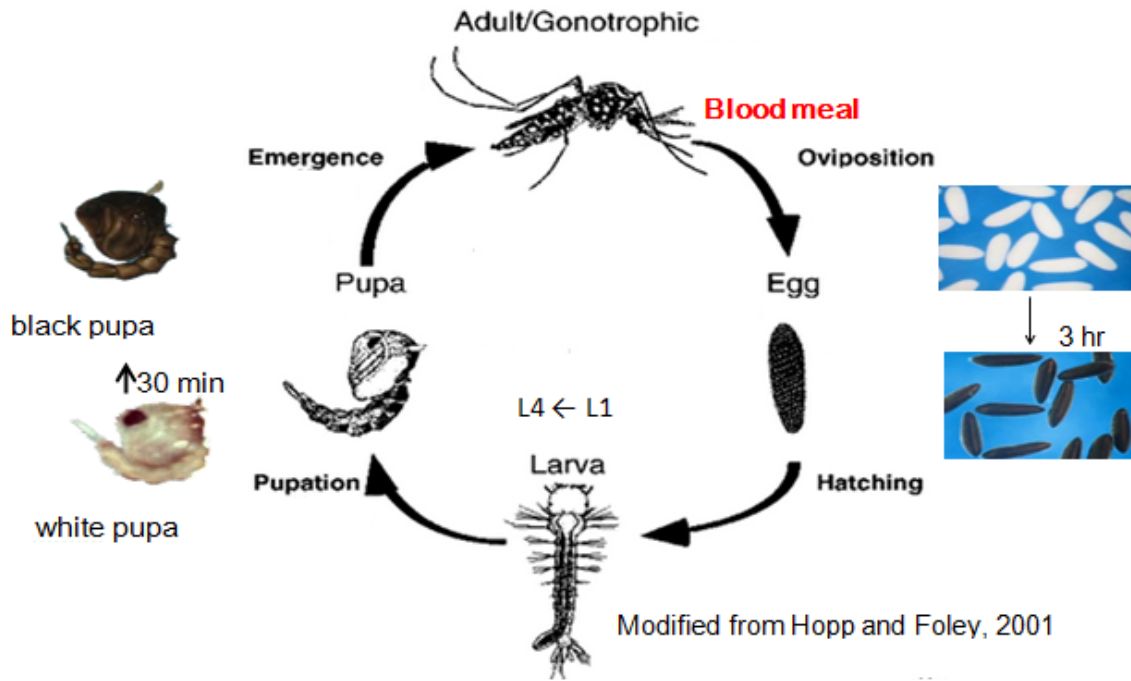


2014 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

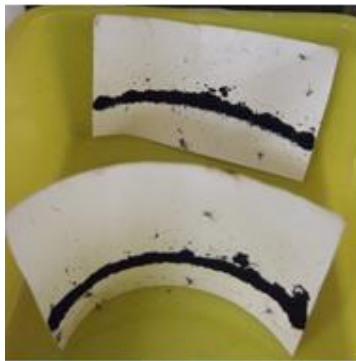
作品編號 050010
參展科別 動物學
作品名稱 TEP1 基因對埃及斑蚊(*Aedes Aegypti*)
生殖能力影響之探討
得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學
指導教師 林玟娟、蕭信宏
作者姓名 施又予、郭乃榕

關鍵字 埃及斑蚊、RNA 干擾、生殖調控



(圖一) 埃及斑蚊的生活史



(圖二)



(圖三)



(圖四)

(圖五)

(圖六)

(圖七)

