

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 利用 To12 基因轉殖斑馬魚探討人類 CX26 基因突變造成 *
* 名稱 : 聽障的機轉 *
* ***** *

執行計畫學生： 楊仲雲
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-048-B
研究期間： 106 年 07 月 01 日至 107 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授： 楊建洲

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 107 年 03 月 31 日

目錄

摘要.....	3
研究目的.....	3
研究問題.....	4
文獻回顧.....	4
研究方法及步驟.....	6
結果與討論.....	9
參考文獻.....	15

摘要

在先前的研究指出,非症候群聽障與人類的 *CX26* 基因有一定程度的關係,在細胞模式的實驗中也發現 *CX26* 的突變會對於細胞功能的影響[1],我們以此為基礎,以斑馬魚做為動物模式的方式,進一步討論 *CX26* 對於人類的影響。

斑馬魚的 *cx30.3* 與人類的 *CX26* 具高度同源性[2],因此我們建立以 *cx30.3* 基因為材料的 Tg(*agr2:cx30.3* R186K),Tg(*agr2:cx30.3* R186Q),Tg(*agr2:cx30.3* WT)轉殖基因魚,再用 7 天大的仔魚做行為分析觀察分析是否與野生型斑馬魚(AB Strain)有行為上的差異,進而推論 *CX26* 與非症候群聽障的關係。

途中,必須篩選以及確認轉殖的斑馬魚系統是否轉入或正確,我們做了螢光篩選,基因定序等等,再用試交以及自交的方式篩出(產生)同型盒子與異型盒子。

在此實驗中,我們發現 *cx30.3* 被突變的斑馬魚系統相對野生型的斑馬魚在某些方面是有些明顯差異,但因為斑馬魚的繼代關係,我們沒能進一步再分析同型與異型盒子的差異,或許在此處著墨,會有其他更深的發現。

研究目的

本實驗室對於非症候群聽障的研究中,已發現數個基因(*connexin 26*、*connexin 29*、*connexin 30*、*connexin 30.3*、*connexin 31*、*connexin*

43)有突變的發生，並且在細胞模式的研究中發現 *CX26* 之突變會影響基因的正常功能[1]，我們先前的研究已知斑馬魚的 *cx30.3* 基因與人類 *cx26* 基因具高度同源性[2]，且有研究發現斑馬魚 *agr2* (anterior gradient 2) 表現在內耳半規管與支持細胞之機制[3]。因先前學長已成功製成了基因點突變的質體，得以讓我們可以繼續建立斑馬魚系統，我們希望繼續利用斑馬魚轉殖系統世代交替，篩選出突變基因的斑馬魚，加以研究與分析，再以 *cx30.3* 基因突變對於斑馬魚的影響，進而推論人類的 *CX26* 基因對人類的影響。本研究主要目的與動機是希望利用本實驗室已建立的包含 *agr2* 啟動子於內耳中表現正常的 *cx30.3* 基因之轉殖斑馬魚系統，和另一個利用 *agr2* 啟動子於內耳中表現突變的 *cx30.3* 基因之轉殖斑馬魚系統，觀察並比較兩者的基因表現情形，嘗試討論人類造成非症候群聽障的機制，期望能為日後之臨床應用有所助益。

研究問題

1. 繼續建立基因轉殖斑馬魚系統【Table 2】，再利用已轉殖突變基因的斑馬魚，並確認過有此轉殖突變基因的子代，做行為分析，研究其行為是否與野生種的斑馬魚有程度上的行為差異
2. 研究有轉殖突變基因的斑馬魚其中同型合子與異形合子是否有階層上

的差異

文獻回顧

斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)是目前常用於研究脊椎動物發育的動物模式，為一種體型約 3~5 公分的熱帶淡水魚，其在胚胎發育上的機制與哺乳類動物非常相似。斑馬魚有許多研究操作上的優點而有很高的利用價值，包括：體型小、飼養容易、不佔太多空間、具有光週期誘發產卵、每次產卵數量眾多(約 100~200 顆)、其透明的胚胎使得器官在發育時期即可利用解剖顯微鏡從外部觀察、胚胎發育期短(約 2-3 天)等等。[4-6]

近年來，許多斑馬魚基因陸續被發現，重要的調控蛋白質其表現位置和時間也都和哺乳類動物類似，所以可利用突變的方法，包括物理、化學和分子生物學方法，來改變特定基因的表現及建立基因轉殖魚動物模式，以研究基因與發育和疾病之間的相關機制[7]。最近，一些斑馬魚突變的研究已發現在一些器官組織如耳朵、眼睛、心臟、肌肉、血液、脊柱、胰臟及腎等所產生的缺陷，與人類這些器官所產生的一些疾病之病理特徵相似，且為相同基因或同源基因突變所造成。因此，斑馬魚可進一步做為人類疾病研究的動物模式。目前，斑馬魚的動物模式已被運用於癌症、心血管疾

病、器官發育、脊椎動物胚胎發育、神經發育、細胞凋亡和聽覺等相關研究，且在藥物篩檢也扮演重要角色。[8]

斑馬魚的聽覺主要是藉由內耳(inner)和側線(lateral line)來偵測水中

聲波顫動的刺激 而產生[9]。雖然斑馬魚的內耳在構造、功能上與脊椎動物不盡相同，但在內耳的發育形成上，基因的機轉與脊椎動物非常類似。[6, 10, 11]在斑馬魚的內耳構造中，經顯微分析後發現在內耳聽斑區 (macula)和側線(lateral line)的毛細胞構造與人類耳蝸內感覺受器的毛細胞構造是相類似的[12]。同樣地，斑馬魚內耳中上皮細胞內襯(epithelial lining)也和人類耳蝸內上皮細胞內襯一樣細胞組成相似，目前已知至少有 granular cell 和 ionocytes 細胞牽涉其中[13, 14]。文獻指出，已有學者以斑馬魚為模式動物研究聽覺的形成機制，藉由利用大量篩檢內耳發育缺陷的斑馬魚突變種來了解基因與內耳缺陷的關係，此研究已找到並分析 58 種內耳缺陷的突變斑馬魚[15]。

