

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫：利用生物資訊學和斑馬魚Tol 2基因轉殖系統來尋找內
* 名稱：耳專一表現的啟動子
* *****

執行計畫學生： 徐靜軒
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-016-B
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授： 楊建洲

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： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 100年03月28日

行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* 計畫 *
* : 利用生物資訊學和斑馬魚 Tol 2 基因轉殖系統來尋找內耳 *
* 專一表現的啟動子 *
* 名稱 *

執行計畫學生：徐靜軒

學生計畫編號：NSC 99-2815-C-040-016-B

研究期間：99年7月1日至100年2月底止，計8個月

指導教授：楊建洲

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

中華民國 100年3月29日

目錄

目錄.....p. 2

摘要.....p. 3

研究動機與研究問題.....p. 3

研究方法及步驟.....p. 4

結果與討論.....p. 7

參考文獻.....p. 11

摘要

斑馬魚是目前常用於研究脊椎動物發育的動物模式，先前已有文獻指出斑馬魚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，所以可利用突變的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。本計畫的動機及目的是希望藉由模式動物來尋找內耳專一表現的啟動子，進而可以建立探討聽障基因功能的動物模式。本計畫的結果，我們利用生物資訊學的方式，在 ZFIN 資料庫和 Ensemble Zebrafish 資料庫及利用 Neural Network Promoter Prediction 進行啟動子區域的預測找到六個可能可以調控基因專一表現在內耳啟動子區。進一步的選殖這些區域建構到 pGL3-basic vector 質體上利用 Luciferase activity 測定及 β -gal assay 分析 promoter 的活性。目前我們已經選殖到兩個片段 (pGL3-basic-otop1 及 pGL3-basic-otolla)，且經 Luciferase activity 測定發現這兩個區域可以調控 Luciferase 的表現量。進一步的我們利用序列刪除的方式縮小 otop1 啟動子區可能存在區域的分析，目前我們發現在 otop1 啟動子的前面 500bp 片段大小既有很強的活性。未來我們將利用斑馬魚 Tol 2 基因轉殖系統來確認這些內耳專一表現的啟動子，若能確定內耳專一表現的啟動子，將可建立一個模式動物來探討聽障的致病機轉。

研究動機與研究問題

研究動機：

先前我們實驗室對於非症候群聽障的研究，在聽障病人中已發現幾個基因 (Connexin 26、Connexin 29、Connexin 30、Connexin 30.3、Connexin 31、Connexin 43) 有突變的發生 (Yang et al., 2007)。另外在細胞模式的研究中，發現其突變會影響基因的正常功能 (Hong et al., 2010; un-publish data)。然而實驗室希望藉由動物模式——基因轉殖斑馬魚——來探討上述基因的功能。為了進行基因轉殖斑馬魚系統的建立，尋找在內耳專一表現的啟動子 (promoter) 是很重要的。因此本研究的目的和動機是利用生物資訊學和斑馬魚 Tol 2 基因轉殖系統來尋找內耳專一表現的啟動子 (promoter)。

研究問題：

1. 利用生物資訊學的方式找尋可能在內耳專一表現的啟動子
2. 利用斑馬魚 Tol 2 基因轉殖系統確認內耳專一表現的啟動子

研究方法及步驟

1. 生物資訊學

1.1 ZFIN 資料庫

(http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?Mival=aa-ZDB_home.apg)

尋找已有文獻指出於內耳專一表現的基因。

1.2 Ensemble Zebrafish 資料庫

(http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index)

