

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  
\* : KCNQ4 基因突變造成非症候群聽障之功能研究  
\* 名 稱  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 江松潔  
學生計畫編號： NSC 97-2815-C-040-011-B  
研究期間： 97年07月01日至98年02月28日止，計8個月  
指導教授： 李宣佑

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系(所)

中華民國 98年03月31日

# 目 錄

中文摘要.....	2
研究動機與研究問題.....	3
文獻回顧 ... ..	3
研究方法與步驟 ... ..	5
結 果 ... ..	8
討 論 ... ..	9
參 考 文 獻 ... ..	10
實驗結果圖表.....	10
附 錄 ... ..	16

## 摘要

離子通道在正常的聽力中扮演相當重要的角色，若耳蝸內細胞離子通道發生異常，就會造成聽障。*KCNQ4* 基因轉譯出來的蛋白在耳蝸內是一種鉀離子通道有關，在一些文獻中已指出 *KCNQ4* 突變後會造成聽障，此種聽障通常是緩慢且漸進的，是一種體染色體顯性遺傳的非症候群疾病(DFNA2)。

我們實驗室先前針對非症候群聽障患者 *KCNQ4* 基因篩檢中發現一個新的突變點為 546C>G/wt(F182L)，此突變是一種 Missense 突變，此突變位於 *KCNQ4* 蛋白 S3 domain。然而到目前為止對於這個突變點造成非症候群聽障的機制並不清楚。因此本研究計畫將利用先前已知在 *KCNQ4* 蛋白 P-loop 的突變(W276S)和在接近 *KCNQ4* 蛋白 S6 domain 的突變(G321S)當作陽性對照組，探討 *KCNQ4* F182L 突變後對於聽力的影響及其致病機轉。本研究將分兩部分來進行，一部分是利用體外製備 *KCNQ4* 正常和突變(F182L、W276S 和 G321S)的 cRNA，送入爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統，來測量鉀離子電流的情形來觀察這些突變點和正常的 *KCNQ4* 蛋白功能上的差異。另一部分是利用 HeLa 細胞和 Tet-on 蛋白表現系統及 Subcellular fractionation 的方法，來觀察 *KCNQ4* 的突變蛋白在細胞內的表現位置是否有改變。相信在這研究結束後將可對 *KCNQ4* F182L 突變在聽障中的致病機轉有進一步的了解。

實驗室先前已建構好 *KCNQ4* 正常和突變點(F182L、W276S 和 G321S)的基於螢光表現載體上，目前已將接有紅色螢光蛋白的 *KCNQ4* wild type 接入 pBI 內，接有綠色螢光蛋白的 *KCNQ4* F182L 突變基因暫時接入 pGEM-T-Easy vector 內，未來將接入 pBI，透過 pBI 的雙向表現，觀察細胞中的蛋白表現。另外已觀察到 *KCNQ4* wild type 的 cRNA 於爪蟾卵母細胞的表現，而 *KCNQ4* 突變點的 cRNA 在爪蟾卵內的表現，尚在測試階段。

## 研究動機與研究問題

研究動機：

由於我們實驗室在先前針對 *KCNQ4* 基因篩檢中發現了 546C>G( F182L)的 Missense 突變，然而對於這突變點的致病機轉並不清楚，因此本實驗動機是想藉由爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統和 Tet-on 蛋白表現系統及 Subcellular fractionation 等方法來探討 *KCNQ4* F182L 突變造成非症候群聽障之致病機轉。

研究問題：

1. 利用爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統來探討 *KCNQ4* 的 F182L 突

變點，以瞭解突變後對鉀離子通道功能的影響，並以 W276S 及 G321S 為陽性對照組，來了解其致病機轉。

2. 利用 Tet-On 蛋白表現系統和細胞免疫染色技術來探討 *KCNQ4* 突變蛋白在 HeLa cell 中的表現位置是否改變以了解其致病機轉。
3. 利用 Subcellular fractionation 將不同密度的胞器分離，再利用 Western blot 方法，來進一步了解 *KCNQ4* 突變蛋白在細胞內的表現位置與正常的 *KCNQ4* 蛋白是否有差異。

## 文獻回顧

聽障是一種常見的感覺神經異常疾病，導致聽障的原因可分為環境因素，如外傷、感染、噪音、老化等和遺傳因素。遺傳性聽障可依是否合併身體其他器官的異常，區分為症候群型(syndromic)與非症候群型(non-syndromic)兩類，大約有 30%的聽障是屬於症候群聽障。除了聽障外，尚有其他種的異常，包括眼睛、肌肉、骨骼、腎臟、神經和色素異常，症候群聽障有不同的遺傳方式，包含源自粒線體突變的母系遺傳。目前已知約有 100 個基因與症候群型遺傳性聽障有關。非症候群聽障佔 70%。是在患者中僅有聽障，而無其他的症候群出現。到目前為止，已有 77 個非症候群的基因做 (gene loci) 被發現，包含 40 個體染色體顯性 (Autosomal dominant; DFNA) 約佔 22%，30 個體染色體隱性遺傳 (Autosomal recessive; DFNB) 佔約 77%，7 個性聯遺傳(X-linked; DFN)佔約 1%，和 2 個母系遺傳的粒線體基因，佔小於 1%。目前已知與聽障有關的基因有 59 個已被定位(Kalatzis and Petit, 1998; Morton et al., 2002)。

耳蝸是一種非常精緻的構造，有數十種的細胞及正常聽力所需要的特化區。聽覺的產生與內淋巴液需有高濃度的鉀離子，因此鉀離子在循環機制的進行和維持相當重要。在整個 K<sup>+</sup>再循環牽涉的基因有很多，而 *KCNQ4* 是其中一個。

*KCNQ* family 包含 *KCNQ1*、*KCNQ2*、*KCNQ3*、*KCNQ4*，位於染色體 1p34，在調節膜電位上及身體許多組織的不同細胞中有重要功能，由過去的研究可以知道 *KCNQ1* 的突變與心臟電子傳遞系統失調、心律不整和聽力缺損有關，*KCNQ2* 和 *KCNQ3* 則可能產生新生兒驚厥，*KCNQ4* 被發現突變後其蛋白功能就會出現問題而會導致聽障，而所引起的聽障是緩慢漸進性的，屬於體染色體顯性遺傳的非症候群疾病 (DFNA2)(Anderson and van Itallie, 1995; Tsukita et al., 2001)。

*KCNQ4* 有 14 個 exons，可轉譯出有 695 個胺基酸的多肽鏈，*KCNQ4* 蛋白有 4 個細胞外環(extracellular loops)，2 個細胞內環(intercellular loops)和 6 個穿膜  $\alpha$ -helix domain(S1-S6)，穿膜的 S5 和 S6 domain 之間有 P loop 區域，對鉀離子的循環有高度