AGR2 是 PDI(protein disulfide isomerase)蛋白家族之一員，斑馬魚 *agr2* 基因會表現在嗅球(olfactory bulb)、耳囊(otic vesicle)、表皮(epidermis)、食道(esophagus)、腸 (intestine)、泳囊(swim bladder)等，其中，在內耳耳囊的表現是由 Sox10 蛋白透過結合 *agr2* 基因上游之一段啟動子區域調控。[3]先前，本實驗室已經發現斑馬魚 *cx30.3* 基因與人類 *CX26* 基因具高度同源性[2]，並已知造成非症候群聽障患者 *CX 26* 基因的三個突變點，經過 site-direct 點突變方式將斑馬魚 *cx30.3* 上的鹼基對突變後，產生相對應於人類非症候群聽障相同之突變蛋白。由過去的實驗發現在斑馬魚的 *cx30.3* 突變點上,R186Q 是表現在內質網，而

R186K 則是表現在細胞膜上,然而我們僅知其突變的位置,其造成的功能是否有變異則尚未明瞭,因此我們希望利用 *agr2* promoter 驅動 *cx30.3* 基因的表現,進而瞭解 connexin 蛋白在功能上的變異、探討造成人類聽障之機轉。近幾年,轉殖基因斑馬魚已被廣泛使用於發育生物學及基因功能的研究,而目前在轉殖基因斑馬魚的建立上,Tol2 system 則是最被廣泛使用於製備表現載體的技術。此技術依據同源性基因序列互換的原理所設計,可將 DNA 片段互換至含有 Tol2 跳躍子 (transposon)的 transposon vector,此質體經由顯微注射至斑馬魚胚胎後,會再藉由斑馬魚體內的 Tol2 酵素作用,將 DNA 片段隨機嵌入斑馬魚基因體中表現 [16]。此外,模式動物行為分析亦是本計劃應用之實驗方法之一,透過攝影與軟體分析比較正常與突變 *cx30.3* 基因之斑馬魚在受到刺激後之反應有何不同。先前 *cx30.3* 之相關研究多著重於其基因、蛋白、細胞層級之探討,在活體上之功能性研究上未有明確的發現。我們想要了解,突變後的 *cx30.3* 蛋白是否會造成斑馬魚內耳某種程度的功能喪失而造成其在受到敲打後可能之反應減敏,實際結果有待以模式動物行為分析觀察。

綜上所述,本研究希望以斑馬魚做為模式生物,再藉由基因重組技術,將正常與突變的 *cx30.3* 基因與現有的專一表現啟動子相接,以顯微注射使斑馬魚表現重組基因,世代交替篩選出已轉殖的斑馬魚後,再藉由動物行為分析比較兩者之差異。若能夠成功分析出具有顯著意義之結果,或許

對人類非症候群聽障之致病機轉有更新的發現。更甚者，目前臨床上具有耳毒性的用藥多達百餘種，舉例而言，當具有耳毒性的後線抗生素藥物在無法以其他藥物替代的情況下，病人往往需要承擔耳毒性的風險以對抗可能致命的感染，造成臨床上的兩難困境。本研究之結果或許亦能進一步應用於內耳保護機制之研究上，期望能對人類健康之促進有所裨益。

研究方法及步驟

1. 斑馬魚(*Danio rerio*)之飼養

野生型斑馬魚(AB strain)，飼養於 28°C 恆溫系統中，日夜週期為光週期 14 小時與暗週期 10 小時，並以適量人工飼料與豐年蝦餵食。

2. 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction , PCR)

運用 DNA 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction , PCR)，放大斑馬魚基因體內 *cx30.3* 片段以及轉殖的 EGFP 綠螢光蛋白片段進而加以分析。反應總體積為 50 μ l，含有 3 μ l genome DNA(濃度為 2.8ng/ μ l)、1 μ l dNTP(濃度為 10mM)、10 μ l 5x buffer、2.5 μ l forward primer 【Table 1】、2.5 μ l reverse primer 【Table 1】、0.5 μ l DNA polymerase 以及 29.5 μ l d2H₂O。將此反應溶液置於迴溫反應器

(Perkin-Elmer 9700)中進行，反應條件為 denature 98°C 30 秒，98°C 10 秒 annealing 58 °C 30 秒 elongation 72°C 30 秒(35 個循環數)，72°C 10 分鐘，最後溫度維持在 25°C。

3. DNA 純化(DNA Clean-up)

本步驟使用 DNA Clean/Extraction Kit(GeneMark)進行 DNA 純化，目的在純化出 PCR 反應後的 cx30.3 DNA 片段。首先，加入 3 倍 PCR 產物體積的 Binding Solution 於 PCR 產物中並混合均勻，在移置到組合的 Spin Column 與 Collection Tube，以 12000rpm 轉速離心 1 分鐘。接著，倒去離心廢液後，加入 700µl 的 Wash Solution 並以 12000rpm 轉速離心 1 分鐘，再重覆本步驟一次。為了移除殘餘的酒精，倒去離心廢液後，直接以 12000rpm 轉速離心 3 至 5 分鐘，然後將 Spin Column 移置一個新的 eppendorf 中。加入預熱過的 d2H2O 35µl 於管內膜上，靜置 5 分鐘，待充分溶出 DNA 後，以 12000rpm 轉速離心 3 分鐘收集純化產物。

4. 顯微注射(Microinjection)

