

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 : 利用爪蟾卵母細胞(Xenopus oocyte)來探討 Cx26 基因
* 名 稱 : 突變造成的功能影響
* *****

執行計畫學生： 鄭宜婷
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-020-B
研究期間： 98年07月01日至99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 99年04月02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 *
* : 利用爪蟾卵母細胞 (Xenopus oocyte) *
* 名稱 來探討Cx26基因突變造成的功能影響 *

執行計畫學生：鄭宜婷
學生計畫編號：NSC 98-2815-C-040 -020 -B
研究期間：98年7月1日至99年2月底止，計8個月
指導教授：李宣佑

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）
中華民國 99 年 2 月 28 日

目錄

摘要	1
實驗動機	2
研究方法及材料	3
結果	10
討論	13
圖表	15
參考資料	18
附錄	19

摘要

Gap junction是細胞膜上的離子通道，基本組成單位是connexin (Cx)。每六個connexin可組成一個connexon (hemichannel)，每個connexon再與鄰近細胞的connexon共同組合形成一個完整的Gap junction。他與耳蝸內細胞之間鉀離子的運送循環有關。根據先前文獻探討，已知許多的Cx基因突變後可能影響到耳蝸內細胞之間鉀離子的運送，進而影響到內耳的電生理，而造成非症候群遺傳性聽障。另外針對台灣地區本實驗室也在非症候群聽障病人中篩選出四個突變點11G>A (G4D)、368C>A (T123N)、224G>A (R75Q)和551G>A (R184Q)，為瞭解這些錯意突變點造成的影響，我們計劃利用分子生物學的方法、爪蟾卵母細胞(Xenopus oocyte)和結合電生理的方式來探討Cx26基因突變在非症候群聽障中所扮演的角色和致病機轉。

本研究結果，我們已經完全建構好在爪蟾卵母細胞(Xenopus oocyte)表現的pTLN Cx26正常和Cx26突變基因載體，目前正進行cRNA製備，並注入爪蟾卵母細胞觀察表現和電生理的研究。同時我們也完成正常和突變的Cx26基因建構於含螢光表現(GFP和RFP)之載體上。進一步的將帶有螢光表現之基因表現載體轉殖到HeLa細胞中，利用螢光顯微鏡觀察在Cx26 WT和Cx26突變基因表現位置的影響，進而瞭解造成非症候群聽障的致病機轉。

實驗動機

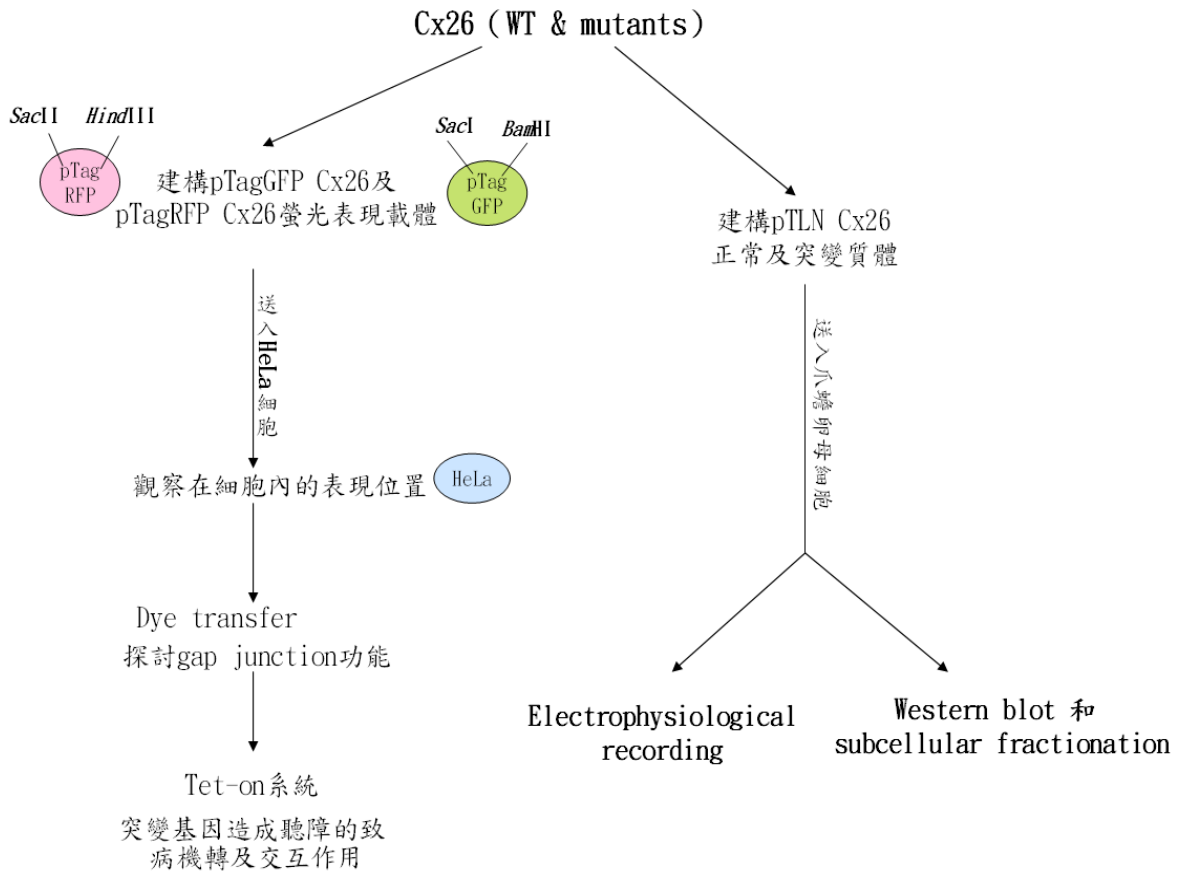
先前我們實驗室研究的非症候群聽障病人中，發現病人身上的*Cx26*基因有幾個錯意突變G4D、T123N、R75Q、R184Q。但是這些錯意突變是否會造成非症候群遺傳性聽障以及致病機轉我們並不清楚。因此本研究的主要動機是想要利用爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)來探討我們在*Cx26*基因上所發現的4個突變點對其蛋白功能所造成的影響，藉以了解這4個*Cx26*基因突變後造成非症候聽障的致病機轉。

