

## 中文摘要

許多人類因三聯核酸重複序列擴增突變(expansion mutation)所導致的遺傳性神經及肌肉退化性疾病，大部分是由於 CAG 與其互補序列 CTG 所引起的。CAG 擴增突變通常發生在密碼區(coding region)，而 CTG 擴增突變通常發生在不轉譯區(untranslated region)。之前我們將長的 CTG 與 CAG 重複序列接在 GFP 基因的不轉譯區，注射到線蟲(*C. elegans.*)體內，發現到不論是 CTG 或 CAG 的重複序列都會對線蟲造成生理上的影響。

本研究中我們將不同長度 CAG repeats 接在綠螢光蛋白(EGFP)基因之 3'UTR (3'untranslated region)，並以 gamma-sarcoglycan (GSG)基因之 promoter 來驅動綠螢光蛋白在老鼠肌肉專一性表達。結果我們發現(CAG)<sub>200</sub> 轉殖基因鼠的綠螢光蛋白表現量會明顯的降低，而從出生時就已經開始。且(CAG)<sub>200</sub> 轉殖基因鼠初代肌肉細胞核內會有 RNA foci 的產生，但(CAG)<sub>200</sub> 轉殖基因鼠在表型上卻無肉眼可分辨的明顯異常。在生理及小鼠的行為表現上，我們發現(CAG)<sub>200</sub> 的轉殖基因公鼠較難使母鼠懷孕。在肌肉細胞的部份，會出現非典型的肌肉細胞特徵如：細胞核的數目較多，且有些核會位於細胞的中央。在琥珀醯酸去氫酶與 NADH 還原酶的病理染色中，我們發現(CAG)<sub>200</sub> 小鼠肌肉細胞含多較高活性琥珀醯酸去氫酶，而 NADH 還原酶的染色紋路也

有異常。我們所觀察到的結果可以肯定(CAG)<sub>200</sub> 的基因轉殖小鼠其肌肉細胞已出現明顯的病理變異，但此變異是局部性的。在肌肉電生理方面，我們並沒有很明顯的看見(CAG)<sub>200</sub> 有肌強直的情形。(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的成鼠肌肉細胞中 MyoD、Myf 5、myogenin、及 CHCR 等肌肉分化指標基因(muscle differentiation marker gene)有高量表現。

這些實驗結果，我們首次發現位於 3'端非轉譯區(3'UTR)的 CAG repeat 不僅會影響到簡單動物，如：線蟲的蟲體肌肉活動力下降及神經傳導異常，也會影響到哺乳類動物，如：小鼠肌肉及細胞型態改變、肌肉細胞分化遲緩及神經傳導受到影響。目前雖然沒有研究報告指出有哪一種人類神經肌肉方面的疾病或是其他方面的疾病是由 3'UTR 之 CAG 三聯核酸擴增突變所造成的，然而，這並不意味著沒有此一可能性，只是尚未知道。

## Abstract

Among human trinucleotide repeat disorders, the most frequent triplets found to be expanded are CAG and its complementary sequence, CTG. CAG repeats are almost always found in coding regions whereas CTG expansions are located in untranslated regions (UTRs). Previously we showed that expanded CTG and CAG repeat in the 3'-UTR of GFP both had pathogenic effect in transgenic *C. elegans*. To investigate the possible pathogenic effect of untranslated (CAG)<sub>n</sub> trinucleotide repeat in mammals, we made transgenic mice expressing a muscle-specific transcript with (CAG)<sub>200</sub> inserted in the 3'-UTR of EGFP gene. The long tract of CAG repeat was found to cause reduced protein expression of EGFP as evidenced by direct fluorescence and western blotting. Histological analysis of the muscle sections revealed atypical muscle cell morphology as well as abnormal staining patterns of succinate dehydrogenase and NADH activity in (CAG)<sub>200</sub> mice. Furthermore, mice expressing expanded CAG repeat exhibited a slight deviation in muscle tension recording, suggesting a sign of low muscle activity. By RNA fluorescent in situ hybridization, the muscle cells of (CAG)<sub>200</sub>

mice were shown to contain nuclear retentions of transcripts, or nuclear foci. Further analysis demonstrated that the expression of muscle differentiation markers, MyoD, Myf5, myogenine and CHCR, were upregulated in the muscle cells of adult (CAG)<sub>200</sub> mice. These effects were specific to CAG repeat because mice expressing EGFP RNA without CAG repeat did not differ from the nontransgenic mice in any aspects as mentioned above. This result is the first to show that the expanded CAG repeat in UTR could cause pathogenic effects in mice and suggested that disorders linked to untranslated CAG repeat expansion may exist in human.

## 前言

### 一、三聯核酸重複序列疾病

近年來陸續發現許多人類遺傳性神經及肌肉退化性疾病，是由於三聯核酸重複序列擴增突變(expansion mutation)所導致的，而依照其核酸重複序列轉譯與否，可分為二類。第一類疾病是其不正常核酸重複序列位於轉譯區(translated region)內，其特徵為基因座內有一段不穩定 CAG 核酸重複序列擴增突變，且其病徵會造成專一性的神經退化。這類疾病包括亨丁頓氏舞蹈症 (Huntington's Disease; HD) (Andrew et al., 1993; Duyao et al., 1993; Snell et al., 1993)、延髓肌萎縮症 (Spinal and bulbar muscular atrophy; SBMA) (La Spada et al. 1991)、小腦脊髓幹運動失調症候群 (Spinocerebellar ataxias; SCAs) (Jodice et al. 1994; Ranum et al. 1994)、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症 (Dentatorubral pallidolusian atrophy; DRPLA/Haw River Syndrome; HRS) (Koide et al. 1994)、Machado-Joseph disease (MJD) (Kawaguchi et al. 1994; Maciel et al. 1992)。第二類是其不正常核酸重複序列位於不轉譯區(untranslated region)內，其特徵為不穩定的 CGG 或 CTG 及位於插入子(intron)中 GAA 三聯核酸重複序列倍增突變所造成的疾病，此類疾病基因中三聯核酸重複序列倍增突變極為不穩定，可重覆上百次至上千次。此類基因突變會引起肌肉萎縮、智障、神經退化等臨床

症狀相異的遺傳疾病，致病機制可能為相關的 RNA 或蛋白質的量降低，導致正常蛋白功能的喪失或是影響到鄰近基因的表達。包括易脆 X 染色體症候群(Fragile X Syndrome) (Verkerk et al., 1991)、肌強直萎縮症(Myotonic Dystrophy; DM) (Mahadevan et al., 1992)、Friedreich's ataxia (FA) (Campuzano et al., 1996)及小腦脊髓運動失調症第八型(Spinocerebellar ataxia type 8; SCA8)(Michael et al., 1999)等，都屬於這一類型疾病。

在三聯核酸重複序列擴增突變所導致的遺傳性神經及肌肉退化性疾病中，絕大多數是由 CAG/CTG 擴增突變所引起的，但其致病機制並不相同，唯一類似之處是發病年齡與其重複次數有關，重複次數越多發病越早。其中 CAG 的重複次數大多在 150 次以內，且皆位於轉譯區內。換而言之，擴增突變會導致疾病基因產物含有過長的 polyglutamine。利用動物模式已證明擴增突變所產生的過長 polyglutamine 會形成核內包涵體(nuclear inclusions)，改變 protein folding homeostasis，進而造成漸進性神經系統方面的退化(Davies et al.1997; Warrick et al.; Faber et al. 1999; Satyal et al.2000)。然而 CTG 的重複次數大多在 150 次以上，甚至可以達到幾千次，且皆位於非轉譯區內。也就是說，擴增突變不會導致疾病基因產物改變。目前對於這種非轉譯區內 CTG 擴增突變的致病機制，並不清楚，且其研究主

要集中在 DM1。

## 二、強直型肌肉萎縮症(Myotonic dystrophy, DM1)

DM1 是一種體染色體顯性遺傳 (autosomal dominant)、神經肌肉方面的疾病。在臨床症狀的表現上主要包括肌肉收縮後不易放鬆、肌肉 (臉部、頸部、和四肢) 無力及漸進性萎縮等。除此之外亦可能影響眼睛、腦、皮膚、肺、心臟等器官及內分泌系統而出現白內障、智能障礙、禿頭、肺炎、心臟傳導缺陷、糖尿病、和男性不孕等症狀。

