

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 *
* : 探討在斑馬魚胚胎發育時期 Sox5 對 Irx11 的調控關係 *
* 名 稱 *
* *****

執行計畫學生： 粘家華
學生計畫編號： NSC 100-2815-C-040-031-B
研究期間： 100年07月01日至101年02月28日止，計8個月
指導教授： 潘惠錦

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 101年03月30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 *
* :探討在斑馬魚胚胎發育時期 Sox5 對 Irx11 的調控關係 *
* 名稱 *

執行計畫學生：粘家華

學生計畫編號：100-2815-C-040 -031-B

研究期間：100年7月1日至101年2月底止，計8個月

指導教授：潘惠錦

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

中華民國

101年

3月

31日

目錄

摘要	2.
研究動機與研究問題	3.
文獻回顧與探討	4.
實驗材料與方法	6.
結果	9.
討論	11.
參考文獻	12.
圖表	13.
附圖	20.

(一)摘要

Irx11 為一廣泛存在於各物種中的新穎 homeobox 基因，在 TALE 家族中其 homeodomain 與 IRO 最為相似。先前實驗室利用斑馬魚來探討 *Irx11* 在胚胎發育上所扮演的角色。斑馬魚的 *Irx11* 在胚胎主要表現於咽喉鰓弓，以 antisense morpholino oligo (MO) 將其 knock down 後，斑馬魚胚胎的咽喉鰓弓軟骨、咽喉肌及神經嵴細胞有明顯缺失。利用 Consite 網站分析發現 *Irx11* 基因在 promoter 上游有數個 Sox5 的結合位置，由先前文獻指出，Sox5、Sox6、Sox9 在軟骨的發育中扮演著重要的角色，Sox5 突變小鼠的胚胎會出現次顎裂，且翼骨、上顎軟骨會有異位生長的情形。利用 RT-PCR 和 Whole-mount in situ hybridization，我們觀察到 Sox5 在斑馬魚胚胎發育時期的 18hpf、48hpf 與 *Irx11* 基因表現的位置有重疊。將內生性的 Sox5 進行 knockdown 後，會造成斑馬魚胚胎下顎軟骨的發育異常，以 Alcian Blue 染色可以發現 Sox5 morphant 其下顎軟骨異常與 *Irx11* morphant 型態類似；且在胚胎發育過程中若抑制 Sox5 表現，*Irx11* 表現是下降的，意味 Sox5 或許可調控 *Irx11* 進而影響軟骨發育。但是選殖不同長度的 *Irx11* promoter 序列至 luciferase reporter 和 Sox5 MO 一同注射到斑馬魚胚胎，發現在 Sox5 knockdown 下，*Irx11* promoter 的活性反而有上升的現象。若注射 pCS₂⁺-Sox5 使其 overexpression，則 *Irx11* promoter 的活性會下降。此結果與先前的結果不一致，我們推測可能有別的轉錄因子如 Sox6 和 Sox9 一起調控 *Irx11*，未來將會進一步加入此兩因子共同去探討其對斑馬魚胚胎下顎軟骨發育的影響。

(二)研究動機與研究問題

Irx11 為一個新穎的基因，廣泛的保留在各個物種之間，推測 Irx11 可能在生物體內扮演了重要的角色。在先前的文獻指出，小鼠和斑馬魚的胚胎中可以發現 Irx11 的表現在許多的組織，但其胚胎發育的相關調控機制並不是很清楚。將斑馬魚胚胎的 Irx11 knock down，則會造成下顎軟骨缺失(F1)。

骨骼的發育是從軟骨開始的，隨著發育漸進由硬骨取代，最後才形成骨骼。而軟骨是由間葉細胞聚集及分化而成。間葉細胞受到許多發育的基因調控（例如：Sox5、Sox6、Sox9），不同基因調控細胞分化，造成不同型態上的發育。Irx11 morphant 的胚胎有下顎軟骨的缺失，利用 Consite 網站分析 Irx11 promoter，發現 promoter 上有 4 個 Sox5 的結合位置，而 Sox5 基因又與軟骨的發育有關，因此引發了我們想探討 Sox5 和 Irx11 基因兩者的調控關係。

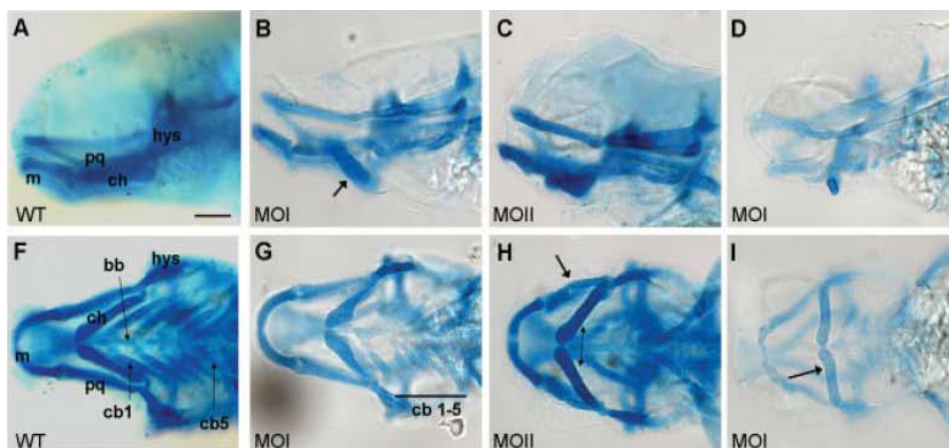
(三)文獻回顧與探討

Irx1 為一新穎基因，具有 homeodomain，屬於 homeobox gene 中的 TALE 次家族。因其 homeodomain 與 IRX 家族最為相似，因此命名為 Irx-like 1(Irx11)[1]，又稱為 Mlx [2]。Irx 家族分別在不同時間與空間調控頭部區域：如中腦、後腦、小腦及耳石、脊索、界線及 rhombomeres 的形成、以及體節尾端等，主要是涉及中樞神經系統、心臟、體節、性腺、軟骨等部位的發育，調控 proneural genes，進一步影響神經管前後與腹背形成 [3,4,5]。在哺乳類動物有 6 個基因，可分為兩個聚集：IrxA (Irx1、Irx2、Irx4)、IrxB (Irx3、Irx5、Irx6)；在斑馬魚中則有 11 個，分為 IrxAa (Irx1a、Irx2a、Irx4a)、IrxAb (Irx1b、Irx4b)、IrxBa (Irx3a、Irx5a、Irx6a)、IrxBb (Irx3b、Irx5b) 四個聚集及 Irx7。Irx genes 主要是涉及神經系統的發育，活化 proneural genes，進一步調控神經管前後與腹背形成，例如：Irx 調節 BMP-4，BMP-4 調節 GATA2。而 Irx 家族分別在不同時間與空間調控頭部區域：如中腦、後腦、小腦及耳石、脊索、界線及 rhombomeres 的形成、以及體節尾端等 [3,4,5]。Irx11 廣泛存在於各物種間，由生物資訊軟體預測顯示 Irx11 基因被廣泛的保留於各物種之間，暗示 Irx11 可能在生物體內扮演重要角色。

