

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 : 斑馬魚 rspo1 剪接異構物對胚胎時期 Wnt/b-catenin \*  
\* 名稱 : 訊息傳遞之影響與其在胚胎結合位置之研究 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生：張孝慈  
學生計畫編號：NSC 98-2815-C-040-040-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：蔡振寧

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：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 99年05月22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：斑馬魚 *rspol* 剪接異構物對胚胎時期 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息  
傳遞之影響與其在胚胎結合位置之研究

\*\*\*\*\*

執行計畫學生：張孝慈

學生計畫編號：NSC 98-2815-C-040-040-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：蔡振寧

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 醫學檢驗暨生物技術學系

中華民國 99 年 03 月 31 日

(一)摘要

r-spondin (以下簡稱 rspo)是一個最近才發現的分泌性蛋白質的家族。研究得知關，rspo 蛋白之生理活性與 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞路徑有關。Rspo 基因家族在脊椎動物發胚胎發育時期之表現區域常與在 Wnt 基因家族重疊，而 Rspo 蛋白也會加強細胞之 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞之訊號。絕大部份的 Rspo 蛋白均含有 furin-like repeat 區域，而此區域對於其增強 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞之訊號是有關的。我們實驗室發現斑馬魚在胚胎發育時除了會表現 *rspo1* 外，還會產生另一種 *rspo1* 剪接異構物，而它只會表現出只含一個 furin-like 區域的 *rspo1*。為了更進一步了解這兩種 *rspo1* 異構物，我準備分別過度表現這兩種 *rspo1* 異構物，並利用 TCF 報導基因之活性測試及 Wnt/ $\beta$ -catenin 目標基因 *axin2* 之表現，來了解它們對胚胎內 Wnt/ $\beta$ -catenin 活性的影響。另一方面我也想分別製造 *rspo1* 及 *rspo1* 剪接異構物與 AP 之融合蛋白，來這研究兩種 *rspo1* 異構物在斑馬魚胚胎上的結合位置是否存有差異。截至目前，無論是 pcDNA3.1-*rspo1*-SEAP 或者轉染至 HEK293 細胞裡，它們表現 *rspo1*-SEAP 或是 *rspo1*- $\Delta$ C-SEAP 之程度均不明顯，所以目前正重新著手 construct 新的載體，去增進其蛋白質表現程度，以利後續實驗之進行。

## (二)研究動機與研究問題

### r-spondin 之簡介

r-spondin 是一個最近才發現的分泌性蛋白質的家族。r-spondin 最早是在 2004 年所發現的(Kamata et al., 2004)。在小鼠胚胎發育時期，r-spondin 大部份會表現在背部神經管，也就是所謂的 roof-plate。分析此基因之結構，則發現它的基因產物是一個典型的分泌型蛋白；N 端具有一段 signal peptide，接下來並有兩個鄰近的 furin-like 的區域，此種區域常見於將荷爾蒙前驅物(pro-hormone)轉換成荷爾蒙之酵素中，在中段較偏 C 端區域則有另一個與 thrombospondin 蛋白相似之區域，稱為 thrombospondin type I 區域，接近 C 端則是富含正電荷的一段區

域(見圖一 A)。由於它表現在 roof-plate 又具有 thrombospondin type I domain，因此便被命名為 r-spondin (Kamata et al., 2004)。到目前為止，哺乳類共計發現四種 r-spondin 基因，他們的基因所製造出之蛋白結構十分相似，均具有上述之特徵 (Kim et al., 2006)。

