

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 Tmprss3 基因突變後造成聽障之致病機轉 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生： 陳鵬如
學生計畫編號： NSC 97-2815-C-040-029-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： 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

98年03月26日

目錄

摘要.....	1
實驗動機.....	2
研究方法及材料.....	3
結果.....	8
討論.....	12
圖表.....	14
參考資料.....	19
附錄.....	21

摘要

先前的文獻指出 *TMPRSS3* (transmembrane protease, serine 3) 基因的突變會影響耳蝸內 Na^+ 的再吸收而造成非症候群聽障 DFNB8/10。由於目前在台灣對於 *TMPRSS3* 基因的相關研究相當缺乏。而我們實驗室先前已發現 6%(12/230) 的聽障學童有 *TMPRSS3* 基因突變的發生。然而這些突變所造成的致病機轉我們並不清楚，因此為了進一步了解 *TMPRSS3* 基因突變後造成聽障的致病機轉，我們將利用爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*) 表現系統和細胞模式(HeLa cell) 來證明 *TMPRSS3* 基因的突變點是否會影響其蛋白功能。希望藉由爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*) 表現系統和螢光蛋白表現系統的研究，能對 *TMPRSS3* 基因突變後造成聽障的致病機制有更一步的瞭解。

目前已成功地從HeLa細胞中抽取RNA，並且反轉成cDNA，將*TMPRSS3* cDNA選殖在pGEM-T載體上。並且已將pGEM-T載體上的*TMPRSS3* subclone至pTLN與pEGFP質體上，完成了pTLN-*TMPRSS3*以及pEGFP-*TMPRSS3*野生型質體的建構。再利用site-directed mutagenesis建構完成突變型質體，如pTLN-*TMPRSS3*G239A、pTLN-*TMPRSS3*T551C、pTLN-*TMPRSS3*C1253T、pEGFP-*TMPRSS3*G239A、pEGFP-*TMPRSS3*T551C、pEGFP-*TMPRSS3*C1253T。另一方面也從大鼠的腎臟中抽取RNA，並且反轉成cDNA，將*ENaC- α* 與*ENaC- γ* cDNA clone在pGEM-T載體上。並且已將pGEM-T載體上的*ENaC- α* 與*ENaC- γ* subclone至pTLN質體上，完成了pTLN-*ENaC- α* 以及pTLN-*ENaC- γ* 質體的建構。另外我們將已建構好正常及突變的*TMPRSS3* (*TMPRSS3*wt、*TMPRSS3*G239A、*TMPRSS3*T551C、*TMPRSS3*C1235T) 表現載體轉殖於HeLa cell中，以便觀察正常及突變的*TMPRSS3*在細胞內表現位置是否有差異?我們目前觀察的結果為突變的*TMPRSS3*蛋白在細胞內的位置並未改變，且和正常的*TMPRSS3*蛋白一樣似乎表現在內質網中。但由於辨識內質網的抗體(anti-PDI)專一性不高，所以我們之後會利用ER tracker來標定細胞內質網的位置來進一步確認。此外將繼續完成*ENaC*表現載體 (pTLN-*ENaC- β*) 的建構，並進一步的將這些正常、突變的*TMPRSS3*基因與*ENaC*表現質體送入*Xenopus oocyte*表現系統來探討*TMPRSS3*突變後之功能影響。

實驗動機

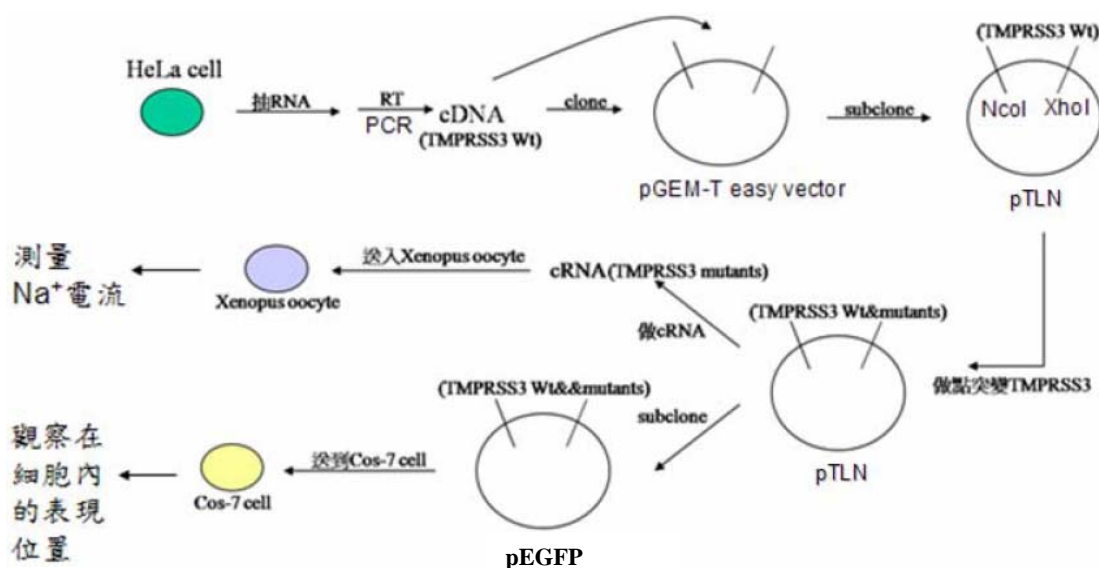
先前我們實驗室的研究在非症候群聽障患者身上發現 3 個 *TMPRSS3* 基因的突變，包括 R80H (LDLRA domain Exon4 239G>A)、L184S (SRCR domain Exon6 551T>C)、A418V (Serine protease domain Exon12 1253C>T)。然而到目前為止我們並不清楚這些突變造成非症候群聽障的致病機轉。因此本研究的主要動機是想要探討我們在 *TMPRSS3* 基因上所發現的 3 個突變點對其蛋白功能所造成的影響，藉以了解這 3 個 *TMPRSS3* 基因突變後造成聽障的致病機轉。

根據上述的動機，我們擬定了一些研究方向和目標：

1. 利用爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*) 表現系統來探討先前我們實驗室在非症候群聽障學童中所發現*TMPRSS3*基因的3個missense突變(R80H、L184S、A418V)對*TMPRSS3*蛋白的功能影響。
2. 以pEGFP為載體，利用HeLa cell來觀察正常以及突變的*TMPRSS3*蛋白在細胞內的所在位置，藉此來瞭解是否因*TMPRSS3*基因突變後造成*TMPRSS3* 蛋白在細胞內表現位置改變而影響其正常功能。

研究方法及材料

研究步驟



研究方法

1). 建構全長 *TMPRSS3* cDNA 載體

1-1 勝任細胞(competent cell)的製備

取 20 μ l DH5 α ，加入裝有 2ml LB broth 的養菌管中，放置 37 $^{\circ}$ C 培養箱旋轉 overnight 進行培養。次日，取菌液 500 μ l 菌液至含有 50ml 的 LB 至錐形瓶中，並將錐形瓶置於維持 37 $^{\circ}$ C 的 shaker 中搖晃 2-3 hours (通常大於 3 小時) (150-200 轉/分鐘) 直至菌液之 OD600 介於 0.6~0.7 之間。再將菌液平均分裝於已先預冷的 2 根養菌管，以 5000rpm 於 4 $^{\circ}$ C 下離心 10 分鐘。離心完，移除上清液，再於每管養菌管加入 100mM 的 CaCl₂ 25ml，並以 vortex 方式將菌液均勻溶於 CaCl₂ 中。隨後將離心管放置 0 $^{\circ}$ C 冰桶上 30 分鐘，再以 5000rpm，4 $^{\circ}$ C 下再離心 10 分鐘。離心完畢移除上清液。再於養菌管內加入 3ml 100mM 的 CaCl₂，將菌輕輕搖勻，回溶菌體。最後加入抗凍劑 glycerol 至濃度約為 7~10%，再以每管 100 μ l 的量分裝 competent cell 至 eppendorf，並保存於 -80 $^{\circ}$ C 下。

1-2 基因轉殖(transformation)

先將 competent cell 從 -80 $^{\circ}$ 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 eppendorf 使其混勻，再放置冰上 30 分鐘。之後將 eppendorf 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 shake 10 秒鐘，隨即將 eppendorf 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 eppendorf 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 kanamycin 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。

1-3 大腸桿菌菌落之聚合酶鏈鎖反應(colony PCR)

利用 PCR 的方式對 transformation 的結果先做篩選，觀察 plate 上形成的 colony 的菌是否含有黏接好的質體。取 single colony 至 15µl 的 STE Buffer，並且 pipetting 均勻。之後取 8µl 進行 PCR 反應。總反應體積為 25µl，包含 8µl DNA，2.5µl 2mM dNTP、2.5µl 10X pfu buffer、forward primer 0.5µl、reverse primer、0.5µl Taq DNA polymerase 以及 10.5µl d₂H₂O。同樣將此反應溶液置於迴溫反應器(Perkin-Elmer 9700)中進行。待 PCR 反應結束，將產物進行 DNA 電泳。觀察 colony PCR 的結果，挑選出現預期基因片段大小的樣本，再添加 5ml LB broth 以及 3µl 50mg/mL kanamycin 進行隔夜培養。

