

# 2020 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

- 作品編號 070005
- 參展科別 微生物學
- 作品名稱 以線蟲模型探討核糖核酸結合蛋白 MSI-1  
如何影響微小核糖核酸 *let-7* 調控 *lin-41* 路  
徑
- 得獎獎項 大會獎：二等獎  
出國正選代表

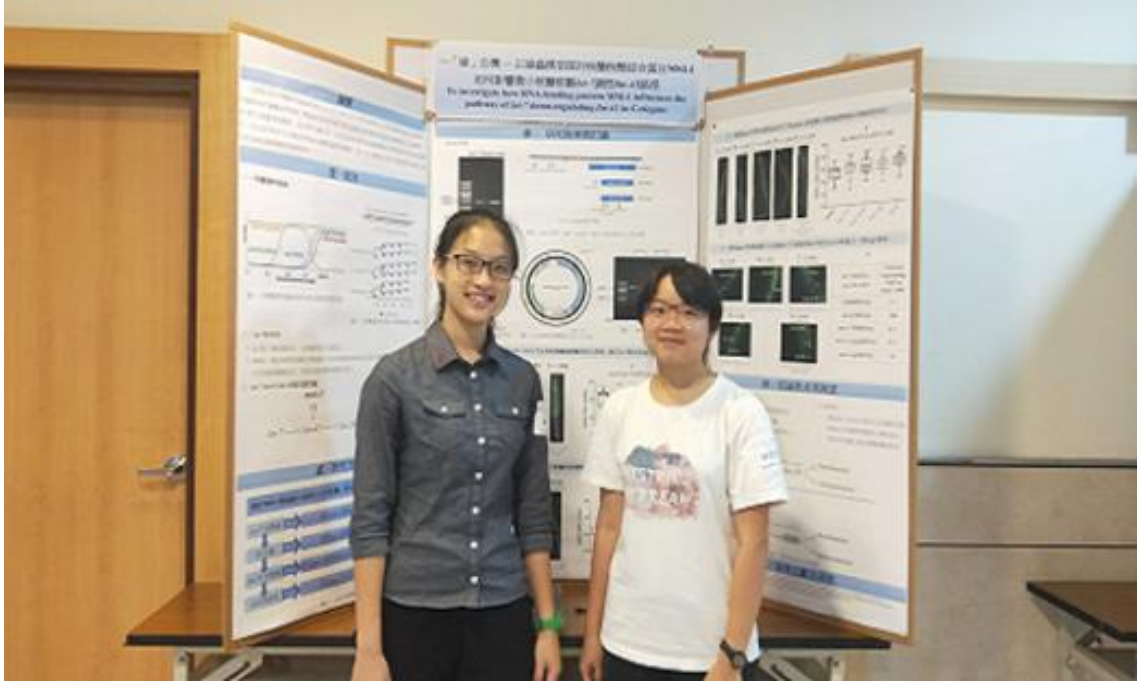
就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 吳雅嵐、詹世鵬

作者姓名 陳伶亞、林芸竹

關鍵詞 線蟲、msi-1、let-7

## 作者簡介



我們是林芸竹和陳伶亞，目前就讀北一女中數理資優班。我們在高一進入了生物專研組，廣泛學習各種生物知識，在選擇題目時，我們有幸進入詹世鵬老師實驗室學習，從基礎實驗到整個專題的完成，我們在實驗室中學習科學研究的方法，不斷修正錯誤、檢討改進。希望透過參與這次臺灣國際科展，我們能在和別人交流的過程中，收獲更多不同的科學見識。

## 摘要

癌症是世界性的嚴重疾病，長年位居國人十大死因之首。而基因調控的失控是造成癌症的主要原因之一，由先前的文獻已知，微小核糖核酸 *let-7* 負向調控下游基因 *lin-41* 是調控細胞週期及癌症發展和預後的重要路徑。由於此調控路徑具有演化上的保守性，本研究以較易操作實驗的秀丽隱桿線蟲為生物模型，透過 RNAi 的方式，降低特定基因的表現，觀察是否影響與 *let-7/LIN-41* 調控路徑相關的突變性狀，來推測該基因是否參與此路徑相關之細胞週期調控。

本研究中，我們發現以 RNAi 降低核糖核酸結合蛋白 *msi-1* 的表現量可抑制 *let-7(n2853)* 突變種線蟲中因 *let-7* 功能缺失所造成的接縫細胞的重複分裂的突變性狀，並增強對下游基因 *col-19* 的活化調節。我們推論，降低 *msi-1* 表現量可以提升 *let-7* 路徑的功能。我們期望可以藉由研究 *msi-1* 如何調控此路徑的機制，更加了解 MSI-1 此一核糖核酸結合蛋白對於細胞週期的控制，並提供未來癌症標靶藥物的重要參考。

## Abstract

Cancers are serious diseases around the globe, ranking first at the top ten death causes of our people for many years. It has been noted that aberrant regulation of genes required in cell-fate decision is one of the main causes of cancers. According to previous research, microRNA *let-7* repressing the expression of *lin-41* is an important pathway regulating cell cycle and cancer development and prognosis. The *let-7/LIN-41* regulatory pathway has been demonstrated to be evolutionarily conserved from nematode to human. In this study, we seek to identify novel genes that could play roles in *let-7*-mediated gene regulation in *C. elegans*, a relatively simple model organism. We first observe the influences on *let-7* mutant phenotypes when expression of particular gene of interest is reduced by RNAi knockdown. Then, we try to find out the role that genes play in the control of *let-7/LIN-41* pathway concerning cell cycle.

In this study, we demonstrated that *msi-1* reduction corrected abnormal division of seam cells in adult *let-7(n2853)*, and enhanced the regulation of downstream gene *col-19* activation. We deduced that *msi-1* reduction enhanced the function of *let-7* pathway. We expected to determine the further molecular mechanism of RBPs MSI-1 regulation of *let-7* pathway. By finding more into the role of MSI-1 regulation in cell cycle, we are looking forward to provide reference of targeted therapy for cancers.

## 壹、前言

癌症是世界性的嚴重疾病，長年位居國人十大死因之首。細胞的過度分裂或不正常分化是導致癌症的主要原因之一，而這種不正常的分裂分化大多是由於調控細胞週期相關的基因失控所造成，例如 *let-7*/TRIM71(Lin-41 的同源蛋白)的調控失控就是廣泛癌症中常見的現象。本研究主要針對 *msi-1* 和 *let-7* 路徑間的調控關係進行探討，此二基因被證實和許多癌症皆有相關性，但兩者之間的關係尚未有明確的研究，因此我們想了解 *msi-1* 和 *let-7* 路徑的調控關係，並觀察此調控和細胞週期間的關聯，並期待 *msi-1* 的調控可提供癌症標靶藥物的重要參考。

*msi-1* 最早在果蠅中發現，作用於感官細胞前體(SOP)細胞不對稱分裂，保守性高，在人類中有兩個 *msi-1* family 的蛋白：Musashi-1, Musashi-2。MSI-1 是一種核糖核酸結合蛋白(RBPs)，可以結合在 mRNA 上抑制其轉譯，在神經母細胞及幹細胞中有高表現量。有醫學研究證明，MSI-1 可作為癌症驅動因子，在廣泛癌症中表現量偏高，可調控癌細胞發展及轉移，因此有做為癌症藥物標靶的潛力，在胰腺癌、神經膠質瘤、髓母細胞瘤和肝細胞瘤中，MSI1/2 皆過度表現(Kanemura Y, 2001) (Hemmati HD, 2003) (Shu HJ, 2002)。

*let-7* 被廣泛地認為是一種抑癌基因(tumor suppressor gene)，會抑制許多致癌基因的表現，例如 RAS、HMGA2 和 MYC (Xirui Wang, 2012)，在廣泛癌症中 *let-7* 表現量偏低。其調控的基因大部分都和細胞週期相關，例如在人體細胞中，*let-7* 可以影響誘導性多功能幹細胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)的轉換，調控人體細胞週期和幹細胞分化(Kathleen A. Worringer, 2013)，*let-7* 可藉由抑制 TRIM71，使 EGR1 表現量上升，促進細胞走向分化。(如圖 1)

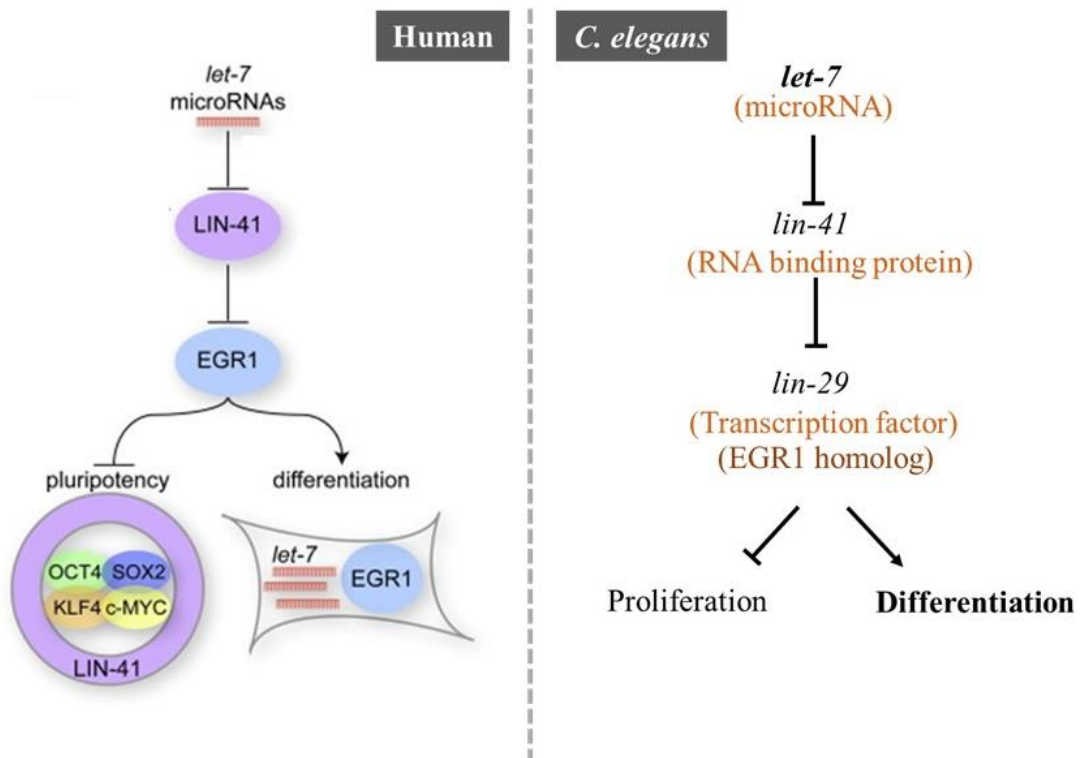


圖 1. 人體和線蟲中 *let-7/Lin-41* 的調控路徑(Kathleen A. Worringer, 2013)

