

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高級中等學校組 動物與醫學科

佳作

052005

建立線蚓(*Enchytraeus sp.*) RNAi 實驗模式並  
探究 Hedgehog 基因對其生長與再生之功能

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 游涵宇 高二 張言晞	指導老師： 李宏孝 許一懿
-------------------------	---------------------

關鍵詞：線蚓、Hedgehog、再生

## 摘要

線蚓(*Enchytraeus* sp.)與蚯蚓同屬於環節動物門，具有很強的再生能力。*Hedgehog(Hh)*基因在兩側對稱動物中對體節發育有重要的調控作用，而先前研究中已發現線蚓體內的 *Hh* 基因序列，所以本研究希望利用調控線蚓體內 *Hh* 基因的表現，探討 *Hh* 基因在環節動物生長與再生中的功能。

本實驗首次嘗試將 RNAi 技術應用在線蚓上。將線蚓浸泡在含有 *Enc-Hh* 的 dsRNA 溶液中以操作 RNAi。利用免疫螢光染色法發現 *Hh* 基因受到抑制後，線蚓新生體節神經的連接不完整，顯示 *Hh* 基因與神經發育有相關性。由於線蚓快速的再生速度、飼養容易、構造簡單及身體透明且方便染色觀察，透過線蚓 RNAi 技術的建立，除了能進一步探討 *Hh* 基因功能外，也希望提供再生研究時的另一種選擇方式。

## 壹、研究動機

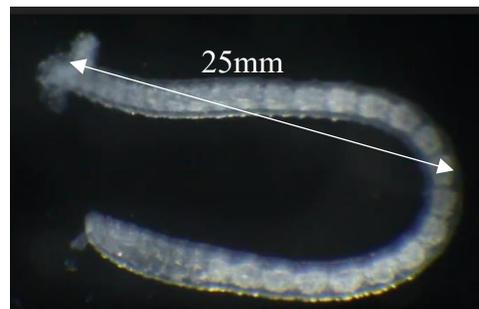
從先前的新聞報導得知，科學家從渦蟲中分離出成體多能性幹細胞亞型，解開了渦蟲強大再生能力的原因，因此開始對生物體內的再生機制感到好奇。在許多具有再生能力的生物中，蚯蚓是生活中常見的物種，但其再生能力有限。接著，從廣泛文獻探索中，發現與蚯蚓同屬於環節動物門的線蚓 (*Enchytraeus* sp.)，不僅具有良好的再生能力也很容易飼養，因此選定其作為研究對象。

線蚓與常見的模式生物線蟲不同，是環節動物門環帶綱寡毛亞綱 (*oligochaetes*) 中一種親緣關係較接近蚯蚓的生物，如圖一。其外觀類似蚯蚓，頭部有類似蚯蚓環帶的 *septal glands*，體長約 50 毫米，直徑約 40 微米，全體透明，生活於陰暗處的土壤中。線蚓的有性生殖極少，主要以斷裂方式進行無性生殖，在環境良好情況下，一個直徑 14 公分圓形培養基上的線蚓族群可在一個多月後由 10 隻達到最多約 50 隻，並維持族群穩定約三個月~六個月。

線蚓具有強大且快速的再生能力，個體可以在斷裂後三到四天再生出完整尾部，或在六至八天後生成頭部，並長成完整個體 (陳, 2017)。目前再生研究較多的無脊椎動物，如水螅及渦蟲，是以成體的全能 (*totipotent*) 或多能 (*pluripotent*) 幹細胞進行再生修復 (Bode, 1996, Aboobaker, 2011, Reddien, 2013)，但這類型幹細胞並不存在於脊椎動物成體中。相較於兩者，

線蚓的再生過程包含斷裂傷口癒合→新分裂出的細胞形成未分化胚基(blastema)→胚基組織的發育→胚基衍生組織的生長與分化，再生過程與脊椎動物的再生及傷口癒合過程較相近。

除了具有再生能力強的優點，線蚓也易於在實驗室中培養，通常將其飼養於濾紙或瓊脂 (agar) 培養基上。此外，線蚓由於全體透明，方便染色觀察，就各條件而言極有潛力作為脊椎動物再生研究的參考模型。

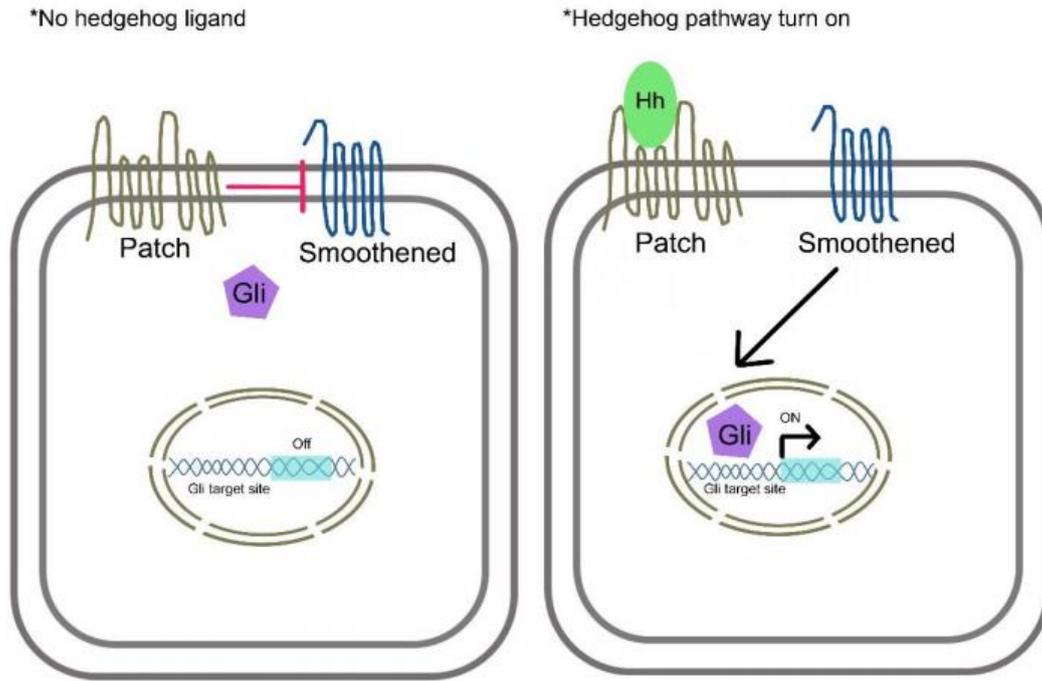


圖一、線蚓

另一方面，已知刺蝟信號通路 (Hedgehog signaling pathway) 是動物發育的關鍵調控之一 (Nüsslein-Volhard, *et. al.*, 1980)，在許多兩側對稱動物中都有表達。其調控機制中有四個主要的控制要素：Hh 配體蛋白 (hedgehog ligand protein, 簡稱 Hh)、patched 受體 (patched receptor, 簡稱 Ptch)、smoothed 受體 (smoothed receptor, 簡稱 smo) 和 gli 轉錄因子 (gli transcriptional factor, 簡稱 gli)。

當 Hh pathway 關閉時，ptch 會抑制 smo，gli 因 smo 不作用，滯留在細胞質中，故無法進入細胞核內控制其目標基因的表現；反之，當 Hh pathway 啟動時，Hh 會和 ptch 結合，使 ptch 無法抑制 smo，smo 得以促使 gli 進入細胞核，調節 Hh pathway 下游基因的表現 (Ingham, *et. al.*, 1991, Von Ohlen, *et. al.*, 1997, Ingham, *et. al.*, 2000, Huangfu, *et. al.*, 2006, Rahnama, *et. al.*, 2006)。

脊椎動物當中，一個物種通常有多個刺蝟因子基因，包含 *SHH* (Sonic hedgehog)、*DHH* (desert hedgehog)、*IHH* (Indian hedgehog)、*EHH* (Echidna hedgehog) 和 *TwHH* (Tiggywinkle hedgehog) 等，而無脊椎動物通常僅有一個 Hedgehog 基因。在果蠅中發現，Hedgehog 基因突變的胚胎形狀較為矮胖，其幼蟲則短小多毛 (Mohler, Jym. 1988)，因此將此基因命名為「刺蝟」，這樣的形態肇因於胚胎體節的不正常發育，可見 Hedgehog 基因對果蠅體節發育有極大的影響。



圖二、HH pathway 示意圖 (陳, 2017)

由於先前的研究已經找到線蚓的 *Hh* 基因序列，故在本實驗中，希望更進一步探討 *Hh* 基因表現對線蚓生長與再生過程中所扮演的角色。然而，在臺灣有關線蚓的研究非常少，因此嘗試對線蚓進行 RNAi，以建立一套可以調控線蚓 *Hh* 基因的研究方法。考量到線蚓以無性生殖為主，極少有胚胎產生，且本研究欲了解成體的再生，因此不使用顯微注射，改為測試較簡便的方法，即利用浸泡的方式進行。預期將線蚓浸泡在 dsRNA 溶液裡，能使 dsRNA 滲透進入線蚓蟲體，進而將蟲體內目標基因的 mRNA 降解，達到基因靜默的效果。此種浸泡法於渦蟲中有成功的先例(Orii, *et. al.*, 2003)。

## 貳、研究目的

由於先前關於線蚓基因的相關研究較少，但牠再生的能力強、生活史短且易於培養，很適合做為研究再生機制的實驗對象。因此本研究欲建立一套簡單有效的線蚓 RNAi 技術並透過此方法研究特定基因的功能。本次實驗的研究問題有二：

- 一. 建立以線蚓為模式之 RNAi 技術並評估其成效
- 二. 以 RNAi 技術研究 *Enc-hh* 基因在線蚓再生時的功能

## 參、研究設備及器材

### 一、PCR 藥品及配方

Plasmid DNA (~1 ng/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
SP6 promoter primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
T7 promoter primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	11 $\mu$ l
2x master mix	12.5 $\mu$ l

### 二、RNA transcription 藥品、配方及器材

RNase inhibitor (20 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
SP6 RNA Polymerase (20 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
T7 RNA Polymerase (20 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
NTP 10X (10 mM)	2 $\mu$ l
Transcription buffer 5X	4 $\mu$ l
DNA (第 1 項中 PCR 產物) +ddH <sub>2</sub> O	9 $\mu$ l
培養箱，溫度設定為 37°C	

### 三、RT-PCR 藥品及配方

Total RNA	0.1ng-0.5ng
Random hexamer primer	1 $\mu$ l
Nuclease-free water	to 12 $\mu$ l
5X reation buffer	4 $\mu$ l
Ribolock RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10mM dNTP Mix	2 $\mu$ l
Revert Aid H Minus M-MnLV Reverse Transcriptase	2 $\mu$ l