1-4 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 200µl，與細菌充份混合均勻後，移至 eppendorf。加入 PD2 200µl，gently 均勻搖 5-6 次，靜至 2 分鐘。PD3 300µl，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 buffer 400µl，離心 30 秒，倒掉離心液。加入 600µl 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 50µl 的 d₂H₂O，靜置 2 分鐘後，離心 2 分鐘將 plasmid DNA 萃取出來。抽取完的質體可利用已知的酵素去切，以切下來的產物片段大小來確定質體的正確與否。

1-5 建構全長 *TMPRSS3* 到 pGEM 載體上

從含有 *TMPRSS3* 表現的 HeLa cell 中利用 Total RNA Extraction Miniprep system(VIOGENE)抽取組織中的 total RNA，萃取的 RNA 以分光光度儀定量。加入 dNTP(10mM)1 μ l 和 dT(100 μ M)或逢機引子(random primer, 3 μ g/ μ l)1 μ l，於 70°C 加熱 5 分鐘後，馬上插在冰上冷卻 5 分鐘以上以防止自黏，在加入 5X first-strand buffer(250mM Tris-HCL、375mMKCL、15mMMgCl₂)4 μ l、0.1M DTT2 μ l 與 Ribonuclease Inhibiter(400U/ μ l)1 μ l。混合均勻後於 37°C 回應 2 分鐘，再加入 1 μ l 反轉錄，以 25°C 5 分鐘後，42°C 進行反轉錄 1 小時，最後於 70°C 加入 15 分鐘以終止回應，反轉錄產物可直接進 PCR 或保存於 -20°C。取適量的反轉錄產物，用 *TMPRSS3* 基因的 Forward primer(TMPRSS3-KpnI:5'AATCCATGGGGGAAAATGATCCGCCT3'和 Reverse primer(TMPRSS3R-XhoI:5'ATTCTCGAGTCAGGTTTTTAGGTCTCTCTCC3')來夾出整段的 coding sequence。接著以 pGEM TA clone Kit 選殖出全長的 *TMPRSS3* cDNA，接著用 miniprep kit(QIAGEN)抽取質體並用限制酶 (EcoR I)，以及做 *TMPRSS3* internal PCR 作初步確認，再利用 Perkin-Elmer Big Dye primer Cycle sequencing Ready Reaction Kit 以及 ABI377 Genetic Analyzer 進行兩端序列比對並定序，確認無其他突變。

2). 將全長的 *TMPRSS3* subclone 到 pTLN 載體

利用 Forward Primer(TMPRSS3-NcoI:5'AATCCATGGGGGAAAATGATCCGCC3')和 Reverse primer(TMPRSS3R-XhoI:5'ATTCTCGAGTCAGGTTTTTAGGTCTCTCTCC3') 將 *TMPRSS3* 從 pGEM TA 質體夾出並 subclone 入 pTLN，選殖方法如方法(1-5)所敘。

3). 建構全長 *TMPRSS3* 的突變質體

主要利用 Stratagene Quickchange site directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) 進行突變點的置換，先設計突變點區的引子 (primer)，引子全長必須要在 25~45base 之間，而 T_m 值必須要大於或等於 78°C，以下為設計的公式

$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \%mismatch$ (N is the primer length in bases, values for %GC and %mismatch are whole numbers)

突變點的位置最好設計位在引子(primer)中間，其前後至少要有 10~15bases 正確的序列，而引子的 GC 百分比必須要高於 40 百分比。設計好引子後即可進行點突變的實驗步驟，plasmid 必須經由 dam+ 的 *E.coli* 來複製，經由這株菌所複製的 plasmid 會被甲基化，所以經過點突變之後，我們可經由是否有甲基化的不同來區分。準備反應溶液體積為 50 μ l，其中含 1 μ l plasmid DNA、1.25ng forward primer、1.25ng reverse primer、1 μ l 10mM dNTP、5 μ l 10X reaction buffer、40.5ml d2H₂O 和 1 μ l pfu Turbo DNA polymerase(2.5U/ μ l)，混合均勻後，在反應溶液上覆蓋 30 μ l mineral oil，將此反應溶液裝置於回溫反應器(Perkin-Elmer9700)中進行，反應條件為 95 $^{\circ}$ C 30 秒、95 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 1 分鐘、68 $^{\circ}$ C 8 分鐘(12 個循環數)，反應結束後將反應物至於冰上 2 分鐘，等反應完全後，加入 DpnI 酵素(10U/ μ l)於 37 $^{\circ}$ C 下作用 2 小時，將有甲基化的舊 plasmid 片段切除。接著進行 *E.coli* 基因轉植(transform)將點突變好的質體送入，以複製大量並將菌液冷凍至 -80 $^{\circ}$ C 雪櫃保存。

4). 建構全長正常或突變的 *TMPRSS3* 在 EGFP 蛋白表現質體

利用 Forward primer (*TMPRSS3*-F-HindIII : 5' AATAAGCTTATG GGGGAAAATGATCCGCC3') 和 Reverse Primer(*TMPRSS3*-R-SacII : 5' TACCGCGGGGTTTTAGGTCTCTCTCCAT3') 將 *TMPRSS3* 從 pTLN-*TMPRSS3* 質體夾出並 subclone 入 pEGFP 螢光蛋白表現質體內，選殖方法如方法(1-5、3)所敘。

5). 建構全長 ENaC 之 α 、 β 和 γ subunits 至 pTLN 載體上

5-1 建構全長 ENaC 之 α 、 β 和 γ subunit 在 pGEM 載體上

之前文獻指出在大鼠腎臟細胞中有 ENaC 之 α 、 β 和 γ subunit 的表現(10)，所以我們利用 Total RNA Extraction Miniprep System(VIOGENE)從大鼠的腎臟細胞抽取其中的 total RNA，再將設計好的 α 、 β 和 γ subunit 引子(附表一)利用上述方法(1-5)進行 RT-PCR 夾出 α 、 β 和 γ 整段的 coding sequence。接著以 pGEM TA clone Kit 選殖出全長的 α 、 β 和 γ cDNA，選殖方法如方法(1-5)所敘。

5-2 將全長的 ENaC 之 α 、 β 和 γ subunits subclone 到 pTLN 載體

為了在爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統中探討 *TMPRSS3* 基因的

突變是否會影響其蛋白功能，所以我們建構了能在爪蟾卵母細胞中表現的鈉離子通道(ENaC)的載體。利用 Forward primer 和 Reverse primer 將 ENaC 之 α 、 β 和 γ 從 pGEM TA 質體夾出並 subclone 入 pTLN，選殖方法如方法(2)所敘。

6). 利用 HeLa cell 觀察正常及突變的 TMPRSS3 在細胞內的表現位置

6-1 細胞培養與基因轉殖

參考之前文獻(11)利用 HeLa cells 觀察正常及突變的 *TMPRSS3* 基因在細胞內的表現位置。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 3.7 cm² 的培養皿中，當細胞濃度達到 80 % 時，即可使用基因轉殖感染(Nanofection Kit)。將 3.2 μ l 的 Nanofection 在 eppendorf 中用 NaCl 稀釋至總體積為 100 μ l 並混合均勻，接著將此注入另一管裝有 5 μ g 的質體以 NaCl 稀釋至總體積為 100 μ l 的 eppendorf 中，將兩者混勻後靜置 15~30 分鐘。將 Nanofectin 與 plasmid 的混合物均勻的加在含有小牛血清的 2c.c. medium 中，在 37°C 的培養箱培養 24~48 小時後，即可進行細胞免疫螢光染色法來觀察 *TMPRSS3* 基因在細胞內的表現情形

6-2 細胞免疫螢光染色技術(immunofluoresene staining)

將細胞拆至 18 mm² coversplit 的 3.7 cm² 培養皿中，待 24 小時後移除舊培養液，以 1X PBS 沖洗 3 次，加入 1 ml 4% paraformaldehyde 固定細胞於室溫下作用 15 分鐘後，以 1X PBS 沖洗在 shaker 上搖 5 分鐘，此動作重覆 3 次，繼而取含 500 ng/ μ l 之 30~40 μ l anti-golgin-97(human) antibody 滴於細胞上置於 4°C 作用 16 小時後，以 1X PBS 沖洗於 shaker 上搖 5 分鐘，此動作重覆 3 次，之後，再取 20 ng/ml 之 goat anti mouse (Alexa Fluor[®] 594) secondary antibody 30~40 μ l 滴於細胞上置於 37°C 作用 1 小時後，以 1X PBS 沖洗於 shaker 上 5 分鐘，此動作重覆 3 次，最後加入 DAPI 50 μ l 靜置 5 分鐘後，以 1X PBS 沖洗 3 次，以螢光油封片，使用蔡氏(Zeiss)510 共厄焦螢光顯微鏡(色螢光: excitation = 557; emission = 579; 綠色螢光: excitation = 488; emission = 507) 觀察正常及突變的 *TMPRSS3* 蛋白在細胞內之分佈螢光位置及細胞型態。