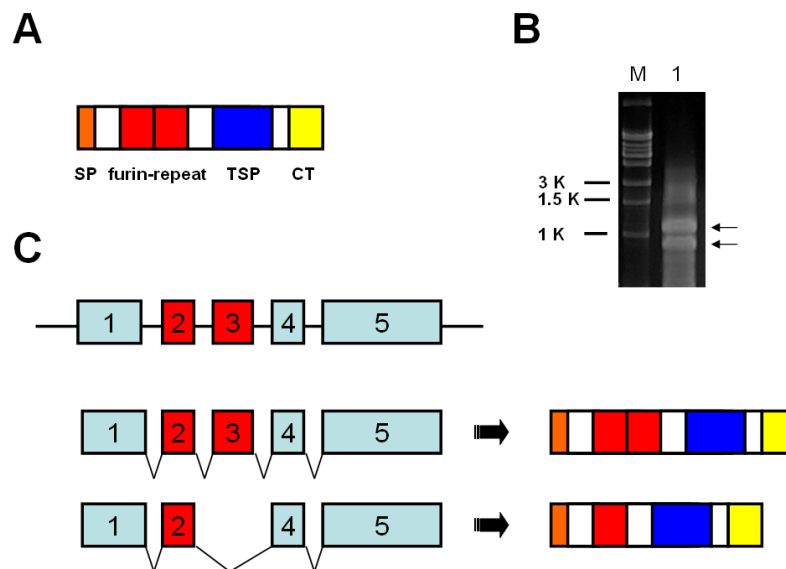
### 斑馬魚之 r-spondin

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)。而近年來經由研究得知關，R-spondin 家族蛋白之生理活性應與 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞路徑有關。主要是因為它最早在小鼠身上發現時，在胚胎發育時期多會出現在背部神經管部位，而這些部位常常就是 Wnt 表現之區域。而且在 Wnt3a<sup>-/-</sup>之小鼠中，它的背部神經管表現之型式，將會消失(Kamata et al., 2004)。將純化之人類 rspondin 1 蛋白加入 HEK293T 細胞後，會加強 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞之訊號。研究顯示成人 RSPO1 主要表現在腎上腺、卵巢、睪丸、甲狀腺以及氣管等組織，不只如此由 Genbank 和 EST 的序列分析顯示，hRspo1 也會進行 RNA 另類剪接，所表現的 RSPO1 主要有三種 isoform：第一種為具有 N 端 signal peptide 完整形式的 RNA，它的表現量最多；第二種是缺乏 exon7 (表現 thrombospondin type 1 的 domain)，而第三種為不具有 N-terminal signal peptide 訊號的 RNA (Parma et al., 2006)。在前人的研究發覺，如果將人類或老鼠的 Rspo1 其中的 furin-like repeat domain 去除掉，則表現出來的具有缺陷的 Rspo 蛋白質就會失去活化 Wnt/ $\beta$ -catenin signaling 的活性 (Kazanskaya et al., 2004)。上網查詢 Ensembl 資料庫，可發現目前在斑馬魚 genome database 中，r-spondin 基因可能僅有三種，我們實驗室已取得其中 rspondin 1 及 rspondin 3 基因之全長 cDNA。我們實驗室現在正研究斑馬魚的 rspondin 基因家族對胚胎發育的影響，我們發現斑馬魚 rspondin 1 也會產生類似人類 RSPO1 的 RNA 另類剪接，但是其所產生的 isoform 與人類不同，主要有兩類，第一類的 isoform 會產生完整的

蛋白質，具有像先前提到的 Rspo 蛋白質各種 domain 的特徵；而第二種 isoform 則缺乏 exon3，它會產生只具有一個 furin-like domain 的 rspo 蛋白（見圖一 B, C），而此兩種 rspo1 的 isoform 在斑馬魚胚胎發育時期幾乎都是同時表現出來的。由於 furin-like domain 對於活化 Wnt/ $\beta$ -catenin 的訊息傳遞相當的重要，因此我這個計劃，主要是想要利用下面兩種方法，來研究斑馬魚 *rspo1* 的這兩個 isoform 的對於胚胎發育時 Wnt/ $\beta$ -catenin 的訊息傳遞的影響。

我想要研究的方向是：

- (1) 藉由過度表現 *rspo1* 與其剪接異構物，來觀察其對斑馬魚胚胎內 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞之影響；測試的方式包括有 TCF 報導基因活性分析及 Wnt/ $\beta$ -catenin 目標基因 *axin2* 表現之變化。
- (2) 製造出具有活性的 *rspo1* 及 *rspo1* 剪接異構物之 AP 融合蛋白。
- (3) 利用 *rspo1* 及 *rspo1* 剪接異構物之 AP 融合蛋白來觀察不同斑馬魚胚胎時期，*rspo1* 及 *rspo1* 剪接異構物之結合位置。



圖一 A. R-spondin 蛋白質家族之特徵, SP 代表 signal peptide, furin-repeat 代表富含

cysteine 之 furin-like domain， TSP 代表 thrombospondin type I 區域， CT 代表接近 C 端富含正電荷的一段區域。 B. 利用 RT-PCR 來分析斑馬魚胚胎的 *rspo1* RNA 另類剪接結果。此為使用體節時期之 cDNA 所放大出來的結果，標示 M 行為 1 Kb marker，標示 1 行為 RT-PCR 結果，箭頭所指是放大出來的兩個 isoforms。 C. 斑馬魚 *rspo1* 之基因結構與 RNA 另類剪接之型式。

### (三)文獻回顧與探討

目前關於這四個 r-spondin gene 之生理功用，由人類家族遺傳之研究及利用小鼠與爪蟾(*Xenopus laevis*)等動物模式之研究中已漸漸可了解。由家族遺傳分析中，發覺 *rspo1* gene 有突變之子代，常會有性別倒置(sex inversion)之現象，而較常觀察到的是 XX 男性，也就是說缺乏正常 *rspo1* 基因之 XX 女性會發展出男性性器官，而且常伴隨有手、腳掌增厚(palmoplantar hyperkeratosis)及皮膚鱗狀上皮細胞癌(squamous cell carcinoma)之發生，這是第一次科學家觀察到，因某個基因的缺失，而在沒有 sry 基因的影響下，導致由女性而轉變至男性之性別倒置之實例(Parma et al., 2006)。利用爪蟾之動物模式則觀察到 *rspo2* gene 與肌肉之形成(myogenesis)有重要之關聯(Kazanskaya et al., 2004); 而在小鼠模式的研究中則發現，*rspo2* 基因與四肢、肺與支氣管之發育有關(Nam et al., 2007; Aoki et al., 2008; Bell et al., 2008); *rspo3* 基因剔除之小鼠在懷孕之過程中與母體胎盤連接之血管則無法順利形成，而導致子代在出生前即流產(Aoki et al., 2007)。由家族遺傳的四肢指甲缺乏症(anonychia)之病人身上，也觀察到 *rspo4* 基因的缺失，這也是第一個因單一基因缺失，而觀察到指甲形成缺失，而這些病人之四肢指骨及甲床均無任何病變(Bergmann et al., 2006; Blaydon et al., 2006; Bröchle et al., 2007; Ishii et al., 2007; Chishti et al., 2008)。

由細胞培養之實驗資料看來，R-spondin 蛋白質似乎與 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞路徑有關，過度表現 *Rspo* 家族各基因至 HEK293T 細胞內，其細胞內之 $\beta$ -catenin