### 四、凝膠電泳藥品、配方及器材

使用 1.5%的膠體(0.4g Agarose 加 40ml TAE buffer)，電壓為 150V，電流為 250A，電泳 20 分鐘後用藍光檢視。

膠體	約 40ml
TAE buffer	
Marker	5 $\mu$ l
SYBR® Safe DNA Gel Stain	4 $\mu$ l
電源供應器	
電泳槽	

## 肆、研究過程或方法

### 一、研究動物

#### (一) 線蚓 (*Enchytraeus*)

實驗室的線蚓最初由潮濕陰暗處的腐植土中分離出來，本研究則使用在實驗室經人工培養的線蚓，如圖三。在飼養方面，相較於線蟲以細菌為食，線蚓攝取簡單的有機質，且可同時大量飼養同一培養基，飼養容易。線蚓培養的方法如下：

##### 1. Agar 培養基的製作與線蚓飼養

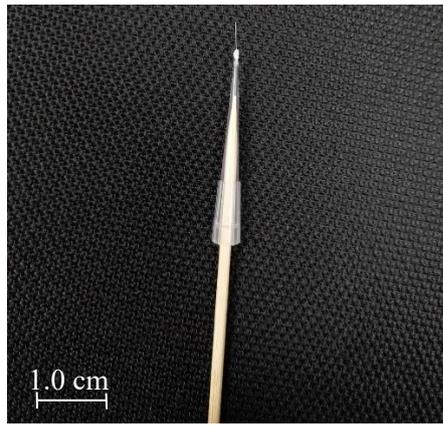
以直徑 14 公分的圓形培養皿盛裝 1% 洋菜膠（厚度約 0.5 公分），每個培養皿中的線蚓數量約在 20~40 隻之間。飼養於攝氏 22 度恆溫箱內，每 2~3 天澆淋自來水以補充膠體水分，作為有機養分來源的磨碎燕麥則均勻置於膠體上層，視情況添加，每次 2~3 克，以避免過多微生物孳生，影響線蚓生長。



圖三、線蚓在培養皿中的情形

##### 2. 挑選及分盤

自製用滴管尖、竹籤和細針製成的簡易工具如圖四，以挑起實驗用的線蚓。挑起線蚓時，將線蚓從身體中段挑起，移到其他實驗器材如試管、培養盤或培養皿中。若線蚓大量增生，或原本飼養環境過於惡劣，則需分盤。另外以圓形培養皿製作 1% 洋菜膠體，待膠體凝固後將線蚓挑入，即完成分盤。分盤後定期提供水分和食物，待族群增生並達穩定後始可使用。



圖四、自製挑取線蚓的簡易工具

## 二、實驗方法

### (一) RNA 沉澱

將轉錄後的 RNA 溶液(20 $\mu$ l)加入 EDTA(0.5M) 1 $\mu$ l、LiCl(6M) 4 $\mu$ l 及 100%酒精 75 $\mu$ l，放於-20°C 冰箱約 1 小時，冷凍離心(4°C)15 分鐘，接著捨棄上清液，加入 70%酒精 1ml 室溫離心 5 分鐘，此步驟重複 1~2 次，將酒精抽乾，放置於室溫至殘留酒精完全揮發，最後加入 10 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 後(可視情況增減)存放於-80°C 冰箱。

### (二) Direct-zol™ RNA MiniPrep

在樣本中加入 500 $\mu$ l 的 TRI Reagent®後用 Tube Micropestles 將之搗碎，接著加入酒精 (95%-100%)均勻混合，離心 1min，取上清液放入 Zymo-Spin™ IIC Column 和 Collection Tube，離心 1min(12000xg)，捨棄液體，再加 400 $\mu$ l 的 Direct-zol™ RNA PreWash 離心 1min(12000xg)，捨棄液體，重複此步驟一次，加入 700 $\mu$ l RNA Wash Buffer 離心 1min(12000 xg)，捨棄液體，為了排空液體，將 column 放入新的 collection tube 離心 2min(12000xg)，最後將 column 放入 RNase-free tube 並加入 50 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 後(可視情況增減)離心 1min(12000xg)。

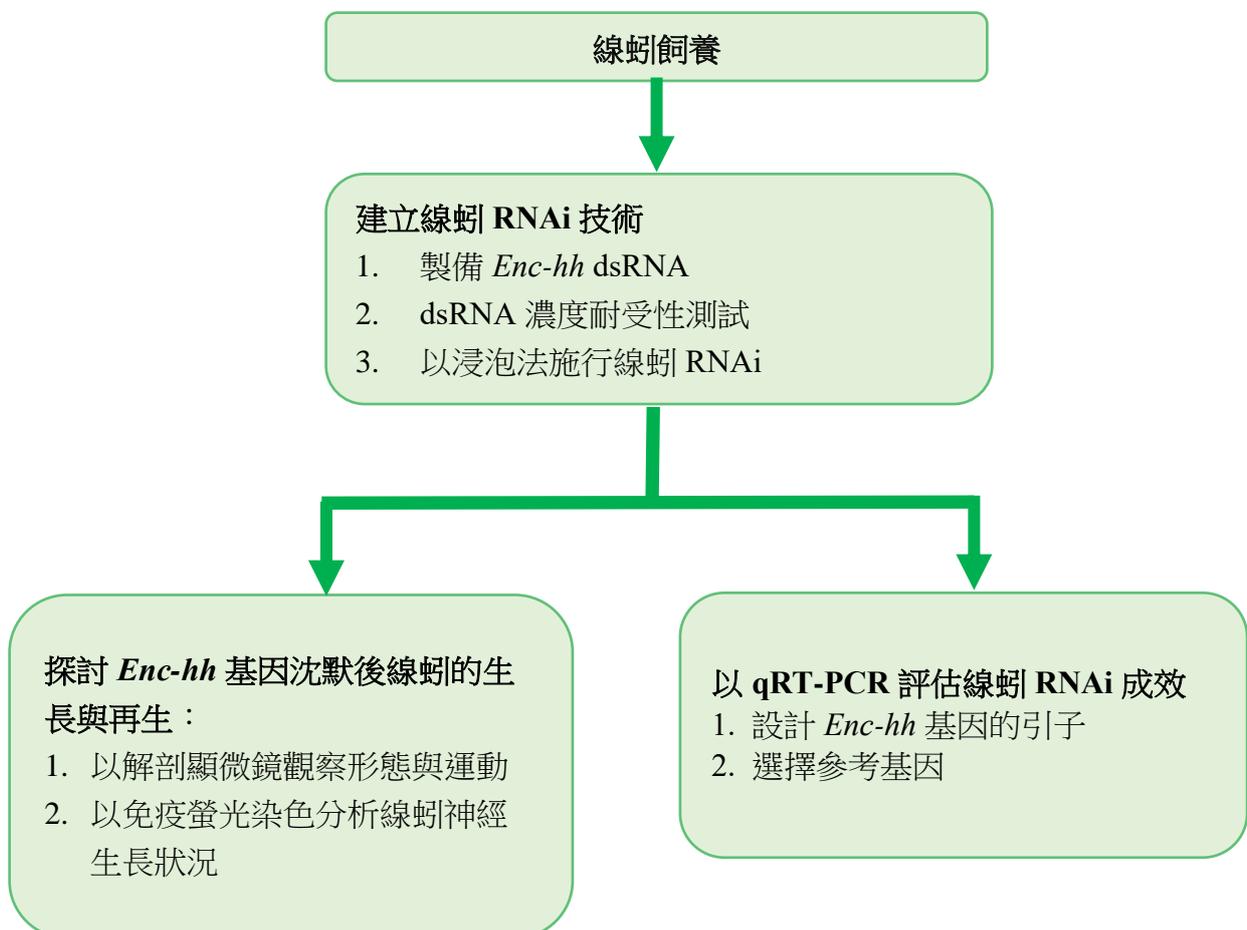
### (三) qRT-PCR( real-time quantitative reverse transcription-PCR)

以反轉錄 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)將經過 RNAi 處理後的線蚓全體 Mrna 轉錄成數個 cDNA 樣本後,將各個樣本的 3 $\mu$ g cDNA 與 3 $\mu$ l 的 primer 混合,加入 30 $\mu$ l SYBR Green 並加入 ddH<sub>2</sub>O 至總體積為 60 $\mu$ l,並平分成三份,分別加入 96 孔盤的三個 well 裡。

反轉錄 PCR 透過反轉錄酶將單鏈的 mRNA 轉錄成 cDNA,以進行後續對基因表現量的檢測。即時定量 PCR(real-time quantitative PCR ; qRT-PCR )除了可以縮短反應時間、提高效率和靈敏度之外,相對於傳統 PCR(end-point PCR)利用凝膠電泳在 DNA 擴增後進行測定, qPCR 利用非專一性染劑 SYBR Green 和 dsDNA 結合發出螢光,透過偵測每一個 PCR cycle 結束後發出的螢光量,可以收集實驗過程中的數據,配合標準曲線可以計算出目標基因的表現量。

## 三、實驗過程

### (一) 研究架構圖



圖五、研究架構圖

## (二) 以 *Enc-hh* dsRNA 建立線蚓之 RNAi 技術

### 1. 實驗流程

為建立線蚓 RNAi 技術，設計以下實驗流程：

- (1) 製備 *Enc-hh* 基因的 dsRNA 片段
- (2) 對線蚓進行 RNAi
- (3) 萃取線蚓 RNA，反轉錄成 cDNA，確認 cDNA 濃度及品質後保存，並用 qPCR 檢測 *Enc-hh* 基因表現量

### 2. 製備 *Enc-hh* 基因的 dsRNA 片段

首先在 *Enc-Hh* 基因中選取片段，用於製作 RNAi 所需的 dsRNA。dsRNA 在 *Enc-Hh* 基因上的位置如圖六（圖中畫線部分皆為引子，所用 dsRNA 為引子包夾區域）。

另外，在進行濃度耐受性測試時，為了能確認線蚓的存活狀況只會受到 dsRNA 水溶液滲透濃度影響，排除 *Enc-Hh* 基因的效應，因此選擇了大小和前述片段相近的綠螢光蛋白基因(GFP)做為控制組。