結果

一、 建構全長 *TMPRSS3* 在 pGEM 載體上

從 Hela cell 中抽取 RNA，進行 RT-PCR 反應。欲以 forward primer *TMPRSS3*-KpnI、reverse primer *TMPRSS3R*-XhoI 夾得 *TMPRSS3* 全長，約 1.3kb (圖一.A)。再利用 *TMPRSS3* 的 internal primer (pF、pR) 夾 *TMPRSS3* 的 internal 片段 (圖一.B)，得 371bp，證明了 Hela cell 中確實有 *TMPRSS3* 此基因表現。將 *TMPRSS3* 與 pGEM-T easy vector (附圖一) 進行 ligation 反應，從 transformation 後塗菌的 LB plate 上挑 10 顆菌落利用 colony PCR 夾 *TMPRSS3* internal segment 得 371bp (圖一.C)。將含有 *TMPRSS3* internal segment 的菌落養菌並抽質體，若 *TMPRSS3* 確實 clone 到 pGEM 上，利用 pGEM-T easy vector 的 multiple cloning site 中的 EcoRI 做 enzyme mapping，可得 *TMPRSS3* 全長 1.3kb 以及 pGEM-T easy vector，3015bp (圖一.D)。最後經由定序反應結果我們確實得到 pGEM-*TMPRSS3* 質體且序列無誤。

二、 將全長的 *TMPRSS3* subclone 到 pTLN 載體

為了利用 *Xenopus* oocyte system 中探討野生型以及突變型 *TMPRSS3* 的蛋白活性，我們將 pGEM-*TMPRSS3* 中全長的 *TMPRSS3* 基因 subclone 至 pTLN (此載體是由 Kubisch 實驗室所提供) 質體來建構可以在 *Xenopus* oocyte system 上表現的 pTLN-*TMPRSS3* 質體。利用 PCR 技術以 forward primer *TMPRSS3*-NcoI、reverse primer *TMPRSS3R*-XhoI 從 pGEM-*TMPRSS3* 質體中夾得全長 1.3kb *TMPRSS3* 基因 (圖二.A)。進一步的利用 restriction enzyme NcoI、XhoI 切割 *TMPRSS3* PCR 產物 (insert) 以及 pTLN (vector)，可得全長 *TMPRSS3* 1.3kb 和 pTLN 載體大小約 3.2kb (圖二.B)，將 vector 與 insert 接合後可得 pTLN-*TMPRSS3* (圖二.C)。最後經由基因特異性的 PCR 反應檢測，我們從 clone 好的 pTLN-*TMPRSS3* 質體夾得 *TMPRSS3* 部分片段 317bp (圖二.D)。另外我們也利用 NcoI、XhoI 做 enzyme mapping 來確認將 *TMPRSS3* clone 至 pTLN 上 (圖二.E)，最後經由定序反應結果我們確實得到 pTLN-*TMPRSS3* 質體且序列都無誤。

三. 建構全長 *TMPRSS3* 的突變質體

為瞭解在 *Xenopus* oocyte 中 *TMPRSS3* 基因突變後對 *TMPRSS3* 蛋白水解功能的影響及是否可活化 ENaC，因此建構 *TMPRSS3* 突變型。首先將設計好的突變點引子 (附表二)，使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 在已有的 pTLN-*TMPRSS3* 野生型質體上做點突變 (site-directed mutagenesis) 的變化，最後經由定序反應確認，建構出我們實驗室先前所發現的三個突變點 G239A(R80H)、T551C(L184S)、C1253T(A418V)

(圖三)。

四. 建構全長正常或突變的 *TMPRSS3* 在 EGFP 蛋白表現質體

為了在 HeLa cell 中觀察野生型以及突變型 *TMPRSS3* 蛋白在細胞內的所在位置，藉此來瞭解是否因 *TMPRSS3* 基因突變後造成 *TMPRSS3* 蛋白在細胞內表現位置改變而影響其正常功能。我們將 pTLN-*TMPRSS3* 中全長的 *TMPRSS3* 基因 subclone 至 pEGFP-C1 質體(附圖二)來建構可以在 HeLa cell 中表現的 pEGFP-*TMPRSS3* 質體。首先我們利用 PCR 技術以 forward primer *TMPRSS3*-HindIII、reverse primer *TMPRSS3*R-SacII 從 pTLN-*TMPRSS3* 質體中夾得全長 1.3kb *TMPRSS3* 基因(圖四.A)。進一步的利用 restriction enzyme HindIII、SacII 切割 *TMPRSS3* PCR 產物(insert)以及 pEGFP-Cx29 (vector)，可得 *TMPRSS3* 全長 1.3kb 和 pEGFP 載體大小約 4.7kb(圖四.B)，將 vector 與 insert 接合後可得 pEGFP-*TMPRSS3* (圖四.C)。最後經由基因特異性的 PCR 反應檢測，我們從 clone 好的 pEGFP-*TMPRSS3* 質體夾得 *TMPRSS3* 部分片段 317bp(圖四.D)。另外我們也利用 HindIII、SacII 做 enzyme mapping(圖四.E)來確認將 *TMPRSS3* clone 至 pEGFP 上，最後經由定序反應結果我們確實得到 pEGFP-*TMPRSS3* 質體且序列都無誤。更進一步地將設計好的突變點引子(附表二)，使用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 在已有的 pEGFP-*TMPRSS3* 野生型質體上做點突變(site-directed mutagenesis)的變化，最後經由定序反應確認，建構出我們實驗室先前所發現的三個突變點 G239A(R80H)、T551C(L184S)、C1253T(A418V)(圖三)。

五. 建構全長 *ENaC- α* 在 pGEM 載體上並 subclone 到 pTLN 載體

為了利用 *Xenopus* system 探討野生型以及突變型 *TMPRSS3* 的蛋白活性，在完成建構正常以及突變的 *TMPRSS3* 表現載體後，致力於建構鈉離子通道(*ENaC- α* 、 β 、 γ) 的表現載體。首先從大鼠的腎臟抽取 total RNA 並以 RT-PCR 夾得 *ENaC- α* 全長，約 2.1kb(圖五.A)，在養菌後抽質體可得 pGEM-*ENaC- α* (圖五.B)，最後利用 EcoRI 做 enzyme mapping 來確認將 *ENaC- α* clone 至 pGEM 上(圖五.C)，最後經由定序反應結果所得到 pGEM-*ENaC- α* 質體序列無誤。為了使 *ENaC- α* 在 *Xenopus* oocyte 中表現，必須將 *ENaC- α* 從 pGEM 載體上 subclone 至 pTLN 載體上。利用限制酶酵素 NcoI 和 XhoI 切割先前建構於 pGEM 的 *ENaC- α* (insert)以及 pTLN-KCNQ4(vector)，可得全長 *ENaC- α* 為 2.1kb 和 pTLN 載體大小約 3.2kb(圖五.D)，將 vector 與 insert 接合後可得 pTLN-*ENaC- α* (圖五.E)。最後用 NcoI、XhoI 做 enzyme mapping 來確認將 *ENaC- α* clone 至 pTLN 上(圖五.F)。

六. 建構全長*ENaC-γ*在pGEM載體上並subclone 到pTLN載體

從 Rat kidney 以 RT-PCR 夾得 *ENaC-γ* 全長，約 1.9kb(圖六.A)。將其 PCR 產物進行加 A 反應後與 pGEM-T 進行 T&A cloning ligation，從 transformation 後塗菌的 LB plate 上挑 14 顆菌落利用 colony PCR 夾 *ENaC-γ* 全長，約 1.9kb (圖六.B)，將含有 *ENaC-γ* 全長的菌落養菌並抽質體(圖六.C)，若 *ENaC-γ* 確實 clone 到 pGEM 上利用 pGEM-T easy vector 的 multiple cloning site 中的 EcoRI 做 enzyme mapping，可得 *ENaC-γ* 全長 1.9kb 以及 pGEM-T easy vector，3015bp(圖六.D)。最後經由定序反應結果我們確實得到 pGEM-*ENaC-γ* 質體且序列都無誤。為了使 *ENaC-γ* 在 *Xenopus oocyte* 中表現，必須將 *ENaC-γ* 從 pGEM 載體上 subclone 至 pTLN 載體上。由於 *ENaC-γ* 內含 1 個 NcoI 酵素切點所以在 insert 置備時採用 partial digestion，利用限制酶酵素 NcoI 和 XhoI 切割先前建構於 pGEM 的 *ENaC-γ*(insert)以及 pTLN-KCNQ4(vector)，可得全長 *ENaC-γ* 1.9kb 和 pTLN 載體大小約 3.2kb(圖六.E)，將 vector 與 insert 接合後可得 pTLN-*ENaC-γ*(圖六.F)。最後經由基因特異性的 PCR 反應檢測，我們從 clone 好的 pTLN-*ENaC-γ* 質體夾得 *ENaC-γ* 全長 1.9kb(圖六.G)。