在人類細胞中，*let-7* 會抑制 Lin-41(等同 TRIM71)，間接使 EGR1 表現量上升，促進細胞走向分化。對照在線蟲中，*let-7* 會抑制下游基因 *lin-41*，進而使 *lin-29* 表現量上升，促進細胞分化。OCT4、SOX2、KLF4 和 c-MYC 等轉錄因子可活化 Lin-41，使細胞轉換為成誘導性多功能幹細胞，而 *let-7* 亦可抑制此轉變發生。此二條路徑互為同源基因，且具有很高的相似性，因此適合以秀麗隱桿線蟲來研究此路徑的調控。

上圖顯示調控人體幹細胞分化的路徑，和線蟲中調控幹細胞分化的路徑相似度很高，顯示這是一個具有演化保守性的發育基因調節機制，在發育學及醫學上都有極大的研究價值，且 *let-7* 在果蠅、線蟲、人類中的序列都幾乎相同，跨物種保守性極高(如圖 2)，在演化上具有重要意義，因此我們可以透過秀麗隱桿線蟲此一模式生物來研究 *let-7/Lin-41* 路徑。此外，前人研究指出，癌症的發展和癌細胞的幹性(stemness)有很大的關聯(Pedro M. Aponte, 2017)。當癌症幹細胞(cancer stem cell)幹性失控，就有可能導致癌症擴散及惡化。而線蟲的接縫細胞是一種幹性受控的幹細胞，因此我們可以透過觀察線蟲接縫細胞系統來了解基因與細胞分裂分化之間的關聯性，並進一步推展至癌症細胞研究。

Consensus	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	u
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
cel-let-7	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
dme-let-7	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	-
xtr-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
dre-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
gga-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
cfa-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
mmu-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U
hsa-let-7a	U	G	A	G	G	U	A	G	U	A	G	G	U	U	G	U	A	U	A	G	U	U

圖 2. *let-7* 在物種之間保守性極高(Hosuk Lee, 2016)

cel:秀麗隱桿線蟲;dme:果蠅;xtr:爪蟾;dre:斑馬魚;gga:原雞;cfa:犬;mmu:小鼠;has:人類。黃框區為種子序列。Consensus 為共同擁有的序列，其中所有物種共有的大寫。

秀麗隱桿線蟲(*C. elegans*)分類上屬於動物界—線蟲門—胞管腎綱—小桿目—小桿科—隱桿線蟲屬。線蟲分為雄性及雌雄同體兩種性別，成蟲分別擁有 1031 個細胞及 959 個細胞，以微生物為食(如大腸桿菌 *Escherichia coli*)。線蟲生命週期約 2 天，卵在孵化後分為四個幼蟲期 (larva stages, L1~L4)及一個成蟲時期，而若在 L1 或 L2 遇生長逆境，將進入永久性幼蟲期 (dauer stage)並停止生長，最多可維持四個月的生命；若逆境消失則進入 L4 的階段繼續生長(如圖 3)。其生命週期短，易於大量培養觀察，且每個細胞的分化圖譜都已標定完成，因此非常適合作為研究基因調控細胞分化機制的模式生物。

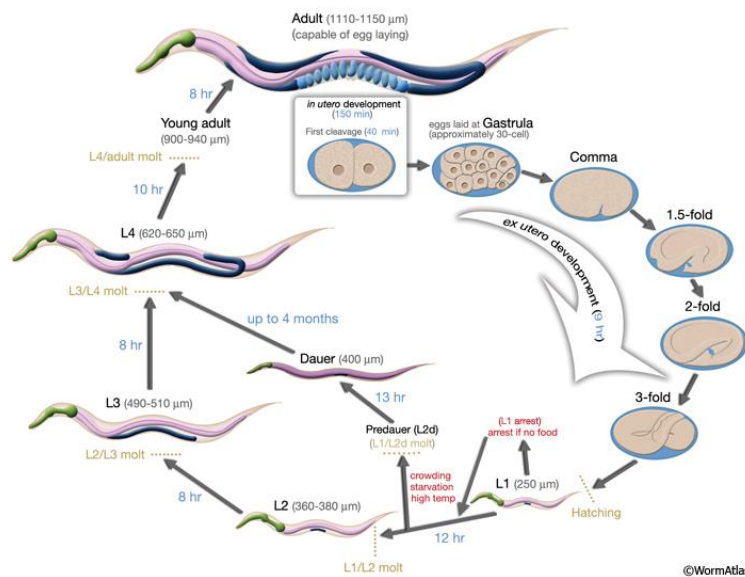


圖 3. 22°C 下的線蟲生長週期示意圖(from WORMATLAS, <http://www.wormatlas.org>)

微小核醣核酸(microRNA, miRNA)是一種能調控訊息核醣核酸(messenger RNA, mRNA)轉譯過程的重要因子，為非編碼單鏈 RNA(non-coding RNAs)，長約 21~23 個核苷酸。miRNA 生成後，會與 AGO 蛋白(argonaute proteins)結合，形成活化的微小核醣核酸沉默複合體(miRNA-induced silencing complex, miRISC)，並與 mRNA 的 3 端不轉錄區域(3'UTR)形成完全或不完全配對，而抑制轉譯作用(translation)引發 mRNA 的降解，使基因表現量降低(Filipowicz W, 2008)。線蟲的生長週期受到數種微小核醣核酸的調控，例如：*let-7*、*lin-41*(如圖 4)。miRNA *let-7* 最初就是在秀麗隱桿線蟲中發現的(Reinhart BJ, 2000)。

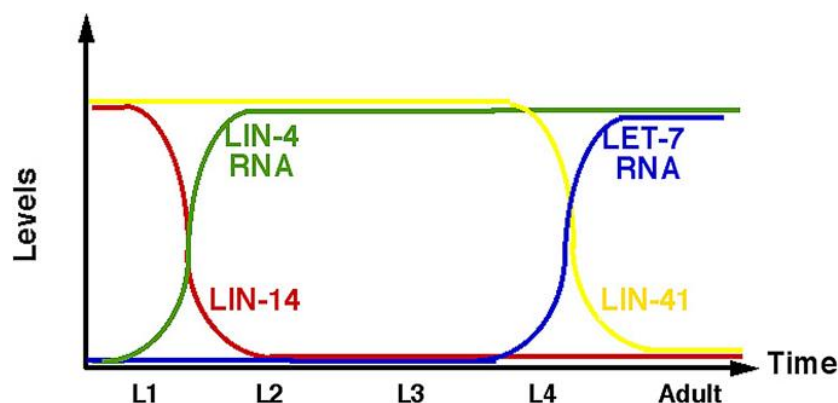


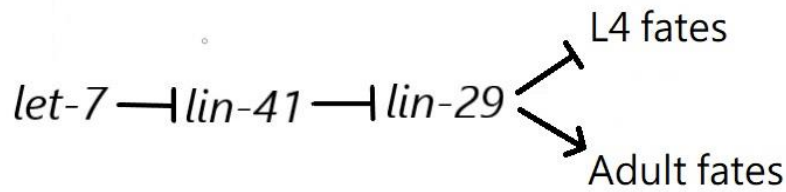
圖 4.秀麗隱桿線蟲 miRNA 和幼蟲發育關係圖。(from Wormbook)

線蟲在 L1 到 L2 時期 *lin-4* 會上升，進而抑制 *lin-14*；在 L4 到 Adult 時期 *let-7* 會上升，進而抑制 *lin-41*。

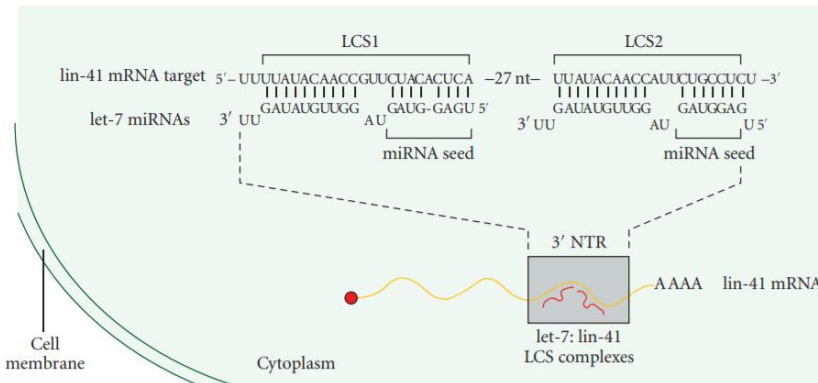
而在線蟲從 L4 進入 Adult 的過程中，*let-7* 會負調控下游基因 *lin-41*，並間接活化下游基因 *lin-29* (如圖 5) (Reinhart BJ, 2000)。*lin-41* 等同人類 TRIM71 的同源基因，而 *lin-29* 等同人類 EGR1 的同源基因(如圖 1)。*lin-29* 的基因產物 LIN-29 是一個轉錄因子(transcription factor)，可結合到更下游的目標基因增強其基因表現，促進線蟲 L4 幼蟲進入成蟲期(Adult)，其中一個明顯的現象是體側皮下組織接縫細胞(lateral hypodermal seam cells)終止不對稱分裂，進入最終分化(terminal differentiation) (請見下段說明)。



A



B



C



圖 5. *let-7* 調控下游基因作用路徑

- A. *let-7* 在 L4 轉變成成蟲期(Adult)時表現量上升以抑制 *lin-41*，間接導致 *lin-29* 表現量上升，促進線蟲 L4 幼蟲進入 Adult。(作者自行繪製)
- B. *let-7* 可藉由鹼基配對到 *lin-41* 3'UTR 上兩個 *let-7* 結合位而抑制 *lin-41* 基因轉譯。(Dominique L. Ouellet, 2006)
- C. LIN41 為一種 RNA 結合蛋白，可結合到 *lin-29* 5'UTR 上的結合位而抑制 *lin-29* 基因轉譯。(Florian Aeschmann, 2017)

線蟲的接縫細胞(seam cells)在 L1~L4 幼蟲期都進行不對稱分裂，也就是其中一個子細胞分化成特定細胞，例如皮下組織細胞 *hyp7*，另一個子細胞則維持如幹細胞的特性繼續分裂分化。接縫細胞的不對稱分裂受到 *let-7-lin-41-lin-29* 路徑的調控，當 *lin-29* 表現量上升，促進線蟲 L4 幼蟲進入 Adult 時，接縫細胞即終止不對稱分裂，進入最終分化。



本研究主要使用兩種線蟲突變種：*let-7(n2853)*突變種和 *lin-29(n333)*突變種。

線蟲 *let-7(n2853)* 為 *let-7* 缺失的突變種。其 miRNA *let-7* 在辨認目標基因的的重要種子區域(seed region)序列中帶有一個 G-to-A 點突變(如圖 6)，使其對於目標基因結合能力較弱，同時使 *let-7* 本身的表現量降低，因此使下游基因 *lin-41* 表現量上升，*lin-29* 表現量下降(Monica C. Vella, 2004)，造成線蟲無法順利進入 Adult fates，seam cells 也無法順利進入最終分化，而在成蟲時期多一次不對稱分裂(如圖 7)，因此最終的 seam cells 數目較野生種多(Reinhart BJ, 2000)。