先以拉針器製作注射所需的毛細管針，條件為 heat:330、pull:150、vel:150、time:150。用高度密合鍍子將拉好的毛細管針前端以 45 度斜口切斷，再以針筒灌入礦物油以平衡注射時的壓力。注射溶液配置總體積為 10µl，體積依照濃度調整，含有 Tol2 表現質體 30ng/µl、

Tranposase cRNA 30ng/μl、0.5% Phenol Red 2μl 以及加入 DEPC H₂O 至總體積 10μl。將準備好的毛細管針架上顯微注射器 (Drummondsc, Nanoject II), 吸入注射溶液至毛細管中, 再注射至 1~2 cell 時期胚胎內, 每次體積 2.3nl。將注射過的胚胎加入 egg water (40g instant salt/1L distilled water) 置於 28°C 恆溫培育觀察。

5. 全胚胎免疫組織化學染色(Whole-mount Immunohistochemistry Staining)

全胚胎免疫組織化學染色技術之目的在於將特定的分子以帶有螢光的免疫抗體結合而成色, 以利後續之觀察與分析。其步驟可分為四個階段進行, 以下以條列式分述各階段之實驗方法:

5.1. 第一階段(第一天)

A. 配製 2% PFA(Paraformaldehyde): 取 0.1g 之 PFA 粉末, 以 PBS 做為溶劑配成總體積 5ml 之 PFA 溶液, 置於 65~70°C 水浴中加熱並經常搖晃均勻, 溶解後置於冰上回溫。

B. 將所有斑馬魚放入 2ml eppendorf 中, 吸乾 egg Water, 用 1ml PBS 清洗三次。

C. 加入 2% PFA 1ml 放置兩小時, 過程避光、搖晃。

D. 換置 PBST 1ml 清洗三次, 每次 5 分鐘, 過程避光、搖晃。

- E. 換置脫色劑 1ml 放置 20 分鐘，過程避光、靜置。
- F. 換置 PBST 1ml 清洗四次，每次 5 分鐘，過程避光、搖晃。
- G. 換置 Acetone 1ml 於-20°C下放置 30 分鐘，過程避光、靜置。
- H. 換置 PBST 1ml 三次，每次 5 分鐘，過程避光、搖晃。
- I. 換置 PBS 1ml 兩次，每次 5 分鐘，過程避光、搖晃。
- J. 換置 2% PFA 1ml 放置 15 分鐘，過程避光、搖晃。
- K. 換置 PBSTriton 1ml 三到四次，每次 5 分鐘，過程避光、搖晃。
- L. 換置 HYB+ 1ml，於 4°C下放置 16 小時以上，過程避光、搖晃。

5.2. 第二階段(第二天)

A. 配置 4 種濃度梯度溶液：

編號	HYB+(μ l)	PBSTriton(μ l)	PBSTriton 濃度	備註
1	750	250	25%	
2	500	500	50%	
3	250	750	75%	
4	0	1000	100%	配 3 管

B. 依序換置 1~4 號溶液，每次 10 分鐘，其中 4 號溶液再重複 2 次，過程避光、搖晃。

C. 換置 Blocking Solution 1ml 放置 3 小時，過程避光、搖晃。

D. 將一次抗體 Monoclonal Anti-acetylated Tubulin 以 Blocking Solution 稀釋 400 倍，換置一次抗體 400 μ l 於 eppendorf 中，放置於 4°C 下 16 個小時以上，過程避光、搖晃。

5.3. 第三階段(第三天)

A. 換置 PBSTriton 1ml 放置 1 小時，共 4 次。

B. 將二次抗體以 Blocking Solution 稀釋 200 倍，換置二次抗體 400 μ l 於 eppendorf 中，放置於 4°C 下 16 個小時以上，過程避光、搖晃。

5.4. 第四階段(第四天)

A. 換置 PBSTriton 1ml 放置 45 分鐘，至少 5 次，過程避光 搖晃。

B. 將斑馬魚浸置於 PBS 中存放，染色完成。

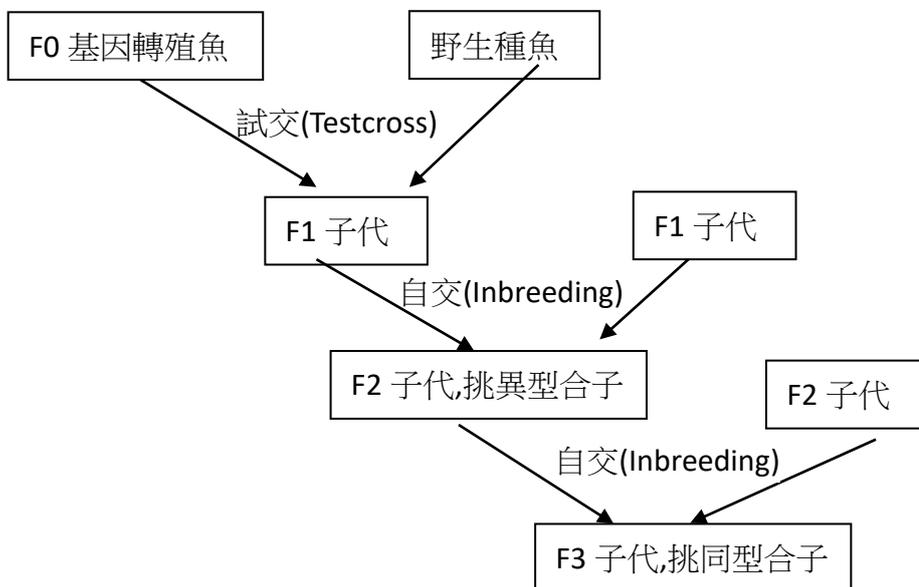
6. 以倒立螢光顯微鏡觀察

將染色完成的斑馬魚利用 0.5% Agarose 膠體溶液擺位至側面向上、雙眼對齊並固定之。使用倒立螢光顯微鏡，調整 Rhodamine 濾鏡觀察 SOX2 紅螢光表現位置、調整 FITC 濾鏡觀察 EGFP 綠螢光表現位置，並攝像記錄之。

