

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫：利用 Tol 2 系統建立基因轉殖斑馬魚探討 GJB2 基因突 *
* 名稱：變造成聽障的機制 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 劉于甄
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-021-B
研究期間： 104 年 07 月 01 日至 105 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授： 許立松

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生化微物免疫研究所

中華民國 105 年 03 月 29 日

摘要

我們實驗室主要著重於非症候群聽障的研究，先前我們實驗室針對台灣地區 513 位語言學習前聽障患者，以及 120 位聽力正常的人血液 DNA 作 CX26 基因的分析，結果分別發現了三個 heterozygous 的錯意突變點 (missense mutation)，包含 11G>A/wt(p. G4D)、224 G>A/wt(p. R75Q)及 G>A/wt(p. T123N)，然而目前仍不清楚這些 CX26 基因的突變是否造成功能上的影響，我們欲利用斑馬魚作為模式動物以建立轉殖基因斑馬魚，藉由基因轉殖的角度了解其致病機轉。我們已經利用 Tol2 轉殖基因系統以專一性啟動子 pvalb3b 表現 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白於斑馬魚耳囊聽斑或側線系統之毛細胞神經叢，利用全胚胎免疫螢光染色也可觀察到 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白會表現在耳囊的毛細胞，隨後我們也進行組織石蠟切片並利用 hematoxylin-eosin staining 和組織免疫螢光染色法觀察斑馬魚胚胎以及轉殖基因成魚的毛細胞組織結構，結果發現 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白確實會表現在斑馬魚內耳的毛細胞，未來我們將延續 Tol2 轉殖基因系統建立以專一性啟動子 pvalb3b 表現三個 CX26 突變基因之轉殖基因魚，藉此與正常的 CX26 基因轉殖魚進行比較分析以瞭解各個突變點對 CX26 基因功能的影響。

前言

目前約有 1/1000 比例的嬰兒於出生時或幼年時期罹患中重度聽障，在已開發國家的個案中發現 60% 為遺傳因素所造成，其餘 40% 則為環境因素或兩者共同造成。遺傳因素所造成的聽障大致可分為 70% 非症候群聽障和 30% 症候群聽障，目前已有 21 個體染色體顯性遺傳基因、23 個體染色體隱性遺傳基因、1 個性聯遺傳基因和 6 個粒線體基因被發表與非症候群聽障相關，屬於一種感音神經缺陷的疾病。

耳蝸在聽覺形成的過程中扮演極為重要的角色，為一種螺旋狀的精密結構。以橫切面來說，耳蝸被基底膜和前庭膜分割為耳蝸前庭腔、耳蝸中膈及耳蝸鼓腔三個腔室，耳蝸中膈內又含有聽覺受器，稱之為柯蒂氏器，腔室內流動著外淋巴液、內淋巴液及 intrastrial 等液體。當聲波經由中耳道傳至鼓膜後會轉換成機械能量並傳送到聽小骨，再經由聽小骨傳送到內耳耳蝸，將機械能轉換成液能並引起耳蝸前庭腔和耳蝸鼓腔的外淋巴液震動，進而將能量傳至耳蝸中膈並造成內淋巴液的震動，刺激柯蒂氏器上的 stereocilia 使其頂端的機械訊號傳導通道打開，內淋巴液的鉀離子經此通道會導致細胞膜去極化，將液能轉換成電神經衝動並將電訊息經由聽神經傳導至大腦皮層的聽覺中樞神經系統。內淋巴液主要是被 12 種不同的上皮細胞圍繞在耳蝸中膈內，其中包含與聽覺相關的感音毛細胞，呈現一種高 K^+ 、低 Na^+ 、

低 Ca^{2+} 和高 HCO_3^- 的環境，離子濃度的維持與聽覺形成有密切的關係，其中鉀離子濃度的改變已知與感覺神經傳導機制有關，因此鉀離子再循環機制的進行與維持在聽覺形成中扮演重要的角色，而 connexin (Cx) 基因家族則已證實會參與內淋巴液的鉀離子再循環，如：GJB2/Cx26、GJB6/Cx30、GJB3/Cx31 及 GJA1/Cx43，這些基因發生突變或缺失的動物皆會發生聽障。

研究動機

先前實驗室已在非症候群聽障病患中篩選出三個錯意突變點 (missense mutation)，然而這些 *GJB2* (*CX26*) 基因的突變是否造成功能上的影響，目前尚不清楚。所以希望藉由模式動物——基因轉殖斑馬魚——來探討各個突變點對 *CX26* 基因在功能上所造成的影響。先前實驗室已知斑馬魚 *CX30.3* 基因與人類 *CX26* 基因具有高度同源性，且會表現在內耳毛細胞的細胞膜上，與人類 *CX26* 基因在細胞膜式下的表現型態相似，因此本研究的動機是利用專一性啟動子 pvalb3b 建立一個於內耳中表現正常的人類 *CX26* 基因之轉殖斑馬魚系統，並針對先前在聽障病人發現的三個 *CX26* 突變點 (G4D、R75Q 及 T123N)，同樣藉由專一性啟動子 pvalb3b 建立表現突變的人類 *CX26* 基因之轉殖斑馬魚系統，觀察比較正常和突變基因在斑馬魚表現情形的差異以探討三個突變點對 *CX26* 功能的影響，藉此探討 *CX26* 基因突變造成非症候

