

材料與方法

一、轉殖基因質體

1. *myo-3::gfp* 質體:此質體由台大動物系吳益群老師提供。

2. *B. myo-3::gfp(CTG)₅* 及 *myo-3::gfp(CAG)₅* 質體

此質體由江淑雅學姊提供。其構築步驟簡述於後；首先，分別合成 5'-CCGGACTGCTGCTGCTGCTGT-3' 及 5'-CCGGACAGCAGCAGCA GCAGCAGT-3' 兩個 primers，然後以逐漸降低溫度的方式使其粘合。粘合的條件及步驟如下：先將等量 primers 混合於 1.5 ml 離心管，再將此離心管置於 95°C 水浴 6 分鐘，之後依序轉置入 85°C，75°C，65°C，60°C，及 55°C 水浴各 6 分鐘完成粘合。粘合之雙股 DNA 兩端含 *BspEI* 限制酶切割後的序列。接著，將 *BspEI* 限制酶 (New England Biolabs, Inc.) 切割後的 *myo-3::gfp* 與已粘合的 DNA 產物利用 T4 DNA ligase 進行連接，並轉殖入 JM109 菌體內，最後以 DNA 定序確認所得質體是 *myo-3::gfp(CTG)₅* 及 *myo-3::gfp(CAG)₅*。

3. *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 及 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 質體

此質體由李逸揚學長提供。其構築步驟簡述於後；首先，將 (CTG)₁₀ 與 (CAG)₁₇ primers 以 94°C，5 分鐘，(94°C，30 秒；37°C，1 分鐘；72°C，6 分鐘) 30 次循環，72°C，10 分鐘的反應條件合成。合成的產物經膠體電泳分離，由膠體中回收分子量適當的片段 (Viogene，

Inc.)，以 T4 DNA ligase 將回收之(CTG/CAG)₁₂₀ 三聯核酸重複序列片段接入 pGEM-T easy 質體，選殖出含 pGEM-T (CTG)₁₂₀ 質體之 JM109。接著，以 *EcoRI* 限制酶 (New England Biolabs, Inc.) 切出 (CTG/CAG)₁₂₀ 片段，經膠體純化後以 Klenow 酵素 (New England Biolabs, Inc.) 補齊(blunt-ended)。之後，將其接入經過 *BspEI* 限制酶切斷，Klenow 酵素補齊的 *myo-3::gfp* 質體，以此可得到 *myo-3::gfp-(CTG)_n* 或 *myo-3::gfp-(CAG)_n*，最後以 DNA 定序確認之。

二、線蟲的培養

1. 一般線蟲的培養

線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 是一種無寄生性，陸棲性的低等生物。其成蟲體長約有 1mm。野生的線蟲生長在土壤裡以微生物為主要的食物。在實驗室中，線蟲培養在塗有大腸桿菌屬 OP50 菌株的 NGM agar 培養皿 (1.7% Agar, 0.3% NaCl, 0.25% Bactopectone, 0.0005% Cholesterol, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 25 mM potassium phosphate, pH 6.0)，並於 15°C 培養。

2. *lin 15* 突變株線蟲的培養

本研究中顯微注射所使用的線蟲皆是以 *lin-15* 基因突變(*n765ts*) 線蟲(MT1642)進行。*lin-15* 是一個與線蟲生殖孔形成有關的基因，此突變株的線蟲於 15°C 培養時呈現正常性狀(單一生殖孔)，而當培養於

25°C 時則會呈現出突變的性狀，即一個個體產生多個生殖孔。若注入 lin-15 正常基因到 lin-15 突變株線蟲體內，則可以使此突變株恢復正常狀態，即在 25°C 或 15°C 的培養箱皆是單一生殖孔。

三、線蟲的顯微注射

1. DNA 溶液的製備

一般的 alkaline lysis DNA 製備法所製備出的 DNA 未經純化前不適用於線蟲的顯微注射。我們使用 QIAGEN plasmid mini kit 純化顯微注射用的 DNA 溶液。我們將轉殖基因質體與含有 lin 15 基因的質體分別以 20 ng/μl 與 100 ng/μl 的濃度溶於 injection 緩衝液（20 mM potassium phosphate, pH 7.5, 3mM potassium citrate, pH 7.5, 2% polyethylene glycol, M.W. 6000）中。

2. Agarose pads 的製備

使用巴斯德吸管滴一滴 2% agarose 在 24×60mm 之蓋玻片上，再用另一片蓋玻片蓋住滴有膠體的蓋玻片。等膠體凝結後，將上面蓋玻片掀開，讓膠體於室溫下繼續風乾至少三小時，此時膠體會形成一層薄膜，即可使用。或者，將凝結後含膠體之玻片(不含上蓋玻片)置於 80°C 烘箱 1 小時，待完全乾後置於室溫下備用。

