

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	050007
參展科別	動物學
作品名稱	探討在秀麗隱桿線蟲中 IFE-1 經由 sRNA 路徑對於 精子生成機制的影響
得獎獎項	三等獎 突尼西亞國際工程與科技節 I-FEST2

就讀學校	臺北市立第一女子高級中學
指導教師	李宏孝 蔡欣祐
作者姓名	陳品安 吳念穎

關鍵詞	<u>IFE-1、sRNA、精子</u>
-----	----------------------

作者簡介



我們是北一女中數理資優班的吳念穎（左）、陳品安（右）。目前在台大醫學院分子醫學所研究線蟲及學習相關基因調控和實驗技術。很幸運能加入實驗室進行生物研究，謝謝蔡欣祐教授，謝謝念祖學長、佳祐學長和所有實驗室學長姊，也非常謝謝李宏孝老師，以及所有支持我們的朋友與家人，讓我們能進入國際科展，往喜歡的路上前進！

研究報告封面

2025 年臺灣國際科學展覽會 研究報告

區別：臺北市

科別：動物學科

作品名稱：探討在秀麗隱桿線蟲中 IFE-1 經由 sRNA 路徑
對於精子生成機制的影響

關鍵詞：IFE-1、sRNA、精子（最多三個）

編號：

（編號由國立臺灣科學教育館統一填列）

摘要

sRNA 在各種物種的精子功能中起著至關重要的作用。在秀麗隱桿線中，當缺少精子相關的 sRNA「ALG-3/4 26G sRNA」會導致其在 25 度時不孕。此外，IFE-1 是人類真核轉譯起始因子 EIF4E 的直系同源基因，主要表達於雄性生殖細胞系統中。在先前研究中我們觀察到當「真核轉譯起始因子 IFE-1 有缺陷」或「精子缺少相關 sRNA」時，亦會導致精子具有缺陷。由於三者的相似性，我們認為 IFE-1 和 26G sRNA 的生成路徑有關。因此我們假設 IFE-1 參與協助酵素 NYN-3 辨認並切割 *msd-1* mRNA 模板後促進 26G sRNA 生成。我們使用 Western Blot、IP、螢光顯微鏡等方法，探討了 IFE-1 和 MSD-1::GFP 的關係，發現在 *ife-1* 正常的情況下，高溫對於 MSD-1::GFP 的表現量沒有影響。並且因該蛋白只表現在公蟲精子，我們可以推論 *msd-1:gfp* 只作用於公蟲精子。而此疑似可正向調控基因表現的 26G sRNA，有望發展成有別於過往 sRNA 藥物抑制基因表現的一種新基因治療方法。

Abstract

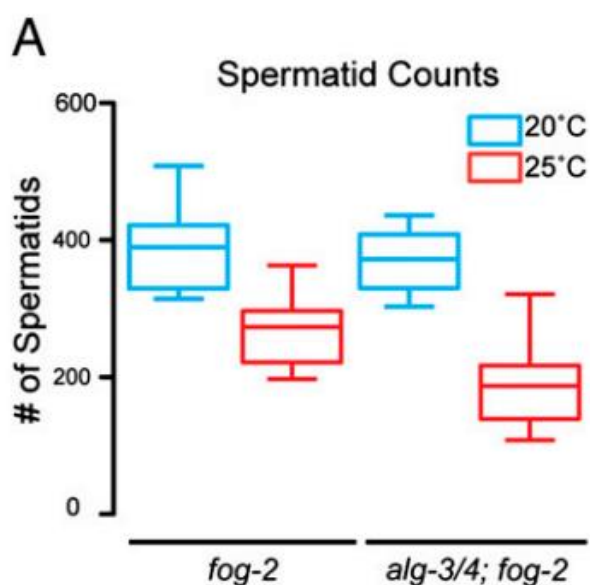
sRNA plays a crucial role in sperm function across various species. In *Caenorhabditis elegans*, the absence of the sperm-related sRNA ,alg-3/4 26G sRNA, results in infertility at 25°C. Additionally, IFE-1, a homologue of the human eukaryotic translation initiation factor EIF4E, is primarily expressed in the male germline. Previous studies show that ‘defects in IFE-1’ or ‘the lack of sperm-related sRNA’ both lead to defective spermatids. Given the similarity in their effects, we hypothesize that IFE-1 is involved in the pathway of 26G sRNA generation. Specifically, we propose that IFE-1 assists the enzyme NYN-3 in recognizing the *msd-1* template and cleaving its mRNA to promote 26G sRNA production. Our research explores the relationship between IFE-1 and MSD-1::GFP, revealing that under normal IFE-1 conditions, high temperatures do not affect MSD-1::GFP expression. Besides, since GFP is only expressed in male sperm, we infer that *msd-1::gfp* functions only in male sperm. The potentially positive regulation of MSD-1::GFP expression by 26G sRNA offers a new therapeutic method distinct from traditional sRNA-based genetic treatment.

壹、研究動機

一、研究背景

sRNA 在調控線蟲精子生成的過程中扮演著重要的角色。sRNA 泛指長度小於 200 個核苷酸的 RNA 分子，在真核生物中其常透過 RNA 干擾的方式，促進或抑制其他基因 mRNA 的表現。大部分 20-30nt 的 sRNA 都會和 argonaute 蛋白結合（如本實驗的 ALG-3/4），sRNA 一方面受 argonaute 保護，同時也一起對目標基因作用。

在先前的研究中，已知若缺少 26G sRNA 將使線蟲精子生成時無偽足，影響其爬行能力。在高溫時（25°C）缺少保護 26G sRNA 的受 ALG-3/4 (Conine, C. C., 2010) 亦將使精子具有缺陷且數量減少，因而導致不孕，如圖一。

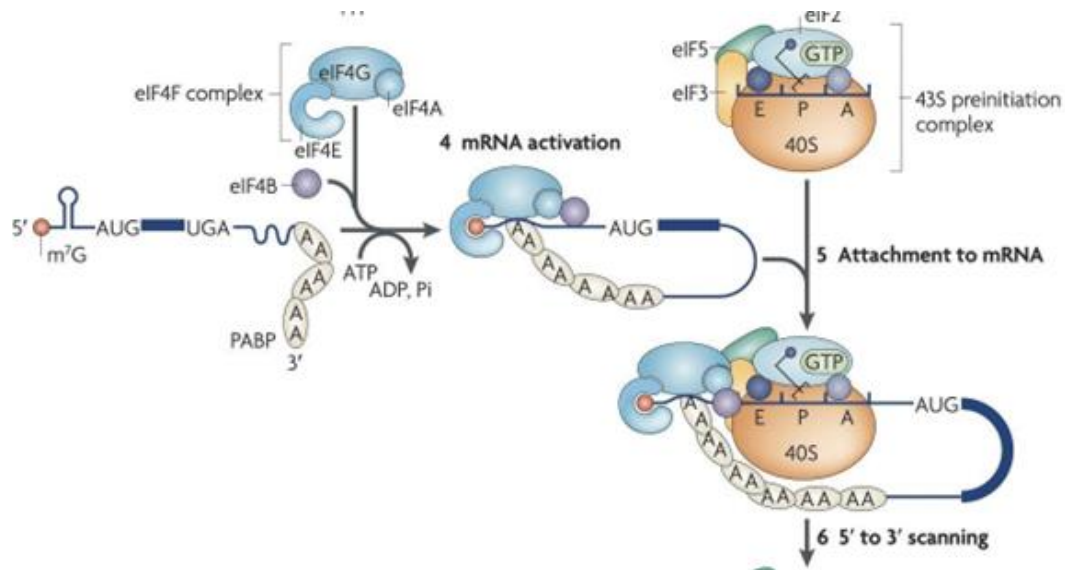


圖一、缺少 ALG-3/4 的公秀麗隱桿線蟲在高溫（25 度）下會造成精子數量減少。

（圖片來源：Conine, C (2010, February 23). *Argonautes ALG-3 and ALG-4 Are*

Required for Spermatogenesis-Specific 26G-RNAs and Thermotolerant Sperm in Caenorhabditis Elegans.)