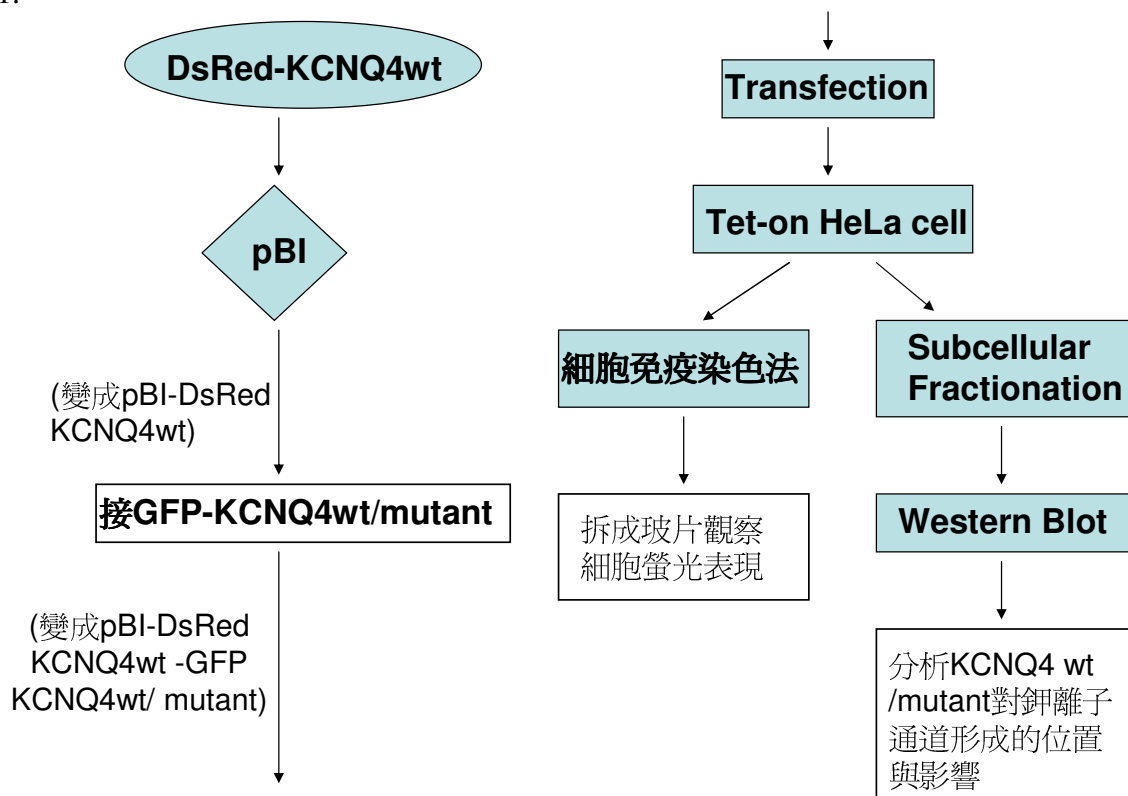
敏感性(Coucke et al., 1999)。KCNQ4 所形成的鉀離子通道表現在耳蝸的感覺外毛細胞上，然而內毛細胞缺乏 KCNQ4 基因的表現。由文獻得知在爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocytes*)表現系統中，KCNQ4 的基因突變後的确會影響鉀離子的電生理功能(Kubisch et al., 1999)。

我們實驗室先前在 KCNQ4 基因篩檢中發現的突變點 F182L 是位在 S3 domain (Su et al.,2007)，但目前對此突變點所造成的影響並不清楚。在先前的文獻中，已知 W276S 突變位於 KCNQ4 的 P-loop，而 P-loop 是主要形成離子通道後選擇離子通過的重要部位，先前的研究中發現 W276S 是一個 hot spot 突變(Coucke et al.,1999)。另一個突變點 G321S 位於接近 S6 domain 上的 C 端，這兩個突變點仍然可使蛋白運輸到膜上，但在形成通道時可能發生了問題，在爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統證明變無法通透電流(Coucke et al., 1999)，因此我們在本研究中將以 W276S 和 G321S 為陽性對照組，利用爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統和 Tet-on 蛋白表現系統及 Subcellular fractionation 等方法，進一步的來研究和了解 KCNQ4 F182L 此突變點所造成的影響。

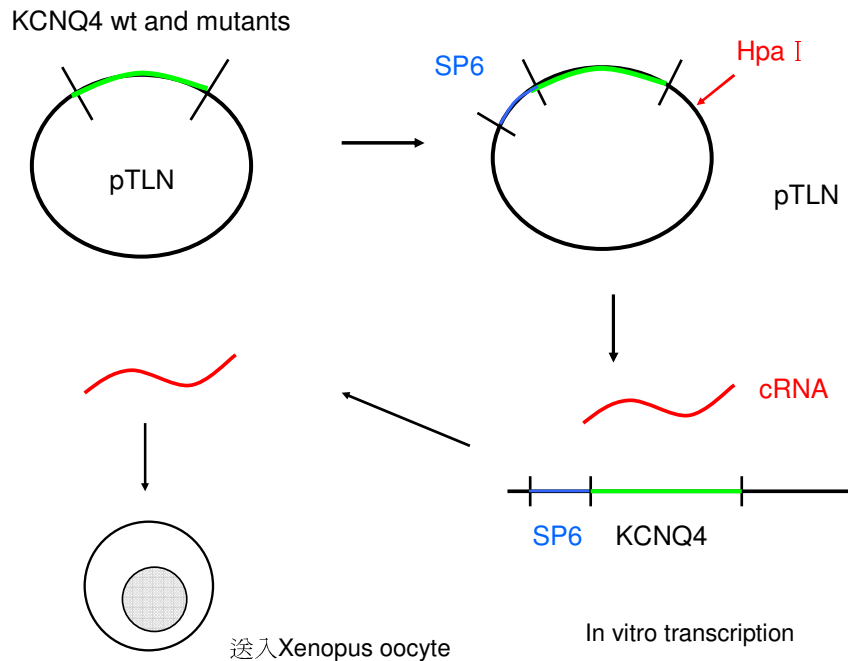
## 研究方法與步驟

### 研究步驟

1.



2.