群聽障的機制，期望未來有益於臨床應用。

文獻回顧與探討

人類目前已發現 21 個 connexins 家族的蛋白，六個 Cx 蛋白質會聚合成六聚體的 connexon 並運送至細胞膜上形成一個半通道，再與鄰近細胞的 connexon 對接而構成一個 gap junction，作為細胞與細胞間的連結通道蛋白。目前於老鼠與人類耳蝸中主要發現四種 Cx 蛋白質 (Cx26、Cx29、Cx30 及 Cx43) 的表現，其中 Cx26 和 Cx30 已知會表現於耳蝸的支持細胞、螺旋紋和螺旋韌帶的纖維細胞以及血管紋 (Lautermann et al., 1998)。此外在內耳的感光上皮細胞，gap junction 通道也被認為對鉀離子再循環有重要的功用，因此在聽覺訊號傳遞裡扮演重要的角色 (Steel and Kros, 2001)。

人類的 *CX26* 基因是坐落於第 13 號染色體長臂上 13q12 的位置，包含一個 exon，及 681 個鹼基對的開放氏讀碼框，可轉譯出 226 個胺基酸，分子量大約 26 kDa，會大量表現在非感覺性上皮細胞以及結締組織，也發現與 CX30 會大量表現於內耳。*CX26* 基因在近幾年已被發現至少超過 30 個顯性突變與聽障有關，同時也發現若是隱性 CX26 突變的話，也可能會造成 GJ 功能的喪失或減少，或是可能造成功能增強。另一個現象則是顯性負面效應，主要是因為突變後產生的蛋白質對正常的蛋白產生影響，像是文獻中發現當 CX30 與 CX26 形成

heteromeric GJ 通道時，如果 CX26 基因突變則會對於正常的 CX30 造成影響。此外，研究指出 CX26 突變的蛋白與正常 CX26 野生型形成 heteromeric/heterotypic channels 時，也可能會有險性負面效應的影響情形，但詳細原因目前並未確定。先前我們實驗室針對台灣地區 513 位語言學習前聽障患者，以及 120 位聽力正常的人血液 DNA 作 CX26 基因的分析，結果分別發現了三個 heterozygous 的錯意突變點 (missense mutation) 例如: 11G>A/wt(p. G4D)、224 G>A/wt(p. R75Q) 及 G>A/wt(p. T123N)。文獻已知 CX 蛋白結構在胺基端和膜外兩個環圍具有較高保留的區域，而膜內環及羧基端則是屬於變異區。CX26 與其他 CX 蛋白進行胺基酸序列比對後發現突變點 p. G4D 位於胺基端區，屬中度保留性；p. R75Q 位於第一個穿膜區域，屬於高度保留區；p. T123N 位於細胞膜內第一個環，屬於變異區，但目前這些 CX26 基因的突變是否會造成功能上的影響則尚未清楚。實驗室目前主要皆是藉由細胞模式來探討 Cx26 基因突變造成聽障的機制，我們想藉由模式動物斑馬魚進一步瞭解 CX26 基因突變造成聽力缺失的機轉。

斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)是目前常用於研究脊椎動物發育的模式動物，其在胚胎發育上的機制與哺乳類動物是非常相似。由於斑馬魚有許多優點包括：體型小、飼養容易且不需太多空間、具有光週期誘發產卵、每次產卵數量眾多(約可產 100~200 顆)、其透明的胚胎

使得器官在發育時期即可利用解剖顯微鏡從外部觀察、胚胎發育期短（約 2-3 天）。近幾年，許多斑馬魚基因陸續被發現，重要的調控蛋白質其表現位置和時間也都和哺乳類動物類似，所以可利用物理、化學和分子生物學突變方法改變特定基因的表現及產生基因轉殖魚來研究基因與發育和疾病之間的相關機制，而最近的研究已發現在一些器官組織如耳朵、眼睛、心臟、肌肉、血液、脊柱、胰臟及腎等所產生的缺陷，與人類這些器官所產生的一些疾病之病理特徵相似，且為相同基因或同源基因突變所造成，因此，斑馬魚可進一步做為人類疾病研究的動物模式。

斑馬魚的聽覺主要是藉由內耳(inner)和側線(lateral line)來偵測外來顫動(水下聲波)的刺激而產生(Moorman, 2001)。在斑馬魚的內耳構造，經顯微分析後發現在內耳聽斑區(macula)和側線(lateral line)的毛細胞構造與人類耳蝸內感覺受器的毛細胞構造是相類似的(Popper and Platt, 2003)，同樣的在斑馬魚內耳中上皮細胞內襯(epithelial lining)也和人類耳蝸內上皮細胞內襯一樣有各種細胞所組成的，目前為止至少有 granular 和 ionocytes 細胞牽涉其中(Mayer-Gostan et al., 1997; Pisam et al., 1998)。文獻指出已有學者以斑馬魚為模式動物以研究聽覺的形成機制。經顯微分析發現在斑馬魚內耳聽斑區及側線上的毛細胞構造與人類耳蝸內柯蒂氏器