7. 模式動物行為分析

將正常與基因改造之斑馬魚置 96 孔盤中，以光或拍打刺激盤中斑馬魚並於攝影機下拍攝 記錄，再利用 Noduls EthoVision 軟體分析其移動軌跡、距離與速度，進而比較正常與基因變異斑馬魚之反應差異。

8. 有性世代交配進行轉殖基因斑馬魚的建立



9. 萃取斑馬魚基因體(組織)

為確定斑馬魚基因型,我們利用 Weigene 公司的 WelPrep DNA kit 來抽取斑馬魚基因體。我們採取斑馬魚剪尾的方式(以組織萃取模式)來進行。

- 1.將 25mg 的組織放到 1.5ml 的 eppendorf
- 2.將 300 μ l DNA Lysis buffer 和 20 μ l 的 Proteinase K solution 加到 1.5ml 的 eppendorf 裡並且用手輕搖
- 3.放在 65°C 的環境下直到溶液變得清澈
- 4.加入 100 μ l DNA Binding buffer 用手輕搖
- 5.把溶液倒入 DNA spin column,以 13000 轉,1 分鐘離心(collection tube 溶液丟掉)
- 6.加入 500 μ l DNA wash buffer 1 進 spin column,離心 13000 轉,一分鐘 (collection tube 溶液丟掉)
- 7.加入 500 μ l DNA wash buffer 2 進 spin column,離心 13000 轉,一分鐘 (collection tube 溶液丟掉)
- 8.將 collection tube 換新,再以 13000 轉,一分鐘離心,離掉不要的舊溶液

9.拿一個新的 1.5ml eppendorf 用去鹼基純水加入 spin column 並放在 65°C環境下 5 分鐘,之後以 13000 轉,1 分鐘離心(elute DNA 置備)

結果與討論

此研究之重點在於透過 Tg(agr2:cx30.3 96K),Tg(agr2:cx30.3 96Q),Tg(agr2:cx30.3 96W) 三種轉殖基因斑馬魚及野生型(AB Strain)斑馬魚進行行為分析, 探討 *cx30.3* 基因對於斑馬魚的影響,推導 *CX26* 對於人類的影響。

首先,為了確定三種轉殖基因斑馬魚,我們用螢光型態(EGFP 為報導基因),PCR 鑑定基因體以及定序三重步驟,確定基因無誤。(Figure 1,2&3)

確定無誤後,我們進行行為分析,累積了上述 4 種魚(包含野生型)各 200 組以上的數據分析比較。

【Table 1】用來分析已轉殖斑馬魚 Genome 的 Primer 序列

Primer 名稱	序列
Zf cx30.3 cds 5'-EcoRI	5'-CgCgAATTCATgAgTTggggAgCACTTTATgC-3'
Zf cx30.3 cds-stop	5'-CgCggATCCggAACAgTCTTATTgCTCgATgAgTC-3'

3'-BamHI	
EGFP-CF	5'-ACGGCGTGTCAGTGCTTCAG-3'
EGFP-CR	5'-ACCATGTGATCGCGCTTCTC-3'

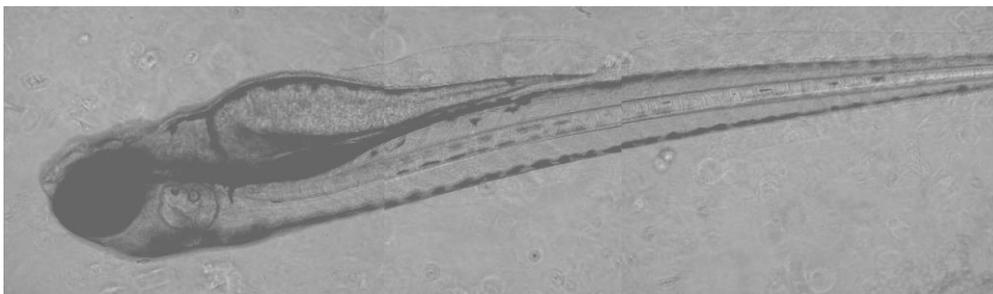
【Table 2】目前斑馬魚轉殖系統

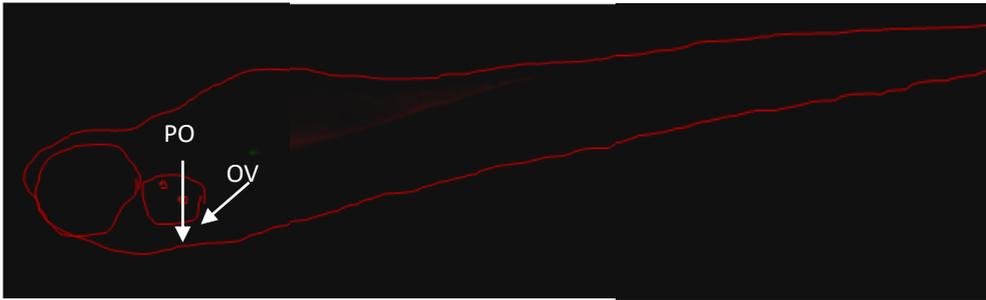
基因型	轉殖基因斑馬魚(代稱)
Tol2-exo200-Agr2-96ecto-cx30.3R186K-EGFP	Tg(agr2:cx30.3 96K)
Tol2-exo200-Agr2-96ecto-cx30.3R186Q-EGFP	Tg(agr2:cx30.3 96Q)
Tol2-exo200-Agr2-96ecto-cx30.3WT-EGFP	Tg(agr2:cx30.3 96W)

