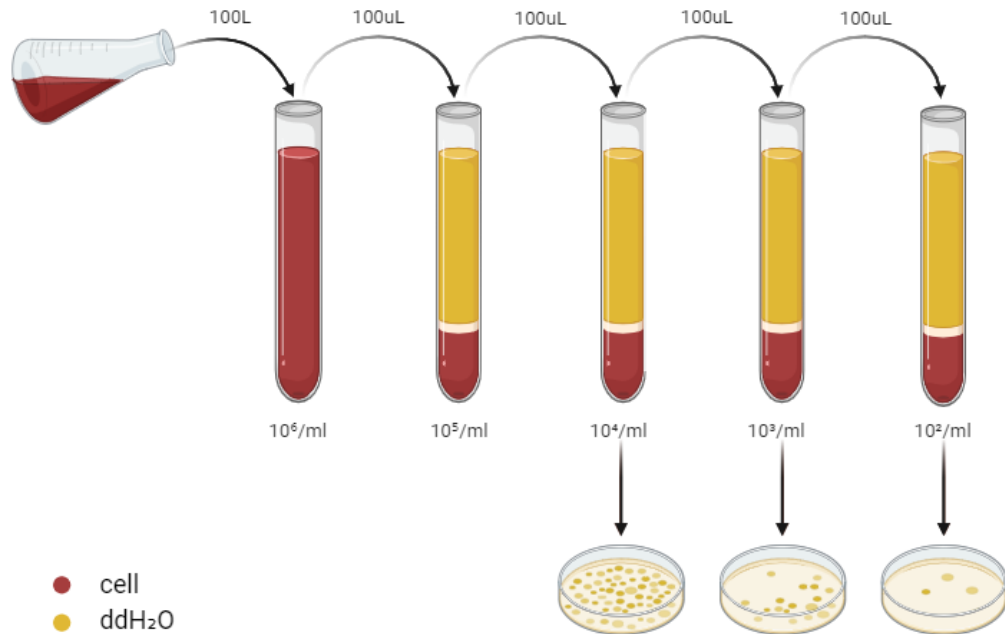
(2) 8.21g SCM MIX (KIM ADNDT RECIPE)

(3) 加	Adenine	(2 mg/ml)	10 ml
	Histidine	(10 mg/ml)	2 ml
	Tryptophan	(10 mg/ml)	4 ml
	Leucine	(10 mg/ml)	10 ml
	Arginine	(10 mg/ml)	2 ml
	Methionine	(10 mg/ml)	2 ml

2. MAT α & MAT α 培養

- (1) 挑MAT α x HO和 MAT α x HO單一菌落到回溶在100 μ L ddH₂O 中，再加入3ml的raffinose SCM-URA (culture tube)中，並放到培養箱中培養過夜。
- (2) 離心3分鐘5000rpm。

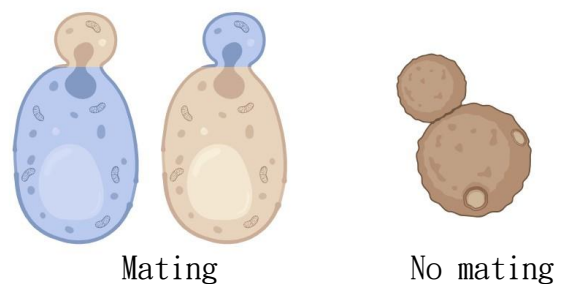
- (3) 回溶ddH₂O並離心，再回溶到3ml galactose (SCM-URA) 2%中，放到培養箱養6小時。
- (4) 6小時後，離心3分鐘5000rpm，並回溶ddH₂O 100 μl。
- (5) 將酵母菌的濃度回溶成10⁵個/ml、10⁴ /個/ml、10³個/ml、10²個/ml。
- (6) 塗盤：YPD(具glucose)，MAT_a和MAT_α總共八盤。



圖九、酵母菌序列稀釋示意圖。

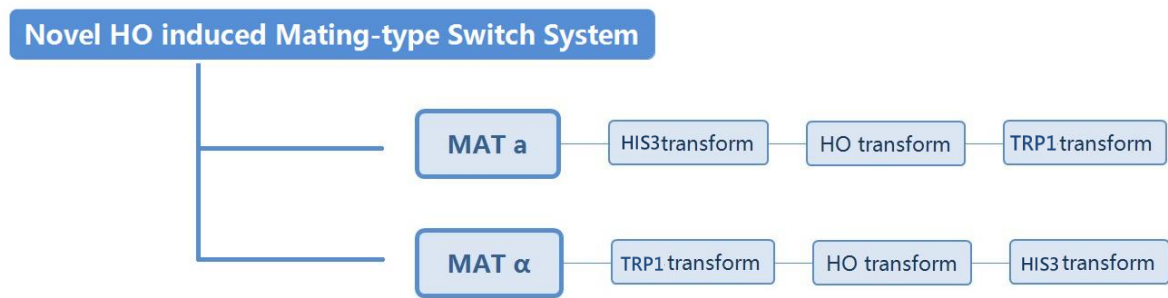
(五) MAT_a & MAT_α 酵母菌交配

1. 劃分培養皿。
2. 將MAT_a & MAT_α 與(α 駢a)和(a 駢α)塗抹至對應位置(四盤)。
3. 等待菌種mate 4小時。
4. 各取些許畫至載玻片。
5. 使用顯微鏡觀察。



圖十、Mating 示意圖

(六) 以oligos檢驗mating type switch效率



圖十一、重建酵母菌性別轉換

1. 在snappene上設計primer
 - (1) 為不影響既有序列表現，標示出a1、a2、 α 1、 α 2序列及其mRNA序列和重複序列，設計primer時應避開。
 - (2) 在Y序列中標示插入來自PRS423 plasmid的HIS3、HIS3 promoter和來自PRS424 plasmid的TRP1、TRP1 promoter到HML、HMR中並選擇方向。
 - (3) 標示出primer和HR(homologous recombination)序列
2. 在設定插入的序列中設計primer，用以檢驗TRP1/HIS3是否是成功插入目標序列。
3. 使用primer進行PCR 增加TRP1/HIS3片段數量。
 - (1) 溶解master mix 並放置在冰上約10分鐘
 - (2) 高速離心primer 15000rpm 1min，依據引子合成報告加入水，將混合物vortex 3min。
 - (3) 在新的ependorf加入ddH₂O 20 μ l並將剛才離心的10 μ l primer reverse 和10 μ l primer forward 混合，得到共40 μ l的25 μ m primer。
 - (4) 配置PCR實驗溶液

template DNA	1 μ l
primer	1 μ l
2x mix	10 μ l
ddH ₂ O	8 μ l

Total	20 μ l

(5) PCR (biometra tadvanced) 溫度設定

Denature1	95度	3min	1 cycle
Denature2	95度	15sec	35cycle
Annealing	55度	15sec	
Extension	32度	60sec/1kb	
Final	72度	1min/1kb	1 cycle

