

R
008.8
7511

私立中山醫學院醫學研究所碩士論文

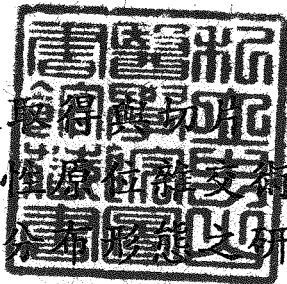
指導教授

李 娟 博士

李 天 翎 博士

使用非放射性原位雜交術
於人、鼠共同高度保留性基因
觀察其 mRNA 於胚胎及組織切片之表現

Detection of mRNA of highly conserved
genes in tissue and embryo sections
using nonradioactive in situ hybridization
in mouse and human



- I. 老鼠胚胎之
- II. 應用非放射性於易脆染色體症候
群基因正常
- III. 應用非放射性原位雜交術於蛋白質甲基轉移
酶基因之老化組織表現形態之研究

研究生：陳 玉 雲

中華民國八十五年六月

中山醫學院圖書館



C036227

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人 在 中山醫學院 醫學研究所
組 84 學年 第 2 學期 所撰 碩士學位論文。

論文名稱：使用非放射性原位雜交術於人鼠共同高度保留性基因觀察其 mRNA 於胚胎及組織切片之表現

同意 不同意
本人具有著作財產權之論文摘要，授予國家圖書館、本學院及行政院
網路，並重製成電子檔，得不限時間與次數，以光碟
或紙本重製發行。

同意 不同意
本人具有著作財產權之論文全文資料，授予國家圖書館、本學院及行政院
縮小、博碩士論文、行政、國、家、科、學、委、員、會、科、學、技、術、資、源、中、心、延、後、至
民國 85 年 1 月 1 日 止，不得再行複製、出版、發行、或向他人提供。

同意 不同意
本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定之圖書館及本人
以各種方法重製，不得再行複製、出版、發行、或向他人提供。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行
權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：李娟

研究生簽名：陳云震 學號：R8301106
(親筆正楷)

日期：民國 85 年 5 月 20 日

- 備註：1. 上述同意與不同意之欄立若未鉤選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 著作權的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，依均須先取得著作權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內勾選並填妥。
2. 所將權授在，金支代義權全在已，裝面去本地
依均須先取得著作權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內勾選並填妥。
3. 依均須先取得著作權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內勾選並填妥。
4. 依均須先取得著作權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內勾選並填妥。
5. 依均須先取得著作權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內勾選並填妥。

研究生姓名：陳云雲 聯絡電話：07, 7633524
地址：鳳山市新富里新旋路17號54j

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之
必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩
士論文考試委員審查合格及口試通過。

口試委員

中央研究院 分子生物研究所

鍾邦柱 博士

鍾邦柱

私立中山醫學院 醫學研究所
(論文指導教授)

李 娟 博士

李娟

私立中山醫學院 牙醫研究所
(論文指導教授)

李天翎 博士

李天翎

中華民國 八十五年 五月

學生陳玉雲論文題目為使用非放射性原位雜交術於
人鼠共同高度保留性基因觀察其 mRNA 於胚胎及組織
切片之表現，其論文已經中山醫學院醫學研究所碩
士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導
教授核閱後無誤。

指導教授：李 娟 副教授 簽名：李娟

李天翎 副教授 簽名：李天翎

中華民國八十五年五月三十日

誌謝

木棉花又到了飄絮的時候，中山培育我四年，兩年大學生涯、兩年研究所；由崎嶇的小路到現在的筆直大道這裡的一切是如此熟悉。

由一個護理臨床工作者到護理系的轉學生，因緣巧合的進了研究所卻由護理組跳到基礎醫學研究，由護理學出發卻以分子組織化學做為終點。而今我又即將回到護理的研究領域，問我為什麼要念研究所？有什麼獲得？千頭萬緒不知從何說起，我想如果只是為了避免去面對工作或是期望藉此能獲得利益，走實驗研究路線就有點搭錯線，兩年的研究生涯需要付出許多心力、時間與金錢，套句別人的話：努力不見得有收穫，但要有收穫卻一定要努力。

研究所給我最大的收穫是：讓我深深的體會到一個人的成就絕不是個人的努力而已，它需要許多人的支持。

在這裡我要感謝我的兩位指導教授，是他們無私的教誨與支持我才能有今天，同時要感謝護理系的各位老師她們從來不吝於伸出援手。

感謝上蒼使我在每一條路上、每個階段都能有人拉我一把，感謝李宣佑教授、王怡鈞學長、謝淑卿學姐、李月君老師給予的協助，謝明麗副教授的指導，電顯室廖克剛教授的支持與協助以及師母楊明鈴老師的體貼與支援、解剖科王旭明老師提供我資料；當然還有我可愛的同學好友：王梅林、歐威志、蔡蕙芳、林敏惠、許毓偵、王瓊瑤學姐、徐在靜學姐、陳銘銜學長；親愛的學妹：孫翠蓮、楊千瑩、艾麗霜、美惠、佩穎、學弟再宏、陶子還有牙科助理秀玲小姐，感謝他們在我失意時、在我無助時、給我支持、給我鼓勵、給

我協助；要感謝的人太多而能說的話太少，曾幫助我的朋友、師長我衷心的謝謝您。

最後我謹以此成果獻給我的父母與我的妹妹、小弟和我的男友，感謝他們絕對的支持，當然還有我的愛貓強強感謝牠陪我度過每一個難熬的日子。

目錄

目次	頁碼
誌謝	
中文摘要	8
英文摘要	9
第一章序論	
1.1 總論	10
1.2 應用非放射性原位雜交術於易脆染色體症候群基因正常分佈型態之研究	11
1.3 應用非放射性原位雜交術於蛋白甲基轉移酶之基因於老化組織表現型態之研究	13
第二章材料與方法	
2.1.1 實驗動物	16
2.1.2 儀器設備	16
2.1.3 試藥	17
2.1.4 配製法	19
2.2 實驗方法	26
2.2.1 實驗流程	26
2.2.2 鼠胚之選取	26
2.2.3 成鼠臟器之採取	27
2.2.4 切片製作	28
2.2.5 Hematoxyline / Eosin staining	28
2.2.6 Luxol fast blue staining	28
2.2.7 探針製備(probe label)	29
2.2.8 標示檢測 (Dot blot)	32

2.2.9 原位雜交術之進行	33
第三章結果	35
第四章討論	90
第五章參考資料	95
附錄	104

表格目錄:

表一	47
表二	52
表三	56
表四	59
表五	66
表六	72
表七	74
表八	75
表九	76
表十	82
表十一	83
表十二	84

線形圖目錄:

線形圖一	48
線形圖二 a, b	53
線形圖三	60
線形圖四 a, b	67

解剖圖示目錄:

圖一	44
圖二	45
圖三	46
圖四	49
圖五	50
圖六	51
圖七	54
圖八	55
圖九	57
圖十	58
圖十一	61
圖十二	62
圖十三	63
圖十四	64
圖十五	65
圖十六	68
圖十七	69
圖十八	70
圖十九	71
圖二十	73
圖二十一	77
圖二十二	78
圖二十三	79
圖二十四	80

圖二十五	81
圖二十六	85
圖二十七	86
圖二十八	87
圖二十九	88
圖三十	89

中文摘要

已知許多與遺傳性疾病相關之基因具人鼠共同基因高度保留性，此類基因多為常駐性基因；觀察其 mRNA 於組織中隨時間與空間之分布變化是探討該種基因功能及其異常病變之機轉的重要基礎研究之一。

非放射性標誌法進行原位雜交其優點在於其避免了放射性同位素之使用且利於長期儲放，利用單股、長度僅 45 mer 之寡核甘酸鏈可達到實驗之專一性；同時應用各組寡核甘酸鏈之 G:C 比例，僅改變雜交緩衝液中 formamide 的濃度可適用於多種不同探針之雜交，其結果具相當的特異性。

應用本實驗法研究 FMR-1，PCM 基因產物於不同天數之胚胎與成鼠組織切片，其結果 *fmr-1* mRNA 主要表現於發育早期，同時於高度分化性組織有高度表現，而於不同的序列組合之探針進行之雜交中，我們發現其 mRNA 的表現強度與序列之互補性組合有正相關性，同時其分布之區域除廣泛性存在外，另於 alternative splicing form mRNA isoforms 發現其表現區域不同，意味著不同的 *fmr-1* mRNA 其具有不同之組織專一性。*pcm* mRNA 則著重於較高鼠齡時期腦部，及各項分化活力高之組織如肌肉骨骼系統中表現。

應用本實驗法於此二項基因產物，由其表現型態之特異性研究證實，此一非放射性探針標誌原位雜交法之穩定性及應用性將可應用至其他基因產物之研究，堪稱其為一便利而有效之研究工具。同時也有助於對此二項基因之功能表現有更進一步瞭解。

ABSTRACT

In this study the expression of FMR-1 and PCMT, two genes that are highly conserved in human and mouse, was localized using nonradioactive in situ hybridization. Mouse tissue and embryo sections of different developmental stages were formalin-fixed and paraffin-embedded. Oligonucleotides of the length of 45-mer were synthesized and labeled nonradioactively with digoxigenin. By changing the formamide concentrations in the hybridization buffer, in situ hybridization with probes of different GC content can be performed at the same temperature, which greatly improves the application of the technique. The expression of FMR-1 was mainly in the early developmental stages, especially in highly differentiated tissues, such as brain. We designed three oligonucleotide probes that can distinguish different alternative splicing products of FMR-1. The strength and subtle localization differences of the mRNA expression can be observed by using these probes. The expression of PCMT, although can be detected as early as in 10-day embryos, are strongest in certain areas of brain in aged mice. Different expression pattern of these two widely expressed house-keeping genes suggests that the experimental results are genuine tissue specific. Since oligonucleotides can be easily synthesized and the non-radioactive label is stable, the reproducibility of our experiments suggests that in situ hybridization with non-radioactive oligonucleotide probes has the potential to be applied generally for studying the expression of genes.

基因之研究。

本實驗選定兩種基因，易脆染色體症候群基因(Fragile X mental retardation, FMR-1) 與蛋白質甲基轉移酶(L-isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase, PCM)基因；進行原位雜交術，於切片上觀察此兩種在人、鼠不同物種間，高度保留之基因其 mRNA，於胚胎發育及特定成鼠臟器之空間與時間上的表現型態，藉此期能對於此二種基因有更具體化瞭解。

鼠類胚胎發育週期約需 17-18 天，其器官組織發育程序與人類極為相似（附圖一），許多與遺傳疾病相關之基因被發現與人類具高度基因共同保留性，同時其胚胎之收集較易，有利於研究人類疾病。

本實驗中我們試圖利用此一特性，進一步瞭解此二種基因在胚胎發育中所扮演之角色。期盼能藉此使我們獲得一簡便而不需使用放射性同位素的研究方式，並對人類遺傳性疾病致病機轉及修補系統對老化之影響有更明確的認知。

1.2. 應用非放射性原位雜交術於易脆染色體症候群正常分佈型態之研究：

易脆染色體症候群 (Fragile X syndrome) 係於 1943 年由 Martin 與 Bell 等人發現某些智障患者，具下列特徵(Bell et al., 1991)：中度至重度智障，同時伴有臉部拉長、耳朵較大、四肢關節肥大等外觀上的特徵；同時在男性於青春前期開始會有巨睪現象，此外患者通常有語言及學習上障礙並有過動行為，此症候群顯示有性聯遺傳傾向。

1969 年 Lubs 利用細胞遺傳學的方法(Cytogenetic methods) 發現

第一章

序論

(INTRODUCTION)

1.1 總論

原位雜交術 (in situ hybridization) 開始發展於 1969 年，藉由特殊設計的探針可於組織切片、細胞和染色體上，經由直接或間接方式、在偵測基因表現之同時，可作形態學上觀察；藉此可進一步研究特定基因之於空間、時間上表現型態，使我們能更直接的對特定基因作用機轉有更多瞭解。

合併使用細胞免疫化學法 (immunocytochemistry)，原位雜交術可以經由顯微鏡操作，在局部解剖位置上觀察特定基因於 DNA、mRNA 及蛋白階層之活性表現。

早期原位雜交術使用放射性同位素標誌之核苷酸，以自動放射性顯影 (autoradiography) 來尋找與其相合互補之基因序列。由於技術的進步，1985 年開始有人將經由化學合成放射性標誌之寡核苷酸序列 (oligonucleotide)，應用於 mRNA 之偵測上。

