

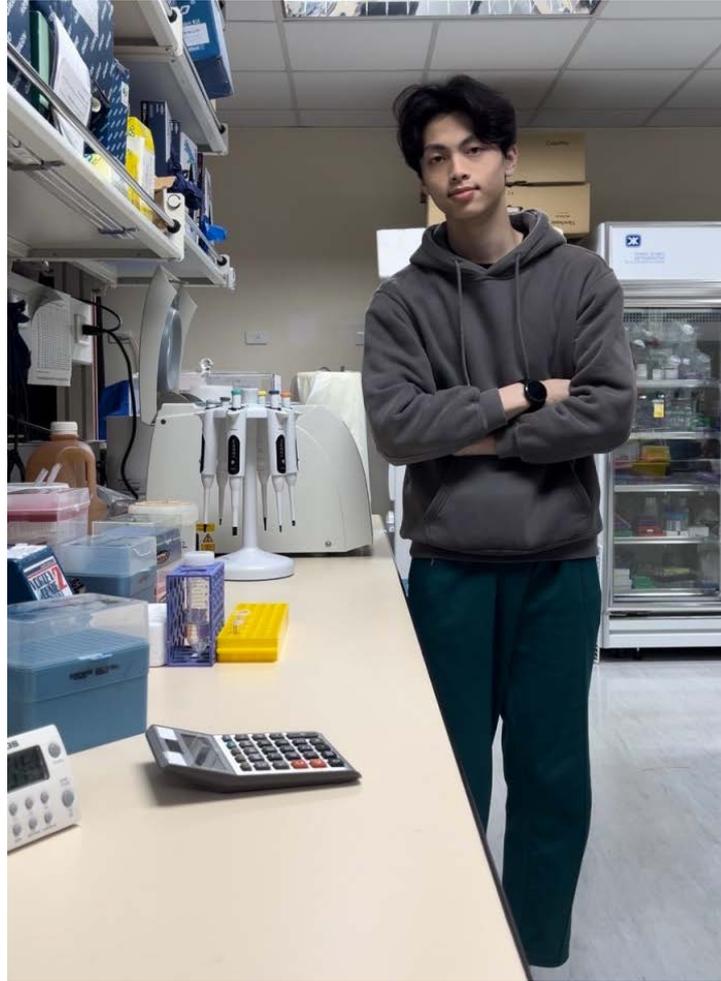
2024年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080004
參展科別 生物化學
作品名稱 以限制酶酵素切位多樣性檢驗臺灣入侵紅火蟻
基因體重組事件

就讀學校 臺北市立永春高級中學
指導教師 王忠信、趙振良
作者姓名 吳品翰

關鍵詞 入侵紅火蟻基因體、PCR 聚合酶連鎖反應、RFLP限制酶切位多樣性

作者簡介



教授、老師同學們好，我是吳品翰，目前就讀臺北市立永春高中二年級數理資優班。特別感謝教授們給此機會，使我有幸參加本屆 2024 國際科學展覽。在高一尚懵懂的我，因緣際會下進入資優班，看到歷屆畢業學長姊的分享，在自己領域發光發熱，因此下定決心希望能與他們比肩。

因好奇心的驅使，觀察昆蟲的興趣自幼萌發，每一次與昆蟲的邂逅，格外興奮，尤其是螞蟻，不禁好奇它們的生物習性、它們奇特的行為。而投入生物專題已一年多，起初研究螞蟻行為科學研究，不少次遇到實驗設計的障礙。於去年六

月，感謝班導、指導老師們的協助與鼓勵，有幸進入中央研究院—生物多樣性研究中心實驗室，轉身投入分子生物專題研究，起初適應地相當困難，涉及到專業知識多、實驗樣本數量也多，每一分神，都可能需要重來。在經不懈努力後對實驗設計與操作的技巧都已有長足的進步。