根據上述的動機，我們擬定了一些研究方向和目標：

1. 利用電生理檢測正常與突變*Cx26*基因在爪蟾卵母細胞膜(*Xenopus oocyte*)形成的gap junction channel功能影響。
2. 利用細胞免疫螢光染色技術(immunofluorescence staining)和西方點墨法檢測正常與突變*Cx26*基因在HeLa細胞蛋白表現的位置。

研究方法及材料

研究步驟



研究方法

1). 建構pTLN Cx26 WT

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°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°C 的 shaker 中搖晃2-3 hours (通常大於3小時) (150-200轉/分鐘) 待菌液之OD600介於0.6-0.7之間。再將菌液平均分裝於已先預冷的2支養菌管，以5000rpm於4°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°C冰桶上30分鐘，再以5000rpm，4°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 μl的量分裝competent cell至ependorf，並保存於-80°C下。

1-2 基因轉殖(transformation)

先將competent cell從-80°C冰箱取出，置於冰上溶解。將4 μl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ampicillin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conoly的菌是否含有接合完全的質體。取single colony至15 μl的STE Buffer，並且 pipetting 均勻。之後取8 μl進行PCR反應。總反應體積為25 μl，包含8 μl DNA，2.5 μl 2mM dNTP、2.5 μl 10X pfu buffer、forward primer 0.5 μl、reverse primer、0.5 μl Taq DNA polymerase 以及 10.5 μl d₂H₂O。同樣將此反應溶液置於回溫反應器(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3 μl 50mg/mL ampicillin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 200 μl，與細菌充份混合均勻後，移至

ependorf。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ependorf 並加入50 μ l 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Cx26 WT基因到pTLN載體上

A. 將含有 Cx26 WT 基因的質體DNA, 利用insert PCR製造含限制酶酵素 *Nco*I 和 *Xho*I, Forward primer (pTLN Cx26-*Nco*I: 5' - ATGCCA TGGATGGATTGGGGCACGCTGC -3') 和Reverse primer (pTLN Cx26-*Xho*I: 5' - A TGCTCGAGTTAAACTGGCTTTTTTGGACTTC -3') 的限制酶切點。2 μ l 的含 Cx26 WT 基因的質體DNA當template, dNTP(10mM)1 μ l, Phusion buffer 10 μ l, Forward primer 和 Reverse primer 各 1 μ l, Taq DNA polymerase (Phusion) 0.5 μ l, 並補水到總體積 50 μ l。進行PCR反應, 98°C 30 秒, 98°C 10 秒, 58°C 30 秒, 72°C 1 分鐘, 72°C 10 分鐘, 25°C 終止反應, 共 32 個cycle。並使用Gel Extraction kit來純化產物, 前提是PCR產物跑膠結果不是single band。首先, 將經由跑膠的agar片段切下, 置於ependorf中, 每管加入 500 μ l GEX buffer, 並放入水浴 10 分鐘而溫度不可高於 60°C, 拍打管壁使得膠融得均勻, 再將混合液放入PD Column, 離心 30 秒倒掉離心液。加入 500 μ l W1 buffer, 離心 30 秒, 去除離心液。加入 700 μ l Wash buffer, 離心 30s, 除去離心液, 再次離心 3 分鐘, 將Column重置於新ependorf(1.5 ml tube), 加入 30 μ l d₂H₂O待 2 分鐘, 離心 2min, 即得到純化好的DNA。可再跑膠做check。

B. 將純化好的含有限制酶*Nco*I和*Xho*I切位的Cx26基因, 用限制酶*Nco*I和*Xho*I進行反應, 取35 μ l的純化後產物, 加入buffer (2) 5 μ l, BSA 1 μ l, 先加*Nco*I 1.5 μ l, 並補水到體積48.5 μ l, 37°C反應2小時。再加入*Xho*I 1.5 μ l, 反應2小時後, 進行PCR clean up。完成含限制酶*Nco*I和*Xho*I切位的Cx26基因插入子 (insert) 製備。