雖然，這使得原位雜交術具高敏感性和高應用性，但由於其放射性探針之放射安全及半衰期之限制，同時其曝光耗時頗長使得實驗之應用受限，此外放射線自然的衰退使得原位雜交術解析度降低許多。

使用非放射性標誌探針可避免掉上述缺陷，更進一步使得一種以上之不同的標誌，可運用於同一實驗中。同時由於抗體偵測系統對於探針之敏感性增加，促使我們將其運用於人鼠共同高度保留性

X 染色體末端有不尋常收縮現象 (Lubs, 1969), 1977 年 Harvey 等人證實 Lubs 的觀察。(Harvey et al., 1977)

此症候群在分子生物學 (Molecular biology) 方面, 到了 1991 年有實驗室發表選殖到一個與易脆染色體症候群相關的基因, 命名為: Fragile -X -Mental Retardation-1 簡稱 FMR-1。此基因第一個 exon 出現 (CGG)_n 核酸序列重複現象, 且其重複次數與症狀出現與否相關。造成易脆-X 染色體症候群最常見的原因, 是 FMR-1 基因第一個 exon 之不轉譯區 (5'untranslated region, 5'UTR) 之 CGG tri-nucleotide tandem repeat 發生倍增突變 (amplification mutation)。使得 FMR-1 之啓動區 (promotor region) 的 CpG island 發生超甲基化 (hypermethylation), 導致 FMR-1 基因失去功能而產生疾病。(Bell et al., 1991; Oberle et al., 1993; Pieretti et al., 1991; Sutcliff et al., 1992)

其他較少見原因尚有基因缺損 (deletion) (Gedeon et al., 1992; Wohrle et al., 1992; Gu et al., 1994) 和點突變 (point mutation) (Boulle et al., 1993)。但對於造成易脆染色體症候群之確實機轉, 以及其產物的功能在智能的表現中扮演何種角色都還不確定。

易脆染色體症候群導致智障兒的比例僅次於唐氏症 (Down's syndrome) 而唐氏症為偶發性, 易脆 X 染色體症候群則為遺傳性, 故而對其病因之瞭解愈顯重要 (Sherman. et al., 1984)。

目前已知 FMR-1 基因位於 X 染色體 q 臂 27.3 處, Siomi 等人於 1993 年發現 FMR-1 含有若干 RNA 結合蛋白新發現之特有序列, 並於試管中證實 FMR-1 蛋白可與 RNA 結合。而老鼠之 cDNA 選殖及定序以及有 alternative splicing 之不同表現產物等之研究結果由 Ashley 等人於 1993 年發表。同時 Abitol et al., 1993; Hinds et al.,

1993; Bachner et al., 1993; 運用 DNA, RNA 及不同長度 oligonucleotide 當探針，以放射性標誌或免疫螢光的方式，進行原位雜交術其結果發現：在胚胎時期 FMR-1 基因分佈相當廣泛，而於成鼠則特別在一些高度分化的組織中出現，尤其是中樞神經系統及生殖系統有高密度表現。

我們覺得如果能進一步瞭解 FMR-1 所受調控及所存在的位置等時空上的分佈，一定能對探討 FMR-1 的功能有很大幫助。本研究自兩年前開始進行老鼠各階段各部位切片，在實驗中我們利用 Digoxigenin (DIG) 結合之非放射性寡核甘酸鏈標誌為探針，標誌後以其進行本實驗。除希望技術之建立外，同時著眼於 FMR-1 基因有多種 alternative splicing products 而各產物之分布及變化仍未確定 (Ashley 1993)，本研究欲藉特殊序列探針之設計進行原位雜交術實驗，對此進行分析。

我們預測可重複 1993 年 Hinds 等人的實驗，同時由於應用非放射性探針將使得實驗之重複性、保存性、解析度增加，這將使我們對於 FMR-1 基因之表現型態有更多瞭解。

1.3. 應用非放射性原位雜交術於蛋白甲基轉移酶在老化組織表現型態之研究：

老化是動物或人體，逐漸失去其維持恆定性的功能，導致個體本身易受疾病纏身、身體活力降低終至死亡的過程。導致生物體老化的原因，很多研究方向及被提出的假說，也非常多。(李權益 1996)

大致可分成兩類：

一、命定論：認為老化是命定 (programmed) 及不可逆轉

(irreversible) 的過程，而控制此一過程之基因被認為已記載於細胞之 DNA 中。

二、錯誤累積論：認為生物在成長過程中，體細胞會不斷累積內生性 (endogenous) 及外生性 (exogenous) 破壞因子，對組織器官內的損傷，積至一定量並嚴重到影響維持其生命的各種生化功能時，組織器官就會發生各種病變以至死去。

相對於第二項理論，修補系統就顯相當重要。

1965 年 Axelerod 和 Daly 首先描述蛋白甲基轉移酶 (protein carboxymethyltransferase; PCM) 為一 'methanol forming enzyme' (Axelord and Daly; 1965)。目前已知 PCM 於原生類如細菌，真核類生物如各種動、植物皆有，在一般真核生物其編號為 E.C.2.1.1.77 其主要功能為修補，將蛋白質異常型態之 L-isoaspartyl and D-aspartyl 經由把來自 SAM - (S-adenosylmethionine) 的甲基轉移至酸化氨基酸側鏈之 Carboxyl group 上而將自然異化之蛋白做修補。(附圖二)

在老化受損之蛋白修補上 PCM 可能扮演一重要角色，在 O'Connor et al., 1985; Johnson et al., 1991; Li and Clarke, 1992 等人之 PCM 實驗中，發現 PCM 的活性廣泛的存在於動、植物及細菌；這似乎意味著這樣一個修補系統，對於生命體是相當重要的。

1992 年 Maclaren 等人研究顯示 L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase gene (PCMT-1)，位於人類染色體 6q 22.3 - 6q 24，而鼠類之基因位於第 10 染色體 8.2 ± 3.5 靠近 centromere 處，此一酵素存於細胞質內其分子子量約 25KD (Clarke, 1985)。

為進一步瞭解 PCM 的活性，在真核生物及複合性組織之生理性意義，自 1992 年始陸續有人自細胞及鼠類組織中取 mRNA 作為

PCM 基因活性表現之研究。 Galus et al., 1994; Romanik et al., 1992, 實驗發現以北方墨點法在老鼠之腦部、睪丸、肝臟和腎臟, 有多重 (multiple) PCM mRNA 之表現; 經由比較其基因序列後發現, PCM 基因顯然在脊椎動物為一長駐性基因 (house keeping gene)。

我們希望能經由非放射性探針, 偵測其在於胚胎與不同天數之成鼠臟器及腦部切片中 mRNA 在空間與時間上的表現型態, 進一步確認 PCM 基因於生理過程中所扮演的角色並和前人之研究作一應對。

第二章

材料與方法

(MATERIALS AND METHODS)

2.1 實驗材料:

2.1.1 實驗動物:

小白鼠品系為 Bahl-c，購自台大醫學院動物中心，於中山醫學院動物室飼養。自 6 週大未曾交配過之成鼠開始飼養，期間以一隻雄鼠配四隻雌鼠為一籠飼養；飼養期間與予充份飲水及飼料。餵養飼料採用福壽牌老鼠實驗動物混合飼料，內含粗蛋白 23.5 % 以上，粗脂肪 4.5 % 以上，粗纖維 6 % 以下，水份 12 % 以下，灰份 9 %。飼養溫度為 21 °C，濕度為 45-60 %，光照時間與無光照時間為 14:10 小時。

2.1.2 儀器設備:

儀器設備	廠牌
1. 電動電子顯示天秤	PB302, Mettler Toledo
2. PH meter	Beckmen
3. microscop	Nikon
4. 解剖顯微鏡 Stereomicroscope	Olympus
5. Centrifuge	Eppendorf 5415c
6. 手動切片機	Spencer (820) MICROTOME

7. 電動切片機 Autocut microtome	Leica
8. Slide warmer	Lab-Line instrument
9. Incubator	Hotech
10. Water bath	TKS WB211
11. Spectrophotometer DU-640	Beckman
12. -70 °C deep freezer	Revco-Elmer Cetus Inc.
13. Dissection scissors	
14. two pairs#5 watchmaker's forceps	(clean and sharp)
15. 本生燈 Burner	
16. 真空烘箱 Vaccum Oven	Hetch
17. 可丟棄滅菌注射筒過濾器 Disposable membrane filter 0.2µm	Nalgene
18. 可丟棄滅菌過濾器	Nalgene
19. 磁式電動攪拌器 (Stir plate)	Corning

2.1.3. 試藥:

名稱	廠牌
1. Sodium chloride	Sigma
2. Potassium chloride	Merck
3. Absolute ethanol	Merck
4. Xylene	Merck
5. Paraformaldehyde	Merck

6.Sodium hydrogen carbonate	Merck
7.Diethyl pyrocarbonate	Merck
8.25 % glutar-aldehyde	Mikroskopie
9.2 % aminopyltriethoxysilane	Merck
10.Aceton	Merck
11.Paraffine	Boehringer Mannheim
12.Hematoxylin	Carlton (1947)
13.Eosin Y	Carlton (45380)
14.Glacial acetic acid	Sigma
15.Phenol red	Sigma
16.Sodium citrate	Sigma
17.Maleic acid	Sigma
18.Blocking reagent	Boehringer Mannheim
19. DIG oligonucleotide 3'end labeling Kit	Boehringer Mannheim
20.N-lauroylsarkosine	Sigma
21.Lithium chloride	Sigma
22.Lithium Carbonate	Merck
23.Tris	Sigma
24. EDTA	Sigma
25.MgCl ₂	Sigma
26.Bovine serum albumin fraction V	Sigma
27.Dextran Sulfate	Sigma
28.Formamide	Merck
29.Triethanolamine	Sigma
30.Hydrogen chloride	Merck

31.Acetic acid	Merck
32.Sodium citrate	Sigma
33.Pepsin	Sigma
34. t-RNA, E. Coli	Boehringer Mannheim
35.Levamisole	Sigma
36.5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)	Boehringer Mannheim
37.4 Nitro-blue-tetrazolium chloride (NBT)	Boehringer Mannheim
38.Fast red solution	Vector
39.Luxol fast blue	Merck
40.AG 501-X8 ion exchange resin	Bio-rad
41.Cresyl violet	Merck
42.Ap-anti-DIG antibody	Boehringer Mannheim

2.1.4. 配製法:

溶液	配製法
1.Fixative solution (固定液)	16 %Paraformadehyde 10 ml 10 x Phosphate Buffered Saline (PBS) 4 ml 25 % Glutardaldehyde solution 4ml d2H2O 22 ml total volume : 40 ml
2.Coating solution	

2.TESPA	2%(v/v)aminopyltriethoxysilane (TESPA) in acetone
3.Delafied Hematoxylin(Carlton 1947)	hematoxylin 4 gm absolute ethyl alcohol 25 ml
4.Eosin Y	eosin Y 1.0 gm 70 % ethyl alcohol 1000 ml galcial acetic acid 5.0 ml
5.0.1 % Luxol fast blue solution	Luxol fast blue,MBS 0.5 gm 95 % ethanol 500 ml 10 % acetic acid 250 ul
6.0.1 % Cresyl echt violet solution	Cresyl echt violet 0.1 gm ddH2O 100 ml
7.Deionzed formamide solution	AG 501-X8 ion exchange resin: 1 and formamide: 10 , keep 30 min then filter with whatman filter paper.
8.0.2 N HCL+Pepsin	0.2N HCL containing 500 µg / ml pepsin
9.0.1 M Triethanolamine HCL	triethanolamine 9.3 gm DEPC water 480 ml PH : 8.0
10.0.1 M Triethanolamine + 0.25 %acetic acid	triethanolamine 9.3 gm ddH2O 480 ml 5 % acetic acid 1000 ul
11.20 X SSC	NaCl 175.3 gm Sodium citrate 88.2 gm ddH2O 800 ml