※**螢光型態**

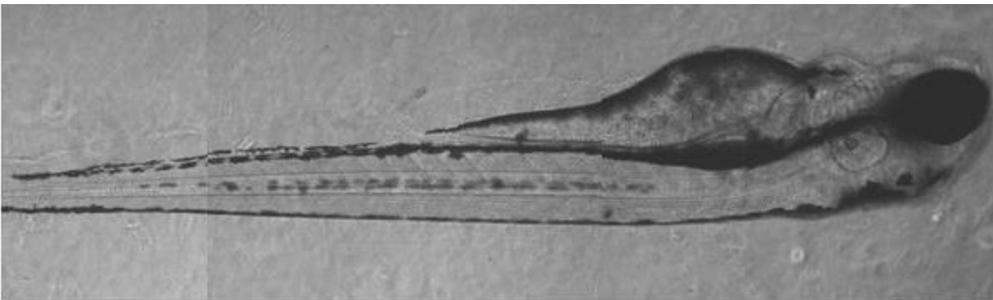
我們拿 3~4dpf 的仔魚,用甲基纖維素固定,倒立螢光顯微鏡下觀察(100x)

A

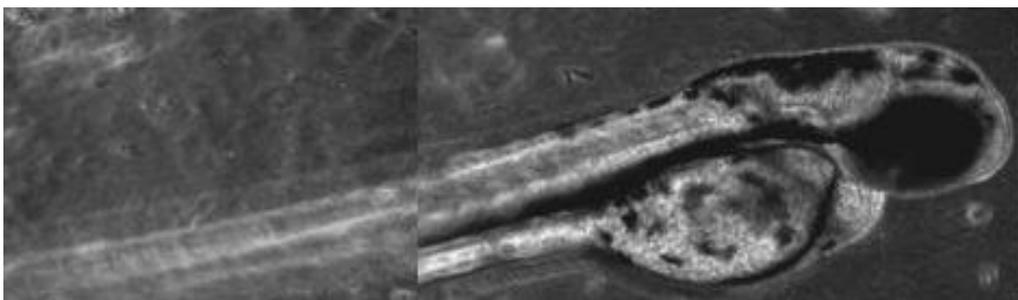




B



C





【Figure 1】上圖是各種轉殖魚的螢光型態

A. Tg(agr2:cx30.3 96K)

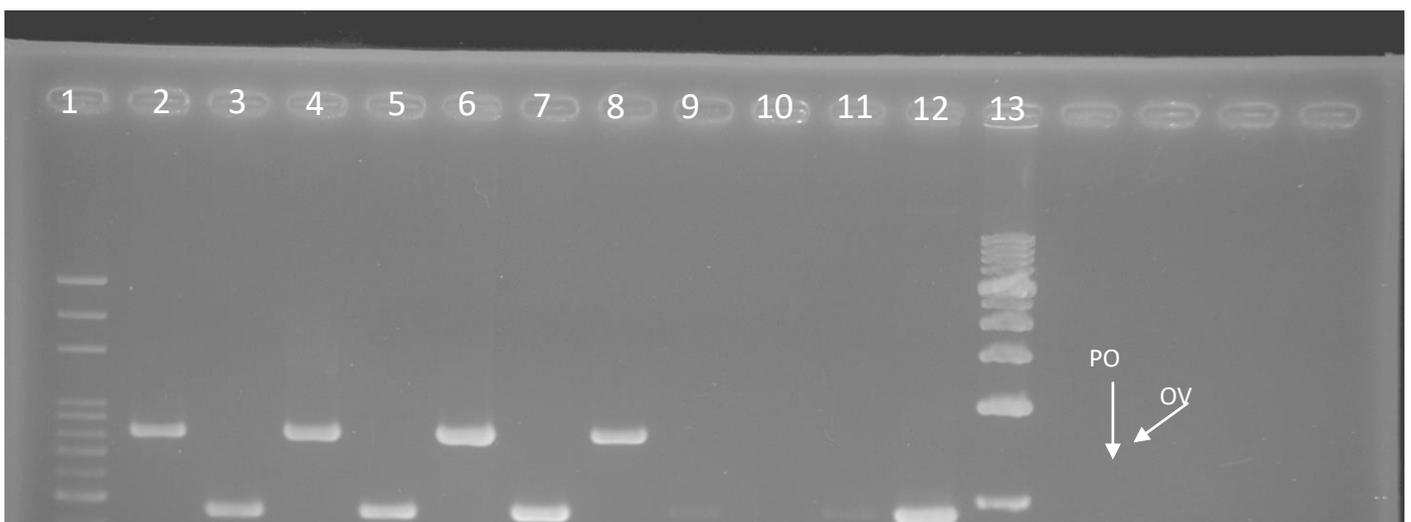
B. Tg(agr2:cx30.3 96Q)

C. Tg(agr2:cx30.3 96W)

* 由圖可看到,三種轉殖魚內耳的地方,都有螢光的產生,符合我們的預期。

※PCR 鑑定基因體

確認了螢光型態後,我們用【Table 2】裡的 Primer 來分析,分別實驗的是 *cx30.3* 基因(700~800bp)以及 EGFP 基因(~450bp),分析這兩個片段確定轉殖的基因有無存在轉殖魚的基因體中。



【Figure 2】上圖是切完魚尾後,抽魚體的基因體,再以 PCR 方式加以裁切我們想要確定的是否有無我們轉職的螢光基因(EGFP),進而確定斑馬魚的轉殖成功;***第 1 與第 13 分別為 100bp 與 1K bp 的 DNA Marker**,其他 well 是以下面原料跑 PCR 實驗的結果:

Primer:第 2.4.6.8.10.:使用 **Zf cx30.3 cds 5'-EcoRI, Zf cx30.3 cds-stop**

3'-BamHI(For *cx30.3*)

第 3.5.7.9.11.12.:使用 **EGFP-CF, EGFP-CR** (For EGFP GENE)

Genome: **Tg(agr2:cx30.3 R186K)**:第 2.3.