另一方面，*ife-1* 位於線蟲的第三對染色體，是秀丽隱桿線蟲中 eIF4E 的同源基因之一，也是人類真核轉譯起始因子 eIF4E 的直系同源基因，eIF4E 屬於真核轉譯起始中 eIF4F 複合物 (eIF4E+eIF4A+eIF4G)。eIF4F 複合物中，eIF4G 可與 PABP (poly A binding protein) 結合，辨識 3' poly A tail，使 RNA 形成環狀。eIF4E 可辨識 5'端結構中的 7-甲基鳥苷，並將 eIF4A 帶到 mRNA 的 5'端，讓 eIF4A 發揮解旋酶活性來打開 mRNA 的 5'端的二級結構，同時阻止核糖體大次單元的結合。接著核糖體小次單元接上並形成 43S 複合物，沿著 RNA 模板掃描到起始密碼子 AUG 後，核糖體大次單元接上，轉譯即開始，如圖二。



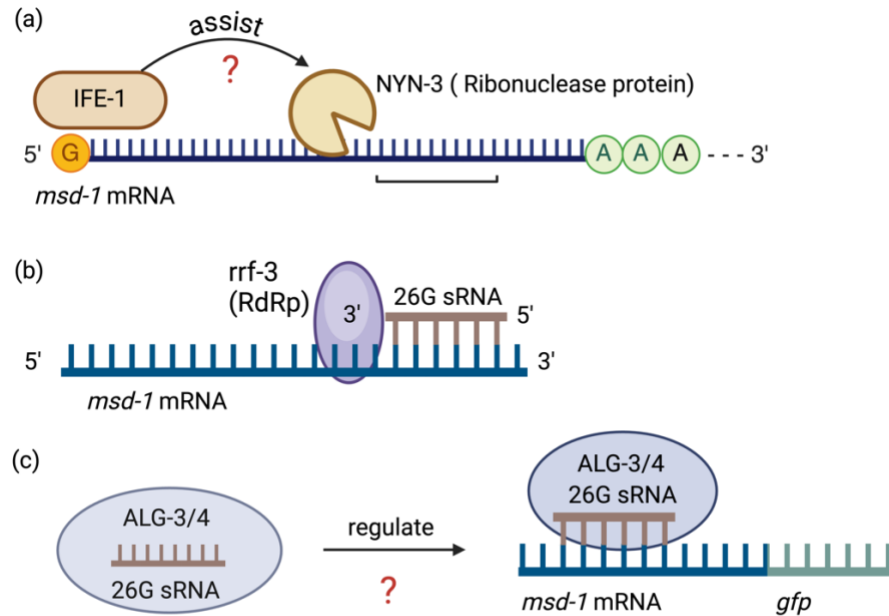
圖二、轉譯起始示意圖 (圖片來源：維基百科 轉譯作用)

而 IFE-1 主要表達於雄性生殖腺的近端區域，特別使減數分裂順利進行 (Anahita amiri, Brett d. keiper, & Ichiro kawasak.,2008)。若真核轉譯起始因子 *ife-1* 在第一外顯子有缺陷，也會造成精子形成後具有缺陷 (Henderson, M. A.,2009)。

而先前從文獻中已知 NYN-3 為一種核糖核酸酶, 可針對目標基因的 mRNA 進行裁切, 進而使 RNA 複製酶(*rrf-3*)以裁切後的 mRNA 為模板做出 26G sRNA, 接著 26G sRNA 會與 ALG-3/4 結合並受其保護, 同時 ALG-3/4 也可協助 26G sRNA 一起對目標基因作用 (Tsai, H., Cheng, H., & Tsai, Y., 2022)。

綜上所述, 缺少 26G sRNA 影響精子爬行能力, 高溫時缺少受 ALG-3/4 保護的 26G sRNA (Conine, C. C., 2010), 或在真核轉譯起始因子 *ife-1* 有缺陷 (Henderson, M. a., 2009), 皆將使精子具有缺陷導致不孕。由於三種的情況相似, 我們想了解其中的關聯, 且 IFE-1 主要表達於雄性生殖腺的近端區域, 因此我們假設 IFE-1 有參與在協助酵素 NYN-3 切割 *msd-1* mRNA 進而促進 26G sRNA 生成的路徑中, 如圖三。

總結以上, 在先前的文獻中, 我們得知若 *ife-1* 在第一外顯子有缺陷將導致不孕, 所以先透過以 *msd-1:gfp* 作為報導基因, 驗證 *ife-1(tm4249)* 在第二及第三外顯子有缺陷的情況下, 對精子綠色螢光蛋白表現量的影響, 再透過免疫沉澱確認 IFE-1 是否有參與協助 NYN-3 切割 *msd-1* mRNA 進而促進 ALG-3/4 26G sRNA 的生成, 影響精子生成的途徑。



圖三、IFE-1 參與在 NYN-3 切割 *msd-1* mRNA 進而促進受 ALG-3/4 保護的 26G sRNA 之可能作用機制圖。NYN-3 切割 *msd-1* mRNA (如圖(a)) 後，使 rrf-3 以該段被切割的 mRNA 序列互補生成 26G sRNA (如圖(b))。(圖片來源：作者繪製)

二、研究動機

綜合眾多文獻，且已知 sRNA 在各種物種的精子功能中起著至關重要的作用，而在秀麗隱桿線蟲中，由於「缺少 26G sRNA」影響精子爬行能力，「高溫時缺少受 ALG-3/4 保護的 26G sRNA (Conine, C. C., 2010)」，或在真核轉譯起始因子「*ife-1* 有缺陷 (Henderson, M. a., 2009)」，皆將使精子具有缺陷導致不孕。但尚未有研究或證據直接顯示在秀麗隱桿線蟲中 IFE-1 是否能協助酵素 NYN-3 切割 *msd-1* mRNA 進而影響 26G sRNA 的生成，因此我們欲探討 IFE-1 是否

參與酵素 NYN-3 切割 *msd-1* mRNA 途徑。

首先我們藉 *msd-1:gfp* 作為報導基因，觀察秀麗隱桿線蟲在 15 度、20 度和 25 度下 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 以及 *ife-1(tm4249);msd-1:gfp* 中精子的綠色螢光蛋白的螢光表現量差異。由於 Mcherry::H2B 在皮膚細胞的細胞核及染色質的表現量為固定，因此接著我們在螢光顯微鏡下觀察 *ife-1(tm4249);msd-1:gfp* 和 *ife-1(2xflag);msd-1:gfp* 的精子綠色螢光蛋白和 Mcherry::H2B 表現量的比值差異。並透過西方墨點法及 RT-qPCR 檢測免疫沉澱所形成的 2xFLAG::IFE-1 複合物是否含有 *msd-1* mRNA，以驗證假說並證明 IFE-1 經由 sRNA 路徑對於精子生成機制的參與。