搜尋基因的 mRNA 序列，其中包含 5'UTR、CDS、3'UTR 等資訊。

1.3 將 5'UTR 上游約 2kb 的序列利用 Neural Network Promoter Prediction

(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 進行啟動子的預測，再利用此序列進行引子的設計

2. Polymerase chain reaction (PCR)

運用DNA聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)，擴增出想要的片段。反應總體積為20 μ l，含有1 μ l DNA、0.4 μ l 10mM dNTP、4 μ l 5X buffer、forward primer 1 μ l【Table 1】、reverse primer 1 μ l【Table 1】、0.4 μ l DNA polymerase 以及補d2H2O至20ul。將此反應溶液置於迴溫反應器(Perkin-Elmer 9700)中進行，反應條件為denature 98°C 35 分鐘，98°C 8 秒、annealing【Table 1】8秒、elongation 72°C 30~180秒(35個循環數)，72°C 10分鐘，最後溫度維持在25°C。

3. 基因轉殖 transformation

先將competent cell從-80°C冰箱取出，置於冰上溶解。將4 μ l 的ligation產物，加入competent cell裡，輕輕拍打ependorf使其混勻，再放置冰上30分鐘。之後將ependorf放在42°C的水浴槽1分鐘進行Heat-shock，再迅速置於0°C冰水裡shake10 秒鐘，隨即將ependorf 插入冰上靜置2分鐘。之後加入1ml的LB broth，並放置於37°C的培養箱，旋轉45~60分鐘，以增加LB的溶氧量，使菌生長更加快速。之後將ependorf以轉速13200rpm離心12秒，離心後去除上清液，並將底部菌塊拍散並均勻塗抹在含有抗生素的LB agar plate上，最後放入37°C培養箱裡隔夜培養16小時，利用plate 所含的抗生素來篩選菌株。

4. 質體DNA 的製備

目的是將我們送進去細菌內繁殖的質體與細菌本身以及細菌的染色體DNA 分離。將5ml 的菌液離心3000rpm/10 分鐘，丟棄上清液，再使用High-speed plasmid mini kit(Geneaid)抽取細菌質體。首先加入PD1 200 μ l，與細菌充份混合均勻後，移至eppendorf。加入PD2 200 μ l，gently 均勻搖5-6次，靜至2 分鐘。PD3 300 μ l，gently 均勻搖5-6 次後進行離心13200rpm/10分鐘。之後抽取上清液至column，離心30 秒，並去除離心液。加入W1 buffer400 μ l，離心30 秒，倒掉離心液。加入600 μ l wash buffer 離心30 秒，去除離心液後，再離心3 分鐘。之後將column 置於eppendorf 並加入50 μ l 的d₂H₂O。

5. 細胞培養

HeLa細胞在基因轉殖感染前培養在含88%DMEM、10%COSMIC CALF SERUM、1%Penicillin 和1%L-Glutamin培養液中。將HeLa細胞培養在3.7cm²的培養皿中，當細胞濃度達到80%時，即可使用基因轉殖感染。

6. promoter分析

6.1 Luciferase activity測定

以Promega kit 之substrate來測定luciferase表現量。先稀釋cell culture lysis reagent至1X，每個3.7cm²的培養皿各加100 μ l，室溫靜置15 min。將細胞刮下，收集於1.5ml離心管，vortex2~3次增加lysis量，離心12000g 4°C5分鐘。將上清液吸取置新的離心管內供測定。準備96well盤，將10 μ l細胞上清液加入well內，再將60 μ l substrate加入，以冷光測定儀測定。

6.2 β -gal assay

β -galactosidase substrate solution製備：200mM Sodium phosphate buffer(pH=7.3)、2mM MgCl₂、100mM β -mercaptoethanol 350 μ l、1.33mg/ml ONPG。將細胞上清液50 μ l加入50 μ l β -galactosidase substrate solution於37°C反應30分鐘。取80 μ l加入96 Well中，以ELISA reader在O.D. 420測定。

將Luciferase測定值除以 β -gal所測得的值即為此promoter region所表現的值。

7. 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。

8. 顯微注射microinjection

先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。用高度密合鑷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。

9. 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(Fig. 1)。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。