在發育中的小鼠可以觀察到 Irx11 大量表現在腳趾、腳掌中，暗示 Irx11 可能參與這些位置發育的調控路徑 [2]。而斑馬魚的 Irx11 在胚胎時期主要表現於咽喉鰓弓，以 antisense morpholino oligo (MO) 將其 knock down 後，斑馬魚胚胎的咽喉鰓弓軟骨、咽喉肌及神經嵴細胞有明顯缺失 (F1) [6]。從生物資訊分析中，發現在 Irx11 promoter 上有許多的 Sox5 binding sites (F2)。

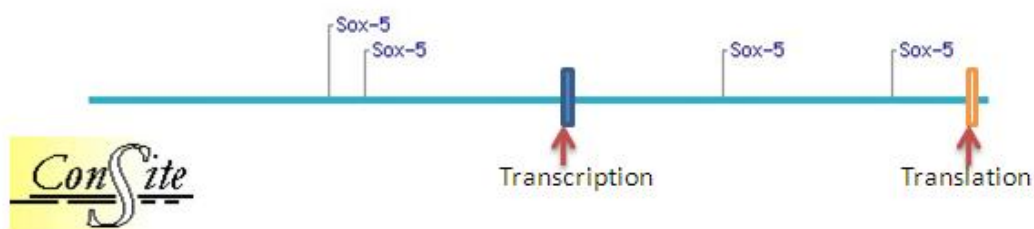
Sox5、Sox6、Sox9 是屬於一個 Sox 轉錄因子家族的成員，此家族基因對物種組織發育影響很大，例如在性別決定、神經系統的發育及軟骨組織的分化都有相關。有文獻指出 Sox5 和 Sox6 在軟骨發育上扮演重要的角色，若把小鼠胚胎的 Sox5、Sox6 基因剔除，其胚胎的軟骨發育會有缺

失，甚至在胚胎時期就死亡。Sox9 位在 Sox5 和 Sox6 的上游，Sox9 的功能是專司於間葉細胞的聚合，其也具有抑制軟骨細胞分化成肥大軟骨細胞的機制，Sox5 和 Sox6 則調控間葉細胞的分化形成軟骨細胞[5]。在 Sox5 剔除的小鼠中，可以發現小鼠胚胎出現了異常，像是出現顎裂，而且在上顎軟骨也有異常的生長。在斑馬魚早期胚胎也有 Sox5 的表現，至於 Sox5 的表現位置以及其在斑馬魚胚胎發育調控角色目前並不清楚，因此我們想要探討在斑馬魚胚胎中，Sox5 是否會影響下顎軟骨的發育，以及 Sox5 是否會調控 *Irx11* 基因的表現進而影響下顎軟骨的發育。



F1. 以 Alcian Blue 染色，發現以 *Irx11* MO 抑制 *Irx11* 的表現造成斑馬魚胚胎下顎軟骨組織嚴重缺陷[6]

Putative transcription factor binding sites found along *Irx11*-promoter



F2. 利用生物資訊網站 Consite 預測 *Irx11* promoter，發現在 *Irx11* 上有四個 putative 的 Sox5 Binding site (-791、-629、+266、+692)

(四) 實驗材料與方法

斑馬魚的飼養及胚胎收集

實驗室所養殖的斑馬魚為 AB strain Wild type Zebrafish (*Danio rerio*)，飼養於 28°C 的恆溫系統中，其日夜週期為光照期 10 小時、黑暗期 14 小時。交配前一晚將公魚和母魚分開，隔天再進行交配並收集魚卵。收下來的胚胎在一到四顆細胞的時期進行顯微注射 Morpholino 或是放入 egg water 中飼養在 28°C 的培養箱中，並且要定時更換 egg water。

斑馬魚 *Irx11* promoter 的選殖

1. pGEM-T Easy-*Irx11* promoter: 首先抽取斑馬魚的 Genomic DNA，設計一對 primer (*Irx1* F-27/*Irx1* R-32)，將 *Irx11* promoter -1342/+951 並以 Taq polymerase 進行 PCR 放大片段，將 PCR 產物(2293bp)以 TA-clone 的方式接到 pGEM-T Easy Vector 中，並 transform 至 *E.coli* 菌株 DH5 α ，經由選殖、定序確定為完整的 *Irx11* promoter 序列。
2. pGL3 basic- *Irx11* promoter: 將 pGEM-T Easy-*Irx11* promoter(-1342/+951) 和 pGL3-Basic Vector 以 *NheI* 酵素切，並進行膠回收。pGL3-Basic Vector 需以 Antarctic phosphatase 去除 5'端的磷酸，避免 self-ligation，再以 ligase 進行接合，transform 至 *E.coli* 菌株 DH5 α 中，經由選殖、定序後即構築好 pGL3- *Irx11* promoter 質體。
3. 先前利用 Consite 網站預測出 *Irx11* promoter 上包含的 Sox5 binding site 分別位在 -791、-629、+266、+692，因此我們利用酵素切的方式，分別設計不同的酵素切點，將已構築完成的 pGL3- *Irx11* promoter -1342/ +951 的序列，逐一縮短，以建立具備不同長度的 *Irx11* promoter 序列，使其包含不同的 Sox5 binding site。

斑馬魚 *Sox5* 的選殖

首先抽取斑馬魚的 cDNA，設計一對 primer (*Sox5*-1 和 *Sox*-2)，將 *Sox5*

並以 Taq polymerase 進行 PCR 放大片段，將 PCR 產物(2293bp)以 TA-clone 的方式接到 pGEM-T Easy Vector 中，並 transform 至 E.coli 菌株 DH5 α ，經由選殖、定序確定為完整的 Sox5 序列。