C. 將pTLN質體DNA以限制酶*Nco*I和*Xho*I反應, 製備pTLN載體。取500ng的pTLN質體DNA, 加入buffer (2) 5 μ l, BSA 1 μ l, 先加*Nco*I 1.5 μ l, 並補水到體積48.5 μ l,

37°C反應2小時。再加入 *Xho*I 1.5 μ l，反應2小時後，進行gel extraction。

D. 將製備好的 *Cx26* 基因插入子 (insert) 和 pTLN 載體，進行黏合反應。取5 μ l 的 *Cx26* 基因插入子 (insert) 及2 μ l 的 pTLN 載體，加入 ligation buffer 1 μ l, T4 ligase 0.5 μ l，補水到總體積10 μ l。25°C反應1小時。利用勝任細胞(1-1)進行基因轉殖(1-2)。並將含有抗生素的plate上之菌株放入LB培養液，進行培養。再利用(1-4) High-speed plasmid mini kit(Geneaid)抽取細菌質體。經過電泳和限制酶的測試確認後，即可得到 pTLN *Cx26* WT 質體。

2). 建構 pTLN *Cx26* mutants

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(附表一)，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 $T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$ (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。準備回應溶液體積為 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，在回應溶液上覆蓋 30 μ l mineral oil，將此回應溶液裝置於回溫回應器 (Perkin-Elmer 9700) 中進行，回應條件為 95°C 30 秒、95°C 30 秒、55°C 1分鐘、68°C 8 分鐘 (12 個循環數)，回應結束後將回應物至於冰上 2 分鐘，等回應完全後，加入 DpnI 酵素 (10U/ μ l) 於 37°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°C 雪櫃保存。

3). 建構 pTagRFP *Cx26* WT

將 pTLN *Cx26* WT 利用兩種限制酶 *Hind*III 和 *Sac*II 處理，取 1500ng 的 pTLN *Cx26* WT

質體DNA，加入buffer (3) 5 μ l，BSA 1 μ l，先加*Hind*III 1.5 μ l，並補水到體積48.5 μ l，37°C反應2小時。再加入*Sac*II 1.5 μ l，反應2小時後，進行gel extraction。即可得pTagRFP *Cx26* WT的插入子。同時將pTagRFP質體用一樣用限制酶*Hind*III和*Sac*II處理，取1000ng的pTagRFP質體DNA，加入buffer (3) 5 μ l，BSA 1 μ l，先加*Hind*III 1.5 μ l，並補水到體積48.5 μ l，37°C反應2小時。再加入*Sac*II 1.5 μ l，反應2小時後，進行gel extraction。即可得到pTagRFP載體。最後將製備好的插入子和載體進行黏合作用(1-5.D)，利用勝任細胞(1-1)進行基因轉殖(1-2)。並將含有抗生素kanamycin的plate上之菌株放入LB培養液，進行培養。再利用(1-4) High-speed plasmid mini kit(Geneaid)抽取細菌質體。經過電泳和限制酶的測試確認後，即可得到pTagRFP *Cx26* WT 質體。

4). 建構pTagRFP *Cx26* mutants

與製備pTLN *Cx26* mutants 相同，利用Stratagene Quickchange site directed Mutagenesis Kit進行突變點的置換，用先前建構pTLN *Cx26* mutants設計之引子於(附表一)，即可製備出pTagRFP *Cx26* mutants。

5). 建構 pTagGFP *Cx26* WT 和 pTagGFP *Cx26* mutants

將建構完成的pTagRFP *Cx26* WT和pTagRFP *Cx26* mutants 利用限制酶*Bam*HI和*Xma*I處理，取1000ng的pTagRFP *Cx26*WT (mutants) 質體DNA，加入buffer (3) 5 μ l，BSA 1 μ l，先加*Bam*HI 1.5 μ l，並補水到體積48.5 μ l，37°C反應2小時。再加入*Xma*I 1.5 μ l，反應2小時後，進行gel extraction，製備出插入子。同時利用限制酶*Bam*HI和*Xma*I處理pTagGFP質體，製備載體。最後和製備建構pTagRFP *Cx26* WT的方式相同，最後將製備好的插入子和載體進行黏合作用(1-5.D)，利用勝任細胞(1-1)進行基因轉殖(1-2)。並將含有抗生素kanamycin的plate上之菌株放入LB培養液，進行培養。再利用(1-4) High-speed plasmid mini kit(Geneaid)抽取細菌質體。經過電泳和限制酶的測試確認後，即可得到pTagGFP *Cx26* WT和pTagGFP *Cx26* mutants 質體。

6). 利用HeLa cell 觀察正常及突變的在細胞內的表現位置

6-1 細胞培養與基因轉殖

利用HeLa cells觀察正常及突變的*Cx26*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3.7cm²的培養皿中，當細胞濃度達到80%時，即可使用基因轉殖感染(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*Cx26*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18mm² cover split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500ng/ 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 antibody30~40 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 7 μ l 靜置10分鐘後，以DFX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*Cx26* 蛋白在細胞內之分佈螢光位置及細胞型態。