此外，*let-7(n2853)* 為溫度敏感型突變，若生長在 20°C 以上，則成蟲會因生殖孔無法正常發育而發生爆裂死亡。在實驗室先前的研究中，降低(knockdown)線蟲 *msi-1* 的表現量，可以有效降低 *let-7(n2853)* 突變種在高溫下成蟲時生殖孔爆裂導致的死亡率，表示降低 *msi-1* 的表現量或許可提升 *let-7* 路徑功能，因此我們首先想探討降低 *msi-1* 的表現量是否可以阻止 *let-7(n2853)* 突變種在成蟲時期多一次不對稱分裂，使其最終的 seam cells 數目降低。另外，在探討 seam cells 分裂情形時我們會用 *hrp-2* 作為 *msi-1* 的正向對照組(positive control)，因為降低 *hrp-2* 已被證實可有效降低 *let-7(n2853)* 突變種中的 seam cells 數目，提升 *let-7* 路徑功能，因此可同時進行 *hrp-2* knockdown 實驗作為對照以增加 *msi-1* knockdown 實驗的正確性(未發表之結果，國立台灣大學醫學院詹世鵬老師實驗室)。

線蟲 *lin-29(n333)* 則是一種 *lin-29* 功能完全喪失的突變種，比 *let-7(n2853)* 突變種的突變情形更加嚴重，因此線蟲會停留在 L4 fates，導致接縫細胞不斷分裂(如圖 7)。由於 *lin-29(n333)* 是一種阻斷 *let-7-lin-41-lin-29* 路徑的突變種，因此我們可用 *lin-29(n333)* 突變種和 *let-7(n2853)* 突變種互為對照，推理 *msi-1* 和 *let-7-lin-41-lin-29* 路徑間可能存在的調控關係。

<i>let-7</i>	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGU
<i>let-7 (n2853)</i>	UGAGAUAGUAGGUUGUAUAGU

圖 6. *let-7(n2853)* 突變種的 *let-7* 點突變

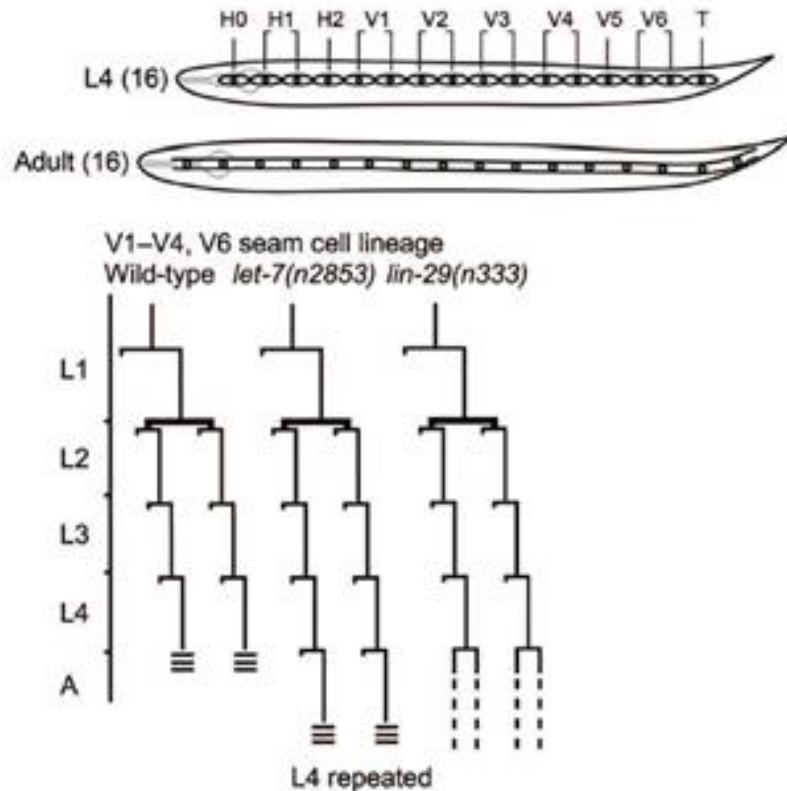


圖 7. *let-7(n2853)*突變種和 *lin-29(n333)*突變種線蟲中接縫細胞分裂示意圖

(Shih-Peng Chan, 2014)

在我們的實驗中，為了能方便地計數 seam cells 的數目，我們會在突變種中植入 *wIs51[SCMp::gfp]* 轉殖基因。*wIs51* 轉殖基因帶有只在 seam cells 中作用的啟動子(promoter)，且接上帶有核定位信號(nuclear localization signal, NLS)之綠螢光蛋白(GFP)基因。因此此綠螢光蛋白僅在 seam cells 表現，並易聚集到細胞核中，在螢光顯微鏡下可以非常容易觀察。在本研究中，我們亦利用 *maIs105[col-19::gfp]* 轉殖基因來觀察 *let-7* 的調節活性。*col-19* 一種只在成蟲階段才開始大量表現的膠原蛋白(collagen)基因，其表現受到 LIN-29 的直接正向調控。*maIs105[col-19::gfp]* 轉殖基因包含了 *col-19* 基因的啟動子與部分蛋白氨基酸基因序列以及綠螢光蛋白(GFP)基因序列，使接縫細胞 seam cells 和由接縫細胞分化而來的皮下組織細胞(*hyp7*) 在成蟲時發出螢光，而 *hyp7* 發出螢光在研究中常作為線蟲進入 Adult 時期的特徵。

本研究中主要使用的實驗技術為核醣核酸干擾技術(RNA interference, RNAi)，RNAi 技術最早由 Andrew Z. Fire 與 Craig C. Mello 研發並獲得 2006 年諾貝爾生醫獎。(Fire A., 1998)。其原理是在線蟲體內植入目標基因的一段 dsRNA，經 Dicer 等酵素的切割後形成長約 21、22 個核苷酸的小分子核醣核酸 siRNA，成為成熟 siRNA 時，其中一股會降解，留下來的一股為引導股，會與 AGO 蛋白(argonaute proteins)和特定蛋白結合，形成一種名為 RISC(RNA-induced silencing complex)的蛋白質複合體，接著 RISC 便可以結合到線蟲體內的目標基因，造成目標基因的沉默。本研究中我們便使用 RNAi 技術來降低 *msi-1* 的表現量。

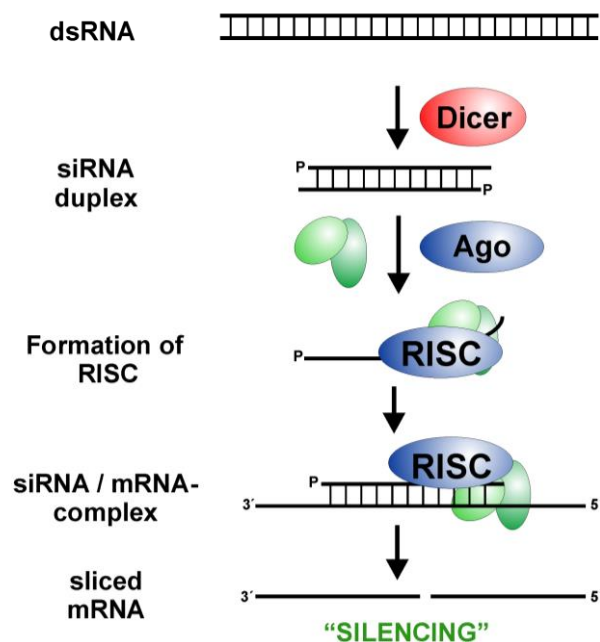
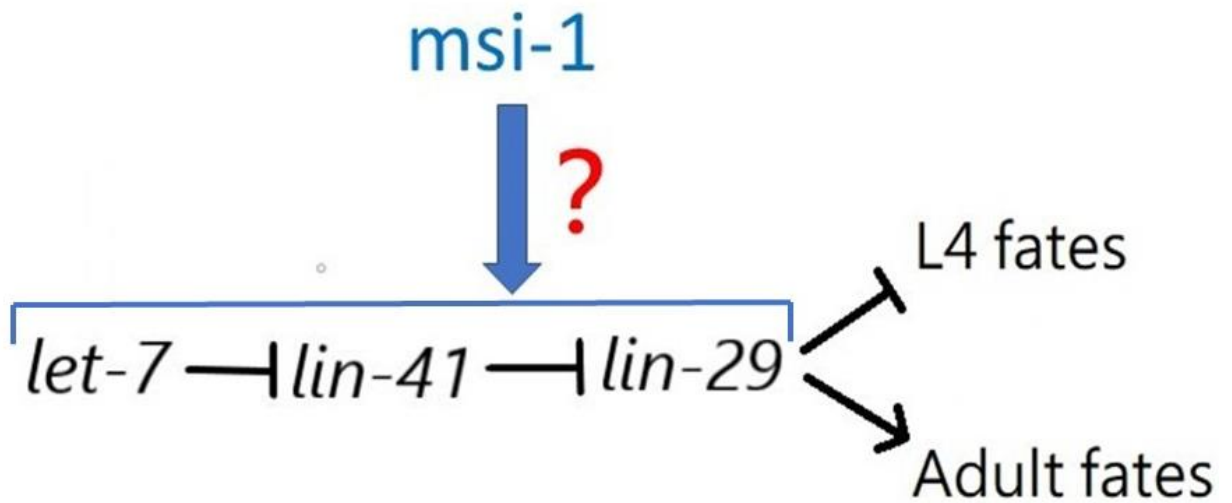


圖 8.RNAi 技術作用原理

我們想藉由本篇研究探討 *msi-1* 對 *let-7-lin-41-lin-29* 路徑的調控關係，並了解其調控和細胞分裂分化的關聯。也期待 *msi-1* 調控 *let-7* 及其下游基因的能力，能推廣至幹細胞疾病及癌症相關研究。

## 貳、研究方法或過程



探討MSI-1對細胞分裂與分化的影響—與*let-7-lin-41-lin-29*路徑的調控關係

以*let-7*缺失線蟲探討降低*msi-1*對seam cells分裂次數的影響

以野生種線蟲探討降低*msi-1*是否對seam cells分裂次數造成影響

以*lin-29*缺失線蟲探討降低*msi-1*抑制seam cells重複分裂路徑是否經過*lin-29*

以*col-19*的表現推論降低*msi-1*是否活化*let-7*路徑下游基因

以*lin-41 gain-of-function*線蟲探討降低*msi-1*對公蟲尾巴性狀的調控

圖 9.研究架構圖

一、藥品與培養基

(一) NGM plate (for 1L)