研究方法：

### 1. 建構正常和異常 *KCNQ4* 在 pBI 載體上

Tet-On 蛋白表現系統(Tet-On inducible expression system)(Koreen, et al., 2004)，是利用在一個表現質體上(pBI vector, clontech)同時接上兩個不同的基因。在 pBI 質體上有 tetracycline reponse element(TRE)，因此可接受 reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA)來調控其基因表現，而 rtTA 的表現可被 tetracycline 或 doxycycline 來調控 Tet operator DNA sequence (tetO) 產生，因此此方法可由 tetracycline 或 doxycycline 來調控穩定等量的表現兩個不同基因並可大量的表現這兩個基因產物進行研究。首先我們要建立一個可經由 tetracycline 或 doxycycline 來調控穩定表現 rtTA 的 HeLa 細胞株，是將帶有 Tet operator DNA sequence (tetO)的質體(clontech)轉殖進入 HeLa 細胞中用含 800ng/ml G418 的培養液加以篩選(T-HeLa)，此細胞株實驗室已經建立好了。另外利用基因重組的技術利用兩組不同的引子(primer)：PBI-Ifwd-ATGGCTAGCACGACTCACTATAGGG AGAC、PBI-Irev-ATGGATATCCTAGAGGCACAGTCGAGGCTGAT 和 PBI-II fwd-ATGCTGCAAACGACTCACTATAGGGAGAC、PBI-IIrev-ATGGATGACCTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGAT 將 *KCNQ4* 基因或 *KCNQ4* 突變 subclone 至 pBI

vector(clontech)使其兩端接了正常基因或形成異型結合子(heterozygous)，將這質體和 pTK-Hyg 質體(篩選穩定表現細胞株用)以 10:1 的比例同時送入 T-HeLa 中經 24-48 小時後，改用含有 1ng/ml 的 doxycycline 取代舊的培養，在 37°C 的培養箱培養 24 小時後，可進行細胞免疫螢光染色法來觀察 *KCNQ4* 基因在細胞內的表現情形。同時加入 Hygromycin 400ng/ml (此濃度再先前的預備實驗中所獲得)來進行穩定表現 HeLa 株的篩選。另外我們將利用 RT-PCR 和 western blot 來確定是否篩選到穩定的 HeLa 表現細胞株。

## 2. 基因轉殖(Transfection)到 HeLa 細胞技術

首先，將  $0.9-4.0 \times 10^5$  的 HeLa 細胞培養在  $3.5 \text{ cm}^2$  培養皿中(NUNC)，細胞培養液含 89 % MEM with non-essential amino acids and Earle's BSS，10% Fetal bovine serum，1% Penicillin and streptomycin (GIBCO BRL)，當細胞濃度達到 80 %時即可使用微脂粒法基因轉殖感染(Efectene<sup>TM</sup> Transfection Reagent Kit; QIAGEN)，將質體送入 HeLa 細胞，此培養皿置於 5 %  $\text{CO}_2$ ，37°C 恆溫培養箱內培養 24-48 小時後將 tranfection medium 置換掉即可進行下一步的實驗。

## 3. 細胞免疫染色法

將一部份細胞拆至  $18\text{mm}^2$  的玻璃片上，並放置於  $3.5\text{cm}^2$  的培養皿中於含有 5% 濃度  $\text{CO}_2$ 、37°C 恆溫的細胞培養箱培養。待 24-48 小時後，將  $18\text{mm}^2$  玻璃片上的培養液吸掉丟棄，並加入 2ml 的 1X PBS 沖洗 (置於 shaker 上，轉速小於 50rpm)，沖洗 3 次，每次 5 分鐘。再加入 1ml 的 4% paraformaldehyde 固定細胞於  $18\text{mm}^2$  玻璃片上，靜置 15 分鐘。再以 2ml 的 1X PBS 沖洗，沖洗 3 次，每次 5 分鐘。再取 30 $\mu\text{l}$  染細胞膜的一級抗體(anti-CH-19)滴於  $18\text{mm}^2$  玻璃片上，將細胞置於 4°C 16 小時並避光。再來將細胞進行 2ml 的 1X PBS 沖洗，沖洗 3 次，每次 5 分鐘。之後取 2mg/ml 30 $\mu\text{l}$  的二級抗體(goat anti-mouse IgG ; Alexa Fluor® 633 )滴於  $18\text{mm}^2$  播片上，將細胞避光並放置於 5% 濃度  $\text{CO}_2$  的 37°C 恆溫培養箱中 1 小時。之後再以 2ml 的 1X PBS 沖洗，沖洗 3 次，每次 5 分鐘。然後加入 100 $\mu\text{l}$  的 DAPI 染劑於  $18\text{mm}^2$  玻璃片上，靜置 5 分鐘。再以 2ml 的 1X PBS 沖洗，沖洗 3 次。最後再以螢光油進行封片。(紅色螢光：excitation=557，emission=579；綠色螢光：excitation=488，emission=507)。

## 4. Subcellular fractionation

此方法主要參考 Cooper et al., (2000)的研究，以 Equilibrium centrifugation 根據密度和重量將上清液離心，可將細胞碎片分層，第一步：在不破壞細胞內胞器的前提下以高頻聲波震碎細胞膜，第二步：將含有 lysosome、peroxisome、膜碎片的懸浮液以

800 Xg 離心 10 分鐘，得到的沉澱物為細胞核的沉澱物，第三步：接著將其上清液以 15,000 Xg 離心 10 分鐘，得到 mitochondria、lysosome、peroxisome 的沉澱物，第四步：再將其上清液離心 10,000Xg 1 小時，得到 plasma membrane 和 endoplasmic reticulum 的沉澱物，第五步：將上清液以 20,000Xg 離心 3 小時，得到 ribosome 的沉澱物，最後得到 cytosol 的上清液。

#### 5. 西方墨點法(Western blot)

將 SDS-PAGE 後的膠體自電泳槽下放入 transfer buffer 中(Tris-Base 5.8g, Glycine 2.9g, Methanol 200ml,調整 PH 值到 8.3，補二次水到 1000ml)，準備合適大小的 PVDF 膜，先以甲醇溶去膜上的保護物質，與六張與 PVDF 膜相同大小的 3M 濾紙一起浸泡在 transfer buffer 中，充分潤濕後以 3M 濾紙、PVDF 膜、膠體、3M 濾紙的順序整齊堆疊好後放入半乾式轉漬機(BioRad)進行轉漬，處理過程要避免介面間氣泡的產生。轉漬條件為 15 伏特 40 分鐘。轉漬結束後將膜加入 5% skim milk/1X PBS 溶液進行 blocking 60 分鐘，以 1X PBST(1X PBS，0.05% tween 20)清洗 PVDF 膜，於室溫下清洗三次，每次 10 分鐘。清洗完畢後加入一級抗體 ( mouse anti-Q4 antibody; 1:500 / 1% skim milk/1X PBS 溶液)，室溫下低速震盪 1 個小時後加入 1X PBST 清洗 PVDF 膜，於室溫清洗三次，每次 10 分鐘。接著加入二級抗體(goat-anti-mouse IgG conjugate HRP antibody; 1:5000/1% skim milk / 1X PBS 溶液)，室溫下低溫震盪一小時後，再以 1X PBST 清洗三次，每次 10 分鐘。最後將 PVDF 放入透明的投影片夾中並加入 500 $\mu$ l 的 HRP 反應受質溶液(ECL Kit)，作用 1-2 分鐘後，以紙巾吸去多餘的溶液，隨後以冷光分析儀(Fuji-Film LAS200)進行曝光，曝光時間由蛋白的表現強弱而定。