七、 將正常及突變的 *TMPRSS3* 送到 HeLa cell 中

為了證明 *TMPRSS3* 基因的突變點是否會影響其蛋白功能，我們以 pEGFP 為載體，利用 HeLa cell 來觀察正常以及突變的 *TMPRSS3* 蛋白在細胞內的所在位置，藉此來瞭解是否因 *TMPRSS3* 基因突變後造成 *TMPRSS3* 蛋白在細胞內表現位置改變而影響其正常功能。

(1) 正常 *TMPRSS3* 蛋白在細胞中的表現

正常的 *TMPRSS3* 基因接入 pEGFP 質體後，將 pEGFP-*TMPRSS3*wt 送入 HeLa cells 中，隔天將細胞種至蓋玻片上，培養兩天讓 *TMPRSS3*-GFP 融合蛋白在細胞內表現，再以 4% paraformaldehyde 固定蓋玻片上的細胞，進行細胞免疫螢光染色，以抗體 anti-protein disulfide isomerase (PDI) mouse IgG 來偵測內質網的位置，並以 DAPI 染細胞核。經正立螢光顯微鏡觀察 *TMPRSS3*-GFP 融合蛋白的表現，可以發現 *TMPRSS3*-GFP 融合蛋白會與內質網共同表現(圖七.A)。我們進一步利用以抗體 Anti-glogin-97(human) 來偵測高基氏體的位置，並以 DAPI 染細胞核。經正立螢光顯微鏡觀察 *TMPRSS3*-GFP 融合蛋白的表現位置，我們發現 *TMPRSS3*-GFP 融合蛋白的表現位置與高基氏體所在位置並未重疊(圖七.B)。結果推論正常的 *TMPRSS3* 蛋白在細胞內的表現位置似乎在內質網並非在高基式體，此結果與之前文獻 Hanwell et al.,2002 的報告相同(11)。

(2)G239A錯意突變之TMPRSS3蛋白在細胞中的表現

G239A 錯意突變的 *TMPRSS3* 基因接入 pEGFP 質體後，將 pEGFP-*TMPRSS3*G239A送入HeLa cells中，隔天將細胞種至蓋玻片上，培養兩天讓TMPRSS3G239A-GFP融合蛋白在細胞內表現，再以4% paraformaldehyde固定蓋玻片上的細胞，進行細胞免疫螢光染色，以抗體anti-protein disulfide isomerase(PDI) mouse IgG來偵測內質網的位置，並以DAPI染細胞核。經正立螢光顯微鏡觀察TMPRSS3G239A-GFP融合蛋白的表現，可發現TMPRSS3G239A-GFP與內質網共同表現(圖七.C)。我們進一步利用以抗體Anti-Golgi來偵測高基氏體的位置，並以DAPI染細胞核。經正立螢光顯微鏡觀察TMPRSS3G239A-GFP融合蛋白的表現位置，我們發現TMPRSS3G239A-GFP融合蛋白的表現位置與高基氏體所在位置並未重疊(圖七.D)。結果推論突變的TMPRSS3蛋白(G239A)並未改變其細胞內所在位置似乎仍位在內質網中。

(3)T551C 錯意突變之 TMPRSS3 蛋白在細胞中的表現

T551C 錯意突變的 *TMPRSS3* 基因接入 pEGFP 質體後，將 pEGFP-*TMPRSS3*T551C送入HeLa cells中，隔天將細胞種至蓋玻片上，培養兩天讓TMPRSS3T551C-GFP融合蛋白在細胞內表現，再以4% paraformaldehyde固定蓋玻片上的細胞，進行細胞免疫螢光染色，以抗體anti-protein disulfide isomerase(PDI) mouse IgG來偵測內質網的位置，並以DAPI染細胞核。經正立螢光顯微鏡觀察TMPRSS3T551C-GFP融合蛋白的表現，可發現TMPRSS3T551C-GFP與內質網共同表現(圖七.E)。結果推論突變的TMPRSS3蛋白(T551C)並未改變其細胞內所在位置似乎仍位在內質網中。

討論

目前文獻指出 *TMPRSS3* 基因突變後會導致非症候群體染色體聽障(3)，而 *TMPRSS3* 是 Type II Transmembrane Serine Protease(TTSP)家族中的成員之一(4)。在 *in vitro* 中指出突變的 *TMPRSS3* 會失去水解蛋白的活性(5)，這意味著 *TMPRSS3* 的蛋白水解活性對正常聽力功能而言是非常重要的。雖然之前研究已顯示出在 *in vitro* 中 *TMPRSS3* 可調節 ENaC 鈉離子通道的活性(8)，也由此推斷 *TMPRSS3* 參與了耳蝸中鈉離子濃度的調節，但目前仍然不完全瞭解 *TMPRSS3* 在聽力系統中所扮演的角色。再加上台灣地區對於 *TMPRSS3* 基因在非症候群聽障患者中的相關研究相當缺乏，因此探討我們實驗室所發現的 3 個錯意突變 G239A(R80H)、T551C(L184S)、C1253T(A418V)所造成的影響可對 *TMPRSS3* 突變後造成聽障的致病機轉有更進一步的瞭解。

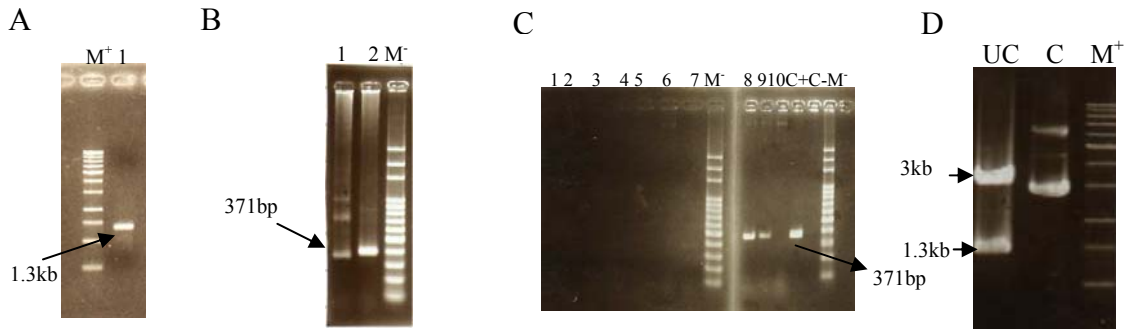
在爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統的研究主要參考 Gunipponi et al., 2002 (8)的研究方法來進行。由於 HeLa cell 中 *TMPRSS3* 基因的表現量非常低，因此我們利用 pGEM-T easy vector 載體做為質體放大以及儲藏之用途。目前我們已從 HeLa cell 利用 RT-PCR 及 T&A clone 的技術將全長的 *TMPRSS3*(含 TM domain)選殖出來，再將全長的 *TMPRSS3*(含 TM domain)subclone 到 pTLN 載體上(可在爪蟾卵母細胞表現的載體)，同樣的突變的質體也是利用 Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit 來建構，目前建構完成了 pTLN-*TMPRSS3*(*TMPRSS3* wt、*TMPRSS3* G239A、*TMPRSS3* T551C、*TMPRSS3* C1253T)等質體。目前我們正分別建構鈉離子通道(ENaC α 、 β 和 γ subunits)的表現載體(pTLN)，在這些質體建構好之後在 *in vitro* 合成 cRNA，完成後再將合成的 cRNA 送入爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)，以便探討 *TMPRSS3* 基因突變後對 *TMPRSS3* 蛋白質水解功能的影響及是否可活化 ENaC。

另外有文獻指出 ENaC 是在內質網進行 subunits 組裝和需要核心糖化作用，這些 subunits 組裝發生在通道生物合成的早期，而且是 ENaC 成熟的重要的決定因子(10)。由於 *TMPRSS3* 蛋白可停泊在內質網的膜上，因此 *TMPRSS3* 被認為在 ENaC 的組裝過程中可能扮演一個重要角色。為了確定 *TMPRSS3* 是停