圖(二) 埃及斑蚊卵片，乾燥可保存，浸泡於水中即可孵化

圖(三) 埃及斑蚊幼蟲

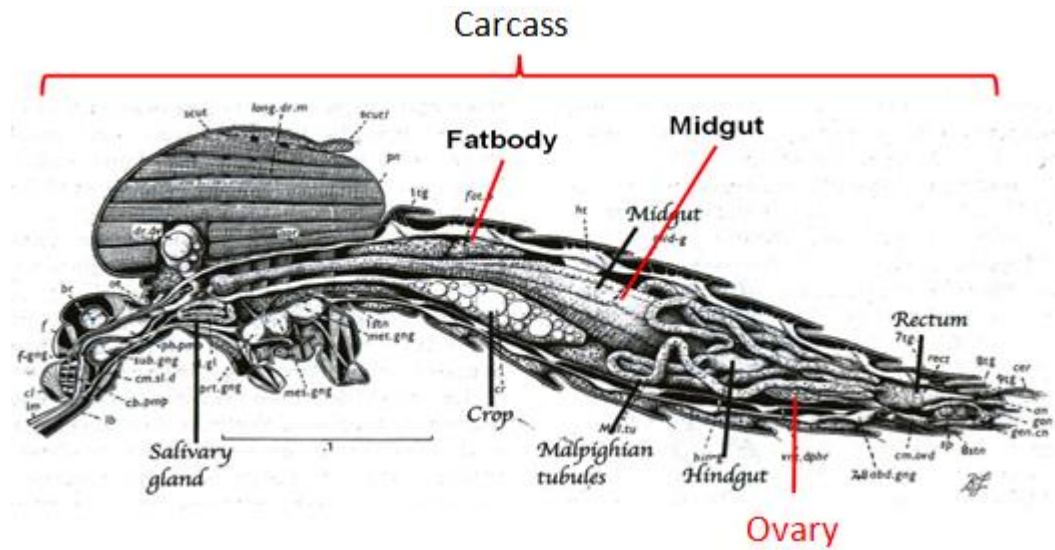
圖(四) 埃及斑蚊的裸蛹

圖(五) 以滴管將裸蛹吸至如圖三的塑膠碗中

圖(六) 將裝有裸蛹的塑膠碗放入蚊籠中再將蚊籠前端的紗布綁緊

圖(七) 成蚊

(二) 埃及斑蚊解剖圖



(圖八) 埃及斑蚊解剖圖

(三) 含硫酯蛋白(Thioester-containing proteins, TEP)基因

含硫酯蛋白(Thioester-containing proteins)存在於許多生物體內，例如：線蟲、軟體動物、魚類、鳥類、昆蟲及哺乳動物等，因其蛋白質結構上含有硫酯鍵(thioester bond)而命名，主要可藉由這個硫酯鍵與病原做共價結合(covalent binding)，而促使病原菌之細胞溶解或增強細胞之吞噬作用(phagocytosis)。目前在果蠅(*Drosophila melanogaster*)已發現6個TEP同源蛋白(homologues)，其功能不盡相同，例如：果蠅TEP1, TEP2及TEP4會在幼蟲時期大量表現，而TEP2及TEP4會在成蟲時期有較大量的表現。另外，果蠅TEP1也被證實在脂肪體及血球細胞中表現。此外，在剛比亞瘧蚊(*Anopheles gambiae*)發現15個TEP同源蛋白，其中TEP1有較深入的研究，*Anopheles gambiae* TEP1主要由瘧蚊的血球細胞產生，再分泌到血淋巴(hemolymph)中，當有外來病原菌刺激時，則會造成*Anopheles gambiae* TEP1的裂解，使其成為活化的狀態，此外，*Anopheles gambiae* TEP1也會結合到瘧原蟲的表面，使其死亡。然而，對於埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)TEP的研究，至今仍付之闕如，因此，我們想針對台灣最重要的登革熱病媒蚊：埃及斑蚊，探討TEP對其生理機能調控的影響。

參、 研究設備及器材

(一) 製備 dsRNA 的設備

1. 離心機
2. 鑄膠器
3. 分光光度計
4. 4°C 和 -20°C 冰箱
5. 無菌操作台
6. 微量分注器
(1 ml, 200 µl, 100 µl, 10 µl, 1 µl)
7. Plasmid Purification Kit II
8. 搖盪器

(二) 處理實體蚊子的設備

1. 蚊籠(培養箱)
2. 濾紙 (filter paper)
3. 解剖顯微鏡
4. Nanoject II
5. 紗布/紙杯/橡皮筋/棉花

(三) 實驗試劑

1. 10%糖水

100 公克砂糖溶於 1 公升的二次水，保存於 4°C 冰箱。

2. Avertin 之製備

Avertin 為麻醉小鼠之非管制用藥，儲存在深色容器中。將 25 克之 2,2,2-Tribromoethanol 加至 15.5 ml 之 T-amyl alcohol 中，並持續攪拌約 12 小時。使用時，將 0.5 ml 儲存溶液加至 39.5 ml normal saline solution 中，並避光攪拌約 12 小時後將溶液在 4°C 以 0.2 µm 濾紙過濾即可使用，使用方式為以 intraperitoneal injection (IP) 之方式注射至小鼠體內，劑量為每 10 克體重 0.2 ml Avertin。

3. LB/Ampicillin 培養皿

25 公克之 Difco TMLB Broth, Miller (Luria-Bertani; BD) 與 15 克 agarose (CONDA) 溶於 1 公升二次水並滅菌，之後於無菌操作台操作，將