成分	克重
NaCl	3 g
Agar	17 g
Peptone	2.5 g
dH <sub>2</sub> O	加入適量 dH <sub>2</sub> O 使其最後為 1L
將所有配方溶液一起滅菌，cholesterol 除外。	
滅菌後加入	
Potassium Phosphate Buffer, pH 6.0	25 mL
1M CaCl <sub>2</sub>	1 mL
1M MgSO <sub>4</sub>	1 mL
5 mg/mL cholesterol	1 mL

(二) Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)

同 NGM 配方，完成滅菌後加入

成分	克重
Ampicillin 100 mg/mL	1 mL
IPTG	0.238 g (預溶於 10 mL H <sub>2</sub> O)

(三) LB broth

成分	克重
Tryptone	10 g
Yeast extract	5g
NaCl	10 g
dH <sub>2</sub> O	加入適量 dH <sub>2</sub> O 使其最後為 1L

(四) M9 緩衝液 (for 1L)

成分	克重
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
dH <sub>2</sub> O	加入適量 dH <sub>2</sub> O 使其最後為 1L
將所有配方溶液一起滅菌	
滅菌後加入	
1M MgSO <sub>4</sub>	1 mL

二、RNA interference 實驗用品

(一) PCR primers

	sequence
<i>msi-1 TH</i> Forward	5'-GGA GAA GGA GGA GCA AAA A-3'
<i>msi-1 TH</i> Reverse	5'-TGT GAG GAA TTG CTG CTG A-3'
<i>msi-1 cenix</i> Forward	5'- GTG GTA GGA ATT GCT GCT GA-3'
<i>msi-1 cenix</i> Reverse	5'-TGG AGA AGG AGG AGC AAA AA-3'

*msi-1 sjj* 使用實驗室已完成剪接的質體 clone。

*TH* 是 Thomas Tuschl 依照 Tuschl rule 設計的 clone。而 *cenix* clone 是 Cenix BioScience 公司改進 Tuschl rule 的計算法而來，改進了 5'端的序列配對彈性(B. Sönnichsen, 2005)。*sjj* 則是 Ahringer library 設計出來的 clone (如圖 10) (Andrew G. Fraser, 2000)。*sjj*、*TH* 及 *cenix* 在 T7 promoter 複製時效率不同，且在線蟲體內進行 RNAi 時，雙股的基因會被切割成長度約 21~22 個核苷酸的片段進行作用，可能影響到非 *msi-1* 的其他基因，因此我們選用不同的 *msi-1* 片段來比對結果，可以有效增加實驗的正確性。

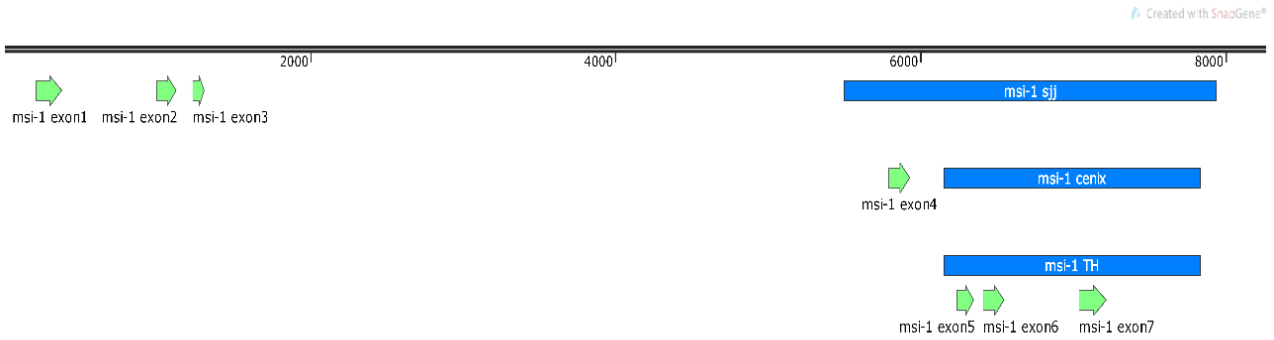


圖 10. *C. elegans* 中的 *msi-1* 片段。

*msi-1* 長 8257bp；*msi-cenix* 長 1681 bp；*msi-sjj* 長 2442 bp。

(二) 1% agarose

成分	克重
Agarose	0.4g
dH <sub>2</sub> O	加入適量 dH <sub>2</sub> O 使其最後為 40 mL

三、線蟲品系

Strain name	genotype	source
JR667	<i>wIs51 [SCMp::GFP]</i>	Joel H. Rothman
SPN016	<i>wIs51 [SCM::GFP] V; let-7(n2853) X</i>	Homemade
SPN014	<i>maIs105[col-19::GFP]; let-7(n2853) X</i>	Homemade
	<i>lin-29(n333) II; wIs51[SCM::GFP] V</i>	Homemade

四、觀察與紀錄工具

- (一) 麻醉劑 (Tetramisole 20mM)
- (二) 螢光顯微鏡 Zeiss Axio Imager M2
- (三) 螢光顯微攝影程式 Axio Vision



## 五、研究過程

### (一) 製作質體

#### 1. 準備 insert (*msi-1 TH*、*msi-1 cenix*)

以 Forward primer 及 Reverse primer 定位線蟲 genomic DNA 上 *msi-1 TH*、*msi-1 cenix*，並利用 PCR 技術放大此 DNA 片段。

#### 2. 準備 vector 及黏合 plasmid

利用 EcoRV 限制酶切除 pL4440 質體的特定片段並純化、以 CIP 切除 plasmid 末端的磷酸根(CIP 可降低 pL4440 plasmid 發生自黏的機率)，最後使用 ligase 將 plasmid 黏合。

#### 3. Enzyme check

使用 Snapgene viewer 程式挑選酵素，挑選切出的長度有明顯差別的兩種酵素，我們挑了 Pvu-II 及 BamHI-HF 兩種酵素，將酵素加入 plasmid 中，放 37°C 30 分鐘作用並用電泳跑膠確認切出的片段大小無誤。

#### 4. 送定序精準確認。

### (二) Feeding RNAi 操作

#### 1. 將 plasmid 送入 *E. coli* 中

將 *msi-1 TH* plasmid、*msi-1 cenix* plasmid、*msi-1 sjj* plasmid 各 1 $\mu$ L 加入 HT115 勝任細胞中，進行熱休克作用 90 秒，置於冰上 5 分鐘以上，加入 900 $\mu$ L LB broth 後置於 37°C shaker 中 1 小時，吸取 100 $\mu$ L 菌液至 Amp+盤上使用玻璃棒塗乾後，置於 37°C shaker 中 16 小時，放到 4°C 冰箱中保存。

#### 2. 養菌

將 LB 分裝至試管中，每管 4mL，將 AMP plate 上的菌落點至 LB 中，置於 37°C shaker 中培養 16~18 小時。

#### 3. Seed 菌

將培養好的菌液放至 IPTG 盤上。*L4440*、*hrp-2*、*msi-1 TH*、*msi-1 cenix*、*msi-1 sjj*、*lin-41* 每種各十盤，*ama-1* 兩盤，一盤 300  $\mu$ L。放置於陰涼處。*ama-1* 乃線蟲 RNA

polymerase II 之基因，。進行 *ama-1* RNAi 會影響線蟲的發育，使得線蟲會停留在 L2 幼蟲期無法長大，因此我們可藉由觀察 *ama-1* RNAi 線蟲的 stage 來判斷 RNAi 實驗是否成功(Sanford, 1982)。

#### 4. 線蟲生長同步化

因一盤培養基上的蟲不一定在一樣的 stage 上，因此我們將蟲體溶掉留下卵，並在 20°C shaker 中搖晃相同的時間以確保孵出的線蟲在同一 stage。以下是實驗步驟：用 M9 緩衝液將 NGM 盤上的蟲收集至離心管內，反覆離心至澄清後倒出上清液，留下 5.25 mL。加入 1.5 mL 的 bleach、0.75 mL 的 5M NaOH 溶液，使用 vortex 震盪 3 分鐘後至顯微鏡下觀察，確認是否已剩蟲卵。確認後用 M9 緩衝液加滿離心管，重複離心、倒出上清液、加滿 M9 緩衝液步驟五次。留 5~6 mL 放入 20°C 線蟲培養箱中的 Nutator 搖晃 16~18 小時。不同時間點所孵化出的線蟲會因為暫時缺乏食物而全部停留在 L1 stage，我們利用此法來同步化線蟲的生長階段。

#### 5. 將蟲放上 RNAi plate

吸取離心管中含已孵化線蟲約 5  $\mu$ L 至顯微鏡下觀察視野內線蟲數量，計算約 300 隻放至 seed 好的 RNAi 菌盤上。

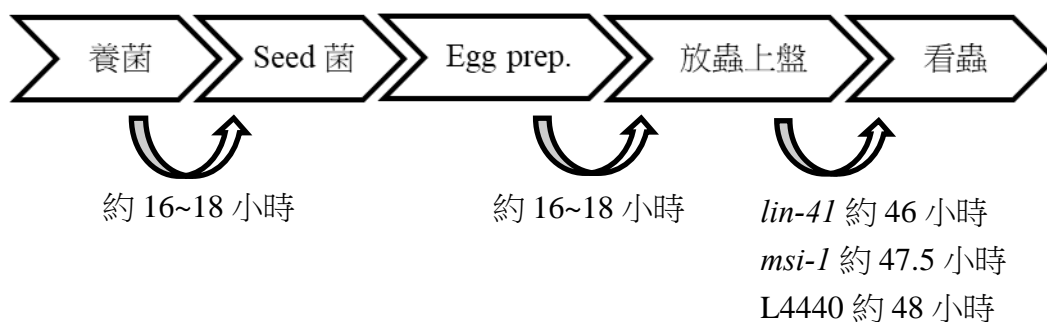


圖 11. RNAi 流程圖

### (三) 使用螢光顯微鏡拍攝線蟲接縫細胞 GFP 綠螢光蛋白之螢光信號

#### 1. 製作玻片

使用 M9 緩衝液將長至成蟲的線蟲洗下收集到 eppendorf 中，反覆離心使線蟲沉澱在底部後吸掉上清液。加熱 1% agarose，利用載玻片使 agarose 凝固成厚薄相同的薄片以固定線蟲，在 agarose 薄片上加 2.5% 麻醉劑，再吸取 eppendorf 底部沉澱的蟲 5 $\mu$ L 加至麻醉劑中，搖晃均勻後蓋上蓋玻片固定線蟲。將做好的線蟲玻片放置螢光顯微鏡下觀察其 seam cell 數並拍攝記錄。

#### 2. 統計方法

使用 GraphPad Prism 統計分析繪圖軟體進行盒鬚圖( box-and-whisker plot)統計分析特定 RNAi 實驗中，線蟲群體帶有不同 seam cells 數目的分布狀況。並以 excel 進行 Student's t test 來檢定在不同 RNAi 實驗中線蟲 seam cells 數目的分布狀況是否有顯著之統計學上的差異。