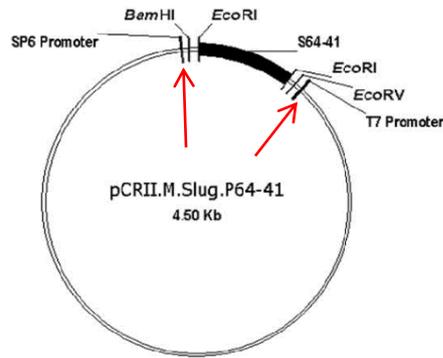
兩組皆插入質體中（切位如圖七所示，以 SP6, T7 為啟動子），利用質體做為模板擴增後，以同樣的啟動子分別轉錄成 *Enc-Hh*, GFP 的 dsRNA。

```

* 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 *
1  aactcagaaaaaccatttcgctacagcacaacatcttttcgccaatgtagaggcggttgcaatttcaactgcaga
76  tttttattaacttttgattactacttttaataatttattcacccagtcgacccatgoggtccaggaaggggtac
151 ggattcaggagggcccccgaaaaatgacaccactagtcacacaagcagcatgtaccgagtgttctgaaaccacc
226 ttgggggctagcgggcccccgagggtaaaatcttacgtggcgatgctaaaaatgaagaagtggtagtcaattac
301 aacaaagagattgtgtttaaggatgaagaggggaaccggagctgatagaattatgagcaagaggtgaaggagttg
376 ttggacgcctgtcggtagctggttatgaatcagtgagggggtgcggtgatggtgacggaggcctgggacgag
451 gagggcacgcacgcccctgagtcacctccactacgagggggcgggcgtcgatatcgtcaccgatgatcgggatcgg
526 tcgaagtacggcatgctggcccgcctggccgctcgaggtgggcttcgattgggtctattatgagtcgagggggcat
601 gtgcattgttctgttaagtcagactcttcocataaactctgagaacaggcggatgctttccggagacgaagaagt
676 gaattggagtttggccagaagaagagcctctccgacctcaaaataggagatcgagttcttgccatggacaacaac
751 cagaatcccatttacgatgaagtcattggatttatccaccgtgacaccaatcttcccatgatatacaggtgta
826 gaattaggagatgggagaaagtattctttaactctgatcatttgatttacacacaaagtgactcctcaaagcaa
901 gaaatcgttttcgtcggctctctaaaggaaggaagtttgtctacacactacacagtaatgaaactcttgaactt
976 ttaacaacacagacttacacgaatctacatttcgcccataaacagagttgattttgttaagaagacgggtgtc
1051 tatgcacctcttacttacagcgaacaatagtcgtaagtggtgctgctgactcgtgctatgcatccgtgaatagt
1126 cactggctagcacatatttcgatgacgccgatgcatggaacgcataatttgatgacgtcatttggcggagagac
1201 gataaaatacagaatgaggaattcattgggttagcgaagattctgcagagatttggaacaacatgattaccgtcg
1276 agttattggtaacataa

```

圖六、實驗用 dsRNA 在 *Enc-Hh* 基因上序列圖（序列大小:665bp）



圖七、質體 DNA 切位圖

### 3. RNAi

因線蚓以行無性生殖居多，不易取得胚胎，以顯微注射對卵進行 RNAi 較難達成，所以參考文獻中使用浸泡的方法對渦蟲進行 RNAi 的研究，設計以下實驗。

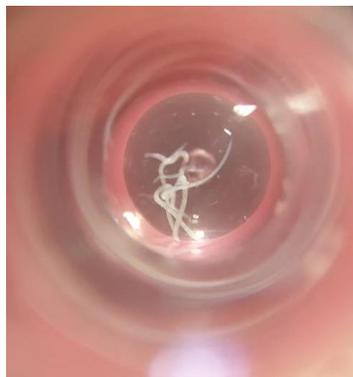
#### (1) RNAi 流程圖



圖八、RNAi 流程圖

#### (2) 線蚓對 dsRNA 之濃度耐受性測試

預期在濃度越高的 *Enc-Hh* dsRNA 水溶液中，RNAi 的效果應該越好。為了找尋最有效，同時又不會使線蚓因滲透壓過高而死亡的濃度，將線蚓五隻為一組浸泡於不同濃度的 *Enc-Hh* dsRNA 水溶液中五個小時，如圖九，同時以浸泡於不同濃度 GFP dsRNA 水溶液中的組別對照，觀察其存活狀況。



圖九、浸泡示意圖。五隻為一組的線蚓浸泡在 1.5 ml eppendorf 中，總體積為 100 $\mu$ l 的溶液。

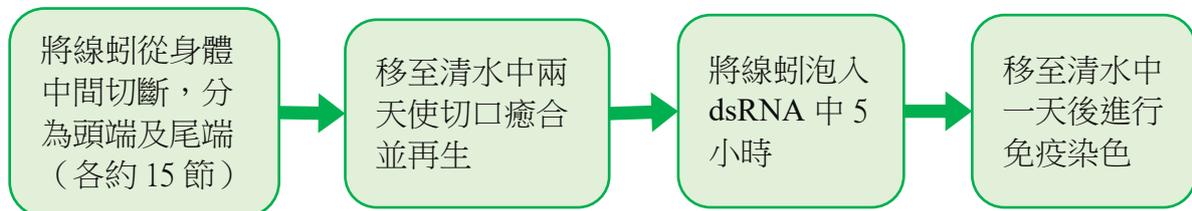
### (3) 製作 cDNA

將實驗組浸泡 *Enc-Hh* dsRNA，控制組浸泡 GFP dsRNA 各五小時後，將線蚓轉換到清水中，三天後收集，抽取 RNA 並反轉錄為 cDNA。

### (三) 以免疫螢光染色(immunostaining)觀察再生狀況

確認 RNAi 的效果後，初步以解剖顯微鏡觀察發現，經 RNAi 處理過後的線蚓在形態或運動上與正常線蚓差異不大。接著，從文獻探討中發現 Hh 基因除了會影響體節發育外，也會影響果蠅、斑馬魚發育早期的神經生成 (Krauss, S., *et. al.*, 1993)，因此推廣到研究線蚓神經的生長與再生情形。

首先對無 RNAi 處理的完整線蚓個體、切斷後再生完成的線蚓個體，以 anti-acetylated  $\alpha$ -tubulins 進行免疫染色，從神經軸突及細胞的分布推測與經 RNAi 處理後的線蚓在再生後形態上的差異。再將線蚓以十隻為一組，分成三組，切成兩段後分別進行頭端再生及尾端再生兩天，再將各組分成浸泡 2% *Enc-Hh* dsRNA、GFP dsRNA 和置於清水中，五小時後將浸泡 dsRNA 的組別轉置清水中，等待一天後進行染色。流程圖如下：



圖十、觀察再生狀況之流程圖

### (四) 利用 qRT-PCR 評估線蚓 RNAi 技術之成效

#### 1. 設計引子

引子 *Enc-Hh* qPCR (以 A, B, C, D, E 編號) 的位置如圖十一。利用 qRT-PCR 檢測時，為防止殘留於線蚓體內的 dsRNA 干擾實驗結果，選取了數組在 *Enc-Hh* 基因上，但不包含在浸泡用 dsRNA 序列中的引子。





表一、常用參考基因與線蚓基因序列比對結果

Gene	比對結果
Chromosome 1 open reading frame 43	unmatch
Charged multivesicular body protein 2A (CHMP2A)	match
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EF1a)	match
Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)	match
Proteasome subunit beta type 2	unmatch
Proteasome subunit beta type 4	unmatch
Member RAS oncogene family	unmatch
Receptor accessory protein 5	unmatch
Small nuclear ribonucleoprotein D3	unmatch
Vacuolar protein sorting 29 homolog	unmatch
Valosin containing protein (VCP)	match
Homo sapiens transferrin receptor (TFRC)	unmatch
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	match
Beta-actin ( $\beta$ -actin)	match

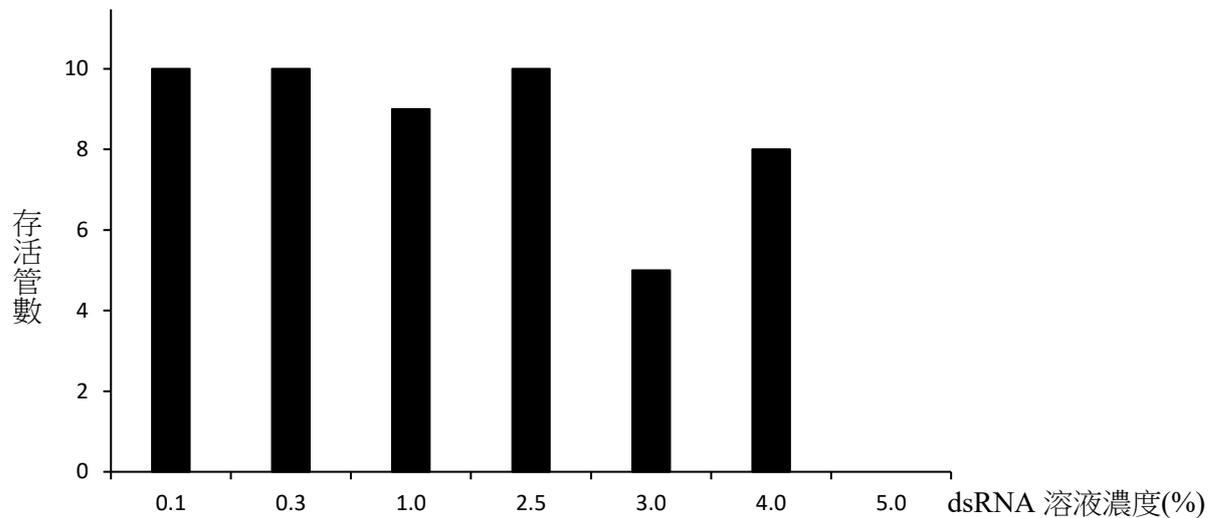
## 伍、研究結果

### 一、研究結果

#### (一) 線蚓 RNAi

##### 1. 濃度耐受性測試

在此處定義管內 5 隻線蚓中若死亡數小於 2，則該管視為存活；反之則視為死亡。在 GFP dsRNA 和 *Enc-Hh* dsRNA 的對照中，結果顯示泡在 *Enc-Hh* dsRNA 的線蚓相較於等濃度 GFP dsRNA 的組別，存活率普遍較低。數次試驗（每個濃度測試 10 管，共 50 隻）後，可以得知 dsRNA 濃度高於 5% 時，線蚓幾乎全部死亡，而在 4% 以下的 dsRNA 水溶液中，線蚓較有機會存活，如圖十二。考量到濃度可能必須較高，RNAi 才有效，以及各濃度之間的差值大小，後續實驗選取了 1%、2% 及 4% 水溶液進行。