以滅菌的溶液加入 1 ml 的 Ampicillin(100mg/L)，混合均勻後倒入培養皿中，等風乾凝固之後保存於 4°C 冰箱。

4. Ampicillin-LB 之培養液

1.6 克 LB B (Sigma)溶於 80 ml 的二次水，之後用高溫高壓滅菌，滅菌後的溶液以 1：1000 的比例加入 Ampicillin 即為 Ampicillin-LB 之培養液。

5. DEPC-H₂O

以 1：1000 的比例將 Diethyl pyrocarbonate 與二次水混合，並於抽氣櫃中均勻攪拌，之後用高溫高壓滅菌，最後分裝保存。

肆、 研究方法

(一) 埃及斑蚊的培養

實驗所用的埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)為 UGAL/Rockerfeller strain，實驗室蚊子條件皆為恆溫 27°C 和濕度 70% 的環境下飼養，當要孵化蚊子的卵時，利用煮沸過後的水，加蓋冷卻後再放入蚊子的卵，此步驟是為了排除原本溶在水裡的氧氣，使得在卵裡的幼蟲感到缺氧，破卵而出。在蚊子的幼蟲(larva)時期，給予適量磨碎的貓飼料(偉嘉)和乾淨的活動空間，約 7~11 日就會發育成蛹(pupa)的型態，在經過 2~3 日就會漸漸羽化(eclosion)成為蚊子。蚊子平常是以 10 % 糖水(台糖)餵食以維持生命，而實驗所用的蚊子皆為羽化後 2~3 日齡大的母成蚊，假若要繁衍後代，會先把蚊籠內的糖水拿出約 6~8 小時，經過餵血之後，再經 48 小時，將濾紙的一半浸泡在水中以模擬蚊子的產卵環境，以利蚊子在濾紙上產卵，再經過 3~4 日將濾紙取出，置於陰涼處晾乾，放於夾鏈袋中保存，可以保存一個月之久。

(二) 瓊脂糖膠體電泳 (agarose gel electrophoresis)

瓊脂糖膠體電泳是運用 DNA 主鏈磷酸根在中性或鹼性酸鹼值溶液中帶負電的特性，使 DNA 分子在電場的作用下會往正極移動，藉此分辨去氧核糖核酸片段(DNA fragment)的數量及分子量。一開始先依 sample 多寡決定要製作的膠體大小(小片 TAE 放 25 ml、大片 TAE 放 50 ml)，測量 TAE 1%(g)的瓊脂糖粉(agarose)倒入錐形瓶中，再加入 TAE 搖晃均勻後放入微波爐待其完全溶解。接著，以 2.5 ml EtBr /100 ml TAE 的比例加入溴化乙啶(ethidiumbromide EtBr) 作為染劑，將溶液倒入模型後，待其凝固即可使用。

(三) 由 whole body 埃及斑蚊萃取 RNA

收取整隻蚊子或蚊子組織放於 500 μL 之 TRIzol[®] Reagent (Invitrogen)，之後利用組織研磨棒將組織磨碎，以 4 $^{\circ}\text{C}$ 轉速 13500 rpm 高速離心十分鐘後取其上清液於 1.5ml 離心管中於室溫下靜置五分鐘。加入 100 μL choloform 混合均勻並靜置三分鐘再以 4 $^{\circ}\text{C}$ 轉速 13500 rpm 高速離心十五分鐘，此時會分兩層，DNA 及蛋白質會在有機層或界面層，而只有 RNA 在水層，如此可有效分離出 RNA。將位於上層的水層抽出到新的 1.5 ml 離心管，再加入 250 μL isopropanol 後混合置於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 30 分鐘，以沉澱 RNA。接著以 4 $^{\circ}\text{C}$ 轉速 13500 rpm 高速離心三十分鐘，去除上清液後加入 500 μL 之 75% 酒精繼續離心五分鐘。在把上清液抽出後將離心管倒置於無菌操作台上晾乾，最後加入 25 μL 之 DEPC 水回溶 RNA，此樣本並加入 Baseline-ZERO[™] DNAase (epiventre[®]) 去除 DNA 後保存於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

(四) 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

取 RNA 樣本以 Super Script[™] First Strand Sythesis System for RT-PCR Kit (Introgen) 並加入 Oligo dT 作為引子反轉錄成 cDNA。其詳細的反應為 2000 ng RNA 加入 2 μL 10X sample buffer、0.8 μL dNTP(100mM)、1 μL oligo dT(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 以及 1 μL reverse transcriptase 並以 DEPC 水補齊體積至 20 μL 。加完反應試劑後於 PCR 循環機反應：於 25 $^{\circ}\text{C}$ 反應 10 分鐘，後以 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應 2 小時，最後於 85 $^{\circ}\text{C}$ 反應 5 分鐘。