現今以 sRNA 作為基因治療的方法大部分為透過 sRNA 的負向調控以抑制基因表現，因此在線蟲中這 26G sRNA 疑似正向調控 *msd-1* 基因的表現值得研究。我們將再進一步設計實驗了解其中機制，未來有望以線蟲作為模式生物，發展出有別於過往 sRNA 藥物抑制基因表現的另一種基因治療方法。

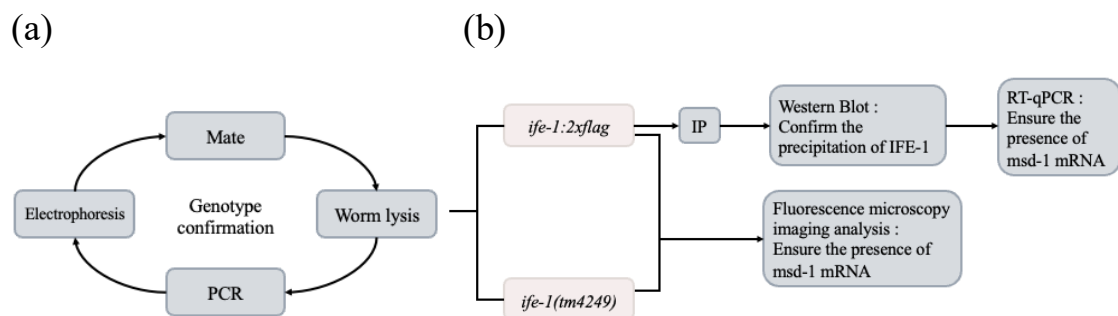
貳、研究目的及研究問題

一、研究目的

藉由 *msd-1:gfp* 作為報導基因，驗證 *ife-1(tm4249)* 在第二及第三外顯子有缺陷的情況下，對精子綠色螢光蛋白表現量的影響。透過免疫沉澱確認 IFE-1 是否有參與協助 NYN-3 切割 *msd-1* mRNA 進而促進 ALG-3/4 26G sRNA 的生成，影響精子生成的途徑。

二、研究問題

- (一) 交配線蟲並確認 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 及 *ife-1(tm 4249);msd-1:gfp* 基因型線蟲之存在
- (二) 透過西方墨點法確認在 15、20、25 度下公蟲及雌雄同體線蟲 IFE-1 蛋白大小，並確定抗原表位 FLAG 可沉澱 IFE-1
- (三) 透過螢光顯微鏡觀察不同溫度下 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 及 *ife-1(tm 4249);msd-1:gfp* 精子中（皆有 Mcherry::H2B），在 *ife-1* 是否有缺陷的情況下，GFP ::H2B/ Mcherry::H2B 比值之改變
- (四) 透過西方墨點法確認抗原表位 FLAG 免疫沉澱下的複合物使否含有 IFE-1 蛋白
- (五) 透過 RT-qPCR 確認免疫沉澱 FLAG 所形成的複合物是否含有 *msd-1* mRNA



圖四、(a)*ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 及 *ife-1(tm4249);msd-1:gfp* 基因型線蟲製備
(b) *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 及 *ife-1(tm4249);msd-1:gfp* 兩種基因型線蟲之實驗流程圖。（圖片來源：作者繪製）

參、研究設備與器材

一、研究設備

(一) 秀麗隱桿線蟲 (*C. elegans*) :

ife-1:2xflag;fog-2/V、*msd-1:gfp;fog-2/V*

(二) 儀器設備:

熱循環儀 (PCR Thermocycler)、水平電泳槽、垂直電泳槽、電泳照膠系統、電泳槽用電源供應器、解剖顯微鏡、滅菌鍋、養菌箱、螢光顯微鏡、Homogenizer、Western blot imaging system、Vortex Genie 2、加熱儀、Semi-dry transfer cell、multimode microplate reader、離心機

(三) 藥劑:

M9、Bleach buffer、Worm lysis buffer、Protease K、Taq Master Mix、TAE buffer、Nucleic Acid Gel Stain (10000X)、Omics 100bp plus DNA RTU ladder、Agarose、ddH₂O、1.5 M Tris (pH 8.8)、1.0 M Tris (pH 6.8)、TEMED、10% APS、10% SDS、異丙醇、DTT、IP buffer、Oxidizing Reagent、25x PIC、BSA standard、Bradford Protein Assay. Reagent、30% Acrylamide mix (29:1)、Fresh/Reused running buffer、5% non-fat milk、甲醇、一級抗體 (Anti-FLAG, mouse)、二級抗體 (Anti-mouse)、transfer buffer、Enhanced Luminol Reagent、Amido Black staining solution、Destain buffer、Tunicamycin (0.02 mg/ml)、Loading-dye、PBST

(四) 引子:

1455 CCAAGCAACGGGTGTAATTA

1456 CTCCAGTCGCCGAGAAATCC

1545 GCTTATCTCGAATGAGACCC

1545 GCTTATCTCGAATGAGACCC

1337 CTTCCACGTCTTCTCGAGAGCGT

1338 GATCTGGGTATCTCGAGAAGCATTGA

1611 TCTGGGCTCTCTACGATGCT

1612 TTTCGGTTGTTTGTTGGGCC

(五) 電腦軟體:

ApE、Excel

(六) 食物:

OP 50

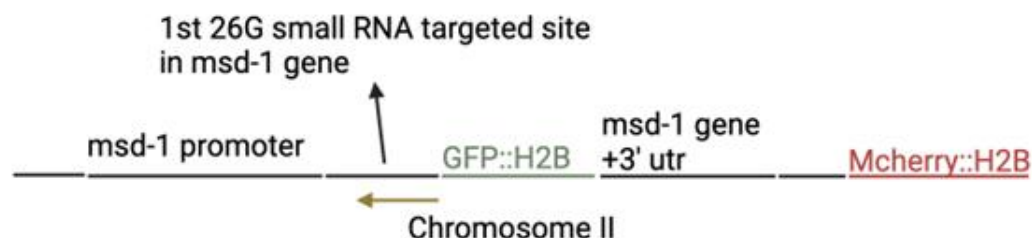
(七) 其他:

55*15 mm 培養皿、NGM plate、LB plate、Pasteur pipette、Pipette tips、Serological pipette、Electronic pipette、Hood、養菌管、1.5ml Microcentrifuge Tube、0.2ml 8-strip PCR Tubes (Attached cap)、Screw cap micro tube、量筒、1.0 mm dia.ZIRCONIA、針、酒精燈、濾網、96 孔盤、PVDF、10x10 cm western blot 玻璃片、transfer membrane、蓋、載玻片、150*20mm 培養皿

肆、研究過程或方法及進行步驟

一、研究設計

為了研究其中的機制，本實驗選用 *msd-1:gfp* 作為報導基因，*msd-1* 位在秀麗隱桿線蟲第四對染色體上，為可被 NYN-3 辨識進而切割的目標基因之一。選用的原因其一為 *msd-1* 是被 26G sRNA 互補到最多次的基因，同時可幫助主要精子蛋白（MSP）在精子細胞骨架中聚合及解聚，進而使其移動。先前文獻指出 MSP 的表現量和 26G sRNA 的有無正相關 (Ting han, & Arun prasad manoharan. 2009)。而 *msd-1:gfp* 為一保有原本 *msd-1* 的序列及 26G sRNA 的互補序列，並在其中插入 *gfp*，此外還接上了 Mcherry::H2B，使其會平均表現在線蟲表皮細胞中，如圖五。



圖五、*msd-1:gfp* 的設計（圖片來源：作者繪製）

此外，我們在 *ife-1* 前面加上 *2xflag*，FLAG 為一種抗原表位，而使用兩倍的原因為使其更好被抗體辨識，因此可透過相應的抗體使其形成免疫複合物，常見的抗原表位有 HA、FLAG、Myc、GST 等。我們可以透過免疫沉澱抓下