	PH : 7.0	
12.2 X SSC+ 50% formamide	20 X SSC	2 ml
	formamide	10 ml
	DEPC water	8 ml
13.10 mM Tris buffer	tris base	24.2 gm
	DEPC water	1000 ml
	PH : 7.6	
14.Dextran sulfate	dextran sulfate	20 gm
	DEPC water	40 ml
	stored at -20 °C. before use	
	warm up to 50 °C ◦	
15. 3 M NaCl	NaCl	17.5 gm
	DEPC water	100 ml
16. 2 M Tris	Tris base	48.44 gm
	DEPC water	160 ml
17.500 mM EDTA	EDTA	1.8625 gm
	DEPC water	10 ml
18.Buffer I (緩衝液I) (in-situ hybridization)	Tris base	6.05 gm
	NaCl	2.922 gm
	DEPC water	400 ml
	PH : 7.5 ; need autoclave.	
19. Buffer II (緩衝液II) (in-situ hybridization)	Tris base	6.0555 gm
	NaCl	2.922 gm
	MgCl ₂	5.0825 gm
	DEPC water	400 ml
	PH : 9.5 ; need autoclave.	
20.Buffer 1	Maleic acid	100 mM

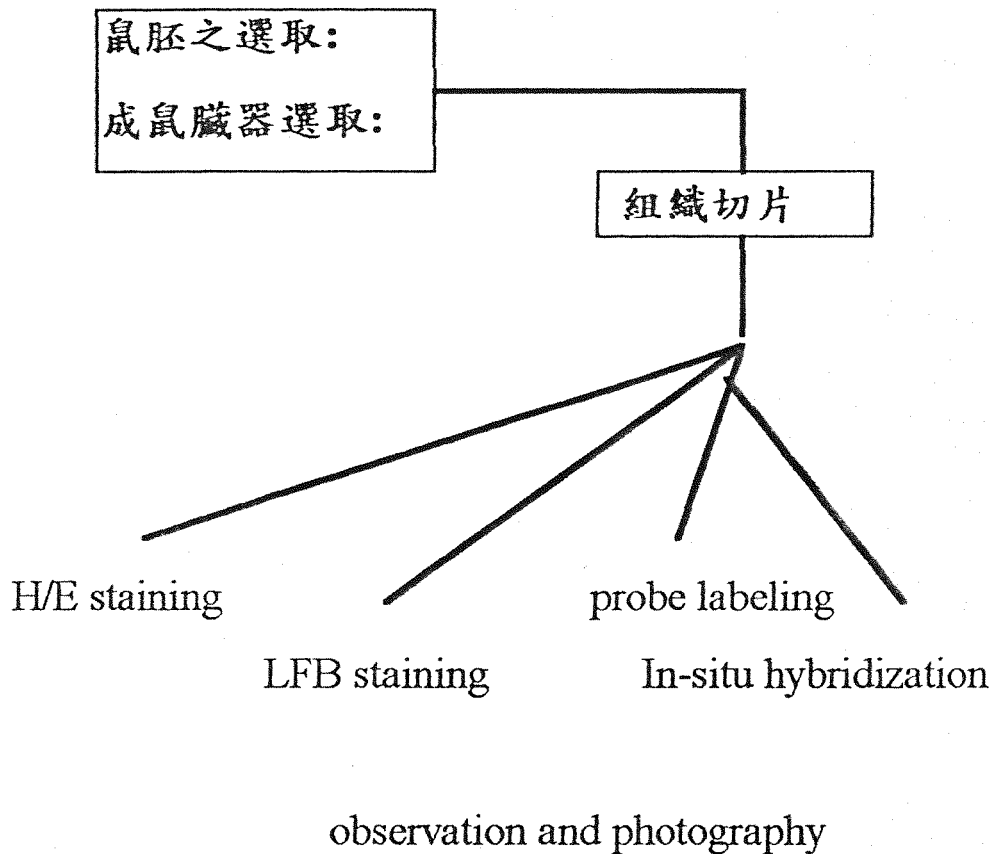
(Dot-blot)	NaCl	150 mM
	PH : 7.5 ; need autoclave.	
21.Buffer 2 (Dot blot)	1 % w/v blocking reagent in buffer I ; need autoclave.	
22.Buffer 3 (Dot blot)	Tris-base	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	50 mM
	PH : 9.5 ; need autoclave.	
23.Blocking reagent	blocking reagent	1 gm
	buffer I	10 ml
	need autoclave.	
24.Washing I solution (冲洗液I)	1 % SDS	10 ml
	20 X SSC	1 ml
	ddH ₂ O	10 ml
25.Washing II solution (冲洗液II)	2 X SSC	0.5 ml
	1 % SDS	1 ml
	ddH ₂ O	10 ml
26.Prehybridization solution (Dot- blot)	20X SSC	3 ml
	10 % Blocking reagent	120 μl
	0.2 % SDS	120 μl
	1 % N-lauroylsarcosine	120 μl
	ddH ₂ O	8640 μl
	total volume	8 ml
	(20 ml / 100 ml) ; filter sterilized by 0.2 μm filter is needed.	

<p>30.Prehybridization solution: (in-situ hybridization) probe : 1993 FMR-1(sense, anti-sense) formamide :50 % TM: 50 °C ◦</p>	<p>Deionized formamide 100 % 7.5 ml NaCl 3 M 1.5 ml Tris 2 M 150 µl EDTA 500 mm 75 µl Dehardt's reagent 50 % 300 µl DEPC water 1975 µl t-RNA (10mg / ml) 1500 µl Dextran 50 % 2000 µl total amount : 15 ml. filterlization by 0.2 µm filter is needed .</p>
<p>31.hybridization solution : (probe was DIG labeled)</p>	<p>probe : prehybridization 1 µl : 200µl (2 pmol in 200µl)</p>
<p>32.anti-body solution (AP-anti-DIG antibody)</p>	<p>antibody (150µl / 200µl) : bufferI+BSA 1 µl : 1 ml</p>
<p>33.substrate solution</p>	<p>NBT (100mg / ml) : 3.4 µl BCIP (50 mg / ml) :3.6 µl in bufferII 1ml ◦</p>
<p>34.prehybridization solution : (in situ hybridization) probe : fnr-1 co formamide : 66.45 % TM : 50 °C</p>	<p>Deionized formamide 100% 6.645 ml NaCl 3 M 1 ml Tris 2 M 100µl EDTA 500 mM 50µl Denhardt's 50 % 200µl</p>

	t-RNA (10 mg / ml)	1 ml
	Dextran sulfate 50 %	2 ml
	total volume : 10 ml	
	filterlization °	
35. prehybridization solution: (in situ hybridization)	Deionized formamide : 100 %	12.9 ml
probe : fmr-1 c39	NaCl 3 M	2 ml
fmr-1c75	Tris 2 M	200µl
formamide : 64.69 %	EDTA 500 mM	100µl
TM : 50 °C	Denhardt's 50 %	400µl
	t-RNA (10 mg / ml)	2 ml
	Dextran sulfate 50 %	4 ml
	DEPC water	40µl
	total volume	20 ml

2.2. 實驗方法:

2.2.1. 實驗流程:



2.2.2. 鼠胚之選取:

選擇週齡介於六至八週性成熟之雌鼠，將其與雄鼠以一比四之比例配於一籠中。以陰道沖洗抹片法（附圖三 a）隔日進行抹片檢查其性週期（附圖三 b），以預知其受孕期並配合觀察雌鼠是否有陰道塞（vaginal plug）作為判斷交配與否之依據，依此原則收集不同時期之胚胎標本。依據陰道抹片結果可預先判定胚胎天數但誤差較大；我們配合於解剖後以同胎胚胎之平均體長與標準胚胎

體長及重量表比較並修正則可對胚胎之天數作更精確之判定。

(附圖四)。

取胚程序如下：

取出經交配確定受孕之雌鼠，以頸椎脫臼法 (cervical dislocation) 處理。(附圖五)

將腹部噴灑 75 % 酒精消毒後，再以雙手的食指和拇指撕開腹部皮膚露出腹膜。以解剖剪剪開腹膜，移開消化道，將 Y 形子宮挑出。(附圖六)

以鑷子夾住靠近輸卵管端的子宮角，剝離輸卵管和卵巢間的脂肪和繫膜，將剪下之輸卵管置於盛有事先預備之緩衝液中；挑開被膜使胚胎完全露出。(附圖七)

以緩衝液 (1 x PBS) 沖洗後置入固定液 (4% paraformaldehyde) 中浸潤 24 小時後，以 DEPC water 連續沖洗至完全去除固定液；以此法準備懷孕 8、10、11、12、13、14、15、16、17、18 天及出生後 24、48 小時之胚胎與幼鼠。

2.2.3. 成鼠臟器之採取：

依成長記錄選取不同天數之成鼠，以頸椎脫臼法處置後；撕開腹部皮膚筋膜露出臟器。

選取心臟、肝臟、腎臟、脾臟、子宮及睪丸，另剪開腦後皮膜，以骨剪挑開頭骨以尖剪及尖嘴鑷移出腦部；將臟器於緩衝液中沖洗後進行固定、包埋。

由此獲得 7 天、2、3、4、21、23、27、31、34、40、43、47、50、54、57、60、62 週大之成鼠器官組織切片。

2.2.4. 切片製作:

標本經完全沖洗後，進入由低 (30 % ethanol) 至高濃度 (absolute ethanol) 酒精序列中逐漸進行脫水；並於酒精處理後進入二甲苯 (xylene) 中浸潤 30 分鐘。完全脫水後置入已加溫至 56 °C 之石蠟中，浸潤並加以包埋。

硬化後修除多餘石蠟，將其固定於小木塊上 (block) 上；設定 Leica autocut 2550 電動連續切片機以 7-15 um 厚度、0-5 之角度進行標本之切片製作。

切下之標本於熱水中開展後，將其固定於已經用粘黏劑或膠原蛋白 (TESPA, 2 % 3-aminoproyltriethoxysilane or gelatin coating) 預先塗敷處理之玻片上乾燥後標號收集。

2.2.5. Hematoxyline / Eosin staining:

組織切片後經 H / E staining 可辨識其一般組織形態，其染色可見細胞核呈深藍而細胞質呈深紅。

將石蠟切片脫蠟、水合後於試液中浸潤，再依其染色深度以酸化酒精或 Lithium carbonate solution 處理；脫水後封片。(圖一 a)

2.2.6. Luxol Fast Blue staining :

此項染色 (LFB) 針對神經組織，可將 sphingomyline 及神經細胞同時染出。就中樞神經染色法而言，一似 H / E 染色法之於一般組織，可謂神經組織代表性染色法。(圖一 b)

將石蠟切片脫蠟後水洗，浸入 LFB 溶液中以 58 --60 °C 過夜；水洗後以 75 % ethanol 分色。再以已加熱至 60 °C 之 Cresyl violet solution 中浸潤，酒精分色、脫水後封片。其結果可見髓磷脂為藍

色，而一般腦細胞為紫色。(Kluver-Barrera Method 1953)

2.2.6. 探針製備 (probe labeling):

本次實驗以非放射性標示(DIG: Digoxigenin -ddUTP, alkaline stable), 連結於長度為 40-45 mer 之 oligo-nucleotide 之 3'end。其操作程序以 DIG oligo-nucleotide 3'end labeling Kit (Boehringer Mannheim) 所提供為主。(附圖八)

實驗所使用之探針共六組，其中 1, 2, 4, 5, 6 組探針係根據 Ashley 等人 1993 年發表之老鼠 *mfmr-1* cDNA 基因序列(Ashely; 1993)。第 1 組探針係利用 Beckman DNA 合成器合成，而其餘各組則由快興科技公司合成。第三組探針係根據 Romainik 等人於 1992 年發表之老鼠 *pcm* (protein carboxymethyltransferase) cDNA 基因序列(Romainik; 1992)。

各組分序如下:

1.1. *mfmr-1ac*: (anti-sense strand)

5'AGCAC CATGA GTACC AATAG CTAAA CCCAT
CAGAT CTTCT

mfmr-1ac and *mfmr-1a* 此組相對性探針序列係以 Ashley 等人 1993 年發表之老鼠 *fmr-1* cDNA 而設計之互補性核苷酸，其位置為 801-840。

1.2. *mfmr-1a*: (sense strand)

5'AGAAG ATCTG ATGGG TTTAG CTATT GGTAC
TCATG GTGCT 3'共 40 mer。

2.1. *mfmr-1A* : (anti-sense strand)

5'GAGAA GATGG AGGAG CTGGT GGTGG
AAGTG CGGGG CTCCA ATGGC 3'

2.2. *mfmr-1S* : (sense strand)

5'GCCAT TGGAG CCCCC GACTT CCACC
ACCAG CTCCT CCATC TTCTC 3'