專題對我而言，是成就自我、是改錯與進步、更是無限知識的泉源。期許未來在喜愛的學科領域更上一層樓，深耕研究！

摘要

入侵紅火蟻(*Solenopsis invicta*，以下簡稱紅火蟻)起源於南美洲巴拉那河流域，其對於農業、畜牧業、甚至對人的健康都具有高度危險性及破壞性。由於國際貿易地興起，紅火蟻目前已於包含台灣在內多個國家中被發現並在當地造成危害。為了對抗紅火蟻造成的影響，瞭解紅火蟻的基因將是個有效的方向。故希望從決定紅火蟻的性別決定基因之候選位置中探索其重組率以更精準地定位性別決定基因的所在位置。本篇研究選用紅火蟻其中兩條等位基因序列，分別標記為 H04、H07。對於紅火蟻來說，正常情況下單套個體將發育成雄蟻、雙套且為異型合子的個體將發育成為雌蟻(職蟻或處女蟻后)，然而同型合子個體則會發育為不孕的雙套體雄蟻。本實驗利用限制酶酵素切位多樣性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)技術，使用 MEGA 軟體將 H04、H07 序列之同源序列做排序後，使用 Ape 軟體找出其候選酵素切位並篩選出於不同等位基因序列上具有多樣性之切位後，利用聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)、酵素酶切割及電泳凝膠技術，找出理應為異型合子之雌蟻中只具有 H04 或 H07 序列其中一個訊號之個體，即代表該區域曾發生過基因體重組事件而應被排除出性別決定基因的候選位置。我們成功確認 H07、H04 的 90 個樣本中，同型合子共有 12 個、異型合子共有 78 個，並且雄蟻皆只偵測到一個訊號，符合預設。未來繼續縮短範圍，直至找尋到決定紅火蟻重要基因序列。

Abstract

The imported fire ant (*Solenopsis invicta*, hereafter referred to as the fire ant) originated in the Parana River Basin in South America. It poses significant threats to agriculture, livestock, and even human health. With the rise of international trade, fire ants have been detected in several countries, including Taiwan, causing local damage. To address the effects of fire ants, understanding the genetics of these ants can be an effective approach. So we aim to explore the recombination rate of candidate regions for the sex determination gene in fire ants and to narrow down the candidates. Normally, hemizygotes develop into male ants, while heterozygotes give rise to female ants (either workers or virgin queens). However, homozygous individuals produce sterile diploid males. In this study, we selected two haplotype sequences from fire ants, labeled H04 and H07. Using Polymerase Chain Reaction (PCR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), and gel electrophoresis, we aim to identify individuals among the anticipated heterozygous female ants that display only one signal for either the H04 or H07 sequences. This would indicate that genetic recombination event occurred in that region, ruling it out as a potential site for the sex determination gene. Out of the 90 samples comprising H07 and H04, we successfully confirmed 12 homozygotes and 78 heterozygotes. Based on the current results, only one signal was observed in the male ants, while all female ants displayed two distinct signals, as anticipated. Moving forward, we will continue to refine the range until we pinpoint the critical gene sequence determining the gender of fire ants.

壹、前言

一、研究動機

入侵紅火蟻肆虐議題頻頻出現，農民因農作物遭紅火蟻侵蝕且受擾於其叮咬本身造成農業損失；抑或其極強的攻擊性造成當地的生態損失；或者會咬食電器、電線造成經濟損失；且其對人類亦有高度危險性，被其叮咬之後傷口將經歷腫脹與灼燒感，甚至可能因此過敏性休克。因此對於防治紅火蟻的研究勢在必行，從最基本基因研究開始。由於影響其群落生存能力的職蟻均為雌性，故深入了解何基因決定紅火蟻的性別將是可能的防治方向。

二、研究目的

- (一) 判斷 12 隻雄蟻與 78 隻雌蟻為異型合子或為同型合子
- (二) 根據決定紅火蟻性別之基因序列所在位置不應發生基因體重組事件雙性質，將候選範圍不斷縮小

三、文獻探討

- (一) 一些生物如蜜蜂、螞蟻及胡蜂是用染色體套數決定性別，雄性來自未受精的單倍體卵，而雌性則來自二倍體的受精卵。其中，若在性別決定基因座為異型合子則此個體將會發育為雌性，然若此個體並未受精而保持單套基因體，或者於此基因座為同型合子則將會發育為雄性，此機制被稱為互補性別決定機制。
- (二) 蜜蜂是目前我們對此機制了解最多的例子，於 *transformer* 基因同源基因的 *csd* 基因則為其性別決定基因座。當於此位點為半型合子時則發育成雄性，