3. 顯微注射針的製備

線蟲顯微注射針是以玻璃的毛細管（Kwik-Fil™, Borosilicate

Glass Capillaries, Item Number 1B100F-6, World Precision Instruments)

使用拉針器(P-97, Sutter Instrument)拉製而成，製作條件為，Heat: 220,

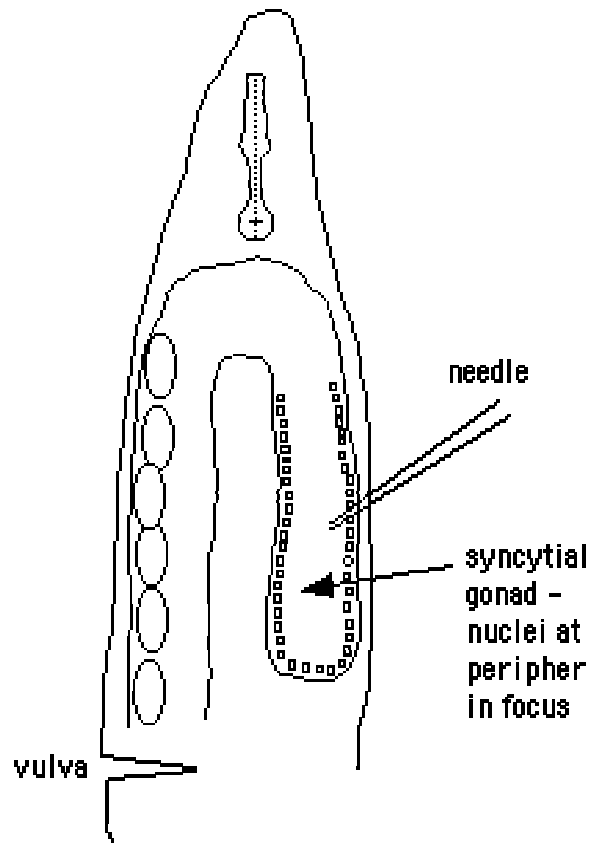
Pull: 100, Vel: 70, Time: 200。

4. 線蟲的顯微注射

先使用裝填 DNA 溶液的針 (Blaubrand® intraMARK, cat#708745) 將 DNA 注入顯微注射針內，並將顯微注射針架設於顯微鏡 (Zeiss Axiovert 200) 的操作手臂上。接著將 Halocarbon oil (Halocarbon product, River Edge, NJ) 滴一滴在 Agarose pad 上，並將待注射的線蟲放置 Agarose pad 上。在具有相位差 (differential interference contrast; DIC) 鏡頭的顯微鏡下，將顯微注射針小心推入線蟲的生殖腺中並將 DNA 溶液注入 (IM 300 microinjector, Narishige)。之後，以含 4% glucose 之 M9 緩衝溶液 (Na_2HPO_4 5.8 g, KH_2PO_4 3.0 g, NaCl 0.5 g, NH_4Cl 1.0g, 1 L $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$) 滴於蟲體上，讓已進行過顯微注射的線蟲回復生理活性，等約十五分鐘後再將蟲置入新的 NGM plate。

四、基因轉殖線蟲的篩選

我們將已復原的線蟲培養於 25°C，其子代若呈現單一生殖孔性狀者則為 F1。我們挑出的 F1 每一隻單獨培養於一個 NGM plate 中。除非另有註明，蟲體螢光及性狀分析係以 F2 線蟲進行之。



註：線蟲顯微注射位置的解剖圖。

五、基因轉殖線蟲的保存

由於顯微注射的基因在線蟲體內是以 extra chromosomal array 的形式存在，並非穩定的嵌入染色體中，因而轉殖基因，特別是 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 及 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 質體，容易從蟲體內失去。每次進行 *myo-3::gfp(CTG)₁₂₀* 及 *myo-3::gfp(CAG)₁₂₀* 蟲體分析實驗，皆重新 produce 基因轉殖線蟲。由於 *myo-3::gfp* 及 *myo-3::gfp(CTG/CAG)₅* 質體較為穩定，為長期保存基因轉殖線蟲，我們將 F2 的線蟲挨餓一天後以 M9 緩衝液清洗，再以等體積的比例加入 freezing solution (0.1 mM NaCl, 0.05 mM KH₂PO₄, pH 6.0, 30% glycerol, 0.6M