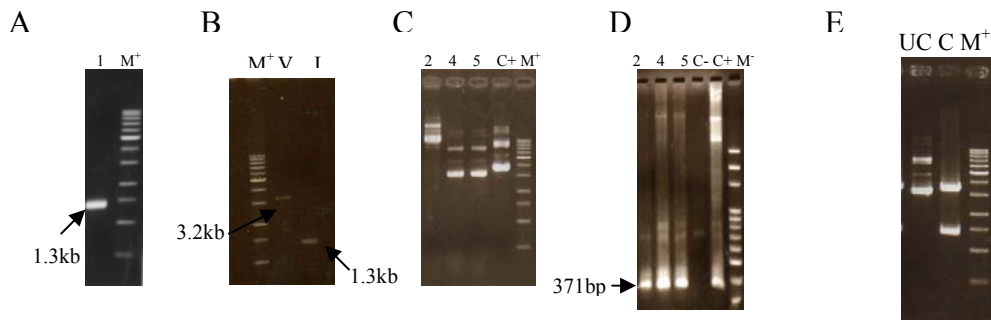
泊在內質網上才會進行蛋白水解並活化 ENaC，我們已建構完成 wild type 和突變 *TMPRSS3* 的 pEGFP 表現載體，並將 *TMPRSS3* 正常與突變的 pEGFP 表現載體送到 HeLa cell 內，利用螢光蛋白表現出蛋白在細胞內的所在位置。進而觀察是否因 *TMPRSS3* 突變後造成細胞內表現位置不在內質網而影響其正常功能。由我們實驗的初步結果顯示突變的 *TMPRSS3*(G239A、T551C)蛋白似乎與正常的 *TMPRSS3* 蛋白皆表現在內質網上，並未改變其在細胞內的表現位置。由於 *TMPRSS3* 蛋白在 R216 和 I217 之間有自動被蛋白水解的切點，進而釋放 serine protease domain 以便執行其蛋白水解功能。於是我們將進一步探討這些未改變其在細胞內表現位置的突變蛋白(G239A、T551C)是否會影響 *TMPRSS3* 蛋白在 R216 和 I217 之間的蛋白水解切點，而使 serine protease domain 無法脫離。此外，在爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統中突變的 *TMPRSS3*(G239A、T551C)蛋白所釋放 serine protease domain 是否仍具有活化 ENaC 的功能，也是我們將要探討的部份。的由於免疫組織染色用於辨識內質網的抗體其專一性並不高，故內質網於細胞內的所在位置並無法像高基式體般有特定的位置，儘管正常及突變的 *TMPRSS3*(G239A、T551C)融合蛋白與內質網共同表現，並無法指出正常及突變的 *TMPRSS3* 確實表現在內質網上，因此我們參考之前文獻(11)的實驗方法將利用 ER tracker 更專一性的標定細胞內 ER 的位置。

然而這也不能完全釐清 *TMPRSS3* 一定要在內質網上才能活化 ENaC。因此我們爾後將利用分生的技術選擇一段(Galactosyltransferase transmembrane domain)可以將蛋白停泊在高爾基體(Golgi)的 transmembrane domain (TM) 取代原本 *TMPRSS3* 的 TM 位置，建構好這取代的質體再送入細胞中或爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統中來探討其活化 ENaC 功能的影響，如此可進一步的釐清 *TMPRSS3* 是否一定要在內質網上才能活化 ENaC。

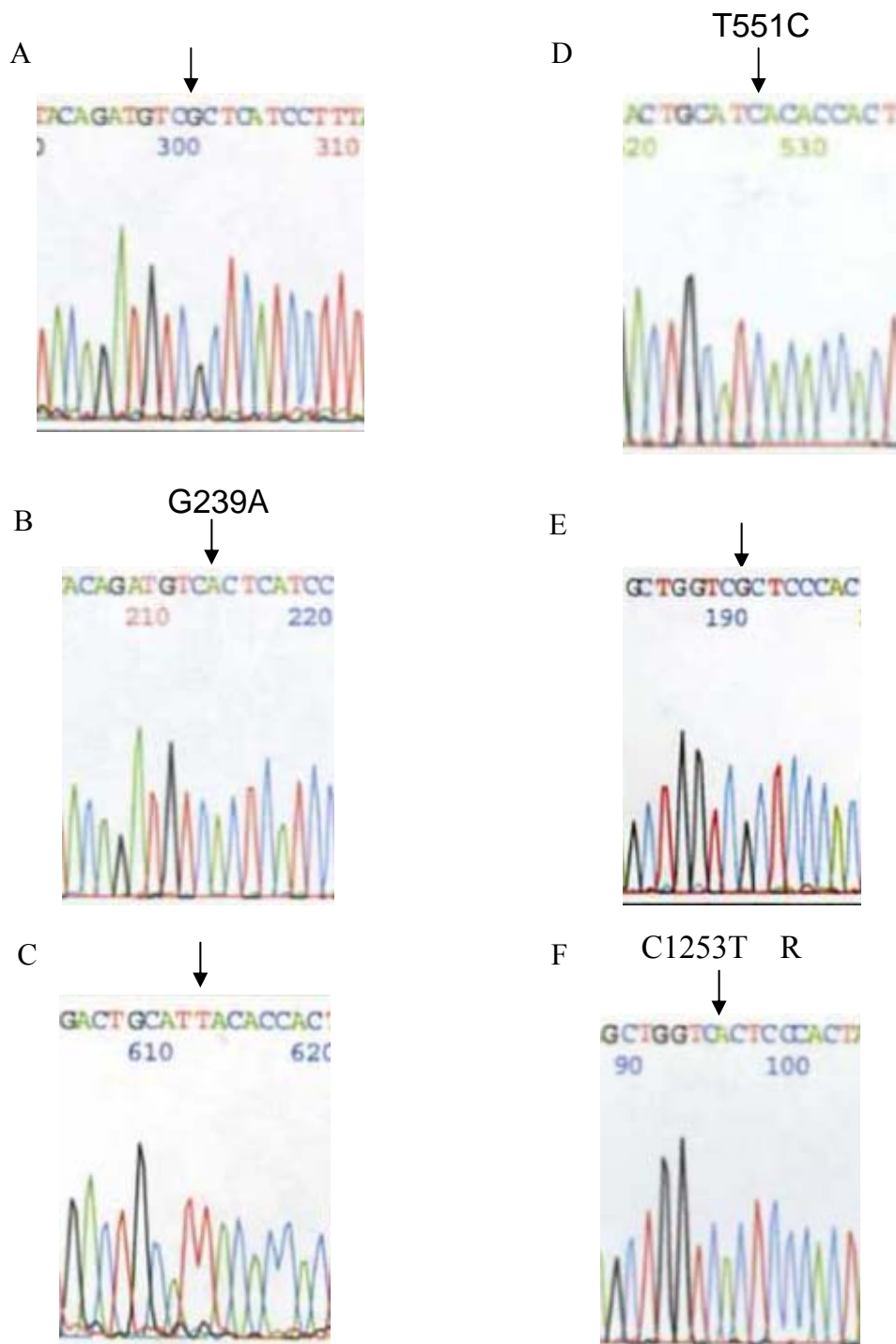
圖表



圖一(A) 從 HeLa cell 中抽取 RNA，進行 RT-PCR 反應。1: 以 forward primer(TMPRSS3-KpnI)、reverse primer(TMPRSS3R-XhoI) 夾得 *TMPRSS3* 全長，約 1.3kb。(B) 1: 用 primer(pF、pR) 夾 *TMPRSS3* 的 internal 片段，371bp。2: β actin(internal control)。(C) 將生長於 LB agar plate 上的菌落溶於 STE buffer 中，取出部份進行 colony PCR 反應。用 primer(pF、pR) 夾 *TMPRSS3* 的 internal 片段，371bp。若有做出與 positive 同等大小的產物，可初步顯示 insert 有可能有接入 vector 的 multiple cloning site。實驗結果顯示，編號 8、9 的樣本中皆有反應出與 positive(C+) 同樣大小的產物。c+: 7 μ l TMPRSS3+1 μ ld2H₂O。c-: negative。(D) 若 *TMPRSS3* 確實 clone 到 pGEM 上利用 pGEM-T easy vector 的 multiple cloning site 中的 EcoRI 做 enzyme mapping，可得 *TMPRSS3* 全長 1.3kb 以及 pGEM-T easy vector，3015bp。C: 用 EcoRI 所切的質體。UC: 未經酵素所切的質體。M⁻: 100bpM。M⁺: 1kbM