上的毛細胞構造相似(Coffin et al., 2010)。本實驗室先前也利用生物資訊學分析得知斑馬魚的 *cx30.3* 與人類的 *CX26* 和 *CX30* 具有高度關聯性，同時利用 RT-PCR 分析亦發現 *cx30.3* mRNA 確實會大量表現在皮膚和內耳組織，且免疫組織染色分析中也可發現 *cx30.3* 蛋白質會表現在內耳毛細胞的細胞膜上，與人類 *CX26* 基因在細胞膜式下的表現型態相似，可能與人類 *CX26* 扮演相似的功能角色(Ju Chang-Chien et al., 2014)，因此我們欲利用 Tol2 基因轉殖系統建立表現人類正常和突變的 *CX26* 基因之轉殖基因魚。目前在轉殖基因斑馬魚的建立上，MultiSite Gateway® cloning system (Invitrogen) 是最被廣泛使用於製備表現質體的一項技術。此技術是依據同源性基因序列(*att* sites of phage lambda)互換的原理所設計，可將 DNA 片段快速且有效率地在質體間進行互換，經 BP 和 LR 反應最終可將 promoter-target gene-3' polyA DNA 片段互換至含有 Tol2 跳躍子(transposon)的 transposon vector pDestTol2pA，此質體經由顯微注射至斑馬魚胚胎後，會藉由 transposase 的作用而將 DNA 片段隨機嵌入斑馬魚基因體中持續地表現(Villefranc et al., 2007)，藉此觀察比較正常和突變基因在斑馬魚表現情形的差異以探討三個突變點對 *CX26* 功能的影響，探討 *CX26* 基因突變造成非症候群聽障的機制。

綜合以上所述，本研究我們將利用斑馬魚作為模式生物以探討 *CX26* 基因突變對其功能的影響。我們藉由 MultiSite Gateway® cloning system 建立以專一性啟動子 *pvalb3b* 表現正常和三個突變的人類 *CX26* 基因之表現質體，以顯微注射將其分別注射至胚胎中表現並篩選有螢光表現的轉殖基因魚，進一步與表現正常 *CX26* 基因的轉殖基因魚進行表現型態的比較，更可利用行為模式分析的方式進行正常與突變 *CX26* 蛋白的功能比較。若本研究確實可在斑馬魚模式動物中分析比較正常與突變 *CX26* 基因間的差異，相信對 *CX26* 基因突變造成人類非症候群聽障的致病機轉認知將是一大突破，未來甚至可將轉殖基因魚作為一個藥物篩選平台，篩選對 *CX26* 蛋白具有破壞性的藥物，甚至期許篩選可改善基因突變造成聽力傷害的藥物，這對人類疾病醫學將是一大進展。

研究方法及步驟

1. 斑馬魚(Danio rerio)之飼養

野生型斑馬魚(AB strain)，飼養於 28°C 恆溫系統中，日夜週期為光週期 14 小時與暗週期 10 小時，並以適量人工飼料與豐年蝦餵食。

2. 基因轉殖系統

最近在斑馬魚的基因轉殖主要是利用 MultiSite Gateway Technology (Tol2 system)，此系統可以快速和有效率的將異源性基因 (heterologous) 的建構在多位點的載體去進行蛋白質表現和功能分析。整個質體建構包括基因選殖的方法和步驟，主要依據 MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit (Catalog no. 12537-032) 的操作手冊進行。建構好的質體利用顯微注射 (Microinjection) 的方式打入 1-2cell 時期斑馬魚胚胎 (不要超過 8 個 cell 期)，方法和步驟如前所述。因斑馬魚體內有 Tol2 酵素是一種 transposase，所以可以將基因插入斑馬魚的染色體內。基因轉殖魚可以利用螢光顯微鏡和 RT-PCR 的方式來加以確定。

3. 顯微注射 microinjection

以拉針器製作注射所需的毛細管針，條件為 heat:330、pull:150、vel:150、time:150。用高度密合鎳子將拉好的毛細管針前端以 45 度斜口切斷，再以針筒灌入礦物油以平衡注射時的壓力，將準備好的毛

細管針架上顯微注射器(Drummondsc, Nanoject II)，把注射液體吸入毛細管中，再注射至 1~2 cell 時期胚胎之卵黃內，每次 2.3nl。將注射過的胚胎加入 egg water (μg instant salt/ml distilled water) 置於 28°C 恆溫培育觀察。

4. 全胚胎免疫組織染色法(Whole-mount immunohistochemistry)