4. 跑膠確認PCR截取的序列大小是否正確
5. 進行gel extraction 已去除template DNA 和雜質:
 - (1) 先照UV確認要切的位置，切下後加入eppendorf 。
 - (2) 加入500 μ l的PCR Gell buffer，加熱到60度直到溶解。
 - (3) 加入DHF column，離心2000rpm 2min 。
 - (4) 加入300 μ l w1 buffer離心7000rpm 2min 。
 - (5) 加入300 μ l wash buffer離心7000rpm 2min 。
 - (6) 離心15000rpm 5min 甩乾。
 - (7) 加入30 μ l elution buffer等待5分鐘。
 - (8) 離心15000rpm 3分鐘並再次跑膠確認。
6. 將pRS423、pRS424 plasmid 和negative control一起transform到MAT α 和MAT α ，並養在SCM-TRP1 和SCM-HIS3 上，以確認plasmid是否可用。
7. 確認後將PCR結果分別transform 入MAT α 和MAT α ，並分別養在SCM-TRP1 和SCM-HIS3 上，以觀察是否轉植成功。
8. 確認成功後，養在YPD上數代並觀察以確認transform入且表現的的是否為template而非目標序列。
9. 以上確認後，PCR 外圍的primer 並跑膠以確認大小來檢驗插入酵母菌的DNA位置是否正確:
 - (1) 將細胞塗在20 μ l的NaOH中加熱到100度10min使其細胞壁損傷，並且於加熱後快速置於冰上使細胞熱漲冷縮而破裂，讓細胞中的DNA 和其他雜質同漂浮於上清液中。

(2) 在PCR eppendorf中加入:

Pre-mix	10 μ l
Primer	1 μ l
Cell buffer	9 μ l
<hr/>	
Total	20 μ l

(3) PCR program溫度設定

(4) 預期結果

MAT α (TRP1)	401bp
MATa(HIS3)	360bp
MATa(a primer)	319bp
MAT α (α primer)	259bp

10. 接下來實驗分成兩部分進行:

- (1) 用檢驗過的酵母菌transform 入HO , 並且重複以上的活化步驟, 養在SCM-TRP1-URA/SCM-HIS3 -URA上, 並且觀察是否存活以計算成功率。
- (2) 將相反性別表現基因的酵母菌重複一次第四個步驟, 並且確認成功之後, transform 入HO , 重複以上的活化步驟, 養在SCM-TRP1-URA/SCM-HIS3-URA上, 並且觀察是否存活以計算成功率。

參、研究結果與討論

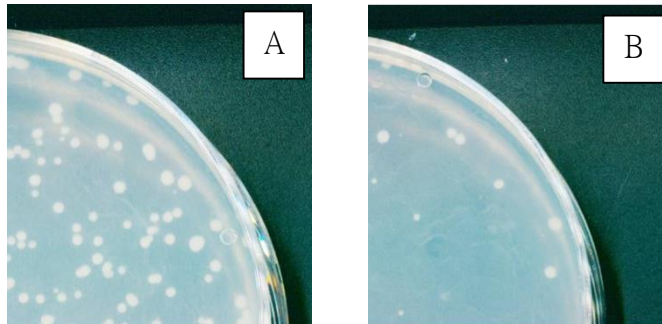
一、Mating-type switch檢驗:

(一) 以顯微鏡檢驗 mating type switch 及效率分析

1. HO transformation

(1) 目的：由於實驗室使用為具有製造HO蛋白基因的酵母菌，而配型變換需以HO 啟動，本實驗將進行HO transformation 使酵母菌可製造HO以進行配型變換。

(2) 結果：



圖十二、HO質體送入plate SCM-URA酵母菌。

(A) HO 轉入 MATa (B) HO 轉入 MAT α

● 說明

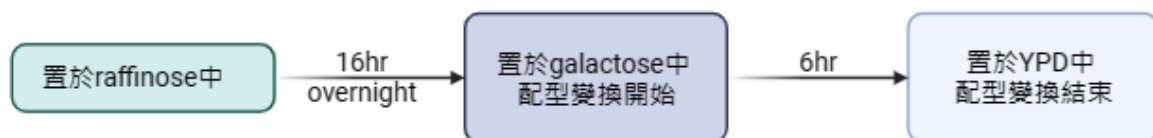
➤ 圖中為MATa和MAT α 轉入具有HO的質體後在SCM-URA上的生長情況。由於HO質體也具有製造uracil 的基因，因此可以判斷盤上存活的菌都有成功轉入。

➤ MATa 的轉入效率明顯大於MAT α 。

(3) 討論：本實驗中發現MATa 的轉入效率明顯大於MAT α 的結果，正在確認緣由。

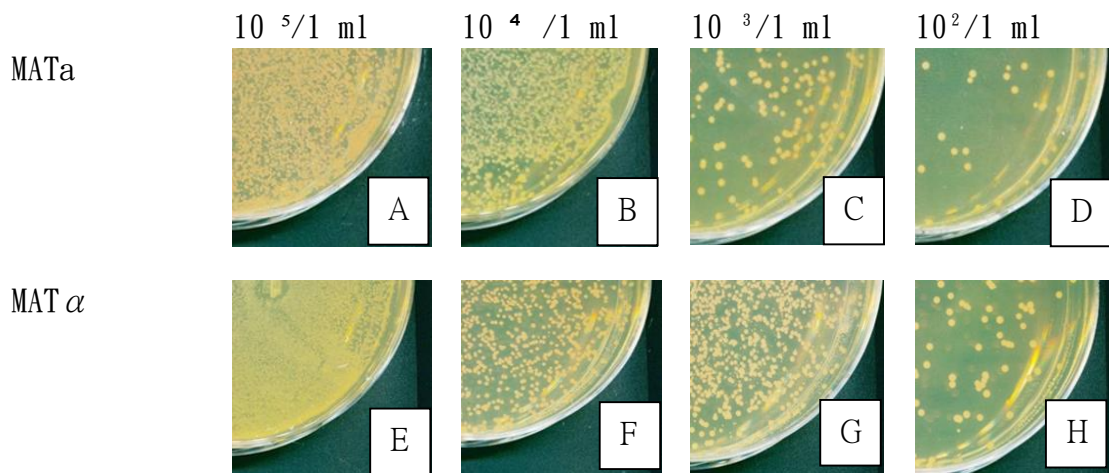
2. 活化HO

(1) 目的：HO基因在接觸galactose 時會被活化，而為了進行mating type switch，本實驗將使酵母菌攝取galactose。



圖十三、活化HO流程圖

(2) 結果：



圖十四、活化HO後酵母菌在YPD上生長結果

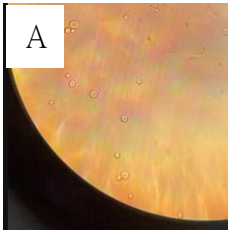
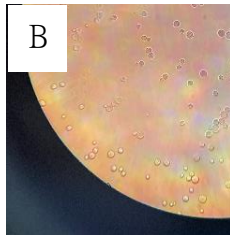
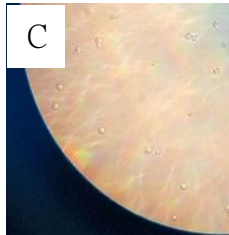
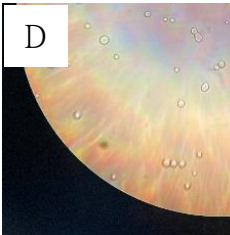