蛋白質濃度會上升，同時轉染含 Tcf/Lef 結合位之 reporter gene，其 reporter gene 之活性亦會上升，證明了 Rspo 家族蛋白質似乎可以增進 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞路徑之強度。將人類的 *RSPO1* 基因過度表現在小鼠體內腸道(包括大腸及小腸)，也會使得這些小鼠腸道出現組織過度增生之病理狀態，而這些增生之狀態也可以同時偵測到 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞路徑之活化(Kim et al., 2005; Kim et al., 2006; Zhao et al., 2007)。Wnt 傳遞訊息至細胞內，必須結合至細胞上的受體 Frizzled 與共受體 Lrp5/6；Dkk1 是一種 Wnt 傳遞訊息之抑制劑，它可將 Wnt 共受體 Lrp5/6 與 Kremen 結合，促進 Lrp5/6 內化至細胞內，而導致細胞表面的 Lrp5/6 不足。利用 R-spondin 與分泌性鹼性磷酸酶(secretory alkaline phosphatase)之融合蛋白分析顯示，目前認為 Rspo 蛋白可加強 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞的原因，主要是因為 Rspo 蛋白會與 Dkk1 競爭 Kremen 上之結合位，來抑制 Wnt 共受體 Lrp5/6 與之 Kremen 結合，從而來穩定細胞表面之 Wnt 共受體 Lrp5/6 (Binnerts et al., 2007)，最後增強 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞路徑。

#### (四)研究方法及步驟

##### 第一部份: *rspo1* 與其剪接異構物對胚胎內 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞之影響

主要再細分成兩部分：TCF 報導基因活性測試及 Wnt/ $\beta$ -catenin 目標基因 *axin2* 表現之變化。

##### 1. TCF 報導基因活性測試

將以構築好的 pCS2-*rspo1* 以及 pCS2-*rspo1* 剪接異構物載體分別加入 TOPflash 載體 (內含具功能的 TCF 結合位八個，一個微弱 TA 啟動子，其下游為報導基因 Firefly Luciferase) 及 pHRG-TK 載體 (一個 TK 啟動子，其下游為報導基因 Renilla Luciferase) 載體，然後分別注入斑馬魚 1 至 2-cell 胚胎中(每組約打 50 個胚胎)，然後放回培養箱裡繼續培養至體節初期 (4 到 6 體節)，然後利用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Inc.) 所附試劑來分析 Firefly(螢火蟲)及 Renilla

(珊瑚蟲) Luciferase 之活性。首先將胚胎放到 1.5-ml 離心管中，再將過多的 medium 吸走，加入 100 ul passive lysis buffer 後，以小型研磨棒將胚胎均質化，然後在 4°C 以 12,000 × g 力量離心，離心後分離出上清液，是為胚胎萃取。取 20 ul 之上述胚胎萃取一至 96-well 測冷光專用的白盤內，加入 100 ul LARII 試劑後，置入冷光儀中，測試 Firefly Luciferase 之訊號，然後再加入 100 ul STOP and GLO 試劑至入冷光儀中，測試 Renilla Luciferase 之訊號，而胚胎內 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞之活性，則是以 Firefly Luciferase 之訊號除以 Renilla Luciferase 之訊號表示。

pCS2-rspo1 以及 pCS2-rspo1 剪接異構物載體注射之劑量(依照之前實驗室之經驗)為 0 pg、250pg、500 pg、1000 pg，每組劑量至少做三重複，為了測試此方法專一性，最高劑量那一組，還必須加做與 FOPflash (內含不具功能的 TCF 結合位)及 phRG-TK 共同注射之實驗，此種微注射的胚胎萃取液之活性，應該是相當低。最後之活性變化之表示，將是以注射 0 pg 的胚胎(但還是含有 TOPflash 及 phRG-TK)所測出的 Luciferase 活性為 100%，觀察其他各組相對於此組活性之變化。

## 2. Wnt/ $\beta$ -catenin 下游目標基因 *axin* 之表現變化

此部分主要利用全胚胎原位核酸雜交來達成 (Whole mutant *in situ* hybridization) 來完成(Jowett, 2001)。如前一部分所述，也是利用不同劑量的 pCS2-rspo1 以及 pCS2-rspo1 剪接異構物質體來注射胚胎後，然後繼續培養至體節前期數，接下來以 4%的 PFA/PBS 在 4°C 隔夜固定後，在解剖顯微鏡下利用鑷子將蛋殼去除，然後以甲醇脫水三次後，儲存於-20°C 至少 30 分鐘。*axin2* 之反義探針製作如下，先使用 T7 及 Sp6 primer 將含 *axin2* 探針之基因部分以 PCR 放大出來，然後利用 *in vitro* transcription 方式將剛才放大之 DNA 模板加入 DIG-RNA 標示混合物，反應緩衝液及 T7 RNA 聚合酶來合成反義的 *axin2* RNA 探針。合成後加入 RNase-free DNase I 分解原來的 DNA 模板，最後加入適量 4M LiCl 及酒精沉澱探針，在-20°C 反應 30 分鐘後，冷凍離心去除上清液，最後加入冰冷 75%酒精，清洗沉澱物後，將沉澱重溶於 RNase-free 的二次水內，儲存於-20°C。接下來之



全胚胎原位核酸雜交則參照 Jowett 2001 所述來執行。

## 第二部份: AP 融合蛋白之表現與純化

主要參考 Brennan and Fabes 之方法(2004)

### 1. 重組基因載體之構築

我們將使用我們實驗室自行構築之 pcDNA3.1-SEAP 載體作為表現 *rspo1*-AP 與 *rspo1* 剪接異構物-AP 融合蛋白之表現載體。將 *rspo1* 剪接異構物之蛋白轉譯區域(coding sequence)，選殖至 pcDNA3.1-SEAP (pcDNA3.1-*rspo1*-SEAP 之前已構築成功)上。上述基因片段均將使用 EcoRI 及 Nde I 來選殖至 pcDNA3.1-SEAP 體內。其簡單步驟如下：在 *rspo1* 剪接異構物之蛋白轉譯區域上下游設計引子，上游引子另外包括 EcoRI 之切位，而下游引子則必須包含 Nde I 之切位，然後利用實驗室中已有的 pCS2-*rspo1* 剪接異構物載體為模板，以具校正活性 Pfu DNA 聚合酶分別放大出上游具 EcoRI 切位及下游具 Nde I 切位之 *rspo1* 剪接異構物蛋白轉譯區域基因片段，將 pcDNA3.1-SEAP 載體及上述放大基因片段分別以 EcoRI 及 Nde I 限制酶切割後，分別作連接反應(ligation)，然後再將連接反應物送入 JM109 competent cell 篩選成功之重組基因載體，並須做進一步的 DNA 定序來確認，確認後之載體將大量製造並純化。