共 45 mer. 此組探針 *mfmr-1A* 與其相對之 *mfmr-1S* 核甘酸序列係依 Hinds 等人 1993 年實驗發表中所用之探針序列而設計，其序列位置為 Ashley 1993 發表之 cDNA 核甘酸鏈序列 118 - 162 。

3.1. *pcm-'* : (anti-sense strand)

5'TGCAG GACCG ACTGG CAATA TCAAT
CTTCC ACCAG GCTTT AACTG 3'

3.2. *pcm-+* : (sense strand)

5'CAGTT AAAGC CTGGT GGAAG ATTCA
TATTC CCAGT CGGTC CTGCA 3'

共 45mer ， *pcm-+* *pcm-'* 此組探針係依據 Romanik 1992 年發表 PCM cDNA 基因序列中 exon 7 之核甘酸鏈序列設計而來。

4. *mfmr-1 C75* : (splicing product)

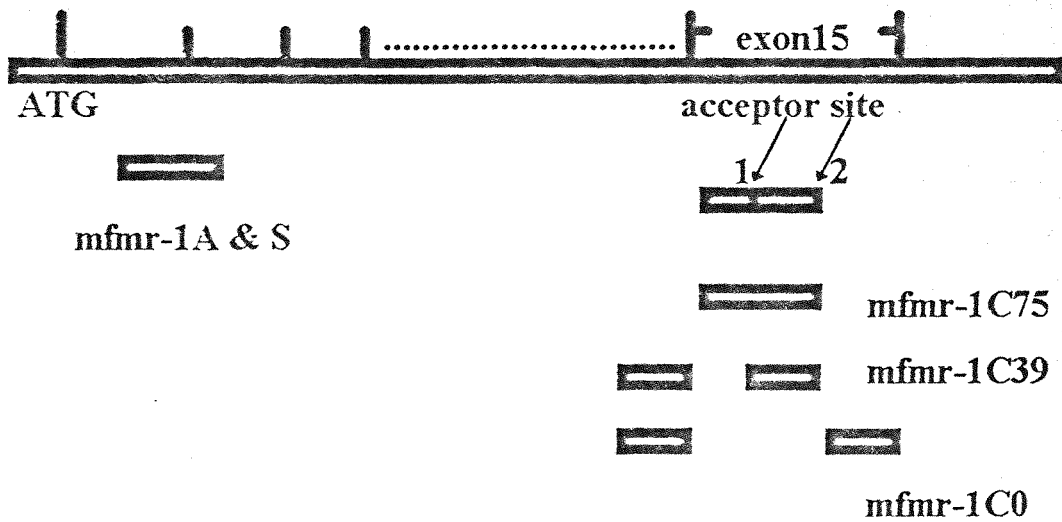
5'GAGTT CGTCTCTGTG GTCAG ATTCT
GTTTC AGAAG CATTG GATGC 3'

mfmr-1 C75 核甘酸基因序列位置，位於 *mfmr-1* cDNA region C 核甘酸鏈序列 1600 - 45 。

5. *mfmr-1 C39* : (splicing product)

5' GAGTT CGTCT CTGTG GTCAG ATTCT
GAAGT ATATC CAGGA CCGCG 3'

*圖示 *mfmr-1A* 組與 *mfmr-1C0* 各組探針於 *fmr-1* cDNA 上分布區。



2.2.7. 標示檢測 : Dot Blot

標誌後探針 (100 μ mol) 溶於 100 μ l d_2H_2O 中，存於 $-20^\circ C$ 中備用；為確定其標識及確認效果，施行墨點法以進一步確定其標誌成功。

首先以含有 *mfmr-1* 基因之質體(MC 2.17) (Ashyle; 1993) 不同的稀釋濃度滴於 Nylon membrane 上 $120^\circ C$ 20 分鐘烘乾固定，後將 prehybridization buffer 以每 100 平方公分給予 4ml 之比例加入。該 membrane 於 $68^\circ C$ 水浴中 60min，後加入探針(10 pmol / ml)以每 100 方公分給與 2.5 ml 之比例加入後；續於 $54^\circ C$ 水浴中隔夜。以 washing solution 沖洗掉探針後；anti-DIG-Ap conjugate antibody 以 1:5000 比例加入，於室溫中浸潤 5 小時。

以 Buffer I & II 處理後加入受質(NBT) 4.5 μ l / ml 和呈色物質 (BCIP) 3.5 μ l / ml，於暗室中作用 16 小時以上後判讀其結果。(附圖十)

2.2.8. 原位雜交術(in-situ hybridization):

原位雜交術(in situ hybridization)之進行:

石蠟切片以二甲苯脫蠟後，經酒精序列性自 100 % 至 30 % 使組織切片恢復含水狀態，以溶於 0.2 N HCL 之胃蛋白酶來去除多餘的蛋白質；以 0.1 M Triethanolamine + 0.25 % acetic anhydride 去除非特異性負電荷後，用 10 mM Tris 緩衝液清洗完全並再經過酒精脫水並完全乾燥後，加入尚未加入探針之雜交緩衝(prehybridization buffer) 。

於 37 °C 中潤濕切片後，每片加入 200 ul 之相同的緩衝液，不過在緩衝液內加入各組不同已標誌之探針(1 : 200)、30 mM NaCl 、20 mM Tris 、2.5 mM EDTA 、0.02 % Denhardt's reagent 及 0.02 % Dextran sulfate 、依 TM 值 (註) 加入不同濃度之 deionized formamide 。

註：TM 值之計算：(Molecular cloning 第二版 Sambrook 等人著)

公式：

$$TM = 16.6 \log (M) + 0.41 (P_{g.c}) + 81.5 - B / L - 0.65 (P f)$$

M： 緩衝液中鹽類 (Salt) 濃度。

P_{g.c}：探針序列中 g: Guanine , c: Cytosin 所佔之比

例。

B： 常數 675 。

L： 探針序列長度。

P f： 緩衝液中 formamide 所加入之比例。

進行原位雜交時，以上述之雜交緩衝液將組織切片蓋滿，其上覆以蓋玻片後置入 50 °C 溫箱中，使探針與切片中之 mRNA 進行雜交約 16-20 小時。

後於 42 °C 中以 2X SSC 溶液將蓋玻片洗掉，續以 2 X SSC+50% formamide 的溶液，每 15 min 更換一次新鮮溶液共三次；將其續以 2 X SSC、1 X SSC、0.2 X SSC、0.1 X SSC 溶液進行每次 15 min 之清洗。

c. 鹼性磷酸酶免疫呈色反應:

將雜交及清洗結束之切片以 Tris 生理食鹽緩衝液 (TBS) 清洗後，浸泡於含 3 % 胎牛血清蛋白的 TBS 中，於室溫中 60 min，以減低非特異性的反應。

以相同溶液以 1:1000 μ l 的比例來稀釋可辨識並結合 Digoxigenin 的抗體原液，此抗體乃是標誌了鹼性磷酸酶。於 37 °C 中 3 小時後，以 TBS 將未作用之抗體洗淨，續用含 MgCl₂ 之高 PH: 9.5 的 TBS 清洗，以使切片更適於與酶受質 (NBT) 及呈色物質 (BCIP) 產生反應；切片於此時以內生性鹼性磷酸酶抑制劑 Levamisole (0.2 mg / 5ml) 處理，後續與此二種物質於避光情況下作用 16 小時後，以 1 X SSC 清洗後再用 Fast red (Vector) or methyl green 作對照染色。

切片脫水後封片以供鏡檢。

(流程見附圖十一)

第三章

結果

(RESULT)

3.1. 我們在實驗中，應用探針分別是 *mfmr-1ac*、*la* 與 *mfmr-1A*、*1S* 和 *pcm*-‘+’ ‘-’ 以及 *mfmr-1 C0*、*C39*、*C75* 等針對不同 alternative splicing forms mRNA (Ashley; 1993) 而設計之三組探針共六組，於相同階段之老鼠胚胎和成鼠腦部與各器官切片中進行反應。經原位雜交處理後以鹼性磷酸酶作呈色反應；切片加入 NBT 與 BCIP 反應 16 小時後，以 Fast red 做對比染色。使用光學顯微鏡可輕易於 10 倍數下，觀察其呈色部位與強度，藉以作為 mRNA 分布之判斷依據並依其出現之時間性與分布之空間性使我們可以對 *fmr-1* 與 *pcm* 基因的表現有更明確的瞭解。

每組探針重覆進行實驗，由探針之 sense、antisense 與不加探針三種加入探針方式作為實驗品質控制；三者於同一反應程序相同生長發育階段之不同切片所呈現反應，於每 10 片切片中其 sense strand 組探針呈現干擾性反應小於 2 片以下，結果可重複進行 2 次以上證實其穩定性，同時每次實驗只須 72 小時，便可得到結果。對於不同 TM 值之探針只須改變 formamide 濃度即可於一致的溫度下進行雜交反應，操作程序簡易。

同時，將不同探針處理之切片經顯微鏡觀察後，依其表現強度與區域作出表一至表十二，由表中結果顯示其各有其不同表現形態與分布特性，顯示此一原位雜交術之穩定性與應用性。

我們製備完成一系列不同天數之胚胎，圖一 a 中所示分別為 8、10、12、14、16 天大小之胚胎切片經 Hematoxylin / Eosin 染色；

同時為能明確的確定 mRNA 之表現部位，我們在圖二與圖三中標示出成鼠腦部與胚胎之主要部位以作為對照，同時於相對位置上搭配以腦神經組織特殊染色法 Luxol Fast Blue 染色之腦部結構作為對照比較的基礎。(圖一 b)

3.2.1 *mfmr-1* mRNA 在成鼠腦部之表現:

應用 *mfmr-1A* 該組長度 45 mer 的探針，以原位雜交術處理不同週數之成鼠腦部石蠟切片每片厚度約為 10 μ m，呈色後加入對比染色處理，最後於光學顯微鏡下觀察；發現於組織特定部位呈現藍紫色細顆粒，將其依不同部位之不同強度之表現，作一比較列於表一。

由表一中顯示成鼠腦部 *fmr-1* 之 mRNA，多表現於尾殼(Caudate putamen)、小腦顆粒層 (Cerebellum granular layer)、胼胝體 (Corpus callosum)、海馬回 (Hippocampus)、大腦皮質 (Neocortex)、腦室 (Ventricle) 等與智能發展、記憶、肢體平衡相關區域 (附圖十二)，將表一中所列與邊緣系統組成相關區域如海馬回、胼胝體、尾殼、腦室、阿蒙氏角 (Ammon's horn)、海馬回纖維部 (fimbria of hippocampus) 等區域之表現強度相加後作線形圖一。發現 *fmr-1* mRNA 在週數較小之幼鼠腦部，其表現強度與分布區域都較為強烈。(表一，線形圖一，圖四，五，六)

由於小白鼠一般平均生育期雄鼠為 6-18 個月，雌鼠約為 6-12 個月 (Laboratory animals table 4.1)，本次實驗中發現週數大於 22 週 (約 6 個月) 以上之成鼠切片中 *fmr-1* mRNA 之表現多集中表現於大腦皮質層。(圖五)

由線形圖一中可發現邊緣系統在幼鼠階段，有明顯高濃度之表現而於週數較高者其邊緣系統與非邊緣系統之表現相似。

同組實驗中 *mfmr-1S* (sense strand) 探針與控制組(不加探針)，經相同處理後，於顯微鏡下並未發現有呈色反應。

3.2.2 *mfmr-1* mRNA 在胚胎期之表現:

應用 *mfmr-1A* 組探針，於胚胎不同時期之切片中進行原位雜交反應，呈色後以接物鏡 10 X 20 X 40 X 顯微鏡倍數，進行觀察其結果列於表二。

由表二及線形圖二中可發現於十五、十六、十七、十八天大的胚胎其 *fmr-1* mRNA 之呈色顆粒多出現於肌肉骨骼系統，將其繪成線形圖二 a 可發現越接近成熟期其表現越強烈，同時於圖七中可見結締組織、腦神經系統 特別是神經管 (Notochord) (線形圖二 b)，於胚胎早期之表現較明顯。

由表二中可見越接近成熟期其 *mfmr-1* mRNA 於組織中的表現越強烈，胚胎切片中可見於肝臟有極緻密的顆粒，並於椎間盤和心胞膜等處有 mRNA 之顆粒出現；於圖八中發現特別是 18、17 天大接近成熟之胚胎其臟器的表現型態與成鼠相似皆為廣泛而細緻之呈色顆粒。