而雌性則為異型合子；當基因座為同型合子時，就會產生不孕的二倍體雄性。

- (三) 長腳捷蟻(*Anoplolepis gracilipes*)另一個例子，他們的雄性由兩不同趨異演化的 R 及 W 的單倍體細胞組成的嵌合體，很有可能源於配子細胞核並未完全融合而仍保持半型合子的狀態。雄蟲體細胞體 R 細胞的比例較高，而精子中則 W 細胞比例較高。在雌性的情況，如果卵細胞被 R 精子受精，則雙倍體後代發展成女王，而如果被 W 精子受精，則發展成職蟻。

貳、研究方法與過程

一、實驗材料

- (一) PCR (Polymerase chain reaction 聚合酶連鎖反應)：

1. 紅火蟻的 DNA 樣本
2. 引子對(Primer pair)
3. PCR 試劑 Master Mix (2X)
4. 脫氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)
5. 二次過濾水(ddH₂O)
6. PCR 機器(Applied Biosystems Veriti 96- Well PCR Thermal Cycler)
7. 電泳凝膠槽(Midi Plus-1 Horizontal Electrophoresis SystemAgrose)
8. TAE 緩衝液(TAE Buffer)

- (二) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism 限制酶酵素切位多樣性)：

1. 緩衝液(#B7004S) 4_Buffer(10X)
2. 限制酶酵素 DraI
3. 二次過濾水(ddH₂O)
4. 瓊膠(Agrose)
5. TAE 緩衝液(TAE Buffer)

6. PCR 機器(Applied Biosystems Veriti 96- Well PCR Thermal Cyclers)
7. 電泳凝膠槽(Midi Plus-1 Horizontal Electrophoresis SystemAgrose)

二、實驗流程

目前已知臺灣紅火蟻共有 10 個基因座之基因型，本實驗取其中兩個，分別為 H04 以及 H07 的基因型序列進行實驗。且決定紅火蟻性別重要的基因序列位於雌蟻中應為為異型合子(兩個等位基因都可被偵測到)，而雄蟻則為同型或半型合子(只能偵測到其中一個等位基因)。

實驗流程如下：

- (一) 準備 H04 以及 H07 序列檔案
- (二) 使用 MEGA 程式進行排列，其中 H04 共有 71736 個鹼基對；H07 共有 72609 個鹼基對
- (三) 使用 APE 程式尋找酵素切位
- (四) 確認哪些候選切位在 H04 以及 H07 序列中會切出不同的結果，若一邊可切一邊不可切，則可利用該切位進行偵測
- (五) PCR 過程：

將 90 個樣本以及 2 個正控制與 1 個負控制組，共計 93 個樣本進行 PCR 並跑膠確認結果。正控制(一定能跑出 PCR 產物)、負控制(H₂O，必定無法跑出 PCR 產物)主要功能為檢驗該次 PCR 之樣本是否有被污染亦或者是該 PCR 機器本身無法正確運作等相關變因。若有正、負控制任一不符預期結果則重複上述步驟。

在 PCR 的過程中，使用紅火蟻的 DNA 樣本、引子對、PCR 試劑、脫氧核糖核苷三磷酸以及二次過濾水，放置於 PCR 機器中。設定條件為 95 度

3 分鐘使 DNA 預變性，之後重複 35 次 95 度 15 秒 DNA 變性、60 度 15 秒引子黏合，72 度 30 秒引子延長，最後 72 度 3 分鐘以完成所有未完成的引子延長步驟。

而後酵素酶切過程，使用紅火蟻的 DNA 樣本經 PCR 增幅後使用緩衝液(#B7004S) 4_Buffer(10X)、二次過濾水、以及限制酶酵素 DraI 放入 PCR 機器。設定時間為 37 度並放置隔夜。

