

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 利用全胚胎原位核酸雜交來偵測注射 gsk3 反義核酸 *
* : 之胚胎中, Wnt/ -catenin 可能之下游目標基因之表 *
* 名 稱 現量與表現位置之變化 *
* ***** *

執行計畫學生： 鄭鈺錡
學生計畫編號： NSC 97-2815-C-040-004-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： 蔡振寧

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 元培科技大學醫學檢驗生物技術系

中華民國 98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

計畫名稱：

利用全胚胎原位核酸雜交來偵測注射 *gsk3 β* 反義核酸之胚胎中，Wnt/ β -catenin 可能之下游目標基因之表現量與表現位置之變化

執行計畫學生：鄭鈺錡

學生計畫編號：NSC: 97-2815-C-040-004-B

研究期間：97年7月1日至98年2月底止，計8個月

指導教授：蔡振寧

執行單位：中山醫學大學醫技系

中華民國 98年 3月 26日

(一)摘要

肝糖合成酶激酶 3(Glycogen synthase kinase 3, 以下簡稱 GSK3)與許多細胞的生理功能，如細胞分化、生長、運動及自戕均有關連；在哺乳類動物中，至少存在二個 GSK3 之同功酶，即 GSK3 α 及 GSK3 β 。其中 GSK3 β 的一個重要角色就是在 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑中是扮演一個負向調控者。我們之前的研究發現，將斑馬魚 *gsk3 β* 之基因以注射反義核酸(morpholino)方式抑制其轉譯，則將導致心臟、神經系統等部位之畸形發育，為了了解上述缺失所產生之相關機制，因此本研究想使用全胚胎原位核酸雜交(whole-mount *in situ* hybridization)來分析已知文獻中發表的 Wnt/ β -catenin 之下游目標基因，觀察其在 *gsk3 β* 基因轉譯受抑制下，其在斑馬魚胚胎之基因表現量及空間分佈上之變化。目前我們共篩選到七個因抑制 *gsk3 β* 基因轉譯而活化 Wnt/ β -catenin 訊息體傳遞路徑的下游目標基因，並觀察其在胚胎中空間位置上之變化。此項資料將有助於了解 *gsk3 β* 基因在斑馬魚胚胎發育時期所扮演的角色，並有助於了解當 *gsk3 β* 基因無法表現時，斑馬魚胚胎所出現之發育上缺失的相關機制。

(二)研究動機與研究問題

1.肝糖合成酶激酶 3 之基本介紹

肝糖合成酶激酶 3 (Glycogen synthase kinase 3, 以下簡稱 GSK3)是一種可將蛋白質內 serine 或 threonine 胺基酸磷酸化的蛋白質激酶。它最早發現是被發現與胰島素相關的肝糖代謝有關，後續之研究陸續發現它與許多細胞的生理功能，如細胞分化、生長、運動及自戕(apoptosis)均有關連。GSK3 的同源基因廣泛存在於各種真核生物中，它們彼此間的蛋白質序列相似度均很高，尤其是在蛋白質激酶部分，均有九成以上。在哺乳類動物中，至少存在二個 GSK3 之同功酶(isoform)，即 GSK3 α 及 GSK3 β ，兩者在蛋白質激酶部分之蛋白質序列相似度高達 98%，比較大的差異在於 GSK3 α 之 N 端較長；而二者之 C 端變異性也高。GSK3 的受質相當的多，其中的 β -catenin，是相當知名 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑中的一員。當 Wnt 還未結合至細胞表面的 Frizzles 受質與 LRP5/6 共受體時，細胞內 Axin、APC 及 GSK3 β 會形成一個複合物而將 β -catenin 磷酸化，而導致 β -catenin 連接上 ubiquitin，而送至 proteasome 分解掉。但當 Wnt 結合至受體後，便會經由一種尚不完全了解機制(其中可能牽涉到 dishevelled 及 GBP 蛋白質)，將上述 Axin, APC 及 GSK3 β 複合物分離，並抑制 GSK3 β 活性，因此 β -catenin 磷酸化程度便會下降，也就較不會被分解掉，最後在細胞質內的濃度便會漸漸上升，然後移動至細胞核內與 Tcf/Lef 轉錄因子結合而活化下游目標基因的轉錄。因此 GSK3 β 在 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑中是扮演一個負向調控的角色(參考較新的 review, Forde and Dale et al., 2007)。