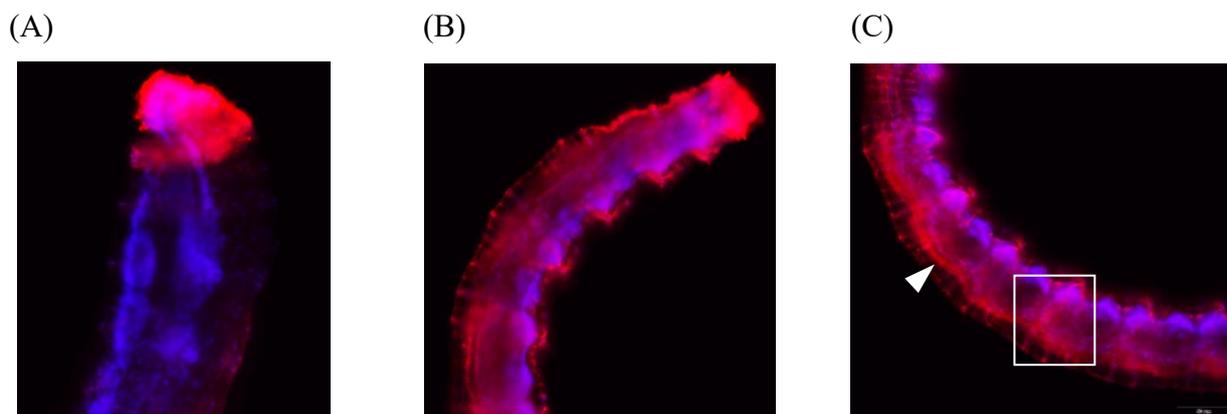
圖十二、線蚓浸泡在不同濃度 *Enc-Hh* dsRNA 中的存活情形

## (二) 以免疫螢光染色(immunostaining)觀察再生狀況

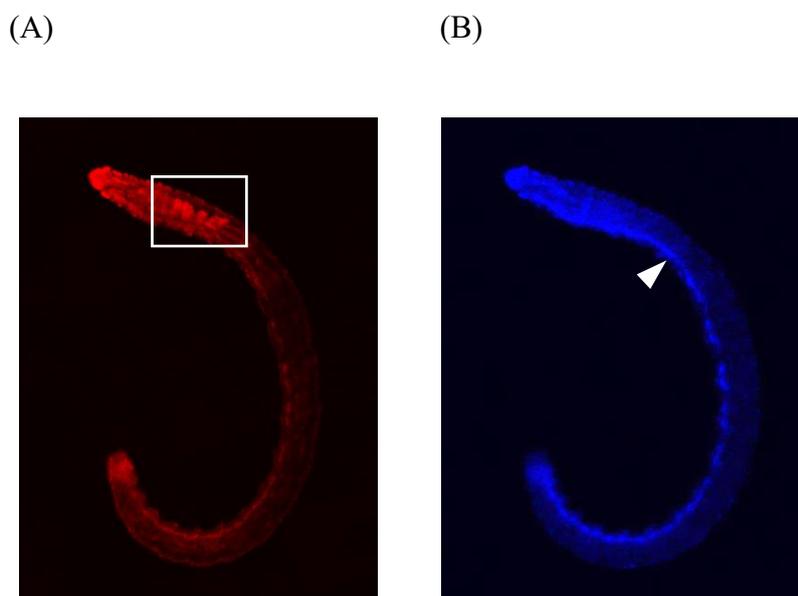
### 1. 完整線蚓個體

首先將未經 RNAi 處理的完整線蚓個體（以下稱 *intact sample*）進行免疫螢光染色，以螢光顯微鏡觀察，結果如圖十三、十四所示。圖十三(A)~(C)依序為線蚓頭部、尾部、軀幹中段，圖十四(A)、(B)為線蚓全體。圖中藍色部分是以 DAPI 染細胞核，用以確認線蚓蟲體未在染色過程中破損；紅色部分是 acetyl- $\alpha$ -tubulins 染色，因為拍攝時放大倍率為 40 倍，故在此可以表示神經組織分布位置。

從圖十三(A)、(B)中可以看到在 *intact sample* 中，頭部和尾部的神經密集，而(C)圖可以看出軀幹部分每一體節有數條主要的橫向神經，中間有縱向神經連接。圖十四(A)中，圓圈處為頭部的 *septal glands*，共四對，解剖顯微鏡下可見，可用於區分頭尾，(B)圖中箭頭所指訊號較強且貫穿全身的是腹部神經索(*ventral ganglia*)，在檢視染色樣本時用於辨識腹側。



圖十三、一隻完整線蚓的染色，顯示神經分布狀態（放大倍率：40 倍）。藍色部分是 DAPI 染色結果，顯示細胞核；紅色部分是 anti-acetyl- $\alpha$ -tubulins 標記並以二抗 goat anti mouse Alexa fluor 555 染色，可表現神經分布情形。圖(A)為本隻線蚓的頭部；圖(B)為本隻線蚓的尾部；圖(C)為本隻線蚓的軀幹中段，箭頭所指為縱向神經，方框標示區域為橫向神經。

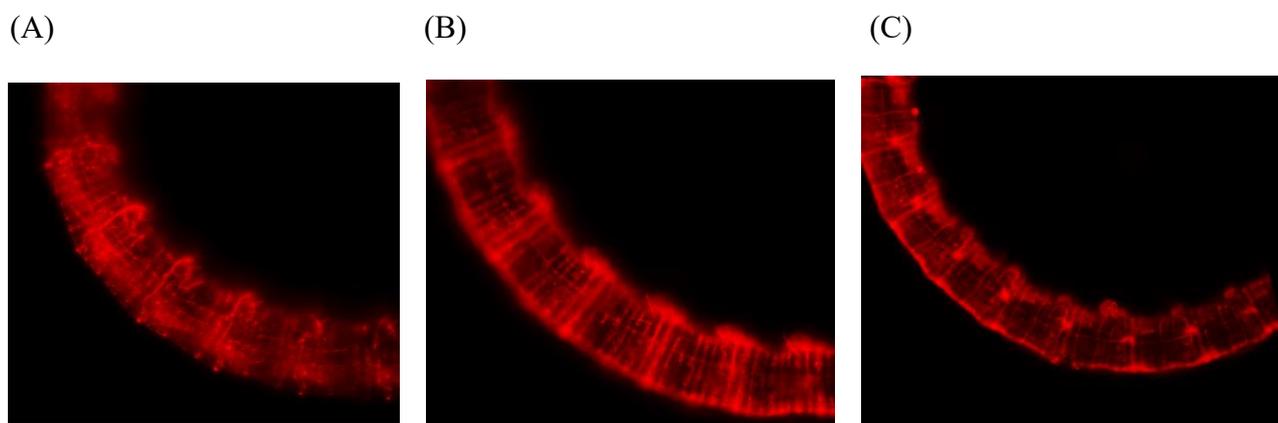


圖十四、線蚓構造（陳，2017）。圖(A)為線蚓全體 PI 染色，框線標示為頭部 septal glands；圖(B)為線蚓全體 DAPI 染色，箭頭所指為 ventral ganglia。

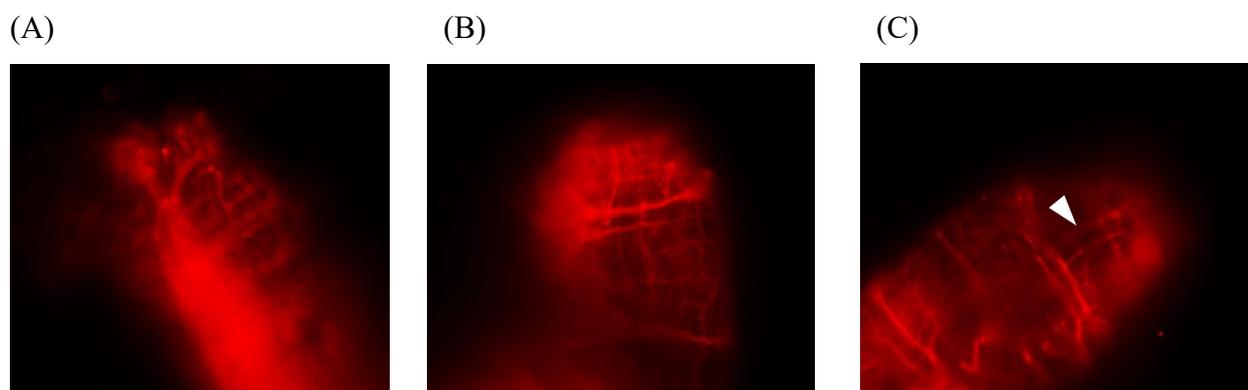
## 2. 經 RNAi 處理的完整線蚓個體

進行再生狀況觀察前，先將完整未切斷的線蚓浸泡在 dsRNA 水溶液中五小時，轉置清水中一天後進行免疫染色，結果如圖十五、十六，在圖十五(A)~(C)中可看到，浸泡清水的組別 (intact sample)、作為對照組的浸泡 GFP dsRNA 組以及浸泡 *Enc-hh* dsRNA 後的線蚓，軀幹中段部位的神經連接皆完整。推測原先已生長的神經，其連接狀況不受 *Hh* 基因的表現影響。而在圖十六(A)(B)可以發現，intact sample 以及作

為對照組的浸泡 GFP dsRNA 組，局部放大的尾端生長區(posterior growth zone)周圍有一對從腹側延伸的縱向神經，會在尾部末端繞到背側，但圖十六(C)顯示，浸泡 *Enc-hh* dsRNA 後的線蚓其縱向神經在末端不完整，推測 *Hh* 基因基因的表現會影響成體線蚓體節的延長。



圖十五、浸泡於 H<sub>2</sub>O、GFP dsRNA 及 *Enc-hh* dsRNA 溶液後的完整線蚓軀幹神經生長情形及其對照組（放大倍率：40 倍）圖(A)為 intact sample 軀幹；圖(B)為浸泡 GFP dsRNA 之完整線蚓個體軀幹；圖(C)為浸泡 *Enc-hh* dsRNA 之完整線蚓個體軀幹