#### 6. 製備 *KCNQ4* 正常和突變的 cRNA

先利用酵素 Hpa I 將 pTLN-KCNQ4 於 37°C 水浴 5 小時，使 plasmid 切成線性，經 gel extraction 純化後，再用 Ambion SP6 mMACHINE kit，於冰上操作，取小 tube 依序加入 2xNTP/CAP 10 $\mu$ l，10x reaction buffer 2 $\mu$ l，linear template DNA 1 $\mu$ g (6 $\mu$ l)，enzyme mix 2 $\mu$ l 共 20 $\mu$ l 混合均勻，放入 37°C incubator 5~6 小時，然後加入 1 $\mu$ l DNase I 混合均勻，放入 37°C incubator 15 分鐘，接著加入 Nuclease-free Water 30  $\mu$ l 和 LiCl 30 $\mu$ l 混合均勻，放入 -20 °C 冰箱靜置 30min 以上，然後離心 13000rpm，4 °C 15 分鐘，小心吸起上清液，加入 1ml 70% EtOH，離心 13000rpm，4°C 5 分鐘，小心吸起上清液，air dry 至完全乾，加入 Nuclease-free Water 20 $\mu$ l 回溶。

#### 7. 爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)的製備及微量注射將 cRNA 送入爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)



爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)從成年的母爪蟾 *Xenopus laevis* 腹中取出。爪蟾的麻醉是將其浸入每升含有 3.7 公克 tricaine 的水。在爪蟾側腹部開啟約一公分的小切口，將約八分之一的卵葉分出並取出卵母細胞置放於培養液中。然後再將爪蟾切口縫合。將第五或六期 (stage V or VI) 的爪蟾卵母細胞置於含有 2 mg/ml collagenase Type 1A 的  $\text{Ca}^{2+}$  - free OR<sub>2</sub> 溶液中以便將外圍的濾泡膜去除，然而再將去濾泡膜的爪蟾卵母細胞置放於 ND96 標準溶液過一個晚上。 $\text{Ca}^{2+}$  - free OR<sub>2</sub> 溶液組成如下: NaCl 82.5 mM, KCl 2 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.8 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM 和 HEPES 5 mM (用 NaOH 將 pH 調至 7.6)。ND96 標準溶液組成如下: NaCl 96 mM, KCl 2 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.8 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM 和 HEPES 5 mM (用 NaOH 將 pH 調至 7.6)。使用微量注射器 (Drummond nanoject apparatus) 將爪蟾卵母細胞的植物極微注射正常型或變異型的 KCNQ4 cRNA (50nl, 50ng)。注射過正常型或變異型 KCNQ4 cRNA 的爪蟾卵母細胞在 24-72 hr 後使用 two-electrode voltage clamp technique 開始進行 K 離子運輸的分析。

## 結果

在先前的實驗中，實驗室已經將 *KCNQ4* 的正常和突變(F182L、W276S 和 G321S) 的基因接入爪蟾卵母細胞的表現質體 pTLN 且也將正常的 *KCNQ4* 基因接入 pGFP-N1 vector (pGFP-KCNQ4wt) 和 pDsRed-Express-N1 vector (pDsRed-KCNQ4wt)，而突變的 *KCNQ4* 基因(F182L、W276S 和 G321S)也已經接在 pGFP-N1 vector (pGFP-KCNQ4 F182L、pGFP-KCNQ4 W276S 和 pGFP-KCNQ4 G321S)。

### 1. 建構接上螢光蛋白的 *KCNQ4* 的正常和突變的基因於 pBI 質體上

因 pDsRed 質體上沒有 Nhe I 及 EcoR V 的限制酶切點，所以利用 PCR 夾出 KCNQ4wt-DsRed 約 2.8kb 大小的片段，因 PCR 的產物非 single band，在 2.8kb 上下有一條與它非常相近的產物(圖一.A)，即使經過 Gel extraction 也無法完全分開，所以暫時接入 pGEM-T-Easy vector 以方便篩選(圖一.B)，經 internal PCR(圖一.C)和 Enzyme mapping(圖一.D)的確認確實有接上後送定序，目前定序完成確定序列無誤。然後利用 Nhe I 及 EcoR V 這兩個限制酶分別切下 vector-pBI 和 insert-KCNQ4 wt-DsRed 後(圖二.A)，再利用 T4 ligase 組合成 pBI-KCNQ4 wt-DsRed，Transformation 後挑選(圖二.B)，經 internal PCR 和 Enzyme mapping(圖二.C)的確認確實有接上後送定序，確定序列無誤。又 pBI 是雙向表現質體，還要再接上皆有綠色螢光蛋白的 *KCNQ4* F182L 突變基因，所以同樣利用 PCR 自 pEGFP 質體上夾出經 Gel extraction 後的 *KCNQ4* F182L-EGFP(圖三.A)，同樣先暫時接入 pGEM-T-Easy vector 以方便篩選(圖三 B)，經 internal PCR 和 Enzyme mapping(圖

三.C)的確認確實有接上後送定序，目前定序完成確定序列無誤。

## 2.體外製備 *KCNQ4* 的正常和突變點的 cRNA

將 pTLN-KCNQ4 wt、pTLN-KCNQ4 G321S、pTLN-KCNQ4 F182L(圖四)經 HpaI 切成線性(圖五)後經 in vitro transcript 產生 cRNA 的濃度(表一)。*KCNQ4* 轉譯的蛋白是屬於鉀離子通道，為了探討 *KCNQ4* 基因形成鉀離子通道的功能，我們採用了成熟的母南非大爪蟾(*Xenopus laevis*)的卵母細胞(oocyte)作為功能研究系統，利用電生理的電位/電流測量方法(two-electrode voltage clamp)來進行研究。首先我們利用 mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Kit (Ambion)在試管中合成正常的 *KCNQ4* cRNA。再以顯微注射方法將 *KCNQ4* 正常 cRNA 注入 *Xenopus oocytes*，經 36~48 小時來分析正常的 *KCNQ4* 形成鉀離子通道的功能，其結果我們發現正常 *KCNQ4* 蛋白從 -80mV 至 +60mV 的電壓刺激下電流逐漸增強，最大可達到 5000~6000nA 的電流(圖六)。另外我們利用電壓在 -30mV 時表現正常 *KCNQ4* 爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)的尾電流(tail current)來分析 *KCNQ4* 鉀離子孔道的電位依賴性(voltage determined)。結果 *KCNQ4* 形成的鉀離子通道其電位依賴性(voltage determined)的  $V_{1/2}$  (孔道開啟到最大值的一半所需電壓)是  $-17.6 \pm 0.7$  mV (圖七)。另外 *KCNQ4* 突變點的 cRNA 打入爪蟾卵內的表現，尚在測試階段。