Tg(agr2:cx30.3 R186Q):第 4.5.

Tg(agr2:cx30.3 WT):第 6.7.

AB strain:第 8.9.

negative control:第 10.11.

pLEGFP(質體):第 12.

* 由上面的膠圖可以看到 DNA 的片段,在跑完 PCR 後,是在正確的位置上,也符合我們的預期

※定序

跑完 PCR 後,為了確定轉殖魚的 *cx30.3* 基因序列是否沒有在轉殖實驗中出錯(且因斑馬魚基因體中都具有內生性的 *cx30.3* 基因,PCR 的結果不夠完全清楚),繼續定序的實驗,用具有校正功能的聚合酶系統 Phusion 來驗證。

A	Query	427	AGGCCGGATT	CATGTATGCTCTCTATTACGTCTATGATGGCTTT	CAGATGGCACGCCTTG	486
	Sbjct	585	AGGCCGGATT	CATGTATGCTCTCTATTACGTCTATGATGGCTTT	CAGATGGCACGCCTTG	644
	Query	487	TGAAGTGTGAGCAATGGCCTTGTCCCAATAAAGTTGACTGTTTCATCTC	CAGGCCGACAG	546	
	Sbjct	645	TGAAGTGTGAGCAATGGCCTTGTCCCAATAAAGTTGACTGTTTCATCTC	AGGCCGACAG	704	
	Query	547	AGAAGACGGTCTTACCACATCTTTATGGTGGGATCTTCTGCTATCTGC	R>Q	ATG 606	
	Sbjct	705	AGAAGACGGTCTTACCACATCTTTATGGTGGGATCTTCTGCTATCTGCATTGTGCTCAATG		764	
<hr/>						
B	Query	368	CCATCACTGGGCCACTGTGGTGGACCTACACATCCAGCCTGTTCTTCAGACTTCTTTTCG		427	
	Sbjct	525	CCATCACTGGGCCACTGTGGTGGACCTACACATCCAGCCTGTTCTTCAGACTTCTTTTCG		584	
	Query	428	AGGCCGGATT	CATGTATGCTCTCTATTACGTCTATGATGGCTTT	CAGATGGCACGCCTTG	487
	Sbjct	585	AGGCCGGATT	CATGTATGCTCTCTATTACGTCTATGATGGCTTT	CAGATGGCACGCCTTG	644
	Query	488	TGAAGTGTGAGCAATGGCCTTGTCCCAATAAAGTTGACTGTTTCATCTC	AAAGCCGACAG	547	
	Sbjct	645	TGAAGTGTGAGCAATGGCCTTGTCCCAATAAAGTTGACTGTTTCATCTC	AGGCCGACAG	704	
				R>K		
<hr/>						
C	Query	425	GCCGGATT	CATGTATGCTCTCTATTACGTCTATGATGGCTTT	CAGATGGCACGCCTTGTG	484
	Sbjct	587	GCCGGATT	CATGTATGCTCTCTATTACGTCTATGATGGCTTT	CAGATGGCACGCCTTGTG	646
	Query	485	AAGTGTGAGCAATGGCCTTGTCCCAATAAAGTTGACTGTTTCATCTC	AAAGCCGACAG	544	
	Sbjct	647	AAGTGTGAGCAATGGCCTTGTCCCAATAAAGTTGACTGTTTCATCTC	AAAGCCGACAG	706	