二.斑馬魚之 GSK3

斑馬魚是近年來一個相當受矚目的動物模式，它具有體積小，性成熟期短(約三個月)，體外授精，胚胎發育時間快(授精後24小時內便具有大部分器官之雛形)，蛋殼為透明(易於觀察)等各方面之優點(Hsu et al., 2007)。本實驗室已將斑馬魚GSK3家族基因，*gsk3 α* 及*gsk3 β* 基因選殖出來，並發現兩者在胚胎發育時期有著不同的基因表現方式(Tsai et al., 2000)。接下來，與台大分子細胞所蔡懷楨教授合作，發現*gsk3 α* 及*gsk3 β* 基因對於斑馬魚心臟之形成有不同之影響，如果將*gsk3 α* 之基因以注射反義核酸(Morpholino)方式抑制其轉譯，則將導致胚胎進入嚴重的細胞自戕狀態，而使心臟無法發育完全；而以同樣技術來抑制*gsk3 β* 基因之轉譯，則發現心臟無法正確完成偏左之動作(looping)而產生畸形之心臟，而*gsk3 β* 的這種效應，乃是因為過度活化Wnt/ β -catenin訊息傳遞路徑所致(Lee et al., 2007)。除此之外，我們還發現抑制*gsk3 β* 基因轉譯之斑馬魚胚胎，其神經系統及身體軀幹尚有許多其他器官發育上之缺失(未發表)。為了了解上述缺失所產生之相關機制，我們也將正常的胚胎與*gsk3 β* 基因轉譯被抑制之胚胎之RNA萃取出來，作晶片分析(Microarray analysis)；結果發覺許多先前預測之Wnt/ β -catenin下游基因，並未完全能在晶片分析中看到其變化。由於晶片分析主要提供的是量上面的變化，基因在胚胎空間上的分佈則無法得知，因此我想使用全胚胎原位核酸雜交(whole-mount *in situ* hybridization)來分析，可能的Wnt/ β -catenin下游目標基因，看它們在*gsk3 β* 基因轉譯受抑制下，在斑馬魚胚胎之基因表現量及空間分佈上之變化。

我主要想研究的方向如下：

第一、搜尋可能成為斑馬魚 Wnt/ β -catenin 下游的目標基因：

(A) 先以已發表文獻中哺乳類之 Wnt 下游目標基因作參考(Wnt homepage)，搜尋 Ensembl 資料庫中斑馬魚同源基因之啟動子區域，是否存在至少一個 Tcf/Lef 結合位，作為後續篩選目標基因變化之依據(結果見表一)。

第二、利用全胚胎原位核酸雜交來偵測注射 *gsk3 β* 反義核酸(Morpholino)之胚胎，其目標基因在表現量及表現位置之變化

篩選之胚胎時期，要視其目標基因表現之型式而定。如果目標基因之基因表現還不清楚，可能先選擇在授精後 12 小時(體節期早期)及 24 小時(體節期晚期)之胚胎來觀察(結果見表一)。

(三)文獻回顧與探討

由於 GSK3 β 之受質眾多，除了 β -catenin 尚有許多轉錄因子會被 GSK3 β 磷酸化，如 c-Jun (de Root et al., 1993)、c-myc (Sears et al., 2000)、CREB (Tullai et al., 2007)、NFATc (Beals et al., 1997)及 HSF-1 (Xavier et al., 2000)等。除此之外也有文獻報導 GSK3 β 也參與在 Hedgehog 訊息傳遞路徑中，它可磷酸化 Ci155 而使之加上 ubiquitin，最後導制它的分解而抑制訊息之傳遞(Jia et al., 2002; Price et al., 2002)。因此在觀察因抑制 *gsk3 β* 基因轉譯之胚胎的基因變化時，必須小心的將這些不同的路徑變化分割出來。