MgSO₄)，之後將溶液分裝至 1.8ml 保存管中，以漸進式降溫的方法，將線蟲儲存於-80℃冰箱中(一般而言，以 L1/L2 stage 蟲體 recover 情況最好)。短期保存(~ 1 month)基因轉殖線蟲，則將含蟲體之 NGM plate 置於 4℃ 冰箱

六、移動軌跡 (locomotion) 紀錄

將 F1 的成蟲挑至新鮮含有 OP-50 之 NGM plate，放置 25℃，隔天產出的卵為 F2，分別在其 L2, L3, L4, Adult 時期以數位式低照度彩色攝影機(CCD)擷取線蟲移動軌跡，使用數位影像處理軟體 (Carl Zeiss Inc., Axio Vision 3.0) 分析線蟲移動的型態。

七、線蟲身體波動量化軌跡速率

在 F2 的線蟲中，每個 lines 挑取 20 隻 L4 時期的線蟲 (在解剖顯微鏡下可觀察到生殖孔上有明顯透明的半月狀)，每隻挑到一個含新鮮 OP-50 的培養皿，放在 22.5℃ 培養箱過夜，24 小時後在解剖顯微鏡下觀察線蟲之移動。咽喉往後收縮，蟲體往前移動，這是線蟲正常的移動型態。移動 S 形算一次，計算三分鐘內移動的次數，每隻蟲體計數三次，三次的平均值為其移動速率。若是線蟲在移動當中，有脫離菌叢，或前後移動及往旁邊移動之情形，則不予計算。

八、螢光比較

將 F1 的成蟲挑至新鮮含有 OP-50 之 NGM plate 放在 25℃ 培養箱

過夜，隔天產出的卵為 F2，分別在其 L2, L3, L4, Adult 時期在解剖顯微鏡 60 倍視野下，擷取其螢光強度的影像；我們使用 FITC 濾片觀察螢光強度，影像擷取及分析係利用數位式低照度彩色攝影機(CCD)及 Media Cybernetics Image Pro Plus 4.1 (Axiocam, Carl Zeiss, Inc.)軟體處理。為客觀呈現不同(CTG)_n 或(CAG)_n 長度對發育時期的線蟲螢光表現的影響，每個 lines 分析約 100 隻不同質體基因轉殖線蟲。

九、肌肉結構的染色

將培養在 15°C 的 L4 時期線蟲挑起，置於新鮮的 OP-50 培養皿(培養的條件為 16±1 小時)，在 15°C 培養 48 小時後再進行固定及染色；首先，以 M9 緩衝溶液將線蟲從 NGM plate 沖洗到 1.5 ml 的微量離心管，然後放入離心機以 7000 rpm，10 秒將蟲體離下，將上清液丟棄。重複以上清洗步驟三次。接著加入 500 µl 的 3% formaldehyde(含 0.1 M Na₂HPO₄)，將線蟲在 22.5°C 下固定 3 小時。固定後以 7000 rpm 10 秒將蟲體離下並移除固定液，接著，加入 500 µl PBS 溶液後置於 3D 震盪器上搖晃 5 分鐘，再以 7000 rpm 10 秒將蟲體離下並移除 PBS 溶液。重複以 PBS 溶液清洗三次，然後加入 500 µl 的 100% acetone 後放到 -20°C 冰箱 2 分鐘，再以 PBS 溶液清洗 3 次後，接著加入 200 µl 的 Phalloidin-rhodamine (1:200 稀釋於 PBS 溶液) 在室溫下進行染色，2 小時後以 PBS 溶液清洗 4 次，最後加入 200 µl 的 PBS 溶液。

十、線蟲發育過程肌肉結構變化的觀察分析

將染好的線蟲取適量滴在玻片上，在正立顯微鏡下先找到我們預備觀察的視野，接著使用 FITC 濾片觀察。使用數位照像機(NIKON coolpix 4500)做影像攝取。為客觀呈現不同(CTG/CAG)_n 長度對發育中線蟲肌肉結構的影響，每個 lines 在分析各個發育時期的影響約觀察 50 隻線蟲。

十一、螢光原位雜交

以 1×PBS 溶液 (10×PBS, 80g NaCl, 2g KCl, 6.1g anhydrous Na₂HPO₄, 2g KH₂PO₄, 補二次水到 1000ml, 使用時稀釋一倍) 將線蟲清洗 (以下的步驟都是以離心的方式將清洗溶液與線蟲分離，之後移除上層液)，加入 100% methanol 置於 -20°C 5 分鐘，再置於室溫下 5 分鐘。之後進行清洗步驟，包括 1 分鐘 90% methanol in H₂O 一次，1 分鐘 70% methanol in PBS 一次，1 分鐘 50% methanol in PBS 一次，5 分鐘 in PTw (1×PBS 加上 0.1% Tween20) 一次。