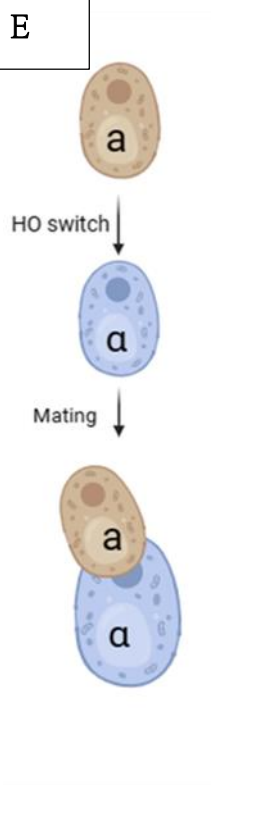
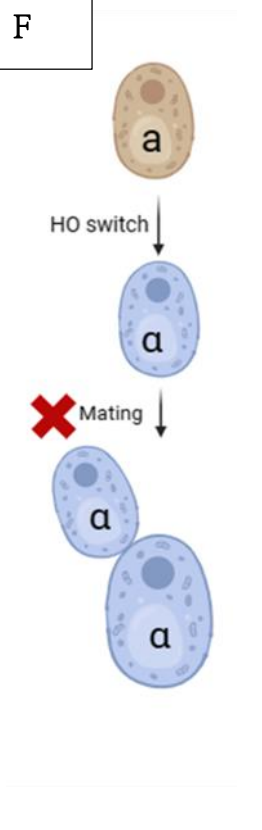
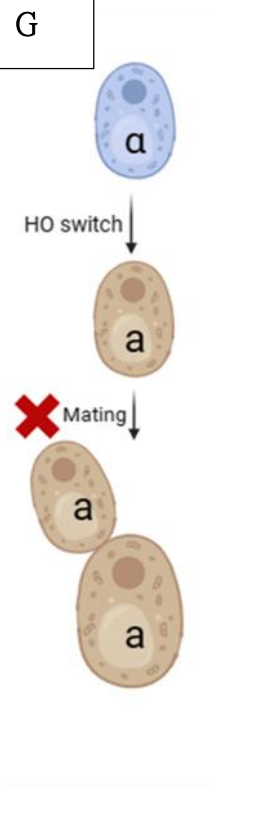
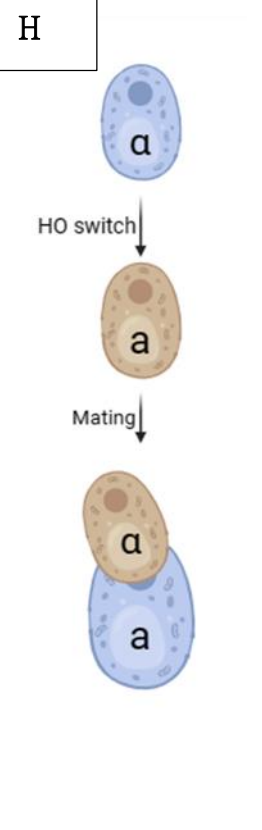
● 說明

- 酵母菌攝取糖的優先順序為：glucose>galactose>raffinose，因此本實驗為確保酵母菌必攝取galactose，會先讓其生長在具有raffinose的環境中，再轉換到SCM galactose溶液中培養，並最後在YPD(具有glucose)上塗盤結束反應。
- 酵母菌一開始養在raffinose的環境中，飽和度最高為 10^6 個/ml，而mating type switch 檢驗理想取用 10^2 個/ml的菌落，所以實驗中進行序列稀釋。
- 可看到圖片中菌落的密度依序遞減，圖A>B>C>D、圖E>F>G>H。