RT-PCR

取 5 μ l total RNA 加入 10mM dNTP Mix，以 oligo (dT) 15 (500 μ g/ml) 為 primer 補 DEPC 水至 13 μ l，在 65 $^{\circ}$ C 作用五分鐘破壞 RNA 二級結構，接著快速的置於冰上冷卻三分鐘避免自行黏合，接著加入 First-strand buffer 和 DTT，使用 SuperScript III Reverse transcriptase (Invitrogen) 進行反轉錄反應，完成後 cDNA 總體積為 20 μ l。進行 PCR 反應時，取 cDNA 作為模版。

全胚體原位雜交(Whole-mount in situ hybridization)

將收集的胚胎以 PBST 清洗後，再以 PFA/PBS 固定在 4 $^{\circ}$ C 中 overnight 固定，之後將胚胎的卵膜脫除再依 25%、50%、75% methanol in PBS，完全脫水於 100% methanol，保存在 -20 $^{\circ}$ C 中。用 25%、10%、50%、75% PBST in methanol 將胚胎用 PBST 覆水後，用 HYB-、HYB+ 進行 prehybridization。加入含 Dig-labeled RNA probe 之 HYB+ 進行 hybridization。用 25%、50%、75% 2xSSCT in HYB- 將胚胎洗至 2xSSCT，之後用 0.2xSSCT 將非專一性結合的 RNA 洗去。用 blocking solution 蓋住胚胎中會非專一性結合的蛋白，使用經 pre-absorbed Anti-Dig-AP 抗體。接著以 detection solution 浸潤胚胎，給予受質 NBT/BCIP 溶於 detection solution 避光進行呈色反應。呈色完成後，用 100% methanol 洗去背景脫色，再以 4%PFA/PBS 固定。拍照時將胚胎放在 50% glycerol 提高透光度且胚胎也較不易移動。

顯微注射(Microinjection)

針對 Sox5 基因轉譯起始點附近的序列設計 MO (F3)，以 Danieau solution 稀釋成 2mM stock，加 phenol red 作為注射指標，配製成 morpholino solution。利用顯微注射器(Drummondsc, Nanoject II)先將 0.5 ~1 p mole /embryo 劑量的 MO 吸入毛細管中，再注射至 1~2 cell 時期之胚胎內。



MOI 利用 Ensemble 網站，設計 Sox5 MO。MOI 為抑制 Sox5 translation，MOII 為抑制 Sox5 splicing

製備全胚體原位雜交的探針

利用先前製備完成的 pGEMT-Sox5(1K)以 Apa1 酵素切後，取用 100~200ng 的模板，加入 10X Dig-RNA labeling Mix，10X NEB buffer，100mM DTT，Rnasin(20 μ / λ)，補 DEPC 水至 20 λ ，利用 T7 polymerase 作用 40 $^{\circ}$ C 兩小時，接著使用 DNase 37 $^{\circ}$ C 作用十五分鐘，最後利用 EDTA(pH8.0)終止反應，酒精沉澱 overnight 後，再以 DEPC 水和 formamide 回溶。

Dual-luciferase reporter assay

pGL3- Irx11 promoter 質體可做出 firefly luciferase，將不同長度的 Irx11 promoter 包含不同的 Sox5 Binding site 與 pCS2 - Sox5 或 Sox5 MO 共同注射到斑馬魚胚胎中，取萃取液分析 luciferase 活性，由其所表現出來的結果找出 Irx11 promoter 上有效的 Sox5 binding site。另外，pRL 做出 Renilla luciferase 可以校正實驗操作的誤差。

(五)結果

斑馬魚胚胎 *Irx11* 與 *Sox5* 的表現

首先在早期斑馬魚胚胎(18、24、48hpf)利用 Whole-mount in situ hybridization 來偵測 *Irx11* 與 *Sox5* 的表現，在 18hpf 的胚胎可以觀察到其兩者表現在 notochord，24hpf 則主要表現在腦部，而 48hpf 則明顯的集中在下顎的部分，由此觀察 *Irx11* 與 *Sox5* 在早期斑馬魚胚胎發育有時間與空間重疊的現象。另外，在 RT-PCR 也可以看到在早期胚胎兩者都有表現(圖一、圖二)。

Sox5 knockdown 胚胎的型態分析

我們將設計好的 *Sox5* MO 顯微注射到斑馬魚胚胎當中，分別做了 RT-PCR 定量分析、Whole-mount in situ hybridization、Alcian Blue 染色觀察其下顎軟骨發育情形。在注射過 *Sox5* MO(0.25pmol+1.5X p53 MO)的全胚胎在 48 小時純化其 RNA，再轉成 cDNA，利用 primer 放大定量 *Irx11* 的表現(圖三)，在 knockdown 下的胚胎，其 *Irx11* 的表現量是下降的，MOI 下降至 80%，而 MOII 則下降至 55%。另外再 Whole-mount in situ hybridization 觀察下，可以觀察到分別在 MOI 及 MOII 有不同的現象，和 STD 比較則 MOI 其 *Irx11* 表現的比例是下降了 45.5%，而 MOII 則下降了 71.4%(圖四；Table1)。此外，我們也利用 Alcian Blue 染色觀察 120hpf 胚胎其下顎軟骨的發育，發現在注射過 *Sox5*MO 的胚胎，下顎軟骨發育有異常的情形，可以將異常情形分為兩種，在第二對軟骨可以觀察到與 STD 比較有角度的異常(mild)，更為嚴重的還可以觀察到生長方向相反(sever)；那麼從後五對軟骨作分析，軟骨異常則為(mild)，如果不發育則較為嚴重(sever)(圖五、圖六)，將這些分類也做了統計(Table2、Table3)。在以上的結果顯示，在 *Sox5* knockdown 下的胚胎，抑制了內生性的 *Sox5*，其下游的 *Irx11* 的表現也隨著下降。

***Irx11* promoter assay**

先將選殖好的 *Irx11* promoter -1342/+249-pGL3 basic，利用酵素切的方式，以及利用 PCR，選殖到 *Irx11* promoter -1342/-459-pGL3 promoter、*Irx11* promoter-452/+249-pGL3 basic(附圖一)。首先將各長度的殖體和 Sox5 MO 一同注射到斑馬魚胚胎，經過 48 小時取出頭部萃取出來做冷光分析(圖七)。發現在 Sox5 knockdown 下，其 *Irx11* promoter 活性是有上升的現象。另外，也將選殖好的 Sox5-pCS₂⁺ 與不同長度的 *Irx11* promoter 一同注射至斑馬魚胚胎，在 48 小時取出頭部萃取出來做冷光分析(圖八、圖九、圖十)。發現不管在 overexpression Sox5 還是 knockdown 內生性的 Sox5，*Irx11* promoter 的活性會隨著 Sox5 的參與有所影響，在 overexpression Sox5 中其活性是明顯的抑制 *Irx11* 的活性，另外在 knockdown Sox5 的情況下，*Irx11* 活性是上升的。