## 參、研究結果與討論

### 一、建置 RNAi 系統:製作 plasmid

#### (一) insert PCR

利用 *C. elegans* genomic DNA 及 insert primers 使用 PCR 的方式大量複製 *msi-1 TH* 及 *msi-1 cenix* 基因片段，並跑膠確認片段大小正確(如圖 12)。之後利用 DNA ligase 將此二片段接入 pL4440 質體中。

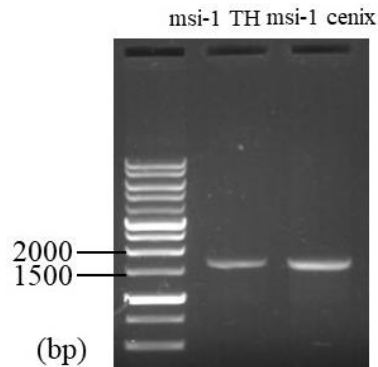


圖 12. 確認 PCR 出的 *msi-1 TH* 和 *msi-cenix* 片段正確。

*msi-1 TH* 實際長度為 1679 bp; *msi-cenix* 實際長度為 1681 bp。

#### (二) enzyme check

我們挑了 *Pvu*-II 及 *Bam*HI-HF 兩種酵素來切割前述所製作之 *msi-1 TH* 和 *msi-cenix* 質體(如圖 13, 14，利用 Snapgene 程式所繪)，利用膠體電泳確認切出的大小無誤(如圖 15)。

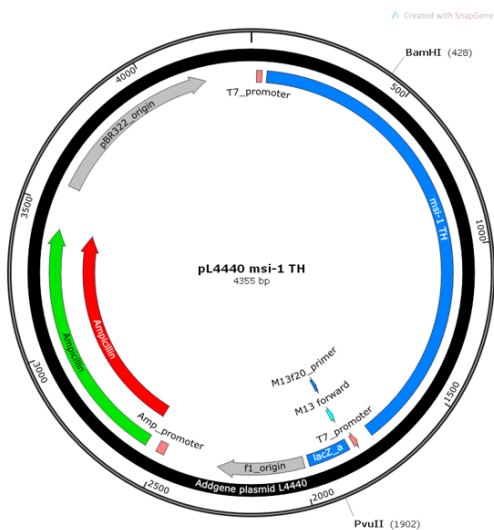


圖 13. pL4440 質體接入 *msi-1 TH*

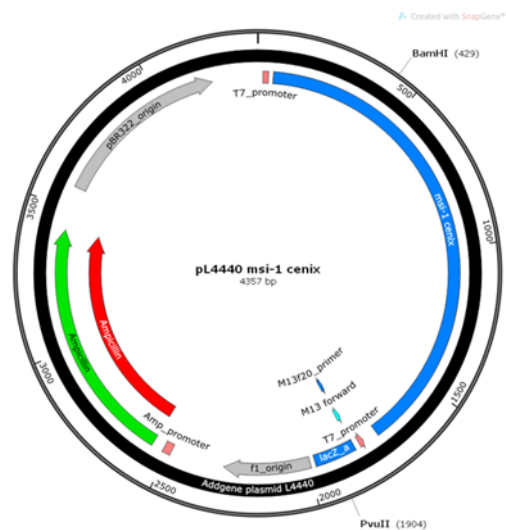


圖 14. pL4440 質體接入 *msi-1 cenix*

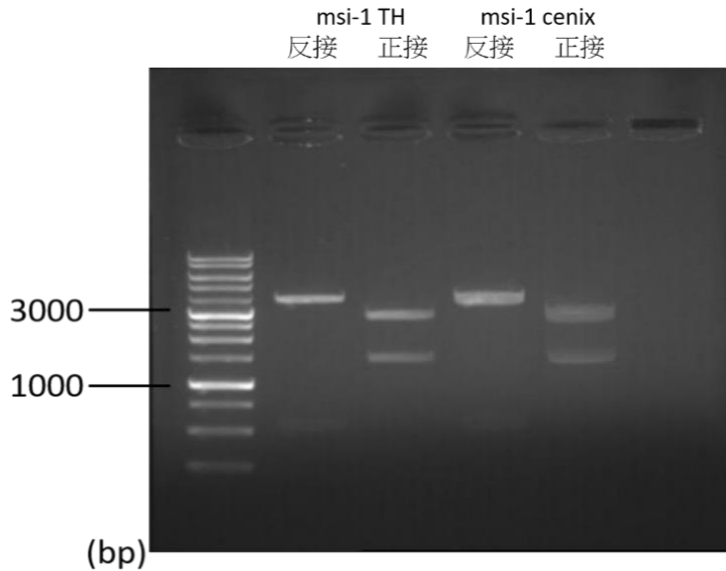


圖 15. Enzyme check 膠圖。

之所以會有正接及反接的差別，是因為雙股的 insert 接入 vector 時，接入的序列有正反兩種情況。如果接入正的 insert 序列，則 *msi-1 TH* 切出 1474bp 和 2881bp 兩片段，*msi-1 cenix* 切出 1475bp 和 2882bp 兩片段；如果接入反的 insert 序列，則 *msi-1 TH* 切出 651bp 和 3704bp 兩片段，*msi-1 cenix* 切出 652bp 和 3705bp 兩片段。實驗中我們使用正接的質體。之後送基因定序確認無誤。

## 二、以 *let-7* 缺失線蟲探討降低 *msi-1* 對 seam cells 分裂次數的影響

野生種(wild type)線蟲的接縫細胞數目通常是 16 個左右，但在 *wIs51;let-7(n2853)* 中，因為 *let-7* 的變異會造成接縫細胞在 Adult 時期繼續分裂，最後會有約 23 個左右的接縫細胞。因此我們觀察接縫細胞中的 GFP 螢光，來記錄在 *wIs51;let-7(n2853)* 中對照組 L4440(RNAi) (mock)、*lin-41*(RNAi) (positive control) 及實驗組 *msi-1 TH* (RNAi)、*msi-1 cenix*(RNAi)、*msi-1 sjj*(RNAi) 接縫細胞數目的變化，觀察降低 *msi-1* 的表現量是否可以讓 *wIs51;let-7(n2853)* 的接縫細胞數回到正常值(如圖 16)。

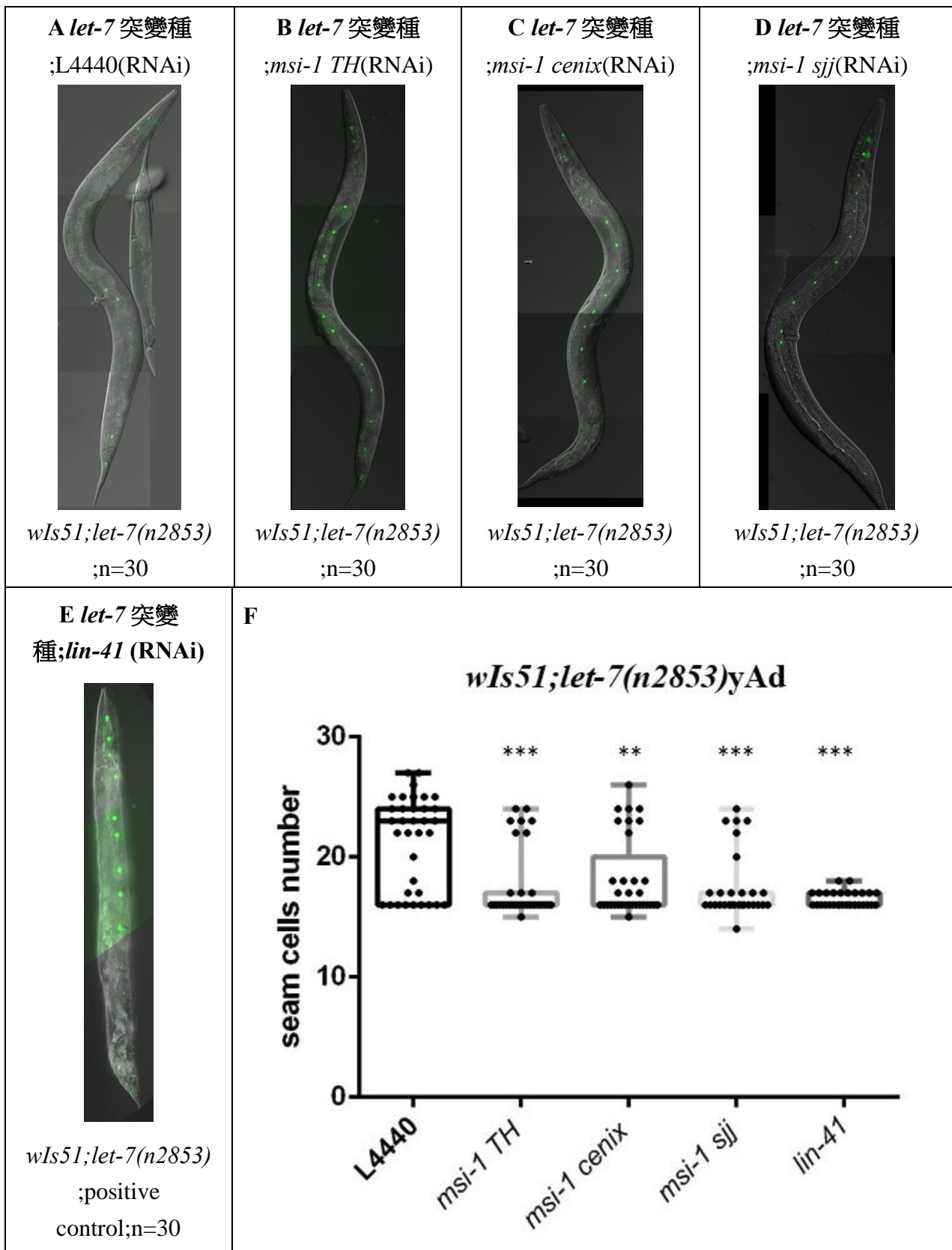


圖 16. *msi-1* (RNAi)影響下 *wIs51;let-7(n2853)*接縫細胞數目

A~E:不同基因 knockdown 的線蟲，綠色螢光為接縫細胞; F:接縫細胞數目統計圖

\*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , by unpaired two-tailed Student's *t* test.