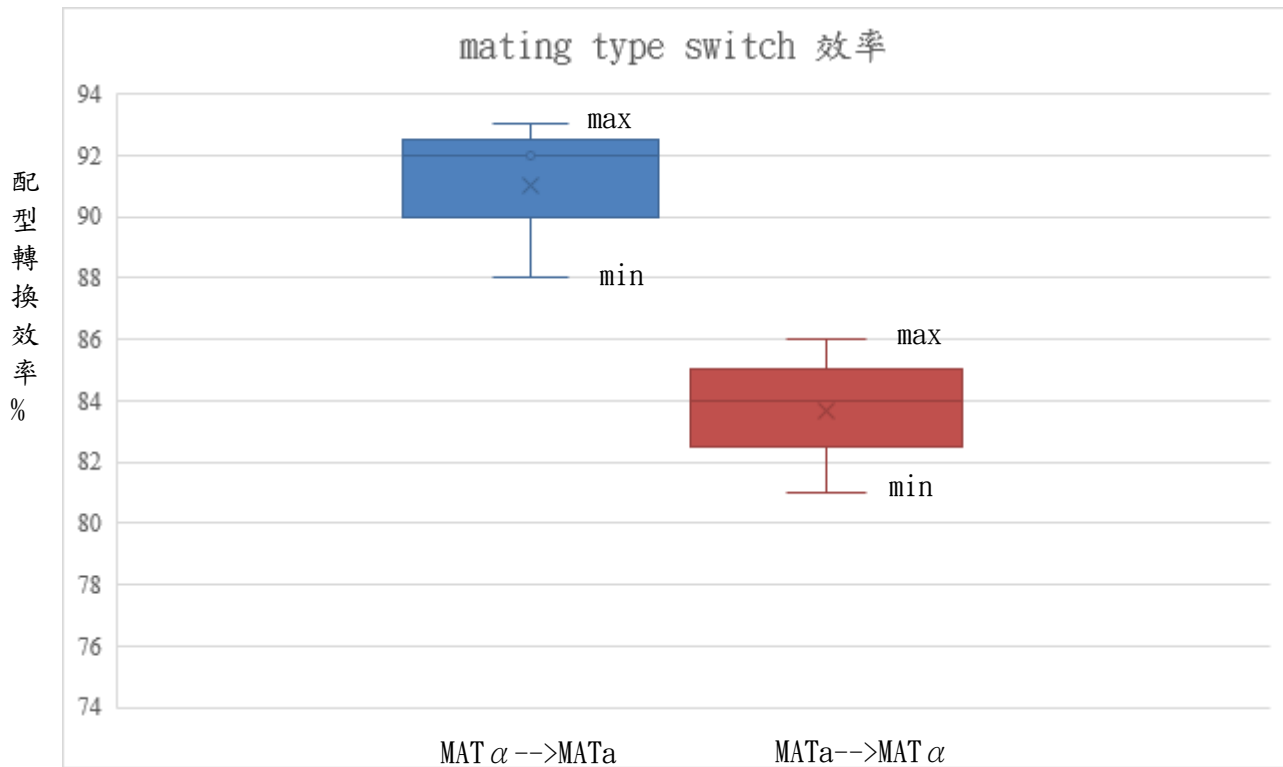
3. 以顯微鏡檢驗 Mating-type switch

- (1) 目的:為了確認mating type switch 效率，利用酵母菌不同mating type 會進行交配的特性並以顯微鏡觀察。

(2) 結果：

original	MATa	MATa	MAT α	MAT α
HO switched	MAT α	MAT α	MATa	MATa
mating with	MATa	MAT α	MATa	MAT α
→ Mating Yeast				
Mating 放大	 mating	 no mating	 mating	 no mating
示意圖	<p>E</p> 	<p>F</p> 	<p>G</p> 	<p>H</p> 

圖十五、以顯微鏡觀察酵母菌交配



圖十六、酵母菌配型轉換效率檢驗

● 說明

- 圖A、B、C、D及其放大圖為顯微鏡下進行mating的酵母菌，可看到mating中的酵母菌(圖A、圖D放大)會向內吸形成8字的形狀。
- 圖E、F、G、H為酵母菌Mating的示意圖，以酵母菌之間是否打開細胞壁作為mating判斷標準，並且兩者體積相差過大時視為出芽生殖。
- 圖十六為mating type switch 效率統計。圖中，配型變換效率介於max和min之間。MAT α 駢MAT α 的mating 檢驗共300組，其中150組與MAT α mating、另150組與MAT α mating，MAT α 駢MAT α 亦同。共三次各100組的mating檢驗中MAT α 駢MAT a的平均轉換效率為91%，MAT a駢MAT α 為83.7%。
- 由於無法控制酵母菌在接觸galactose 的時間內(6hr)變換了幾次mating type，因此效率準確度會稍有偏差。

(二) 將 a 與 alpha mating type 替換為HIS3或TRP1以檢驗mating type switch效率

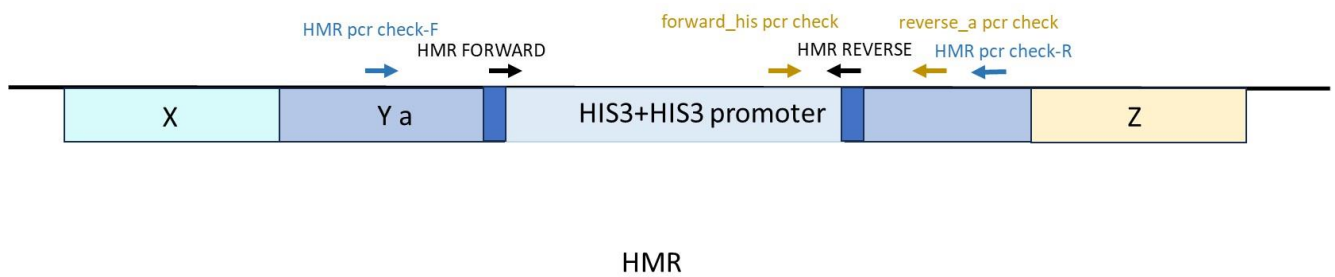
1. 設計引子取得TRP1和TRP1 promoter/HIS3和HIS3 promoter基因片段

(1) 目的:以進行後續的transformation與酵母菌mating type的HR。

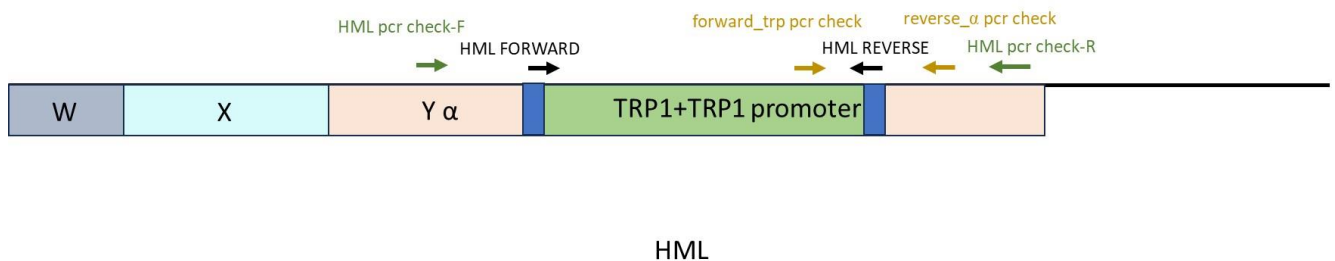
(2) 結果：



圖十七、pRS423 質體和 pRS424 質體



圖十八、HMR 基因圖與Primer 設計

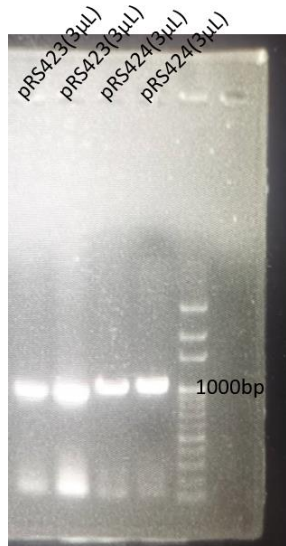


圖十九、HML基因圖與Primer 設計

● 說明

- 利用 snapgene 軟體設計 primer 及 homologous 序列 (圖十八、圖十九) 與 pRS423 和 pRS424 (圖十六) PCR 得到 TRP1 和 TRP1 promoter/HIS3 和 HIS3 promoter 基因片段。HMR FORWARD, HMR REVERSE, HML FORWARD, HML REVERSE (圖中黑色箭頭)

- 另設計兩組primer檢查是否插入染色體。HMR pcr check-F(圖中藍色箭頭), HMR pcr check-R (圖中藍色箭頭), HML pcr check-F(圖中綠色箭頭), HML pcr check-R(圖中綠色箭頭)