含有 IFE-1 的免疫沉澱複合物，並再透過西方墨點法檢測抗原表位 FLAG 是否僅有將 IFE-1 蛋白沉澱下，以及使用 RT-qPCR 檢測沉澱下的複合物中是否含有 *msd-1* mRNA。

二、研究步驟

（一）交配線蟲

1. 將一隻 *msd-1:gfp* (公) 和一隻 L4 階段 *ife-1:2xflag* (雌雄同體) 的線蟲置於 mating plate (55*15mm 的 NGM plate 中滴 10 μ L 的 op50)，放入 25 度冰箱，等待一至兩天。

（二）Worm Lysis 取出線蟲 DNA

1. 確認該盤雌雄同體產出的卵已孵化，且親代皆在盤內。
2. 一隻線蟲需 5 μ L 的 Worm Lysis Buffer + Protease K，將盤數 *2 (一公一雌雄同體) *5 (μ L) 算出所需劑量。若為製作對照組，則取 20 μ L 的劑量並加入 8~10 隻線蟲。
3. 將 Worm Lysis buffer 及 Protease K 以 40 : 3 加入混合。
4. 分別將公蟲、雌雄同體挑起，每隻一管放入 PCR Tube 內攪拌，並在解剖顯微鏡下確認已溶進溶劑中。
5. 蓋上蓋子，置於熱循環儀中跑 Worm Lysis program，步驟如下。

表一、Worm lysis 步驟及其原理

步驟一	65 度	3 小時	使蟲溶在 Worm Lysis Buffer 中
步驟二	95 度	15 分鐘	使酵素 Protease K 失去活性
步驟三	15 度	∞	保存

(三) 聚合酶連鎖反應 PCR

1. 需檢測 3 種基因是否為同型顯性合子。

(1) *ife-1:2xflag*

(2) *msd-1:gfp*

(3) 檢測是否兩條染色體皆有 *gfp*

2. 將 4 μ L Taq Master Mix、0.25 μ L DNA、3.65 μ L ddH₂O、兩種引子各 0.05 μ L 混合置於 PCR Tube 中。檢測 *gfp* 使用 1337、1338, 檢測是否兩條染色體皆有 *gfp* 使用 1545、1546, 檢測 *ife-1* 是否含 2xFLAG 使用 1455、1456。

3. 放入熱循環儀 PCR Taq 2x Mix program。

(四) 電泳 Electrophoresis

1. 配置 3%Agarose, 並以一百萬倍稀釋加入 Nucleic Acid Gel Stain.
2. 將膠體置於水平電泳槽內, 分別滴入 DNA RTU ladder 及樣本各 8 μ L。
3. 固定電壓 100V 跑 20~40 分鐘。
4. 跑完後置於電泳照膠系統下以青光照射並拍攝影像。

5. 選擇 *msd-1:gfp* 或 *ife-1:2xflag* 為同型顯性合子，計算子代基因型機率後選擇交配出同型顯性合子機率高的樣本，再進行下一輪交配及後續步驟。

(五) 螢光顯微鏡

1. 製作玻片
2. 在中央 agarose 上滴上 10μl Tunicamycin 作為麻醉劑。
3. 挑 8~10 隻蟲置於中央麻醉劑中，並蓋上蓋玻片。
4. 至螢光顯微鏡下觀察：

(1) *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 和 *ife-1(tm4249);msd-1:gfp* 在精子綠色螢光蛋白與皮膚表皮 Mcherry 紅色螢光蛋白表現量的比值差異。

(2) *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 公及雌雄同體在三種不同溫度下精子綠色螢光蛋白表現量差異。

(六) 萃取蛋白質

1. 用 M9 將盤上的蟲洗下來，以濾網過濾，保留公蟲，再以 1000 g 離心 20 秒，沉澱後去除上清液。
2. 加 IP buffer（和沉澱物等體積）+ 蛋白質抑制劑（25x PIC）+ Suprase-In，分裝到 Screw Cap micro tube，再加 1.0mm dia. ZIRCONIA 至八分滿。

3. 放入 Homogenizer 震碎（以 3500 rpm 震碎 10 sec，中間泡冰休息 1 分鐘，重複四次），最後一次結束後再冰一分鐘。
4. 燒燙針戳在 micro tube 下方，放在塑膠試管上面，以 1000g 離心 20 秒。
5. 將樣本移到 micro Tube 在 4 度以 10000g 離心 10 分鐘，保留上清液。重複此動作兩次。

（七）蛋白質定量

1. 將標準品 BSA Standard 兩倍稀釋做五次到濃度 0.0625，準備一管水做對照組。
2. 萃取出的蛋白質 50 倍稀釋（49 μ l 水+1 μ l 蛋白質）
3. 滴到 96 孔盤（二重複）並滴 Bradford Protein Assay 每格各 200 μ g。
4. multimode microplate reader 測吸光度。
5. 算平均後在 Excel 以濃度為橫軸，吸光度為縱軸做圖，取最適直線代入代測物的吸光度求其濃度，並乘回 50 倍（單位: μ g/ μ l）

（八）免疫沉澱

1. 所需蛋白質含量為 10 mg，計算其所需的樣本量。
2. 加入 5 mg 的抗體（Anti-FLAG mouse），於 4 度轉一小時。
3. 取含有 protein A/G 的 agarose 20 μ l，並以 IP buffer 洗三次。

4. 將樣本加入 agarose, 於 4 度轉一小時。

(九) 西方墨點法 Western Blot

1. 取 1/10 IP 完的樣本, 離心並以 IP buffer 沖洗三次再回溶。
2. 將蛋白質濃度控制在 40-60 mg, 並加入 loading dye 及 DTT。
3. SDS-PAGE preparation
4. Running
5. Transfer
6. Blocking, Ab incubation
7. 呈色

(十) RT-qPCR

1. 取 9/10 IP 完的樣本, 離心保留沉澱。
2. 加 TRIzol 200 μ l, vortex 均勻。
3. 加入氯仿 50 μ l, vortex 均勻。
4. 在 4 度 15000g 離心 15 分鐘, 並保留透明上清液。
5. 以體積比 1:1 加入異丙醇, 1 μ l 的 Glyco Blue, 放置於 -20 度冰箱一晚。
6. 離心並去除上清液。
7. 以酒精沖洗, 離心去除上清液, 並於 hood 風乾 5-10 分鐘。
8. 以超微量分光光度計檢測其濃度。
9. 約需 1000 ng 之 RNA, 計算其所需之樣本量, 先加入 oligo dt