肌肉骨骼系統之發育過程中骨細胞會進行骨化以便適應出生後環境，特別是出生前期此一過程會加速，其一現象與線形圖二 a 中顯示 *fmr-1* 之 mRNA 之強度出現時期相應和。

3.2.3 *mfmr-1* mRNA 於成鼠睪丸 (Testis) 之表現:

將不同天數之成鼠睪丸石蠟切片以 *mfmr-1A* 組探針應用原位雜交術處理並於呈色反應後加入對比染色，於顯微鏡下以不同倍數觀察，將其結果列於表三。

圖九中顯示 *mfmr-1* mRNA 明顯表現於睪丸表皮層 (Epithelia) 其表現形態於不同天數之切片中表現一致；同時由圖十中發現 *mfmr-1* mRNA 之表現似乎會隨鼠齡之增加而改變其呈色顆粒表現的強度，週數增加而呈色強度減弱如圖中所示 28 週之表現明顯小於 14 週。同時於圖中可見其 mRNA 之表現在成鼠的精子生成 (spermatogenesis) 中多位於 Leydig's Cell，且於成鼠細精管上皮的週期循環 (cycle of the seminiferous epithelium) 中，周邊之 sertoli cell 和原精細胞 (spermatogonia) 有強烈的表現。

同時於圖九中可見未加入探針之控制組其表現與加入 *mfmr-1A* 組探針之表現相差甚多，配合組織學圖譜判定其表現區域應為周邊之基底膜 (basement membrane) 與 sertoli cell，同時亦應包含精原細胞在內。圖十中顯示其副睪丸之表現小於睪丸且高週數表現小於低週數這似乎意味著 *mfmr-1* 之 mRNA 之表現著重於精子生成之早期。

同時 *mfmr-1* mRNA 應用 *mfmr-1A* 組探針在成鼠肝臟、腎臟等亦可偵測其強烈表現。(圖八)

3.3.1 *mpcm* mRNA 在腦部之表現:

應用 45 mer 長度之 *pcm* -'+' '-' 組探針，於不同週數之成鼠腦部石蠟切片中進行原位雜交術，染上對照底色後進行顯微鏡鏡檢，其結果整理後列於表四。

配合圖三之成鼠腦部解剖圖示與線形圖三，發現 PCM 基因的表現在成鼠腦部是相當顯著；其表現區域和 *mfur-1* 之表現有明顯不同。

表四觀察結果顯示其訊息多集中表現於胼胝體 (*corpus callosum*) 海馬回繖部 (*fimbria of hippocampus*) 海馬回體部 (*CA1-3 of the hippocampus*) 尾狀殼 (*caudate of putamen*) 等處且其表現形態多為片狀分布，濃度顯示強於 *fmr-1A* 組之表現。PCM 基因的表現於成鼠腦部其表現級數多為+++，但於線形圖三邊緣系統與鼠齡之比較圖中似乎並未見其 mRNA 的表現因週數增加而成線性相關，但在 60、57 等高週數之腦部其表現的確較強烈且分布範圍亦較廣泛。(圖十一)

由圖十一、十二、十三、十四、十五中顯示 *mpcm* mRNA 表現區域在成鼠腦部為：嗅葉 (*Bulbus olfactorius*)、尾殼 (*Caudate putamen*)、胼胝體 (*Corpus callosum*)、海馬回繖部 (*Fimbria of hippocampus*)、大腦皮質 (*Neocortex*) 等，與思考、記憶、警覺性等與個體功能發揮相關之部位。

3.3.2 *mpcm* mRNA 於胚胎發育之表現:

mpcm-'-' 組探針於不同天數之胚胎中，應用原位雜交術處理後。於光學顯微鏡下進行觀察，結果列於表五，同時將其表現形態列示於圖十六、十七、十八。

切片呈色反應發現，其於胚胎中表現強度普遍較弱，但其於胚胎中分布極廣泛，特別在肌肉骨骼系統(圖十六、十七)、分泌性器官如甲狀腺(圖未列出)，結締組織、中樞神經系統(圖十六 D)，同時橫膈膜 (圖十七 g、h)、氣管、視網膜(圖未列出)等處都有 *mpcm*

mRNA 之表現。

由表五中發現小於 14 天之胚胎，其 *mpcm* mRNA 之表現明顯減弱，由圖二 a, b 與圖四 a, b 曲線圖之比較中可明顯看出其差異。

3.3.3 *mpcm* mRNA 於成鼠臟器之表現：

mpcm mRNA 於 40 週大成鼠之舌頭此一富含結締組織與感覺細胞之器官有極強烈表現。(圖十六) 但於成鼠器官如肝臟、腎臟(圖十八) 及睪丸之切片(圖十九)中之幾乎不表現。

3.4.1 應用 *mfmr-1ac* 該組探針於組織切片之表現：

由於 Ashley 等人發現 *fmr-1* 有 alternative splicing 不同之 product，我們利用 splicing sequence 設計了五組以其不同部份 sequence 為依據之 40 mer 探針，以此進行原位雜交術期望能在組織切片中對不同的 splicing product 之時、空分布有所發現；多次進行後其結果列示於表六。我們經多次實驗，結果發現此組探針於成鼠睪丸切片中 *fmr-1ac* (sense strand) 此含主要序列探針與不加探針之控制組其反應呈現明顯區別(圖二十)；但於胚胎中則如表六所示，*fmr-1a* 亦呈現反應實驗結果之特異性無法確定。

而 *fmr-1ac* 組並非 splicing sequence 的部份，在此組我們無法獲得有效成果，其他組亦無法期望能獲得有意義的結果，故而目前對該組實驗我們認為是失敗的。

3.5. *mfmr-1* C75, C39, C0 三組探針於成鼠腦部之表現：

由於 *pcm* 組和 *fmr-1A* 組探針的實驗所呈現之特異性，使我們推

測是否由於探針長度小於 45 mer 而使得結果之呈現出現混淆，故而將 *fmr-1* C0、C39、C75 等三組原先針對 alternative splicing form mRNA 而設計之探針由 40 mer 加長為 45 mer 進行標誌後進入實驗。

mfmr-1C75 包含了整個 exon 15 (region C) 而 *mfmr-1C39* 則缺了 exon 15 acceptor site 1 之前的部份，另外 *mfmr-1C0* 則不包括整個 region C 的部份；這三組探針原則上應能偵測到大部份不同基因組合的 mRNA，我們期望能於組織中針對不同的探針處理而有不同的發現。

其結果如下：

圖二十一顯示三組探針於相同週數大小之成鼠腦部表現強度，*mfmr-1C75* 強於 *mfmr-1C39* 而 *mfmr-1C39* 之表現強度又大於 *mfmr-1C0*。其分布區域由表七、八、九配合圖二十二、二十三、二十四、二十五 可發現其三組探針所偵測之 mRNA 表現之時、空性雖不相同但卻有共同主要表現區域如：小腦顆粒層、海馬回繳部、橋腦、胼胝體等四個區域，同時其 mRNA 出現與切片之鼠齡並無正相關性，但在小於 4 週之幼鼠其表現三組皆相當強烈。

三組 alternative splicing form 探針表現形態各不相同但其表現強度普遍大於 *fmr-1A* 組探針，其表現型態多為片狀其強度可達+++ 級；其表現區域如小腦顆粒層(圖二十二) 橋腦(二十五) 為本組實驗特殊表現區，此區於 *mfmr-1A* 與 *pcm* 組兩組探針表現皆不同該兩組顯示於該處表現較弱甚或部份週數並不表現(圖未列出) 與此三組探針強烈的表現明顯不同。

3.6. *mfmr-1C75*、C39、C0 三組探針於胚胎之表現：

將切片置於 10 X 顯微鏡下觀察，我們發現此三組探針所偵測之 mRNA 似乎集中表現於和胚胎之骨骼肌肉系統(圖二十七)與海馬回(圖二十八)與生殖膈(圖二十九)等分化活力相當明顯之區域(列表於十、十一、十二)，同時三組探針於同一階段之切片之表現有明顯強度分別，多為 *fmr-1C75* 強，*mfmr-1C39* 中而 *mfmr-1C0* 居後(圖二十五、二十六、二十七、二十八)。與 *mfmr-1A* 組不同此三組探針於肝臟、肺臟幾乎不表現，但在心包腔之表現則相當明顯。(圖二十五)

3.7. *mfmr-1C75* 等三組探針於成鼠睪丸之表現:

由圖三十中不難發現其表現形態與圖九中 *mfmr-1A* 組之表現大不相同，其表現於 28 週與 40 週成鼠睪丸切片由圖中可見其主要表現於精細胞(*spermatid*)少部份表現於 *sertoli cell* 且其表現強度很弱。

我們由圖九與圖三十中發現偵測同一基因的表現於睪丸的表現卻因為偵測 mRNA 所用之探針序列不同，其表現的形態與強度便有大差異，這似乎意味著 *mfmr-1* mRNA 具有組織之專一性。