配置2%PFA，以PBS清洗3次，PFA固定2小時，PBST清洗4次，一次5分鐘，加入脫色劑20分鐘，PBST清洗4次，一次5分鐘，加入Acetone打洞30分鐘，放置-20°C，PBST清洗4次，一次5分鐘，PBS清洗3次，一次5分鐘，PFA固定15分鐘，PBS triton清洗(PBS + 0.1% Triton X-100)4次，一次5分鐘，HYB+ 4°C 16小時以上，25%、50%、75% PBS Triton+HYB⁺各清洗一次，一次10分鐘，PBS triton清洗3次，一次10分鐘，blocking(PBS Triton+5%血清+2.5%DMSO)3小時，一抗1:400 4°C overnight，PBS triton 清洗4次，一次1小時，二抗1:200 4°C overnight，PBS triton 清洗6次，一次45分鐘，0.5% agar包埋，拍照。

5. 石蠟切片

受精後4天大的斑馬魚胚胎以4% PFA固定並以1% agar包埋，再利用一系列濃度的酒精進行組織脫水、浸蠟，最後於烘箱以石蠟進行包埋並放入-20°C冰箱使石蠟凝固，隨後即可以石蠟切片機進行切片。

6. hematoxylin-eosin staining

先用Neo-Clear脫蠟2次，每次30分鐘，用100%、95%、70%酒精複水各30秒，放入H染劑30秒，再放入HC13秒，用清水潤洗。放入E染劑3-5秒，用清水潤洗。之後用70%、95%、100%酒精脫水各30秒，放入Neo-Clear兩次，每次5分鐘，用Neo-Mount封片。

7. 免疫組織染色法(immunohistochemistry)

第一天先用Neo-Clear脫蠟2次，每次30分鐘，用100%、95%、70%酒精、二次水複水各5分鐘，接著放入Tris-EDTA於95°C水浴槽1小時。之後放入3% Blocking Solution 6小時，一抗1:200 4°C overnight。

第二天PBST 清洗2次，一次10分鐘，二抗1:300 1小時，PBST 清洗5次，一次10分鐘，用DAPI螢光油封片。

結果與討論

本實驗室先前也利用生物資訊學分析得知斑馬魚的 *cx30.3* 與人類的 *CX26* 和 *CX30* 具有高度關聯性，且免疫組織染色分析中也可發現 *cx30.3* 蛋白質會表現在內耳毛細胞的細胞膜上，與人類 *CX26* 基因在細胞膜式下的表現型態相似，可能與人類 *CX26* 扮演相似的功能角色，因此我們利用斑馬魚 *Tol 2* 基因轉殖系統建立以專一性啟動子 *pvalb3b* 表現 *CX26-TagGFP* 融合基因之轉殖基因魚，其融合綠螢光蛋

白會表現於內耳或側線系統的毛細胞【Figure 1】，每一世代的斑馬魚皆等待約 3~6 個月至其性成熟後即進行世代有性交配，並同樣篩選於內耳及側線系統表現綠色螢光蛋白的轉殖基因魚【Figure 2】，目前已篩選到第五代，僅篩選到異型合子(heterozygote)基因型的轉殖基因魚【Table 1】。我們已經利用全胚胎免疫組織染色技術以 anti-tubulin 抗體標定毛細胞前端的纖毛(kinocillium)，確實可發現 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白會表現在內耳的毛細胞【Figure 3】。隨後我們也進一步將受精後 4 天的斑馬魚胚胎(5 μm)和轉殖基因成魚(8 μm)進行組織石蠟切片，並利用 hematoxylin-eosin staining 技術觀察到斑馬魚胚胎【Figure 4】和轉殖基因成魚【Figure 5】的內耳毛細胞結構，以倒立螢光顯微鏡直接觀察組織石蠟切片，也確實發現 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白表現於內耳毛細胞【Figure 6】。我們也將成魚組織石蠟切片利用 anti-CX26 抗體進行免疫組織染色，結果發現 anti-CX26 抗體確實會與 CX26-TagGFP 綠色螢光蛋白共同表現於內耳毛細胞【Figure 7】，此結果與全胚胎免疫組織染色的結果符合一致，所以目前我們已經建立一個專一性表現 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白於內耳毛細胞的轉殖基因魚。之後為了更深入瞭解 CX26-TagGFP 綠色螢光蛋白在內耳聽斑的表現位置，我們利用 anti-acetylated tubulin 單株抗體標定聽斑的毛細胞位置，或利用

anti-pancadherin 單株抗體標定細胞膜位置，結果顯示 CX26-TagGFP 綠色螢光蛋白會表現於聽斑的毛細胞以及細胞膜上【Figure 8】、【Figure 9】。本研究雖然還未成功建立出利用 Tol 2 基因轉殖系統以專一性啟動子 pvalb3b 建立突變的 CX26 基因轉殖斑馬魚，觀察比較正常和突變基因在斑馬魚表現情形的差異。然而目前我們已經瞭解 CX26-TagGFP 綠色螢光蛋白在內耳聽斑的表現位置，這將有利於我們後續的實驗。因此之後我們可將轉殖基因魚作為一個藥物篩選平台，篩選對 CX26 蛋白具有破壞性的藥物。之後我們將更進一步建立以專一性啟動子 pvalb3b 建立突變的 CX26 基因轉殖斑馬魚，未來可以用來探討我們實驗室在非症候群聽障病人當中發現有突變發生的基因之功能。