(六)討論

在早期斑馬魚胚胎發育過程中，可以觀察到 *Irx11* 與 *Sox5* 有 colocalize 的現象，此外在 RT-PCR 也可以看到兩者有相同時間上的表現。暗示著在早期發育過程中其兩者有可能在發育過程中扮演了重要的角色。

另外，也將內生性的 *Sox5* 進行 knockdown 去探討斑馬魚下顎軟骨的發育情形，不管在 0.25pmol 還是在 0.5pmol 的濃度下，都會造成下顎軟骨發生異常，甚至會有更嚴重的不發育等情形，在目前的結果顯示 *Sox5* 或許調控著 *Irx11*，進而影響下顎軟骨的發育情形。在 Alcian Blue 染色結果可以發現 *Sox5* morphant 其下顎軟骨發育與 *Irx11* morphant 型態類似，另外，RNA 的 level 也顯示，knockdown *Sox5* 其 *Irx11* 的表現也是下降的，這樣的結果更加顯示 *Sox5* 調控 *Irx11* 的可能性。

在前面的結果顯示，在 knockdown 內生性的 *Sox5*，*Irx11* 的表現都呈現下降的情形。我們就想要利用 promoter assay 來探討是否會和先前結果一致，首先在 *Irx11* pr.-1342/+249 這個片段裡面有兩個預測的 *sox5* binding sites，藉由 overexpression *Sox5* 來看 *Irx11* promoter 的活性，發現其活性是下降的，在 *Irx11* pr.-1342/-452 片段也是一樣的情況。這樣的結果顯示和先前的結果是相反的。

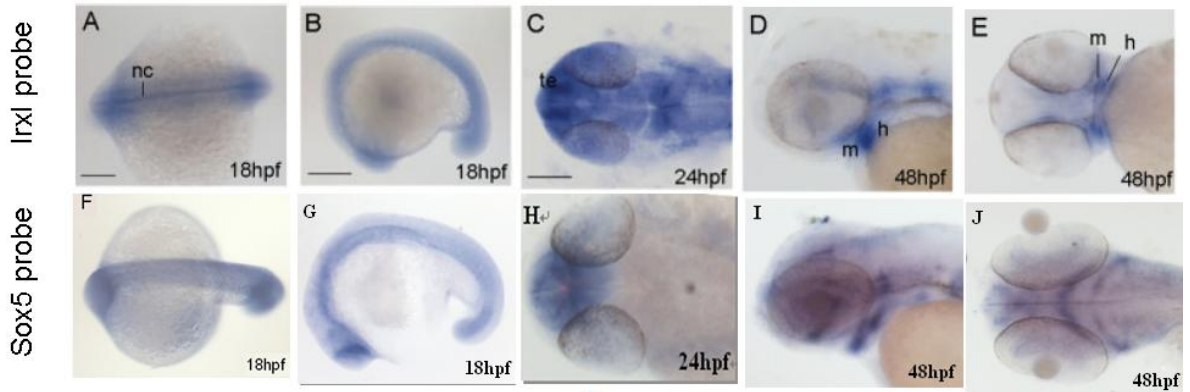
以上的結果有相反的情況，就在推測說是否不只單一個 *Sox5* 去調控 *Irx11*，或許有另一個因子去結合 *Sox5* 進而影響下游的基因。在先前的文獻報告，在軟骨細胞事實上有三個轉錄因子調控其發育，分別是 *Sox5*、*Sox6* 和 *Sox9*，且 *Sox5* 和 *Sox6* 會形成 heterodimers 去結合特定序列調控下游，此外，三個轉錄因子也會有不同調控方式，或許在我的實驗結果看來，不僅只有 *Sox5* 會去影響 *Irx11*，應該也要去看 *Sox6* 和 *Sox9* 是否會參與其中。

未來不僅 overexpression *Sox5*，還會 overexpression *Sox6* 以及 *Sox9* 進行顯微注射，給予不同的情況下去探討是否三者會去調控 *Irx11*。