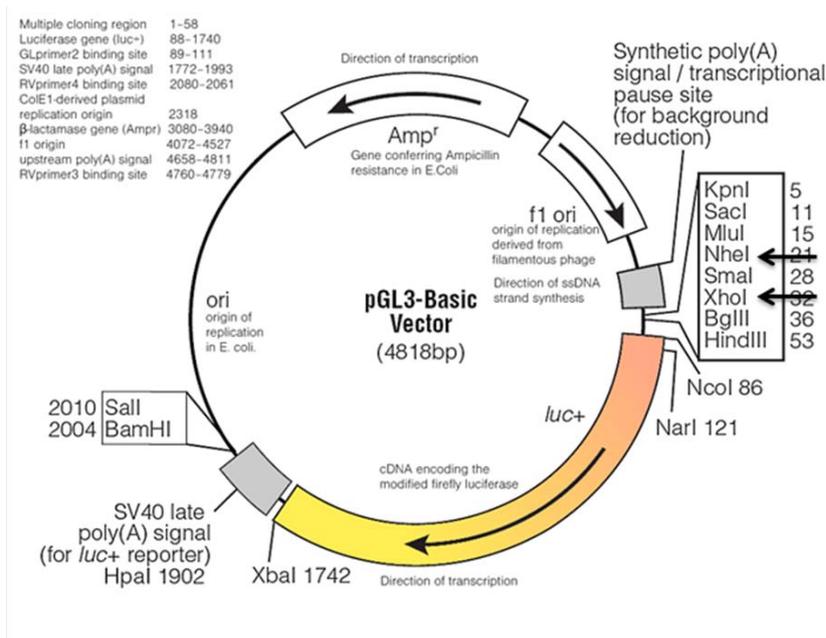
結果與討論

我們已經利用生物資訊學的方法從 ZFIN 資料庫中找到六個可能專一表現在內耳的基因，這六個基因包括：1. otopetrin 1 (otop1)、2. otolin 1a (otolla)、3. starmaker (stm)、4. distal-less homeobox gene 2a (dlx2a)、5. muscle segment homeobox C (msxc)、6. muscle segment homeobox D (msxd)。同時我們利用 Ensemble Zebrafish 資料庫找到這六個基因的相關基因序列。進一步的我們利用 Neural Network Promoter Prediction 預測了 otop1、otolla、stm、dlx2a、msxc 和 msxd 這 6 個基因的啟動子序列區域所在。目前已設計 otop1、otolla primer【Table 1】，分別將這兩個基因轉殖到 pGL3-basic vector【Figure 1】上。將已建構好的 pGL3-basic-otop1【Figure 2 F】以及 pGL3-basic-otolla【Figure 2 A】分別與做為 internal control 的 β -galactosidase plasmid 以 1600ng/ μ l : 800 ng/ μ l 的比例 co-transfection 到 HeLa cell 內，在經過測定 Luciferase activity 及 β -gal 的值後，將 luciferase 結果除以對應的 β -gal 值，即可得校正之 promoter 活性表現值。從結果我們可發現 pGL3-basic-otop1 及 pGL3-basic-otolla 表現與 negative control 有明顯的差別。【Figure 4 A、C】。進一步我們先針對 pGL3-basic-otop1 進行序列刪除，希望能夠縮小可能的 promoter 範圍【Figure 3】。目前已經順利將 pGL3-basic Zf otop1 promoter (2525)、Zf otop1 promoter (3001) 建構到 pGL3-basic 質體上，並用酵素確認【Figure 2 B、C、D、E】。同樣分別與 β -galactosidase plasmid 以 1600ng/ μ l : 800 ng/ μ l 的比例 co-transfection 到 HeLa cell 內，經過同樣的校正方式所得到的值，由目前結果我們發現其 promoter 活性可能是在前面 500bp【Figure 4 B】。之後我們會繼續完成尚未建構好的片段，進一步我們會繼續縮小可能 promoter 存在的片段。pGL3-basic-otolla 部分同 pGL3-basic-otop1 做序列刪除，縮小可能 promoter 存在的片段。進而利用 Tol2 基因轉殖系統觀察其表現位置。