最後根據切割後的膠圖與切割前的膠圖比對，理應切出來的長度相加為 PCR 時的長度，並且以此判斷各個樣本為同型合子或為異型合子。本研究使用含有 SyberSafe、2%的洋菜膠來確認反應後的結果。

- (六) 利用 PCR 跑膠結果以及酵素酶切跑膠結果判斷 12 個雄蟻、78 個職蟻樣本為同型或異型合子。

參、 研究分析與結果

一、 檢測火蟻酵素切位是否符合雄蟲為單個訊號而雌蟲為兩個訊號

(一) PCR：

本次實驗使用了 m13~m24 共 12 個雄蟲樣本、w1~w24、w46~75、w77~w100 共 78 個雌蟲樣本，進行 PCR 後使用 DraI 酵素酶切並跑膠確認結果。使用前次實驗已知結果的 w40 及 w41 作為正控制組以及 H₂O 作為負控制組，以檢驗是否有機器故障、人為汙染等變因。所有的樣本經 PCR 技術增幅後可以看見都於 400bp 位置有一處亮帶，如圖(2)，代表 PCR 產物均有跑出正確長度，可進行下一部利用 DraI 酵素進行切割。

(二) 酵素 DraI 進行切割：

將全部樣本經過第一次 PCR 並進行酵素酶切後，建立在 PC、NC 都有符合預期結果之上，其酵素酶切前之 DNA 長度應共為 402bp，實驗結果如圖(3)。實驗結果發現 w11、w46、w72、w84、w92 在酵素酶切割後並無跑出 DNA 產物，故需將上述所提到之樣本重新進行 PCR 以及酵素酶切割，如圖(4)。

在酵素酶切並跑膠確認結果之後，上述 5 個樣本皆成功跑出正確長度，加上前 85 個以成功樣本，意謂著全部 90 個樣本在 PCR、酵素酶切後皆有成功跑出長度。即可藉由 PCR、酵素酶切前後結果判斷該樣本為同型合子或為異型合子。為了方便比對同、異型合子，需取其中數個 DNA 量多、PCR、酵素酶切後結果較為明顯的樣本，重新進行 PCR、酵素酶切，讓其皆於同一膠圖上，則該圖即為標準，以此標準來判斷其他樣本為同或異型合子。

經篩選，選擇 m13、w14、w15、w51、w90、PC：m12、m14、w103、NC：H₂O，進行 PCR、酵素酶切步驟，結果如圖(5)

根據圖(5)結果，m13、w14、w15、w51、w90、m12、m14、w103 及 H₂O 可視為標準組，進行 H04、H07 各樣本的同、異型合子分類。分類方法為：若酵素酶切後共有兩個亮帶，代指一條 DNA 可被切，而另一條則無法被切，則此 sample 則為異型合子；反之，若酵素酶切後只有一條亮帶，則代表此兩條 DNA 均可被切或者均不能被切。

(三) 統整結果如下：

同型合子：

m13~m24，共 12 個樣本

異型合子：

w1~w24、w46~w75、w77~w100，共 78 個樣本

肆、研究結論與討論

一、研究結論

根據所有測試的結果，樣本 m1~m24 都只偵測到一個訊號，故應為同型合子（雙倍體的情況）或半型合子（單倍體的情況），由於樣本 m13~m24 為單倍體雄蟲，因此都只得到一個訊號，符合預期。樣本 w1~w24、w46~75、w77~w100 為雙倍體雌性的情況，都得到兩個訊號，亦符合預期。

二、討論

此次實驗中，包含利用 APE 尋找 H04、H07 兩基因座之酵素切位，並實際將 90 個雌蟲樣本進行 PCR、跑膠確認及 DraI 酵素酶切、跑膠確認，以前後跑膠結果比對判斷 90 個樣本各為同型或異型合子。

目前實驗結果得到 m13~m24，共 12 個雌蟻樣本中均為同型合子，以及 w1~w24、w46~w75、w77~w100，共 78 個職蟻樣本中均為異型合子。符合我們預期假設，但未有職蟻卻為同型合子之基因重組事件。代表於此處基因體重組事件並不是一個簡單能觀察到之情況。在未來，需要測試更多樣本以增加此證據的強度。