同時我們將 *pcm* 組探針於睪丸中的表現(圖二十)加入比較，我們可以發現不同探針有不同表現形態，這使得本實驗方法之專一性更加確定。

圖一(a): 不同受孕天數之 Balb-c mice 胚胎之石蠟切片, 厚度為 10 μm

Hematoxyline / Eosin 染色。

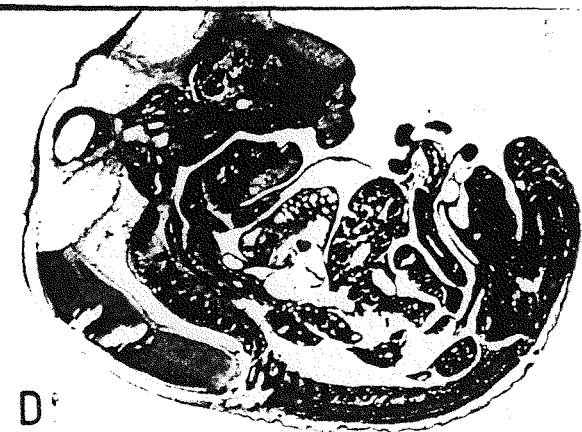
A: 受孕 8 天之胚胎切片。

B: 受孕 10 天之胚胎切片。

C: 受孕 12 天之胚胎切片。

D: 受孕 14 天之胚胎切片。

E: 受孕 16 天之胚胎切片。

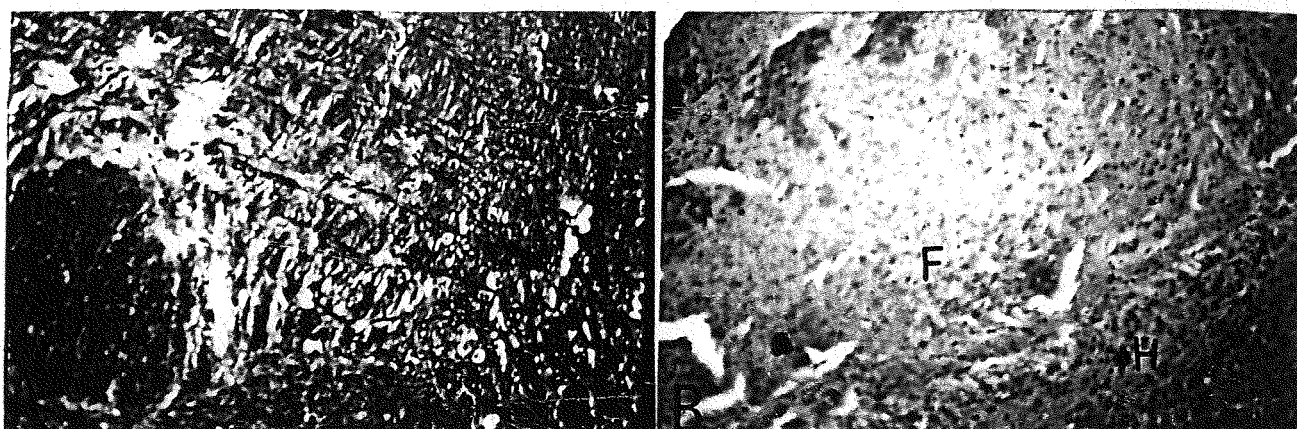


圖一(b): 40週大成鼠腦部切片, 厚度 $10\mu\text{m}$, Lusol Fast Blue作對照

染色, 藍色為神經磷脂質, 紫色為其他神經細胞。

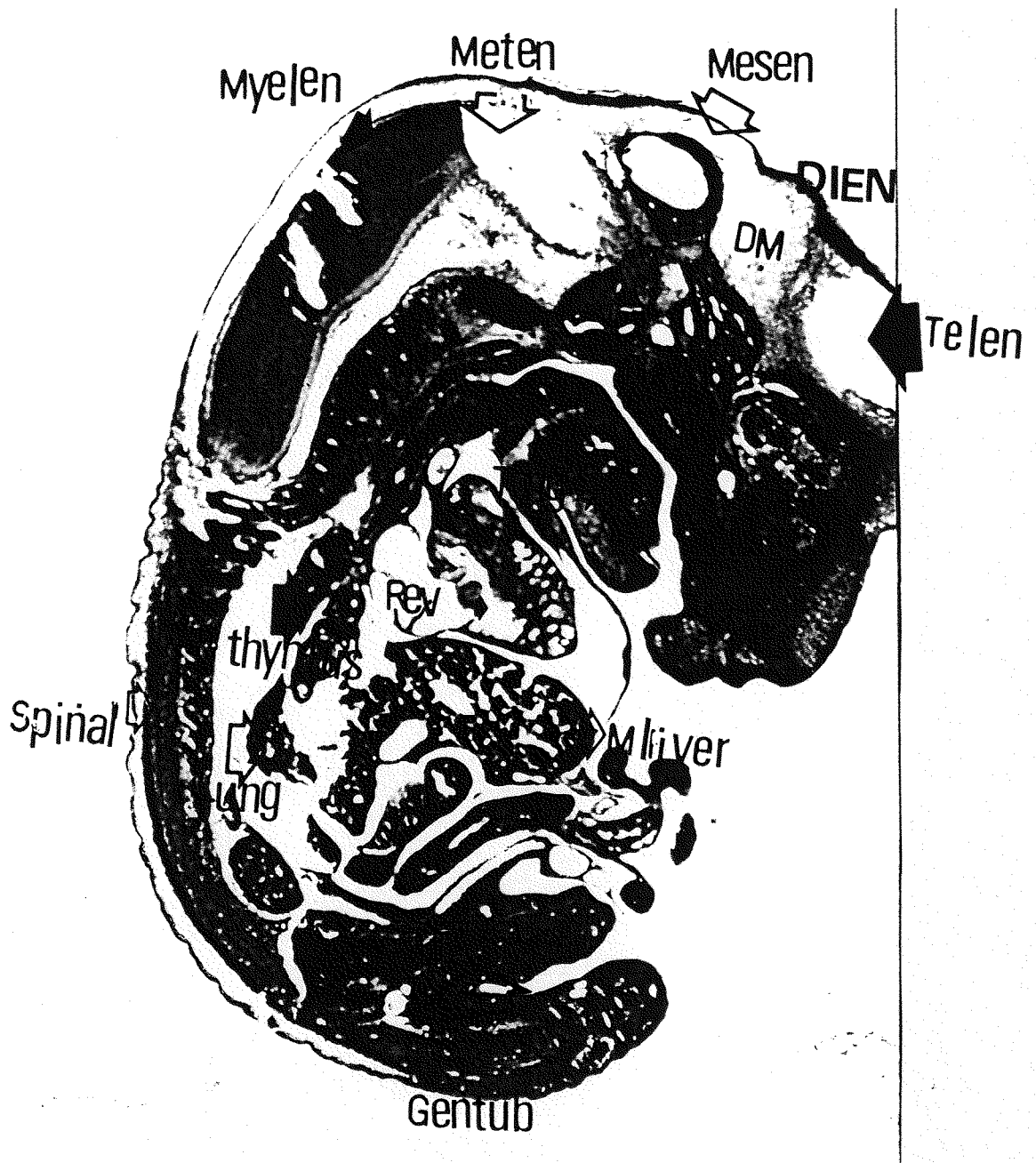
A: 顯示部位為胼胝體(corpus callosum). 20 X.

B: 顯示部位為海馬回(hippocampus), 繖部 (fimbria) 20 X.



圖二: 16 天大胚胎器官各部份標示, Hematoxyline / Eosin staining,
解剖顯微鏡放大倍數: 17 。

4v: fourth ventricle DM: dorsolmedial hypothalamic nu
 DIEN: diencephalon gentub : genital tubercle Hi : hippocampus
 formation neuroepi Mesen : mesencephalon Meten : metencephalon Mliver :
 middle lobe of liver Myelen : Myelencephalon Rev : right ventricle
 spinal : spinal cord Telen : telencephalon Tongue

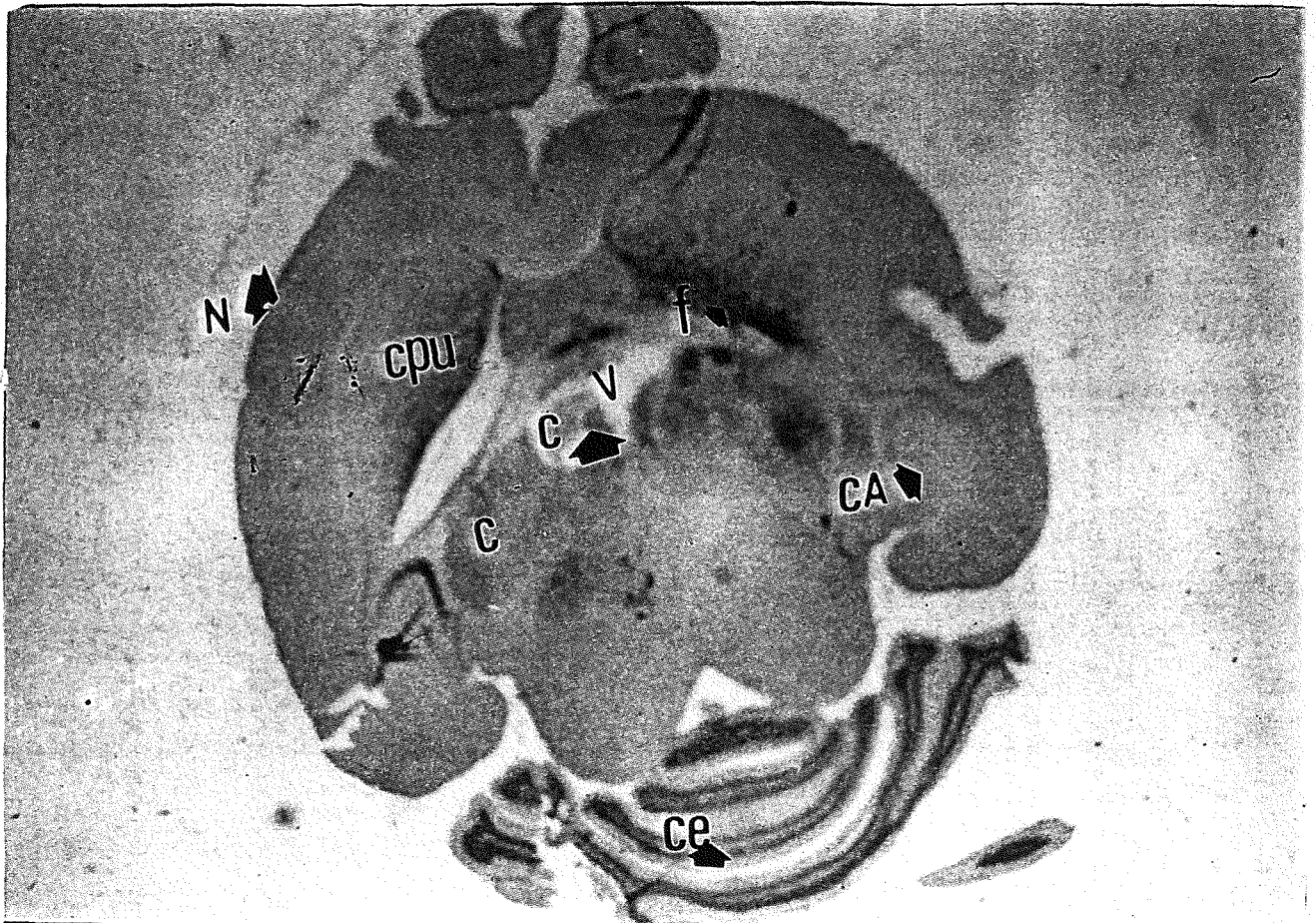


圖三: *pcm*-*'-'* antisense 組探針於 27 週大成鼠腦部表現，其腦部結構標示放大倍數為 10，其背景染色為 Fast red。

N: neocortex C: Corpus Ce: Cerebellum CA: hippocampus

Cpu: Caudate putamen f: fibrilla of hippocampus

V: Ventricle



表一：應用探針 *mfmr-1A*，以原位雜交術於不同天數大小，
成鼠腦部組織切片中，*mfmr-1* mRNA 之表現強度比較。
(縱向標示為腦部結構，橫向標示為老鼠年齡，以週數為單位)

Tissue	62	60	57	50	47	43	27	22	4	3	2	1
Bulbus olfactorius	-	-	+	-	-	-	++	-	N	N	N	N
Caudate putamen	+	+	++	-	-	++	++	+	++	++	+	+++
Cerebellum(granular layer)	+++	+	+	-	-	-	++	+++	++	++	N	N
Corpus callosum	+	+	+	-	+	++	-	++	+++	+++	-	++
Ammon's horn	++	++	+	+++	-	++	-	++	+	+++	+++	+
Hippocampus	+	+	-	+	-	-	-	+	++	+	++	++
Fibrilla of hippocampus	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+
Neocortex	+++	+++	++	++	+++	++	++	+	+	+++	+++	+++
Pontin	+	-	++	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Ventricle	+	++	+	+	++	+++	-	+++	++	++	-	-

此表所列之強度價數，以切片經呈色處理後，所呈現之紫藍色色素顆

粒之多寡及呈色強弱表現形態為依據：

“-” 於該部位未見任何呈色顆粒出現；

“+” 單一細胞於肉眼可見，成點狀分布；

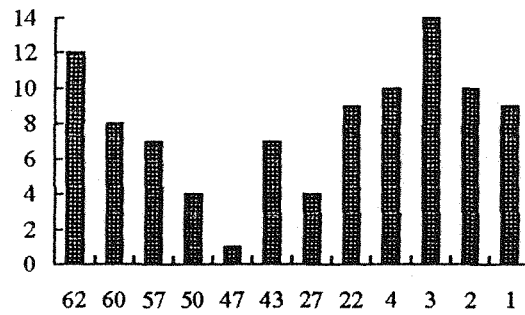
“++” 色澤深度增強，成團狀分布；

“+++” 分布範圍較廣並呈片狀分布。

N: 不適用本評估法 因尚未發育或切片中未切到

線形圖一：應用探針 *mfmr-1A*，以原位雜交術，於不同天數大小之成鼠腦部切片中，觀察其 *mfmr-1* mRNA 於邊緣系統之表現與鼠齡之關係。

(縱軸為表現強度，橫軸為鼠齡，以週數為單位，強度之估計以表一為準)



圖四: mfmr-1A 組探針於成鼠腦部切片之表現.

g: 18 天大胚胎腦部海馬回結構圖示, Hematoxyline / Eosin 染色, 20 X.

h: mfmr-1A 於 3 週大幼鼠腦部切片整體顯示.