(五) 聚合酶連鎖反應 (PCR)

將得到的 cDNA 以所設計之 primer 與 HotstarTaq[®] plus PCR KIT (QIAGEN) 進行 PCR，詳細反應為 2 μL cDNA(2000ng/ μL) 與 1 μL 10X sample buffer、4 μL Q solution、0.4 μL dNTP(10Mm)、各 0.2 μL 的 forward 與 reverse primer 以及 0.1 μL HotStarTaq Plus DNA polymerase 最後補水至 20 μL 。反應溫度為 95 $^{\circ}\text{C}$ 反應 5 分鐘使 polymerase 開始作用，95 $^{\circ}\text{C}$ 反應 30 秒使 cDNA denature，

TEP1 annealing 溫度為 55°C，extension 反應溫度 72°C 反應 30 秒，最後的 extension 反應溫度 72°C 反應 5 分鐘。利用 1% 電泳膠(agarose gel)確認產物大小。本實驗用於 gene knock-down 成效之確認。使用的 Check Primer 如下：

TEP1 Check Primer-Forward: GAATACGTTGGGCTTGTGGT

TEP1 Check Primer-Reverse: ATTGATGTTCGCCGAATGA

(六) RNAi 技術

本實驗是用 RNA 干擾 (RNA interference, RNAi) 的技術來阻斷 TEP1 基因的表現。它是由雙鏈 RNA(double strand RNA, dsRNA)在 mRNA 合成時，關閉對應之基因序列表現或使其沈默的過程。以微型核糖核酸 (microRNA, miRNA)和小干擾核糖核酸 (small interfering RNA, siRNA)這兩種小片段 RNA 為最主要的干擾形式，且 RNAi 可在細胞之間傳播，甚至還可使子代產生基因突變。

1. 養菌 PCR

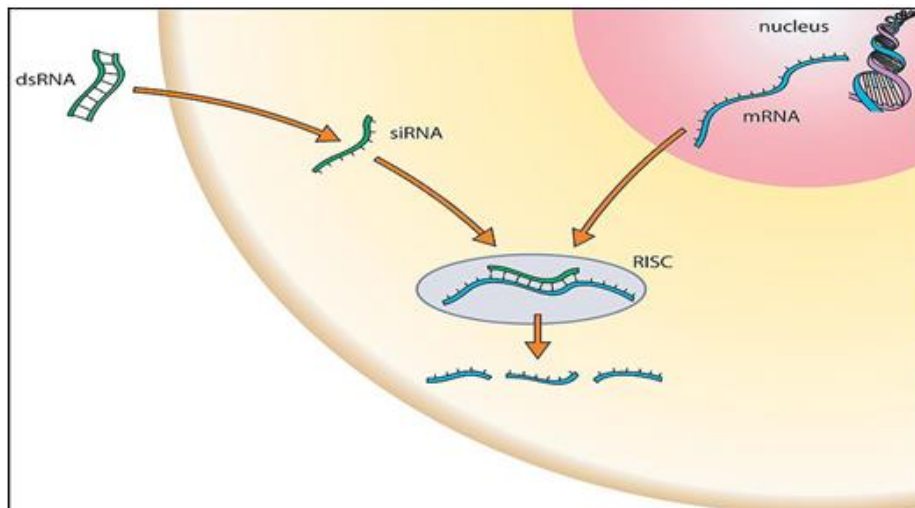
以 EcoRI 切出質體上的目標 DNA 片段，再將此片段以電泳跑膠的方式分離出大小。切取膠中含有目標 DNA 的片段，並以 MiniElute Kit 純化。接著將 4 μ L 已純化的片段(Purified fragment)加入 5 μ L 10X PCR Buffer、2 μ L dNTP Mix、0.5 μ L primer with T7-F、0.5 μ L primer with T7-R、0.5 μ L TaKaRa Ex Taq、37.5 μ L H₂O 再次純化，最後電泳跑膠確認，並以分光光度計定量。

2. 轉錄為雙股 RNA

將此純化後的 DNA 以 Ambition MEGAscript T7 kit 進行轉錄。此過程需將純化後的 x μ L DNA 產物加入(16-x) μ L DEPC-H₂O、16 μ L mixed NTPs、4 μ L 10X reaction buffer 及 4 μ L enzyme mix。

3. 雙股 RNA 的萃取(Purification of dsRNA)