圖二十、確認PCR夾出目標序列的電泳圖

圖二十一、gel extraction純化序列

● 說明

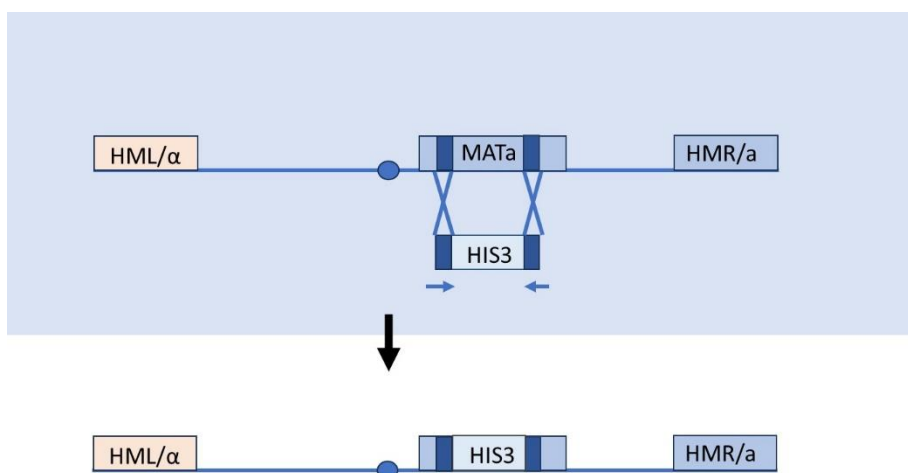
- 圖二十為確認PCR產物是否正確而電泳確認。圖中接近1000bp 的亮帶為從質體取下的片段大小，符合預期。底下的殘留的亮帶則是殘餘的質體和primer。
- 圖二十一為gel extract後的PCR產物，只留下純淨的TRP1和TRP1 promoter/HIS3和HIS3 promoter基因片段。可看到經過gel extraction 的序列只有顯示出接近1000bp的亮帶，並沒有殘留物。

表二、primer總表

HMR-FORWARD	5' CAATACATCTCCTTATATCAAAGAAAATCAAGAAGGACACTAGTACACTCTATATTTTT-3'
HMR-REVERSE	5' GGTACTGAGATTGATGAAATCAATCTCAATACTAATAATCTTTATAATGTATGTTTTTCATT-3'
forward_HIS pcr check	5' -CCACCAAAGGTGTTCTTATG-3'
HMR pcr check-F	5' -GTTGGCCCTAGATAAGAATCC-3'
HMR pcr check-R	5' - GGAAAGTAATTTGACTAAAGTAGAGC- 3'
reverse_a pcr check	5' -CTTTGCTTTCTTCTAAAAACCTGTTC-3'
HML FORWARD	5' GATTTCAATCTCTCCTTTATATATATTTTTTAAGTTCCAACATTCTATTTCTTAGCATTTTT-3'
HML REVERSE	5' CCAAACAAAACCCAGACATCATTAATGTTTTGAAACATAAAACGACATTACTATATATAT-3'
forward_TRP pcr check	5' -CGATGCTGTCTATTAAATGCTTCC-3'
reverse_α pcr check	5' -GAGAGGAAGGAACAGGAATC-3'
HML pcr check-F	5' - GTTGTTACTCTCTGTTAACTTAG -3'
HML pcr check-R	5' - CCTGCTTTCAAATTAAGAACAAAGC -3'

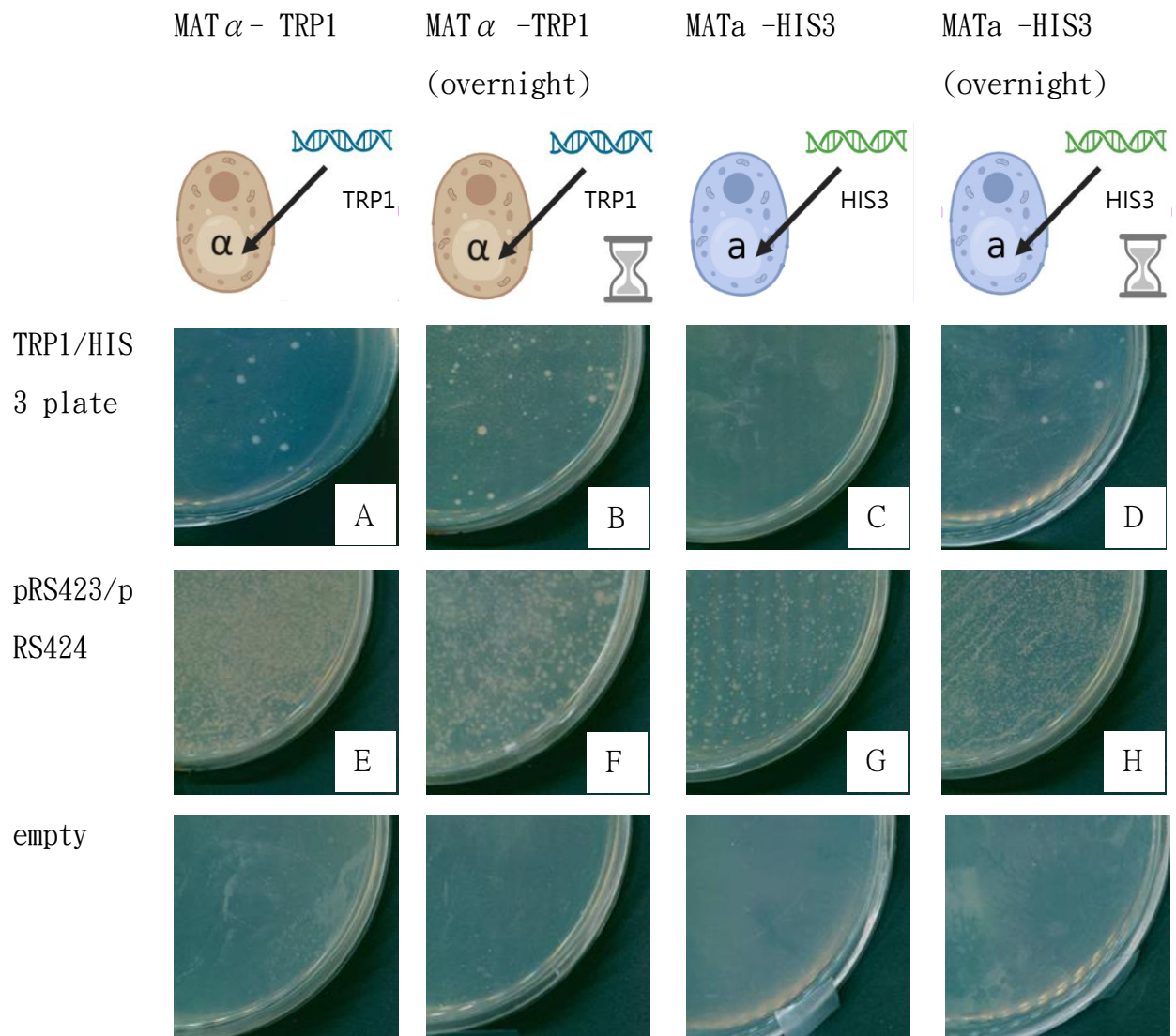
2. TRP1和TRP1 promoter/HIS3和HIS3 promoter基因片段transformation