自從第一個 Wnt/ β -catenin 的下游目標基因 Engrailed 在果蠅身上被鑑定出來，迄今已有二十年 (DiNardo et al., 1988)。目前學界用來尋找 Wnt/ β -catenin 的下游目標基因主要有兩種方法；第一類早期主要是利用 Serial analysis of gene expression (Velculescu et al., 1995)及 Differential RT-PCR (Liang et al., 1992)來比較正常細胞與受刺激細胞間基因之變化，最近較為流行的方式則是使用基因晶片(microarray)來分析，晶片分析的主要優點就是除了直接的下流基因變化可觀察到外，間接的下流目標基因的改變也可偵測到。

第二類則是利用生物資訊方式(Altschulet al., 1990)或者實驗技術來鑑定，下游目標基因的啟動子區域是否含有 Tcf/Lef 結合位。上述實驗技術主要必須使用到染色體沉澱(Chromatin immunoprecipitation)技術，然而利用斑馬魚胚胎來執行染色體沉澱之技術尚未成熟，目前只有一篇文獻發表(Havis et al, 2006)，而且目前似乎也找不到可用的抗斑馬魚 Tcf 抗體，因此在本計劃內是不會採用染色體沉澱技術來確認這些目標基因的。關於晶片分析之方式，我們實驗室的确也有曾使用此技術來分析受精後二十四小時後的正常胚胎與基因注射 *gsk3 β -MO* 胚胎之間基因表現的變化。雖然的确有找到幾個較新穎的基因有變化，但是大部分的結果並未如預期，尤其是幾個主要應該發生變化的基因，在晶片分析中在兩組分析中完全沒有差別。譬如在之前研究中，我們利用全胚胎原位核酸雜交觀察到 *bmp4* 基因之表現形式，無論是在基因強度或基因分布的空間位置上，注射 *gsk3 β -MO* 胚胎均有明顯的變化(Lee at al., 2007)；但是利用晶片分析甚至 RT-PCR 卻完全沒有差別。所以我們想改變策略，先將斑馬魚的可能存在之 Wnt/ β -catenin 下游目標基因做啟動子區域的分析，剔除較不可能的基因，然後再利用全胚胎原位核酸雜交來分析，希望能找到相關的 Wnt/ β -catenin 目標基因。

(四)研究方法及步驟

1.生物資訊分析法

要觀察哪一些是 Wnt/ β -catenin 訊息體傳遞的目標基因，最簡單的方式就是利用 BLAST 程式去搜尋各基因上游啟動子區域是否包含有 Tcf/lef 結合序列:5'-A/T A/T CAA A/T G-3'(van De et al.,1991; Korinek et al.,1997)。但為了簡化步驟，我們初期先以已發表在文獻上之基因為主，這些通常是以人類或小鼠細胞株所取得的資料(參考史丹福大學 Roel Nusse 教授之 Wnt 網頁，<http://www.stanford.edu/~ronusse/pathways/targets.htm>)。首先至 Ensembl 網(http://www.ensembl.org/danio_rerio/index.html), [zv7](#))尋找斑馬魚之同源基因，比較其 cDNA 及 genomic DNA 序列之可能轉錄起始點上游 2000 bp，然後搜尋可能之 Tcf/Lef 結合位，另外若基因之轉譯起始位(ATG)不在第一個外顯子(Exon)的話，其上游之內含子(Intron)也列入搜尋之範圍。最後將存在 Tcf/Lef 結合位之斑馬魚基因啟動子列表，並依其具有上述結合位之數目來排序。