並加熱至 65 度 5 分鐘。

10.加入 5x reaction buffer、RNase Inhibitor、dNTP、MMLV Reverse

Transcriptase 加熱至 42 度 60 分鐘，70 度 10 分鐘。

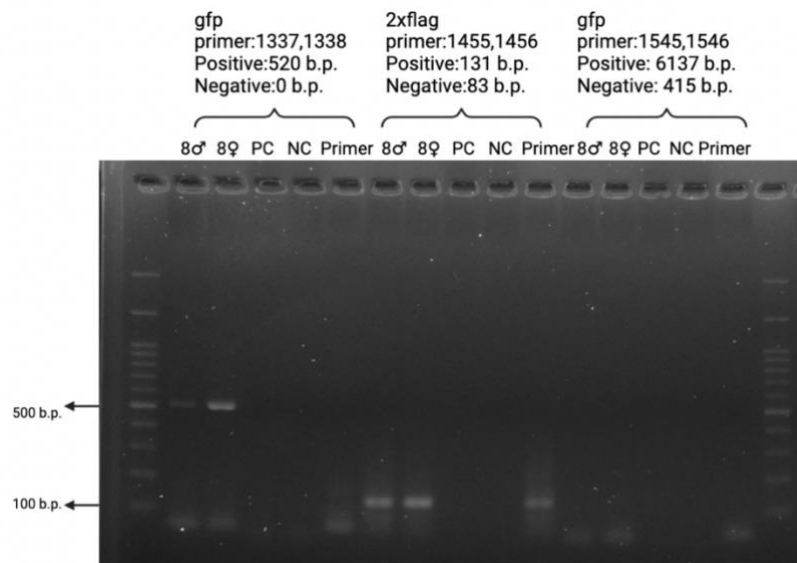
11.將 7.5 μ L CYBR Green、6.38 μ L ddH₂O、各 0.06 μ L primer、經十倍稀釋過後的 cDNA 1 μ L 置於 96 孔盤(需三重複)。

12.設定好標準 qPCR program。

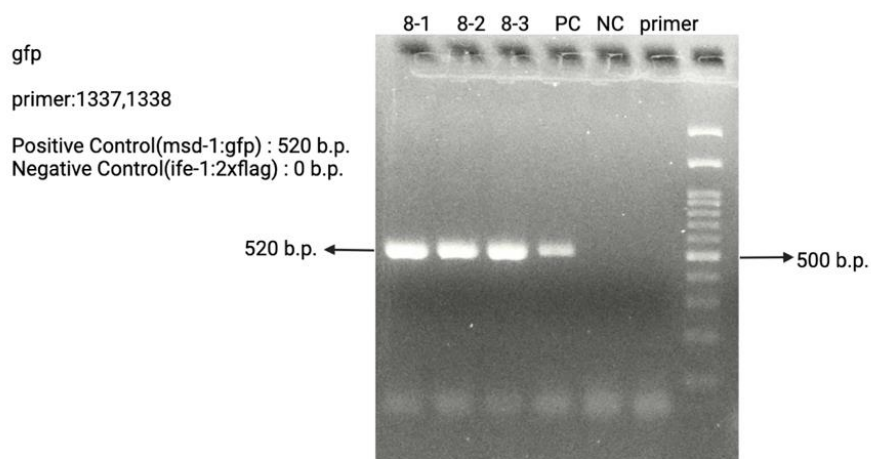
伍、結果與討論

一、交配線蟲 *ife-1:2xflag x msd-1:gfp* 電泳結果：

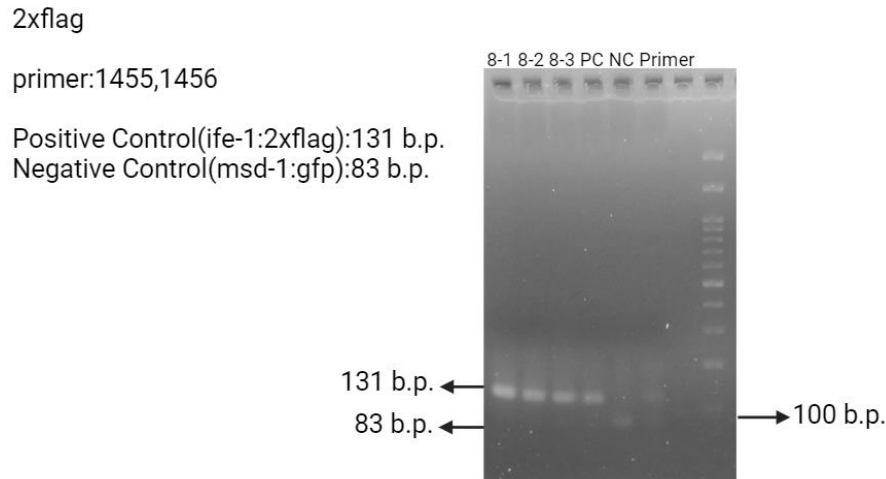
我們從最後第八盤挑出親代之公母驗證，結果如圖六，引子 1337,1338 的部分樣本在 520b.p.看到 band, 1455,1456 的部分樣本也皆可在 131b.p.看到 band, 但引子 1545,1546 的部分之 negative control 沒有顯現，因此大致確認了其基因型為 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp*。接著再從第八盤的子代中挑了三管，每管各 8~10 隻做驗證，如圖六到九。由以下結果可以確認基因型 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 之線蟲的存在，以繼續進行後續的實驗。



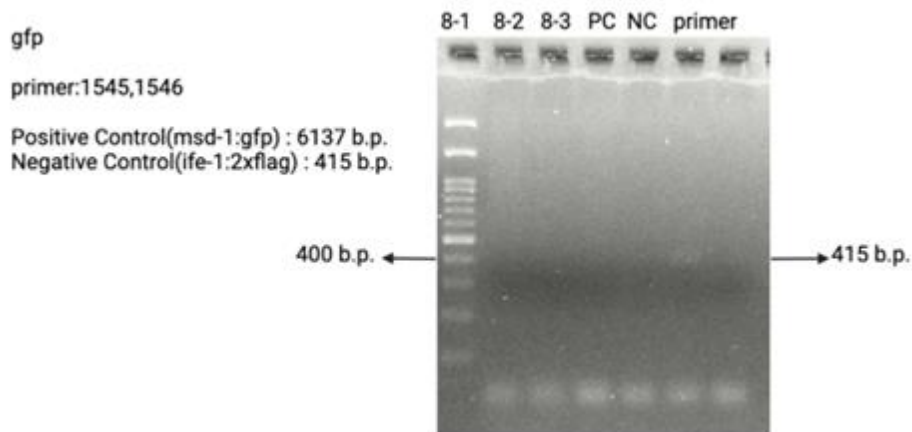
圖六、第八盤親代公母依序驗證 *gfp*、*2xflag*、*gfp*（引子 1337,1338、1455,1456、1545,1546）（圖片來源：作者親自拍攝）



圖七、驗證第八盤子代 *gfp*（引子 1337、1338）（圖片來源：作者親自拍攝）



圖八、驗證第八盤子代 *2xflag* (引子 1455、1456) (圖片來源：作者親自拍攝)

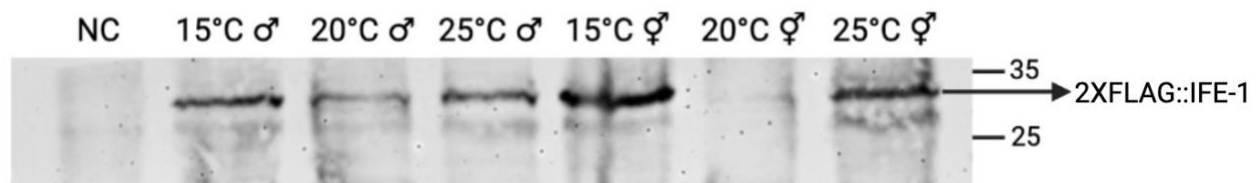


圖九、驗證第八盤子代 *gfp* (引子 1545、1546) (圖片來源：作者親自拍攝)

二、透過西方墨點法檢測在 15、20、25 度下公蟲及雌雄同體秀麗隱桿線蟲 IFE-1 蛋白：

我們從三種溫度 15 度、20 度、25 度分別挑公蟲及雌雄同體各 100 隻萃取蛋白質並跑 Western Blot, 並以不含 *ife-1:2xflag* 的 wildtype 作為 Negative control, 驗證 IFE-1 蛋白皆存在及確認其長度, 結果如圖十, 由於 IFE-1 的長度約為 26 kDA, 2xFLAG 長度約為 3 kDA, 所以 2xFLAG::IFE-1 大小共約 29 kDA, 由圖