結果

一、建構 *Cx26* WT 基因 到pTLN 載體上

為了利用爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統來探討正常型以及突變型 *Cx26*的蛋白功能，首先我們將*Cx26*WT建構至pTLN(此載體是由Kubisch 實驗室所提供)。此質體可以在爪蟾卵母細胞(*Xenopus oocyte*)表現系統上表現蛋白。將含有*Cx26*基因的質體DNA，使用PCR方式，利用Forward primer (pTLN *Cx26*-*NcoI* : 5' - ATGCCA TGGATGGATTGGGGCACGCTGC -3')和Reverse primer (pTLN *Cx26*-*XhoI* : 5' - A TGCTCGAGTTAAACTGGCTTTTTTGACTTC -3')來製造含限制酶切點*NcoI*和*XhoI*的*Cx26*基因產物。再經過限制酶切割後，可得到*Cx26*WT基因大小約680 bp (圖一A)。將pTLN質體經過限制酶切割後，可得到大約3.2kb的載體 (圖一B)。將*Cx26*WT與pTLN進行ligation反應，經transformation後塗菌的LB plate上挑6顆菌落利用限制酶*NcoI*和*XhoI*反應1個小時做測試，切下來的產物經過電泳跑膠之後，可看到680bp的插入子和3.2kb的載體 (圖一B)。經過限制酶的再次確認以及最後經由定序反應結果我們確實得到pTLN *Cx26*WT質體且序列無誤。(圖一C)

二. 建構的pTLN *Cx26*突變質體

為瞭解在*Xenopus oocyte* 中正常與突變*Cx26*基因後，在爪蟾卵母細胞膜(*Xenopus oocyte*)形成的gap junction channel電生理檢測功能是否有影響。首先將設計好的突變點引子(附表一)，使用QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 在已有的pTLN *Cx26*WT質體上做點突變(site-directed mutagenesis)的實驗，經過限制酶的再次確認以及最後經由定序反應確認，我們已經建構好實驗室先前所發現的四個突變點11G>A (G4D)、368C>A (T123N)、224G>A (R75Q)和551G>A (R184Q) (圖一D) (圖二)。

三. 建構正常或突變的*Cx26* 在pTagGFP和pTagRFP質體

為了在HeLa cell 中觀察正常型以及突變型*Cx26*蛋白在細胞內的所在位置，藉此

來瞭解是否因 *Cx26* 基因突變後造成 *Cx26* 蛋白在細胞內表現位置改變而影響其正常功能。我們將 pTLN-Cx26WT 質體 subclone 至 pTagGFP 和 pTagRFP 的螢光蛋白表現質體上(附圖一、二)，建構可以在 HeLa cell 中表現的 pTagGFP *Cx26* 和 pTagRFP *Cx26* 質體。首先，我們將 pTLN Cx26 WT 及 pTagRFP 利用兩種限制酶 *HindIII* 和 *SacII* 處理，可得大約 680bp 的插入子和 4.7kb 的載體(圖三A)，並將插入子和載體進行黏合作用和轉型，即可得 pTagRFP *Cx26*WT。利用先前建構 pTLN Cx26 突變設計之引子(附表一)，結合 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 在已有的 pTagRFP *Cx26* 正常質體上做點突變(site-directed mutagenesis)的實驗，經過限制酶的再次確認以及最後經由定序反應確認(圖三B)，建構出我們實驗室先前所發現的兩個突變點 11G>A (G4D) 和 224G>A (R75Q)(圖三C)。當建構 pTagGFP *Cx26*WT 時，則是將以建構好的 pTagRFP 使用 *BamHI* 和 *XmaI* 的限制酶處理，後面步驟和 pTagRFP *Cx26*WT 的建構過程相同(圖三C)，即可得到 pTagGFP *Cx26*WT 螢光表現質體。

目前已建構完成之表現質體：

基因	基因
pTLN CX26WT	pTagRFP CX26G4D(11G>A)
pTLN CX26R184Q (551C>A)	pTagRFP CX26R75Q(224G>A)
pTLN CX26R75Q(224G>A)	pTagGFP CX26WT
pTLN CX26T123N(368C>A)	pTagGFP CX26G4D(11G>A)
pTLN CX26G4D(11G>A)	pTagGFP CX26R75Q(224G>A)
pTagRFP CX26WT	

四、將正常及突變 *Cx26* 的送到 HeLa cell 中

為了證明 *Cx26* 基因的突變點是否會影響其蛋白功能，我們以 pTagRFP 和 pTagGFP 為載體，利用轉殖到 HeLa cell 上來觀察正常以及突變的 *Cx26* 蛋白在細胞內的所在位置，藉此來瞭解是否因 *Cx26* 基因突變後造成 *Cx26* 蛋白在細胞內表現位置改變而影響其正常功能(目前正在進行中)。