當我們使用 RNAi 技術抑制 *wIs51;let-7(n2853)* 中 *msi-1* 的表現時，可以觀察到 *wIs51;let-7(n2853)* 的接縫細胞數目回到 16 左右，也就是正常線蟲接縫細胞的數量，統計多次實驗數據的結果顯示 L4440(RNAi) (mock) 的接縫細胞數目約落在 21 左右，*lin-41*(RNAi) (positive control) 則落在 15 左右，與預期相符。*msi-1 TH* (RNAi)、*msi-1 cenix*(RNAi)、*msi-1 sjj*(RNAi) 的接縫細胞數目分別落在 17、18、17，根據計算 P value 的結果，此三種 RNAi 表現的接縫細胞數均和 L4440(mock) 有顯著差異。結果顯示降低 *msi-1* 表現量可以讓 *let-7* 缺失所造成的 seam cells 過度分裂恢復正常，也表示降低 *msi-1* 可以提升 *let-7* 路徑的功能。

### 三、以野生種線蟲探討降低 *msi-1* 是否對 seam cells 分裂次數造成影響

為了確認前述 *msi-1* RNAi 可抑制 *n2853* 的 seam cells 重複分裂現象並非因為 *msi-1* RNAi 影響其他可能調控 seam cells 的路徑所造成，我們以 *wIs51*(wild type) 進行了 RNAi 實驗。在野生種與之後的 *lin-29* 功能完全失去及 *let-7* 缺失的突變種實驗中，我們另外也以 RNAi 方式來 knockdown *lin-41* 並觀察其在此不同基因背景下對於 seam cells 分裂分化的影響。藉由觀察在接縫細胞中 GFP 螢光表現來記錄在 *wIs51*(wild type) 中，對照組 L4440(RNAi) (mock)、*lin-41*(RNAi) (positive control) 及實驗組 *msi-1 TH* (RNAi)、*msi-1 cenix*(RNAi)、*msi-1 sjj*(RNAi) 接縫細胞數目的變化(如圖 17)。



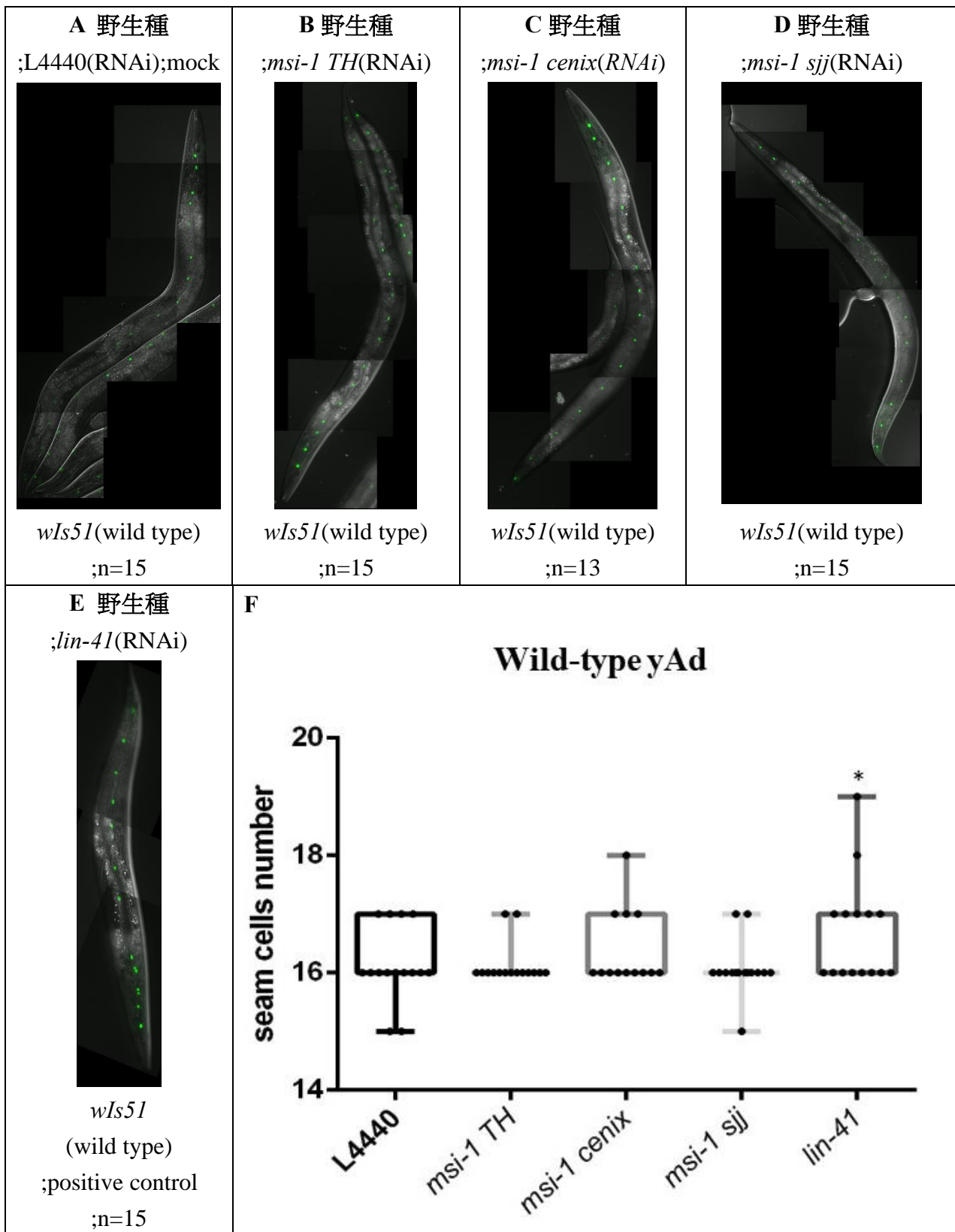


圖 17. *msi-1* (RNAi) 影響下 *wIs51*(wild type) 接縫細胞數目

A~E: 不同基因 knockdown 的線蟲，綠色螢光為接縫細胞; G: 接縫細胞數目統計圖

P 值皆 > 0.05 屬於 n.s., 無統計上差異意義, by unpaired two-tailed Student's t test.

我們在對照組 L4440(RNAi) (mock)·*lin-41*(RNAi) (positive control) 及實驗組 *msi-1 TH*

(RNAi)、*msi-1 cenix*(RNAi)、*msi-1 sjj*(RNAi)中皆觀察到接縫細胞數量大約為 16~17，由以上結果，可推論 *msi-1* 在 *wls51*(wild type)中進行 RNAi 不會影響接縫細胞發育的其他路徑，並確認前述 *msi-1* RNAi 可抑制 *n2853* 下的 seam cells 重複分裂現象並非因為 *msi-1* RNAi 影響其他調控 seam cells 的路徑所造成。

#### 四、以 *lin-29* 缺失線蟲探討降低 *msi-1* 抑制 seam cells 重複分裂路徑是否經過 *lin-29*

為了確認 *msi-1* 在 *let-7-lin-41-lin-29* 的路徑上，以及 *msi-1* RNAi 抑制 seam cells 重複分裂路徑是否經過 *lin-29*，我們使用 *lin-29(n333);wls51* 進行 RNAi 實驗，由於 *lin-29(n333);wls51* 完全不具 *lin-29* 活性，阻斷了 *let-7-lin-41-lin-29* 的路徑，因此若 *msi-1* 不在 *let-7-lin-41-lin-29* 路徑上，則 knockdown *msi-1* 仍可以透過別的路徑來降低 seam cells 數。我們觀察接縫細胞中的 GFP 螢光來記錄在 *lin-29(n333);wls51* 中，對照組 L4440(RNAi) (mock)、*lin-41*(RNAi) (positive control)及實驗組 *msi-1 TH* (RNAi)、*msi-1 cenix*(RNAi)、*msi-1 sjj*(RNAi)接縫細胞數目的變化(如圖 18)。

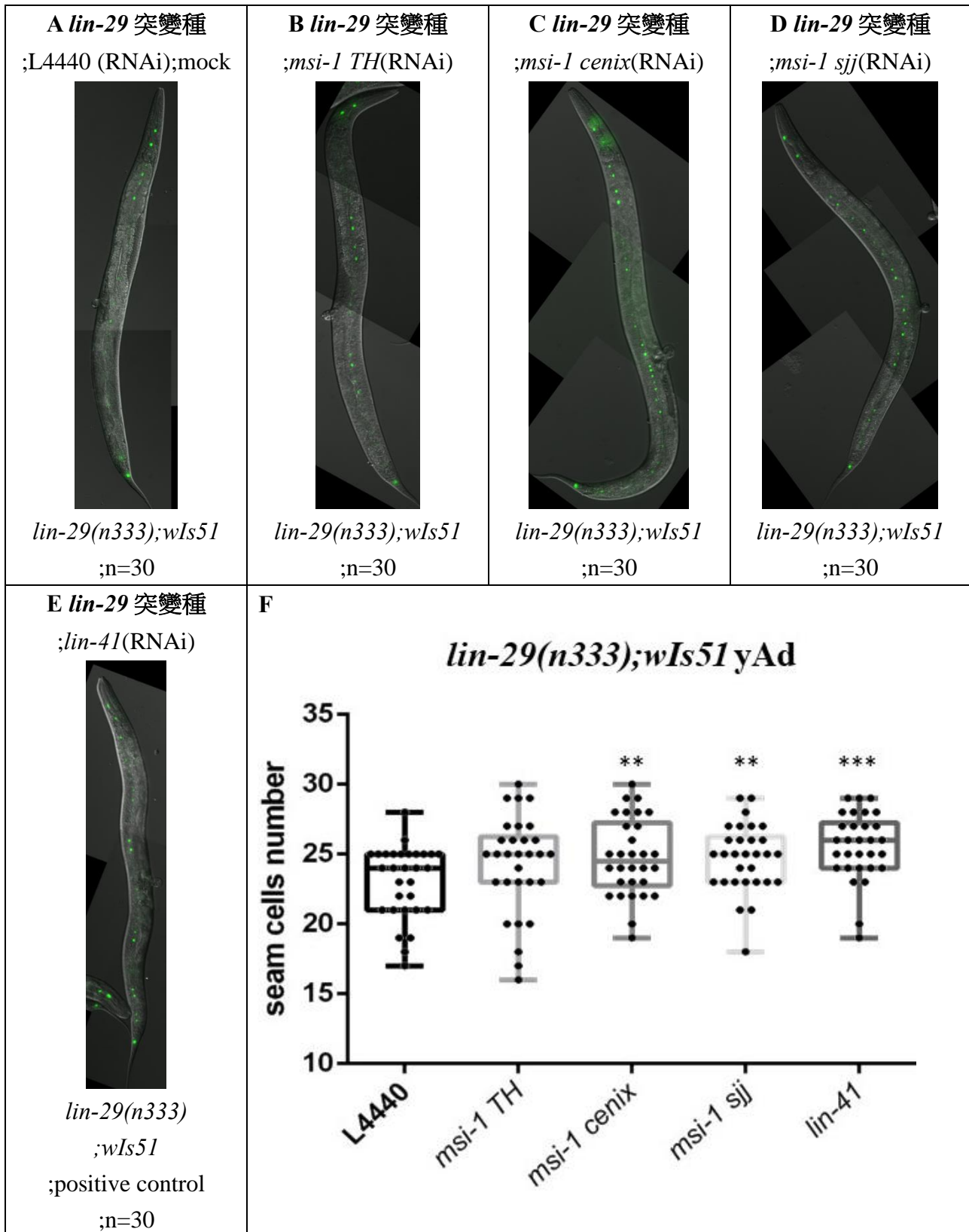


圖 18. *msi-1* (RNAi) 影響下 *lin-29(n333);wIs51* 接縫細胞數目

A~E: 不同基因 knockdown 的線蟲，綠色螢光為接縫細胞; F: 接縫細胞數目統計圖

\*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $P > 0.05$  屬於 n.s.，無統計上差異 by unpaired two-tailed Student's t test.