參考文獻

1. Ju Chang-Chien, Yung-Chang Yen, Kuo-Hsuan Chien, Shaun-Yow Li, Tsai-Ching Hsu, Jiann-Jou Yang(2014). The connexin 30.3 of zebrafish homologue of human connexin 26 may play similar role in the inner ear
2. Steel, K.P., Kros, C.J., 2001. A genetic approach to understanding auditory function. Nat. Genet. 27, 143 - 149.

3. Lautermann, J., ten Cate, W. J., Altenhoff, P., Grummer, R., Traub, O., Jahnke, K., Winterhager, E., 1998. Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res.* 294, 415 - 420.
4. Moorman SJ (2001). Development of sensory systems in zebrafish (*Danio rerio*). *ILAR J.* 2001;42(4):292-8.
5. Popper AN and Platt C (2003) Inner ear and lateral line. Chapter 4 of *The Physiology of fishes* Boca Raton: CRC Press, c1993 Evans, David H., (David Hudson), 1940 [ISBN0849380421]
6. Mayer-Gostan N, Kossmann H, Watrin A, Payan P and Boeuf G (1997) Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*). *Cell Tissue Res* 289, 53 - 61
7. Pisam M, Payan P, LeMoal C, Edeyer A, Boeuf G and Mayer-Gostan N (1998) Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts, *Oncorhynchus mykiss* and *Psetta maxima* *Cell and Tissue Research* 294, 261-270
8. Coffin, A. B., Ou, H., Owens, K. N., Santos, F., Simon, J. A., Rubel, E. W. & Raible, D. W. (2010). Chemical screening for

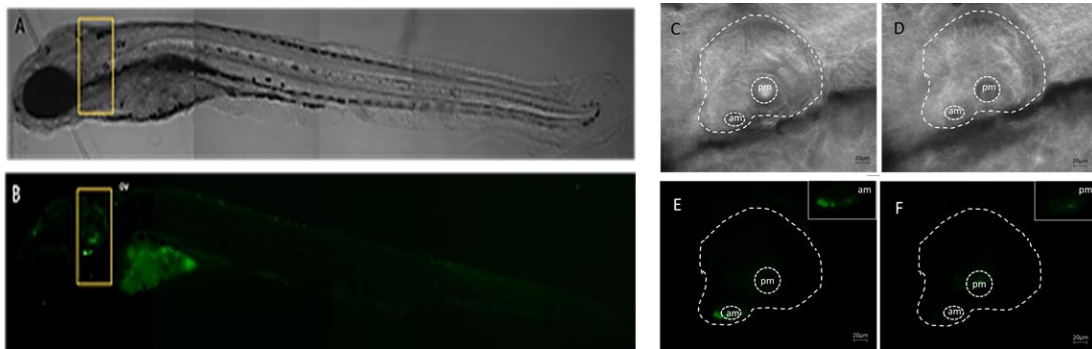
hair cell loss and protection in the zebrafish lateral line.

Zebrafish 7(1): 3-11.

圖表

【Table 1】 已建構好 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 螢光篩選

	第零代	第一代	第二代	第三代	第四代
有螢光的 同型合子	—	—	0/9	0/23	0/21
有螢光的 異型合子	1	—	9/9	23/23	21/21



【Figure 1】 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚

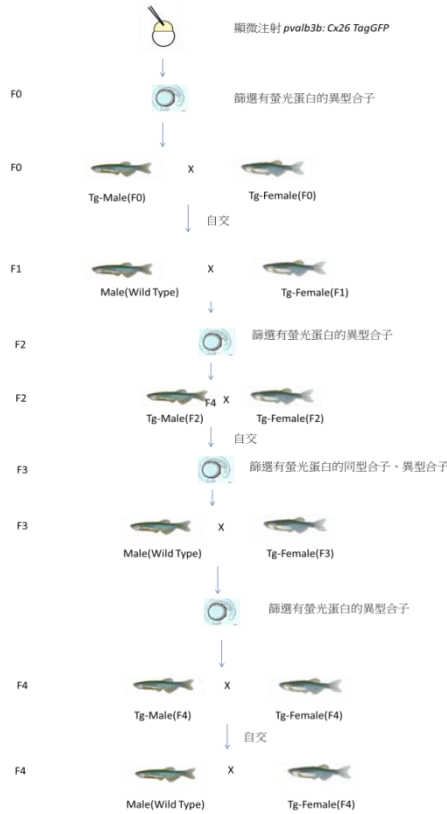
pvalb3b: CX26-TagGFP 轉殖螢光斑馬魚於 7dpf 所觀察之螢光影像，