可知 15 度、20 度、25 度公蟲及雌雄同體皆含 IFE-1，可以做後續的實驗觀察 MSD-1::GFP 螢光表現量。



圖十、以 Western Blot (單位: kDA) 確認 15 度、20 度、25 度公蟲及雌雄同體之 IFE-1 蛋白存在。NC 為不含 2xFLAG::IFE-1 的野生型線蟲。(圖片來源: 作者親自拍攝)

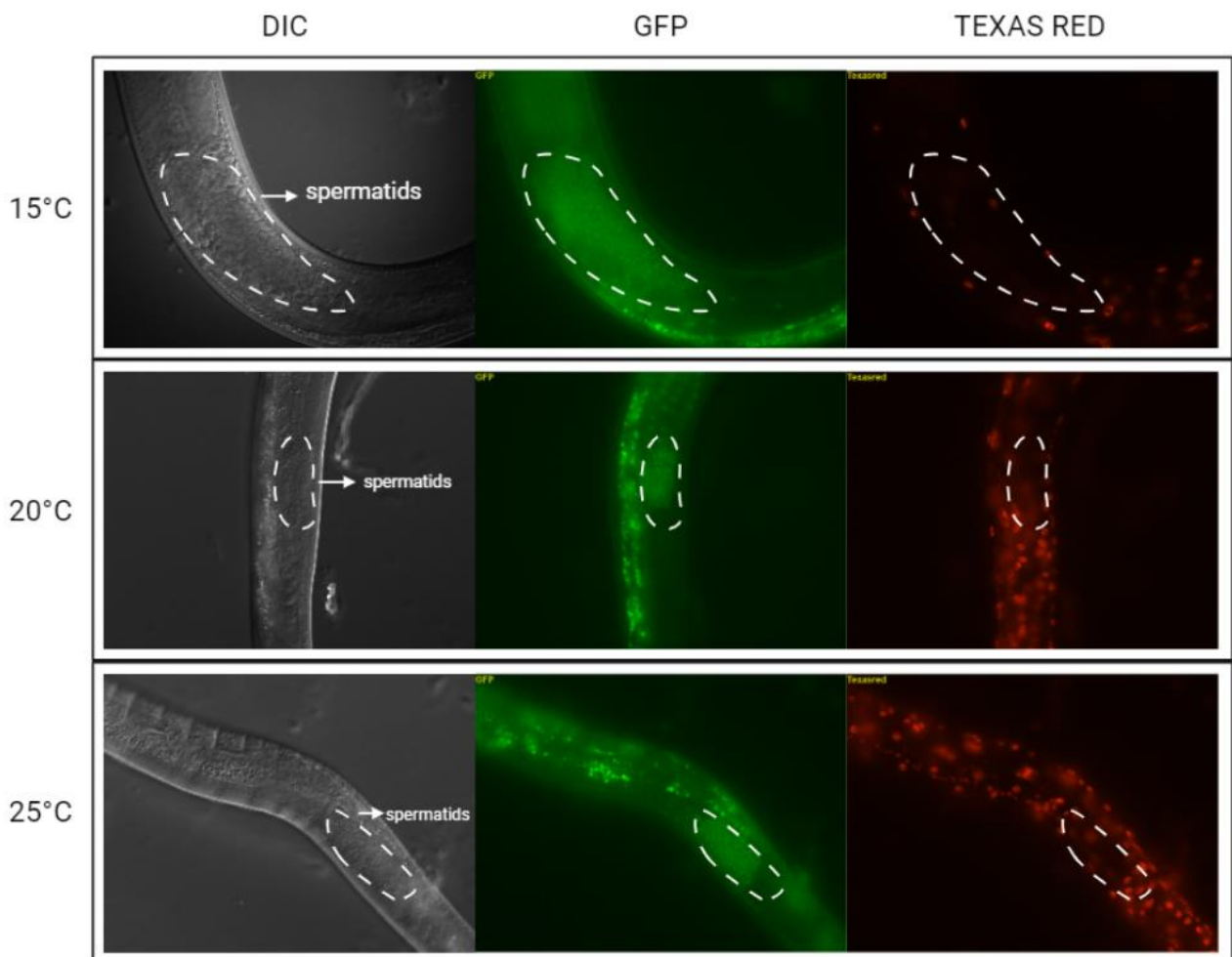
三、不同溫度下 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 之公、雌雄同體線蟲在 germline 及精子 (spermatids) 之 MSD-1::GFP 綠色螢光蛋白表現量結果討論:

接著我們將一些 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 的成蟲以 bleach buffer 殺死後，留下卵並從卵開始分別養在 15、20、25 度下，在其長成成蟲後，分別將三個溫度下的公蟲及雌雄同體以螢光顯微鏡照射三種光，由左至右為 DIC, GFP, TEXAS RED，觀察 spermatids 和 germline 的螢光表現量。如圖十一、十二。

由圖十一可確認 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 在不同溫度下的公蟲 MSD-1::GFP 在精子表現並無明顯差異，我們可知，在 *ife-1:2xflag* 的公蟲精子中，高溫對 MSD-1::GFP 的表現量沒有影響。我們推測是由於 26G sRNA 可正常調控 *msd-1* 基因，進而使 MSD-1::GFP 表現。我們亦證實即使加入 GFP 且在 Ch II 表達，MSD-