造成此一多系統疾病的主要原因係位於第十九對染色體長臂 (19q13.3) 上一段 CTG 三聯核酸重複序列，稱之為 DM1 locus (OMIM 160900; The IDMC 2000)，發生擴增突變所導致 (Brook et al. 1992; Fu et al. 1992; Mahadevan et al. 1992)。目前已知 DM 基因座內 CTG 擴增突變的致病機轉，包括會影響到本身的 DM protein kinase (DMPK) 基因和下游的 DM locus-associated homeo-domain protein (DMAHP，或稱為 Six5) 蛋白產量 (Aslanidis et al. 1992; Boucher et al. 1995; Brook et al. 1992; Buxton et al. 1992; Fu et al. 1992; Harley et al. 1992; Harris et al. 1996; Klesert et al. 1997; Mahadevan et al. 1992; Thornton et al. 1997)。他們是座落在於第十九對染色體的長臂上 (19q13.3) 相連的兩個基因。造成 DM 的 CTG 重複序列發生擴增突變位於 DMPK 基因的 3' 非轉譯區內，此區域亦是 DMAHP 基因

的驅動子區域 (promoter region)。由於 CTG 重複序列位於這兩個基因不轉譯區內，因此不太可能改變這些基因產物之特性。

目前研究證據顯示造成此一多系統疾病之機轉可能包括：

(1) 就 DMPK 而言，CTG 位於此基因的 3' 不轉譯區內，而 CTG 擴增突變後對 DMPK RNA 及蛋白質濃度產生改變。有報告指出 classic DM 和 congenital DM 病人 DMPK 的 RNA 和 蛋白質濃度皆比正常人低，顯示 CTG 擴增突變直接影響 DMPK 基因的表現 (Hofmann-Radvany et al. 1993；Fu et al. 1993)。此外，擴增後之 (CUG)<sub>n</sub> tract 可能會使得 DMPK RNA 無法被送出核外，造成 nuclear retention (Davis et al. 1997)。最近的研究顯示 (CUG)<sub>n</sub> tract 會影響 DMPK 的 RNA processing，使得 DMPK mRNA isoforms 在核內外的 ratio 發生改變並進而產生 dominant effect (Tiscornia and Mahadevan 2000)。研究 DMPK 基因從正常老鼠體內剔除的實驗發現，這些老鼠有晚發行漸進性肌病 (progressive myopathy) 產生，利用電生理測試發現這些老鼠出現心臟傳導不良 (Berul et al. 1999)，但並沒有出現白內障，肌強直等典型 DM1 症狀，顯示 DMPK 在維持骨骼肌的構造及功能上是必須的，卻不是造成 DM1 的唯一關鍵因素 (Reddy et al. 1996；Jansen et al. 1996)。

(2) CTG 擴增突變會改變鄰近區域染色體的構造 (Otten et al.



1995)，造成很強的核體位置元素(nucleosome positioning elements) (Wang et al 1994; Wang et al 1995)。核體(nucleosome)是由 146 bp DNA 纏繞八個組織蛋白複合體(octamer of histone proteins)而形成的，是染色體構造的基本單位，此一構造會抑制轉錄的進行，使基因無法正常表達。而 nucleosome 形成的速率隨 CTG 的擴增而增加，所以 CTG 擴增突變可能會影響到某些基因(DMAHP 亦稱 SIX5)的表達，進而造成 DM。Klesert 及 Thornton 等人觀察到 DM 患者肌肉細胞內 DMAHP 之 RNA level 較正常人為低(Klesert et al. 1997; Thornton et al. 1997) 而且是隨 CTG 擴增的增加而降低，雖然並沒有直接證據證明 DMAHP 之 RNA level 之降低係因驅動子活性改變的緣故，他們的結果初步肯定上述說法。由於 DMAHP 是一 homeodomain-encoding gene，其基因產物很有可能是一種與個體發育有關的轉錄因子。利用  $\beta$ -gal 為 reporter gene 接至 DMAHP 基因的驅動子區域之下游而做成 fusion gene，然後以 transgenic mice 當模型，Heath 等人(1997)觀察此 fusion gene 在老鼠胚胎發育過程之表達而發現到 DMAHP 基因的驅動子在 12.5 天的胚胎即活化，而且在多個出現 DM 臨床症狀的器官有活性。雖然他們的結果並不能代表真正 in vivo 的情形，這些觀察也顯示說 DMAHP 是一與個體發育有關的基因，並且 CTG 擴增突變造成 DMAHP 基因表達之不足(haplo-insufficiency)可能與

DM 的多系統臨床症狀 (multisystematic symptoms) 有關。最近利用基因剔除小鼠的研究報告證明 DMAHP (or Six5) gene loss 足以造成白內障 (Klesert et al. 2000 ; Sarker et al. 2000)。

(3) RNA gain of function mutation:利用基因轉殖鼠表現 expanded (CUG) $n$  repeats 研究顯示，不論肌肉細胞內擴增突變(CUG) $n$  tract 是否位於疾病基因 DMPK，皆會造成 DM 主要臨床症狀肌強直 (myotonia)及肌病變(myopathy)(Mankodi et al. 2000; Seznec et al. 2001)，顯示 expanded (CUG) $n$  repeats 會導致 gain of function 的作用。可能的機制除了影響 polyadenylation (Wang et al. 1995)及 splicing (Philips et al. 1998)外，expanded (CUG) $n$ -RNA 亦可能透過一些 RNA-binding protein 來作用。例如過長的(CUG) $n$ -RNA 可能會 sequester 細胞內的 CUG-binding protein，進而影響 CUG-binding protein 在細胞內的正常功能，如干擾或破壞 CUG-containing RNA 之 processing、代謝和運輸( Wang et al. 1995 ; Korade-Mirnic et al.1998 )。目前對於這些 RNA binding protein 分子之作用對象及其生理功能，只有初步的認識。但已有越來越多的研究顯示這些 RNA binding protein，如 ETR-1 (Milne and Hodgkin. 1999)、CUGBP1 (Timchenko et al. 2001)、muscleblind (Miller et al.2000; Mankodi et al. 2001)等，可能與 DM1 的致病機制有關。

### 三、CAG 三聯核酸重複序列擴增--基因轉殖線蟲研究

如前所述，絕大多數的 CAG 三聯核酸重複序列擴增皆位於轉譯區內，形成過長的 polyglutamate 而致病。而對於在非轉譯區內 CAG 三聯核酸重複序列擴增突變可能產生的作用及其影響，目前尚未有研究報告。在先前的研究中，發現部分 DM1 病人在 MJD、SCA8 loci 亦有偏高之 CAG repeat tract (Pan et al.submitted)。利用 repeat expansion detection (RED)技術進行全基因體掃描(whole genome scan)，亦有報告指出在 HD、MJD 及 SCA1 病人中曾發現在疾病基因座以外區域存在 CAG/CTG 三聯核酸重複序列擴增突變(Hofferbsert et al.1997; Martorell et al.1997)。因 RED 無法知道突變位置(Schalling et al. 1993)，故不清楚這些突變影響之基因及其生理效應為何。這些觀察也暗示 CTG/CAG 擴增突變可能發生在三聯核酸重複序列疾病病人基因體內多個 loci，且造成臨床症狀。藉著 electron microscope 以及 thermal melting and nuclease digestion studies 顯示(CUG)<sub>>20</sub> RNA 易形成 stable RNA hairpins (Napierala and Krzyzosiak 1997;Michalowski et al. 1999;Tian et al. 2000)，使得 double-strand RNA binding protein 可以結合上去(Miller et al. 2000)。同樣地，(CAG)<sub>>20</sub> RNA 也可能形成 stable RNA hairpins，而導致相同的結果。

在實驗室先前的研究中，利用線蟲(*C. elegans*)作為基因轉殖動

物，將不同長度 CAG repeats 插入綠螢光蛋白(GFP)基因之 3'UTR (3'untranslated region)，並以專一性表達在線蟲肌肉細胞的 promoter 來驅動 GFP 的表達。發現 GFP 與 GFP-(CAG)<sub>5</sub> 的基因轉殖線蟲活動力與非基因轉殖線蟲無異，但 GFP-(CAG)<sub>120</sub> 的基因轉殖線蟲活動力明顯的較差。此外，利用螢光顯微鏡觀察可發現基因轉殖線蟲之 GFP 螢光表現量隨 CAG 長度的增加而變弱。以電生理分析 (electrophoreograph analysis)得知 GFP-(CAG)<sub>120</sub> 基因轉殖線蟲的肌神經傳導反應有明顯差異(Hsiao et al, manuscript in preparation)。

如果 GFP-(CAG)<sub>n</sub> 會造成基因轉殖線蟲肌肉功能喪失，意謂 human genome 內，除了 DMPK gene 與 SCA8 之(CTG)<sub>n</sub> loci 外，位於其他基因不轉譯區的 CAG 若產生擴增突變亦有可能造成生理功能不正常，甚至疾病的發生。因此本論文即以轉殖基因小鼠動物模式來探討位於不轉譯區內的 CAG 重複序列對小鼠肌肉發育的影響，是否過長的 CAG 重複序列也會造成肌肉生理功能不正常，甚至疾病的發生。