2.斑馬魚的觀察、飼養與微注射

斑馬魚(AB stain)之飼養須依照標準方式(Westerfield et al., 2000)飼養在 28.5°C(\pm 0.5°C)之魚缸中，光週期 14 小時，暗週期 10 小時，其胚胎分期係依照 Kimmel et al.(1995)。微注射過程是使用 Nanojet II (Drummond, Inc.)微注射器，將斑馬魚 1 至 4-cell 胚胎注射 4 or 6 ng 之 *gsk3 β* -morpholino (序列為 5'-GTTCTGG GCCGACCGGACATTTTT C-3'，加底線處為與 ATG 互補之位置，Genetools, Inc.)(Lee et al.,2007)，注射體積為 2.3 nl。

3.全胚胎原位核酸雜交(whole-mount *in situ* hybridization)

為了要觀察目標基因在注射 *gsk3 β* -MO 之胚胎內，其基因在不同時期及不同位置之分佈是否有任何改變，因此必須針對上述有可能成為 Wnt/ β -catenin 下游之目標基因執行核酸雜交之分析，步驟主要參考 Jowett (2001)。

a. DIG-標定之探針製作

上述各類可能成為斑馬魚 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞路徑目標基因探針的 clone 之取得係依照下列三種方式：1. 寫信向原作者索取；2. 至 Zfin 網站上 (<http://zfin.org>) 搜選斑馬魚該同源基因，是否已經有可用之探針，如果有的話，就依照其序列，設計 primer pair，利用 RT-PCR 方式放大出來，再選殖至 pGEM-T-easy 載體內；3. 自行設計。標定 Digoxigenin (以下簡稱，DIG)之反義 RNA 探針製作方法如下：使用線性化的載體，或以適當的 primer pair 放大之基因片段(如基因片段已選殖至 pGEM-T-easy 者，可以 T7/Sp6 primer pair 放大)作為模板，加入適量 RNase 抑制劑、100 mM DTT、5x 轉錄緩衝液、10 x DIG RNA 標定液及適當的 RNA polymerase (T7, Sp6 or T3)，混合均勻後在 37°C 反應兩小時，然後再加入 2 ul RNase-free DNase I 反應 15 分鐘，最後再加入 2 ul 4 M LiCl 及三倍體積

酒精，執行酒精沉澱。在-20°C反應 30 分鐘後，在 4°C 以 12,000 x g 離心 15 分鐘後，再以 75%酒精清洗一次，最後重溶於 30 ul DEPC-處理之二次水中，取適當量執行電泳分析其大小後，其餘 DIG-RNA probe 則加入等體積之 formamide，儲存於-20°C 中。

b. 胚胎分析前之處理

要分析之胚胎，先以固定液(4% paraformaldehyde, 溶於 PBS 中)固定於 4°C 中隔夜反應。接下來在解剖顯微鏡下，以攝子(Watchman forcep)將其卵殼剝除，然而再以甲醇清洗 3 次(每次 5 分鐘)，最後儲存於甲醇，冰在-20°C 中。