### 2. 轉染至 HEK293T

我們將使用 HEK293T 作為製造 *rspo1*-AP 與 *rspo1* 剪接異構物-AP 融合蛋白之細胞株。在 DNA 轉染前，先將 10 的六次方之 HEK293T 細胞 seeding 在 8-cm petri dish 內，其中含 10 ml DMEM medium(10% fetal self serum 與 0.45% glucose)，然後在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 狀態下培養 24 小時，在轉染前，先將 BES 緩衝液 500 µl 加入 15 ml 離心管，在一個 1.5 ml 管中加入 20 µg pcDNA3.1-*rspo1*-SEPA 或 pcDNA3.1-*rspo1* 剪接異構物-SEAP (溶於滅菌二次水 450 µl 中)，然後加入 50 µl CaCl<sub>2</sub> 溶進，振盪混合後，將 DNA-CaCl<sub>2</sub> 一滴一滴加入上述含 BES 液之管中，置於室溫 15 分鐘(輕

輕搖晃)，再將上述混合液一滴一滴加入細胞中(一邊輕輕搖晃)，在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 狀態下培養 24 小時，將 medium 丟棄，以 10 ml 無菌 PBS 清洗細胞三次，再加入 10 ml 新的 DMEM medium，再在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 狀態下培養 3~5 天。在此期間可對 medium 執行 AP 活性之測試，以確定最佳的 medium 收集時間點。

### 3.分泌蛋白的製備(AP 融合蛋白)

以下的階段都在滅菌過的情況下操作，將有表現 AP 融合蛋白的細胞移到 1.5ml 離心管，離心將把細胞碎片離下，取出培養液並測試其活性。然後將 AP 的活性以調整至在 25 mM，儲存在 4°C。亦可使用離心過濾膜來濃縮 AP 融合蛋白；亦可使用含抗 AP 之單株抗體之樹脂來純化 AP 融合蛋白。

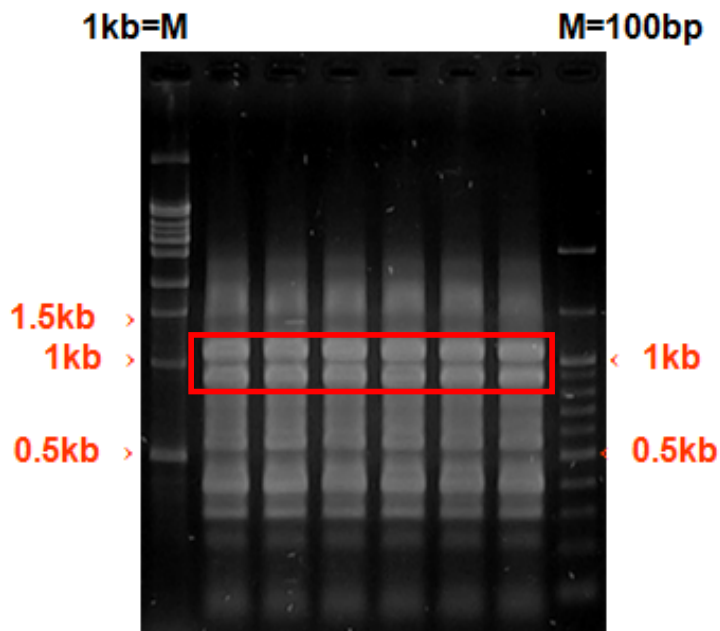
### 4.胚胎染色

先將要分析的特定時期胚胎以 4% PFA/PBS 在室溫下固定 1 至 2 小時。然後以 0.5 mg/ml BSA (in Hanks buffer) 清洗四次，每次 5 分鐘。然後培養含 AP 融合蛋白裡之反應液中 90 分鐘，然後以 0.5 mg/ml BSA (in Hanks buffer) 清洗六次，每次 5 分鐘。接下來再以 Acetone-Formaldehyde Fixative 培養 2.5 分鐘，然後以 Hanks buffer 清洗三次，每次 5 分鐘。接下來在 65~70°C 的溫度下，培養 20~30 分鐘，以消滅內生性鹼性磷酸酶的活性。最後以 AP Reaction Buffer 清洗後，加入 AP 反應受質後呈色，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**

*Rspo* 基因家族在脊椎動物發胚胎發育時期之表現區域常與在 Wnt 基因家族重疊，而 *Rspo* 蛋白也會加強細胞之 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞之訊號。所以為了解 *Rspo1* 在 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞所扮演的角色，首先我們拿斑馬魚 *Rspo1* 基因之全長 cDNA 利用 PCR 的技術去放大 *Rspo1* 的 coding sequence (圖一)，再經過 TA cloning，選殖到此的基因片段最後定序得知，的確有 isoform 的存在，