我們將不同長度 CAG repeats 接在綠螢光蛋白(EGFP)基因之 3'UTR(3'untranslated region)，並以 gamma-sarcoglycan (GSG)基因之 promoter 來驅動 EGFP 的肌肉專一性表達。實驗結果初步顯示，(CAG)<sub>200</sub> 之重複序列會造成小鼠肌肉細胞分化及酵素的異常，而對肌肉生理功能的影響尚待進一步的分析。

## 材料與方法

### 一. 轉殖基因質體的構築：

#### A. pGSG-EGFP

##### 1. Gamma-sarcoglycan(GSG) promoter 的部分

由 Eijiro Ozawa 提供的質體，利用限制酶 Kpn I 和 Xma I 將其 promoter 的部分切下，再利用膠體回收大約 1.5 kb 的 DNA 片段。

##### 2. pEGFP-1 vector (U55761)

此質體是從 CLONTECH Laboratories 所購買 (GenBank #:U55761)，利用限制酶 Kpn I 和 Xma I 將其切開，再利用膠體回收大約 4.2 kb 的 DNA 片段。

利用 T4 DNA ligase 使 GSG promoter 插入 pEGFP-1 質體的 EGFP 基因之前(附圖一)。

#### B. pGSG-EGFP-(CAG/CTG)<sub>23</sub>

##### 1. pGSG-EGFP 的部分

利用限制酶 Not I 將其切開，再利用膠體回收大約 5.7 kb 的 DNA 片段。

##### 2. (CAG/CTG)<sub>23</sub> 三聯核酸重複序列的部分

利用限制酶 Not I 將 pGEMT-CTG<sub>23</sub> 質體(由李逸揚學長

所提供) 切出(CAG/CTG)<sub>23</sub> 三聯核酸重複序列，再利用膠體回收大約 80 bp 的 DNA 片段。

利用 T4 DNA ligase 使(CAG/CTG)<sub>23</sub> 三聯核酸重複序列接入 pGSG-EGFP 質體 EGFP 基因之 3'-UTR 區(附圖二)。

### C. pGSG-EGFP-(CAG/CTG)<sub>200</sub>

#### 1. pGSG-EGFP-1 (在 Multiple Cloning Site 沒有 Eco RI 切點)

利用限制酶 Eco RI 將 pGSG-EGFP 切開，再用 Klenow 補齊後，最後利用 T4 DNA ligase 讓其 self ligation，得到一在 Multiple Cloning Site 沒有 Eco RI 切點的質體。(附圖三)

#### 2. pGSG-EGFP-1(3'UTR-Eco RI)

用限制酶 Not I 從 pGEMT-CTG<sub>23</sub> 切出含有 EcoRI 的三聯核酸重複序列，並將其接入 pGSG-EGFP-1 質體的 Not I site。再用限制酶 Eco RI 將(CAG/CTG)<sub>23</sub> 三聯核酸重複序列切出，膠體回收約 5.7 kb 的 DNA 片段，讓其 self ligation，如此一來就能使得限制酶 Eco RI 的切點出現在 EGFP 的 3'UTR 的位置上。(附圖四、附圖五)

#### 3. 用限制酶 Eco RI 將(CAG/CTG)<sub>200</sub> 三聯核酸重複序列的部分

分，從 Myo-3-(CTG/CAG)<sub>200</sub> 切出(此質體是由李逸揚學長所提供)，再利用膠體回收大約 0.6 kb 的 DNA 片段。將此片段

接入以 Eco RI 切開的 pGSG-EGFP-1(3'UTR-Eco RI)質體中  
即得 (附圖六)。

## 二. 基因轉殖鼠的產生

利用限制酶 Afl II 將 GSG-EGFP 轉殖基因的 DNA 片段從上述 A 質體切出，此片段約為 2.3 kb，含 1320 bp 的 GSG promoter，700 bp 的 EGFP 及 300 bp 的 poly A tail。同樣用限制酶 Afl II 將 GSG-EGFP-(CAG/CTG)<sub>23</sub> 轉殖基因的 DNA 片段從上述 B 質體切出，此片段與上述片段相同，除了在 EGFP3'-UTR 多了一段 (CAG/CTG)<sub>23</sub>。GSG-EGFP-(CAG/CTG)<sub>200</sub> 需要利用限制酶 Afl II 和限制酶 Rar II 將其從 pGSG-EGFP-(CAG/CTG)<sub>200</sub> 切出，全長約 2.9 kb。

所有的轉殖基因片段，皆經過膠體純化回收，以 microinjection 方式打入小鼠的單細胞受精卵，並植入假孕母鼠體內著床發育。此部份的實驗操作是由中央研究院分生所 李鴻 博士所提供協助。

## 三. 轉殖基因鼠的篩選

### A. Genomic DNA 的抽取

所有老鼠尾巴組織是剪取自出生大約 3 個星期的小鼠，並

抽取其 Genomic DNA。Genomic DNA 的抽取是利用 Blood & Tissue Genomic DNA Miniprep Kit (Viogene)，操作方法參照所附之操作手冊。或以下列方法操作：將剪取下來的老鼠尾巴組織(大約 0.3-0.5 cm)，用剪刀剪碎後加入 500  $\mu$ l 的 Genomic lysis solution ( 20 mM Tris buffer pH 8.0、150 mM NaCl、100 mM EDTA、1% SDS )，5 $\mu$ l 的 Proteinase K ( 20mg/ml )混和均勻後在 60°C 反應 16 小時，再加入 500  $\mu$ l phenol/chloroform ( 1:1 ) 萃取 genomic DNA，均勻搖晃(不可劇烈震盪)約時 5 分鐘，離心(轉速 14000 rpm，3 分鐘)取其上清液，重複萃取 3 次後加入 2 倍上清液體積的 100%酒精，上下輕輕搖晃 5 到 10 分鐘 genomic DNA 會形成線圈圈出，倒掉上清液加入 500  $\mu$ l 70%酒精上下輕輕搖晃 5 分鐘，倒掉上清液在空氣中晾乾，加入 150  $\mu$ l 60°C 二次水溶解 genomic DNA，保存在-20°C。

#### B. 聚合酶連鎖反應( Polymerase Chain Reaction，PCR )

轉殖基因鼠篩選是利用 PCR 來放大轉殖基因鼠特有的 DNA 片段，PCR 反應的系統是採用 GeneAmp PCR System 2400 (PERKIN ELMER) 與 GeneAmp PCR System 9700 (PERKIN ELMER)，在 20  $\mu$ l 的反應體積中，含有 1  $\mu$ l 小鼠尾巴的 genomic DNA，2  $\mu$ l 10X PCR Buffer，2  $\mu$ l dNTP (2mM)，



0.4  $\mu$ l EGFP-nf2 (10  $\mu$ M) primer 及 0.4  $\mu$ l EGFP-cr1(10  $\mu$ M) primer , 0.2  $\mu$ l Thermoprime Plus DNA polymerase (ABgene) 。  
PCR 反應條件 94 °C 4 分鐘 ; 94°C 45 秒、55°C 45 秒、72°C 1 分鐘 15 秒、35 個循環 ; 72°C 10 分鐘 , 反應結束後取 5  $\mu$ l 加 1  $\mu$ l 6X DNA Loading dye 混勻 , 以 1.2 % Agarose 膠體電泳分析。

### C. 南方點墨法 (Southern blot analysis)

取 10  $\mu$ g 小鼠尾巴 genomic DNA 用 100 U 限制酶 Bam HI 在 37°C 作用 16-20 小時後, 加入體積 0.05 倍的 8M ammonium acetate ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) 及體積 2.5 倍的 100% 酒精混勻 , 置於 -20°C 2 小時後離心 (轉速 14000 rpm , 20 分鐘) , 移去上清液之後, 將沉澱出來的 DNA 置於室溫乾燥並用 25  $\mu$ l 的二次水回溶, 再加入 5  $\mu$ l 6X DNA Loading dye 混勻, 以 0.8 % Agarose 膠體進行電泳, 電泳條件為 25V 16 小時, 經 EtBr 染色後拍照存證。接著以 0.5 N NaOH/ 1.5 M NaCl 處理 Agarose 膠 1.5 小時使 DNA 變性, 再以 0.5 M Tris pH7.4/ 1.5 M NaCl 處理 Agarose 膠 1.5 小時中和膠體, 接著用 10X SSC 將變性 DNA 轉移至 nylon membrane (NEN) 至少 18 小時, 以 UV- cross link 將變性 DNA 固定在 membrane, 而 UV- cross link 採用的系統