c. 原位核酸雜交步驟

將胚胎由-20°C 中取出，經由一連串的不同濃度的甲醇與 PBST (PBS+0.1% Tween 20)(75% 甲醇/25%PBST, 50% 甲醇/50%PBST, 25% 甲醇/75%PBST)之溶液置換(每次 5 分鐘)，最後將固定之胚胎由甲醇置換至 PBST 中，然後利用 proteinase K (10 ug/ml 溶於 PBST 中，將胚胎作部分水解(24 pfh 時前，不需水解；24 pfh, 5-10 分鐘；36 pfh, 50-60 分鐘；48 pfh, 1.5 小時)水解完成後，以 PBST 溶液清洗二次，再使用上述固定液反應 30-60 分鐘。固定完後，以 PBST 溶液清洗三次，先加入核酸雜交液 Hyb⁻(50% formamide, 5x SSC, 0.1%Tween20, pH 6.7)置於 68°C，反應 5 分鐘；然後再加入雜交液 Hyb⁺(雜交液 Hyb⁻加上 500 ug/ml yeast RNA 及 50 ug/ml heparin)置於 68°C，反應至少 2 小時以上。DIG 標示之 RNA 探針加入新鮮的雜交液 B 中(2 ul/300 ul 雜交液 Hyb⁺)，在 84°C 反應 5 分鐘後，立刻置於冰上，3 分鐘後 spin down。再將前述已反應 2 小時胚胎中雜交液 Hyb⁺置換掉，加入含 DIG-標示 RNA 探針之 Hyb⁺。然後在 68°C 中反應隔夜。隔天將含探針之雜交液 Hyb⁺取出，然後以下述溶液浸泡在 68°C 每次反應 10 分鐘(75% 雜交液 Hyb⁻/25% 2 x SSC, 50% 雜交液 Hyb⁻/ 50% 2 x SSC, 25% 雜交液 Hyb⁻/75% 2 x SSC)。接下來使用 0.2 x SSC 清洗未結合的探針，共計二次，每次在 68°C 反應 30 分鐘。接下來，使用下述溶液將胚胎浸泡在溫室中，每次反應 5 分鐘(75% 0.2 x SSC/25% PBST, 50% 0.2 x SSC/50% PBST, 25% 0.2 x SSC/75% PBST 及 100% PBST)，當胚胎完全浸泡在 PBST 中後，加入 blocking 緩衝液(2 mg/ml BSA, 2% sheep serum 溶於 PBST 中)在室溫下反應至少 2 小時，接下來加入抗-DIG alkaline phosphatase (以 blocking 緩衝液稀釋 5000 倍)，在 4°C 輕輕搖晃反應隔夜。隔天利用 PBST 清洗胚胎共八次，每次在室溫下輕輕搖晃反應 15 分鐘。接下來再以 alkaline phosphatase 反應液(100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween20)，先清洗胚胎三次，每次 5 分鐘，最後加入反應受質，每 1 ml 反應液中(4.5 ul 的 75 mg/ml NBT, 3.5 ul 的 50 mg/ml BCIP)，在暗處反應數小時，每一小時觀察一次，直至適當訊號出現。染色後之胚胎觀察與照相是使用解剖顯微鏡(SMZ800, Nikon)或是正立相位差顯微鏡(Axioskop2, Zeiss)。

(五)結果與討論

目前已經篩選到 25 個斑馬魚基因的啟動子具有典型的 TCF/LEF 結合位如表一，針對這些有可能成為 Wnt/ β -catenin 下游之目標基因執行核酸雜交的分析，本次實驗經選殖得到可供製造 DIG 標示之 RNA 反義探針，包括: *axin2*、*dkk1*、*sp5l*、*cdx4*、*bmp4*、*ccnd1*、*myf5*、*myf6*、*cx52.6*、*cx27.5*、*fgf6a* 等，其他探針也繼續進行實驗中。

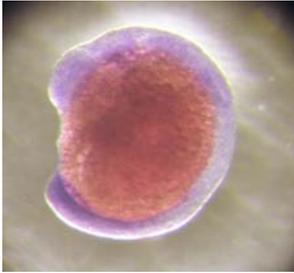
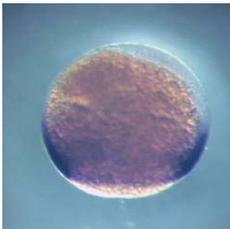
直接活化 Wnt 訊息傳遞使下游基因的表現量增加，測定 RNA 變化可使用 Northern blot 或是 RT-PCR，但是本次實驗希望直接在胚胎上觀察其分佈，所以我們利用半定量的方法 whole-mount *in situ* hybridization 來觀察在不同時段不同胚胎時期 RNA 的表現變化量，使用此方法有另一個優點就是，必須量的變化非常明顯才能觀察到。由於篩選胚胎時期，要視其目標基因表現型式而定，我們分別選擇 75% epiboly、體節時期及授精後 24 小時的胚胎來觀察。