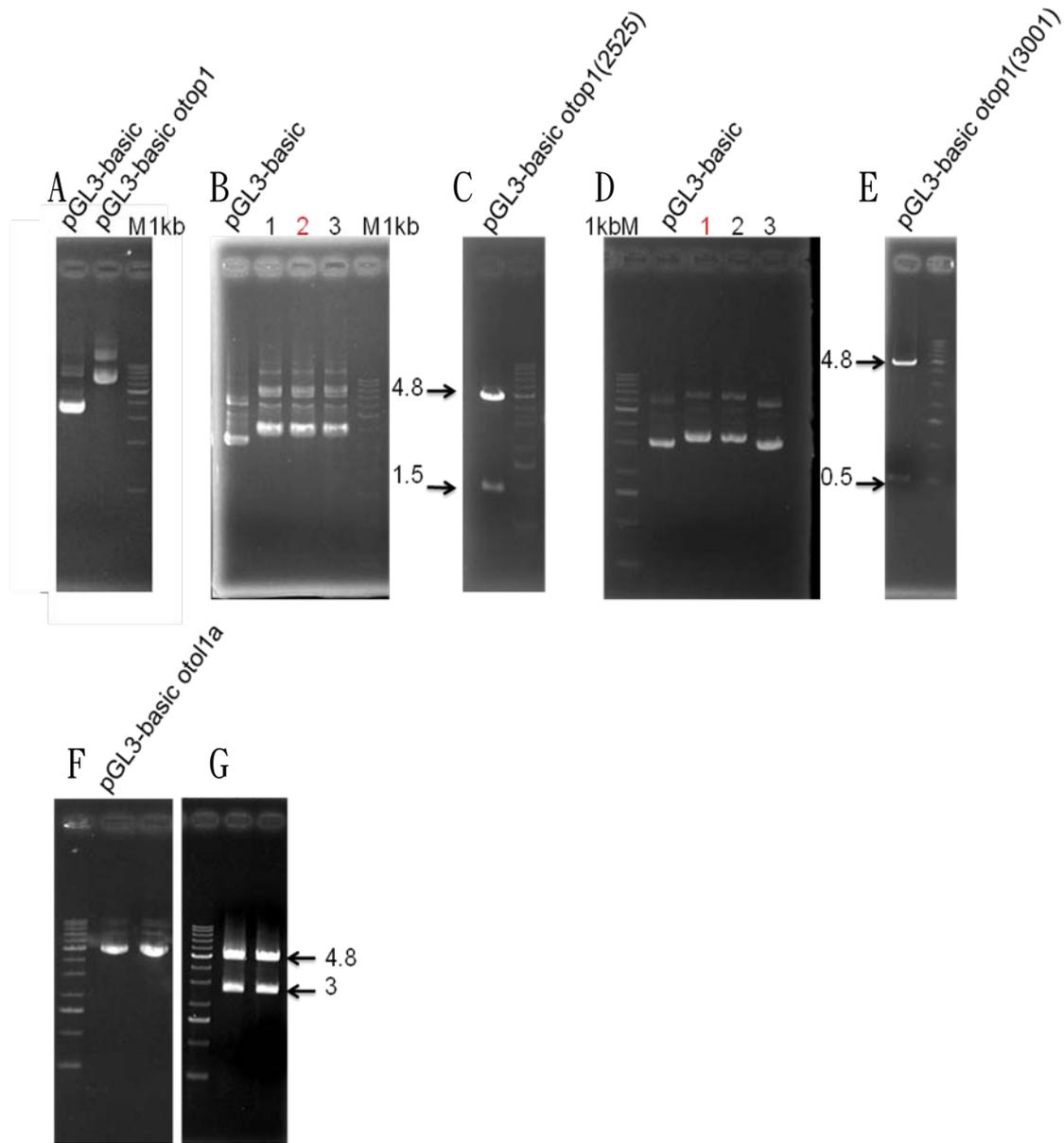
Tol2 基因轉殖系統目前正在將 otop1 所預測的 promoter 區域利用 BP Reaction 換到 pDONR P4-P1r plasmid 上【Figure 5】。之後會繼續完成 LR Reaction，再利用 Microinjection 的方式打到斑馬魚胚胎觀察其 promoter 表現位置。若能確定內耳專一表現的啟動子，將可以用來探討我們實驗室在非症候群聽障病人當中發現有突變發生的基因之功能。