是 UV stratalinker 1800 (STRATGENE)內建的 AUTO CROSS LINK 的功能。UV- cross link 之後將 membrane 置於 10 ml 的 pre- hybridization buffer (50% formamide deionized、5X SSC、5X denhardts、1% glycine、50 mM sodium phosphate pH 6.5、500 µg/ml salmon sperm denatured)在 42°C 下作用 6 小時。而 DNA 探針(DNA probe)的合成是利用 Random Primed DNA Labeling Kit (Roche)與  $\alpha$ -[p<sup>32</sup>]-dCTP 來標幟(label)，而 GSG 與 EGFP 兩個探針分別利用 Bam HI、Xma I 與 Bsr GI 從 pGSG-EGFP 所切下，利用膠體回收大約 0.9 kb 與 0.7 kb 的 DNA 片段，標幟方式參照 Random Primed DNA Labeling Kit 所附之操作手冊。將標幟好的探針以 G50 column 來回收，G50 column 製作如下：以 1 ml 的注射針筒填上一層玻璃棉 (Glass wood)，再填入經 TE buffer (pH 8.0)處理過的 Sephadex G50 樹脂，將針筒離心(轉速 1000 rpm，1 分鐘)，如此反覆裝填離心到取得 1 ml 左右的 Sephadex G50 樹脂。將用 G50 column 回收的探針，以 99°C 加熱 10 分鐘並立即插入冰中來使 DNA 探針變性，再將變性 DNA 探針加入 10 ml hybridization buffer (50% formamide deionized、5X SSC、5X denhardts、10% dextran sulfate、20 mM sodium phosphate pH

6.5、300  $\mu\text{g/ml}$  salmon sperm denatured)在  $42^{\circ}\text{C}$  下作用至少 16 小時。清洗步驟分為冷洗及熱洗；冷洗是在含有 2X SSC 和 0.1% SDS 溶液中，室溫清洗 2 次每次 15 分鐘，熱洗是在含有 0.2X SSC 和 0.1% SDS 溶液中， $60^{\circ}\text{C}$  清洗 2 次每次 30 分鐘。用 IMAGING PLATE (FUJIFILM) 壓片並經磷光分析儀判讀。

#### D. PCR-based Southern blot

先利用 PCR 來放大轉殖基因鼠特有的 DNA 片段，PCR 反應的系統是採用 GeneAmp PCR System 2400 (PERKIN ELMER) 與 GeneAmp PCR System 9700 (PERKIN ELMER)，在 20  $\mu\text{l}$  的反應體積中，含有 1  $\mu\text{l}$  老鼠尾巴的 genomic DNA，2  $\mu\text{l}$  10X PCR Buffer，2  $\mu\text{l}$  dNTP (2mM)，0.4  $\mu\text{l}$  EGFP-nf1 primer (10  $\mu\text{M}$ ) 及 0.4  $\mu\text{l}$  EGFP-cr2 primer (10  $\mu\text{M}$ )，0.2  $\mu\text{l}$  FastStart Taq DNA polymerase (Roche)。PCR 反應條件  $95^{\circ}\text{C}$  4 分鐘； $95^{\circ}\text{C}$  45 秒、 $55^{\circ}\text{C}$  45 秒、 $72^{\circ}\text{C}$  1 分鐘 15 秒、35 個循環； $72^{\circ}\text{C}$  10 分鐘。PCR 產物以 Southern blot 方式來作分析，此分析是利用非放射性的 Quick-Light detection system (Life Codes)。做法簡述如下：取 5  $\mu\text{l}$  PCR 產物加 1  $\mu\text{l}$  6X DNA Loading dye 混勻，以 1% Agarose 膠體進行電泳。後轉至 nylon

membrane (NEN)； membrane 與探針(Alkaline phosphatase-coupled (CTG)<sub>10</sub>)於 42°C 進行雜交，再依照操作手冊清洗 membrane。接著將 Lumi-Phos 480 dioxetane solution 均勻噴灑在 membrane 上，等待 5 分鐘反應後並經冷光螢光分析系統判讀。

#### 四. 轉殖基因的表達

##### A. Total RNA 的抽取

取下基因轉殖鼠身體十個部分的組織，大小大約 100-500 mg，利用 TRIAGENT(Molecular Research Center, Inc)來抽取 total RNA，抽取方式參照 TRIAGENT 所附之操作手冊。最後將抽取好的 total RNA，以光度比色儀 (Spectrophotometr)測其波長 260 nm 的吸光值及 260 nm/280 nm 吸光比值。

##### B. 純化 RNA

取 10 µg total RNA 加入適量的 DNase，於 37°C 反應 16 小時後，使用 DEPC 水將體積放大到 400 µl phenol/chloroform 萃取與酒精沉澱來純化經 DNase 處理過的 RNA。

##### C. 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

## 1. 反轉錄(RT)

取 3 $\mu$ g 到 5 $\mu$ g 的已純化 RNA 加入 1  $\mu$ l Oilgo dT primer (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l)混合均勻後，於 70 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，立即冰浴 1 分鐘，再利用離心的方式將 eppendrof 管壁上的液體帶下，隨後加入 2  $\mu$ l 10X SuperScript RTase buffer、1  $\mu$ l 10 mM dNTP、2  $\mu$ l 0.1 M DTT，於 42 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘，最後加入 1 $\mu$ l SuperScript II RTase (Roche)，總體積是 20  $\mu$ l，並於 42 $^{\circ}$ C 反應 60 分鐘，再 70 $^{\circ}$ C 反應 15 分鐘，使 RTase 失去活性，保存在-20 $^{\circ}$ C。

## 2. 聚合酶連鎖反應(PCR )

取上述 RT 之後的 cDNA 1  $\mu$ l 進行 PCR 反應，在 20  $\mu$ l 的反應體積中，含有 2  $\mu$ l 10X PCR Buffer，2  $\mu$ l dNTP (2 mM)，0.4  $\mu$ l EGFP-nf2 (10  $\mu$ M) primer 及 0.4  $\mu$ l EGFP-cr1(10  $\mu$ M) primer，0.2  $\mu$ l Thermoprime Plus DNA polymerase (ABgene)。PCR 反應條件 95  $^{\circ}$ C 4 分鐘；95 $^{\circ}$ C 45 秒、55 $^{\circ}$ C 45 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分鐘 15 秒、35 個循環；72 $^{\circ}$ C 10 分鐘，反應結束後取 5  $\mu$ l 加 1  $\mu$ l 6X DNA Loading dye 混勻，以 1.2 % agarose 膠體電泳分析。

#### D. 北方點墨法 (Northern blot)

20  $\mu$ l 的 RNA 溶液中，含 20  $\mu$ g 老鼠肌肉 total RNA，2  $\mu$ l 10X formaldehyde gel-running buffer pH 7.0 (0.2 M MOPS、50 mM sodium acetate、10 mM EDTA)，3.5  $\mu$ l formaldehyde，10  $\mu$ l formamide。置於 95°C 10 分鐘立即冰浴 15 分鐘，加入 5  $\mu$ l 的 5X RNA Loading dye 和 1  $\mu$ l EtBr 混勻，以 1 % agarose 膠體(10% 10X formaldehyde gel-running buffer、10% 37% formaldehyde)進行電泳，電泳條件為 20V 16 小時並拍照存證。接著以 DEPC 水室溫處理 agarose 膠 0.5 小時，接著用 10X SSC 將 RNA 轉移至 nylon membrane (NEN)至少 18 小時，以 UV-cross link (AUTO CROSS LINK, UV stratalinker 1800, STRATGENE)將 RNA 固定在 membrane。之後將 membrane 置於 10 ml 的 pre-hybridization buffer (6X SSC、2X dextran sulfate、20% SDS、400 $\mu$ g/ml salmon sperm DNA denatured)在 60°C 下作用 6 小時，而 DNA 探針(DNA probe)的合成是利用 Random Primed DNA Labeling Kit (Roche)與  $\alpha$ -[p32]-dCTP 來標幟(label)，標幟方式參照 Random Primed DNA Labeling Kit 所附之操作手冊。將標幟好的探針以 G50 column 來回收，將用 G50 column 回收的探針，以 99°C 10 分鐘並立即插入冰中來使 DNA 探針變性，再將變性 DNA 探針加入 pre-

hybridization buffer 在 60°C 下作用至少 16 小時。清洗步驟分為冷洗及熱洗；冷洗是在含有 2X SSC 和 0.1% SDS 溶液中，室溫清洗 2 次每次 15 分鐘，熱洗是在含有 0.2X SSC 和 0.1% SDS 溶液中，60°C 清洗 2 次每次 30 分鐘。用 IMAGING PLATE(FUJIFILM)壓片並經磷光分析儀判讀。

## E. 蛋白質的表現

### 1. 蛋白質的抽取

取下基因轉殖鼠的組織，大小大約 500 mg-1 g，加入 1 ml protein lysis buffer(15 mM Tris-base、250 mM sucrose、1 mM EDTA、2 mM PMSF)並均質化，再用超音波(sonicator)強度 7、20 分鐘破細胞，置於 4°C 離心(轉速 12000 rpm，20 分鐘)，取其上清液保存在 -20°C。