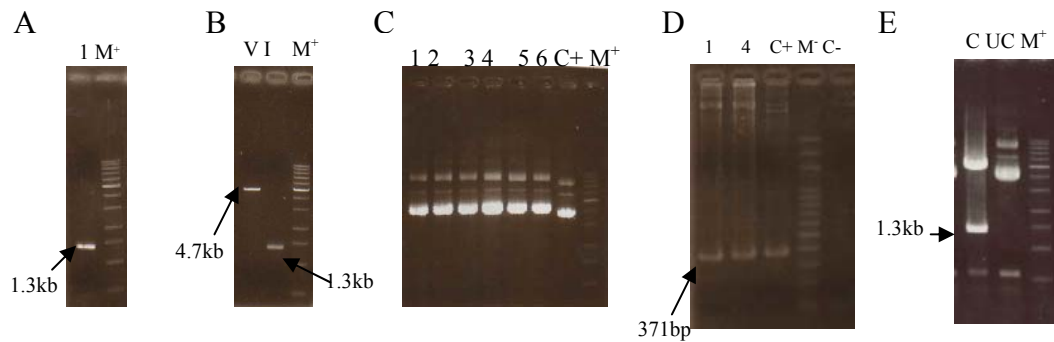


圖二(A) 1: 用 forward primer TMPRSS3-NcoI、reverse primer TMPRSS3R-XhoI 從 pGEM-TMPRSS3 質體中夾得 *TMPRSS3* 全長，約 1.3kb。(B) V: 用 NcoI、XhoI 切 pTLN-KCNQ4 得 pTLN，3.2kb。I: 用 NcoI、XhoI 切 pGEM-TMPRSS3 得 *TMPRSS3*，1.3kb。(C) 抽 pTLN-TMPRSS3 質體。2: pTLN-TMPRSS3-2，C+: pTLN-KCNQ4。(D) 若 *TMPRSS3* 確實 clone 至 pTLN 載體上，可利用 primer(pF、pR) 從 pTLN-TMPRSS3 質體中夾出 *TMPRSS3* 的 internal 片段，371bp。C-: negative。C+: positive。(E) 若 insert 有接入於 vector 內，且連接的限制酶酵素切點位置正確，則以 NcoI、XhoI 對此質體做切割，結果顯示可成功將 insert 和 vector 片段切下。UC: 未經酵素所切的質體。C: 用 NcoI、XhoI 所切的質體。M⁻: 100bpM。M⁺: 1kbM

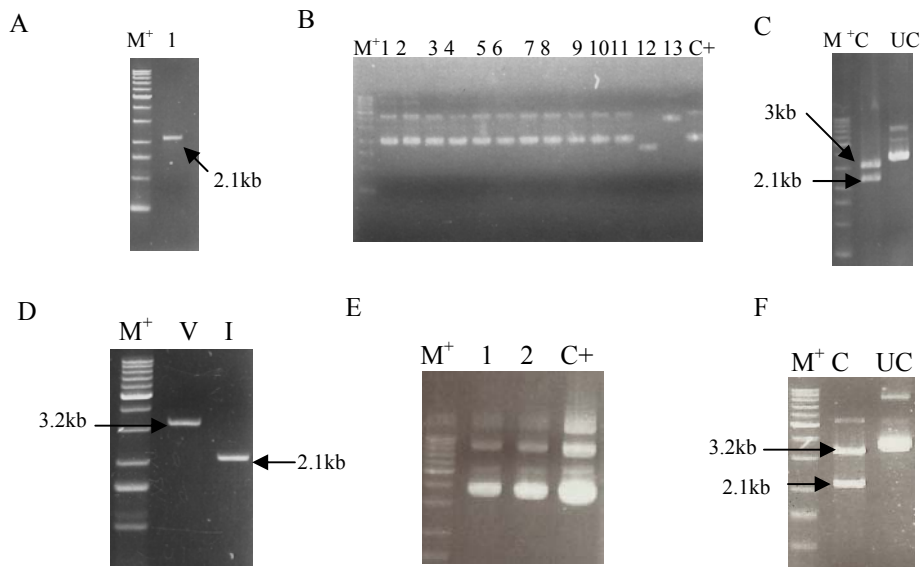


(圖三) *TMPRSS3* 在 pTLN-*TMPRSS3* 和 pEGFP-*TMPRSS3* 質體上的錯意突變點序列

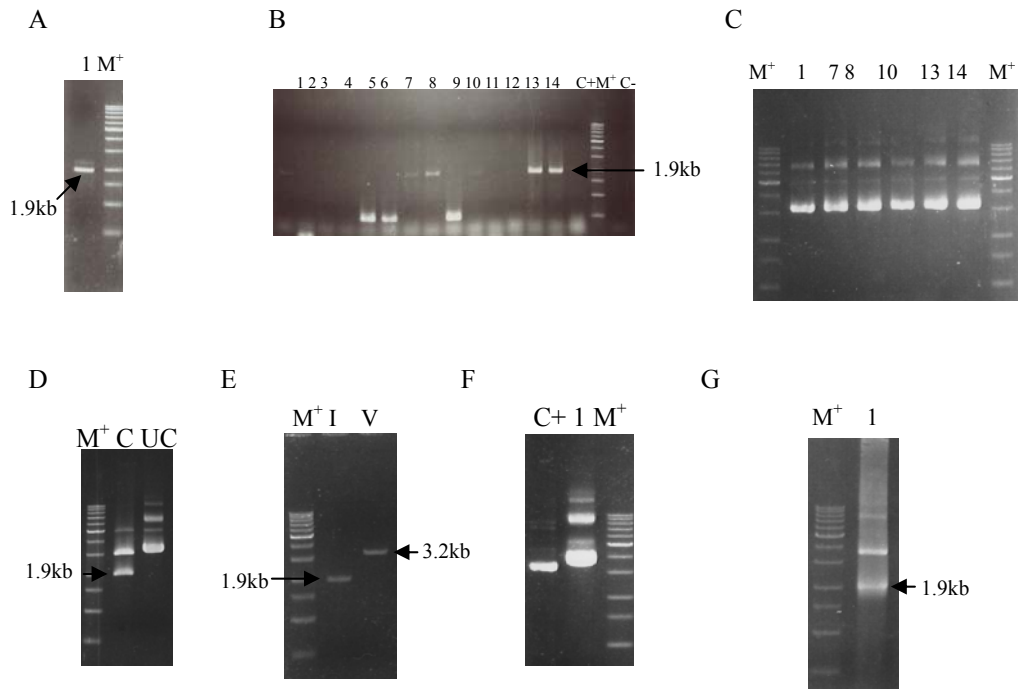
- A. *TMPRSS3* Exon4 239G 正常序列，箭頭所指即為突變點正常序列
- B. *TMPRSS3* Exon4 239G → A 突變序列，箭頭所指即為突變位置
- C. *TMPRSS3* Exon6 551T 正常序列，箭頭所指即為突變點正常序列
- D. *TMPRSS3* Exon4 551T → C 突變序列，箭頭所指即為突變位置
- E. *TMPRSS3* Exon12 1253C 正常逆向序列，箭頭所指即為突變點正常序列
- F. *TMPRSS3* Exon12 1253C → T 突變逆向序列，箭頭所指即為突變位置
(R：Reverse primer)，逆向引子



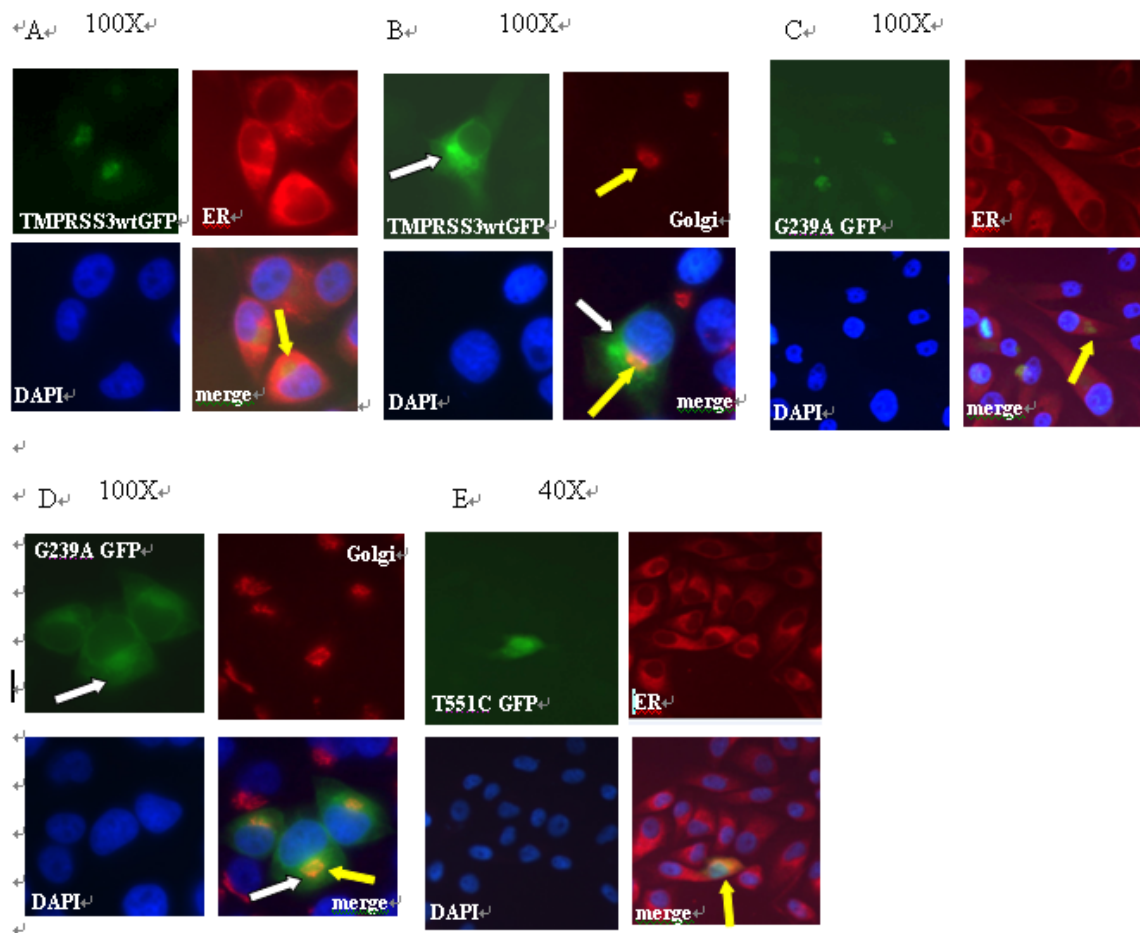
圖四(A)1:用 forward primer TMPRSS3-HindIII、reverse primer TMPRSS3R-SacII 從 pTLN-TMPRSS3 質體中夾得 *TMPRSS3* 全長,約 1.3kb。(B) V:用 HindIII、SacII 切 pEGFP-Cx29 得 pEGFP 約 4.7kb。I:用 HindIII、SacII 切 *TMPRSS3* PCR 產物得 *TMPRSS3*, 1.3kb。(C)抽 pEGFP-TMPRSS3 質體。1:pEGFP-TMPRSS3-1。C+:pEGFP-Cx29。(D) 若 *TMPRSS3* 確實 clone 至 pEGFP 載體上,可利用 primer(TMPRSS3-HindIII、TMPRSS3R-SacII)從 pEGFP-TMPRSS3 質體中夾出 *TMPRSS3* 的 internal 片段, 371bp。C-: negative。C+: positive。(E) 若 insert 有接入於 vector 內,且連接的限制酶酵素切點位置正確,則以 HindIII、SacII 對此質體做切割,結果顯示可成功將 insert 和 vector 片段切下。UC:未經酵素所切的質體。C:用 HindIII、SacII 所切的質體。M⁺:100bpM。M⁺:1kbM