在此實驗中，由於初步接觸到分子生物之實驗，在研究設備的操作上難免失誤，如微量吸量管的操作、跑膠的時間等等都可能導致結果誤差大，亦或是難以判斷，這也造成了結果可能並不完美而需要重複確認等。例如上述 H04、H07 的 90 個樣本無論 PCR、酵素酶切跑膠後的圖，我認為皆有重複確認的必要。

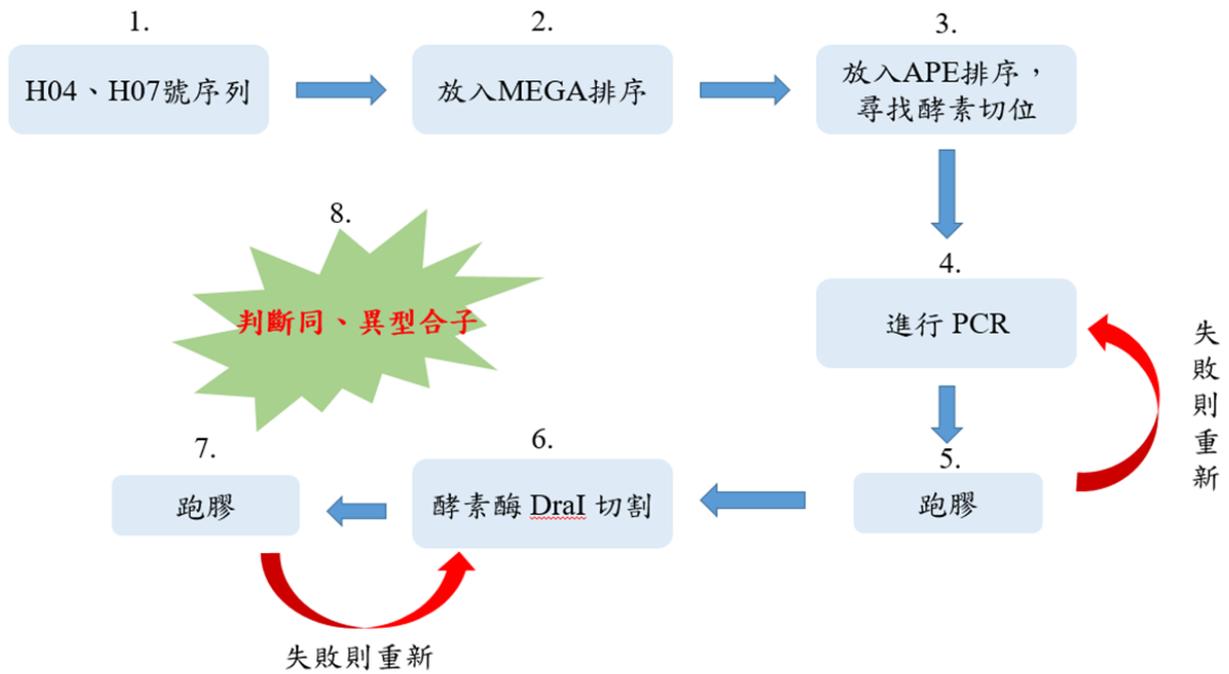
而此實驗尚未結束，對於決定紅火蟻性別之基因序列位確切於何基因座上，尚未可知，最終目的希望能藉由此實驗了解以前紅火蟻基因重組的事件，以確認

或接近絕對無法容許被重組的序列位置，以此幫助了解決定紅火蟻性別基因為何。

伍、參考文獻

- [1] H. DARRAS , C. BERNEY, S. HASIN , J. DRESCHER , H. FELDHAAR , L. KELLER (2023/04/06). Obligate chimerism in male yellow crazy ants. Retrieved from <https://reurl.cc/17pzLQ>.
- [2] Martin Beye , Martin Hasselmann , M.Kim Fondrk , Robert E Page Jr. , Stig W Omholt (2003/08/22). The Gene *csd* Is the Primary Signal for Sexual Development in the Honeybee and Encodes an SR-Type Protein. Retrieved from <https://reurl.cc/E1mV8y>.
- [3] YUAN ZOU , ELZEMIEK GEUVERINK , LEO W. BEUKEBOOM , EVELINE C. VERHULST X , LOUIS VAN DE ZANDE (2020/11/27). A chimeric gene paternally instructs female sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia*. Retrieved from <https://reurl.cc/1G8KQW>.