### 2. 膠體的製備

配製 3.5 ml 含有 SDS 之 12.5% polyacrylamide (組成如下：1.38 ml 40% acrylamide : bisacrylamide = 29 : 1、1 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8、20  $\mu$ l 20% SDS、500  $\mu$ l 10% APS、2  $\mu$ l TEMED)的下層膠(running gel)倒入已架設好的電泳玻璃，再以二次水壓平液面，待下層膠凝集後，倒掉二次水。再倒

入 stacking gel 2.0 ml 含有 SDS 之 3% polyacrylamide (組成如下 187.5  $\mu$ l 40% acrylamide : bisacrylamide = 29 : 1、500  $\mu$ l 0.5 M Tris- HCl pH 6.8、10  $\mu$ l 20% SDS、100  $\mu$ l 10% APS、2  $\mu$ l TEMED)，插入齒模 (comb)。確定膠凝集後拔出齒模，並將玻璃連同膠置於電泳槽中，電泳槽內外要充滿 running buffer。

### 3. 西方點墨法 (Western Blot)

配置 12.5% SDS-PAGE，sample 與 sample buffer 混合後煮沸 5 分鐘，使蛋白質變性，再 loading 到 gel，用 120V 2 小時進行電泳分析，將電泳後的 gel 以 transfer buffer 浸泡，於室溫溫和搖盪 10 分鐘。將 gel 緊貼於 PVDF 上，置於 mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad) 轉印 1 小時(100V)。(PVDF 使用前處理：將 PVDF 以適量甲醇浸泡 5 分鐘，接著再用二次水洗去甲醇，並在室溫中搖盪 5 分鐘，最後將 PVDF 再浸泡 transfer buffer 至少 10 分鐘。) 將 PVDF 浸泡於 50 ml TBS buffer (含 3% skim milk) blocking，室溫下溫和搖晃至少 30 分鐘或 4°C 放置過夜。PVDF 置於夾鏈袋中，加入 5 ml TBS buffer (含 3% skim milk 再加入 10  $\mu$ l EGFP Ab (1:500) 或 5  $\mu$ l  $\beta$ -tublin Ab (1:1000)，最後將氣泡趕走，再將夾鏈袋密封，



室溫搖晃至少兩小時或 4°C 放置過夜，再以 TBS buffer 清洗 PVDF 10 分鐘 3 次。將 PVDF 置於夾鏈袋中，加入 5 ml TBS buffer 含 3% skim milk 及 1.7  $\mu$ l anti-mouse Ab (1:3000) 或 1.7  $\mu$ l anti-rabbit Ab (1:3000)，趕走氣泡，再將夾鏈袋密封，於室溫搖晃至少一小時。以 TBS buffer 清洗 PVDF 10 分鐘 3 次。呈色是使用 SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate Kit (PIERCE)，先將第一劑與第二劑以 1:1 的比例混合，等待 5 分鐘反應後並經冷光螢光分析系統判讀。

## 五. 組織染色與免疫化學染色

### A. 組織石臘包埋

將取下之組織置於 4% PFA/PBS (4% paraformaldehyde in PBS) 於 4°C 過夜，再用 1X PBS 清洗 5 分鐘 2 次後，送中山醫學大學病理科脫水及包埋，或依下列方式進行脫水及包埋：依序浸泡在 1X PBS 4°C 30 分鐘、Saline (0.85% NaCl /PBS) 4°C 30 分鐘、Saline/100%酒精 1:1 室溫 15 分鐘、70%酒精 室溫 15 分鐘 2 次、85%酒精 室溫 15 分鐘、85%酒精 室溫 30 分鐘、95%酒精 室溫 30 分鐘、100%酒精 室溫 30 分鐘 2 次、二甲苯(xylene) 室溫 30 分鐘、二甲苯(xylene)/石臘(paraffin) 1:1 60°C 1 小時、石臘 60°C 20 分鐘 3 次，最後一次將組織固定

在石臘中室溫使其凝固。

## B. 玻片處理

將玻片浸入 95% 酒精潤洗 3 次每次 10 下，風乾後再浸入含有 2 % 3-丙胺三乙氧基-SILANE(3-aminopropyltriethoxy-SILANE, APTS) (Sigma)的丙酮溶液中靜置 2 分鐘，然後浸入二次水潤洗 3 次每次 10 下，置於 60°C 烘箱中 18 小時後備用。

## C. Hematoxylin and Eosin 染色

將組織切片(5 $\mu$ m)依序浸入二甲苯(xylene)溫和搖盪 2 次每次 10 分鐘、100%酒精 室溫 10 分鐘 2 次、70%酒精 室溫 10 分鐘、50%酒精 室溫 10 分鐘、二次水 室溫 5 分鐘、Hematoxylin 室溫 3 分鐘、自來水清洗 室溫 5 分鐘、80%酒精 室溫 1 分鐘、Eosin 室溫 3 分鐘、95%酒精 室溫 15 秒、100%酒精 室溫 2 分鐘 2 次、二甲苯(xylene) 2 分鐘 2 次、最後以 cytooseal 封片保存。

## D. 冷凍切片

取適當月齡老鼠的比目魚(Soleus)肌，不能固定(fixation)以維持酵素活性。先用薄薄一層 OCT 包住比目魚肌，放入低溫(-80°C)的 isopropanol 中 10 秒，再丟入液態氮下將小鼠肌肉

組織急速冷凍，利用冷凍切片機將其切約 8  $\mu\text{m}$ ，再將切片迅速貼於玻片上，最後置於室溫風乾，剩餘的組織可置於-20°C 冰箱保存。

#### E. 螢光表現

將肌肉冷凍切片置於室溫風乾 30 分鐘後，浸泡二次水 5 分鐘後用水溶性封片膠封片，利用共軛焦顯微鏡觀察其螢光表現。

#### F.琥珀醯酸去氫酶 (succinate dehydrogenase)

將切好的新鮮冷凍切片(8  $\mu\text{m}$ )，放在室溫中乾燥 30 分鐘，再將乾燥好的冷凍切片浸潤在 incubation medium (100 mg sodium succinate (sigma)、5 mg nitro blue tetrazolium (NBT)、0.25 mg phenazine methosulphate/10 ml 0.2 M Tris buffer pH 7.4) 37°C 60 分鐘，用二次水清洗 5 分鐘，及可利用水溶性封片膠封片。

#### G. NADH 還原酶 (nicotinamide adenine dinucleotide reductase)

將切好的新鮮冷凍切片(8  $\mu\text{m}$ )，放在室溫中乾燥 30 分鐘，再將乾燥好的冷凍切片浸潤在 incubation medium (8 mg nicotinamide adenine dinucleotide (sigma)、10 mg nitro blue

tetrazolium (NBT) /10 ml 0.2 M phosphate buffer pH 7.6) 37°C

30 分鐘，用二次水清洗 5 分鐘，後用 30% acetone、60% acetone 和 90% acetone 褪染各 20 秒，再用二次水清洗 5 分鐘，及可利用水溶性封片膠封片。

## 六. 橫膈膜張力紀錄 (Muscle Tension Recording)

所採用的實驗小鼠，年齡大於 2 個月。

### A. 橫膈膜之分離。

橫膈膜之分離仍是依據 Bulbring (1946) 的方法，將分離的組織浸浴於混合氣(95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>)飽和的 Krebs 溶液中，其組成如下: NaCl 131 mM、KCl 4.8 mM、MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM、CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM、NaHCO<sub>3</sub> 12.5 mM 和 glucose 11 mM。溶液溫度維持於 36~37 °C，pH 值為 7.2~7.4。

### B. 橫膈膜收縮力之記錄

分離之橫膈膜浸浴於 5 至 10 ml Krebs 溶液中，以電刺激橫膈膜，使橫膈膜收縮以便記錄。電刺激橫膈膜是以白金電極鉗住橫膈膜，刺激條件是 0.5 ms 期間及 supramaximal 的電壓方波以 0.1 Hz 或 20 Hz 刺激之。電刺激所產生的收縮張力是經由一個等長轉能器(isometric transducer, Grass FT.03)放大，並將收縮訊號記錄

於 Grass Model 7E 的生理記錄器上。橫膈膜靜止張力調為 1g，並平衡 20-30 分鐘後，開始進行實驗流程。

## 七. 螢光原位雜交(Flouorescence in situ hybridization，FISH)

### A. 小鼠骨骼肌細胞的培養

將出生一天的幼鼠的腿取下，利用 70%的酒精清洗浸泡 5 分鐘，接下來用 1X PBS 清洗 5 分鐘 5 次，再將清洗好的腿泡在含 2%抗生素的 F12 培養基中，用無菌的剪刀順著其肌肉的走向剪成碎片，離心 (1000g 5 分鐘)，吸去上清液加入 1 mL 的 F12 (含 10% FBS 及 1% penicillin/streptomycin)混合培養在蓋玻片上，在 37°C / 5% CO<sub>2</sub> 的培養箱培養三天後至顯微鏡觀察，取貼壁細胞繼續培養。