圖五.(A)從 Rat kidney 中抽取 RNA,進行 RT-PCR 反應。1:以 forward primer(α -F)、reverse primer(α -R) 夾得 *ENaC- α* 全長,約 2.1kb。(B)抽 pGEM-*ENaC- α* 質體。1:pGEM-*ENaC- α* -1。C+:pGEM-T easy vector。(C) 若 *ENaC- α* 確實 clone 到 pGEM 上利用 pGEM-T easy vector 的 multiplecloning site 中的 EcoRI 做 enzyme mapping,可得 *ENaC- α* 全長 2.1kb 以及 pGEM-T easy vector, 3015bp。C:用 EcoRI 所切的質體。UC:未經酵素所切的質體。(D) 將 *ENaC- α* 從 pGEM-*ENaC- α* subclone 至 pTLN 載體上。V:用 NcoI、XhoI 切 pTLN-KCNQ4 得 pTLN 約 3.2kb。I:用 NcoI、XhoI 切 pGEM-*ENaC- α* 得 *ENaC- α* , 2.1kb。(E) 抽 pTLN-*ENaC- α* 質體。1:pTLN-*ENaC- α* -1, C+:pTLN-*ENaC- γ* 。(F) 若 *ENaC- α* 確實 clone 到 pTLN,且連接的限制酶酵素切點位置正確,則以 NcoI、XhoI 對此質體做切割,結果可得 *ENaC- α* 全長 2.1kb 以及 pTLN, 3.2kb。UC:未經酵素所切的質體。C:用 NcoI、XhoI 所切的質體。M⁺:100bpM。M⁺:1kbM



圖六(A) 從 Rat kidney 中抽取 RNA，進行 RT-PCR 反應。1:以 forward primer(γ -F)、reverse primer(γ -R)夾得 ENaC- γ 全長，約 1.9kb。(B)ENaC- γ 確實 clone 至 pGEM 載體上，可利用 primer(γ -F、 γ -R)從 pGEM-ENaC- γ 質體中夾出 ENaC- γ 全長，1.9kb。編號 1、7、8、10、13、14 的樣本中皆有反應出與 positive(C+)同樣大小的產物。C-: negative。C+: positive。(C) 抽 pGEM-ENaC- γ 質體。1: pGEM-ENaC- γ -1。(D)若 ENaC- γ 確實 clone 到 pGEM 上利用 pGEM-T easy vector 的 multiplecloning site 中的 EcoRI 做 enzyme mapping，可得 ENaC- γ 全長 1.9kb 以及 pGEM-T easy vector, 3015bp。C:用 EcoRI 所切的質體。UC:未經酵素所切的質體。(E) 將 ENaC- γ 從 pGEM-ENaC- γ subclone 至 pTLN 載體上。V:用 NcoI、XhoI 切 pTLN-KCNQ4 得 pTLN 約 3.2kb。I:用 NcoI、XhoI 切 pGEM-ENaC- γ 得 ENaC- γ ，1.9kb。(F) 抽 pTLN-ENaC- γ 質體。1: pTLN-ENaC- γ ，C+: pTLN-KCNQ4。(G) 1:利用 primer(γ -F、 γ -R)從 pTLN-ENaC- γ 質體中夾出 ENaC- γ 的全長，1.9kb。M:100bpM。M⁺:1kbM



圖七(A)pEGFP-TMPRSS3 wt 轉殖入 HeLa cells 內的表現左上圖為 TMPRSS3wtGFP 融合蛋白(綠色)；右上圖為內質網螢光染色(紅色)；左下圖為細胞核染色(藍色)；TMPRSS3wtGFP、內質網與細胞核 merge 在一起呈現在右下圖(如黃色箭頭所指)(B)pEGFP-TMPRSS3 wt 轉殖入 HeLa cells 內的表現左上圖為 TMPRSS3wtGFP 融合蛋白(綠色如白色箭頭所指)；右上圖為高基式體螢光染色(紅色如黃色箭頭所指)；左下圖為細胞核染色(藍色)；TMPRSS3wtGFP、高基式體與細胞核 merge 在一起呈現在右下圖(C)pEGFP-TMPRSS3 G239A 轉殖入 HeLa cells 內的表現左上圖為 TMPRSS3G239A-GFP 融合蛋白(綠色)；右上圖為內質網螢光染色(紅色)；左下圖為細胞核染色(藍色)；TMPRSS3G239A-GFP、內質網與細胞核 merge 在一起呈現在右下圖(如黃色箭頭所指)(D)：pEGFP-TMPRSS3 G239A 轉殖入 HeLa cells 內的表現左上圖為 TMPRSS3G239A-GFP 融合蛋白(綠色如白色箭頭所指)；右上圖為高基式體螢光染色(紅色如黃色箭頭所指)；左下圖為細胞核染色(藍色)；TMPRSS3G239A-GFP、高基式體與細胞核 merge 在一起呈現在右下圖(E)pEGFP-TMPRSS3 T551C 轉殖入 HeLa cells 內的表現左上圖為 TMPRSS3T551C-GFP 融合蛋白(綠色)；右上圖為內質網螢光染色(紅色)；左下圖為細胞核染色(藍色)；TMPRSS3T551C-GFP、內質網與細胞核 merge 在一起呈現在右下圖(如黃色箭頭所指)。

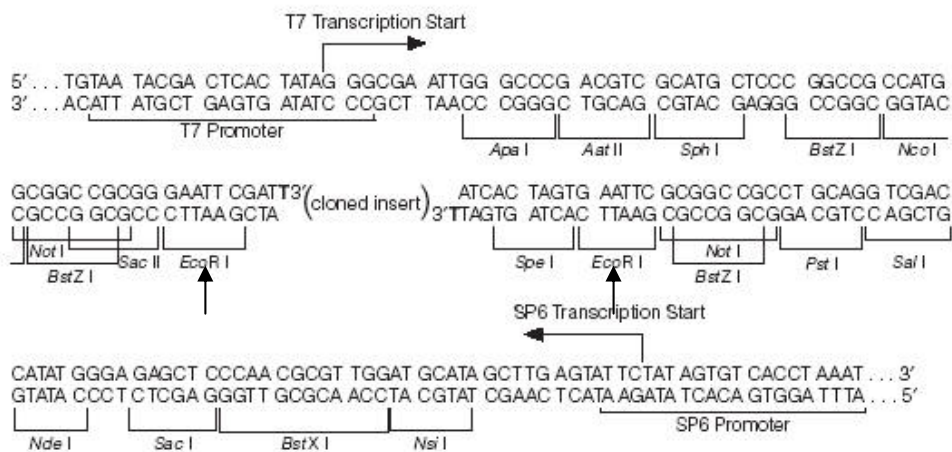
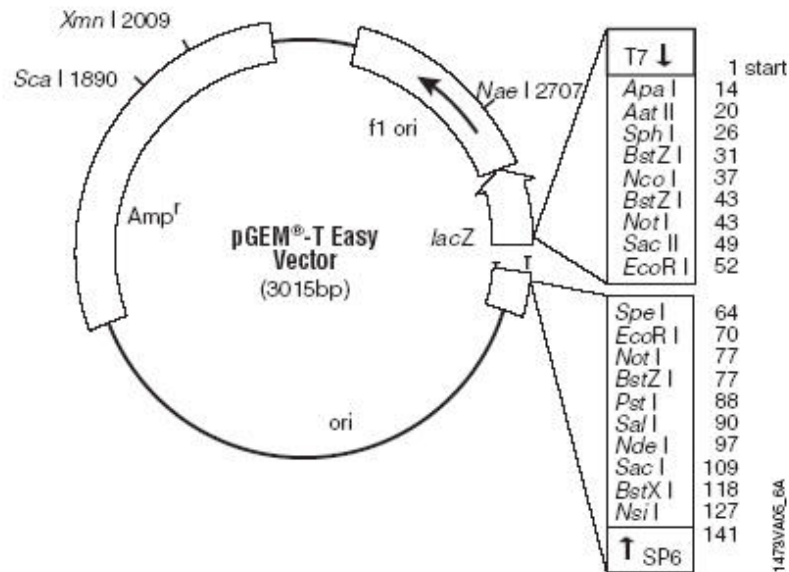
參考資料