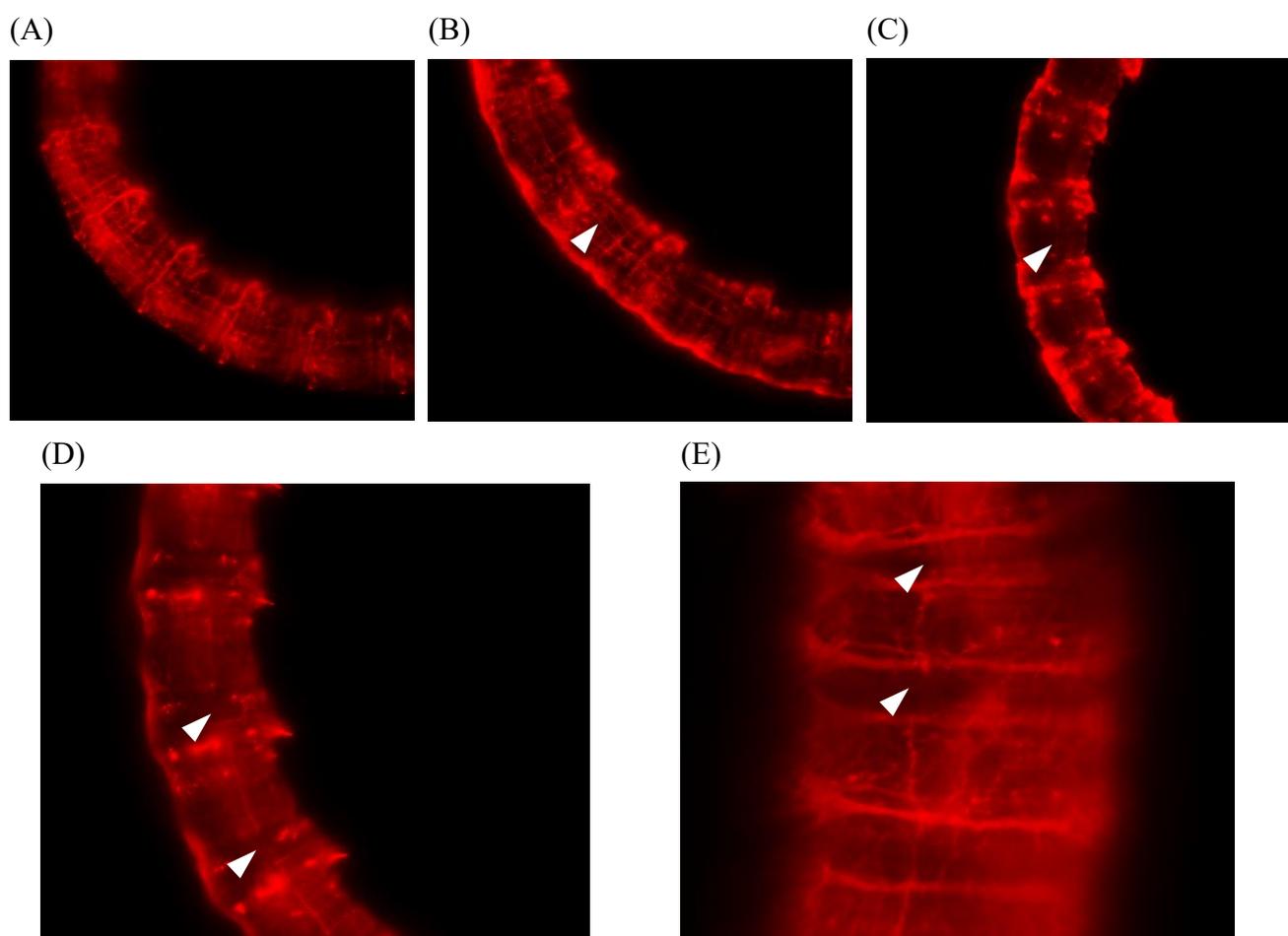
圖十六、浸泡於 H<sub>2</sub>O、GFP dsRNA 及 *Enc-hh* dsRNA 溶液後的完整線蚓，其尾端生長區周圍神經生長情形（放大倍率：100 倍）圖(A)為 intact sample 尾部；圖(B)為浸泡 GFP dsRNA 之完整線蚓個體尾部；圖(C)為浸泡 *Enc-hh* dsRNA 之完整線蚓個體尾部

### 3. 切斷後再生過程中經 RNAi 處理的線蚓個體

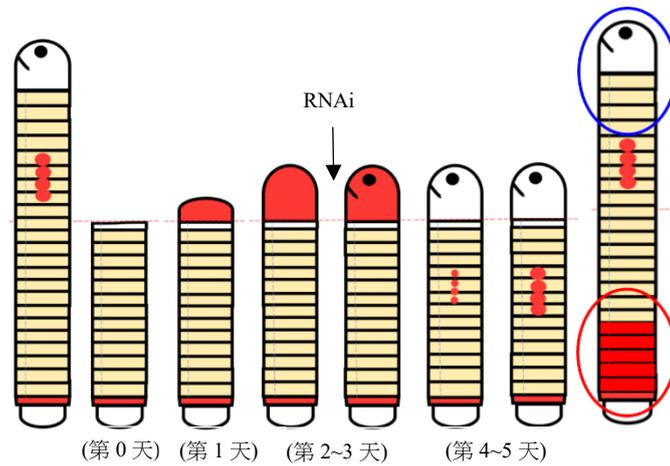
經過切斷處理的線蚓，在初步檢視後，發現無論是在頭端或尾端再生，其軀幹在外觀上的復原和生長狀況與 intact sample 相比沒有明顯差別，因此圖十七皆只拍攝由尾端再生出之軀幹部分。切斷的處理及再生狀況的示意圖如圖十八所示。

由圖十七(A)~(C)對照可知，切斷後完全於清水中再生及浸泡在 GFP dsRNA 溶液中再生的組別，其再生後之體節的神經分布和 intact sample 的組別無異，橫向的神經間有縱向神經連接（箭頭處）。而在圖十七(D)和放大後的(E)中可以看到，當浸泡過 *Enc-hh* dsRNA 後，部分體節的縱向神經有連接不完整之情形，如(D)(E)二圖中箭頭所指，由此可知當線蚓經過 RNAi 處理後，神經的再生會受影響。

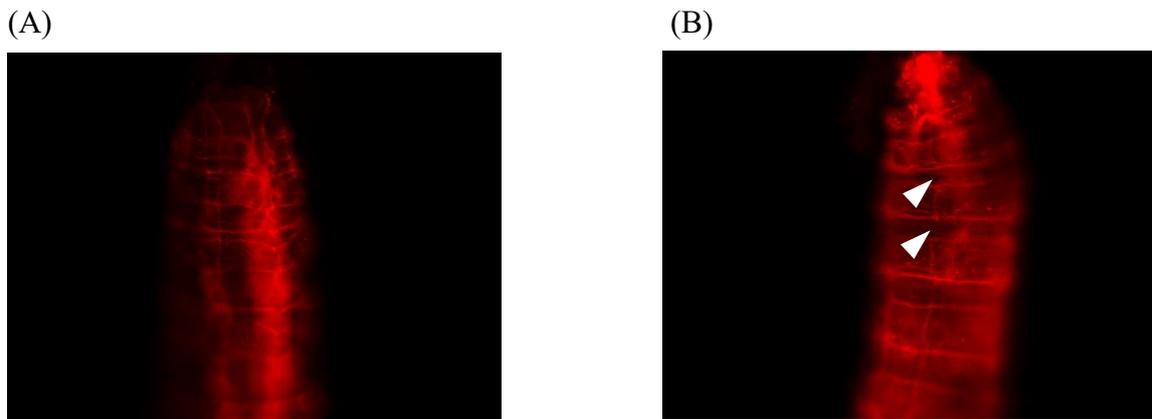
再者，將浸泡於 H<sub>2</sub>O 及 *Enc-hh* dsRNA 溶液後的線蚓由尾端再生出的頭部放大，如圖十九，也可以看到 H<sub>2</sub>O 組的神經連接完整，而 hh 組有縱向神經連接不完整的現象，如圖十九(A)中箭頭所指。



圖十七、浸泡於 H<sub>2</sub>O 後 GFP dsRNA 及 *Enc-hh* dsRNA 溶液後的線蚓由尾端再生出的軀幹神經生長情形 ((A)~(D)放大倍率：40 倍)。圖(A)為 intact sample 軀幹；圖(B)為浸泡 H<sub>2</sub>O 後線蚓的軀幹；圖(C)為浸泡 GFP dsRNA 後線蚓的軀幹；圖(D)為浸泡 *Enc-hh* dsRNA 後線蚓的軀幹；圖(E)為浸泡 *Enc-hh* dsRNA 後線蚓的軀幹（放大倍率:100 倍）。



圖十八、線蚓頭端再生示意圖（陳，2017）。其頭端再生順序依序為：線蚓傷口癒合→長出頭部→長出 *septal glands* →新生軀幹體節。觀察軀幹的再生神經時，選取的範圍如紅色圓圈所示；觀察頭部的再生神經時，選取的範圍如藍色圓圈所示。