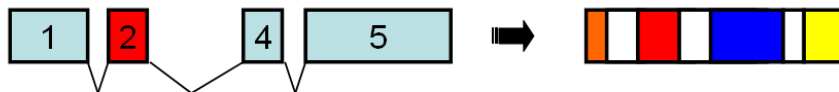
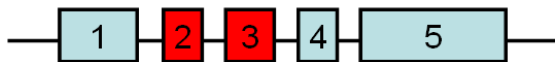
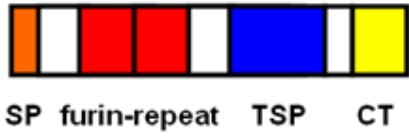
再進一步用鹼基配對去看其序列是否相似，我們發現斑馬魚*rspo1* 也會產生類似人類*RSPO1* 的RNA另類剪接（圖二）。但是其所產生的isoform 與人類不同，主要有兩種，第一種的isoform 會產生完整的蛋白質，具有Rspo 蛋白質所有domain 的特徵；而第二種isoform 則缺乏exon3(141個bp)，它會產生只具有一個furin-like domain 的 *rspo*蛋白，而不是像第一種isoform具有兩個furin-like domain（圖三）。從文獻可得知furin-like domain對於活化Wnt/ $\beta$ -catenin的訊息傳遞相當的重要，因此研究斑馬魚*rspo1*的這兩個isoform的對於胚胎發育時Wnt/ $\beta$ -catenin的訊息傳遞的影響，是非常有意義的。



【圖一】利用RT-PCR偵測出*rspo1*含有兩種isoform，使有的cDNA為12至16體節時期所分離。

【圖二】 *rspo1* 所兩種 isoform 是因有 RNA 另類剪接所致，由圖中可知，*rspo1* 會產生兩種 isoforms，其中一種是含有五個 exon，而另一種是缺乏 exon 3 的 isoform，因此其基因產物只有一個 furin domain

SP + Furin + Furin + TSP1 → *rspo1*



SP + Furin + TSP1 → *rspo1* AS (alternative spliced form)

【圖三】 由 ensembl 資料庫所得到 *rspo1* genomic DNA 中 exon 3 附近相關的序列資訊。框框中顯示的是 exon 3 的序列。

## Exon Information

No. Exon / Intron	Chr	Strand	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence	
5' upstream sequence									
1	ENSDARE00000431196	16	-1	40,243,901	40,244,224	-	1	324	CTCCATACTCAATGCGCGCCAGCTCCTCTTCTCGGCTTCATGGGTTGAAGGGCCACAA GATCTCCAAAAGGTGATCTTCTTCATCGCGCTATGGTTTGCCTCTTAAACATGTCGGGG TTGCCAAAAGGCTCCCCAGCCAAAAGGCTCCGGAGGGGCTAGTCCACTTCGTTCCACC TGCCACAGCGTGAAGGGGGCTCCTCAGTGACTGGGCCACGAGGGACTATGCAATTTGGGAC TGCTGGCGCTGGCACTGGTCTTCTTCAGCTCCATGGGTCAAGCCGATAACCTCAAGGCCT CCAAAAGCAAGAAAGCAGAGACGGGA
Intron 1-2									
2	ENSDARE00000431194	16	-1	40,234,370	40,234,561	1	1	192	TAAAGCACTGAAGTTCCTCCATCATGTTCGAATGGATGTGAACACTGCTGGGAGTACAACG GCTGCTTAAATGTGACCCCGACTTTCATCTTACTGGAGCGAAATGATATCCGTCAGA TAGGCATTTGCTGGCCCGTGTCTGTTGGATATTATGGCAATTCGAAATCGGGATATGA ACAAATGCACAC
Intron 2-3									
3	ENSDARE00000431193	16	-1	40,228,480	40,228,620	1	1	141	gtagtctcttgcctcaattcaaaa ..... gcaactgtctttttctttatttcag AATGTAAAATAGAAAATGTGAGGCATGTTTTAGCCGAAACCTTTTCGACAAATGSHAGE AAGCCCTGTACTCGCATAGAGGGCGATGTTCTCCAGCTGTCTGAAGGATTCACCGTCA ACGGCACCATGGAGTGTGAG
Intron 3-4									
4	ENSDARE00000431192	16	-1	40,224,936	40,224,935	1	1	210	TCCAATGTGATCTAAGTGAAGTGGATCCATGGGGCCCTTGCATGAAGAAGAAACAAACAT GTGGCTTTAAAAGGGTAACCCAGACCCGAAACAGGGAGCCCTTCAGGTTCCAAAGTCCGTG CCACCTCCACAGGGCCCTCCAGCCTCGGGCTGCGTCCCGGAGATCCAGACCCAGAGAT GTACCGTGCAGAAAAGATCCCATGCAAAAG
Intron 4-5									
5	ENSDARE00000431190	16	-1	40,211,655	40,213,215	1	-	1,561	gtaaatcagagaagaacaacagaa ..... ctaattgcatcttactttttccag GAGAAAATAAAAAGAACCAACAGAACCGTGGAGAAAATAGCAAGAACCAGGACCGAGACT CTAAGGAAAGAGGAGGAAAACAGAAAAGAAAGAACACTAACCGTCCACCACTGTCGCCCA CCATTACCAACCAAGTGGTACCTAAATTTCAACAGCATCAAGTGGGCTCAGGAAAAGA GAACCTCGGCTCATCTTAAGACTGACTGGCAGCAAGGTTAAAGTTATGGCGAAACATTT TAAAAGGAAATAACCGCTGTACACTTAAAATAAACATGATCAATGCAATGAGAACTGGA GGATTGCTGACAAAACAAATGAACTGTGTGTAAGGCTTGAGGAACTAAGATGCTGGCTC GGTTAAGTCCCATGCTATTTGCAAGAAGTGGCGAGTGCATGGTTATCTTTTTGTAAGCC TTTTGGGTTGGAGACATGTTCCATATGTTCTCTTAGACCTATCAATAAGGTTTCTGAA CCATAGAGGAAACCACAAAAGGTTACCGTCTTACGTTCTTAAAAGCATCTAAA CACATCCGAACTTTTGGTTCGCTAATCCAGCTGTAATCGCATCTTTTGGGATCTC CTAATGTTTTGACAGGTAGCAAAAGTCTGGAGTCTGTCTCAGAGTGAAGGCTTCTGT TTTTGTATGTTTTTTCTGTGTTTATAACAAAAGAGGCACTGGAACTGATATTGTTGG TTTACAGAGAAATCGGAAAAGAGAACTTTAATAATGATGAACTATCCAAATATG AAGGAAATGTGTTATTATACACTACCTAGAGACAAAGCCACTTAACTTACAGCC GTTTTATTTTTGTTTTTATATGTTGTTTTTGGTTAGGGGACGCAAAATACACTATTT TCTGCACAGAAGAGGCAATAATAGGAATGTACAGTTTTGACGTATGTGATATA AAGATTGTGCTGTGTCGGTTTTATGTTGACTTTTTGTGTCACCTTATGTTGT AAGTCAATGAGATGAGAGATATTGACCGACTGTTACGGAACACTTATCAAGACCAAGCCA TTGAGAATCTAAACAGCAATAATGCTTAAGTTGCAATGTTAGTACTACTATTTTTGTC ATTGCTCAGTTATCAAGTTTGCACCTGGTTCAGTATATCATATTTCATGCTTTGGCAG ATACAATATCAGAGGGAGGAAAGGCTGTACATCATACAGTATTATATGATAGCTCCATT CACACTTTTCTAGTCTGTTTGCATTTACAGTTTTATCCACTGGGCTGTGTTTTTCCTA AAAACATTTGTGAGGAGATCGTAGAGGCTGTTGGTTCTTATCGTTTCTAATGATCTGTTTA TGATGTTTTATGGAAATCTGGCCAGATCAGTGGTTTTTCCACATATACATCTCCCTA TGGAGAAATGACACCCGAACATGTCAGCTCCGTTAATCTTGATGCAATATACATATTG TATTATATCAGTCTGTTTCTATAAAAAGCTACAAGGTAAAATAAACACTTTTTAAACATTTTGA