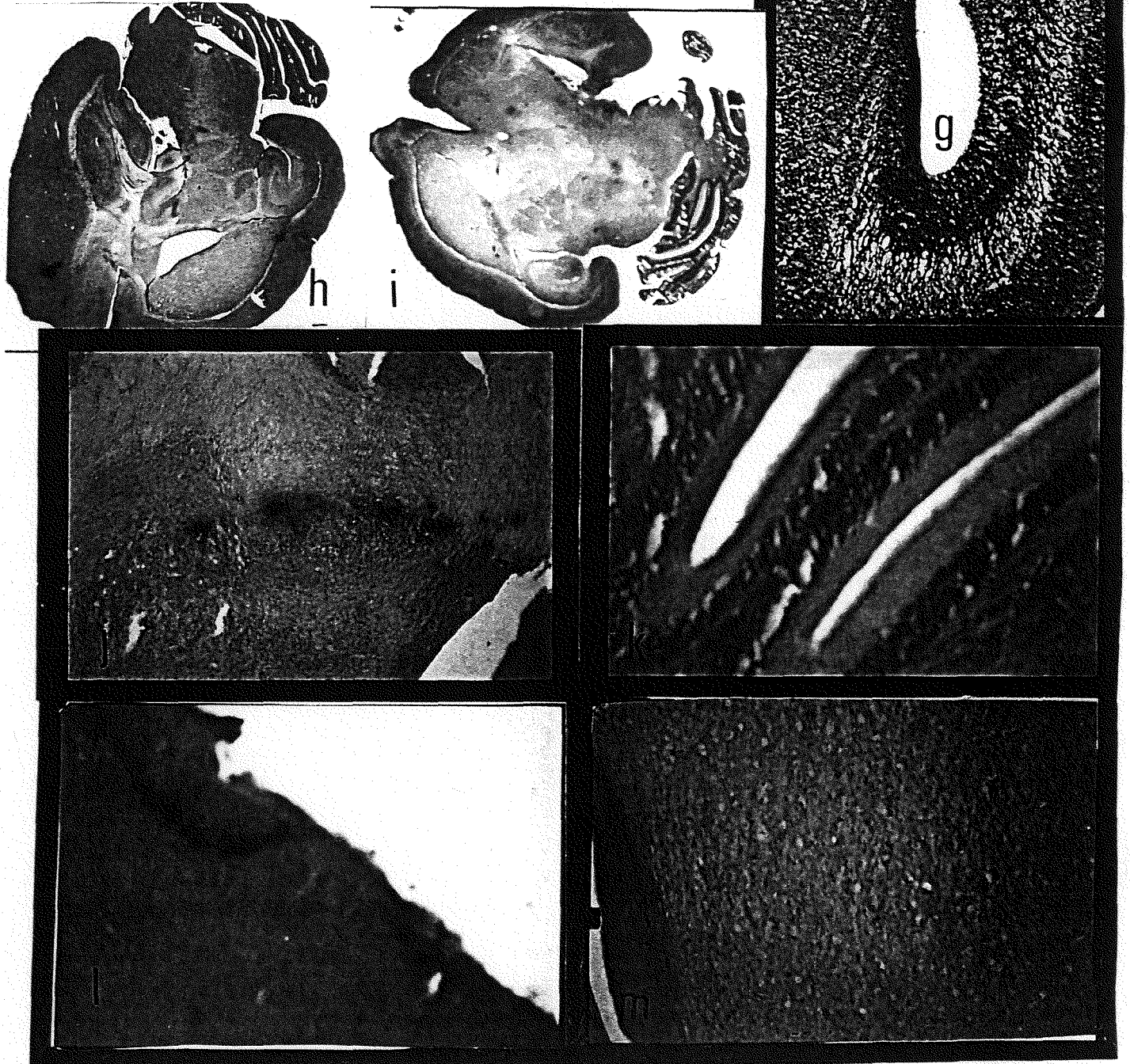
i: mfmr-1A 於 27 週大胚胎腦部切片整體顯示.

j: mfmr-1A 於 2 週大幼鼠橋腦 (pontin) 處表現, 10 X.

k: mfmr-1A 於 3 週大幼鼠小腦顆粒層表現, 20X.

l: mfmr-1A 於 62 週大成鼠大腦皮質表現, 10X.

m: mfmr-1S 於同週數部大腦皮質表現, 10 X.



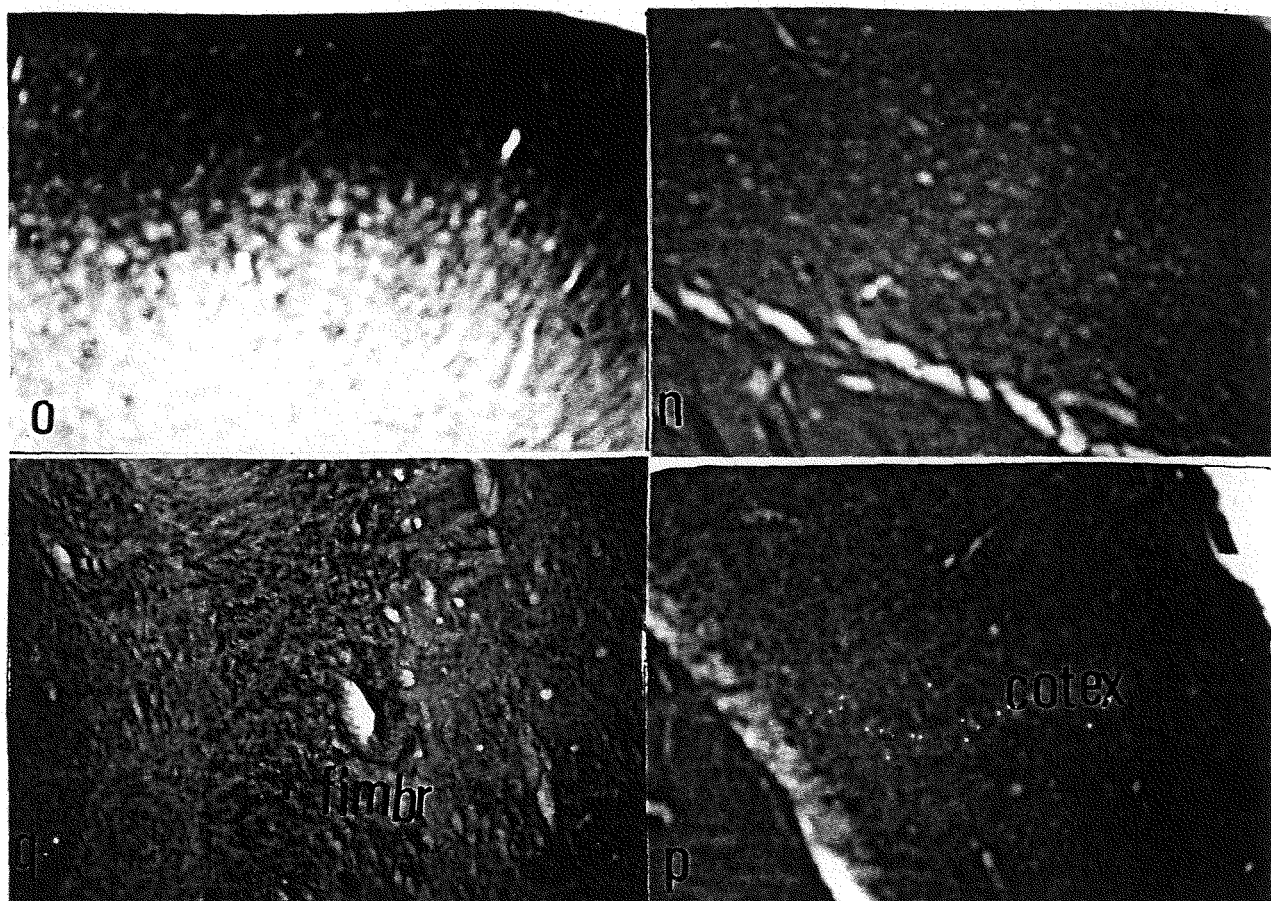
圖五: mfmr-1A 組探針於成鼠腦部之表現.

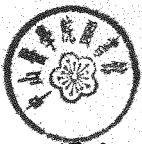
n: mfmr-1S 於 27 週大成鼠大腦皮質表現, 10 X.

o: mfmr-1A 於 27 週大成鼠大腦皮質之表現, 10 X.

p: mfmr-1A 於 3 週大幼鼠之大腦皮質表現, 10 X.

q: mfmr-1a 於 3 週大幼鼠之海馬回繖部表現, 10X.





圖六: mfmr-1A 組探針於幼鼠腦部之表現.

t: mfmr-1A 於 4 週大幼鼠腦部尾狀殼, 胼胝體處表現, 10 X.

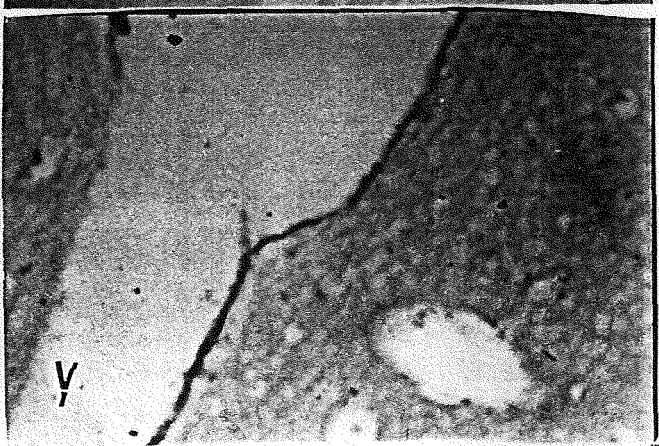
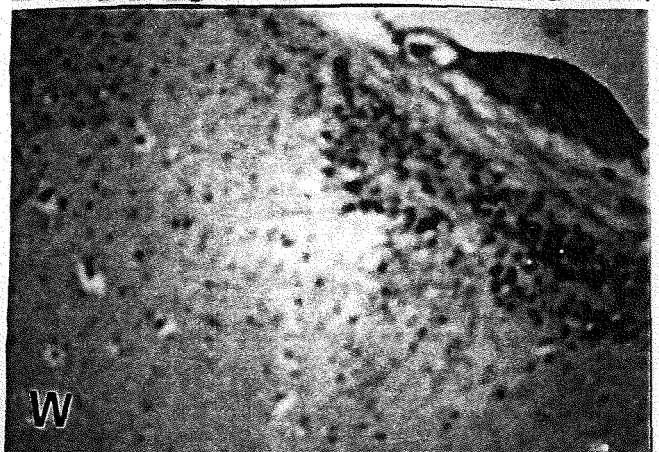
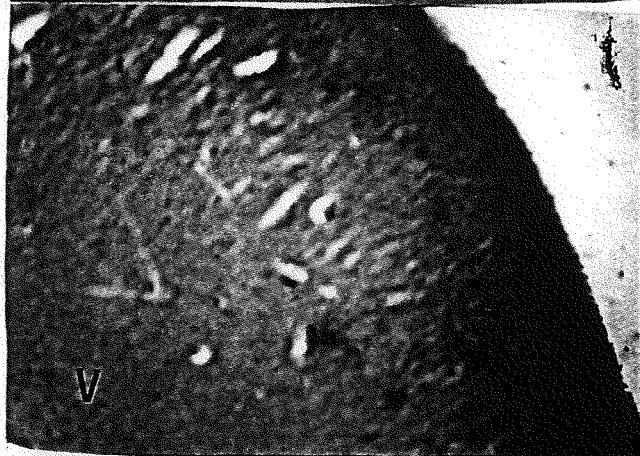
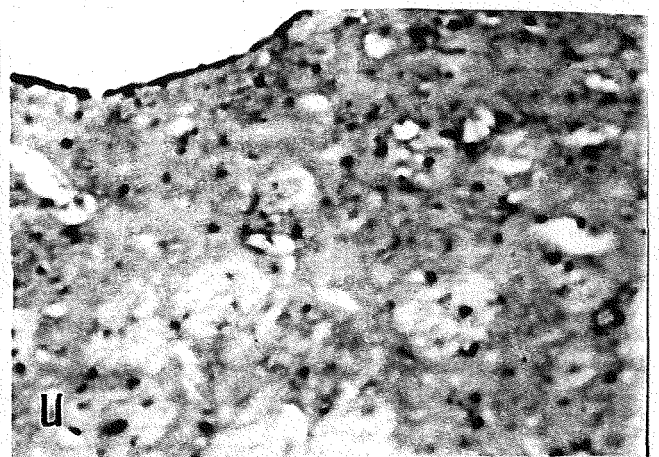
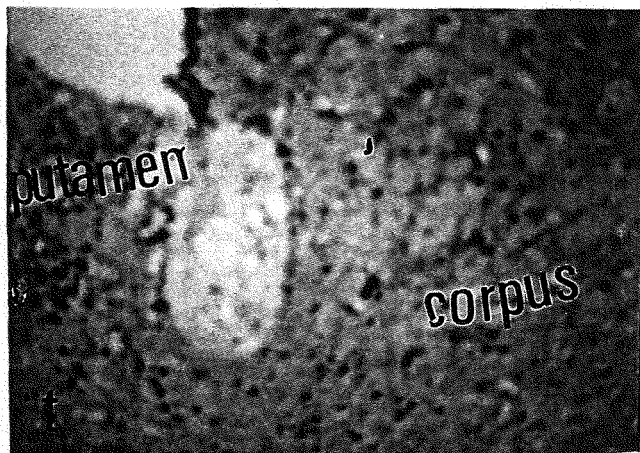
u: mfmr-1A 於 4 週大幼鼠之海馬回 (amon's horn) 處表現, 20 X.

v: mfmr-1A 於 2 週大幼鼠大腦皮質表現, 10 X.

w: mfmr-1A 於 4 週大幼鼠胼胝體表現, 10 X.

x: mfmr-1A 於 2 週大幼鼠之海馬回 (CA1-3) 表現, 10 X.

y: mfmr-1A 於 4 週大幼鼠腦室之表現, 10 X.