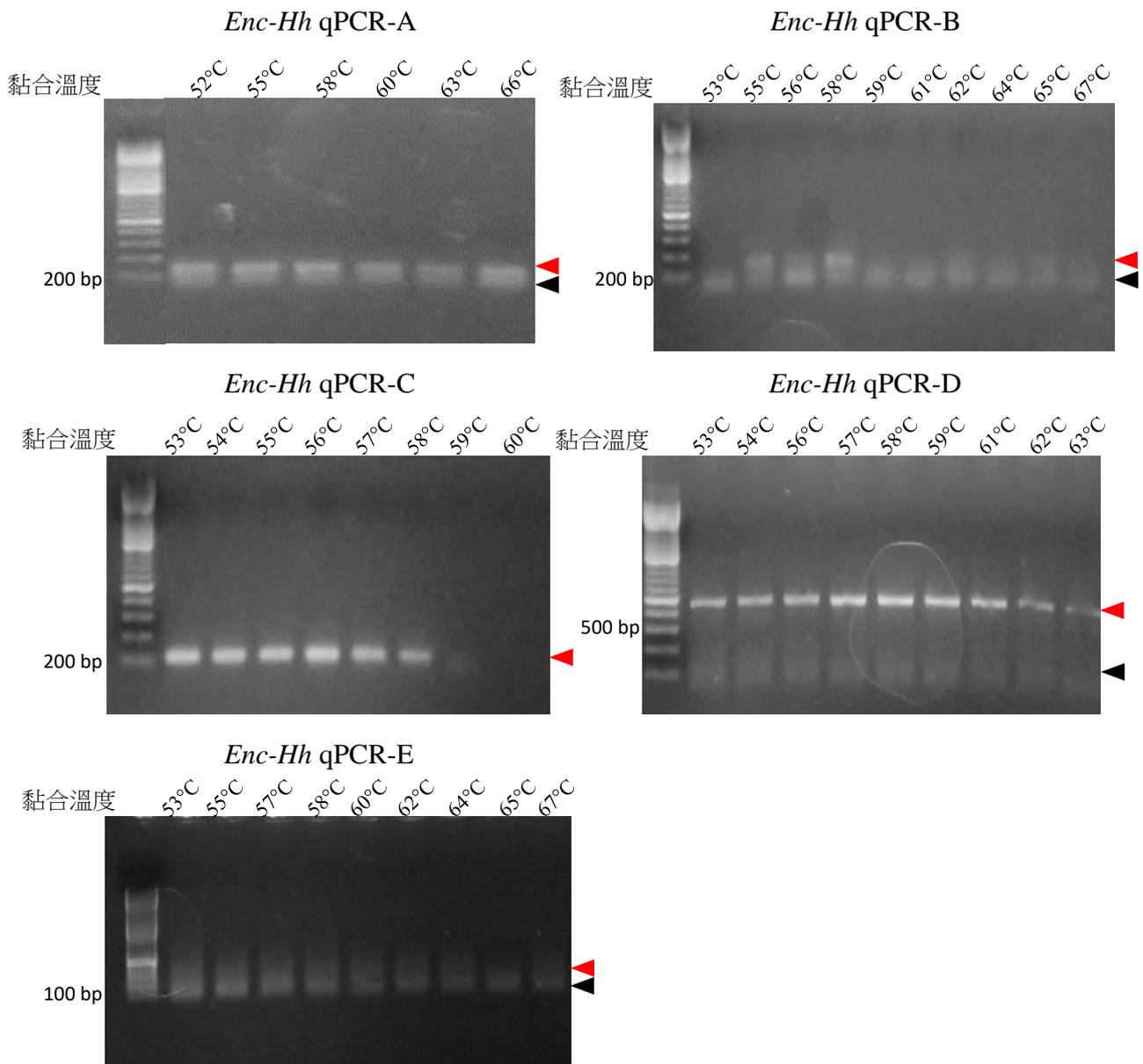


圖十九、浸泡於 H<sub>2</sub>O 及 *Enc-hh* dsRNA 溶液後的線蚓由尾端再生出的頭部神經生長情形，圖(A)為浸泡 H<sub>2</sub>O 後線蚓的頭部；圖(B)為浸泡 *Enc-hh* dsRNA 後線蚓的頭部

### (三) 以 qRT-PCR 評估線蚓 RNAi 成效

#### 1. 設計引子

為了確認最適合用於 qRT-PCR 的引子，以載有 *Enc-Hh* 基因片段的質體作為樣本，目標為尋找條帶 (band) 明顯的引子，而引子在 PCR 過程中互相黏合產生的非目標產物(primer dimer)會干擾實驗結果，故需考慮到目標產物和 primer dimer 的差異必須清楚可區分。同時以溫度梯度(gradient)尋找較佳黏合溫度(annealing temperature)。分別將 *Enc-Hh* qPCR-A, B, C, D, E 引子以黏合溫度梯度測試的結果如圖二十。



圖二十、引子測試電泳圖。紅色箭頭所指為 Target band，黑色箭頭為 Primer dimer。

由圖二十的電泳結果可知，除了 *Enc-Hh* qPCR-C，其他皆有 primer dimer（小於 100bp 的淺色條帶），故最後選擇序列長度較短(100~200bp)，但沒有 primer dimer，可清楚區分的 *Enc-Hh* qPCR-C 作為 qPCR 的引子，而黏合溫度則選取較低且使條帶明顯的 53 度。

## 2. 選擇參考基因

在以 qRT-PCR 測試並進行評估後，決定以  $\beta$ -actin 的部分序列作為後續分析 RNAi 成效時使用的參考基因。

## 陸、研究討論

### 對線蚓進行浸泡法 RNAi 的限制

實驗過程中發現 RNAi 的作用具有時效性，約 5 到 6 天後效果減弱，RNAi 處理的線蚓生長狀況即恢復至與一般線蚓無異。因此若要持續抑制特定基因的表現，可考慮對胚胎使用顯微注射，若想對胚胎進行研究，則必須找出可刺激線蚓進行有性生殖產生胚胎的方法，例如提供濕度較低、養分較少的逆境。

本研究由於線蚓的 qRT-PCR 技術仍在發展階段，因此尚未對 RNAi 的成效做出完整評估。但過去研究發現，若以 hedgehog 抑制劑(PF-5274857)處理線蚓會導致其腸道及各體節的縱肌、環肌形態異常。而本實驗以 RNAi 技術處理線蚓後，亦觀察到其再生體節的神經連接不完整，故初步推測本實驗使用之浸泡法 RNAi 同樣能影響 hedgehog 信息傳遞路徑，未來將會以 qRT-PCR 進一步確認 *Hh* 基因表現與發育的關係。

### 引子的選擇

由於先前對線蚓基因的研究較少，故在以 qRT-PCR 檢測基因表現量時沒有標準化的引子可供使用。本實驗參考線蚓轉錄體資料庫，挑選數組引子作為候選，並選出包夾片段大小適中、較無 primer dimer 干擾的 *Enc-hh* 基因引子，以提供後續實驗所需。

### *Hh* 基因在環節動物中表現位置的差異

環節動物門多毛綱(polychaete)的沙蠶(*Platynereis*)，其 *Hh* 基因在胚胎時期及後端再生時都表現在各個體節的邊界(Dray, et. al., 2010)，而屬於環帶綱寡毛亞綱的線蚓，其 *Hh* 基因則表現在後腸(hindgut)，後端再生時則表現在後端生長區（陳，2017）。另外，相較於環節動物門環帶綱蛭亞綱的水蛭，其 *Hh* 基因表現在胚胎時期後大幅下降，線蚓的 *Hh* 基因表現在其生命週期的每個階段，並被推測與維持型態的穩定有關。*Hh* 基因表現在各環節動物的差異可能可用以了解環節動物間的演化關係。

## *Hh* 基因在環節動物線蚓中的功能

*Hh* 基因最早在果蠅中發現，在果蠅(*Drosophila*)的胚胎發育中調節體節的生成(J Mohler, 1988)，後續研究也顯示 *Hh* 基因也參與後生動物的發育過程、再生及癌症的發生。在環節動物中，*Hh* 基因能維持沙蠶(*Platynereis*)的體節型態(Dray, N., 2010)。本實驗利用線蚓探討 *Hh* 基因對於其再生體節發育的功能，參考前人對線蚓體節神經的染色觀察結果(Müller, M. C., 2004)，發現 *Hh* 基因的表現影響線蚓新生體節中神經的連接情形，同樣影響了體節型態。

## 柒、結論與未來展望

- 一、本實驗以簡單的浸泡方法對線蚓進行 RNAi。若能確定此法的普遍應用性，未來可以擴大使用於研究其他基因。惟須建立更穩定的測試條件，包含引子和 reference gene 的選擇，以得出更精確的實驗結果。
- 二、從免疫染色的結果得知 *Enc-hh* 基因確實有參與在線蚓切斷後的神經再生過程中，*Enc-hh* 基因功能的下降使線蚓體內新生的縱向神經連接不完整，未來將更進一步探討 *Enc-hh* 基因的功能及作用機制。
- 三、若能確定 *Enc-hh* 基因對於線蚓的功能，可進一步利用 *Hh* 基因在環節動物門中如多毛綱、環帶綱等生物的發育或再生過程中扮演的角色，藉以了解物種間分類地位和演化關係。
- 四、線蚓的再生能力是目前普遍使用的模式生物所未見的，期望能透過建立線蚓再生的研究方法，進而提供動物模式的另一種選擇。

## 捌、主要參考資料文獻

### 一、期刊論文類

陳思卉. "以線蚓作為再生研究的模式物種: hedgehog 基因表現之初探." 國立臺灣大學生命科學系學位論文 (2017): 1-86.

Dray, N., Tessmar-Raible, K., Le Gouar, M., Vibert, L., Christodoulou, F., Schipany, K., ... & Vervoort, M. (2010). Hedgehog signaling regulates segment formation in the annelid *Platynereis*. *Science*, 329, 339-342.

Krauss, S., Concordet, J. P., & Ingham, P. W. (1993). A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*, 75, 1431-1444.

Mohler, J. (1988). "Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*." *Genetics* 120: 1061-1072.

Müller, M. C. (2004). Nerve development, growth and differentiation during regeneration in *Enchytraeus fragmentosus* and *Stylaria lacustris* (Oligochaeta). *Development, growth & differentiation*, 46, 471-478.

Nüsslein-Volhard, C. & E. Wieschaus (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*." *Nature* 287: 795-801

Orii, Hidefumi, Makoto Mochii, & Kenji Watanabe. "A simple soaking method" for RNA interference in the planarian *Dugesia japonica*." *Development genes and evolution* 213.3 (2003): 138-141.

Yoshida-Noro, C., Myohara, M., Kobari, F., & Tochinai, S. (2000). Nervous system dynamics during fragmentation and regeneration in *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida). *Development Genes and Evolution*, 210, 311-319.

## 二、網站資料類

M.Slug. ◦ Map of pCRII ◦ 2019 年 11 月 4 日，取自

[https://www.researchgate.net/figure/Map-of-pCRII-MSlugP64-41-plasmid-used-for-in-vitro-transcription-of-riboprobes\\_fig20\\_7004010](https://www.researchgate.net/figure/Map-of-pCRII-MSlugP64-41-plasmid-used-for-in-vitro-transcription-of-riboprobes_fig20_7004010) (圖)

郭承儒 (2013)。蟲蟲危機—以線蟲做為模式生物。2019 年 11 月 4 日，取自

<https://scitechvista.nat.gov.tw/c/vpd9.htm>

## 【評語】 052005

本研究希望利用調控線蚓體內 Hh 基因的表現，探討 Hh 基因在環節動物生長與再生中的功能。由於線蚓快速的再生速度、飼養容易、構造簡單及身體透明且方便染色觀察，透過線蚓 RNAi 技術的建立，除了能進一步探討 Hh 基因功能外，也希望提供再生研究時的另一種選擇方式。

本研究挑戰非模式生物之研究，欲建立一套簡單有效的線蚓 RNAi 技術，發現簡單的浸泡就可能有效果。實驗過程記錄詳實，證明作者為此實驗所費的心血很多，作者對此系統了解也很多。未來不可限量。

但是證明浸泡 RNAi 此方法有效的重要實驗，雖然已經進行，且有初步成果，但是最後確實結論尚未確實完成。仍需補足。

作者用免疫螢光染色去觀察線蟲神經再生的情形。初步結果雖然很好，仍需做染色強度的定量，並比較統計結果。來確實證明 Hh 基因與線蚓神經再生之間的關係。

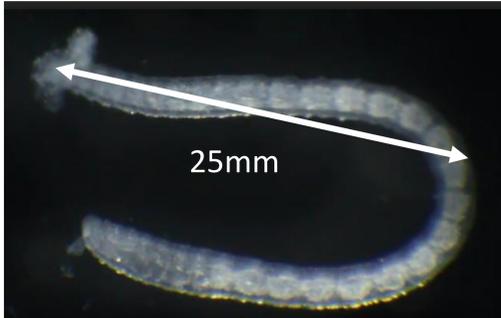
# 背景介紹

線蚓 (*Enchytraeus*) 是環節動物門環帶綱寡毛亞綱 (*oligochaetes*) 中的一種親緣關係接近蚯蚓的生物，如圖一。先前研究已找到線蚓體內 *Hedgehog* 基因 (*Enc-hh*) 的序列 (陳, 2017)，此基因在所有兩側對稱動物中皆有表現，而且被證實與體節發育有重要關聯，例如若 *Hh* 基因突變，會導致果蠅胚胎體節發育的畸形。