## 討論

實驗室先前建構完成的 *KCNQ4* 的正常和突變(F182L、W276S 和 G321S)的基因接入螢光蛋白表現載體上，欲將接上螢光蛋白的 *KCNQ4* 的正常和突變基因接入 pBI 質體中雙向表現。但因 pDsRed 質體上沒有 Nhe I 及 EcoR 的限制酶切點，所以利用 PCR 夾出 *KCNQ4*wt-DsRed 約 2.8kb 大小的片段，PCR 的產物非 single band，在 2.8kb 上下一條與它非常相近的產物，所以將產物利用 T&A cloning 來篩選，近 3kb 長的片段在 PCR 複製過程中極易產生突變，所以我們利用不同的 polymerase 來改善突變的情形。最先使用的酵素是 Taq 加上 ThermalAce，ThermalAce 是個類似 Pfu 的酵素，具有校正功能，但經 T&A cloning 接上 pGEM-T-Easy Vector 的質體送定序後發現在 DsRed 螢光蛋白上具有突變，重複數次後仍是有突變，因而換了另一個酵素 ExPrime Taq，可以複製 10kb 以下的片段，雖然可以輕易獲得產物，但定序後也多有突變發生，效果不彰，所以再加上 Pfu 加強它的校正功能，定序結果突變點雖較少，但還是有，因此嘗試另一種 Pfx DNA Polymerase 酵素，隨酵素改變部分條件，PCR 產物接上 pGEM-T-Easy vector 送定序結果無突變產生，目前已將接上 pGEM-T-Easy vector 的 *KCNQ4*-DsRed 切下，接入 pBI。

目前 *KCNQ4* 的正常和突變點的 cRNA 打入爪蟾卵內，尚在測試階段。未來將接

上 pGEM-T-Easy vector 的 KCNQ4-EGFP 切下，接入 pBI，建構完成 pBI 雙向表現質體，轉殖進入細胞，經 pBI 的雙向表現，藉由螢光蛋白觀察 *KCNQ4* wt 和突變點的交互作用。另外觀察 *KCNQ4* wt 和突變點的 cRNA 在爪蟾卵中對鉀離子通道的影響。

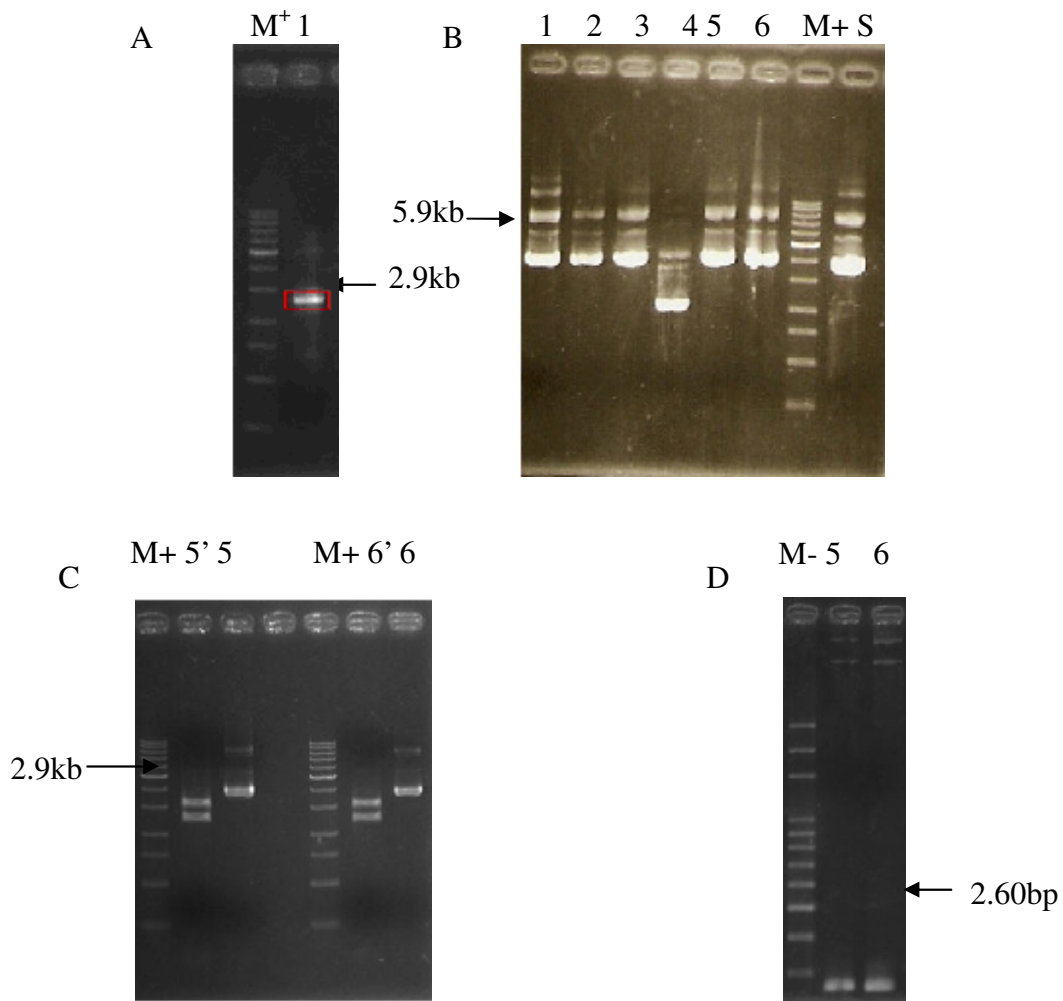
## 參考文獻

- Anderson JM and van Itallie CM (1995) Tight junction and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* 269,G467-G475.
- Coucke PJ, Van Hauwe, Kelley PM, Kunst H, Schatteman I, Van Velzen D, Meyers J, Ensink RJ, Verstreken M, Declau F, Marres H, Kastury K, Bhasin S, McGuirt WT, Smitj SD, Gremers CW, Van de Heyning P, Willems PJ Smith SD and Van Camp G (1999) Mutations in the *KCNQ4* gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 Families. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1321-1328.
- Cooper EC, Aldape KD, Abosch A, Barbaro NM, Berger MS, Peacock WS, Jan YN and Jan LY (2000) Colocalization and coassembly of two human brain. *PNAS*
- Koreen IV, Elsayed WA, Liu Y J, and Harris A L (2004) Medline Tetracycline-regulated expression enables purification and functional analysis of recombinant connexin channels from mammalian cells.
- Kalatzis V and Petit C (1998) The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1589-1597
- Kharkovets T, Dedek K, Maier H, Schweizer M, Khimich D, Nouvian R, Vardanyan V, Leuwer R, Moser T, and Jentsch TJ. (2006) *Medline* Mice with altered *KCNQ4* K<sup>+</sup> channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lu'tjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C and Jentsch TJ. (1999) *KCNQ4*, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96, 437-446.
- Morton CC. (2002) Genetics, genomic and gene discovery in the auditory system. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1229-1240
- Su CC, Yang JJ, Shieh JC, Su MC and Li SY. (2007) Identification of novel mutations in the *KCNQ4* gene of patients with nonsyndromic deafness from Taiwan.
- Tsukita SH, Furuse M and Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 285-293.