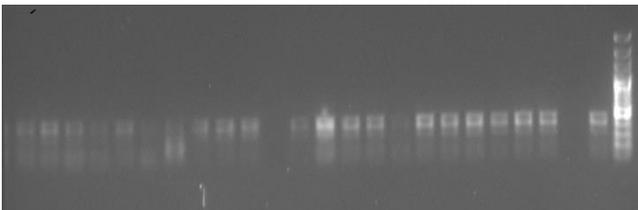
陸、圖表



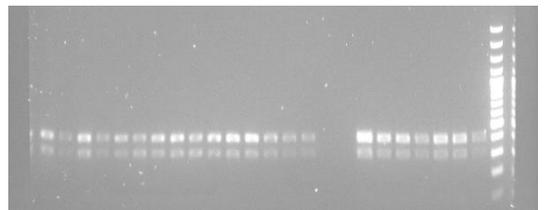
圖(1)實驗流程架構圖

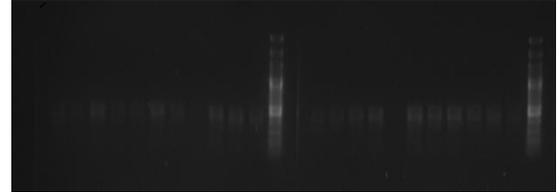
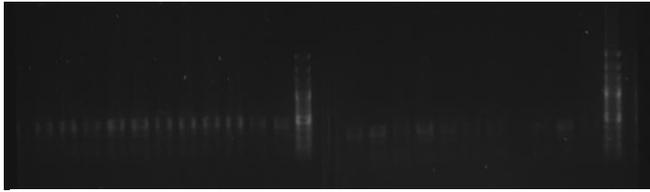
本實驗先透過軟體方式將 H04、H07 兩同源基因序列放入 MEGA 排序對照、後放置 APE 中尋找酵素切位。將 12 個雄蟻樣本及 78 個職蟻樣本進行 PCR、跑膠確認以及酵素酶切、跑膠確認若其中無跑出正確長度則重新該步驟。最後將 PCR、酵素酶切結果相比對判斷該樣本為同型或異型合子。