討論

gap junction為一細胞的細胞膜上特別的結構並可使細胞會和其他細胞結，形成一個細胞和細胞之間的通道(cell-to-cell channels)，可允許細胞間分子量約小於1000kDa的離子、代謝產物和第二訊息分子的運送與傳遞(Bruzzone et al., 1996; Nicholson, 1997)。細胞間藉由gap junction來進行訊息的交流在很多生理機能中是不可或缺的，包括生長和分化、代謝的平衡、組織分泌的同步化、肌肉的收縮和神經作用的同步化等。而gap junction在聽覺傳導上之所以重要，因其主要為協助運送鉀離子或其他離子從毛細胞(hair cell)回到耳蝸內淋巴系統的再循環，以維持內淋巴中的鉀離子濃度(Kikuchi et al., 1995)。

目前已有文獻表示若是構成gap junction的蛋白質發生突變或異常，也就是Cx基因群的突變，則會對聽覺的傳導產生重大影響。根據先前文獻探討，已知許多的connexin (Cx)基因突變後可能影響到耳蝸內細胞之間鉀離子的運送，進而影響內耳的電生理，而造成非症候群遺傳性聽障。目前已知有大約60%的感音性神經缺失是屬於遺傳性因素，而其中有50%的語言學習前感音神經性聽障是Cx26突變所造成的。並指出Cx26突變造成了大部分體染色體顯性遺傳非症候群聽障autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment (ARNHI)，研究Cx26基因的缺失、複寫的突變，所可能影響的聽力流失(Gürtler N et al., 2008)。也由此推斷Cx26參與了耳蝸中鉀離子濃度的調節，但目前仍然不完全瞭解Cx26在和聽障間的交互關係和致病機轉。因此我們實驗室針對非症候群聽障發現的4個錯意突變11G>A (G4D)、368C>A (T123N)、224G>A (R75Q)和551G>A (R184Q)，結合爪蟾卵母細胞和HeLa細胞系統研究Cx26突變點所造成聽障的致病機轉。

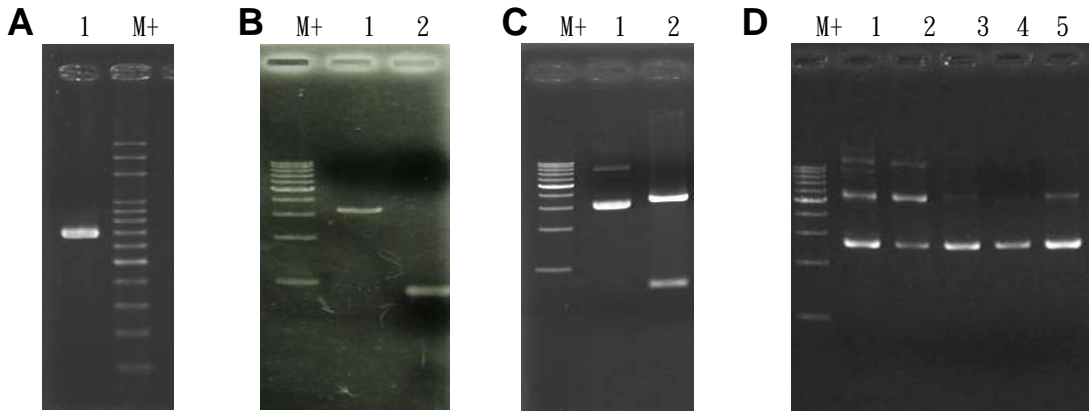
Palmada M. 等作者(2005)利用爪蟾卵母細胞(Xenopus oocyte)表現系統研究Cx26基因的突變點對其蛋白功能影響。發現Cx26基因在這些突變點M34T, V37I和I82M會造成gap junction間鉀離子流動的改變。因此我們實驗室也將利用爪蟾卵母細胞(Xenopus oocyte)表現系統來研究篩選出的4個突變點，包括G4D、T123N、R75Q和R184Q錯意突變。目前我們已從將正常和突變Cx26基因建構到pTLN載體上(可在爪蟾卵母細胞表現的載體)，同樣的突變的質體也是利用Quik ChangeSite-Directed

Mutagenesis Kit 來建構，目前建構完成了 pTLN *Cx26* (pTLN *Cx26*- G4D、pTLN *Cx26*- T123N、pTLN *Cx26*- R75Q、pTLN *Cx26*- R184Q) 等質體。目前正進行上述質體在 *in vitro* 合成 cRNA，待完成後再將合成的 cRNA 送入爪蟾卵母細胞 (*Xenopus oocyte*)，以便探討 *Cx26* 基因突變對蛋白功能的影響。