(1) 目的：將基因片段送入酵母菌中，使其和酵母菌的染色體發生homologous recombination 插入酵母菌第三條染色體。



圖二十二、homologous recombination示意圖

(2) 結果：



圖二十三、酵母菌轉入TRP1/HIS3後生長情形

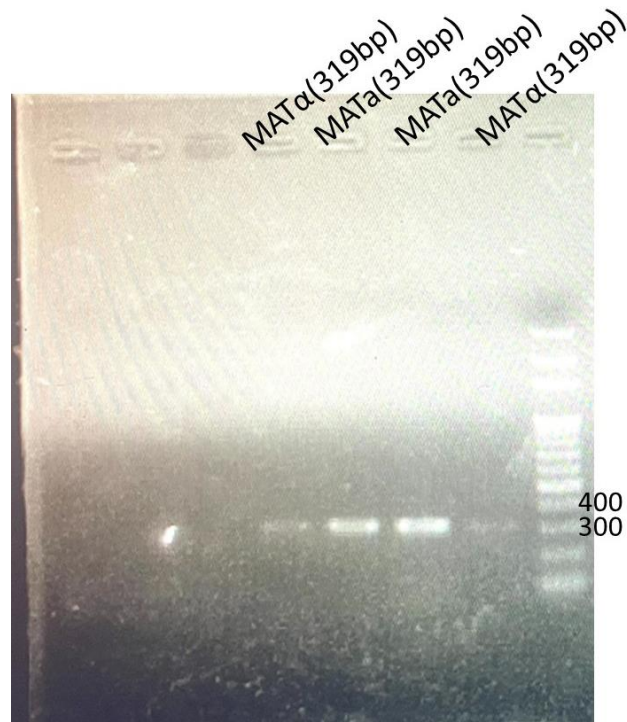
● 說明

- HIS3/TRP1為必需胺基酸，將轉入後的酵母菌塗盤在SCM-HIS3/TRP1 plate上以判斷並得到成功HR的菌落，圖A、B、C、D為目標菌落。
- 由於HR培養時間愈長，效率愈高，因此培養overnight 後圖盤菌落應多於立刻圖盤菌落，圖中可見菌落數H > G。
- 後續以PCR截取酵母菌中TRP1/HIS3 片段確認recombination是否成功。

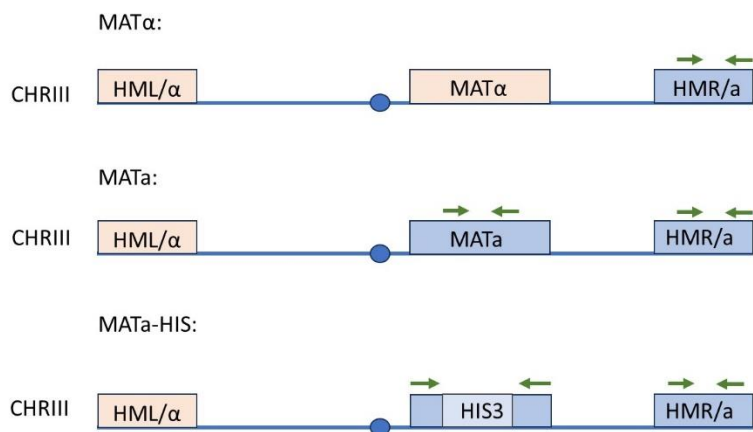
3. PCR check-不表現的mating type序列

(1) 目的：由於酵母菌的第三條染色體具有兩個相同但分別為表現與不表現的mating type序列，因此本實驗想確認PCR時是否會將兩者一起夾取下來，並且以此作為確認recombination是否成功的依據之一。

(2) 結果：



圖二十四、MATa、MAT α 使用25 cycle的PCR check電泳圖



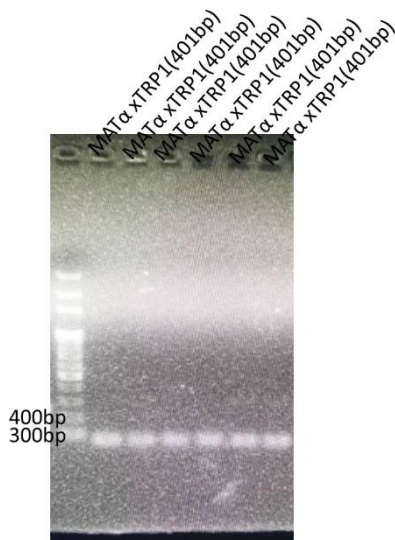
圖二十五、MATa、MAT α 和MATa-gel extraction HIS3 染色體的a基因量理論示意圖

● 說明

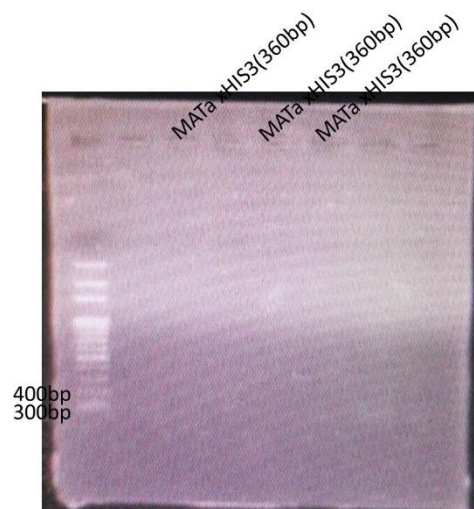
- 本實驗將PCR的cycle數量調整為25以呈現亮度對比，並使用夾取mating type a序列的primer進行PCR，發現MATa的亮度大於MAT α (圖二十三)。
- 圖二十五中，理論上MATa的a基因量設為2x，MAT α 的a基因量則應該是x。而如果recombination成功，截出的序列應該較大，且亮度降低，因此理論亮度為MATa > MAT α = MATa - gel extraction HIS3。以此亮度對比可確認recombination是否成功。

4. PCR check-確認homologous recombination (HR)

- (1) 目的: 確認TRP1、HIS3是否插入第三條染色體。
- (2) 結果:



圖二十六、MATa-HIS3 電泳圖

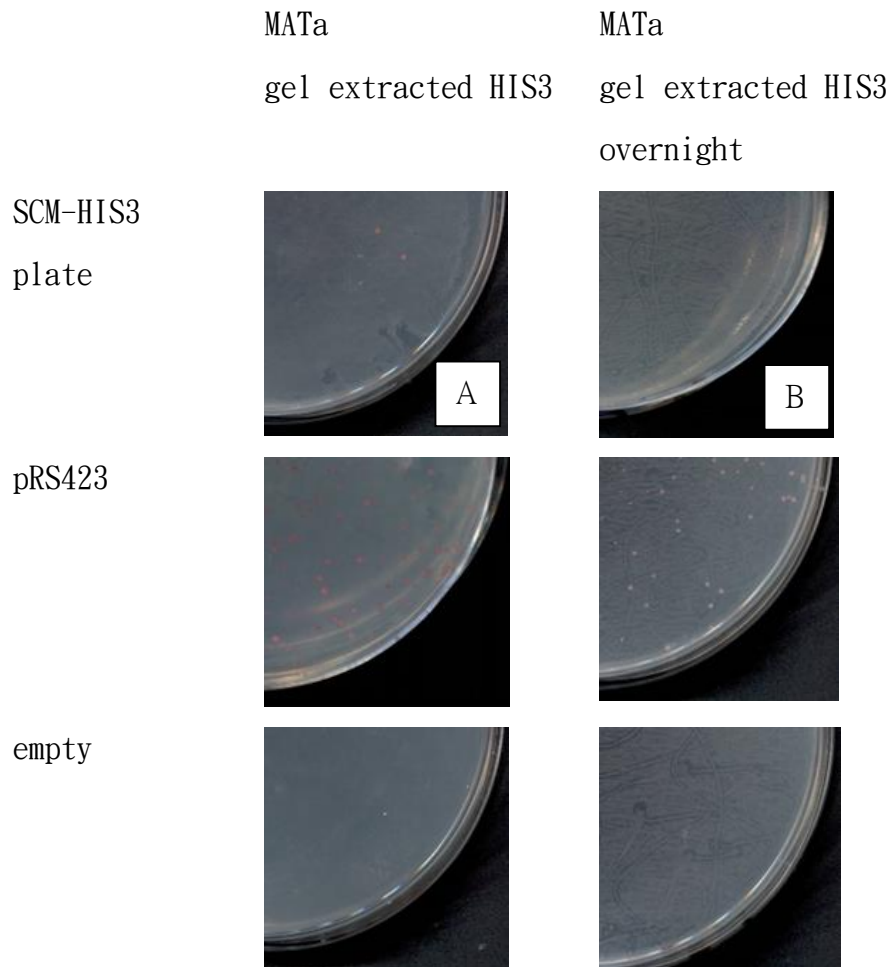


圖二十七、MAT α -TRP1 電泳圖

● 說明

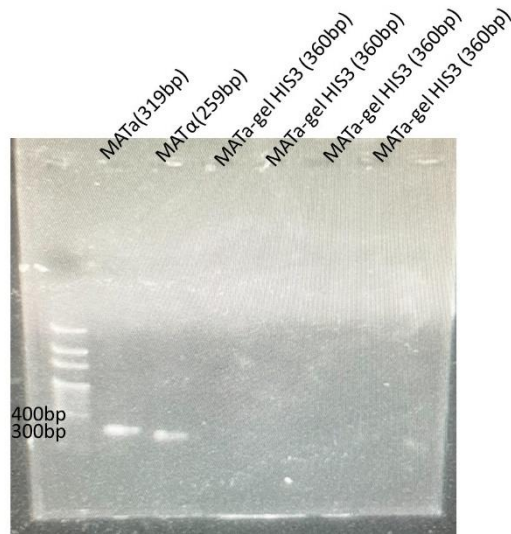
- 由於無positive control對比，實驗結果將與前述亮度對比實驗對照。
- 本實驗以截取酵母菌第三條染色體中轉入的TRP1/HIS3片段的primer與酵母菌PCR。因primer-forward設計在HIS3內、primer-reverse設計在a mating type上，若未轉入成功電泳圖則呈現無亮帶。
- 預期序列大小為TRP1(401bp)、HIS3(360bp)，而結果亮帶小於300bp，未符合TRP1/HIS3核苷酸長度的亮帶。

- 且這些菌落於 selection plate maintain多代以後，並未持續生長，皆逐漸死亡。
 - 推測應為尚未染色體HR，只有plasmid送入。
5. 純化後片段的transformation與PCR check-確認homologous recombination(HR)
- (1) 目的:轉殖純化後的HIS3片段，避免轉入質體。
- (2) 結果:

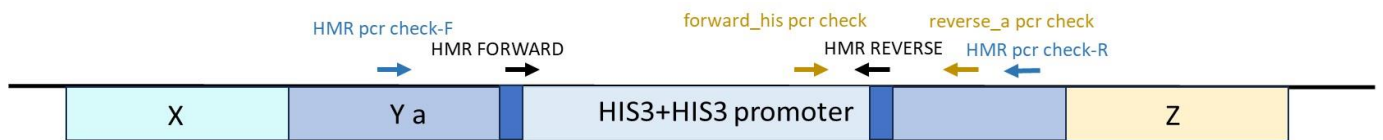


圖二十八、酵母菌轉入gel extraction HIS3後生長情形

- 說明
 - 圖 A、B轉入的基因片段經過gel extraction 純化，避免有質體轉入MATa，可看到圖中所含的菌落數相較未純化前減少許多(圖二十三)。
 - 推測未純化前轉殖後存活的酵母菌內含有質體，而不是同源轉換染色體的目標菌落。
 - 後續將A、B菌落以PCR確認HR是否成功。



圖二十九、MATa - gel extraction HIS3 電泳圖



HMR

圖三十、HMR基因與primer設計

- 說明
 - 採用經過gel extraction的HIS3 基因片段轉入的MATa 與截取HIS3 的primer PCR 。
 - forward_a pcr check, reverse_a pcr check，用來放大a基因作為對照組 (319bp)。(圖中黃色箭頭)
 - forward_his pcr check, reverse_a pcr check，用來卻確認HR是否成功(360bp)。(圖中黃色箭頭)
 - 圖二十七中除了MATa、MATα positive control 以外，其餘4個菌落並未呈現符合HIS3基因片段核苷酸長度(360bp)的亮帶。因缺乏positive control，需要設計新的primer來確認。
 - 預計將設計夾整個HIS3+HIS3 promoter的primer以確認插入HIS3。

肆、結論與應用

一、結論

(一) mating type switch 效率檢測

1. 各300個樣本的mating實驗中MAT α \rightarrow MATa平均轉換率91%(93/100, 92/100, 88/100), MATa \rightarrow MAT α 平均轉換率為83%(86/100, 81/100, 84/100)

(二) Homologous recombination

1. Transformation效率低, 轉入時應增加DNA及培養時間以提高成功colony數。
2. 已進行HIS3 transformation, 以SCM-HIS3 plate篩選獲得colony。

(三) 為確認HR是否成功, 設計primer進行PCR後電泳測試, 預期序列大小為HIS3(360bp)