對照組 L4440(RNAi) (mock)、*lin-41*(RNAi) (positive control)比對實驗組 *msi-1 TH* (RNAi)、*msi-1 cenix*(RNAi)、*msi-1 sjj*(RNAi)，不管降低哪種基因表現，皆無法降低 *lin-29(n333);wIs51* 的 seam cells 數，雖然統計上有差異，但我們認為是由於 *lin-29(n333);wIs51* 的 seam cells 會在 L4 時期不斷重複分裂(如圖 7)，因為觀察時間先後才會造成此差異。根據此結果，我們可以推論 *msi-1* 應該作用在 *let-7-lin-41-lin-29* 的路徑上，*msi-1* RNAi 抑制 seam cells 重複分裂路徑須通過 *lin-29*，且作用在 *lin-29* 上或其上游。

## 五、以 *col-19* 的表現推論降低 *msi-1* 是否可活化 *let-7* 路徑下游基因

*malS105;let-7(n2853)* 因為 *let-7* 變異，導致下游基因 *lin-29* 無法活化 *col-19*，因此 *hyp7* 皮層細胞的 GFP 螢光無法表現。在此實驗中，我們想確認 knockdown *msi-1* 是否可以修正 *let-7* 缺失所造成的突變性狀，進一步了解 *msi-1* 在 *let-7* 路徑上的調控能力，並藉 *let-7* 路徑促進下游基因 *lin-29* 活化 *col-19* 使 *hyp7* 發亮。因此我們進行 *msi-1 TH* (RNAi)、*msi-1 cenix*(RNAi)、*msi-1 sjj*(RNAi)的實驗，觀察在 *malS105;let-7(n2853)*中，對照組 L4440(RNAi) (mock)、*lin-41*(RNAi) (positive control)及實驗組 *msi-1 TH* (RNAi)、*msi-1 cenix*(RNAi)、*msi-1 sjj*(RNAi) 在相同曝光時間下 *hyp7* 的 GFP 螢光表現(如圖 19)。

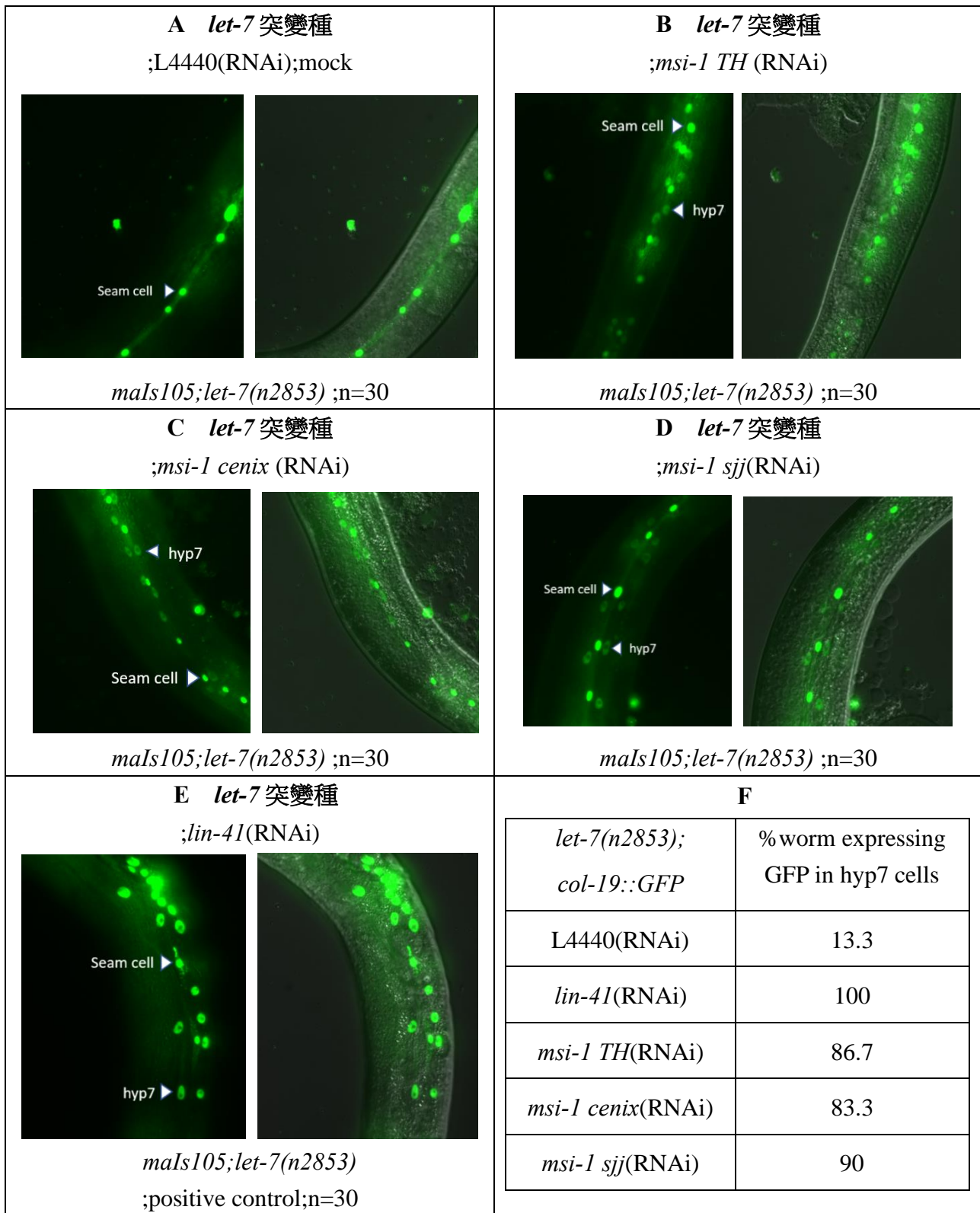


圖 19. *msi-1* (RNAi) 影響下 *maIs105;let-7(n2853)* 接縫細胞數目

A~E: 不同基因 knockdown 的線蟲; F: hyp7 cells 發出螢光百分比統計

seam cells 和 hyp7 cells 型態如圖所示，hyp7 cells 細胞核較 seam cells 的細胞核略大。

圖中僅以白色三角形各標示一個細胞位置以為代表。

我們在對照組 L4440(RNAi) (mock)中觀察到 GFP 在 *hyp7* 中表現比例偏低，*lin-41*(RNAi) (positive control)及實驗組 *msi-1 TH* (RNAi)、*msi-1 cenix*(RNAi)、*msi-1 sjj*(RNAi)中皆有觀察到 *hyp7* 發亮，由於以上結果，可確認在 *let-7* 突變種中 knockdown *msi-1* 可以活化下游基因 *lin-29* 調控 *col-19* 的能力，使 *hyp7* 發亮，進一步證明 *msi-1* 可調控 *let-7* 路徑，影響其下游基因的表現。

#### 六、以 *lin-41 gain-of-function* 線蟲探討降低 *msi-1* 對公蟲尾巴性狀的調控

*lin-41(bx42) ; Em106* 因為 *lin-41* 過度表現，使公蟲尾巴有不同程度的突出現象(圖 20)。在此實驗中，我們想探討 *msi-1* 和 *lin-41* 之間是否有直接的調控關係，因此我們在 *lin-41(bx42) ; Em106* 品系線蟲中 knockdown *msi-1*，並統計公蟲尾巴性狀的表現。

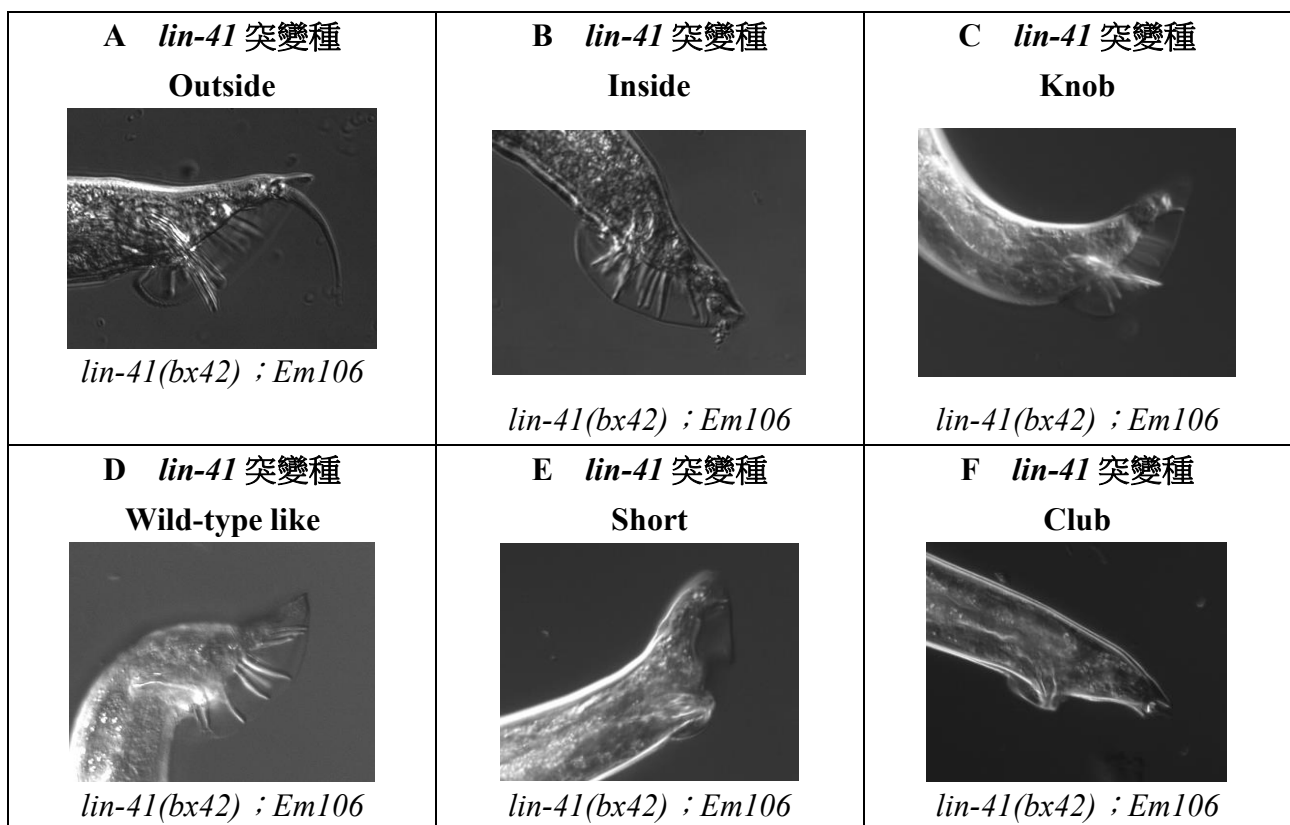


圖 20. *lin-41(bx42) ; Em106* 公蟲尾巴六種性狀

表 1.在 *msi-1* RNAi 下 *lin-41 gain-of-function* 公蟲尾巴性狀統計

	Outside%	Inside%	Knob%	Wt like%	Short%	Club%	n	LSI
L4440	<b>78.85</b>	5.77	3.85	11.54	0	0	104	<b>83.98</b>
<i>msi-1 TH</i>	<b>77.19</b>	6.14	9.65	7.02	0	0	114	<b>84.5</b>
<i>msi-1 cenix</i>	<b>51.89</b>	2.83	24.53	20.75	0	0	106	<b>61.95</b>
<i>msi-1 sjj</i>	<b>72.82</b>	8.74	8.74	9.71	0	0	103	<b>81.56</b>
<i>lin-41</i>	<b>1.98</b>	0	2.97	89.11	2.97	2.97	101	<b>2.97</b>