【Table 1】Primer 整理

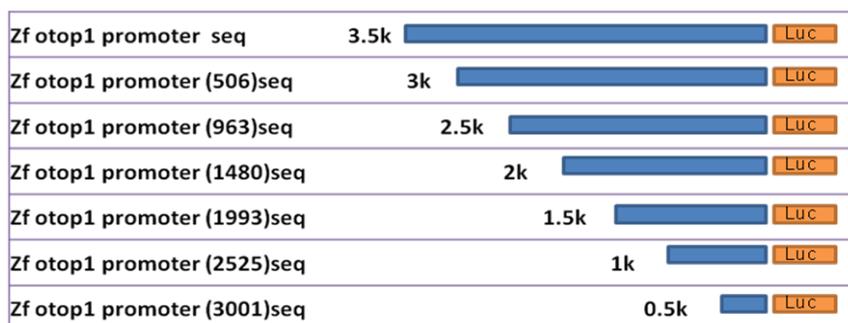
Primer 名稱	序列	黏合溫度
Zf otop1 pro 5'-NheI	5' -CgCgCTAgCTgAgggTATggATCATCgATTAgTT-3'	68°C
Zf otop1 pro 3'-XhoI	5' -CgCCTCgAgAAACTgAgTgAAAAGCagCagAAgAT-3'	68°C
Zf otop1 promoter (506)seq-F-NheI	5' -TCAgCTAgCAACACACAgATgTCCgTCT-3'	68°C
Zf otop1 promoter (963)seq-F-NheI	5' -ATAgCTAgCAAgACTATgTgAACgCCggC-3'	67°C
Zf otop1 promoter (1480)seq-F-NheI	5' -ACTgCTAgCCAgTgTTggACCTgATAgAC-3'	68°C
Zf otop1 promoter (1993)seq-F-NheI	5' -gTAgCTAgCgCCgTggAgCTTTACAATAT-3'	68°C
Zf otop1 promoter (2525)seq-F-NheI	5' -CTCgCTAgCggACTCCCATgTCTATCATT-3'	68°C
Zf otop1 promoter (3001)seq-F-NheI	5' -AgCgCTAgCaggCgTCCAgTgTAATgAAC-3'	67°C
Zf otolla pro 5'-NheI	5' -CACgCTAgCCCCTCAAgTgTTAgTgTTTTCTCC-3'	65°C
Zf otolla pro 3'-XhoI	5' -gAACTCgAgCCTCCTCTTCgTTCTCTTACTAAg-3'	65°C
Tol2-otop1 promoter-attB4	5' -ggggACAACCTTgTATAgAAAAGTTgCgTgAgggTATggATCATCgATTAgTT-3'	
Tol2- otop1 promoter-attB1r	5' -ggggACTgCTTTTTTgTACAAACTTgCAAACCTgAgTgAAAAGCagCagAAgAT-3'	