先將斑馬魚的可能存在之 Wnt/ β -catenin 下游目標基因做啟動子區域的分析，剔除較不可能的基因，所找到相關的 Wnt/ β -catenin 目標基因如表一，然後再利用全胚胎原位核酸雜交分析，在實驗結果裡，其中 *cdx4*、*sp5l*、*axin2* 為 Positive control，因為根據文獻報告在斑馬魚身上已確認是 Wnt 的下游基因，經由注射 *gsk3 β* -MO 後和控制組相比，其 RNA 變化量明顯的上升，這是因為抑制 *gsk3 β* 基因轉譯而活化 Wnt/ β -catenin 訊息體傳遞，而導致它的下游基因表現量有增加。另一個基因 *ccnd1*，雖然在其他脊椎動物內已證明它是 Wnt 訊息傳遞之目標基因，但在斑馬魚身上尚未有較確定之資料，我們在結果裡，也可發現注射 *gsk3 β* -MO 之後有些微的上升。在觀察 *bmp4* 基因的控制組及實驗組之後，我們也發現到其表現在 *gsk3 β* -MO 之胚胎中有變化。另外提到的是與肌肉發育相關的基因 *myf5*，根據我們所述的實驗方向所篩選出一個可能成為 Wnt pathway 的目標基因，在注射 *gsk3 β* -MO 之後與控制組相比較，發現 *myf5* 表現位置和強度並無很大差異，我們推論在斑馬魚胚胎內 *myf5* 可能不是 Wnt 訊息傳遞的下游基因。

雖然目前尚未有發現有較新穎的 Wnt 下游基因，但是由於手邊收及或選殖之探針陸續到位，相信之後還是可能會有新的發現。在執行本計劃後，我們還希望後續能藉由過度表現 Wnt 及 *dkk1*(Wnt 抑制劑)，來確認上述有變化基因之表現型式，希望未來也能發展在斑馬魚胚胎，執行 CHIP 之分析以確認上述基因，確有 Wnt/ β -catenin 訊息傳遞之直接目標基因。

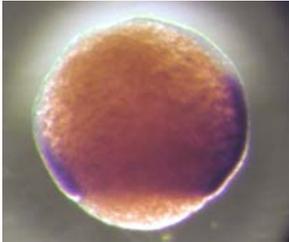
表一 Zfish wnt downstream target gene

Gene Accession Number	Position ^a	Tcf/Lef site ^b	WISH result	Comment
<i>axin2</i> NM_131561	-1804 -1541 -1292 -710 -527 -270 -40 +317 +338 +729 +741 +1124 +1319 +1393	TTCAATG **CTTTGCC *TGCAATG *CATTGCA *CTCAAAG CTTTGAT CTTTGAT CTTTGAT CTTTGAA TACAAAG CTTTGTA CTTTGAT *CACAAAG *CTTTGTG	Ctl  <i>gsk3β</i> -MO 	已在斑馬魚中證明為 Wnt/ β -catenin 之下游目標基因 (Weidinger et al., 2005)
<i>bmp4</i> NM_131342	-1380 -1353 -1343 -1056 -946 -444 -85 -59	*CTTTGGT *TGCAAAG *GCCAAAG *CTTTGCA TTCAAAG *GCCAAAG CTTTGTA *CTCAAAG	ctl  <i>gsk3β</i> -MO 	其基因之表現型式在 <i>gsk3β</i> -MO 之胚胎中有變化 (Lee et al., 2007)