將步驟 2 的產物加入 15 μL 醋酸胺(ammonium acetate)和 95 μL DEPC-H₂O 混和均勻,再加入 150 μL 苯酚/氯仿(phenol/chloroform)均勻混合並以轉速 13500 rpm 高速離心五分鐘。收集上清液後加入 150 μL 氯仿(chloroform)均勻混合並以轉速 13500 rpm 高速離心五分鐘,再次收集上清液並加入 110 μL 異丙醇(isopropanol)均勻混合,靜置於-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱裡十五分鐘進行沉澱。將溶液於 4 $^{\circ}\text{C}$ 轉速 13500 rpm 高速離心十五分鐘,移除上清液,然後加入 50 μL 的 DEPC-H₂O 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 回溶十分鐘,最後以電泳跑膠確認並以分光光度計定量。



(圖十) dsRNA 之作用機制

(七) 基因抑制(Gene Knock-down)方法

使用 Nanoject II AutoNanolite Injector (Drummond Scientific Company)將 dsRNA 以顯微注射法打入羽化三到五天之母蚊中,注射位置在母蚊的胸部之間。本實驗會同時注射 LacZ 基因的 dsRNA,因為埃及斑蚊體內沒有 LacZ 基因,所以將其注入母埃及斑蚊體內,是控制”顯微注射是否影響母蚊的產卵能力”這個變因,作為 TEPI 的對照組。為使 dsRNA 完全抑制基因,顯微注射後隔兩天再做後續實驗。

伍、 研究過程

(一) Double-stranded RNA (dsRNA)製備之前置作業

本實驗使用到 TEP1 之 dsRNA。首先先設計 TEP1 基因之 T7 RNAi 引子 (primer)並以 PCR(polymerase chain reaction)方式放大基因片段，並以電泳 (electrophoresis)確認其片段大小是否正確。確認無誤後以 HIT Non-Heat Shock transformation protocol(Bioscience)將產物與 TOPO vector (Invitroren)接合，再轉殖到 ECOS101 DH5 competent cell(Yeastern Biotech Co.,Ltd)中。

將其培養於含有 IPTG 與 X-Gal 之 LB-Ampiciline 培養皿，培養環境為 37 °C。經過 16 小時培養後進行藍白篩選(Blue-White screening)，選擇白色菌落，並培養於 Ampiciline-LB 之培養液中。為確保挑選出的菌株帶有本實驗所需要的基因片段，以 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid)萃取菌落之質體，並以限制酶(Restriction enzyme)切出基因片段，再以電泳確認其片段大小後進行基因定序(台大醫學院第一共研)。基因比對無誤之後，將菌種保存於-80°C 冰箱中。

(二) Double-stranded RNA (dsRNA)製備

製備 Double-stranded RNA 的原理為細胞外轉譯系統，藉由辨認 DNA 模板上之 T7 promoter 來催化 dsRNA 之合成，因此在設計 RNAi primer 時前面都會接上 T7 序列。實驗過程為將上段所敘述之菌株，一樣以 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid)萃取菌落之質體，並以限制酶(Restriction enzyme)切出基因片段，並以電泳確認其大小。再以 Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid)將基因片段從電泳膠萃取出來，之後以 RNAi primer 運用 PCR 技術放大其基因片段並純化基因片段，最後以 Ampliscribe™ T7 transcription Kit

(EPICENTRE® Biotechnologies)轉譯出 dsRNA 並以 Phenol/Chloroform 法純化。

以下為本實驗所用到之 TEPI RNAi primer：

TEPI RNAi Forward:

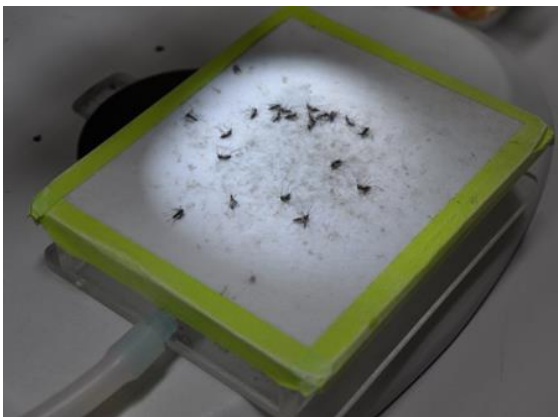
TAATACGACTCACTATAGGGGTCACGCATCCACTCTTCTTG

TEPI RNAi Reverse:

TAATACGACTCACTATAGGGTCTGGTGCTGCAGGATGTAG

(三) 顯微注射 Micro injection

先取三個紙杯分別寫上 Naïve、LacZ、TEPI 並以紗布和橡皮筋封口，再取羽化後 3 至 5 天的母蚊以 CO₂ 麻醉(如圖十一)。將 50 隻未經處理的母蚊裝入寫有“Naïve”的紙杯；再取各 50 隻母蚊，使用 Nanoject II AutoNanolite Injector(如圖十二)分別注射 1 shot(0.6 μL)LacZ 的 dsRNA 和 4 shots TEPI 的 dsRNA(如圖十三)，裝入寫有“LacZ”和“TEPI”的紙杯。將沾了 10%糖水的棉花放在紙杯的紗布上(如圖十四)，作為母蚊能量的來源。



圖(十一)



圖(十二)



圖(十三)



圖(十四)

注射後隔兩天用 Avertin 以 intraperitoneal injection (IP) 之方式注射至小鼠體內麻醉小鼠，劑量為每 10 克體重 0.2 ml。待小鼠昏迷後置於紗布上讓母蚊吸血 30 分鐘。

餵血 24 小時後將母蚊以 CO₂ 昏迷，置於顯微鏡下，將未吸血的母蚊移除，並各取三隻吸血的母蚊做 RNA efficiency 以確定基因已 knock down 成功。

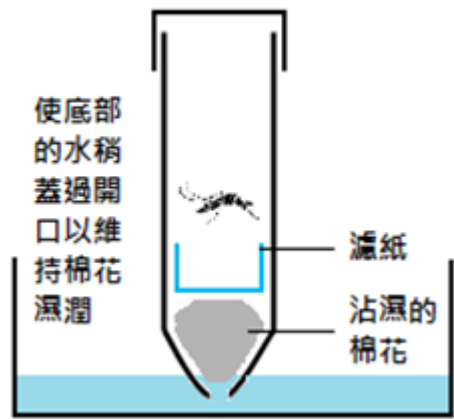
(四) 分管與數卵

餵血後隔兩天，將母蚊個別分裝至鋪有濾紙的管子，底部有棉花以及水，維持濾紙的濕潤，模擬母蚊產卵的環境(如圖十五、十六)。

分管後隔兩天取出卵片(濾紙)，觀察母蚊卵巢發育情形及卵的黑化情形，並計數蚊卵的數目(如圖十七)。重複顯微注射的步驟三次，最後進行數據處理。



圖(十五)



圖(十六)



圖(十七)

陸、 研究結果

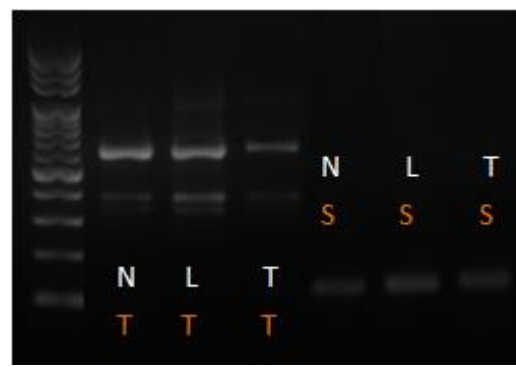
(一) 以 RNAi efficiency 確認基因是否 knock down 成功

圖(十八)與圖(十九)中，白色字 N、L、T 分別代表 Naïve、注射 LacZ dsRNA 和注射 TEP1 dsRNA 的母蚊，而橘色字 S、T 則分別代表其 PCR 時所使用的 S7 及 TEP1 primer。

在圖(十八)和 (十九)中，S7 primer(橘 S)為對照組，因此同一張圖裡 N、L、T 的跑膠亮度幾乎相同。TEP1 primer(橘 T) 的三組中 T 的亮度較 N 與 L 來得暗，表示第一次與第二次顯微注射實驗中，TEP1 已被成功 knockdown TEP1 基因的表現。



圖(十八) 第一次進行 TEP1 顯微注射實驗的 RNAi efficiency



圖(十九) 第二次進行 TEP1 顯微注射實驗的 RNAi efficiency

(二) 埃及斑蚊產卵情形與數據分析

注射 dsTEP1 的母蚊產卵數(圖二十一)比 Naïve 以及注射 dsLacZ 的母蚊產卵數量(圖二十)明顯較少，圖(二十一)中的卵片上只有一顆卵(紅色圈圈處)。

dsLacZ (control)