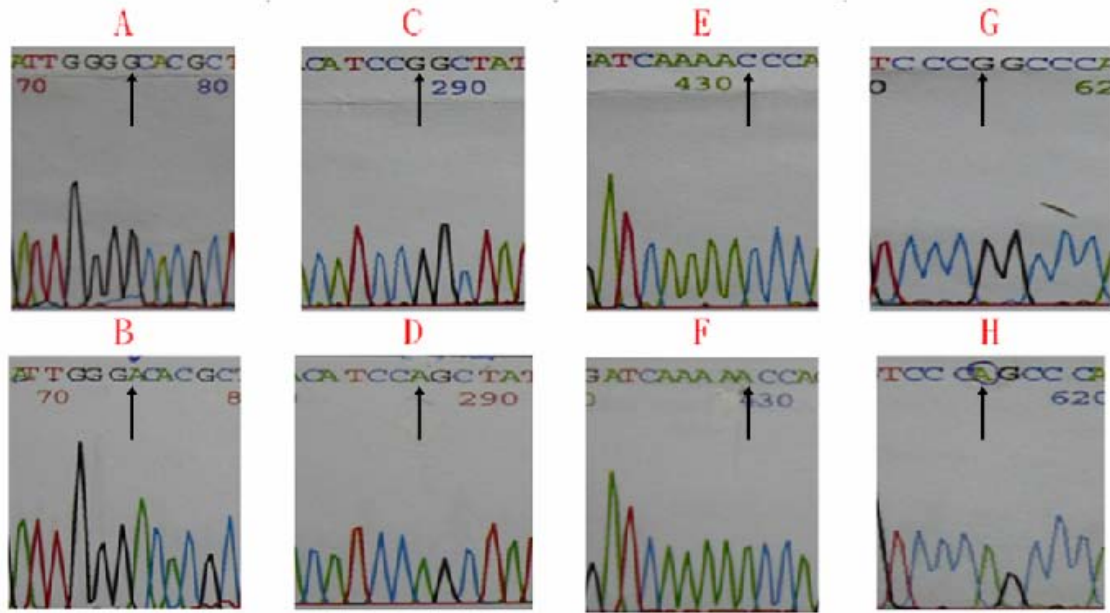
另外，我們將利用 HeLa 細胞系統研究 *Cx26* 基因，因此先著手於建構正常和突變的 *Cx26* 基因於 pTagGFP、pTagRFP 螢光表現質體，目前已建構完成 pTagGFP *Cx26*- WT、pTagGFP *Cx26*- G4D、pTagGFP *Cx26*- R75Q、pTagRFP *Cx26*- WT、pTagRFP *Cx26*- G4D、pTagRFP *Cx26*- R75Q 等質體。並將其轉殖於 HeLa cell 中，將來將利用 dye transfer 等方式了解其形成 gap junction 的特性，以探討突變基因造成聽障的致病機轉以及 *Cx26* 基因突變後與正常基因間的交互作用。

綜合已上所述，研究計劃目的是想要利用爪蟾卵母細胞 (*Xenopus oocyte*) 和 HeLa 細胞系統研究 *Cx26* 突變點所造成聽障的致病機轉。目前，已完成上述研究方面所需要的質體建構，並且正在進行下一步的實驗研究。本研究在質體建構上花費了一段時間，目前兩個系統 (爪蟾卵母細胞表現系統和 HeLa 細胞表現系統) 都在進行功能分析的相關實驗，相信在這些實驗完成後將可瞭解實驗室所發現的 4 個 *Cx26* 基因突變在非症候群聽障中所扮演的角色和致病機轉。

圖表

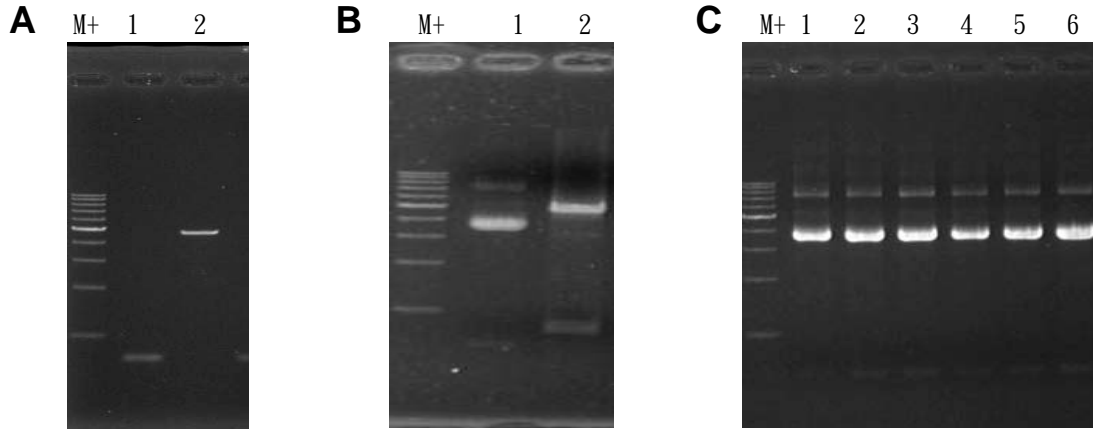


圖一 (A) 1. 利用Forward primer和Reverse primer進行insert PCR，將含有*Cx26 WT* 基因的質體DNA，夾得*Cx26 WT* 基因，約680bp。(B) 1. 將pTLN質體以限制酶*NcoI*及*XhoI*處理，經過膠體純化，得到pTLN載體，約3.2kb。2. 將利用insert PCR所夾出的*Cx26 WT*基因以限制酶*NcoI*及*XhoI*處理，並經過純化可得到建構pTLN *Cx26 WT*的插入子，約680bp。(C) 將生長於LB agar plate 上的菌落，以LB做培養並抽取質體。將此質體以限制酶*NcoI*及*XhoI*作用，如果產物跑電泳可分別看到相同大小的插入子和載體，可初步顯示insert 有可能有接入vector 的multiple cloning site。1：抽取的pTLN *Cx26 WT*質體。2：限制酶處理後的產物，可分別看出符合插入子和載體的大小。(D) 將建構好的pTLN *Cx26 WT*，利用Stratagene Quickchange site directed Mutagenesis Kit進行突變點的置換，得到的pTLN *Cx26*突變質體。1：pTLN *Cx26 WT*。2：pTLN *CX26 G4D*(11G>A)。3：pTLN *CX26 R75Q*(224G>A)。4：pTLN *CX26 T123N*(368C>A)。5：pTLN *CX26 R184Q* (551C>A)。