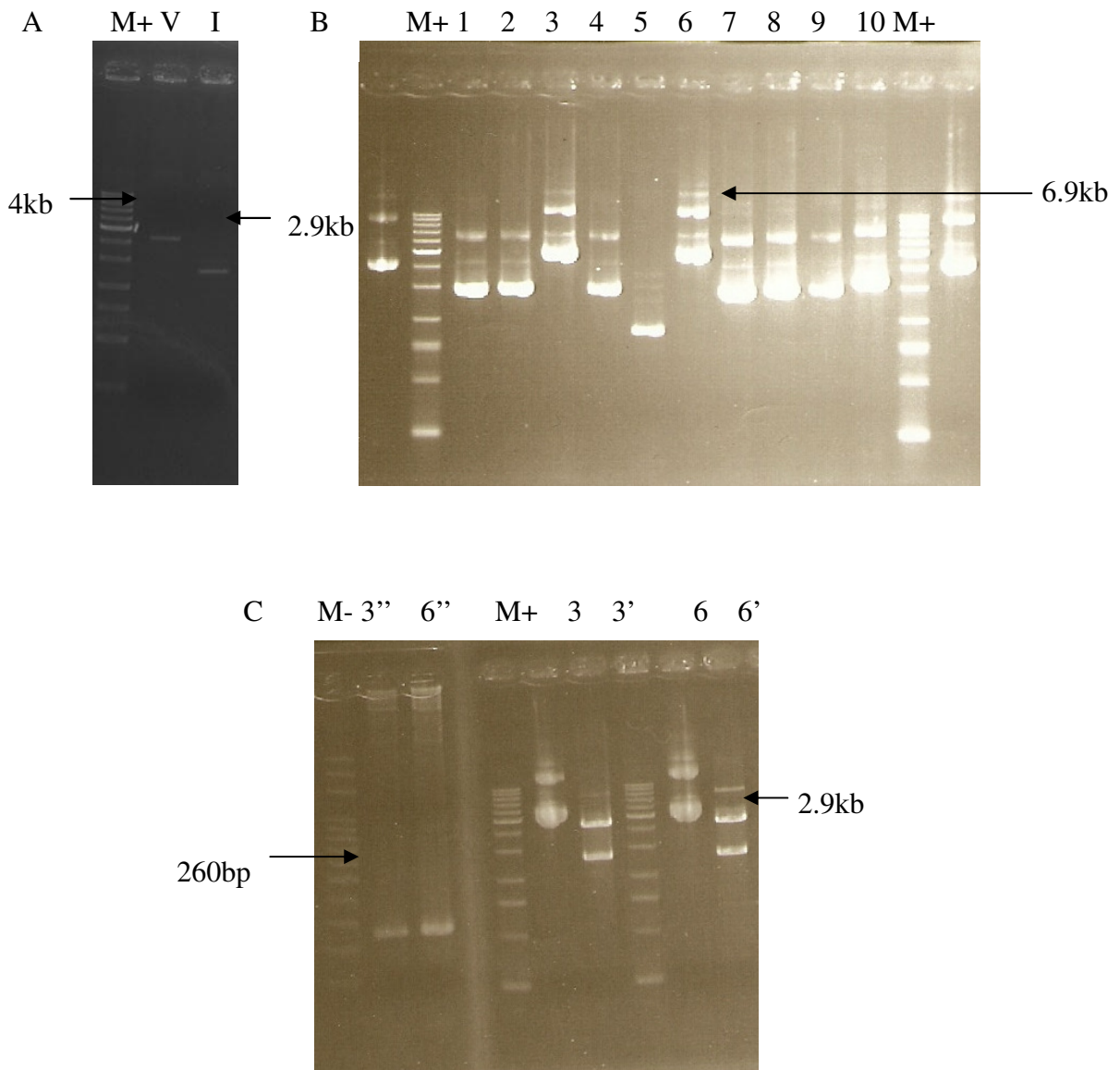
## 實驗圖表

表一：*KCNQ4* wild type 和突變點的 cRNA 濃度

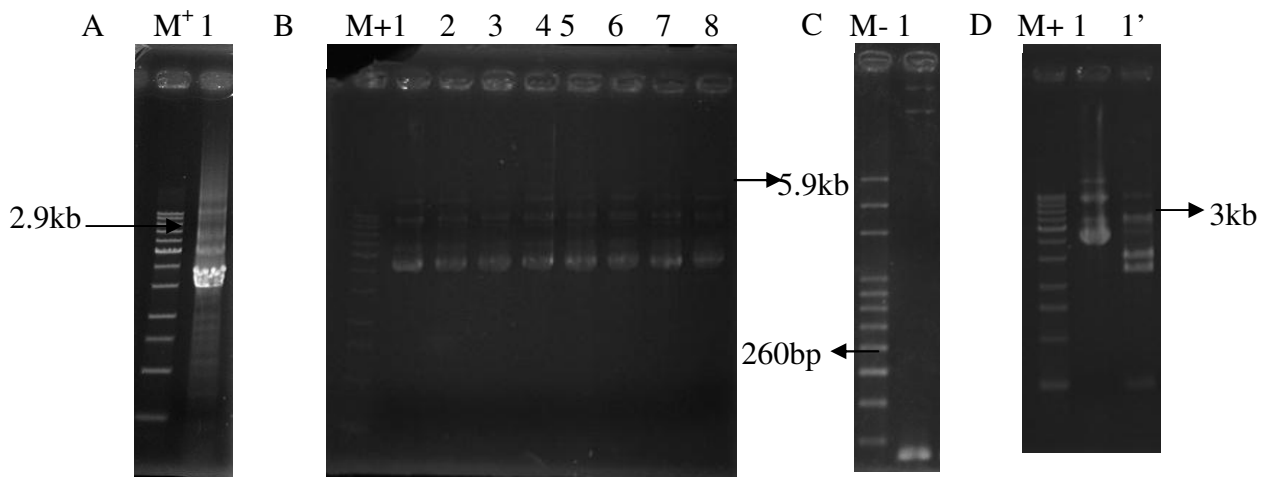
	cRNA 濃度 ng/ $\mu$ l	cRNA 濃度 ng/ $\mu$ l	cRNA 濃度 ng/ $\mu$ l	cRNA 濃度 ng/ $\mu$ l
KCNQ4-pTLN wt	520	738	638	616
KCNQ4-pTLN G321S	768	672	486	X
KCNQ4-pTLN F182L	501	X	X	X