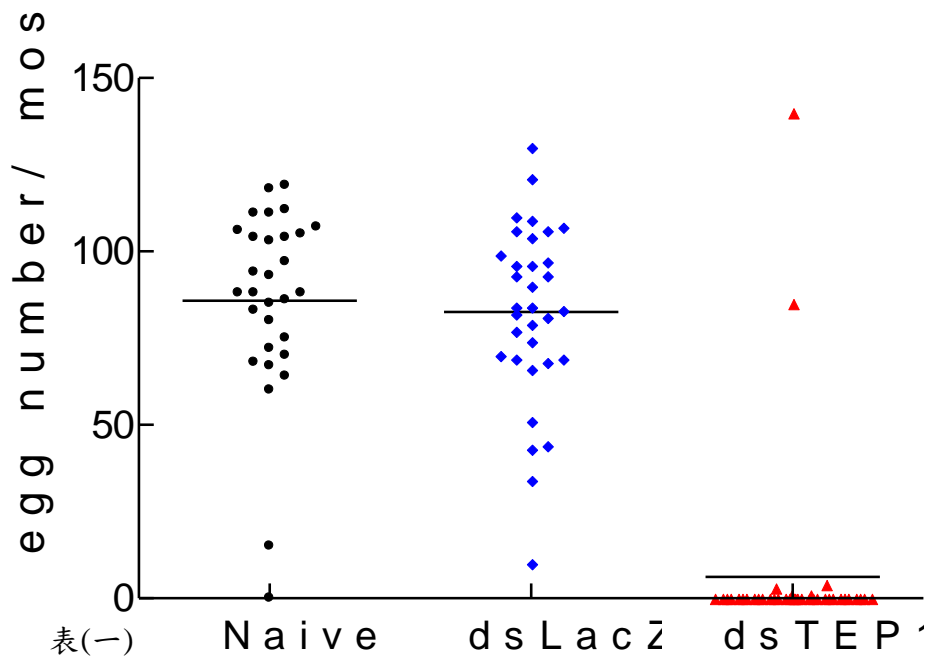
圖(二十)

dsTEP1



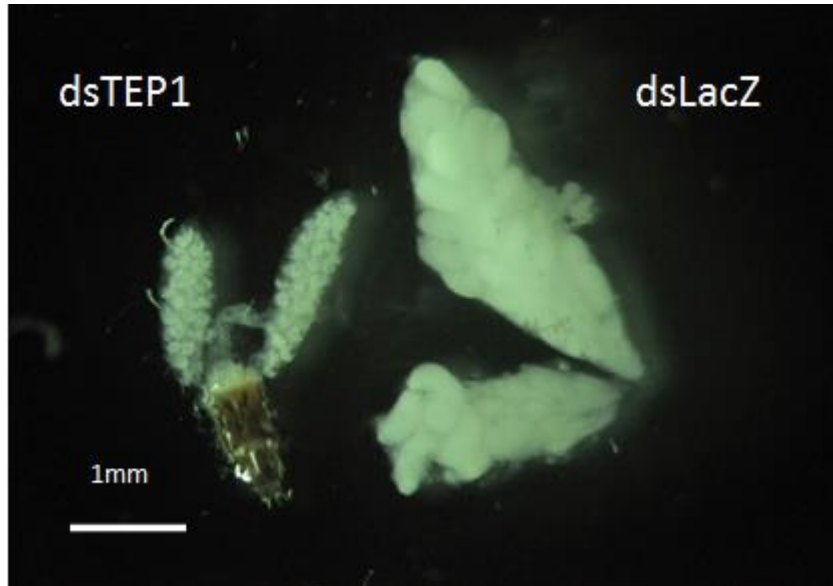
圖(二十一)