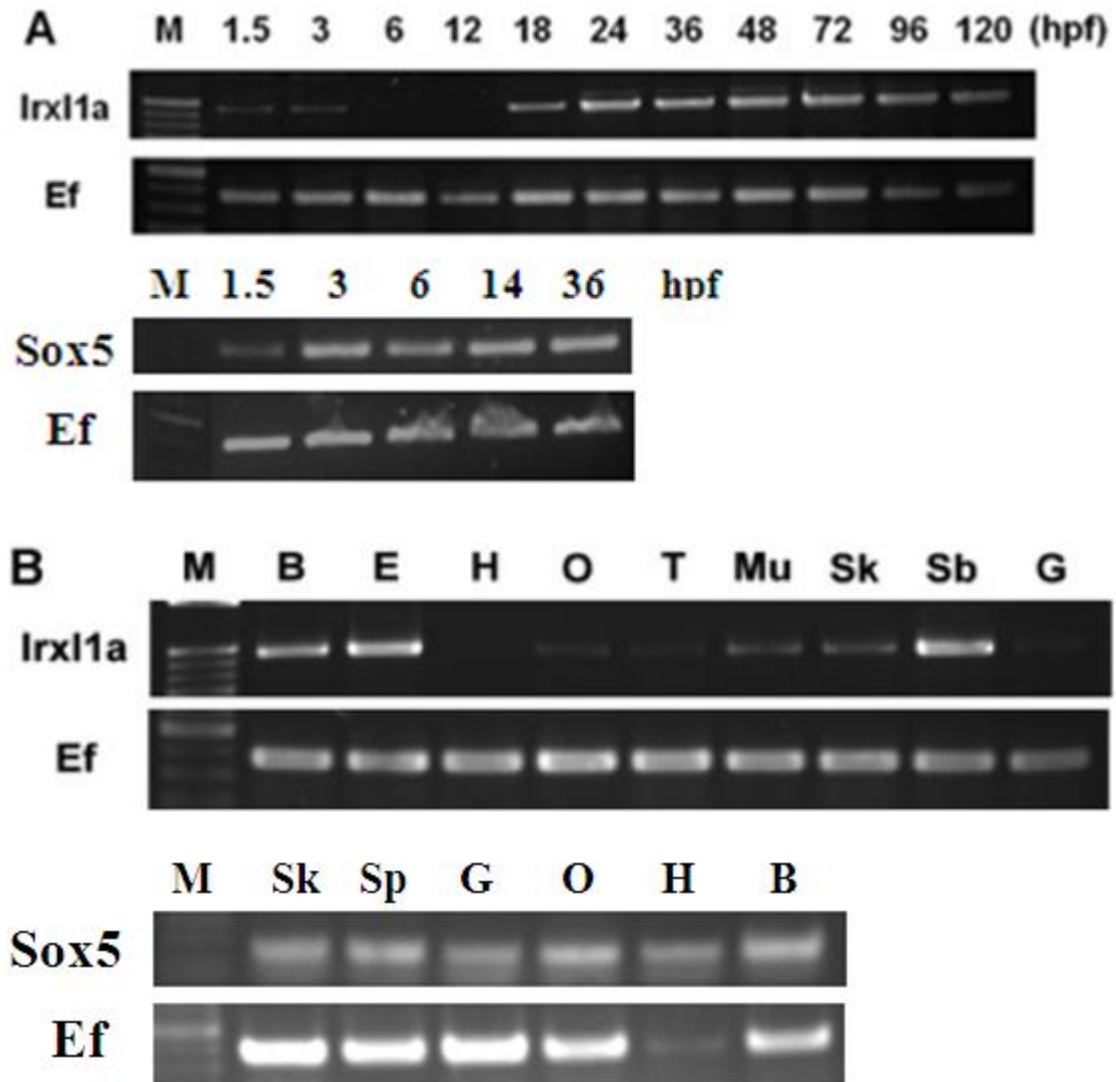
(七)參考文獻

1. Delgado-Olguin, P., J.K. Takeuchi, and B.G. Bruneau, Chromatin modification and remodeling in heart development. *ScientificWorldJournal*, 2006. 6: p. 1851-61.
2. Anderson D.M., J. Arredondo, K. Hahn, G. Valente, J. F. Martin, J. Wilson-Rawls, Rawls. (2006) Mohawk is a novel homeobox gene expressed in the developing mouse embryo. *Dev Dyn* 235:792–801.
3. Lecaudey V, I. Anselme, R. Dildrop and U. R. Sylvie Schneider-Maunoury (2005) Expression of the Zebrafish Iroquois Genes during Early Nervous System Formation and Patterning. *The Journal of Comparative Neurology* 492: 289–302.
4. Lecaudey V, I. Anselme, F. Rosa and S. Schneider-Maunoury (2004) The zebrafish Iroquois gene *iro7* positions the r4/r5 boundary and controls neurogenesis in the rostral hindbrain. *Development* 131: 3121-3131.
5. Carmen G.F., M. Miguel, E.D.L Calle-Mustienes, J. L. Gomez-Skarmeta and M.L. Allende (2004): The *Irx* gene family in zebrafish: genomic structure, evolution and initial characterization of *irx5b*: *Dev Genes Evol* 214: 277–284,.
6. Chuang H-N, H-Y Cheng, K-M Hsiao, C-W Lin, M-L Lin and H Pan. (2010) The zebrafish homeobox gene *irx11* is required for brain and pharyngeal arch morphogenesis. *Dev. Dyn.* 239: 639-650.
7. Ikeda T., H. Kawaguchi, S. Kamekura, N. Ogata, Y. Mori, K. Nakamura and S. Ikegawa, U-I. Chung (2005) Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab* 23:337–340.
8. Takeuchi, J.K. and B.G. Bruneau, *Irx11*, a divergent Iroquois homeobox family transcription factor gene. *Gene Expr Patterns*, 2007. 7(1-2): p. 51-6.
9. Smits P, P. Li, J. Mandel, Z. Zhang, J.M. Deng, R. Richard, et al (1995) The Transcription Factors L-Sox5 and Sox6 Are Essential for Cartilage Formation. *Dev. Cell* 1: 277–290.

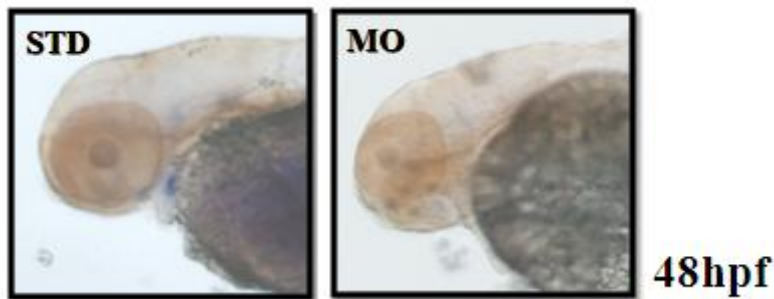
(八)圖表



(圖一)利用全胚體原位雜交(Whole-mount in situ hybridization)，以 Sox5 probe 觀察不同時期斑馬魚的胚胎 Sox5 的表現是否和 Irx11 基因表現重疊



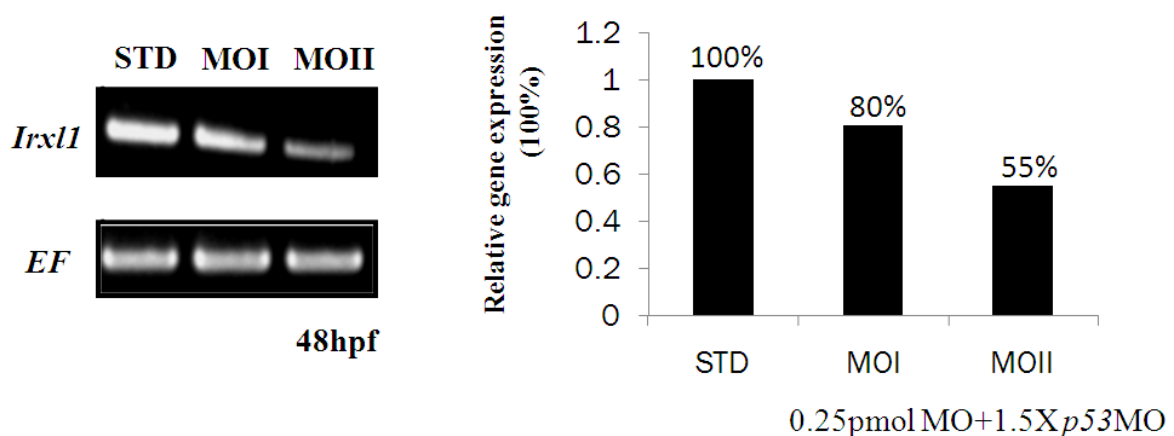
(圖二) (A)在不同時期的斑馬魚胚胎中，隨著時間增加，Irx11 和 Sox5 表現量會同步的增加。(B)在成魚的腦、眼、魚鰾中可以觀察 Irx11 有高度的表現，在相同組織內也可以觀察到 Sox5 有高度的表現。