(圖二) CX26基因在pTLN *Cx26*、pTag GFP *Cx26*和pTag RFP *Cx26*質體上的錯意突變點序列。

- A. *CX26* 11G正常序列，箭頭所指即為突變點正常序列
- B. *CX26* 11G →A 突變序列，箭頭所指即為突變位置
- C. *CX26* 224G正常序列，箭頭所指即為突變點正常序列
- D. *CX26* 224G →A突變序列，箭頭所指即為突變位置
- E. *CX26* 368C正常序列，箭頭所指即為突變點正常序列
- F. *CX26* 368C →A突變序列，箭頭所指即為突變位置
- G. *CX26* 551C正常序列，箭頭所指即為突變點正常序列
- H. *CX26* 551C →A突變序列，箭頭所指即為突變位置

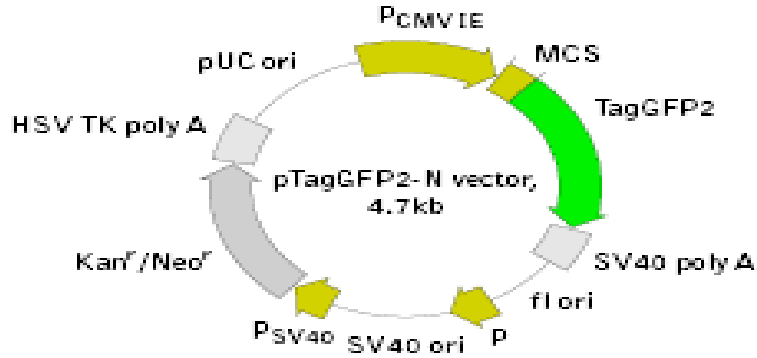


圖三 (A) 將 pTagGFP 質體和以建構好 pTagRFP *Cx26* WT 質體，利用限制酶 *Bam*HI 和 *Xma*I 作用，可分別得到插入子和載體，得以進行接合作用。1: *Cx26* WT 插入子，約 680bp。2: pTagGFP 載體，約 4.7Kb。(B) 將生長於 LB agar plate 上的菌落，以 LB 做培養並抽取質體。將此質體以限制酶 *Bam*HI 和 *Xma*I 作用，如果產物跑電泳可分別看到相同大小的插入子和載體，可初步顯示 insert 有可能有接入 vector 的 multiple cloning site。1: 抽取的 pTagGFP *Cx26* WT 質體。2: 限制酶處理後的產物，可分別看出符合插入子和載體的大小。(C) 將利用 Stratagene Quickchange site directed Mutagenesis Kit 進行突變點的置換，得到的 pTLN *Cx26* 突變質體。分別以限制酶處理，建構到 pTagGFP 質體和 pTagRFP 兩個螢光表現蛋白載體。1: pTagGFP *Cx26* WT。2: pTagGFP G4D(11G>A)。3: pTagGFP *CX26* R75Q(224G>A)。4: pTagRFP *Cx26* WT。5: pTagRFP G4D(11G>A)。6: pTagRFP *CX26* R75Q(224G>A)。