由以下表(一)我們可以發現，TEP1 基因抑制之後，埃及斑蚊的產卵數量明顯下降。



(三) TEP1 抑制對病媒蚊卵巢發育之影響

將 TEP1 基因抑制之後的埃及斑蚊卵巢解剖觀察，我們可以發現其卵巢沒有表現黑化，與未黑化的 dsLacZ 卵巢比起來，可以看得出也沒有發育。



圖(二十二) TEP1 抑制對病媒蚊卵巢發育之影響

柒、 結論

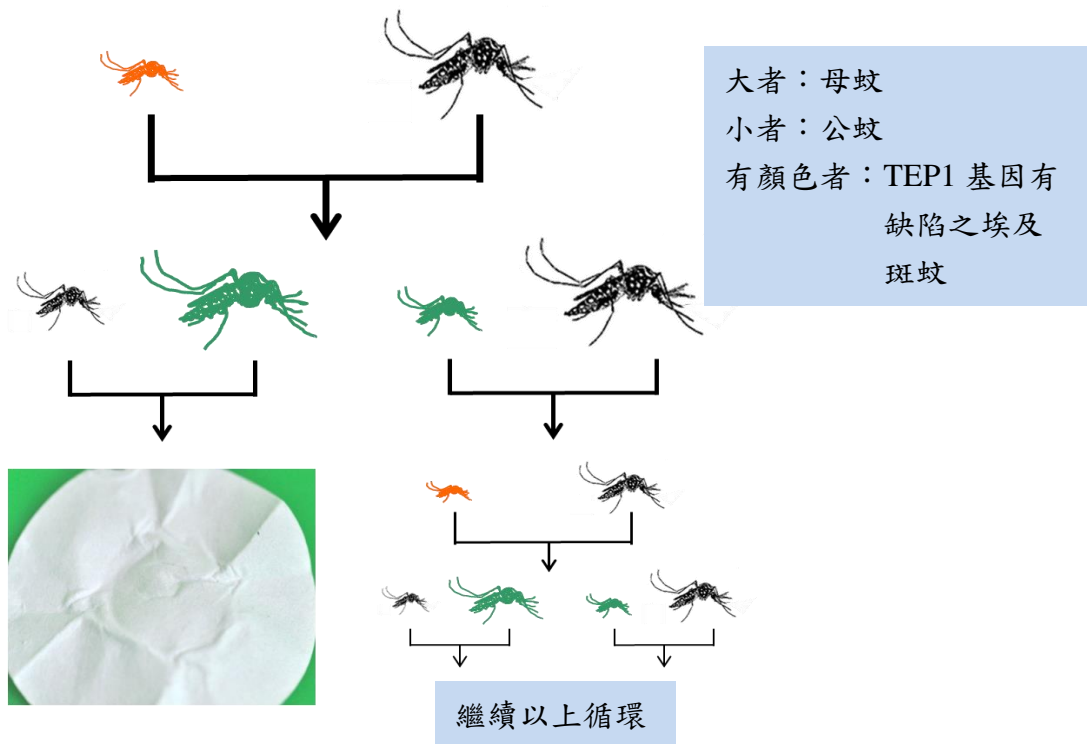
- (一) 藉由 RNA 干擾技術，我們發現埃及斑蚊 TEPI 基因受到抑制之後，明顯抑制埃及斑蚊產卵數量以及卵巢發育。
- (二) 我們證實埃及斑蚊 TEPI 基因參與病媒蚊產卵能力之調控。

捌、 討論

- (一) 不同的母蚊會有許多個別差異，因此我們在做完一個實驗流程後(一批母蚊後)，將再取另外兩批不同時間出產的母蚊，從顯微注射的部分繼續做接下來的實驗。也就是將樣本數增加，以確定做出來的實驗結果在生物體內有普遍性。
- (二) 顯微注射的過程中，玻璃細針的粗細與注射技術對母蚊的生存率有很大的影響。

玖、 未來展望

未來將做近一步的實驗，製作基因改造的埃及斑蚊公蚊，並釋放這些TEP1基因有缺陷的公蚊到登革熱疫區，與野外母蚊交配。假設產下了TEP1基因有缺陷的子代，基因缺陷的母蚊將會如實驗的結果產卵數量減少甚至完全抑制其產卵能力，基因缺陷的公蚊則會繼續進行以上的循環(如圖二十三)。建立新的登革熱防治策略，可有效降低病媒蚊數量，減緩疫情。



圖(二十三)

壹拾、 參考文獻來源

1. 高中選修生物(下)龍騰版
2. 劉玉婷(民101) Notch參與調控埃及斑蚊胚胎發育之功能性分析
3. 黃瓊瑩Chiung-Yin Huang熱帶醫學研究所
多巴去羧基酵素及多巴色素轉換酵素在蚊子黑化反應中所佔之角色
4. 江幸福，羅禮智 昆蟲黑化現象（中國農業科學院植物保護研究所，植物病蟲害生物學重點實驗室，北京52）
5. 師大附中 姚柔安、張純髣、陳奕璇、胡旻峯（民98）線蟲老化之研究
6. Sequence <http://www.vectorbase.org/>
7. Primer design <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
8. Alignment <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
9. Reverse Complement http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
10. 埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)的基因體定序
http://www.sciscape.org/news_detail.php?news_id=2245

評語

1. 本研究主旨在於利用 RNA 干擾的技術抑制埃及斑蚊含脂硫蛋白 TEP1 的表現，發現可以抑制產卵能力。
2. 對於學生的研究精神與實驗過程中的辛勞，給予高度嘉許。
3. 建議本研究後續的持續探討與未來的展望，將有益助新的登革熱防治策略。