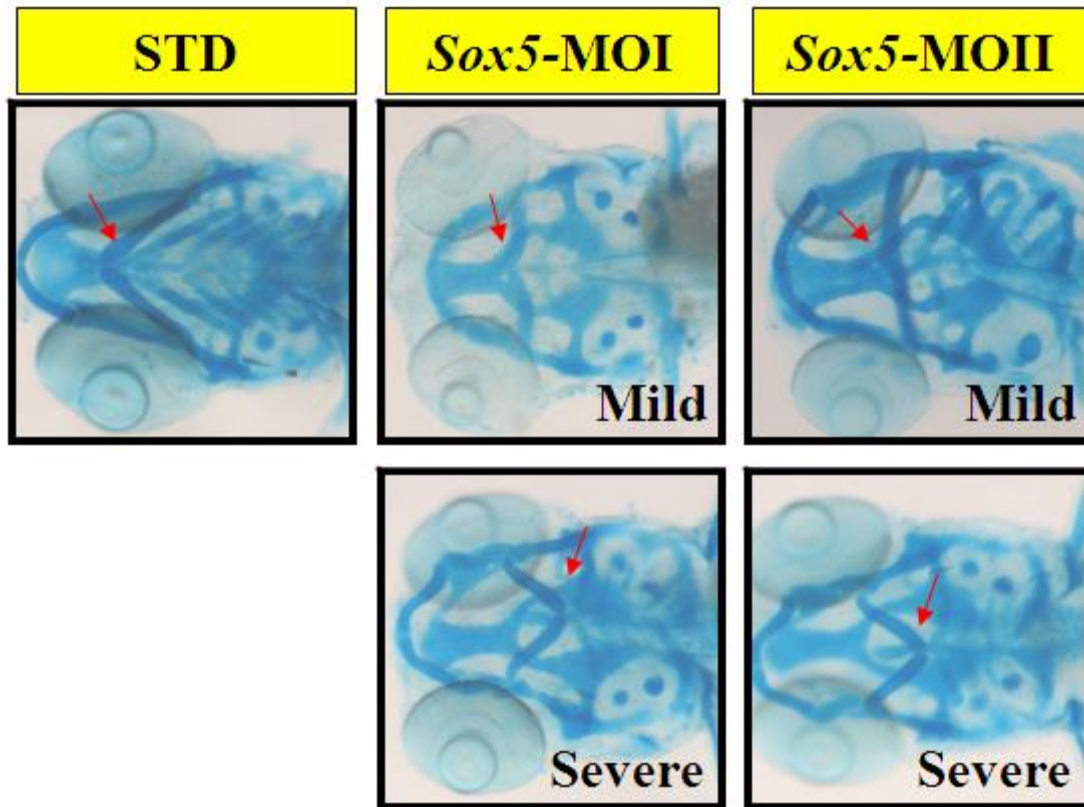
(圖三)在 Sox5 knockdown 下的胚胎，發現在 MOI knockdown 下 Irx11 不表現的比例有 45.5%，而 MOII knockdown 下則占了 71.4%。從此顯示在早期發育 Sox5 對 Irx11 有所調控。

(Table1)

Morpholino	No Irx11 expression
STD	3/17 17.6%
Sox5-MOI	15/33 45.5%
Sox5-MOII	10/14 71.4%



(圖四)在 48hpf 胚胎，可以觀察到 Sox5 knockdown 下，Irx11 的表現是有下降的趨勢



0.5pmolMO+1.5X*p53*MO 120hpf

(圖五) 在 120hpf morphant，在 Alcian Blue 染色下，可觀察第二對軟骨其形態有差異，且 knockdown 程度不同，可以將其分成兩型(mild 以及 sever)。且隨著濃度增加此情形也是如此。

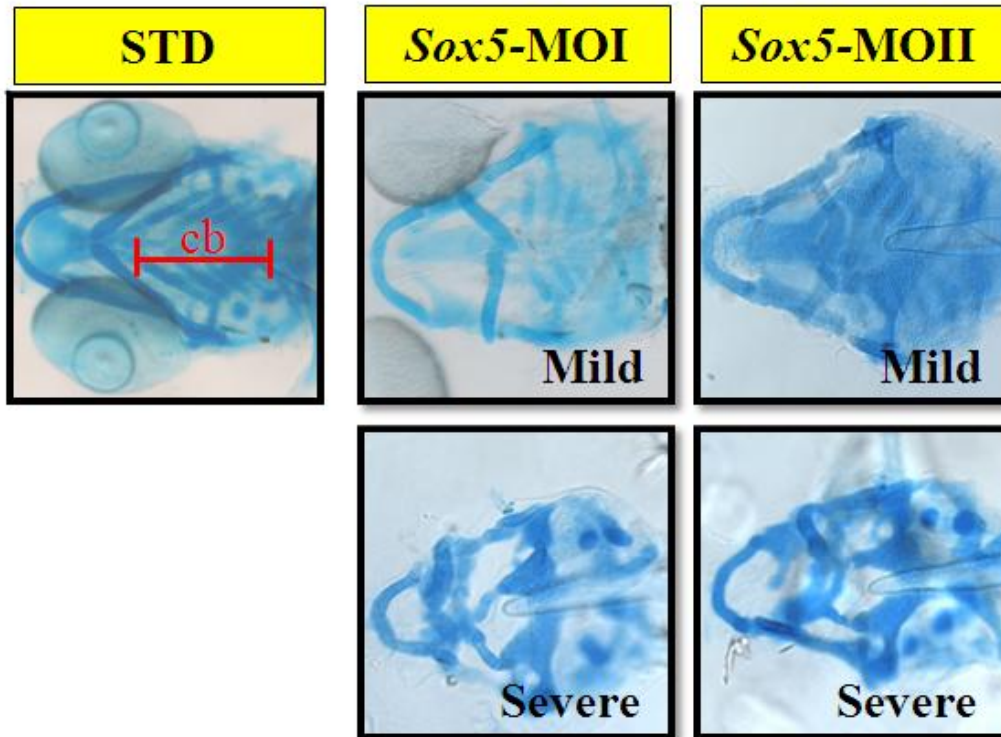
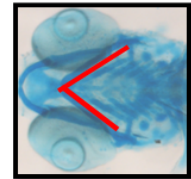
(Table2)