藉由先前實驗室學姐的實驗得知，rspondin家族中的rspo3表現載體轉染至細胞內效果比rspo1好所以我們先利用rspo3表現載體來試驗，評估自己的試驗技術如何。首先我們將構築成功好的 pcDNA3.1-rspo3-SEAP載體，transfect到HEK293細胞裡，希望能利用HEK293細胞製造出具有活性的rspo3之AP融合蛋白。在DNA轉染前，先將 $10^6$ 之HEK293細胞seeding在10-cm petri dish內，其中含10 ml DMEM medium，然後在 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 狀態下培養至petri dish達九分滿後，subculture至6well的dish，給予350ul不含血清以及營養成分的medium在 $37^{\circ}\text{C}$ 培養30分鐘，另外在轉染前先將要轉染的pcDNA3.1-rspo3-SEAP加入到1.5 ml tube中以含有150ul不含血清以及營養成分的medium，接著再加入適當比例的Lipofectamin藉由pipeting增加振動頻率，室溫靜置20~25分鐘後將其mixture加至well裡，在 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 狀態下培養4~6小時候，加入正常培養之medium，再在 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 狀態下培養至第2天後對medium 執行AP活性之測試。由先前學姊經驗得知，在轉染第二天後可能是最佳的medium 收集時間點。所以收集了第2、3、4天的medium，

執行SEAP活性分析（每1分鐘測試一次活性，測10分鐘，共11次），然而發現其表現出的fusion SEAP活性並不好，而這種情形並不是因為transfection效率不佳所致，因為只表現SEAP的載體轉染後，其分泌至medium所出現的活性並不差（見表一）

表一：rspo3 SEAP表現仔體轉染至HEK293，其medium中SEAP隻活性測試結果

時間點	CTL 1.5	CTL 3	r3-3	r3-5.2	Neg-1	Neg-2
Day2_OD/min	0.0413	0.0377	0.0009	0.0012	0	0
Day3_OD/min	0.0417	0.033	0.0011	0.0012	0	0
Day4_OD/min	0.0517	0.0306	0.001	0.0014	0	0