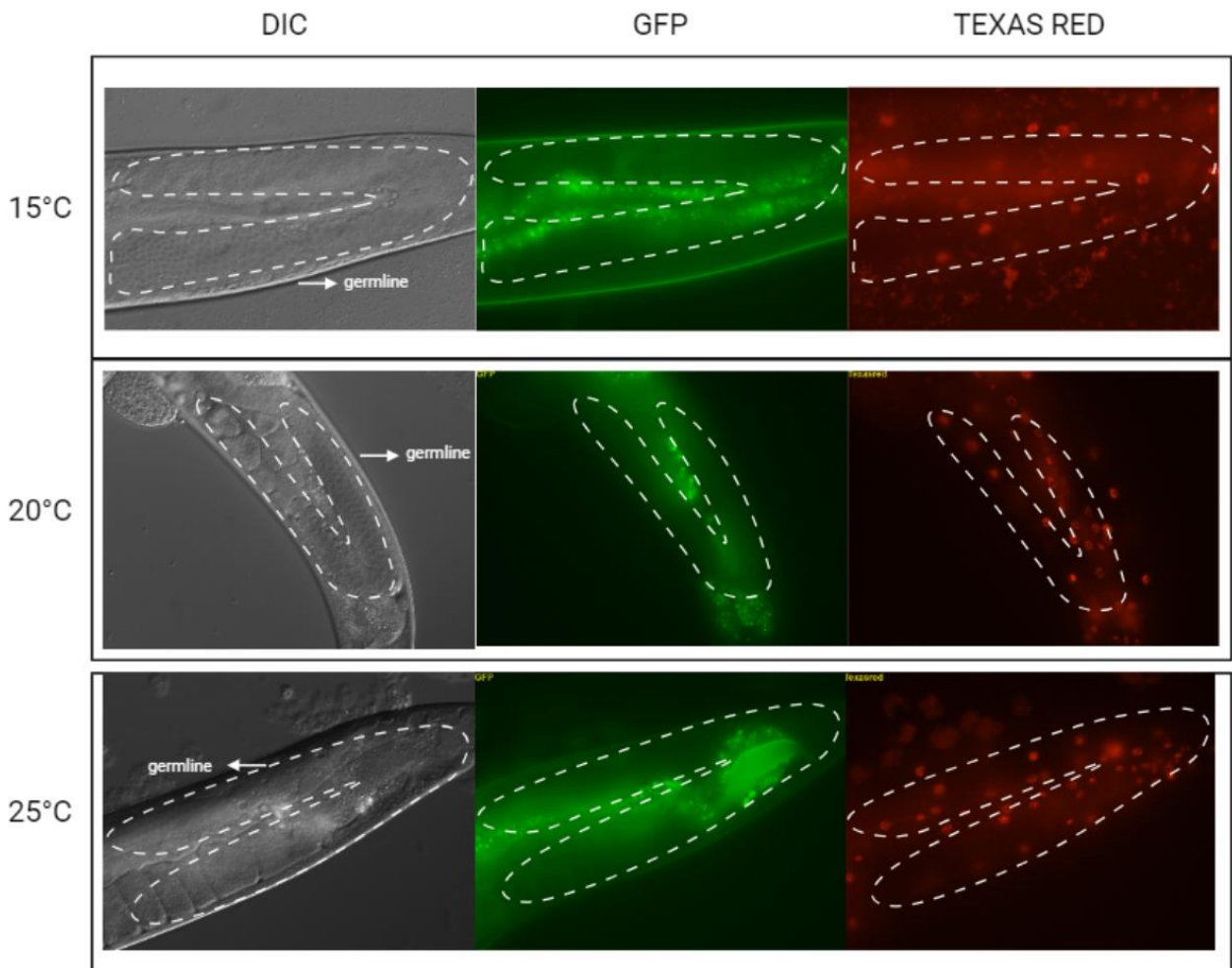
1::GFP 依然可以表現在精子中

從圖十二中觀察到在雌雄同體性腺並無 MSD-1::GFP 表現，而圖中 GFP 之綠色螢光蛋白為來自不同平面腸道的自體螢光（Autofluorescence），並非來自於性腺。因此，我們認為 MSD-1::GFP 對在精子的表現相較十分明顯，可以得知 *msd-1:gfp* 只參與調控於精子。



圖十一、15 度、20 度、25 度下之公 spermatogenesis 中尚未減數分裂的生殖細胞及精子（spermatids）的 DIC，GFP，TEXAS RED 表現量。從圖中觀察到在三種不同溫度下在 spermatids 中 GFP 的表現量並未有顯著差異，這也驗證了 *ife-*

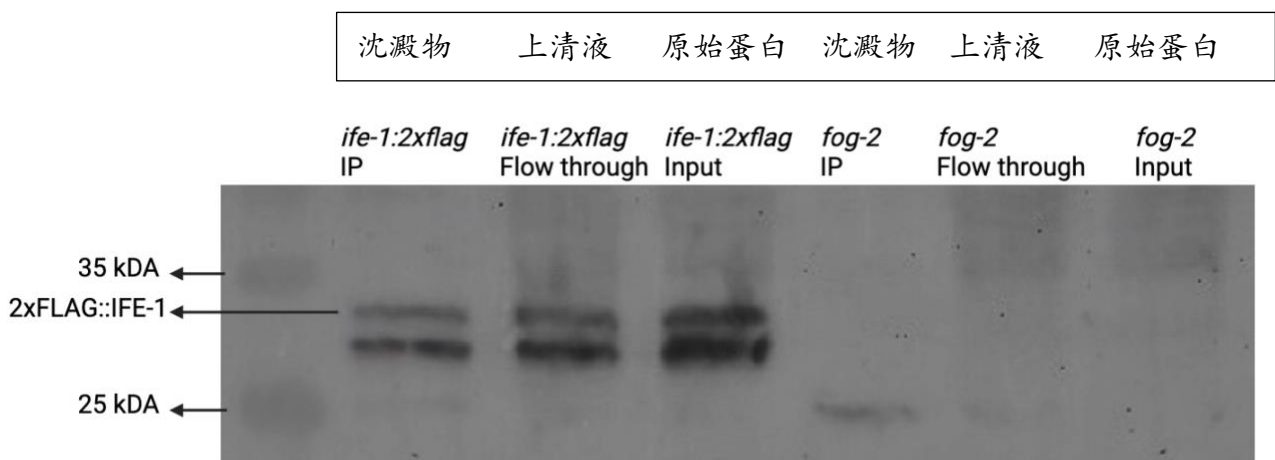
l:2xflag ; msd-1:gfp, 在不同溫度下精子 MSD-1::GFP 的表現無顯著差異, 推測可能是因為 26G sRNA 正常調控 *msd-1* 基因, 使後方 *gfp* 序列表現。(圖片來源: 作者親自拍攝)



圖十二、15 度、20 度、25 度下 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 之 hermaphrodite 線蟲。圖中 GFP 之綠色螢光蛋白為來自不同平面腸道的自體螢光 (Autofluorescence), 並非來自於性腺。因此可以觀察到相較於 male 線蟲, hermaphrodite 在三種溫度下 germline 的 MSD-1::GFP 綠色螢光蛋白皆不表現, 得知 *msd-1:gfp* 只作用於公蟲的精子。(圖片來源: 作者親自拍攝)

四、以 FLAG 抗原表位免疫沉澱，並以西方墨點法確認 IFE-1 蛋白有正確沉澱：

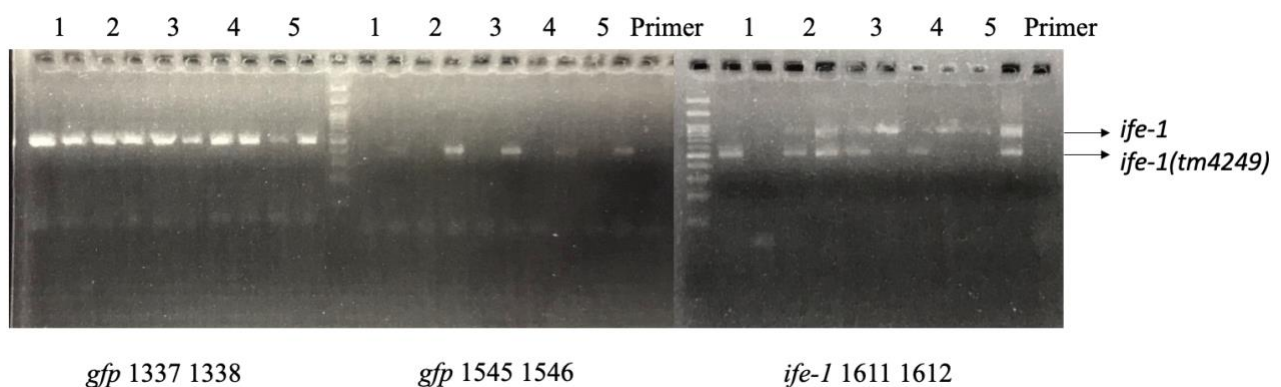
萃取蛋白質後，我們分別將 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 及 *fog-2* 的蛋白質以離心機分離出上清液及沉澱物，並和原始蛋白作為比較，以西方墨點法檢測 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 的沉澱有包含 2xFLAG::IFE-1。結果如預期，由於上清液及原始蛋白總量皆為 69 mg，從圖可以發現上清液的 band 亮度相較於原始蛋白有減少，且在沉澱物中可見到 29 kDA 的 band，因此我們可以確認 FLAG 有免疫沉澱下 IFE-1 的蛋白。此外，我們能夠在 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 看到 29 kDA 的 band，而 *fog-2* 沒有。如圖十三。由結果可以確認能夠繼續以 RT-qPCR 檢測該複合物中是否含有 *msd-1* mRNA。