圖 A 的黃色框框標示為明視野下斑馬魚內耳的相關位置，ov 為耳囊。

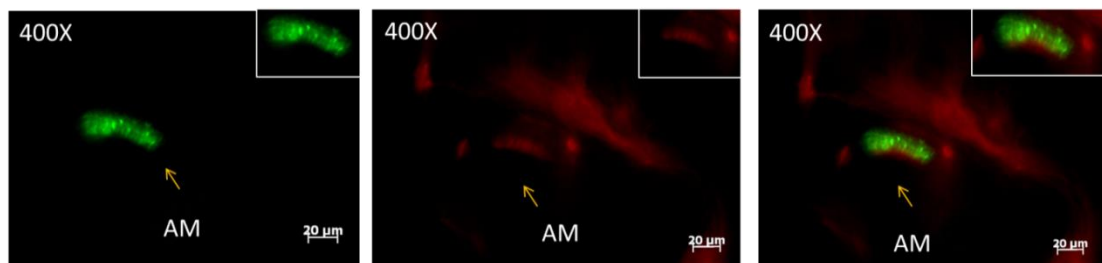
圖 B 為 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 專一性表現 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白

於內耳或側線毛細胞的轉殖基因魚。圖 C 和圖 D 為 400 倍放大的明視

野下斑馬魚內耳耳囊前聽斑(am)、後聽斑(pm)的相關位置。圖 E 和圖 F 為 400 倍放大的螢光影像下斑馬魚內耳耳囊前聽斑(am)、後聽斑(pm)的相關位置。



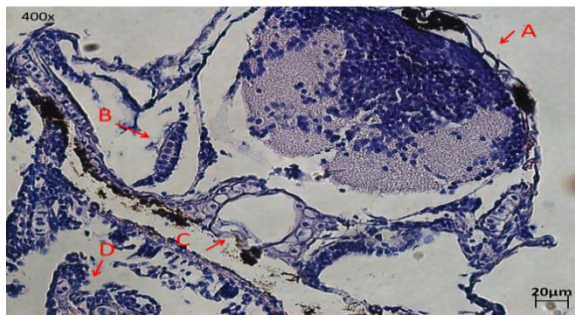
【Figure 2】已建構好的 Tg(pvalb3b-Cx26-TagGFP)利用有性世代交配進行螢光篩選



【Figure 3】*pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚胚胎

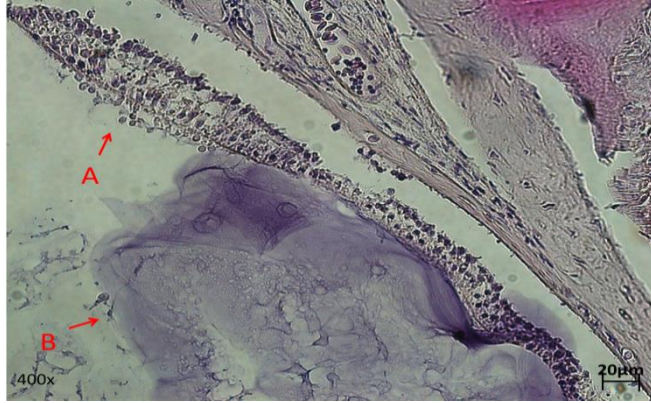
我們將已篩選到基因型態為異型合子轉殖基因魚去做 Whole-mount

immunohistochemistry，標定以已知會表現在內耳毛細胞的 anti-tubulin 抗體，觀察其螢光蛋白表現位置，發現 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白會表現在內耳毛細胞。箭頭代表內耳毛細胞納的前聽斑。綠色螢光為專一性表現於內耳的 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白。紅色螢光為標定 anti-tubulin 抗體。AM 為前聽斑。



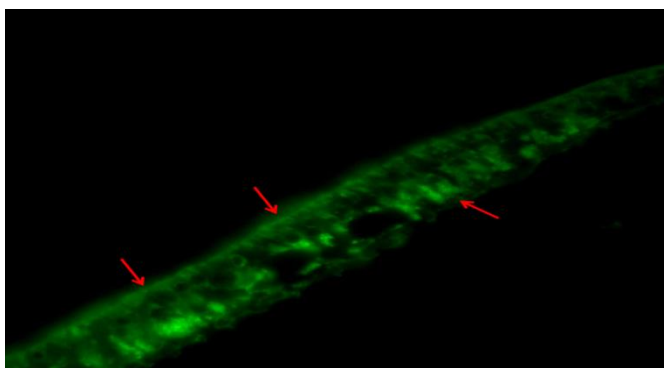
【Figure 4】受精後 4 天大 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚胚胎組織

利用石蠟切片技術去切取厚度 5 μm 的受精後 4 天大 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚胚胎的石蠟切片。下圖為利用 hematoxylin-eosin staining 後在正立螢光顯微鏡所觀察之 400 倍放大明視野影像。箭號 A 為受精後 4 天大 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 胚胎的大腦。箭號 B 為受受精後 4 天大 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 胚胎的內耳耳囊毛細胞。箭號 C 為受精後 4 天大 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 胚胎的脊柱。箭號 D 為受精後 4 天大 *pvalb3b: CX26- TagGFP* 胚胎的心臟。