11





w77 w78 w79 w80 w81 w82 w83 w84



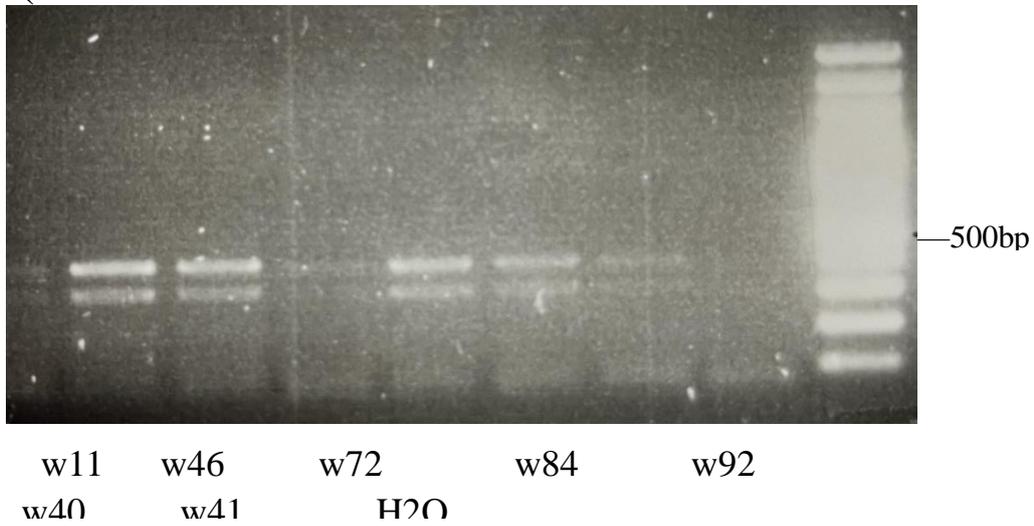
圖(3) 酵素酶切實驗結果：

本實驗將 PCR 後的樣本利用 *DraI* 酵素進行切割得到以上序列，可以判斷其屬於 H04 或 H07。此 PCR 產物相加應為 402bp。(A) m13~m23、w1~w12 之酵素酶切結果 (X 代表無內容物只是空一行以更好地展示)。(B) w13~w24、w46~w53、PC、NC 之酵素酶切結果。(C) w54~w75 之酵素酶切結果。(D) w77~w98 之酵素酶切結果。(E) w99、w100 之酵素酶切結果。



—500bp

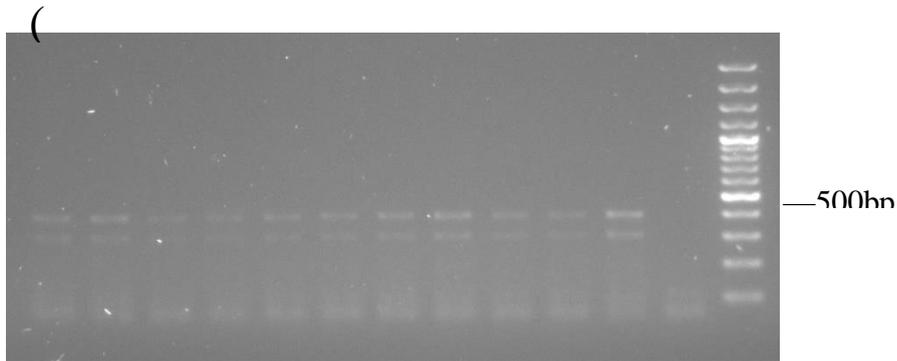
(B)



圖(4) 以 PCR、酵素酶切重新確認結果：

因第一次 PCR、酵素酶切 w11、w46、w72、w84、w92 並無跑出正確長度，故重複步驟以確認。(A) w11、w46、w72、w84、w92、PC、NC 之 PCR 結果。(B) w11、w46、w72、w84、w92、PC、NC 之酵素酶切結果





圖(5) 初步結果之職蟻屬同型合子之樣本重複確認：

因初次 PCR、酵素酶切 之結果，認為職蟻並為同型合子機率不高，故重複流程以二次確認。(A) w54~w56、w65、w73、w77~w81、PC、NC 的 PCR 結果。(B) w54~w56、w65、w73、w77~w81、PC、NC 的酵素酶切結果

【評語】 080004

本研究希望從決定紅火蟻的性別決定基因之候選位置中探索其重組率，以更精準地定位性別決定基因的所在位置。研究選用紅火蟻其中兩條等位基因序列，分別標記為 H04、H07，使用 MEGA 軟體將 H04、H07 序列之同源序列做排序後，使用 Ape 軟體找出其候選酵素切位並篩選出於不同等位基因序列上具有多樣性之切位後，利用聚合酶鏈鎖反應、酵素酶切割及電泳凝膠技術，找出理應為異型合子之雌蟻中只具有 H04 或 H07 序列其中一個訊號之個體，即代表該區域曾發生過基因體重組事件而應被排除出性別決定基因的候選位置。

優點：

作者成功確認 H07、H04 的 90 個樣本中，同型合子共有 12 個、異型合子共有 78 個，並且雄蟻皆只偵測到一個訊號，符合預設。未來繼續縮短範圍，直至找尋到決定紅火蟻重要基因序列。

建議：

1. 決定紅火蟻性別重要的基因序列位於雌蟻中應為為異型合子（兩個等位基因都可被偵測到），而雄蟻則為同型或半型合子

(只能偵測到其中一個等位基因)。這樣只能說二個基因座和紅火蟻性別決定有關，如何用這知識來防治紅火蟻？

2. 應說明如何鎖定 H04、H07 二個基因座和紅火蟻性別決定之關係。