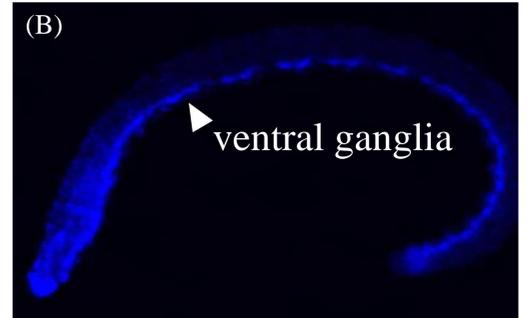
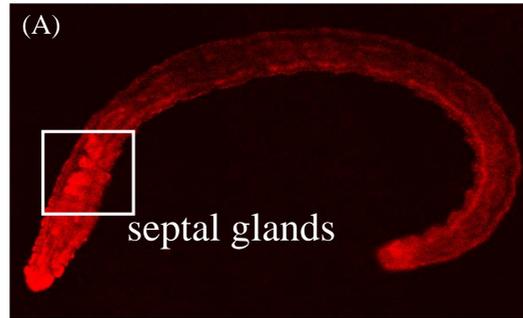
線蚓做為動物實驗模式的優點：

1. 能行無性生殖，繁殖速度快
2. 能在斷裂後快速修復並再生
3. 因其體型小(長度約1毫米，直徑約40微米)且能生長在人造環境，如濾紙或瓊脂(agar)上，飼養方便
4. 全體透明，方便染色觀察

→ 線蚓適合做為再生研究的實驗動物。



圖一、線蚓。箭頭代表頭部到軀幹中段長度



圖二、線蚓全體染色之主要構造分布圖 (A)以PI染色，框線內為用以區分頭尾的septal glands，共四對；(B)以DAPI染色，箭頭處指出用以區分腹側及背側的ventral ganglia

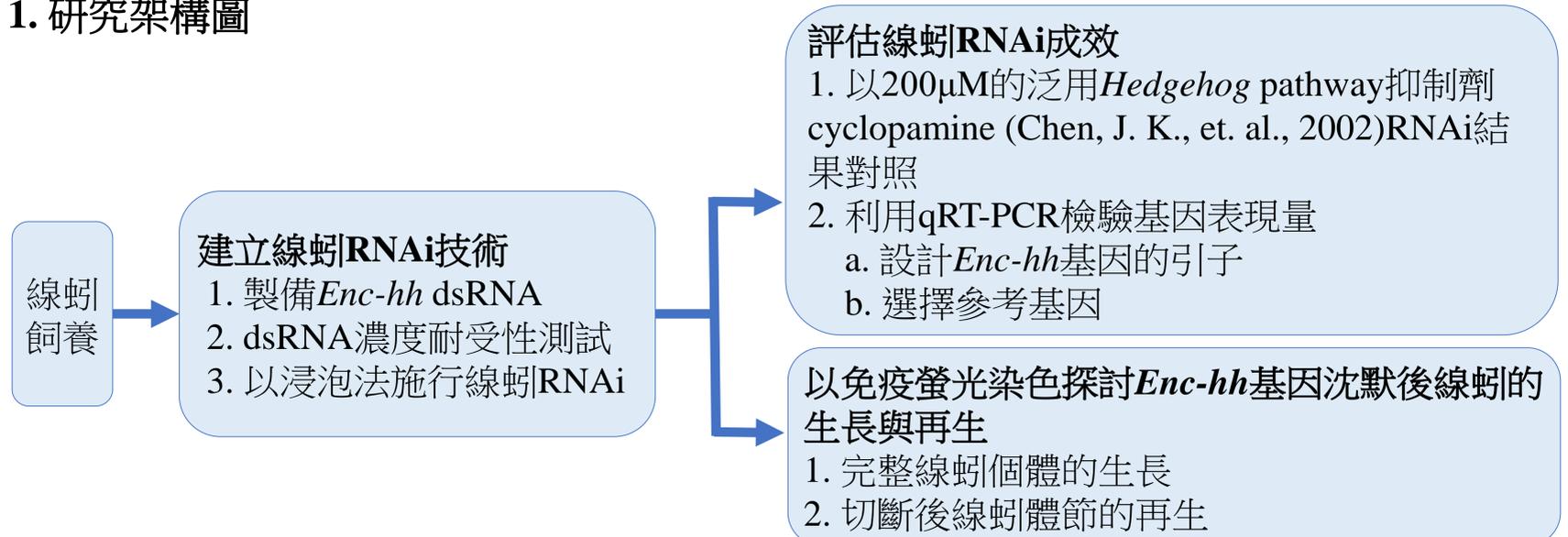
## 研究動機與目的

本研究欲建立一套簡單有效的線蚓RNAi技術並透過此方法研究特定基因的功能。本次實驗的研究問題有二：

- 一. 建立以線蚓為模式之RNAi技術並評估其成效
- 二. 以RNAi技術研究*Enc-hh*基因在線蚓再生時的功能

## 研究過程及方法

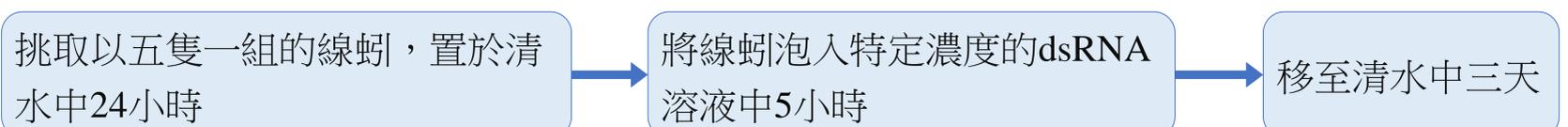
### 1. 研究架構圖



圖三、研究架構圖

### 2. 建立線蚓之RNA干擾(RNAi)技術

參考先前使用浸泡的方法對渦蟲進行RNAi的研究(Orii, et.al., 2003)，在確認線蚓能夠承受而不致死的濃度後（濃度耐受性測試），設計以下實驗。



圖四、建立線蚓RNAi技術之流程圖

### 3. 以免疫染色(immunostaining)觀察再生狀況

將再生第二天的線蚓進行RNAi處理後，利用抗acetyl- $\alpha$ -tubulins的小鼠抗體對線蚓進行免疫染色，觀察神經的再生狀況。流程圖如下：

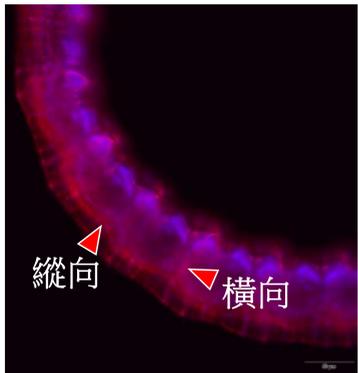


圖五、觀察再生狀況之流程圖

# 實驗結果

## 1. 以免疫螢光染色觀察線蚓神經分布情形

### (1)神經分布

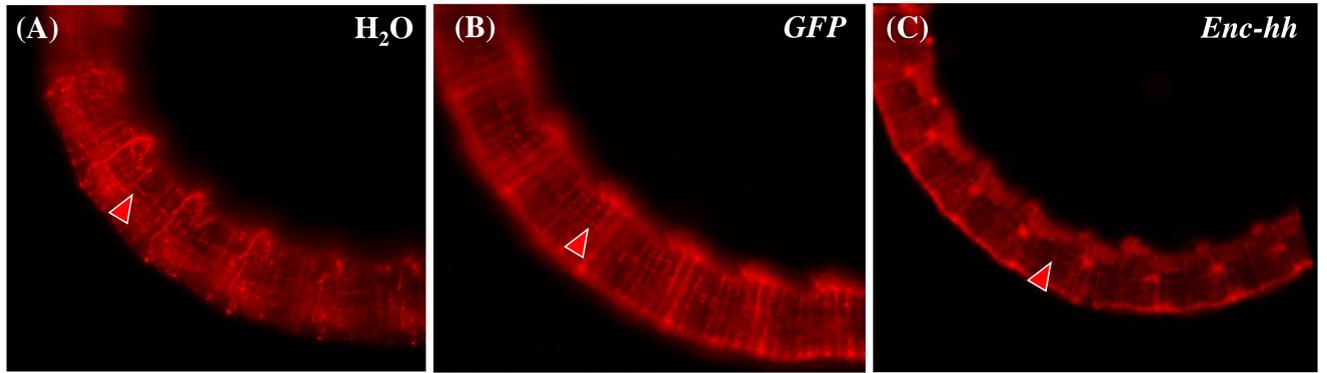


圖六

圖六、線蚓全體染色之主要構造分布圖（腹側在右）。藍色部分是以DAPI染細胞核，紅色部分是anti-acetyl- $\alpha$ -tubulins單株抗體標記並以二抗goat anti mouse Alexa fluor 555染色，因為拍攝時放大倍率為40倍，故在此可以表示神經組織分布位置。軀幹部分每一體節有數條主要的橫向神經，中間有縱向神經連接。

圖七、浸泡溶液後的完整線蚓軀幹神經生長情形及其對照組。紅色箭頭處指出連接完整的縱向神經。

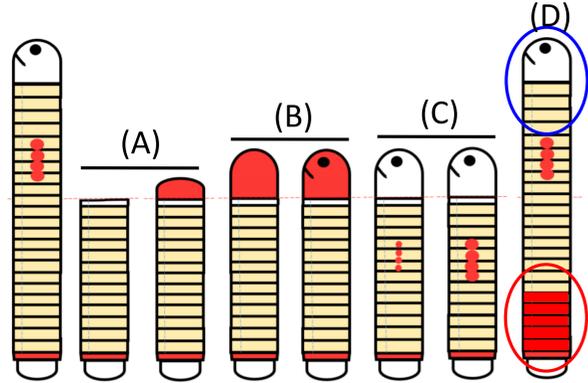
### (2)完整線蚓之神經生長情形 → 推測*Enc-hh*不會影響原有神經的生長狀況