圖十三、西方墨點法檢測抗原表位 FLAG 是否有正確免疫沉澱下 IFE-1。（左至右分別為 IFE-1 沉澱、上清、原始蛋白，對照組 FOG-2 沉澱、上清、原始蛋白）
(圖片來源：作者親自拍攝)

五、交配線蟲 *ife-1(tm4249) x msd-1:gfp* 電泳結果：

我們將多隻 *ife-1(tm4249)* 的雌雄同體和 *msd-1:gfp* 的公蟲進行交配，取其第二子代進行一對一交配，並在其產下子代後進行基因檢測。由於 *ife-1* 為劣勢基因，交配過程格外困難。而由電泳結果可以看到，具有雙股 *ife-1(tm4249)* 的蟲較少，此外仍有部分線蟲並未兩股皆有 *gfp*，因此交配出具有 *ife-1(tm4249);msd-1:gfp* 之線蟲的目標我們仍在進行中。



圖十四、交配 *ife-1(tm4249)* x *msd-1:gfp* 電泳圖(圖片來源：作者親自拍攝)

陸、本計畫之未來應用

一、拍攝 *ife-1(tm4249);msd-1:gfp* 及 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 精子綠色螢光蛋白和 Mcherry 比值的差異：

由先前的文獻得知當 *ife-1* 在第一外顯子有缺陷時將導致精子有缺陷靜而不孕，雖然本實驗所使用的突變株為 *ife-1* 在第二及第三外顯子有缺陷，但預期會出現相似的結果，也就是亦將使精子具有缺陷而不孕。因此我們預期能夠在 *ife-1(tm4249);msd-1:gfp* 的蟲中觀察到相較於 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 精子綠色螢光蛋白與皮膚表面 Mcherry 表現量比值的減少，如圖十五。

in ife-1:2xflag, ife-1 mutant

GFP::H2B

Mcherry::H2B

remains constant

圖十五、定量比較 *ife-1:2xflag* 和 *ife-1(tm 4249) mutant* 在精子的綠色螢光蛋白表現量差異。根據我們的假設，我們預期能夠在 *ife-1(tm 4249) mutant* 中觀察到比值的減少。(圖片來源：作者繪製)

二、利用抗原表位 FLAG 免疫沉澱複合物並用西方墨點法檢測：

為了觀察 IFE-1 是否參與在協助 NYN-3 切割出 *msd-1* mRNA 進而促進 26G sRNA 的生成，我們將以 FLAG 免疫沉澱形成複合物，並以西方墨點法確認是否有包含 IFE-1 的蛋白，以進行後續的 RT-qPCR 檢測。

三、RT-qPCR：

透過 RT-qPCR 檢測 2xFLAG::IFE-1 沉澱複合物是否含有 *msd-1* mRNA，或觀察 2xFLAG::IFE-1 沈澱物和哪些 RNA 有相關性，進而確認 IFE-1 在 sRNA 路徑中對於精子生成機制的影響與角色。

四、觀察 26G sRNA 和精子綠色螢光蛋白表現量的關係：

我們亦可以透過直接觀察 26G sRNA 的有無和 MSD-1::GFP 表現量的直接關係，以進一步了解 26G sRNA 是否正向調控 *msd-1* mRNA，以及設計其他實驗了

解正向調控的機制。

未來除了了解 IFE-1 如何協助酵素 NYN-3 切割 *msd-1* mRNA 進而促進 26G sRNA 生成，也將進一步了解 26G sRNA 如何正向調控 *msd-1* mRNA，未來有望以線蟲作為模式生物，發展出有別於過往 sRNA 藥物抑制基因表現的一種新型基因治療方法。

柒、 結論

一、證明了 *ife-1:2xflag;msd-1:gfp* 基因型線蟲存在。

二、相較於 male 線蟲，hermaphrodite 在三種溫度下 germline 的綠色螢光蛋白不表現，因此得知 *msd-1:gfp* 主要影響並作用於公蟲的精子。

三、不同溫度下 *ife-1:2xflag* 公蟲在精子的 MSD-1::GFP 表現並無明顯差異，我們可知，在 *ife-1:2xflag* 公蟲中，溫度對 MSD-1::GFP 的表現量沒有影響。我們推測是由於 26G sRNA 可以正常作用，調控 *msd-1* mRNA，使後方 *gfp* 序列表現，仍須設計相關實驗以證明其調控機制。

四、已知內生型 *msd-1* 可表現在 spermatids，在此實驗中我們證實即使加入 GFP 且在 Ch II 表達，MSD-1::GFP 依然可以表現在精子中。

捌、 參考資料

-本實驗研究中成果照片皆為作者兩人親自拍攝

Henderson, M. A. (2009, May 15). *A Germline-Specific Isoform of EIF4E (IFE-1) Is Required for Efficient Translation of Stored MRNAs and Maturation of Both Oocytes and Sperm*. PubMed.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19383718/>

Kawasaki, I. (2011, February). *Regulation of Sperm-Specific Proteins by IFE-1, a Germline-Specific Homolog of EIF4E, in C. Elegans*. PubMed.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21191815/>

Morrison, K. N. (2021, February 22). *MFP1/MSD-1 and MFP2/NSPH-2 Co-Localize with MSP during C. Elegans Spermatogenesis*. PubMed.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34316545/>

Conine, C. C. (2010, February 23). *Argonautes ALG-3 and ALG-4 Are Required for Spermatogenesis-Specific 26G-RNAs and Thermotolerant Sperm in Caenorhabditis Elegans*. PubMed.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20133686/>

Corsi, A. K. (2006, April). *A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis Elegans*. WormBook.

http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html

Tsai, H., Cheng, H., & Tsai, Y. (2022, August 12). *Biogenesis of C. Elegans Spermatogenesis Small RNAs Is Initiated by a Zc3h12a-like Ribonuclease*. PubMed.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35947655/>

Ting han, & Arun prasad manoharan. (2009, October 21). *26G Endo-SiRNAs Regulate Spermatogenic and Zygotic Gene Expression in Caenorhabditis Elegans*. Pubmed.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19846761/>

Anahita amiri, Brett d. keiper, & Ichiro kawasak. (2008, June 17). *An Isoform of EIF4E Is a Component of Germ Granules and Is Required for Spermatogenesis in C. Elegans*. National Library of Medicine.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2430591/>

吳念祖. (2024). 於秀麗隱桿線蟲中探討調控精子之小 RNA 的生成機制

Decoding the Mechanisms Governing Small RNA Biogenesis Essential for Sperm Function in Caenorhabditis Elegans. Airiti Library.

<https://www.airitilibrary.com/Article/Detail/U0001-0745240805588002>

【評語】 050007

研究分析 IFE-1 在秀丽隱桿線蟲中的作用，揭示其如何通過影響 *msd-1* mRNA 裂解促進 26G sRNAs 的生成並調控精子生成。結果顯示，IFE-1 在不同溫度下穩定表達，並可參與 sRNAs 的生成路徑。

缺點與改進建議：

1. 模型生物限制：

僅聚焦於線蟲，建議擴展至其他生物進行普適性驗證。

2. 自體螢光干擾：

GFP 自體螢光可能對數據造成影響，需進一步校正以提高數據準確性。

3. 討論深度不足：

未充分比較與前人研究的差異，需加強討論部分的學術對話與文獻對比。