<p><i>cyclind1</i> NM_131025</p>	<p>-1892 -1880 -1668 -1557 -1192 -721 -540 -247</p>	<p>*CTTTGTC *TGCAAAG CATTGTT *CTTTGTC *CTTTGTC TACAAAG *CATTGGT TTCAATG</p>	<p>ctl</p>  <p><i>gsk3β</i>-MO</p> 	
<p><i>c-jun</i> NM_199987</p>	<p>-1807 -1439 -1364 -1006 -933 -335</p>	<p>*CTTTGTG AACAAAG *CTTTGAC *CTTTGTG **CTTTGGC CTTTGTA</p>		
<p><i>c-myc</i> NM_131412</p>	<p>-1490 -1302 -1250 -1205 -378 -373 -183</p>	<p>*CACAAAG *CTTTGGA *CTTTGAC *GTCAATG *CATTGCA **CATTGCG **CTTTGGG</p>		
<p><i>cdx4</i> NM_131109</p>	<p>-1971 -1899 -1552 -935 -883 -806 -750 -714 -591 -224</p>	<p>CTTTGTA CATTGAT *CTTTGCA AACAAAG *CATTGAC CTTTGTA TACAAAG *AGCAAAG ATCAAAG **CTTTGCC</p>	<p>ctl</p>  <p><i>gsk3β</i>-MO</p> 	
<p><i>connexin52.6</i> NM_212819</p>	<p>-1935 -1844 -1833 -1790 -1601</p>	<p>*CATTGTG *CACAAAG TTCAAAG ACAATG *CATTGTC</p>	<p>正執行中</p>	

<i>connexin52.6</i> NM_212819	-1573 -1494 -1173 -1128 -987 -653 -633 -515 -419 -361 -286	*CATTGGT TTCAAAG CATTGAA CATTGTT *CATTGTG *TCCAAAG AACAAAG ATCAATG **CATTGGC *CTTTGAC CATTGTA	正執行中	
<i>connexin27.5</i> NM_131811	-1989 -1672 -1128 -1010 -973 -816 -389 -311 -196 -174	CTTTGAA CTTTGTA TACAATG AACAAAG CTTTGAT **CTTTGCC *CATTGTC *GTCAATG *CATTGTG **CATTGGC	正執行中	
<i>dennd4a</i> NM_001080989	-1921 -1029 -395	ATCAAAG ATCAAAG TTCAAAG		
<i>dkk1</i> NM_131003	-1821 -1689 -1576 -1532 -1514 -1501 -1402 -1352 -996 -961 -863 -394 -356 -148 -128	**CGCAATG TACAATG ATCAAAG *CTTTGGA AACAAAG *GACAAAG ATCAAAG CTTTGAA CTTTGAT TTCAAAG TTCAATG TTCAAAG CTTTGAT CTTTGAA CTTTGTT	ctl  <i>gsk3β</i> -MO 	
<i>fgf4</i> NM_131635	-1936 -1713 -451	CTTTGTT CTTTGAA CTTTGAA		
<i>fgf6</i> NM_001001398	-1708 -1376 -913 -559 -261	**GGCAAAG *TGCAAAG *CTTTGCT **CTTTGGG ATCAAAG	正執行中	
<i>foxN1</i> NM_212573	-1711	CTTTGAA		

<i>gastrin1</i> XM_690581	-1384 -1161	AACAAAG CTTTGTT		
<i>gastrin2</i> XM_683368	-831 -652	CTTTGAA TTCAAAG		
<i>jagged1</i> NM_131861	-1774 -1252	AACAAAG TTCAAAG		
<i>lef1</i> NM_131426	-1604 -510	AACAAAG ATCAAAG		
<i>myf5</i> NM_131576	-1832 -1619 -1313 -1165 -1106 -1097 -1068 -912 -758 -575 -339 -113	CATTGAA *CATTGCA ATCAATG *ACCAATG TTCAATG *AGCAAAG **CATTGGG TACAATG CTTTGTT CTTTGTT *CTCAAAG **GCCAATG	ctl 	
<i>myf6</i> NM_001003982	-1961 -1822 -1726 -1700 -1681 -1248 -1151 -1010 -994 -759 -677 -614 -559 -555 -409	CTTTGAA AACAATG AACAATG CATTGTA TTCAATG CTTTGTT TACAATG TACAAAG TTCAAAG **GGCAAAG TACAATG **CGCAATG **CATTGGC **GGCAAAG CATTGTA	<i>gsk3β</i> -MO 	
<i>myf6</i> NM_001003982			正執行中	
<i>ret1</i> NM_181662	-1982 -1645 -1711	*CTTTGTC *CTCAAAG CTTTGAA		
<i>sox2</i> NM_213118	-1940 -1769 -1115 -584 -117	CTTTGTT **GCCAAAG ATCAAAG AACAAAG *AGCAAAG		