Phenotype Morpholino	Defect rate	Mild	Severe
STD	1.4% 1/73	1.4% 1/73	0% 0/73
<i>Sox5</i> -MOI	45.7% 32/70	28.6% 20/70	17.1% 12/70
<i>Sox5</i> -MOII	26.2% 16/61	23.0% 14/61	3.2% 2/61

0.25pmol MO+1.5X*p53*MO 120hpf

Phenotype Morpholino	Defect rate	Mild	Severe
STD	0% 0/58	0% 0/58	0% 0/58
<i>Sox5</i> -MOI	44.7% 42/94	29.8% 28/94	14.9% 14/94
<i>Sox5</i> -MOII	46.8% 36/77	28.6% 22/77	18.2% 14/77

0.5pmol MO+1.5X*p53*MO 120hpf



0.5pmol MO+1.5X*p53*MO 120hpf

(圖六) 在 120hpf morphant, 在 Alcian Blue 染色下, 可觀察後五對軟骨其形態有差異, 且 knockdown 程度不同, 可以將其分成兩型(mild 以及

sever)。且隨著濃度增加此情形也是如此。

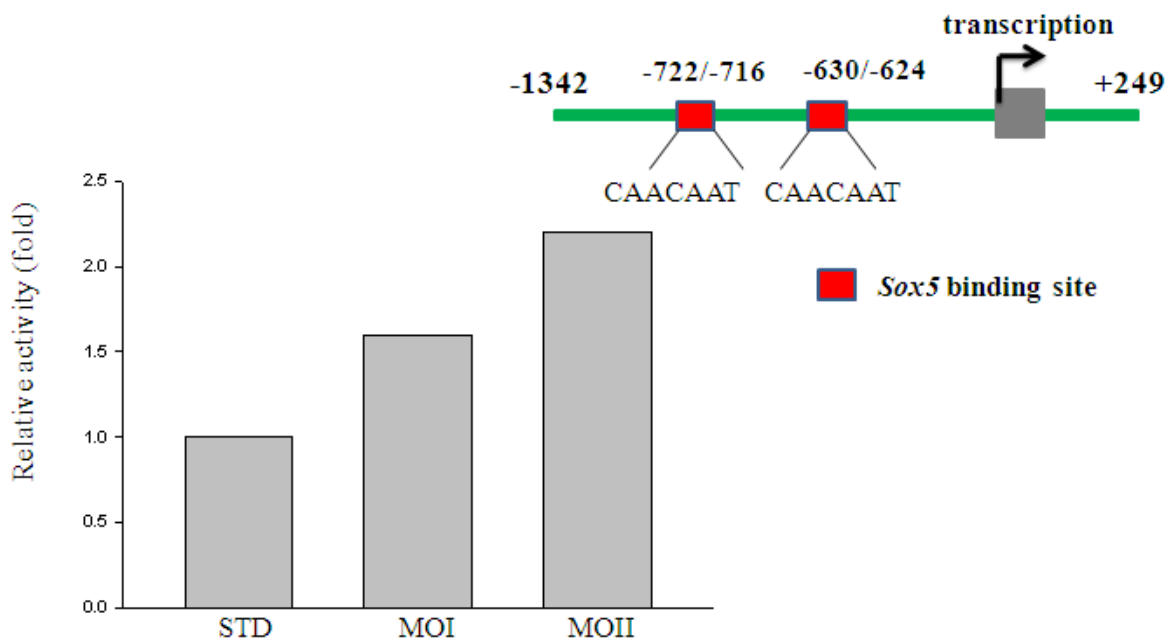
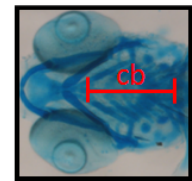
(Table3)

Phenotype Morpholino	Defect rate	Mild	Severe
STD	1.4% 1/73	1.4% 1/73	0% 0/73
<i>Sox5</i> -MOI	25.7% 18/70	18.6% 13/70	7.1% 5/70
<i>Sox5</i> -MOII	10.0% 6/61	8.1% 5/61	1.9% 1/61

0.25pmol MO+1.5Xp53MO 120hpf

Phenotype Morpholino	Defect rate	Mild	Severe
STD	0% 0/58	0% 0/58	0% 0/58
<i>Sox5</i> -MOI	25.5% 24/94	16.0% 15/94	9.5% 9/94
<i>Sox5</i> -MOII	20.8% 16/77	13.0% 10/77	7.8% 6/77