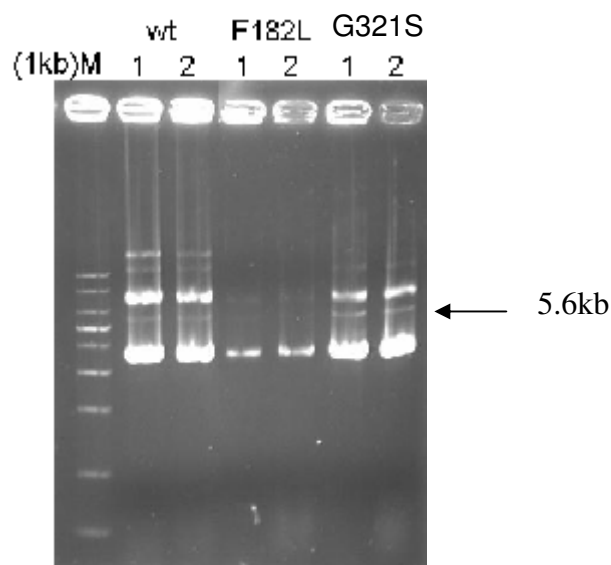
圖一、(A)1:pDsRed-KCNQ4 wt 質體經 PCR 反應，以 primer(5'Nhe I、3'EcoR V) 夾得 DsRed-KCNQ4 wt，約 2.9 kb，S 表示 pDsRed-KCNQ4 wt  
 (B) DsRed-KCNQ4 wt clone 至 pGEM 質體上，編號 1.2.3.4.5.6 表示抽取的樣本  
 (C)利用 pGEM 上的 multicutting site 的 EcoR I 檢測是否有成功接上，可得到 2.9kb 的 DsRed-KCNQ4 wt 和 3kb 的 pGEM vector。5'及 6'表示經 EcoR I 所切的質體，5 及 6 表示未經 coR I 所切的質體  
 (D)將編號 5.6 pGEM- DsRed-KCNQ4 wt 質體經 PCR 反應，利用 KC-4、KC-7 夾出約 260bp 的片段  
 M+表 1kb 的 marker，M-表 1kb 的 marker



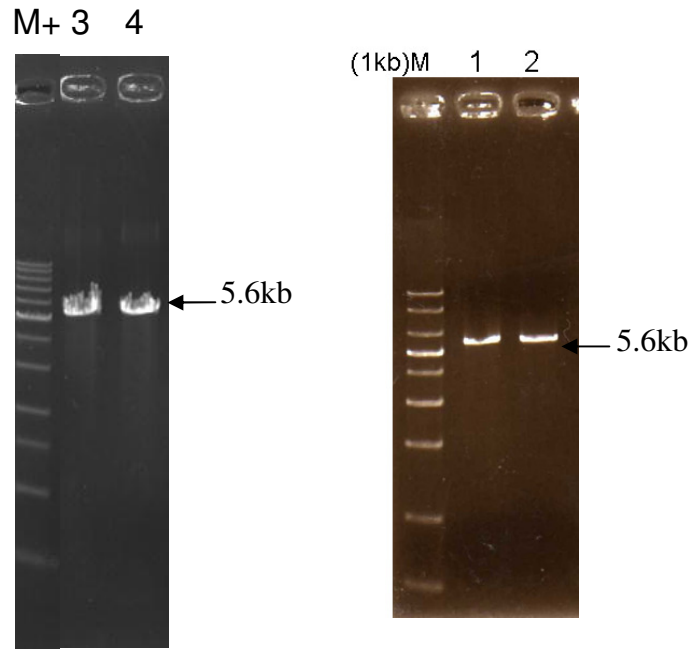
圖二、(A)V:將 pBI 經 EcoR V 和 Nhe I 切過，I:將 pGEM- DsRed-KCNQ4 wt 經 EcoR V 和 Nhe I 切過，約 2.9kb  
 (B) DsRed-KCNQ4 wt clone 至 pBI 質體上，編號 1-10 表示抽取的樣本，只有 3 和 6 有可能成功接上  
 (C) 將編號 3.6 pBI- DsRed-KCNQ4 wt 質體經 PCR 反應，利用 KC-4、KC-7 夾出約 260bp 的片段，3''和 6''表 PCR 產物，約 260bp。3'及 6'表示經 EcoR V 和 Nhe I 所切的質體，3 及 6 表示未經 EcoR I 和 Nhe I 所切的質體  
 M+表 1kb 的 marker，M-表 1kb 的 marker



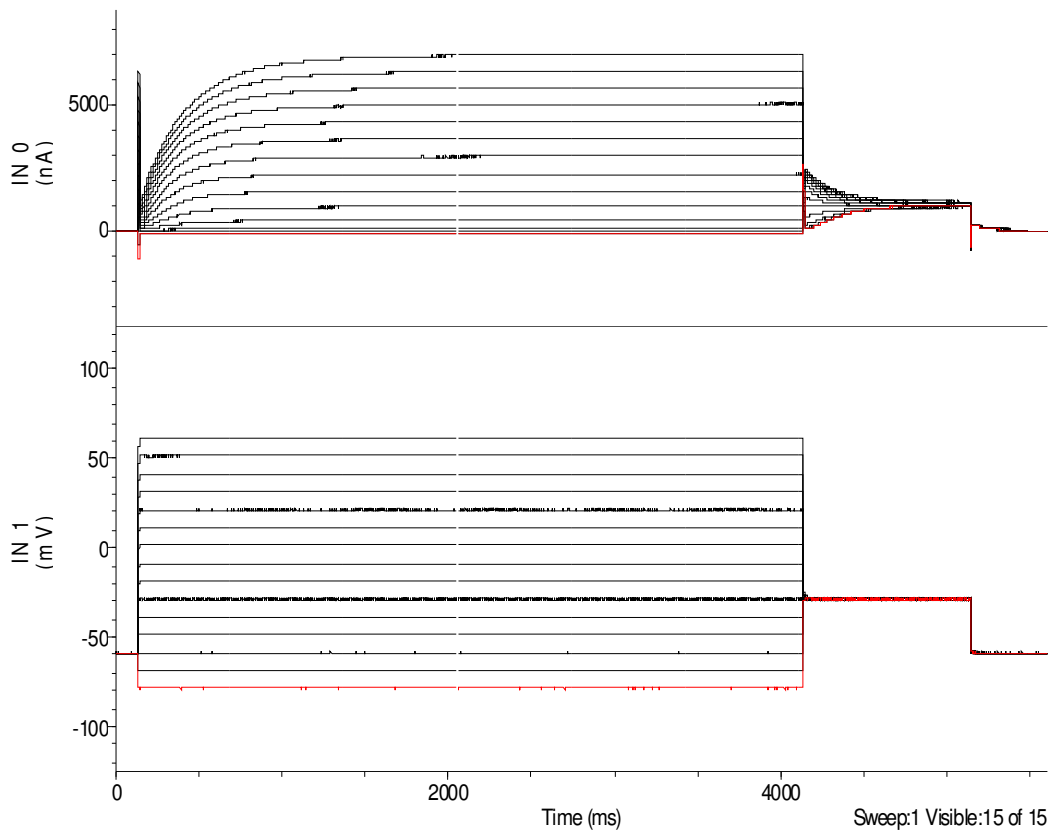
圖三、(A)1:pEGFP-KCNQ4F182L 質體經 PCR 反應，以 primer(5'Not I、3' Sal I) 夾得 EGFP-KCNQ4 F182L 約 2.9 kb，1: EGFP-KCNQ4 F182L  
 (B)EGFP -KCNQ4 F182L clone 至 pGEM 質體上，編號 1-8 表示抽取的樣本  
 (C) 將編號 5.6 pGEM- DsRed-KCNQ4 wt 質體經 PCR 反應，利用 KC-4、KC-7 夾出約 260bp 的片段  
 (D)利用 pGEM 上的 multicutting site 的 EcoR I 檢測是否有成功接上，可得到 2.9kb 的 EGFP-KCNQ4 F182L 和 3kb 的 pGEM vector。1'表示經 EcoR I 所切的質體，1 表示未經 coR I 所切的質體  
 M+表 1kb 的 marker，M-表 1kb 的 marker