### B. 細胞的固定

用 5 mM MgCl<sub>2</sub>/PBS 清洗已貼壁細胞，將其置於 4% PFA/PBS 15 分鐘 室溫予以固定，再用 70% 酒精清洗及保存在 4°C 備用。

### C. 細胞免疫螢光染色

將固定好的細胞於室溫下 1X PBS 覆水 10 分鐘，之後浸在 5% normal goat serum-0.1% Triton X-100/PBS 30 分鐘 室

溫，用 1X PBS 清洗 5 分鐘 3 次，加 50  $\mu$ L Desmin Ab (mouse monoclonal, DAKO) 於 4°C 反應 16 小時。接著以 1X PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，再加 100  $\mu$ L 接有 FITC 的 anti-mouse Ab/PBS (1:150) (Sigma) 室溫反應 1 小時，1X PBS 清洗 3 次每次 5 分鐘，最後以 antifade 封片膠封片(內含 PI)，利用螢光顯微鏡觀察之。

#### D. 螢光原位雜交

將固定好的細胞於室溫下 1X PBS 覆水 10 分鐘，浸在 pre-hybridization buffer (40% formamide/2X SSC) 10 分鐘 室溫，接著將細胞移置 hybridization buffer (40% formamide、2X SSC、0.2% BSA、2 mM ribonucleoside vanadyl complex、1 mg/ml yeast tRNA、50 ng 5' Cy3-(CTG)<sub>13</sub> oligonucleotide probe) 反應 2 小時，PBS 清洗 5 分鐘 3 次最後以 antifade 封片膠封片(封片膠內含 DAPI)，利用螢光顯微鏡觀察之。

### 八. 小鼠其他基因之表現

#### A. RT-PCR

取下基因轉殖鼠比目魚肌與心臟組織，大小大約 100-500 mg，利用 TRIAGENT(Molecular Research Center, Inc)來抽取 total RNA。接著取心臟(3  $\mu$ g)或比目魚肌(5  $\mu$ g)的 total RNA 如前

述進行 RT-PCR 反應。RT 反應體積 20  $\mu$ l，之後的 cDNA 取 1  $\mu$ l 進行 PCR 反應。PCR 反應條件參照附表，反應結束後取 5  $\mu$ L 加 1  $\mu$ L 6X DNA Loading dye 混勻，以 2 % agarose 膠體電泳分析。

#### B. 半定量 RT-PCR(Semi-Quantitative RT-PCR )

取等量 RT 之後的 cDNA 1  $\mu$ l 進行 PCR 反應，在 20  $\mu$ l 的反應體積中，含有 2  $\mu$ l 10X PCR Buffer，1  $\mu$ l dATP (1mM)，1  $\mu$ l dGTP (1mM)，1  $\mu$ l dTTP (1mM)，1  $\mu$ l dCTP (0.1mM)，0.1  $\mu$ l  $^{32}$ P-dCTP，0.4  $\mu$ l sense primer (10  $\mu$ M)及 0.4  $\mu$ l antisense primer (10  $\mu$ M)，0.2  $\mu$ l FastStart Taq DNA polymerase (Roche)。PCR 反應條件參照附表，反應結束後加 4  $\mu$ l 6X DNA Loading dye 混勻，取 4  $\mu$ l 以 5% polyacrylamide 膠體電泳分析。以 80°C/2 小時將膠體乾燥後，用 IMAGING PLATE(FUJIFILM)壓片並經磷光分析儀判讀及定量。

## 結果

### 一.轉殖基因之構築與轉殖基因小鼠品系之建立

為了建立轉殖基因小鼠動物模式來探討位於不轉譯區內的 CAG 重複序列對小鼠肌肉發育的影響，我們將不同長度的 CAG repeats 接在綠螢光蛋白(EGFP)基因之 3'UTR (3'-untranslated region)，並以 gamma-sarcoglycan (gSG)基因之 promoter 來驅動 EGFP 在肌肉專一性表達 (圖一)。先前的 *in vivo* 研究指出，gSG promoter 可主導 EGFP 在小鼠的橫紋肌，特別是骨骼肌高量表現 (Noguchi et al., 2001)，因此我們選用此 promoter 來建立 CAG 轉殖基因小鼠動物模式。利用 PCR 及 Southern blot 來篩選小鼠尾巴 DNA，我們得到 3 隻(CAG)<sub>0</sub> (#10, 24, 41)、6 隻(CAG)<sub>23</sub> (# 27, 31, 32, 57, 62, 65)、7 隻(CAG)<sub>200</sub> (#1, 24, 27, 32, 31, 43, 47)的 founder 鼠(稱為 F<sub>0</sub>) (圖二和圖三)。將這些 F<sub>0</sub> 小鼠與非轉殖基因小鼠 (non-transgenic, NT)交配，得到 F<sub>1</sub> 小鼠，F<sub>1</sub> 小鼠再彼此互交，得到 F<sub>2</sub> 小鼠。從同一隻 F<sub>0</sub> 小鼠所產生的所有 F<sub>1</sub> 及 F<sub>2</sub> 等後代，建立成為一個品系(lineage or line)。為了進一步證實小鼠體內含有正確的 CAG 重複序列，我們也以 PCR-based Southern blot 分析，用 (CAG)<sub>10</sub> 作為 probe 來偵測其是否為(CAG)<sub>0</sub> 與(CAG)<sub>200</sub> 的轉殖基因鼠(圖三)。



## 二. (CAG)<sub>0</sub> 與 (CAG)<sub>200</sub> 小鼠轉殖基因的表現

為了解轉殖基因 EGFP 表達在哪些組織，及 (CAG)<sub>0</sub> 小鼠與 (CAG)<sub>200</sub> 小鼠轉殖基因表達量是否有差異，我們首先從各組織純化 RNA 做 RT-PCR 分析。結果發現 EGFP mRNA 主要表現在小鼠心臟、骨骼肌、橫隔膜、睪丸，不論 (CAG)<sub>0</sub> 或 (CAG)<sub>200</sub> 小鼠在上述組織的 EGFP mRNA 表現量差異不大(圖四)。由於 (CAG)<sub>200</sub> 的重複序列不容易以 PCR 增幅，此實驗所使用的引子只涵蓋 EGFP 基因的部份。利用 Northern blot 分析肌肉細胞的 total RNA，我們進一步證實 (CAG)<sub>0</sub> 和 (CAG)<sub>200</sub> 轉殖基因的轉錄長度與預期相符，且 RNA 的表現量也相同(圖五)。

其次，我們也從心臟、骨骼肌、橫隔膜、睪丸等有表達 EGFP RNA 的組織萃取蛋白，利用 Western blot 分析 EGFP 蛋白質在這些組織的含量。結果顯示，(CAG)<sub>0</sub> 小鼠的 EGFP 蛋白在上述組織皆有表現，但在 (CAG)<sub>200</sub> 小鼠中，EGFP 蛋白表現量非常低，甚至不表現(圖六)。

同樣的，用螢光顯微鏡觀察 (CAG)<sub>0</sub> 與 (CAG)<sub>200</sub> 小鼠肌肉的冷凍切片也顯示，(CAG)<sub>0</sub> 小鼠的切片螢光強度較 (CAG)<sub>200</sub> 小鼠的強且明顯(圖七)，此一結果與 Western blot 的結果相符。

## 三. 轉殖基因鼠的表型及肌肉組織型態

我們觀察(CAG)<sub>200</sub> 轉殖基因鼠的外觀，包括體形大小、活動能力等，與正常小鼠並無明顯差異。為進一步觀察並比較小鼠的肌肉組織型態，我們取大於 2 個月的對照組(NT)、(CAG)<sub>0</sub> 與 (CAG)<sub>200</sub> 小鼠的橫隔膜與 Soleus 肌，做石臘切片及組織染色。(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的肌肉細胞，不論是在橫隔膜或 Soleus，與對照組比較都有較肥大的現象(圖八)，核的數目較多且較大(表一，圖九)，有些核甚至位於肌肉細胞的中央，細胞與細胞之間的距離也較為鬆散(圖八)。