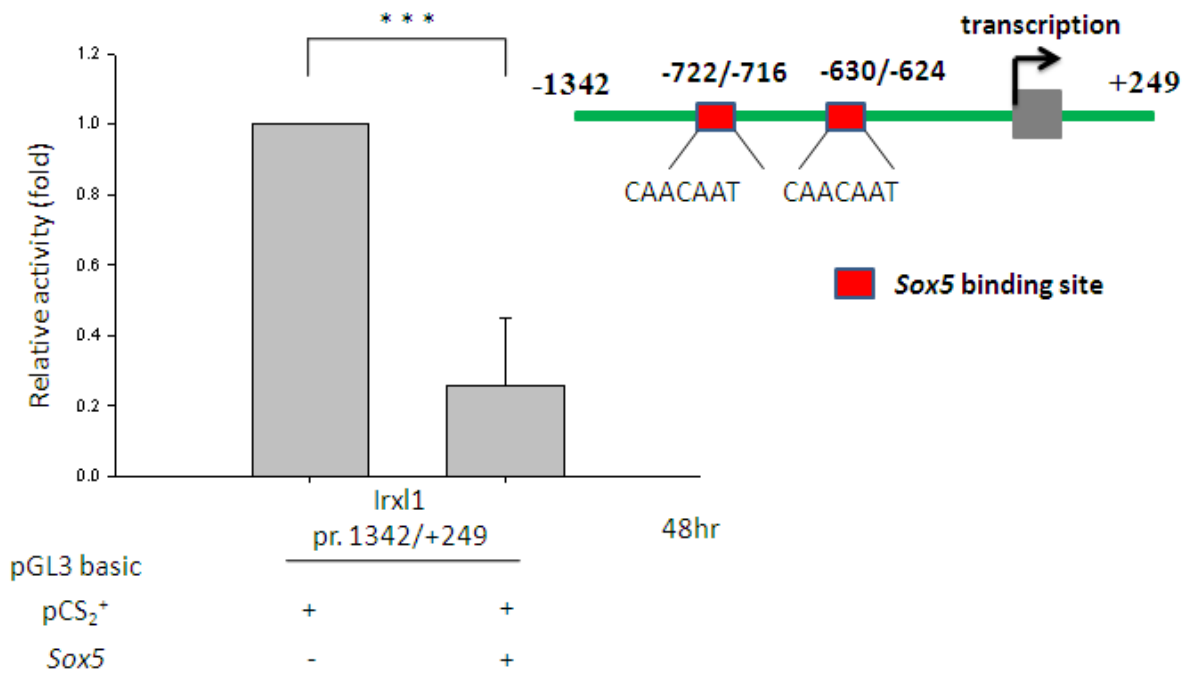
0.5pmol MO+1.5Xp53MO 120hpf



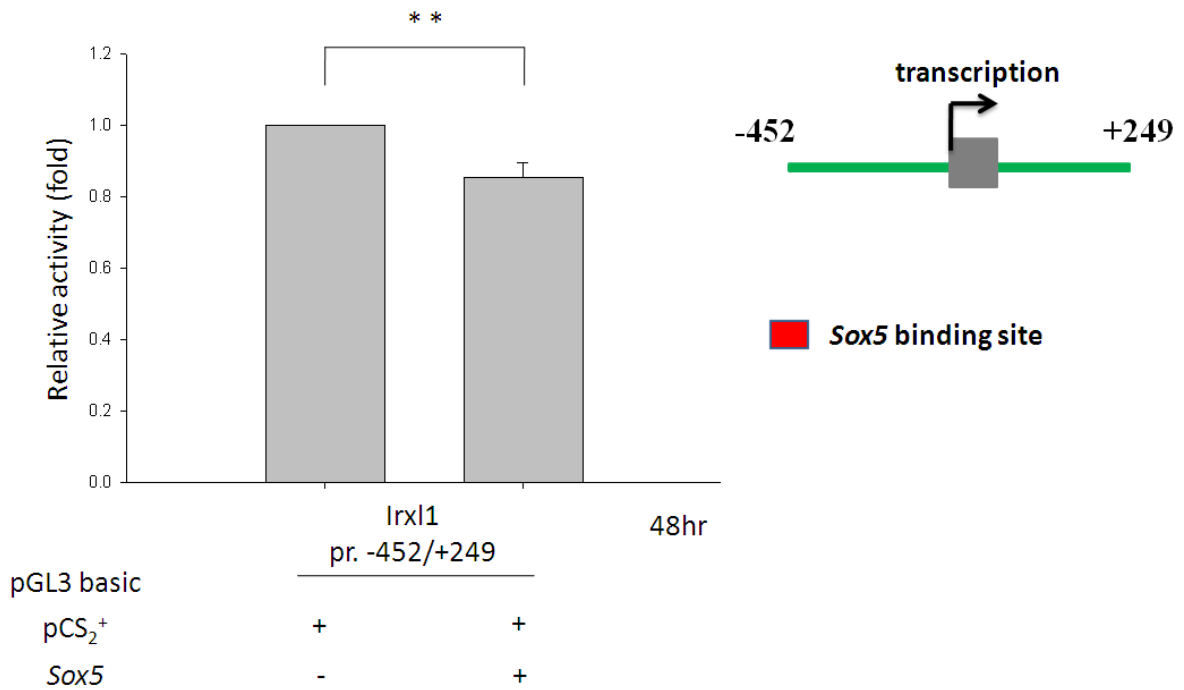
0.25omol+1.5Xp53MO 48hpf

(圖七)在 *Irx11* pr.-1342/+249 這段序列裡有兩個 Sox5 binding sites，藉由注射 Sox5 MO 進行探討發現，其活性會隨著 Sox5 knockdown 而有上升的

現象。

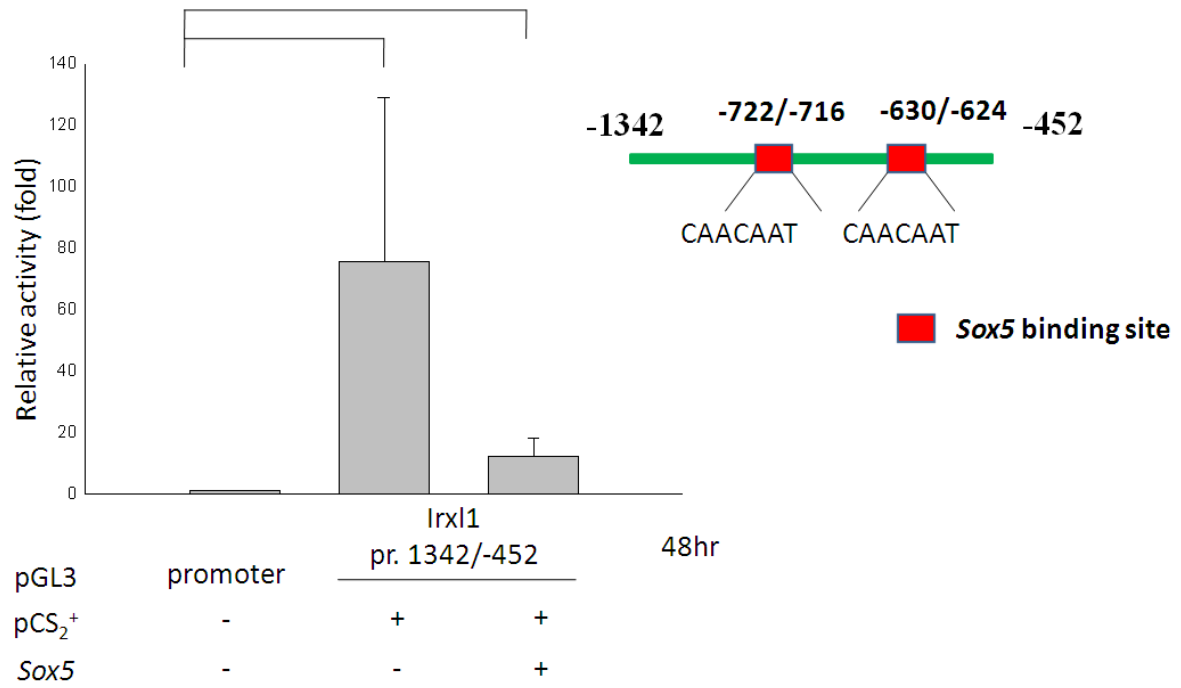


(圖八)在 Irx1 pr.-1342/+249 這段序列裡有兩個 Sox5 binding sites，藉由 overexpression Sox5 發現 Irx1 活性是下降的。



(圖九)在 Irx1 pr.-452/+249 這段序列裡不管 Sox5 有無參與，其活性是沒

有太大的顯著差異



(圖十)進而將 Irx1 promoter 縮短至-1342/-452，發現其活性會被 Sox5 所抑制。

(九)附圖