註一：CTL1.5以及CTL3為well含有1.5ug以及3ug的pcDNA3.1-CTL-SEAP

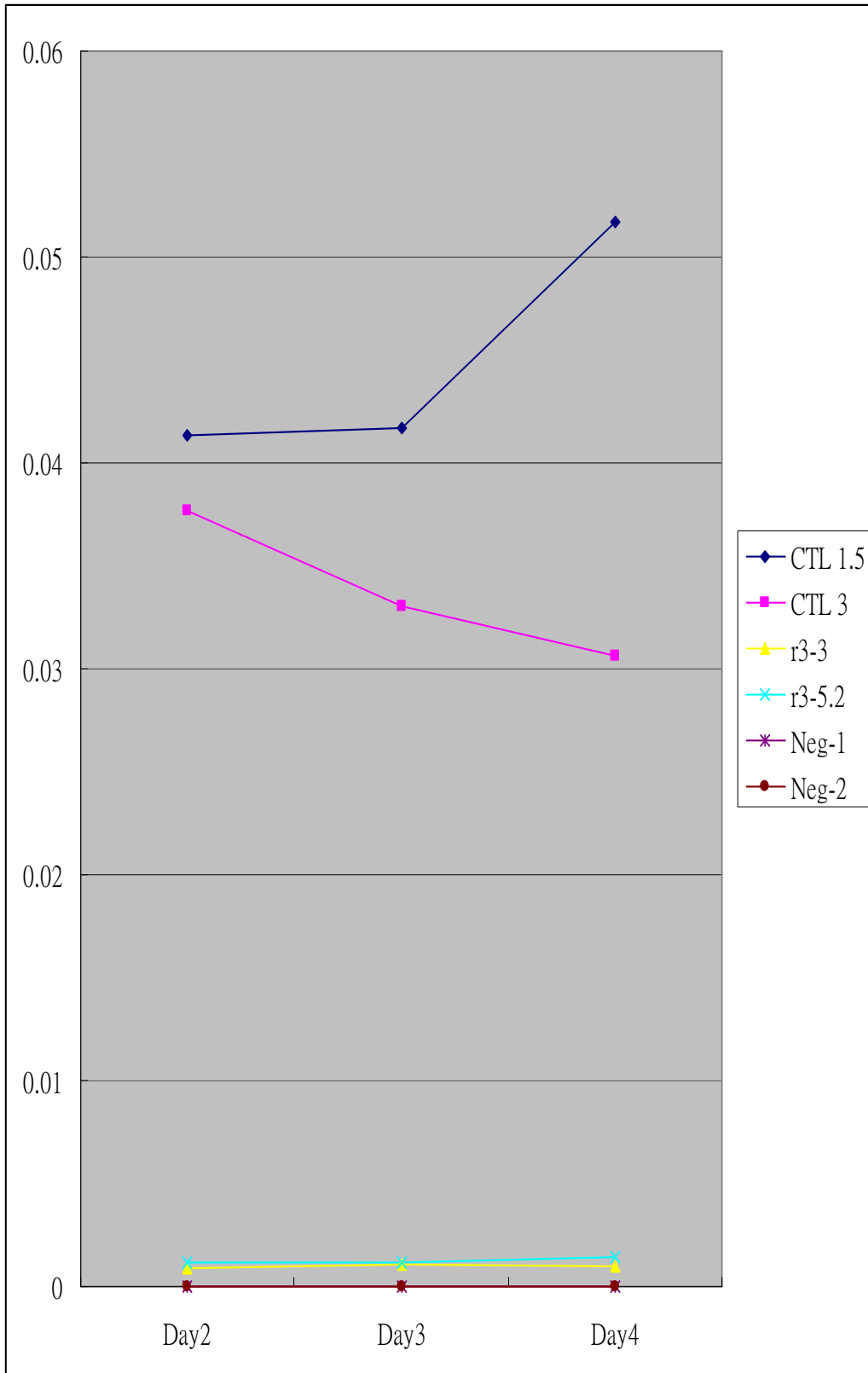
r3-3 以及r3-5.2為每well含有3ug以及5.2ug的pcDNA3.1-rspo3-SEAP

neg為negative control為只有HEK293細胞以及medium

註二：pcDNA3.1-CTL-SEAP濃度為1256 ug/ml

pcDNA3.1-rspo3-SEAP濃度為1246 ug/ml

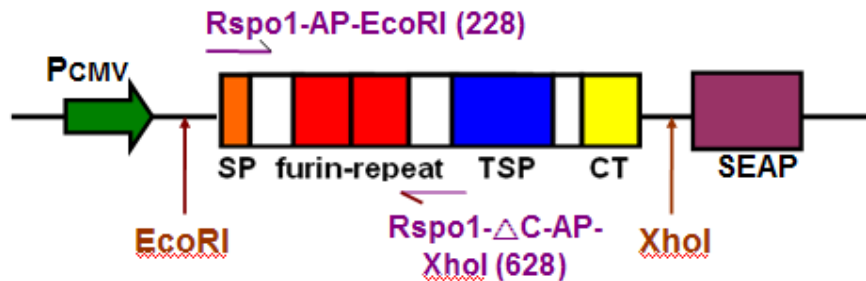
將上述表格數據用excel作圖，如下【圖四】



然而用 pcDNA3.1-*rspo3*-SEAP 作為轉染的載體，無論載體濃度升高與否，鹼性磷酸酶上升的幅度皆非常小。

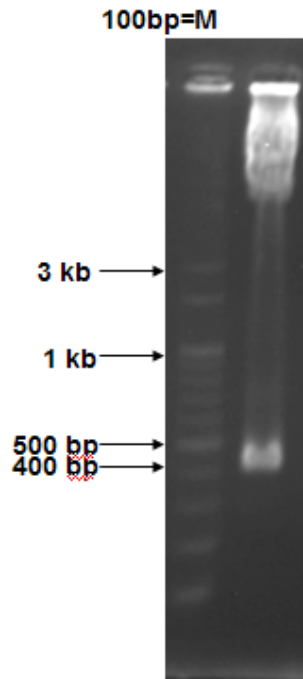
在和老師討論之後，發現文獻有提到將 *rspo* 家族基因的 C 端 (thrombospondin type I 區域以及富含正電荷的一段區域 C 端) 去除掉，會對於此基因在細胞中的表現有促進的效果。因此我們就另外設計了，會不含 C 端蛋白的 *rspo1*-SEAP 融合蛋白 (pcDNA3.1-*rspo1*- $\Delta$ C-SEAP) 的 primer，其構築流程如下 (如下圖五 A) 去放大其只含 signal peptide 以及 furin-repeat 的 region，我們預期大小為 407bp (如圖五 B)。

【圖五.A】構築 pcDNA3.1-*rspo1*- $\Delta$ C-SEAP 的示意圖

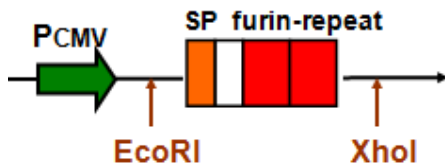




【圖五.B】：放大的基因片段（大約 407bp）



【圖五.C】：最後完成示意圖



將上述重組 DNA construct 好後，同先前 transfect 的步驟轉染到 HEK293 細胞裡。對第 2、3、4 天的 medium 執行 SEAP 活性之測試，結果見表二