參考資料

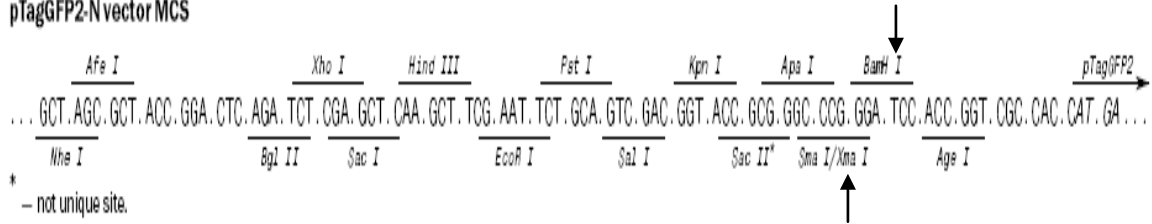
- (1) Barrio LC, Suchyna T, Bargiello T, Xu LX, Roginski RS, Bennett MV and Nicholson BJ. (1991) Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(19):8410-4.
- (2) Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ and Steinlein OK. (1988) A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science.* 279(5349):403-6
- (3) Bruzzone R, White TW, Paul DL. (1996) Connections with connexins the molecular-basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238, 1 - 27
- (4) Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, Cockburn DJ, Pandya A, Siemering KR, Chamberlin GP, Ballana E, Wuyts W, Maciel-Guerra AT, Alvarez A, Villamar M, Shohat M, Abeliovich D, Dahl HH, Estivill X, Gasparini P, Hutchin T, Nance WE, Sartorato EL, Smith RJ, Van Camp G, Avraham KB, Petit C and Moreno F. (2003) Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subject. *Am J Hum Genet.* 73 : 1452-1458
- (5) Görtler N, Egenter C, Bösch N and Plasilova M. (2008) Mutation analysis of the Cx26, Cx30, and Cx31 genes in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Acta Otolaryngol.* 128(10):1056-62.
- (6) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391(2):85-100.
- (7) Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL and Adams JC. (1995) Gap junctions in the rat cochlea. *Anat Embryol.* 191:101-118
- (8) Nicholson SM and Bruzzone R. (1997) Gap junctions. *Curr Biol.* 7:R340-R344
- (9) Palmada M, Schmalisch K, Böhmer C, Schug N, Pfister M, Lang F and Blin N. (2005) Loss of function mutations of the GJB2 gene detected in patients with DFNB1-associated hearing impairment. *Neurobiol Dis.* Apr;22(1):112-8. Epub.
- (10) Spray DC, Harris AL and Bennett MV. (1981) Equilibrium properties of a voltage-dependent junctional conductance. *J Gen Physiol.* 77(1):77-93.
- (11) Sohl G, Eiberger J, Jung YT, Kozak CA and Willecke K. (2001) The mouse gap junction gene connexin29 is highly expressed in sciatic nerve and regulated during brain development. *J. Biol. Chem.* 382: 973 - 978.

Appendixes

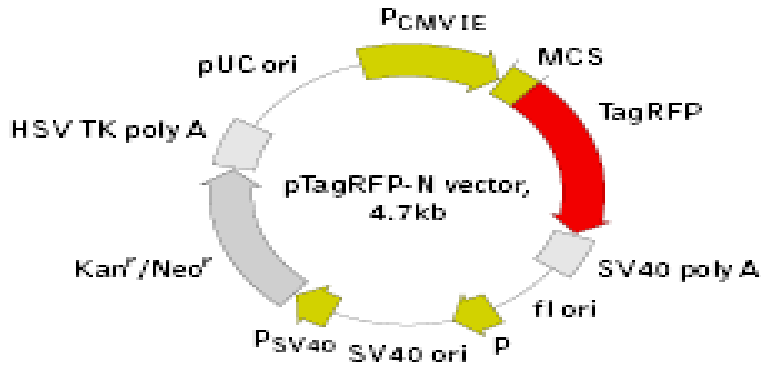


For vector sequence, please visit our Web site at <http://www.emvogen.com/support/vector-info.shtml>

pTagGFP2-Nvector MCS

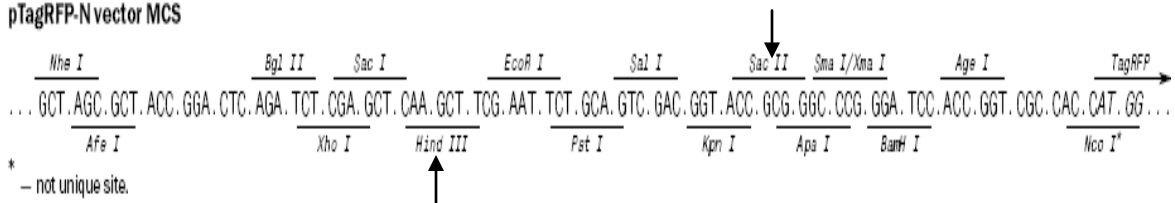


附圖一、pTagGEP₂-N Vector 載體以及其multiple cloning site 上限制酶酵素的位點。建構Cx26 基因於此載體上，使用BamHI和XmaI（黑色箭頭所指）、切點。



For vector sequence, please visit our Web site at:
<http://www.invitrogen.com/support/vector-info.shtml>

pTagRFP-N vector MCS



附圖一、pTagREP₂-N Vector 載體以及其multiple cloning site 上限制酶酵素的位置。建構Cx26 基因於此載體上，使用HindIII和SacII（黑色箭頭所指）、切點。

附表一、CX26 點突變所使用的primer

Primer	序列
Cx26 G4D (11G>A)	Come : 5' -- ATGGA TTGGGACACG CTGCAGACGA TCC-- 3' Recome : 5' -- GGA TCGTCTGCAG CGTGTCCTCAA TCCAT-- 3'
Cx26 R75Q (224G>A)	Come : 5' -- CTC CCACATCCAG CTATGGGCCC TGC--3' Recome : 5' -- GCA GGGCCCATAG CTGGATGTGG GAG --3'
Cx26 T123N (368C>A)	Come : 5' -- CATCGAGGAG ATCAAAAACC AGAAGGTCCG CATCG-- 3' Recome : 5' -- CGATG CGGACCTTCT GGTTTTTGA TCTCCTCGATG-- 3'
Cx26 R184Q (551C>A)	Come : 5' --CTGC TTTGTGTCCC AGCCCACGGA GAAGAC -- 3' Recome : 5' -- GTCTTC TCCGTGGGCT GGGACACAAA GCAG -- 3'