LSI= (%knob + [2 × %inside] + [3 × %outside]) / 3

LSI 值偏高表示尾巴突出程度高。

我們在對照組 L4440(RNAi) (mock)中統計得到的 LSI 值約為 84，而在 *lin-41*(RNAi) (positive control)中統計得到的 LSI 值約為 3。實驗組 *msi-1 TH* (RNAi)、*msi-1 cenix*(RNAi)、*msi-1 sjj*(RNAi)皆無法顯著修正公蟲尾巴突出的性狀。由於以上結果，可以推測降低 *msi-1* 無法修正 *lin-41 gain-of-function* 的突變，但無法排除 *msi-1* 有組織特異性的可能。



## 肆、結論與應用

- 一、確認 *msi-1* 參與 *let-7-lin-41-lin-29* 的調控路徑上。
- 二、降低 *msi-1* 可以使 *let-7* 缺失所造成的 seam cells 重複分裂現象恢復正常。
- 三、降低 *msi-1* 可修正 *let-7* 缺失所造成的突變性狀，進而活化下游基因 *lin-29* 調控 *col-19* 的能力。

我們首先以 *wIs51;let-7(n2853)* 的線蟲進行 *msi-1* RNAi 實驗，結果顯示降低 *msi-1* 表現量可以讓 *let-7* 缺失所造成的 seam cells 重複分裂恢復正常，證明降低 *msi-1* 表現量可能提升 *let-7* 的功能。為進一步確認前述現象並非因為 *msi-1* RNAi 影響其他調控 seam cells 的路徑所造成的，我們使用 *wIs51(wild type)* 來進行 RNAi 實驗，結果顯示在 *wIs51(wild type)* 中降低 *msi-1* 表現量並不會減少 seam cells 數目，證明 *msi-1* RNAi 並不是影響其他調控 seam cells 分裂的路徑。

為了進一步確認 *msi-1* 作用在 *let-7-lin-41-lin-29* 路徑上及探討 *msi-1* RNAi 抑制 seam cells 重複分裂路徑是否經過 *lin-29*，我們使用了 *lin-29(n333);wIs51* 來進行 RNAi 實驗，結果顯示，在 *lin-29(n333);wIs51* 中降低 *msi-1* 無法抑制 seam cells 重複分裂現象，確定 *msi-1* 作用在 *let-7-lin-41-lin-29* 的路徑上，也可知降低 *msi-1* 來抑制 seam cells 重複分裂路徑，須通過 *lin-29* 且作用在 *lin-29* 上或其上游。

為了更加了解 *msi-1* 在 *let-7* 路徑上的調控能力，我們進行了 *mal5105;let-7(n2853)* 的 RNAi 實驗，結果顯示，在 *let-7* 突變種中 knockdown *msi-1* 可以活化下游基因 *lin-29* 調控 *col-19* 的能力，使 *hyp7* 發亮，進一步證明 *msi-1* 可調控 *let-7* 路徑，影響其下游基因的表現。綜上所述，我們發現降低 *msi-1* 的表現量可修正線蟲中 *let-7* 缺失所造成的突變性狀，並活化 *let-7* 下游基因的功能。

接著我們想了解 *msi-1* 和 *lin-41* 是否有直接調控關係，因此我們在 *lin-41 gain-of-function* 突變種中降低 *msi-1* 後觀察公蟲尾巴性狀的改變。由結果可知，*msi-1* RNAi 無法修正公蟲尾巴性狀的突變，可推測 *msi-1* 和 *lin-41* 之間沒有直接調控關係，但不排除 *msi-1* RNAi 有組織特異性的情況。

先前的文獻指出，降低細胞中 *msi-1* 的表現量可顯著影響癌症的發展、增生、轉移以及治療預後效果，在多種癌細胞中也發現 MSI-1 表現量偏高。且 *msi-1* 可參與多種癌症相關基因路徑的調控，例如 NUMB/Notch、PTEN/mTOR、TGFb/SMAD3、MYC、cMET 等(Alexander E. Kudinov<sup>1</sup>, 2017)。也有研究指出，降低 *msi-1* 的表現量可有效抑制結腸癌細胞的增生(Chao Gao, 2015)。在本實驗中，我們發現 knockdown 線蟲中的 *msi-1* 可修正 *let-7* 缺失所造成的突變性狀，且可調控 *let-7* 下游基因的表現。提高 *let-7* 表現量被證實可抑制多種致癌基因，而 LIN-41 在人類中的同源蛋白為 TRIM71，目前已知功能包含了維持人類幹細胞的多重分化能力，亦可被人類的 *let-7* miRNA 調控，而 *let-7*-TRIM71 調控途徑的失常，常在多種人類癌症中觀察到。因此我們想藉先建立此一研究的線蟲生物模式，未來進而瞭解人類中之 MSI-1 同源蛋白核糖核酸結合蛋白 Musashi-1/2 是否與人類 *let-7*-TRIM71 調控路徑相關及其可能扮演的角色。

## 伍、參考文獻

- Aeschmann, F., Kumari, P., Bartake, H., Gaidatzis, D., Xu, L., Ciosk, R., and Grosshans, H. (2017). LIN41 post-transcriptionally silences mRNAs by two distinct and position-dependent mechanisms. *Mol Cell* 65, 476-489.e474.
- Aponte, P.M., and Caicedo, A. (2017). Stemness in cancer: stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. *Stem Cells Int* 2017, 5619472-5619417.
- Chu, Y.-D., Wang, W.-C., Chen, S.-A.A., Hsu, Y.-T., Yeh, M.-W., Slack, F.J., and Chan, S.-P. (2014). RACK-1 regulates *let-7* microRNA expression and terminal cell differentiation in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Cycle* 13, 1995-2009.
- Dominique L. Ouellet, Marjorie P. Perron, Lise-Andree Gobeil, Pierre Plante, and Patrick Provost(2006) MicroRNAs in Gene Regulation: When the Smallest Governs It All. *J Biomed Biotechnol* 2006, 1–20
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N.(2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics* volume 9, 102–114
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., and Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference.

Nature 408, 325-330.

Gao, C., Han, C., Yu, Q., Guan, Y., Li, N., Zhou, J., Tian, Y., and Zhang, Y. (2015). Downregulation of Msi1 suppresses the growth of human colon cancer by targeting p21cip1. *Int J Oncol* 46, 732-740.

Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H.I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15178-15183.

Hosuk Lee, Sungwook Han, Chang Seob Kwon, Daeyoup Lee (2016) Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications, *Protein Cell* 7(2), 100–113

Kanemura, Y., Mori, K., Sakakibara, S., Fujikawa, H., Hayashi, H., Nakano, A., Matsumoto, T., Tamura, K., Imai, T., Ohnishi, T., et al. (2001). Musashi1, an evolutionarily conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy, and proliferative activity. *Differentiation* 68, 141-152.

Kudinov, A.E., Karanicolas, J., Golemis, E.A., and Bumber, Y. (2017). Musashi RNA-binding proteins as cancer drivers and novel therapeutic targets. *Clin Cancer Res* 23, 2143-2153.

Monica C. Vella, Eun-Young Choi, Shin-Yi Lin, Kristy Reinert, and Frank J. Slack (2004) The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev.* 2004,132–137.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvié, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.

Shu, H.-J., Saito, T., Watanabe, H., Ito, J.-I., Takeda, H., Okano, H., and Kawata, S. (2002). Expression of the Musashi1 gene encoding the RNA-binding protein in human hepatoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 150-154.

Sönnichsen, B., Koski, L.B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.-M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., et al. (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 434, 462-469.

Wang, X., Cao, L., Wang, Y., Wang, X., Liu, N., and You, Y. (2012). Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol Lett* 3, 955-960.

Worringer, K.A., Rand, T.A., Hayashi, Y., Sami, S., Takahashi, K., Tanabe, K., Narita, M., Srivastava, D., and Yamanaka, S. (2013). The let-7/LIN-41 pathway regulates reprogramming to human induced pluripotent stem cells by controlling expression of prodifferentiation genes. *Cell Stem Cell* 14, 40-52.

## 【評語】 070005

由先前的文獻已知，微小核糖核酸 let-7 負向調控下游基因 lin-41 是調控細胞週期。本研究發現以 RNAi 降低核糖核酸結合蛋白 msi-1 的表現量可抑制 let-7(n2853)突變種線蟲中因 let-7 功能缺失所造成的接縫細胞的重複分裂的突變性狀，並增強對下游基因 col-19 的活化調節。推論降低 msi-1 表現量可以提升 let-7 路徑的功能。期望可以藉由研究 msi-1 如何調控此路徑的機制，更加了解 MSI-1 此一核糖核酸結合蛋白對於細胞週期的控制，並提供未來癌症標靶藥物的重要參考。

優點：研究主題有重要性。方法完備，結果有新穎性。

缺點：結果顯示，msi-1 RNAi 無法修正公蟲尾巴性狀的突變，可推測 msi-1 和 lin-41 之間沒有直接調控關係，且跟癌症主題關係不大。

書面報告內容及研究建議如下：

1. 每一張圖需有清楚的圖說，簡介做法及所得到的初步結論，勿以單一個標題即結束。
2. 質體的製作應屬於材料方法的內容，不應列在結果部分。如何利用質體進行後續 RNAi 實驗需加以說明。
3. 文中引用之參考文獻未列在(五)參考文獻中，而(五)參考文獻中所列之參考文獻也未在文中引用，不符合正規論文引用文獻的書寫方法。