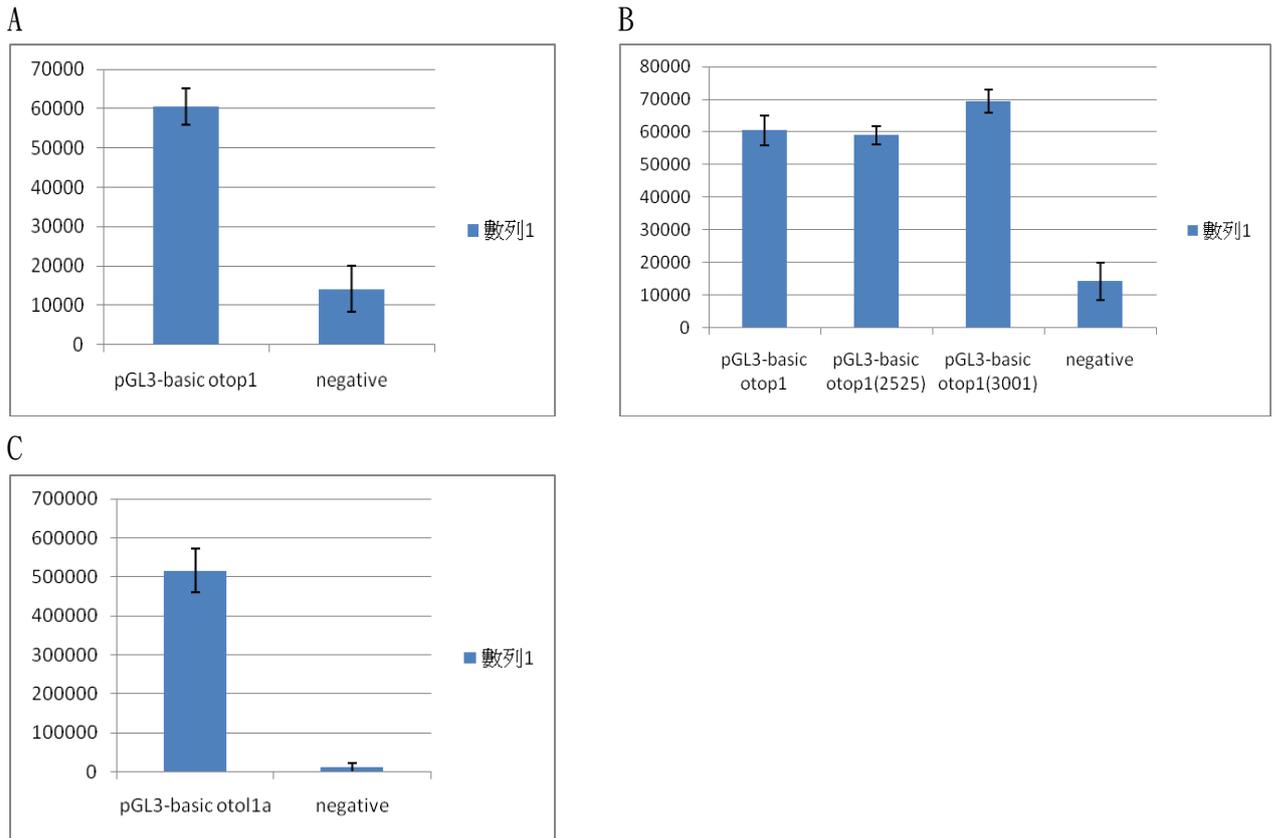
【Figure 1】pGL3-basic 質體圖。



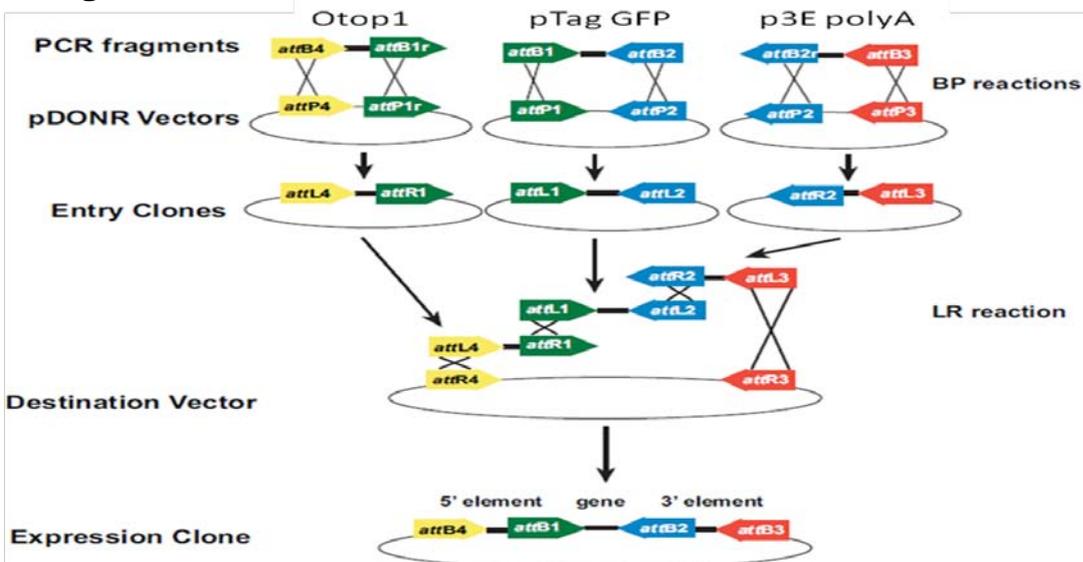
【Figure 2】 A : pGL3-basic-otop1 質體膠圖。
 B : pGL3-basic-otop1(2525) 質體膠圖。
 C : pGL3-basic-otop1(2525)質體利用 Nhe I 及 Xho I 兩種酵素確認。
 D : pGL3-basic-otop1(3001) 質體膠圖。
 E : pGL3-basic-otop1(3001)質體利用 Nhe I 及 Xho I 兩種酵素確認。
 F : pGL3-basic-otolla 質體膠圖。
 G : pGL3-basic-otolla 質體利用 Nhe I 及 Xho I 兩種酵素確認。



【Figure 3】 pGL3-basic-otop1 序列刪除示意圖。將刪除序列的片段分別接到 pGL3-basic 質體上。



【Figure 4.】將建構好的質體 pGL3-basic-otop1、pGL3-basic-otop1(2525)、pGL3-basic-otop1(3001)、pGL3-basic-otolla 分別與 β -galactosidase co-transfection 到 HeLa cell 內，經過測定 Luciferase activity 及 β -gal 的值後，將 luciferase 結果除以對應的 β -gal 值，所得校正之 promoter 活性表現值利用 Microsoft Excel 所畫出的圖表。A：pGL3-basic-otop1 promoter 活性表現高於 negative control，有明顯差異。B：在序列刪除後 pGL3-basic-otop1、pGL3-basic-otop1(2525)、pGL3-basic-otop1(3001) promoter 活性表現皆高於 negative，有明顯差異。其中 pGL3-basic-otop1(3001) 高於 pGL3-basic-otop1(2525)，pGL3-basic-otop1 promoter 在前面 500bp 的地方活性最強，很可能是 promoter 存在的位置。C：pGL3-basic-otolla promoter 活性表現高於 negative control，有明顯差異。



【Figure 5.】Tol2 基因轉殖系統流程圖

參考文獻

1. George Streisinger ,THE ZEBRAFISH BOOK
2. Yang JJ, Huang SH, Chou KH, Liao PJ, Su CC, Li SY(2007). Identification of mutations in members of the connexin gene family as a cause of nonsyndromic deafness in Taiwan. *Audiol Neurootol.* 2007;12(3):198-208
3. Hong HM, Yang JJ, Su CC, Chang JY, Li TC, Li SY(2010). A novel mutation in the connexin 29 gene may contribute to nonsyndromic hearing loss. *Hum Genet.* 2010 Feb;127(2):191-9
4. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF(1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995 Jul;203(3):253-310
5. Moorman SJ (2001). Development of sensory systems in zebrafish (*Danio rerio*). *ILAR J.* 2001;42(4):292-8.
6. 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]
7. 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
8. Pizam 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
9. Whitfield TT, Granato M, van Eeden FJM, Schach U, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J and Nüsslein-Volhard C (1996) Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development* 123, 241-254
10. Kawakami K, Shima A (1999) Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene* 240, 239-244