1. 由於primer-forward設計於HIS3上, primer-reverse設計於protein a1上, 若HR成功則電泳應呈現亮帶且DNA片段大小符合預期。
2. 挑選培養於SCM-HIS3 plate菌落, 若電泳結果呈現不符預期則推測為轉入plasmid, 而plasmid可能逐漸丟失, 由菌落於selection plate maintain多代後逐漸死亡得知。
3. 為避免轉入plasmid, 將DNA經過gel extraction純化以提高HR成功率。
4. 以PCR確認HIS3插入染色體

二、討論

(一) 由於同源重組效率約為 $1/10^6$, 因此目前所得colony很少, 所以應提高轉入酵母菌的DNA量以獲得更多colony candidates。

(二) 為確認染色體兩端不表現基因是否會被實驗中所設計primer夾到, 成功以PCR 25 cycle表現出亮度的差異, 表示即使染色體不活躍仍有可能被放大。

(三) 以PCR確認HIS3是否替換的設計缺少positive control, 因此設計新的可完全包夾HIS3的primer。

(四) 因目前實驗PCR的限制, 亦討論發展其他確認配型變換的方式。

三、未來展望

(一) 以轉殖HIS3基因建立方法, 同樣完成TRP1的改造以重建酵母菌性別轉換。

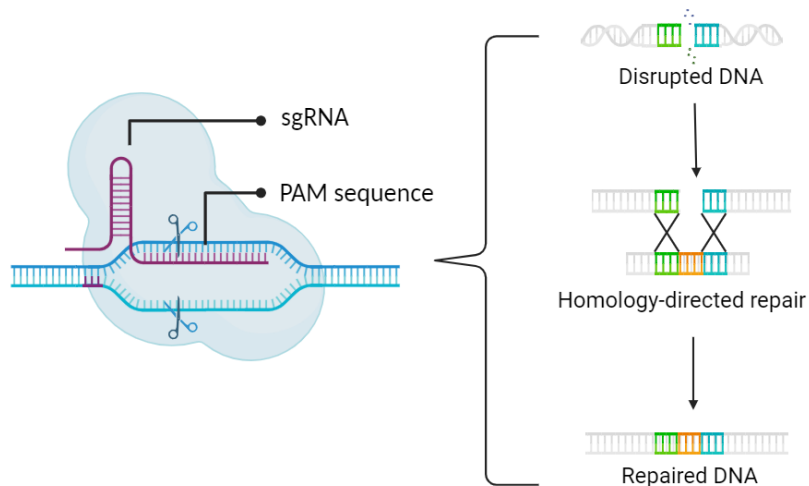
(二) 未來可殖入螢光蛋白(GFP、RFP)以讓配型變換的結果容易觀察。

(三) 最後將把HO轉變成gRNA和Cas9來調控其變換(Tabassum, T. et al., 2023), 以達到二進位運算。同時為了增加二進位運算的位元, 將會讓酵母菌交配以增加單一細胞中的染

色體量(2N)。

四、應用

- (一) 細胞可以透過存活在環境中系統性地將自身或環境的狀態紀錄儲存在DNA中，甚至在完善的規劃中可以運算、判斷特定因素。
- (二) 此技術可用於紀錄導致疾病基因的出現，以達成遺傳性疾​​病基因檢測。(Giovannelli I. et al., 2023)描述了漸凍症相關基因的檢測及治療。
- (三) 同源重組可修復細胞中染色體雙股斷裂(DSB)。未來可利用Mating生物運算偵測斷裂點位與修復的特殊DNA之間的距離 (Lee et al., 2015)。
- (四) 以CRISPR/Cas9技術針對遺傳性漸凍症進行雙股DNA基因修復(Shi Yajun. et al., 2023)，而本研究建立的Mating系統，可改造為CRISPR系統紀錄細胞狀態與修復的應用。



圖三十一、遺傳疾病基因治療

伍、參考資料

1. Astell, C. R., Ahlstrom-Jonasson, L., Smith, M., Tatchell, K., Nasmyth, K. A., & Hall, B. D. (1981). The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 27(1), 15-23.
2. Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., & Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic acids research*, 20(6), 1425.
3. Giovannelli I, Higginbottom A, Kirby J, Azzouz M, Shaw PJ. Prospects for gene replacement therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2023 Jan;19(1):39-52.
4. Klein, H. L., Bačinskaja, G., Che, J., Cheblal, A., Elango, R., Epshtein, A., ... & Malkova, A. (2019). Guidelines for DNA recombination and repair studies: Cellular assays of DNA repair pathways. *Microbial cell*, 6(1), 1.
5. Lee, C. S., Wang, R. W., Chang, H. H., Capurso, D., Segal, M. R., & Haber, J. E. (2016). Chromosome position determines the success of double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(2), E146-E154.
6. Muers M., (2011) Getting Moore from DNA sequencing, *Nat Rev Genet* 12, 586
7. Shi Yajun, Zhao Yan, Lu Likui, Gao Qinqin, Yu Dongyi, Sun Miao, CRISPR/Cas9: implication for modeling and therapy of amyotrophic lateral sclerosis, *Frontiers in Neuroscience*, 2023, 17
8. Tabassum, T.; Pietrogrande, G.; Healy, M.; Wolvetang, E. J. CRISPR-Cas9 Direct Fusions for Improved Genome Editing via Enhanced Homologous Recombination. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 14701.

【評語】 080003

本研究利用合成生物学將酵母菌配型變換的特性改變為一種運算機制。首先，以 HO 內切酶切割不同配型的酵母菌(MAT_a 和 MAT _{α}) 染色體使其進行配型變換，並用顯微鏡檢視是否達成交配和計算效率。其次，利用同源重組將製造必需胺基酸 (TRP1 和 HIS3)的基因替換配型變換中會置換的配型基因(a 和 α)，將酵母菌配型變換改造為二進位生物運算單元。本實驗設計了引子用於 PCR 確認酵母菌第三條染色體中是否準確插入入 TRP1/HIS3 序列。

優點：

目前成功以 HIS3 基因轉殖重建酵母菌的配型。這項研究可能為隨後涉及不同配型變換以及利用 CRISPR 系統進行計算應用的更廣泛研究提供了基礎。

建議：

1. 本研究並未把實驗操作及結果，如何達成二進位運算，作明確的說明，似乎只是前置作業或理論驗證，並不清楚如何將酵母菌配型變換改造為二進位生物運算單元。

2. 本研究未來展望將達到二進位運算，甚至此技術可用於紀錄導致疾病基因的出現，以達成遺傳性疾病基因檢測，但都已有論文顯示其可行性。
3. 未來可提高轉入酵母菌 DNA 的量，以獲得更多 colony candidates。