圖四、pTLN -KCNQ4 的 wild type 和突變點 F182L.G321S plasmid 電泳跑膠圖，約 5.6kb

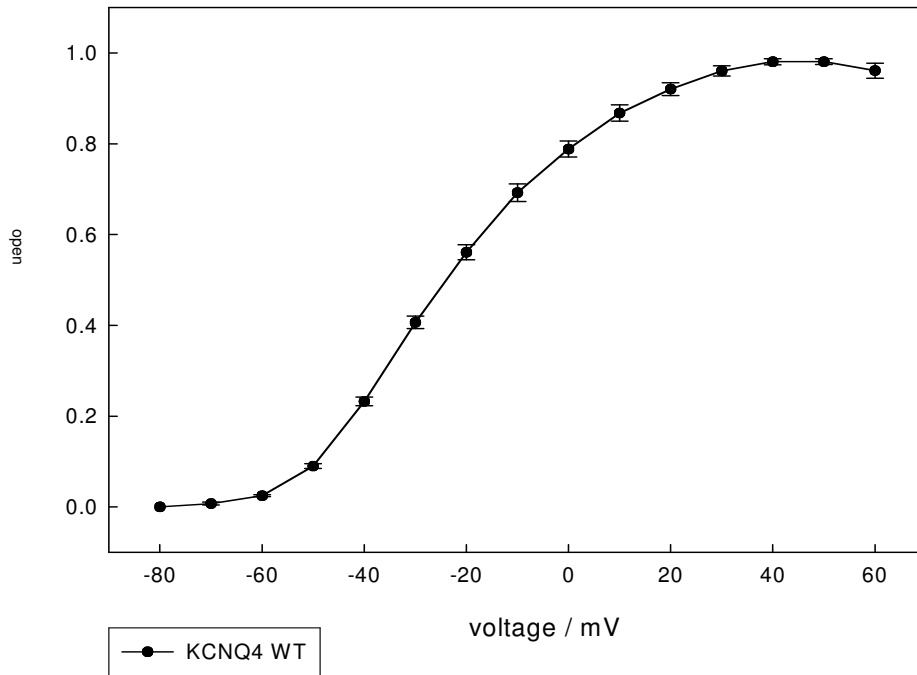


圖五、pTLN-KCNQ4 的 wt 和 G321S、F182L 經 Hpa I 切過後成 linear form 的 plasmid，約 5.6kb。1: pTLN-KCNQ4 F182L，3: pTLN-KCNQ4 wt 4: pTLN-KCNQ4 G321S



圖六、人類的電壓型鉀離子通道 KCNQ4 在爪蟾卵母細胞中的暫時表現

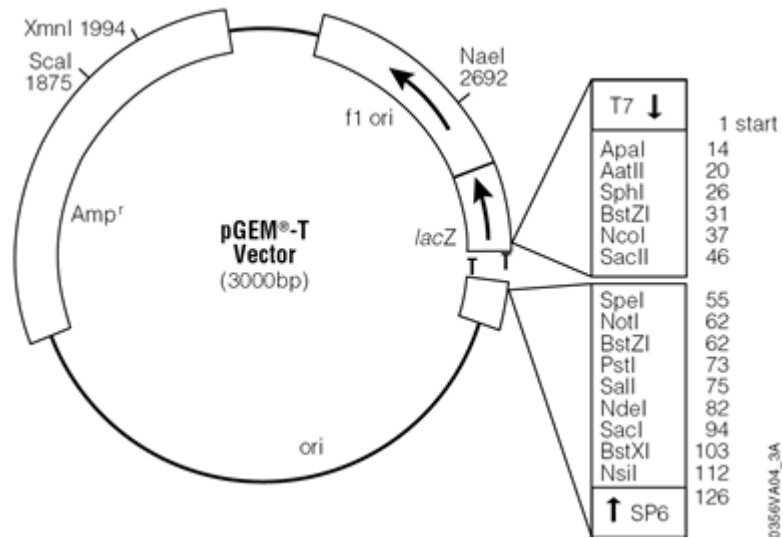
### KCNQ4 WT



圖七、藉由尾電流(tail current)分析 KCNQ4 鉀離子孔道的電位依賴性(voltage determined)



# 附錄



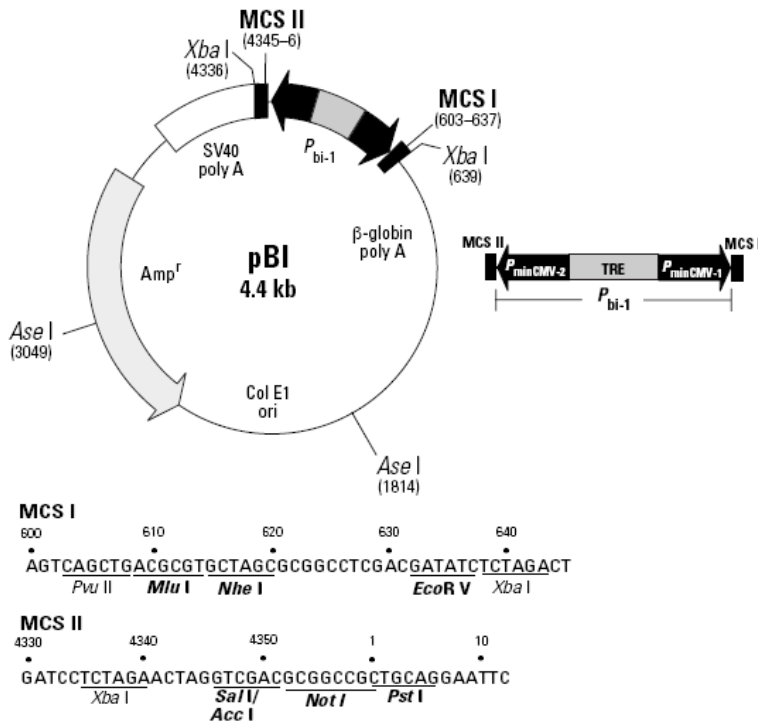
附圖一、pGEM-T-Easy Vector 載體以及其 multiple cloning site 上限制酶酵素的位  
置

## pBI Tet Vector Information

GenBank Accession No.: U89932

PT3070-5

Cat. No. 631006



附圖二、pBI 載體以及其 multiple cloning site 上限制酶酵素的位  
置