表二：*rspo1-ΔC*-SEAP 表現仔體轉染至 HEK293，其 medium 中表現 SEAP 的活性

時間點	CTL 1.5	CTL 3	<i>r1-ΔC</i> -3	<i>r1-ΔC</i> -6	Neg-1	Neg-2
Day2_OD/min	0.0217	0.0152	-0.0001	0	-0.0001	0
Day3_OD/min	0.0412	0.0309	-0.0001	0	-0.0001	-0.0013
Day4_OD/min	0.0626	0.0487	0	-0.0001	-0.0001	-0.0001

註一：CTL1.5以及CTL3為well含有1.5ug以及3ug的pcDNA3.1-CTL-SEAP

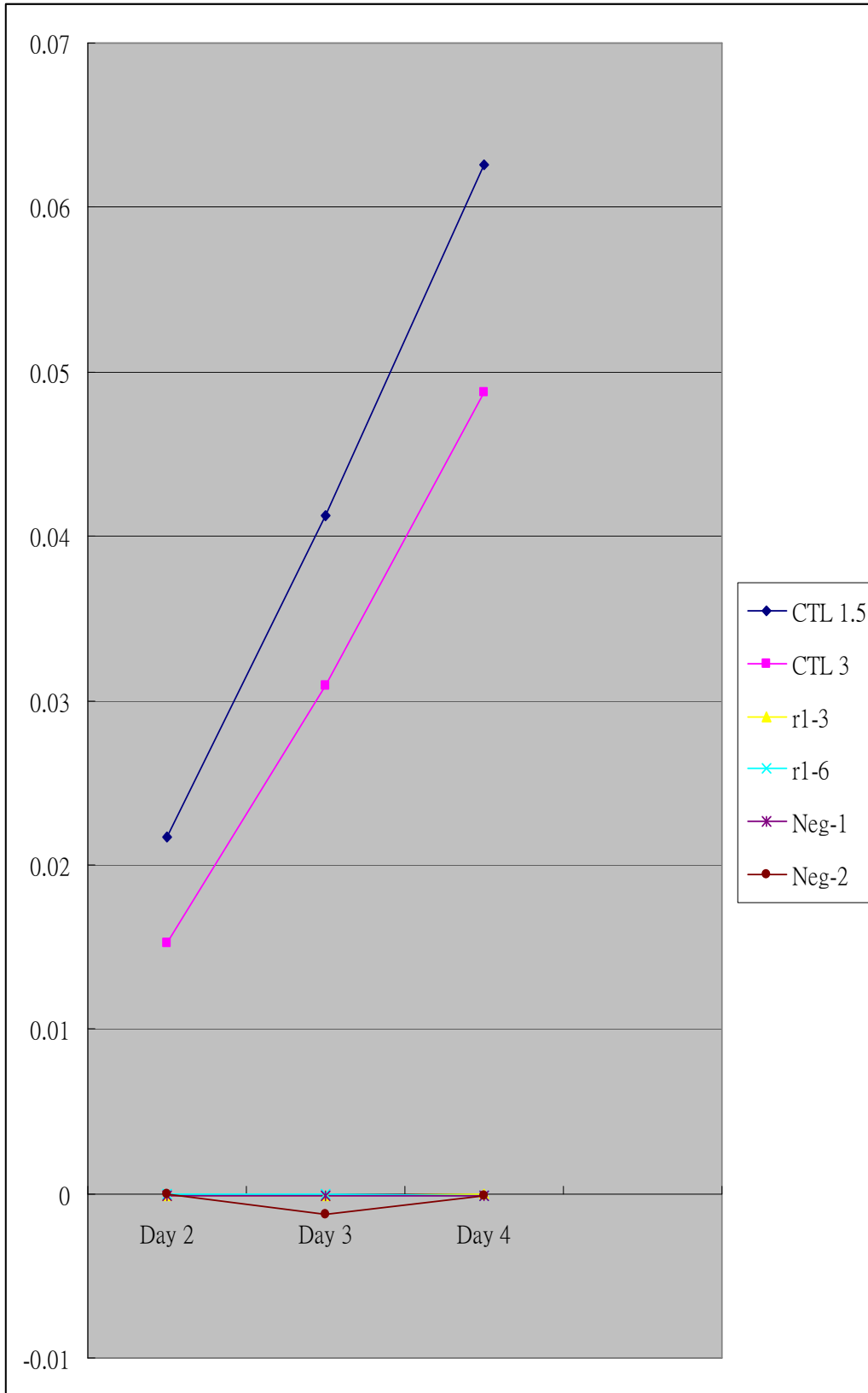
r1-3 以及r1-6為每well含有3ug以及6ug的pcDNA3.1-*rspo1*- $\Delta$ C-SEAP

neg為negative control為只有HEK293細胞以及medium

註二：pcDNA3.1-CTL-SEAP濃度為1256 ug/ml

pcDNA3.1-*rspo1*- $\Delta$ C-SEAP濃度為1874 ug/ml

將上述表格數據用excel作圖，如下【圖六】



根據以上實驗結果，pcDNA3.1-*rspo1*- $\Delta$ C-SEAP 轉染至 HEK293 細胞，測其 medium 中的鹼性磷酸酶的活性幾乎沒什麼上升，甚至跟 negative control 的結果類似，所以說 pcDNA3.1-*rspo1*- $\Delta$ C-SEAP 對於 Wnt/ $\beta$ -catenin 訊息傳遞幾乎影響。不過本次的 CTL-SEAP 的轉染結果，卻很穩定，而且有 dose-dependent 現象，顯是我個人在轉染技術已有長足的進步。

推測可能的原因為轉染技術的問題、細胞本身太老 (passage 次數過多) 亦或是重組 gene construct 的技術問題等等，所以導致其結果不如預期，又因為 *rspo1* 非常的不穩定，現在正思考新的表現方式，也不排除直接將此仔體注射至胚胎中表現。因為本次所表現是斑馬魚的基因，將其送進 HEK293 細胞，會因為物種的不同會有所問題。