<i>survivin1</i> NM_194397	-1843 -1673 -1631 -983 -792 -215	ACCAAAG *GCCAAAG *GACAAAG AACAAATG *TCCAATG TTCAATG		
<i>survivin2</i> NM_145195	-1844 -1192 -1149 -713 -537 -238	CTTTGAA ACCAAAG *TGCAATG AACAAATG *ACCAATG TACAATG	正執行中	
<i>pcf-1</i> NM_170764	-1899 -1768 -1514 -1064 -415 -357 -263 -156 -87 -64	TACAAAG *TGCAAAG CTTTGAT *CTTTGTG *GCCAAAG CTTTGTA CTTTGTT CTTTGTT **CTTTGCC *GCCAAAG		
<i>versican-a</i> NM_214688	-1684 -1487 -160 -152 -62	ATCAAAG CTTTGAA *CACAAAG *CTTTGCA *GCCAAAG		其基因之表現型式在 <i>gsk3β</i> -MO 之胚胎中有變化(Lee et al., 2007)
<i>Sp5l</i>			<p>Ctl</p>  <p><i>gsk3β</i>-MO</p> 	

^a from putative initiation site.

^b 5'-A/T A/T CAA A/T G-3' or 5'-C A/T TTG A/T A/T-3'.

(六)参考文献

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, *J. Mol. Biol.* 1990 215:403–410.
- Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997) *Science* 1997 275:1930 – 1934.
- van De WM, Oosterwegel M, Dooijes D, Clevers H, *EMBO J* 1991. 10: 123–132.
- de Groot RP, Auwerx J, Bourouis M, Sassone-Corsi P. *Oncogene* 1993, 8:841 – 847.
- Havis E, Anselme I, Schneider-Maunoury S. *BioTechniques* 2006, 40:34-40.
- Hsu CH, Wen ZH, Lin CS, Chakraborty C. *Curr Neurovasc Res.* 2007 4:111-20.
- Jia J, Amanai K, Wang G, Tang J, Wang B, Jiang J. *Nature* 2002 416:548 – 552.
- Jowett T, *Method* 2001 23: 345–358.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF: *Dev Dyn* 1995, 203:253-310
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H, *Science* 1997, 275:1784–1787.
- Lee HC, Tsai JN, Liao PY, Tsai WY, Lin KY, Chuang CC, Sun CK Chang WC, Tsai HJ *BMC Dev Biol.* 2007 7:93.
- Liang P, Pardee AB, *Science* 1992, 257:967–971.
- Price MA, Kalderon D. *Cell* 2002 108:823 – 835.
- Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. *Genes Dev.* 2000 14: 2501 – 2514.
- Tsai JN, Lee CH, Jeng H, Chi WK, Chang WC. *Mech Dev* 2000, 91:387-391.
- Tullai JW, Chen J, Schaffer ME, Kamenetsky E, Kasif S, Cooper GM. *J. Biol. Chem.* 2007 282: 9482 – 9491.
- Velculescu VE, Zhang L , Vogelstein B, Kinzler KW, *Science* 1995 270: 484–487.
- Weidinger G, Thorpe CJ, Wuennenberg-Stapleton K, Ngai J, Moon RT. *Curr Biol* 2005, 15:489-500
- Westerfield, M. 2000. The Zebrafish Book: a Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*). 4th eds. Eugene, Oregon: University of Oregon Press.
- Xavier IJ, Mercier PA, McLoughlin CM, Ali A, Woodgett JR, Ovsenek N. *J. Biol. Chem.* 2000 275, 29147 – 29152.