另外，使用冷凍切片做肌肉細胞的病理染色，我們發現 (CAG)<sub>200</sub> 小鼠 Soleus 肌肉細胞含高活性琥珀醯酸去氫酶(succinate dehydrogenase)的肌肉細胞數目較對照組多(圖十)。另一方面，(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的 NADH 還原酶 (nicotinamide adenine dinucleotide reductase)的染色紋路也有異常(圖十一)。與對照組小鼠的染色比較，(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的紋路較粗，而前者較為平整；其次是(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的切片含深色之細胞(第一型)數目較少，且不論是第一型或第二型的肌肉細胞都呈現出紋路中空(類似病理學上所謂 moth-eaten)的現象。除此之外，(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的肌肉細胞並無纖維化、發炎、或由外力所造成的組織損壞及修復等特徵，顯示其病理現象是內生性的原因所造成。這些結果暗示(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的

肌纖維形式(type)、肌纖維分化(differentiation)、或肌肉細胞中粒腺體的分佈或功能等可能有異常。

#### 四. (CAG)<sub>200</sub> 小鼠肌肉細胞的分化

為進一步確認(CAG)<sub>200</sub> 小鼠肌肉細胞的分化是否異常，我們檢查了 MyoD、Myf 5、myogenin、及 CHCR 等肌肉分化指標基因 (muscle differentiation marker)，在小鼠肌肉分化不同時期的表現情形(圖十二)。我們發現在新生的幼鼠肌肉細胞，這些基因的表現不論在 NT、(CAG)<sub>0</sub>、或(CAG)<sub>200</sub> 幼鼠皆無差異，都可以偵測到較高的表現。但是在 NT 及(CAG)<sub>0</sub> 的成鼠(二個月大)，這些早期肌肉分化基因(如 MyoD、Myf-5 和 myogenin)或肌肉分化抑制基因(如 CHCR)的表現量都下降了，然而在(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的成鼠肌肉細胞仍有高量表現。此不正常表現持續至小鼠八個月大時仍然一樣(圖十三)。此結果顯示(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的肌肉分化現象類似於剛出生的幼鼠，可能是(CAG)<sub>200</sub> 小鼠肌肉分化受到抑制，或是退化 (degeneration)，有待進一步研究。

#### 五. (CAG)<sub>200</sub> 小鼠的肌肉電生理

肌肉細胞的異常若影響到其生理功能，可以用肌電圖來分析。我們取大於二個月的非轉殖基因鼠 NT、(CAG)<sub>0</sub> 與(CAG)<sub>200</sub> 小鼠

其橫隔膜來做電生理實驗。在單一刺激下，(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的 contractile period 較 NT 的寬(有 delay 現象)，而在 50htz 的頻率連續刺激下，(CAG)<sub>200</sub> 小鼠呈現輕微 titanic fading 的現象，提高其刺激頻率到 100htz 時，此現象有稍微增加，但並不是非常明顯。相對的，NT 與(CAG)<sub>0</sub> 小鼠在 50htz 或 100htz 的刺激下都不會有 titanic fading 的現象(圖十四)。另外，我們也做了動作電位分析。初步結果顯示(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的肌肉動作電位並無明顯異常。目前我們所使用都是異型合子(hemizygous)的小鼠，且年齡在八個月以下，尚無四個月以上的同型合子(homozygous)小鼠可供研究。因小鼠的年齡及其基因型(hemizygous vs. homozygous)都可能是影響結果的因素之一，我們會等小鼠年紀大於八個月以上後，再來分析不同基因型的小鼠。

#### 六. (CAG)<sub>200</sub> 小鼠在肌肉細胞的 RNA foci

從 Western blot 分析結果得知，(CAG)<sub>200</sub> 小鼠在出生一天或四個月的時候，其 EGFP 蛋白的表現量都較(CAG)<sub>0</sub> 的小鼠低(圖十五)。也就是說，(CAG)<sub>200</sub> 的作用至少在小鼠出生時即已開始。之前的報告指出，含有過長的 CUG repeat 的 RNA 在細胞核內會形成 RNA foci，因而影響 RNA 的代謝或運輸 (Herve 2000 ; Jeffrey 2001; Jeffrey 2002 ; Emmanuelle 2002)。因此我們使用剛出生的 NT

與(CAG)<sub>200</sub> 幼鼠，做成原細胞培養(primary culture)，並利用 RNA-FISH (fluorescent in situ hybridization)的方法，以 Cyc3 labeled-(CTG)<sub>13</sub> oligonucleotide 作為 probe 來偵測(CAG)<sub>200</sub> RNA。我們觀察到(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的細胞核內有 RNA foci 形成的現象，而此現象並不會出現在對照組(NT)(圖十六 A、C)。肌肉細胞的確認是使用肌肉專一性蛋白質(myogenic marker，Desmin)的抗體，以螢光免疫法偵測(圖十六 B、D)。

#### 七．檢測可能影響的下游基因表現

根據 Cooper (2002)所提出的假說(圖十七)，DM1 的病人會因為 CUGBP1 的增加而造成 CIC-1、IR 和 cTNT 基因異常的 RNA splicing 情形。由於我們的 CAG 擴增突變位置與 DM1 病人的 CTG 擴增突變位置相似，所以我們檢測(CAG)<sub>200</sub> 小鼠是否在這些基因上也有相似的 alternative splicing 情況。RT-PCR 分析的結果顯示，(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的 CIC-1 splicing pattern 與 NT 或(CAG)<sub>0</sub> 小鼠相似，但 (CAG)<sub>200</sub> 成鼠的 CIC-1 卻類似剛出生小鼠的 splicing pattern，與 NT 或(CAG)<sub>0</sub> 成鼠的 pattern 較不相同 (圖十八)。利用半定量 RT-PCR 檢測，發現(CAG)<sub>200</sub> 成鼠所表現的幼鼠專一性(neonatal-specific) CIC-1 isoforms，其表現量介於幼鼠和 NT/(CAG)<sub>0</sub> 成鼠之間(圖十九)。然而分析 cTNT(圖二十)、MBNL(圖

二十一)等基因，並沒有類似的情形。另外，我們發現 MBNL 有一些不同的 isoforms 分別在幼鼠和成鼠表現，但(CAG)<sub>200</sub> 小鼠與對照組並無明顯差異。最後，(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的 CUGBP1 蛋白量不論在幼鼠或成鼠，其與 NT 和(CAG)<sub>0</sub> 小鼠比較都沒有如同 DM1 病人有增加的情形(圖二十二)。

## 討論

本實驗中我們利用可以在小鼠橫紋肌專一性表達的 gSG promoter，使 EGFP 基因表達在肌肉細胞，並在 EGFP 基因的 3'UTR 位置接上重複 200 次的 CAG repeats，與 3'UTR 不含 CAG repeats 的轉殖基因鼠做比較。我們發現含有 200 次 CAG repeats 的轉殖基因鼠，其骨骼肌有明顯的組織型態異常、肌肉病理染色異常以及肌肉分化相關基因表現異常的情形。以下我們以幾個層次來探討(CAG)<sub>200</sub> 基因轉殖鼠分子上與相關組織型態上的變化。

一. DNA 層次: 我們所產生的第一代(CAG)<sub>200</sub> 轉殖基因鼠，其 CAG repeats 數目並沒有因為 microinjection 或是胚胎發育過程中 DNA 複製時可能產生的不穩定性而使 CAG repeats 數目有擴增的情形(圖二、三)。觀察傳代的過程到第二代(F2)，也沒有發現 CAG repeats 數目有擴增或類似期望現象(anticipation)的發生(data not shown)。而在 PCR-based Southern 中看到部份鼠系有一低於原有 CAG repeats 數目的產物(圖二)，可能是 PCR 反應的 artifact，因較長的 CAG repeat 易產生嚴重的二級結構，使 PCR 反應提早結束。由於子代中並無明顯的 CAG repeat 長度改變，傳代過程中的 DNA 不穩定性並不明顯，也可能是因為傳代次數尚不多所致。在人類的三聯核酸重複序列疾病中，期望現象的程度與三聯核酸重複次數成正相關(Imber et al. 1993; Goldberg et al. 1994)，也就是三聯核酸重複次數越高，子代出現擴增

的機率越高。本實驗中 CAG 重複次數為 200，或許還不到嚴重不穩定的長度。但另一方面，PCR-based Southern 中可看到輕微的 smear 現象，此可能與體異質性(somatic heterogeneity)有關，而此現象在人類的三聯核酸重複序列疾病中是很常出現的情況。

二. RNA 層次:在 Northern blot 中，我們發現不論是(CAG)<sub>0</sub> 或 (CAG)<sub>200</sub> 的轉殖基因鼠，所轉錄出來的 RNA 的長度都符合我們預期的，尤其是(CAG)<sub>200</sub> 轉殖基因鼠並沒有因為異常 CAG repeats 形成的二級結構，而造成轉錄的滑動(transcription slippage)或是轉錄在延長時停頓(pause in RNA elongation)，使得轉錄出的 RNA 含有高於或是低於原來數目的 CAG repeats (圖三)。(CAG)<sub>200</sub> 轉殖基因鼠的 EGFP RNA 量也沒有因為異常 CAG repeats，而變得比(CAG)<sub>0</sub> 轉殖基因鼠的少(圖五)。所以異常 CAG repeats 可能不會降低 RNA 轉錄的效率。