- (1) Marazita, M.L., Ploughman, L.M., Rawling, B., Remington, E., Amos, K.S. and Nance, W.E. (1993) Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S school-age population. *Am. J. Med. Genet.* 46, 486-491.
- (2) Cohen, M.J. and Gorlin, R.J. (1995) *Epidemiology, Aetiology and Genetics Patterns* Oxford University Press, Oxford, UK.
- (3) Ben-Yosef, T., Wattenhofer, M., Riazuddin, S., Ahmed, Z.M., Scott, H.S., Kudoh, J., Shibuya, K., Antonarakis, S.E., Bonne-Tamir, B. and Radhakrishna U (2001) Novel mutations of *TMPRSS3* in four DFNB8/B10 families segregating congenital autosomal recessive deafness. *J. Med. Genet.*, 38, 396 -400
- (4) Hooper, J.D., Clements, J.A., Quigley, J.P. and Antalis, T.M. (2001) Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.*, 276, 857 -860
- (5) Lee, J., Park, D., Kim, S.Y. and Park, W.J. (2003) Pathogenic mutations but not polymorphisms in congenital and childhood onset autosomal recessive deafness disrupt the proteolytic activity of *TMPRSS3*. *J Med Genet.* 40:629-31.
- (6) Vuagniaux, G., Vallet, V., Jaeger, N.F., Pfister, C., Bens, M., Farman, N., Courtois-Coutry, N., Vandewalle, A., Rossier, B.C. and Hummler, E. (2000) Activation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by the serine protease mCAP1 expressed in a mouse cortical collecting duct cell line. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 828-834.
- (7) Guipponi, M., Vuagniaux, G., Wattenhofer, M., Shibuya, K., Vazquez M, Dougherty, L., Scamuffa, N., Guida, E., Okui, M., Rossier, C., Hancock, M., Buchet, K., Reymond, A., Hummler, E., Marzella, P.L., Kudoh, J., Shimizu, N., Scott, H.S., Antonarakis, S.E. and Rossier, B.C. (2002) The transmembrane serine protease (*TMPRSS3*) mutated in deafness DFNB8/10 activates the epithelial sodium channel (ENaC) in vitro. *Human Molecular Genetics*, 11(23): 2829-36
- (8) Guipponi, M., Vuagniaux, G., Wattenhofer, M., Shibuya, K., Vazquez, M., Dougherty, L., Scamuffa, N., Guida, E., Okui, M., Rossier, C., Hancock, M., Buchet, K., Reymond, M., Hummler, E., Marzella, P.L., Kudoh, J., Shimizu, N., Scott, H.S., Antonarakis, S.E., and Rossier, B.C. (2002) The transmembrane serine protease (*TMPRSS3*) mutated in deafness DFNB8/10 activates the epithelial sodium channel (ENaC) in vitro. *Hum Mol Genet.* 11(23):2829-36

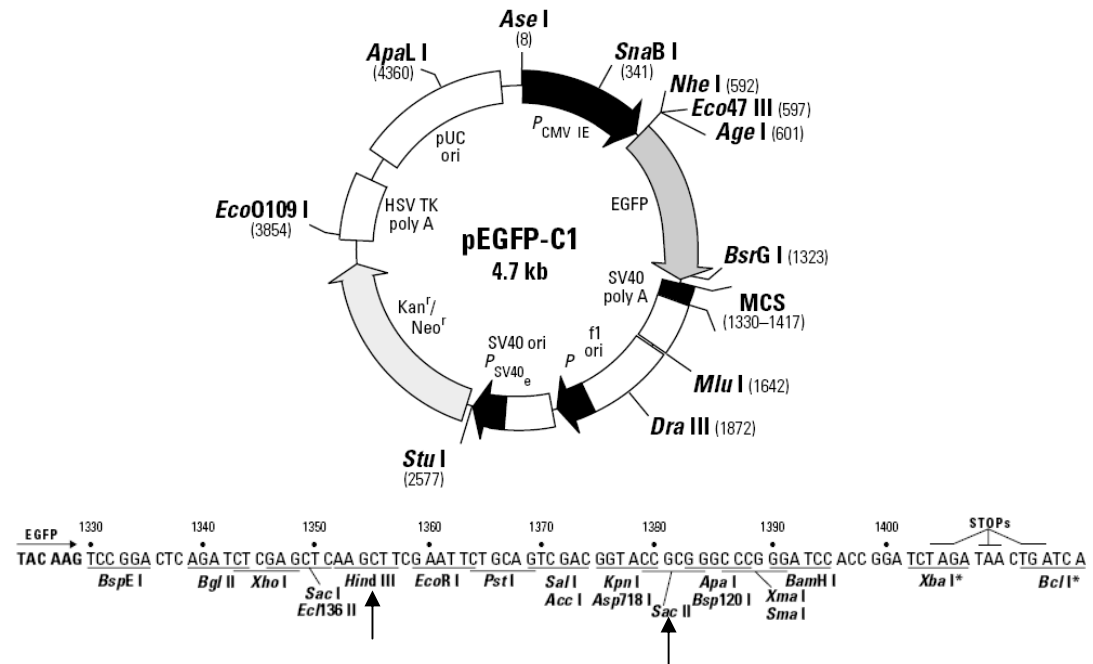
- (9) Wattenhofer, M., Sahin-Calapoglu, N., Andreasen, D., Kalay, E., Caylan, R., Braillard, B., Fowler, J.N., Reymond, A., Rossier, B.C., Karaguzel, A. and Antonarakis, S.E. (2005) A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein. *Hum Mol Genet.* 117(6):528-35.
- (10) Cecilia, M.C., Laurent, S., Gary, B., Bernard, T., Ivan, G., Jran-Daniel, H. and Bernard, C.R. (1994) Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367, 463 - 467
- (11) Hanwell, D., Ishikawa, T., Saleki, R. and Rotin, D. (2002) Trafficking and cell surface stability of the epithelial Na⁺ channel expressed in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.*, 277, 9772–9779.

Appendixes

Promega



附圖一、pGEM-T Easy Vector 載體以及其 multiple cloning site 上限制酶酵素的位
置。建構 *TMPRSS3* 基因於此載體上，使用 EcoRI(黑色箭頭所指)、切點。



附圖二、pEGFP-N1 載體以及其 multiple cloning site 上限制酶酵素的位置建構 *TMPRSS3* 基因於螢光表現載體上，使用 HindIII、SacII(黑色箭頭所指)切點。

附表一、PCR ENaC 之 α 、 β 和 γ subunits 所使用的 primer

Primer 名稱	Sequence
α ENaC F	5' TTACCATGGAT ATGCTGGACCACACCAG 3'
α ENaC R	5' ATTCTCGAG TCAGAGCGCCGCCAGGG 3'
β ENaC F	5' AATGTCGAC ATG CCA GTG AAG AAG TACCTG 3'
β ENaC R	5' ATTCTCGAGCTAGATGGCCTCCACCTCG 3'
γ ENaC F	5' TTA CCATGGATGGCGCCTGGAGAGAAGA 3'
γ ENaC R	5' ATTCTCGAGTTACAACCTCATTGGTCAACTGA 3'

附表二、*TMPRSS3* 點突變所使用的 primer

Primer 名稱	Sequence
TMPRSS3 239G→A F	5'-GACTGCTCAGGGAAGTACAGATGTCACCTCATCC-3'
TMPRSS3 239G→A R	5'GGATGAGTGACATCTGTACTTCCCTGAGCAGTC-3'
TMPRSS3 551T→C F	5'CCAGATGACAAGGTGACTGCATTCACACCACTCAG-3'
TMPRSS3 551T→C R	5'CTGAGTGGTGTGATGCAGTCACCTTGTCACTCTGG-3'
TMPRSS3 1253C→T F	5'GTGGAAGTTAGTGGGAGTGACCAGCTTTGGC-3'
TMPRSS3 1253 C→T R	5'GCCAAAGCTGGTCACTCCCACTAACTTCCAC-3'