接著，在室溫下以 proteinase K (1 µl/ml solution in PTw) 處理 15 分鐘後，離心並移去上層溶液。然後，加入 2 mg/ml glycine in PTw 於 3D vortex 上搖 2 分鐘使反應停止，再以 PTw 溶液清洗二次，每次 5 分鐘。接著，在室溫下加入 formaldehyde fixative solution (1×PBS, 0.08 M HEPES pH 6.8, 1.6 M MgSO₄, 0.8 M EGTA, 3.7% formaldehyde)，

於 3D vortex 上搖 20 分鐘進行再固定。之後，加入 PTw 溶液清洗二次各 5 分鐘，一次 2 mg/ml glycine in PTw 5 分鐘，及三次 PTw 各 5 分鐘。

固定後，在室溫下加入 1:1 (V/V) 的 hybridization buffer (10 mg/ml ssDNA, 10 mg/ml heparin, 1 μ l Tween 20, 400 μ l formamide, 100 μ l 20 \times SSC) 及 PTw 混合液反應約 10 分鐘。於此同時，取 1500 μ l hybridization buffer 隔水加熱沸騰 10 分鐘置於冰上備用。之後從中取 500 μ l hybridization buffer 加入蟲體樣本進行 pre-hybridization (於 37 $^{\circ}$ C 培養箱內約 1~2 小時)。進行 hybridization 時，加入含 0.5 μ g/ml oligonucleotide probe 之 50 μ l hybridization buffer 置於 37 $^{\circ}$ C，O/N。

隔天以 500 μ l washing buffer (含 40%formamide 及 2 \times SSC) 在 37 $^{\circ}$ C 培養箱靜置 10 分鐘，短暫離心後(up to 7000 rpm then release)，再以 TTBS (1M NaCl, 1M Tris, 0.1%BSA, 0.1%Tween20 補二次水到 100ml) 在室溫下清洗二次，每次 10 分鐘。細胞核以 DAPI 染色(1 μ g/ml)。

螢光訊號偵測使用 ZIESS AXOPLANT 正立顯微鏡，以數位式低照度彩色攝影機(CCD camera)擷取，數位影像處理軟體使用 Axio Vision 3.0。

十二、電子顯微鏡(electron microscopy)觀察

在 F2 的線蟲中，每個 line 挑取 20 隻 L4 時期的線蟲 (在解剖顯

微鏡下可觀察到明顯透明的咽喉肌上有一點黑色)，隔 16 小時後將轉殖基因線蟲挑到前固定液（4% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate）放過夜，隔天將前固定液以離心的方式移除，用緩衝液清洗三次（0.2 M cacodylate, 0.2 M sucrose）將緩衝液移除後加入一比一的緩衝液與後固定液（2% osmium, 0.5 M cacodylate）進行三小時的固定，之後以離心的方式移除並配製 1% agarose 備用，取 10 μ l 的 1% agarose 滴到固定後的基因轉殖線蟲，待其凝固後切成數小塊再進行酒精脫水；酒精脫水的步驟：50%，70%，80%，90%，95%，95%，100%，100%，100% 各 15 分鐘後，再進行兩次各 10 分鐘 1,2-propylene oxide 脫水的步驟。接著進行包埋，將樹脂與 propylene oxide 以 1：1 比例混合，與固定過的檢體在真空下反應 O/N，隔天去真空取出檢體並移除混和液，再加入樹脂與 propylene oxide 比例為 2：1 的混合液在真空下反應 1 小時，接著以全比例的樹脂在真空下重複 3 次，每次分別為 1 小時，最後將樹脂打入模型將檢體置入，放在 60°C 的烘箱 16 小時使含有檢體的樹脂凝固。

包埋好的檢體先行厚切，因超薄切片的範圍更小且薄，所以在切片機上以玻璃刀先行厚切以確認超薄切片的範圍，將切出的檢體撈起放到玻片上，滴一滴 Toluidine blue（1g toluidine blue, 1g alconox 溶在 100ml d_2H_2O ）進行初步染色，當表面呈金屬光澤後以 0.1M PBS

清洗後烘乾，在顯微鏡下觀察選取超薄切片的範圍，之後換上鑽石刀進行超薄切片，切出的檢體以銅網撈起後烘乾染色，先以 Uranyl acetate（50% alcohol 的 Uranyl acetate 飽和溶液）20 分鐘，接著以 lead citrate 40 分鐘（4g lead citrate, 0.1ml 10N NaOH， 10ml d₂H₂O），檢體到此步驟即完成最後再以穿透式電子顯微鏡進行拍照觀察。