圖七

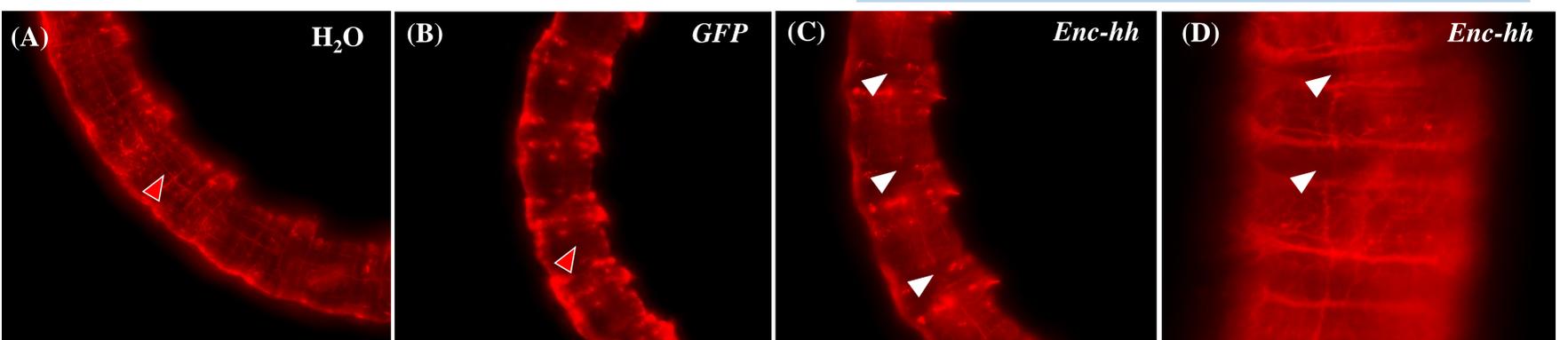
(A)浸泡清水之完整線蚓個體軀幹（腹側在後，40倍）；(B) 浸泡*GFP* dsRNA（非專一對照組）之完整線蚓個體軀幹（腹側在上，40倍）；(C) 浸泡 *Enc-hh* dsRNA之完整線蚓個體軀幹（腹側在上，100倍）。

### ※切斷後的線蚓由尾端再生出頭部及軀幹的過程



圖八、線蚓頭端再生示意圖。從軀幹中間切斷後，(A)線蚓傷口癒合→(B)長出頭部→(C)長出septal glands→(D)新生軀幹體節  
觀察軀幹的再生神經時，選取的範圍如紅色圓圈所示  
觀察頭部的再生神經時，選取的範圍如藍色圓圈所示

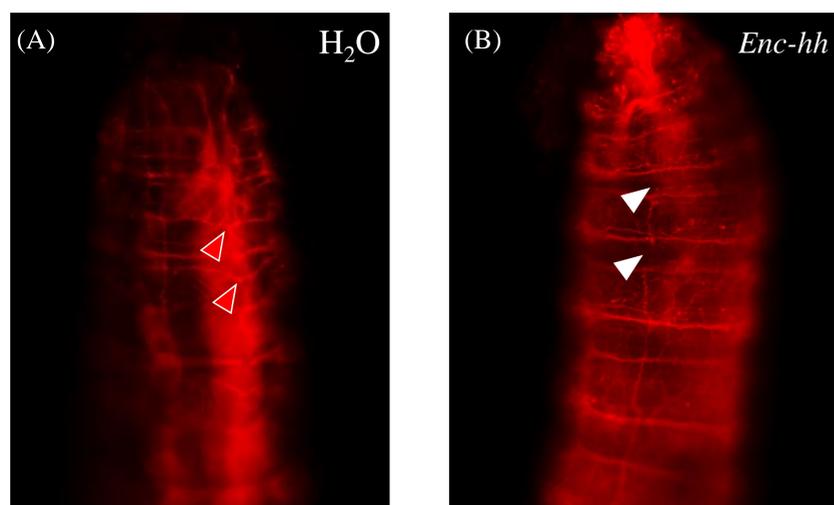
### (3)切斷處理後線蚓由尾端再生出的軀幹神經生長情形 → 推測*Enc-hh*會影響軀幹部位的神經再生狀況



圖九、浸泡於H<sub>2</sub>O、*GFP* dsRNA及*Enc-hh* dsRNA溶液後的線蚓由尾端再生出的軀幹神經生長情形。(A)~(B)中橫向的神經間有縱向神經連接，如紅色箭頭處。而在(C)和(D)中可以看到，當浸泡過*Enc-hh* dsRNA後，部分體節的縱向神經連接不完整，如(C)(D)中白色箭頭所指。

(A) 浸泡於清水中再生的軀幹（腹側在上，40倍）；(B)浸泡*GFP* dsRNA組別的軀幹（腹側在下，40倍）；(C) *hh*軀幹（腹側在右，40倍）；(D) *hh*軀幹（腹側在上，局部放大，100倍）

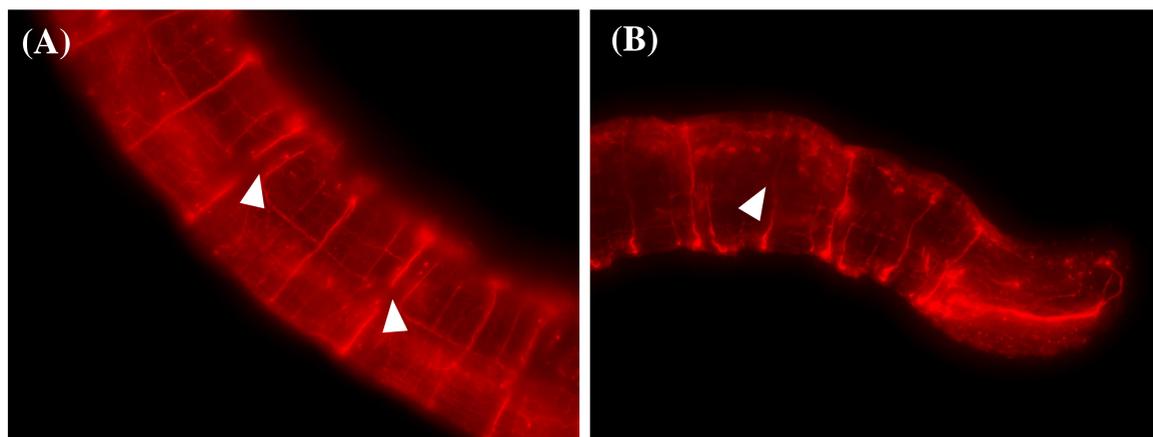
### (4)切斷處理後線蚓由尾端再生出的頭部神經生長情形 → 推測*Enc-hh*會影響頭部的神經再生狀況



圖十、浸泡於清水及*Enc-hh* dsRNA溶液後的線蚓由尾端再生出的頭部神經生長情形

(A) 浸泡在清水中再生出的頭部（腹側在右偏上），縱向神經神經連接完整；(B) 浸泡過*Enc-hh* dsRNA的線蚓（腹側在左），再生出的頭部有縱向神經連接不完整的現象，如箭頭所指。

## 2. 評估線蚓RNAi成效→ 浸泡抑制劑與RNAi 有相似的效果



圖十一、切斷後的線蚓浸泡於 *Hedgehog pathway* 抑制劑- cyclopamine 18小時後，由尾端再生出的軀幹神經生長情形。由白色箭頭所指可看出軀幹中段及軀幹尾段神經連接不完整。圖(A)為軀幹中段（40倍）；圖(B)為軀幹靠近尾部處（40倍）。

## 討論

### 一、對線蚓進行浸泡法RNAi的限制

實驗過程中發現RNAi的作用具有時效性，約5到6天後效果減弱，RNAi處理的線蚓生長狀況即恢復至與一般線蚓無異。因此若要持續抑制特定基因的表現，可考慮對胚胎使用顯微注射。

由於線蚓的qRT-PCR技術仍在發展階段，因此尚未對RNAi的成效做出完整評估。而本實驗以cyclopamine處理線蚓，亦觀察到其再生體節的神經連接不完整，故初步推測本實驗使用之浸泡法RNAi同樣能影響*Hh*信號通路，未來將會以qRT-PCR進一步確認*Hedgehog* 基因表現與發育的關係。

### 二、 *Hedgehog*基因在線蚓發育過程中的功能

*Hedgehog* 基因最早被發現於果蠅胚胎發育中調節體節的生成，且已知*Hedgehog* 基因能維持環節動物沙蠶(*Platynereis*)的體節型態，後續研究也顯示該基因也參與動物發育及再生的過程。而本研究探討*Hedgehog* 基因對於線蚓的發育及再生扮演的角色，實驗顯示*Hedgehog* 基因的表現同樣影響線蚓新生體節中神經的連接。

### 三、引子的選擇

由於先前對線蚓基因的研究較少，故在以qRT-PCR檢測基因表現量時沒有標準化的引子可供使用。本實驗參考線蚓轉錄體資料庫，挑選數組引子作為候選，並選出包夾片段大小適中、較無primer dimer干擾的*Enc-hh*基因引子，以提供後續實驗所需。

## 結論

- 一. 從免疫染色的結果得知若*Enc-hh*基因的功能下降，對於線蚓個體原有的神經沒有影響，但會影響切斷後的神經再生過程，使線蚓體內新生的**縱向神經連接不完整**，未來將更進一步探討*Enc-hh*基因的功能及作用機制。
- 二. 本實驗以簡單的浸泡方法建立線蚓RNAi實驗模式，可以有效抑制*Enc-hh*基因表現。若能確定此法的普遍應用性，未來可以應用於研究其他基因功能。惟須建立更穩定的實驗條件，包含引子和參考基因的選擇，以得出更精確的實驗結果。
- 三. 若能確定*Enc-hh*基因對於線蚓的功能，可進一步利用*Hh*基因探討其他環節動物如多毛綱、環帶綱等生物的發育或再生過程，藉以釐清物種間分類地位和演化關係。
- 四. 線蚓的再生能力是目前普遍使用的模式生物所未見的，期望能透過建立線蚓再生的研究方法，進而提供動物模式的另一種選擇。

## 主要參考文獻

1. Chen, Szu-Huei. "以線蚓作為再生研究的模式物種: hedgehog 基因表現之初探." 臺灣大學生命科學系學位論文 (2017): 1-86.
2. Orii, Hidefumi, Makoto Mochii, and Kenji Watanabe. "A simple soaking method" for RNA interference in the planarian *Dugesia japonica*." *Development genes and evolution* 213.3 (2003): 138-141.
3. Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K., & Beachy, P. A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & development*, 16(21), 2743-2748.