【Figure 3】學生重新用有校正功能的聚合酶系統 Phusion,驗證我們的轉殖序

列是正確的

A. Tg(agr2:cx30.3 96Q)

B. Tg(agr2:cx30.3 96K)

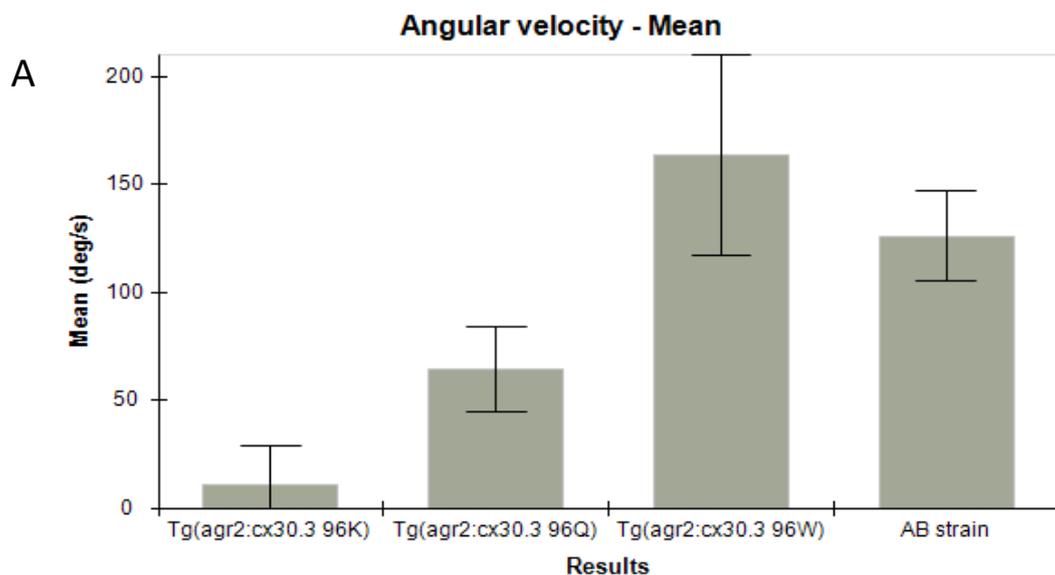
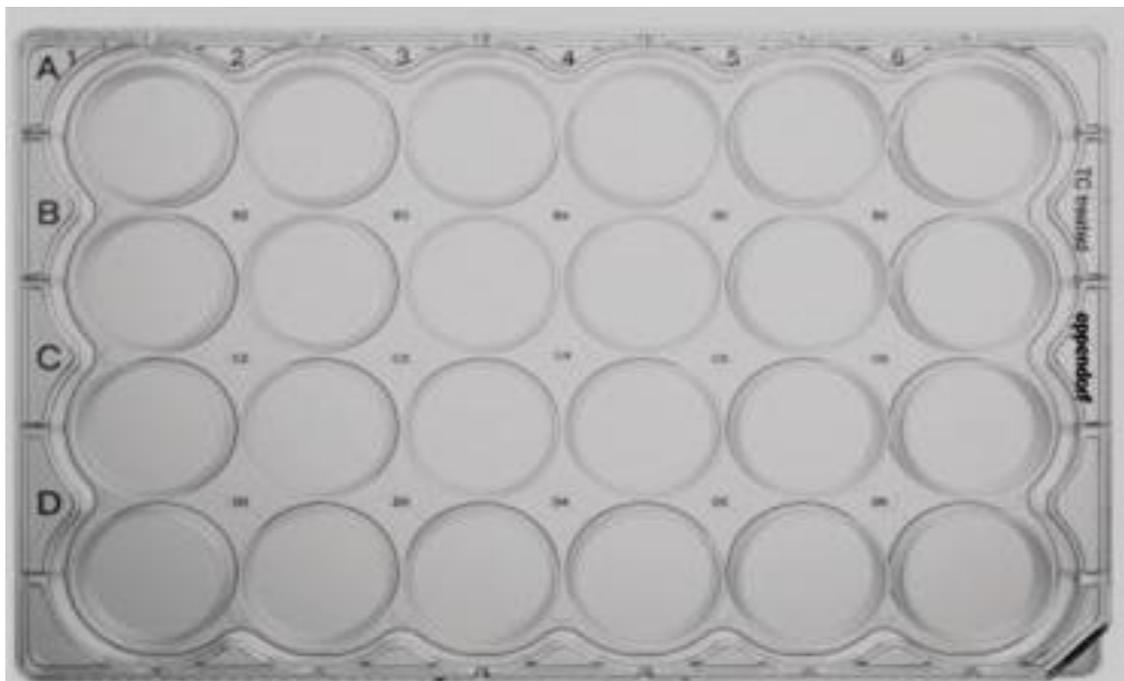
C. Tg(agr2:cx30.3 96W) *以上是 NCBI BLAST 系統分析的結果

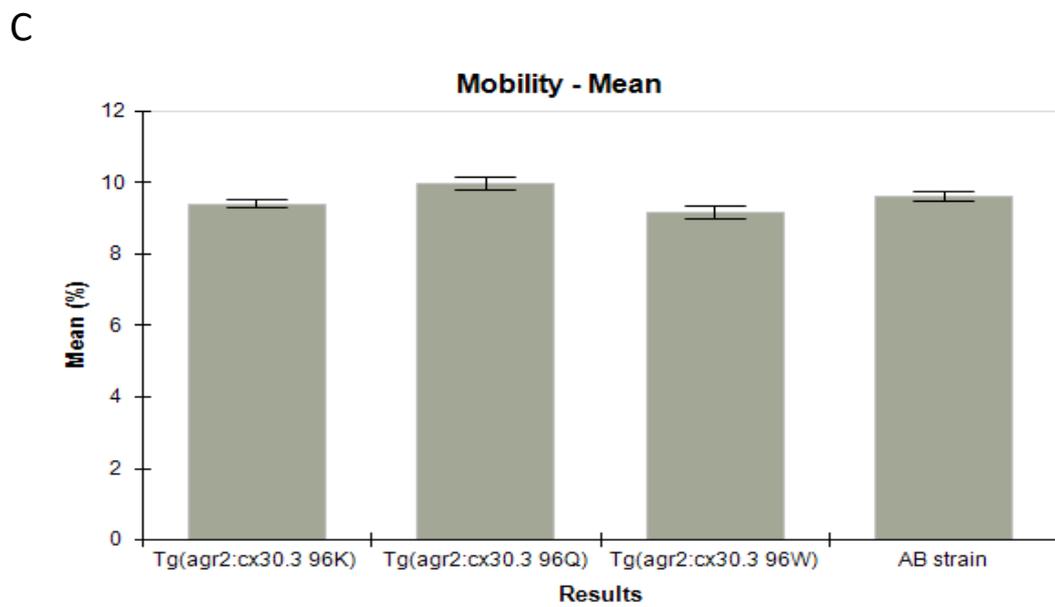
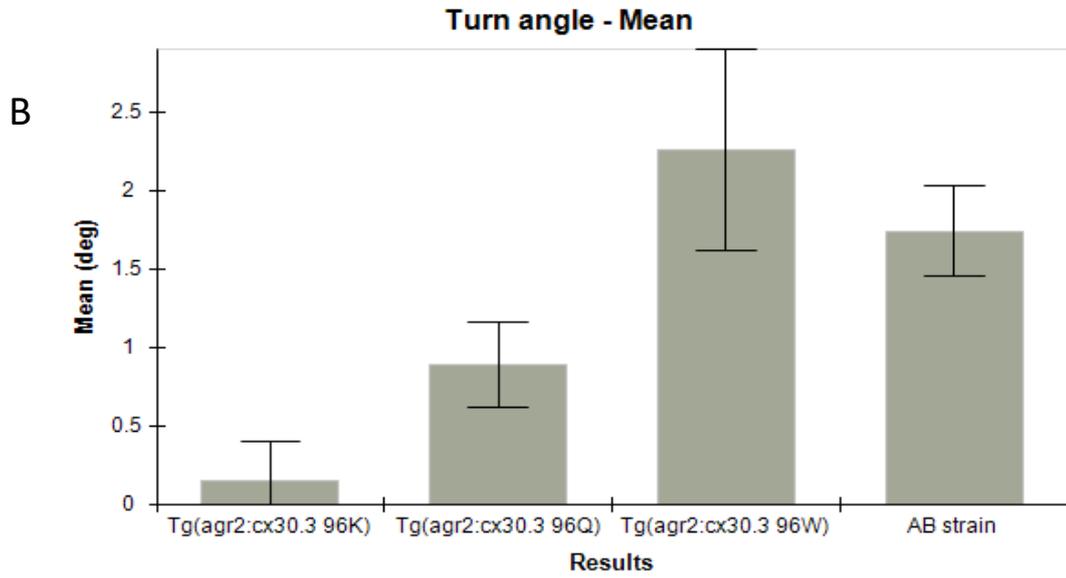
* 由上圖的紅框中,,可以發現有轉殖成功,突變位點是正確的,經過三種程序