【Figure 5】 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚成魚組織

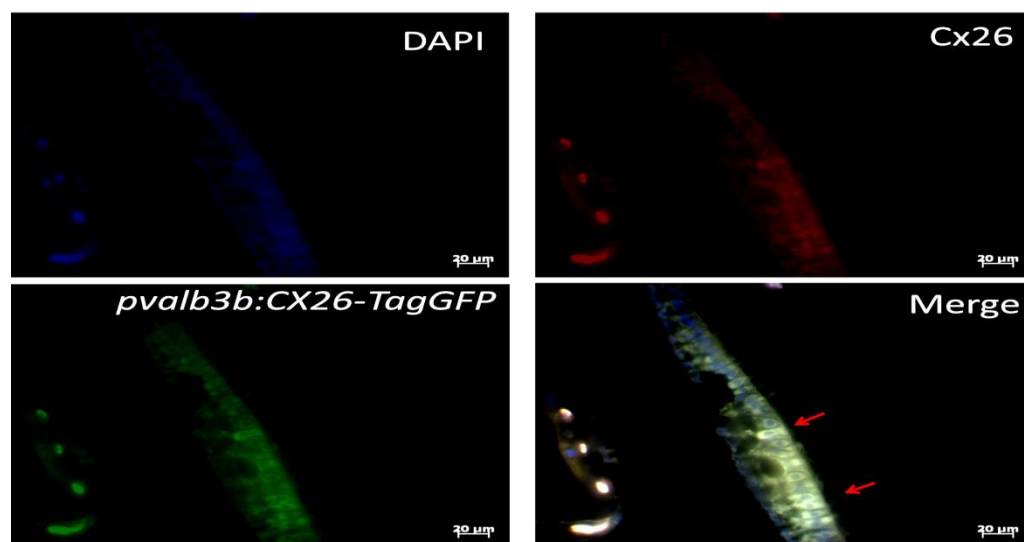
利用石蠟切片技術去切取厚度 8 μm 的 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚成魚組織的石蠟切片。下圖為利用 hematoxylin-eosin staining 後在正立螢光顯微鏡所觀察之 400 倍放大的 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚成魚組織的石蠟切片的明視野影像。箭號 A 為 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚成魚組織的內耳耳囊毛細胞。箭號 B 為 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚成魚組織的耳石。



【Figure 6】 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚之螢光影像

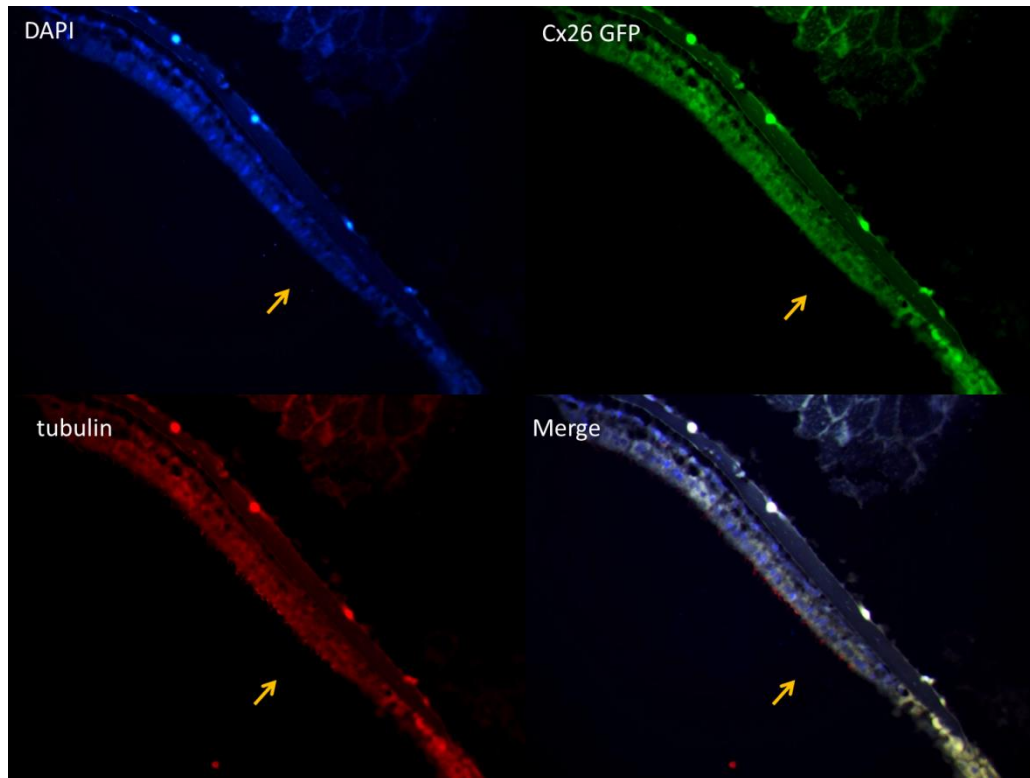
下圖為已利用 hematoxylin-eosin staining 的 *pvalb3b: CX26-TagGFP*