三. 蛋白質層次: 我們發現EGFP蛋白的表現量會受到異常CAG repeats的影響，而使得(CAG)<sub>200</sub>轉殖基因鼠的EGFP蛋白量遠少於(CAG)<sub>0</sub>轉殖基因鼠 (圖六、圖十五)。造成此一現象可能的原因為:

1. RNA上的異常CAG repeats形成hairpin的結構，進而影響到RNA的轉譯(Gacy et al., 1995; Petruska et al., 1996: Gacy et al., 1998)。



2. 根據之前的研究RNA上異常的CUG repeats會吸引過多的CUG-binding protein (如: CUGBP-1、MBNL、MBXL等) 的結合，使得RNA無法運送到核外而堆積在核中形成RNA foci，進而影響到蛋白質的合成。雖然目前並不清楚RNA上異常的CAG repeats是否會和可能的CAG-binding protein結合，而出現類似異常的CUG repeats所形成的RNA foci，我們在(CAG)<sub>200</sub>轉殖基因鼠的初代肌肉細胞上，的確發現有RNA foci的產生。這個結果或許可以說明為什麼異常CAG repeats會影響EGFP的蛋白產生。至於是哪些蛋白結合在CAG repeats上，目前我們還無法得知，有待後續實驗進一步探討。

另一個有趣的現象是，EGFP 蛋白在Western blot分析中，不論在(CAG)<sub>200</sub>或是(CAG)<sub>0</sub>轉殖基因鼠的睪丸(testis)組織，其分子量都約為其他組織中分子量的二倍。此類似雙聚合體 (dimer)型式的分子並不能以DTT或β- mercaptoethanol等還原劑解開，所以推測並非為雙硫鍵方式鍵結，為什麼會形成此高分子量的EGFP蛋白，其鍵結方式或形成機制目前尚不清楚，可能與組織的特異性有關。至於表現此特殊EGFP蛋白的睪丸，不論從外形或組織切片染色來觀察，都沒有發現異常(data not shown)。

四.生理與組織型態層次: 雖然(CAG)<sub>200</sub> 轉殖基因鼠在其標的組

織中表現的 reporter (EGFP) 蛋白明顯減少，但在表型上卻無肉眼可分辨的明顯異常。在生理及小鼠的行為表現上，我們發現(CAG)<sub>200</sub> 的轉殖基因小鼠較難使母鼠懷孕，平均配種時間比同齡的(CAG)<sub>0</sub> 或 NT 小鼠長達二倍以上。由於 EGFP 也會在睪丸組織表現，是否因而影響到睪丸組織的功能，例如精子的成熟或精子的數目等問題，目前仍在分析中。

在肌肉細胞的部份，(CAG)<sub>200</sub> 轉殖基因鼠肌肉細胞核的數目較多，肌纖維細胞也較大，且有些核會位於細胞的中央，而這些都是非典型的肌肉細胞特徵。我們做過肌肉石臘切片的 PCNA staining，呈現沒有明顯變化，排除可能有些肌肉細胞仍處於分裂的推論。在琥珀醯酸去氫酶與 NADH 還原酶的病理染色中，我們發現(CAG)<sub>200</sub> 轉殖基因鼠明顯的與 NT 和(CAG)<sub>0</sub> 鼠不同，(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的 Soleus 肌肉細胞含多較高活性琥珀醯酸去氫酶(succinate dehydrogenase) (圖十)。而(CAG)<sub>200</sub> 小鼠 NADH 還原酶 (nicotinamide adenine dinucleotide reductase) 的染色紋路也有異常(圖十一)。(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的紋路較粗不規則，且含有深色之細胞(第一型)數目較少，第一型的肌肉細胞含有較高的氧化活性，可能造成(CAG)<sub>200</sub> 小鼠的肌肉耐力較差，而不論是第一型或第二型的肌肉細胞都呈現出紋路中空(類似病理學上所謂 moth-eaten)的現象。這二種酶都是粒腺體中所獨有的酵素，在不同型

的肌肉細胞中有不同的酵素活性，其不同的染色紋路也代表不同的病理現象，或許異常的 CAG repeats 會造成粒腺體的異常。我們所觀察到的結果可以肯定(CAG)<sub>200</sub> 的基因轉殖小鼠，其肌肉細胞已出現明顯的病理變異，但此變異是局部性的，並不是在所有的肌細胞中都有。或許這可以說明(CAG)<sub>200</sub> 的基因轉殖小鼠為何在巨觀上沒有異常的原因。

而會出現肌肉細胞病變可能的機制有: RNA 上異常的 CAG repeats 搶走或是增加了過多的 CAG- or GCN-binding protein，造成 RNA gain-of- function，而影響一些肌肉分化有關基因如 MyoD，進而影響到 Myf5 和下游基因(如: myogenine、CHCR)的表現。

在肌肉電生理方面，我們並沒有很明顯的看見(CAG)<sub>200</sub>有肌強直的情形。先前的類似研究中，(CTG)<sub>n</sub>轉殖基因鼠有肌肉電生理異常是在八個月以上的homozygous，或十一個月以上的hemizygous才偵測得到(Ami et al., 2000; Hervé et al., 2001; Ami et al., 2002)。由於我們所使用的基因轉殖鼠基因型為hemizygous並非homozygous，且年齡只有二到四個月，有可能還偵測不到明顯的差別。進一步的實驗會等homozygous的小鼠達到八個月以上再來進行。

在初步的研究中，我們發現位於 3 端非轉譯區(3'UTR)的 CAG repeat 不僅會影響到簡單動物，如: 線蟲 (C. elegans) 的蟲體肌肉活

動力下降及神經傳導異常，也會影響到哺乳類動物，如：小鼠肌肉及細胞型態改變、肌肉細胞分化遲緩及神經傳導受到影響。目前雖然沒有研究報告指出有哪一種人類神經肌肉方面的疾病或是其他方面的疾病是由 3'UTR 之 CAG 三聯核酸擴增突變所造成的，然而，這並不意味著沒有此一可能性，只是尚未知道。

未來的研究可以朝以下幾個方向開展：

#### 一.(CAG) $n$ 小鼠肌肉電生理—

1. 確認是否有肌強直或是肌無力等現象，如果有將進一步探討，是由哪一個離子通道(ion channel)或是哪一種神經傳導出現問題所造成的。
2. 利用不同時期的基因轉殖小鼠來確認肌強直或是肌無力等現象，是否會隨著年齡的變化而有所增加。
3. Hemizygous 與 Homozygous 的基因轉殖小鼠，其肌強直或是肌無力等現象，是否會有所不同。

#### 二. 擴增突變的(CAG/CTG) repeat 可能影響到哪些下游基因—

目前提出三聯核酸序列擴增突變所造成的可能作用機制之一，是 RNA gain-of-function model。即是過長的(CAG/CTG) repeat 可能增加或減少重要的 RNA binding proteins，使其在細

胞中無法正常的運作，因而間接影響到下游的分子。最近的研究顯示，3'UTR 之 CTG repeat expansion 會影響數個下游基因的 alternative splicing，如 CIC-1、cTNT、IR 等(Nicolas et al. 2002)。此 alternative splicing 的改變是造成下游基因活性及功能改變，進而導致細胞病變的關鍵原因。從初步的研究結果可知 3'UTR 之 CAG repeat expansion 對已知下游分子的影響與 3'UTR 之 CTG repeat expansion 的結果並不十分相似，這意味或許 CAG 與 CTG 所造成的影響是經由截然不同的途徑。未來將可以從三個方向來尋找受到(CTG/CAG)<sub>n</sub> 擴增突變所影響的基因及蛋白質。

1. 分析已知含(CTG/CAG)<sub>n</sub> repeat 的 loci 及其附近的基因，用 quantitative RT-PCR 技術初步了解這些 loci 及其附近的基因的 RNA level 是否有被改變，如果有改變，將進一步做基因選殖並分析其 protein level 的變化及研究可能的生理功能。
2. 利用 DDRT-PCR 的方式或小鼠的生物晶片做 microarray 去找尋(CTG/CAG)<sub>n</sub> repeat 小鼠與正常小鼠之間的基因表達差異，並選殖出有差異的基因進一步研究。
3. 利用二維膠體電泳做蛋白質體學(proteomics)的研究，分

析(CTG/CAG) $n$  repeat 的小鼠體內蛋白質組成及其表現量上  
與正常小鼠的差異，並進一步分析確定這些差異性蛋白質在  
in vivo 表達型式。