的驗證後,我們可以確定三種轉殖魚的正確性

※行為分析

本研究最重要的實驗;用來分析基因轉殖的斑馬魚與野生型的斑馬魚有何行為上的差異,我們用 24-well 的盤子(如下圖),把 7dpf 的小魚與 1ml 的蛋水加在各個 well,加畢休息 20 分鐘(讓魚冷靜減少魚的驚嚇造成的影響),爾後放入 Noldus 的 DanioVision 機器執行的行為分析:





【Figure 4】我們用 Noldus 的 DanioVision 執行的行為分析,可以發現轉殖聽障序列的魚(agr2:cx30.3 R186K,R186Q)有明顯的差異,因為之前的文獻,讓我們知道我們誘發突變的內耳是影響其魚體平衡,所以我們分析其 Angular velocity,Turn angle, Mobility,也在上面的 Mobility 發現所有魚種的健康活動狀況是差不多的(N Value: Tg(agr2:cx30.3 R186K)=201;Tg(agr2:cx30.3 R186Q)=229;Tg(agr2:cx30.3 WT)=200;AB Strain=518)

※討論

這個研究在前面部分的螢光型態以及定序的實驗都是確定我們的基因是否正確地轉進去我們想要的位置,而後的行為分析才是我們最主要的重點。

行為分析的結果發現(我們用 Noldus 的 DanioVision 分析)發現基因轉殖魚在一些關於平衡或者轉向的部分跟正常的 WT 都有一定的差距,且在移動性的測試 (Mobility)並沒有哪個基因轉殖魚是有顯著的差異的【Figure 4C】,代表我們轉

殖基因應該沒有對斑馬魚的基本運動能力沒有太大的影響;查閱過去資料,也提及我們基因轉殖的表現區域--內耳半規管是影響魚體平衡的區域,我們推測跟我們的實驗結果有相關。

參考文獻

1. Yang, J.-J., et al., *Identification of mutations in members of the connexin gene family as a cause of nonsyndromic deafness in Taiwan* . Audiology and Neurotology, 2007. 12(3): p. 198-208.
2. Chang-Chien, J., et al., *The connexin 30.3 of zebrafish homologue of human connexin 26 may play similar role in the inner ear*. Hearing research, 2014. 313: p. 55-66.
3. Tang, C.-H., et al., *Expression of zebrafish anterior gradient 2 in the semicircular canals and supporting cells of otic vesicle sensory patches is regulated by Sox10* . Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2014. 1839(6): p. 425-437.
4. Kimmel, C.B., et al., *Stages of embryonic development of the zebrafish* . Developmental dynamics, 1995. 203(3): p. 253-310.
5. Postlethwait, J.H., et al., *A genetic linkage map for the zebrafish*. Science, 1994. 264(5159): p. 699-703.
6. Whitfield, T.T., *Zebrafish as a model for hearing and deafness*.

Journal of neurobiology, 2002. 53(2): p. 157-171.

7. Ikegami, R., P. Hunter, and T.D. Yager, *Developmental activation of the capability to undergo checkpoint - induced apoptosis in the early zebrafish embryo*. Developmental biology, 1999. 209(2): p. 409-433.

8. Zon, L.I., *Zebrafish : a new model for human disease* . Genome Research, 1999. 9(2): p. 99-100.

9. Moorman, S.J., *Development of Sensory Systems in Zebrafish (Danio rerio)*. ILAR Journal, 2001. 42(4): p. 292-298.

10. Haddon, C. and J. Lewis, *Early ear development in the embryo of the zebrafish, Danio rerio*. Journal of Comparative Neurology, 1996. 365(1): p. 113-128.

11. Haffter, P., et al., *The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio*. Development, 1996. 123(1): p. 1-36.

12. Popper, A. and C. Platt, *Inner ear and lateral line*. The physiology of fishes, 1993: p. 99-136.

13. Mayer-Gostan, N., et al., *Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (Oncorhynchusmykissand Scophthalmusmaximus)* . Cell and tissue research, 1997. 289(1): p. 53-61.

14. Pisam, M., et al., *Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts, Oncorhynchus mykiss and Psetta maxima.*

Cell and tissue research, 1998. 294(2): p. 261-270.

15. Whitfield, T.T., et al., *Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line.* Development, 1996. 123(1): p.

241-254.

16. Villefranc, J.A., J. Amigo, and N.D. Lawson, *Gateway compatible vectors for analysis of gene function in the zebrafish.* Developmental

Dynamics, 2007. 236(11): p. 3077-3087.