轉殖螢光斑馬魚成魚組織的石蠟切片，後於倒立螢光顯微鏡油鏡放大所觀察之螢光影像。箭號為 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚表現在毛細胞的綠色螢光。



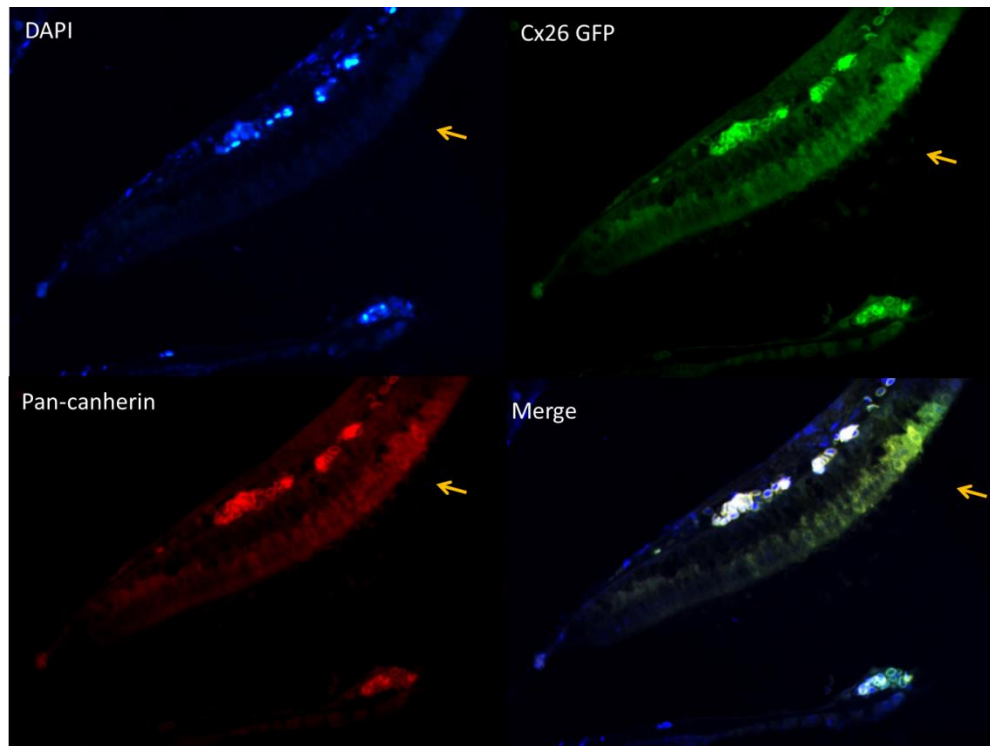
【Figure 7】 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚內耳毛細胞之螢光影像

我們將有切取到內耳毛細胞的石蠟切片利用 anti-CX26 抗體標定，進行 immunohistochemistry 以深入觀察，後於倒立螢光顯微鏡油鏡放大所觀察之螢光影像。而 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 為轉殖螢光斑馬魚會專一性表現 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白於內耳的螢光影像。紅色箭頭為毛細胞。*pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚表現在聽斑毛細胞的綠色螢光與 anti-CX26 抗體的紅色螢光重疊。由此圖可確定 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚的綠色螢光是 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白於內耳的螢光影像。



【Figure 8】 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚內耳毛細胞之螢光影像

我們將有切取到內耳毛細胞的石蠟切片利用 anti-tubulin 抗體標定，進行 immunohistochemistry 以深入觀察，後於正立螢光顯微鏡油鏡放大所觀察之螢光影像。而 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 為轉殖螢光斑馬魚會專一性表現 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白於內耳的螢光影像。anti-tubulin 為標定轉殖螢光斑馬魚於內耳毛細胞的螢光影像。黃色箭頭為毛細胞。*pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚表現在聽斑毛細胞的綠色螢光與 anti-tubulin 抗體的紅色螢光重疊。代表 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚的 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白確實是表現於毛細胞上。



【Figure 9】 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚內耳毛細胞之螢光影像

我們將有切取到內耳毛細胞的石蠟切片利用 anti-pan canherin 抗體標定，進行 immunohistochemistry 以深入觀察，後於正立螢光顯微鏡油鏡放大所觀察之螢光影像。而 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 為轉殖螢光斑馬魚會專一性表現 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白於內耳的螢光影像。

anti-pan canherin 為標定轉殖螢光斑馬魚於內耳細胞膜的螢光影像。

黃色箭頭為毛細胞。*pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚表現在聽斑毛細胞的綠色螢光與 anti-pan canherin 抗體的紅色螢光重疊。代表 *pvalb3b: CX26-TagGFP* 轉殖螢光斑馬魚的 CX26-TagGFP 融合螢光蛋白與 pan-cadherin 共同表現於毛細胞的細胞膜上。