表二：應用探針 *mfmr-1A*，以原位雜交術，於不同發育天數之老鼠胚胎切片中，*mfmr-1* mRNA 之表現強度。

(縱向標示為組織部位，橫向標示為胚胎成長天數，單位為天。)

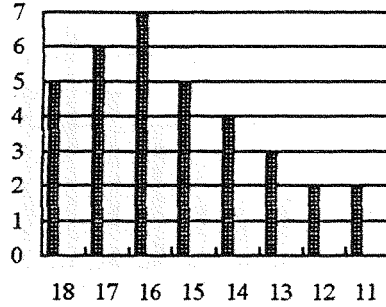
組織部位	18	17	16	15	14	13	12	11
Bone osteoblasts	+	+	+	+	+	+	+	+
Epidermis	+	+	+	+	+	+	+	+
Hair follic	++	++	+	++	-	-	-	-
Pericardium	-	++	+	++	-	N	N	N
Intesteinal epithelium	-	+	+	-	-	-		-
Kidney(Browman's Capsule)	++	+	-	++	N	N	N	N
Liver	+++	++	+	-	++	-	-	N
Lung	+++	++	+	+	-	N	N	N
Skeletal muscle	++	++	+++	+++	+	++	+	+
Smooth muscle	++	+	+	-	-	-	-	-
Spleen	+	+	-	-	N	N	N	N
Notocord	-	++	+	++	+	+	+++	+++
Telephalon	++	+	+			-	+	+
Hindbrain	+++	+++	+	++	++	+	+	+
Ventric	+++	+	+	++	+	-	-	-

* 強度價數之估計以表一為準

線形圖二:各系統強度之圖示:

a.肌肉骨骼系統:

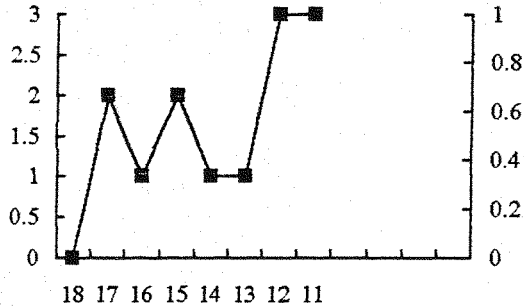
(縱軸為表二之肌肉骨骼系統強度之總數相加，橫軸為胚胎發育天數。)



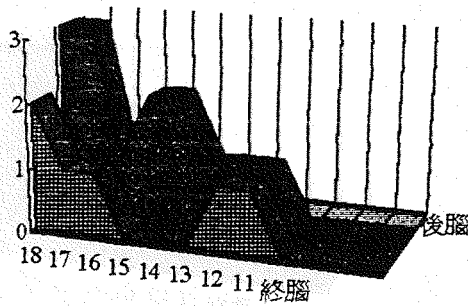
b.腦神經系統:縱軸為強度以價數為單位，

橫軸所標示為不同天數之胚胎。

I. 神經管中表現強部度與胚胎天數之關係。



II. 終腦(telecephalon)，後腦(hind brain)，曲線圖示此二部位與胚胎發育之關係。

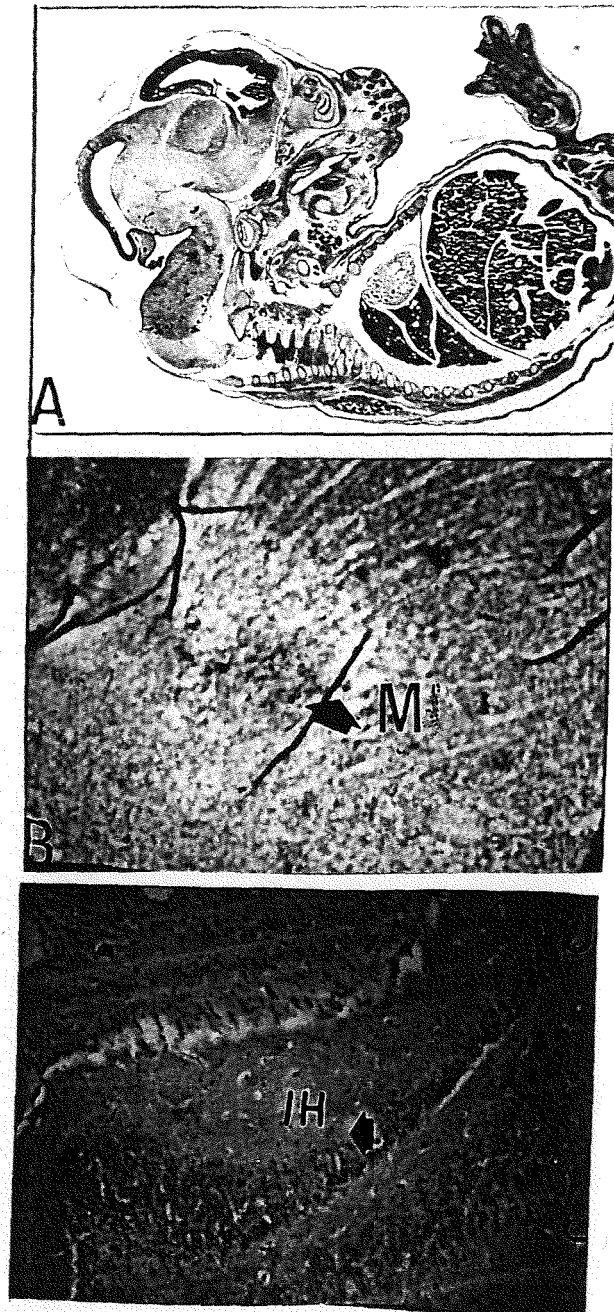


圖七: mfnr-1A 於胚胎之表現.

A: mfnr-1A 於 16 天大胚胎表現整體顯示.

B: mfnr-1A 於 18 天大胚胎之中腦表現, 10 X.

C: mfnr-1A 於 18 天大胚胎之海馬回表現, 10 X.



圖八: mfmr-1A 於成鼠組織切片之表現.

a: 18 天大胚胎腎臟切片, 10 X, hematoxyline / Eosin 染色.

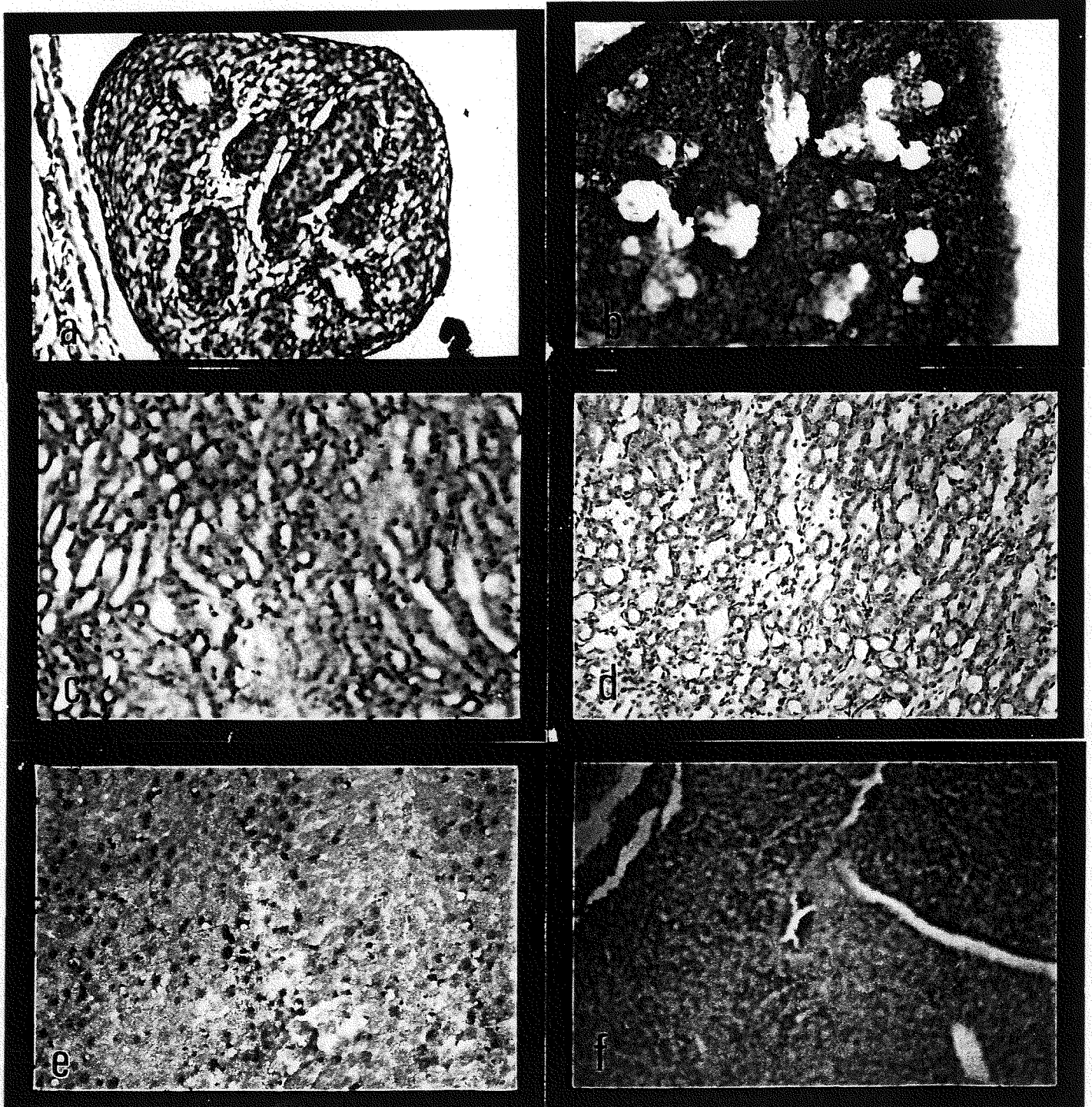
b: mfmr-1A 在 18 天大胚胎之肺臟表現, 40 X.

c: mfmr-1A 在 40 週大成鼠腎臟切片中表現, 紫黑色顆粒呈現為 positive reaction, 40 X.

d: mfmr-1S 於同一組腎臟切片表現, 40 X.

e: mfmr-1A 於 18 天大胚胎之肝臟表現, 20 X.

f: mfmr-1S 於 18 天大胚胎之肝臟表現, 10 X.



表三:應用 *mfmr-1A* 探針，於成鼠睪丸切片；
 其 *mfmr-1* mRNA 表現強度，與部位分布表。
 (縱軸為睪丸各部位，橫軸為成鼠週數)

組織部位	14	28	30	43	50
Spermatogonia	+++	+++	+++	++	+
Leydig cells	+	+	++	+	-
Sertoli cells	+	+	+	+	-

圖九: *mfmr-1* A 組探針於成鼠睪丸石蠟切片中，反應後進行對比染色，

於光學顯微鏡下進行觀察。

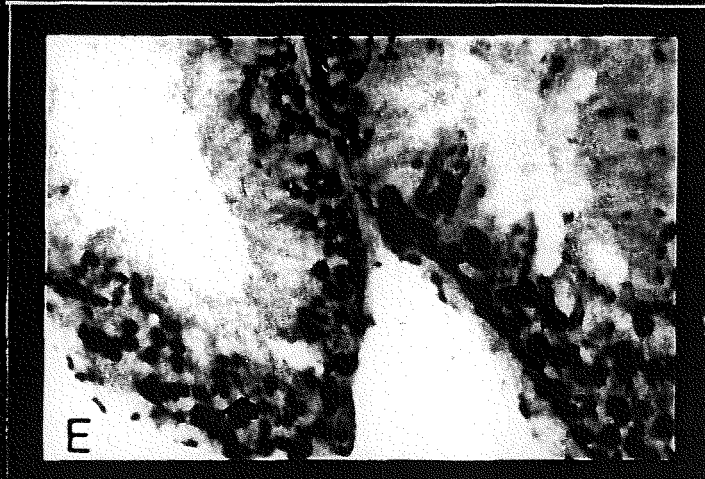
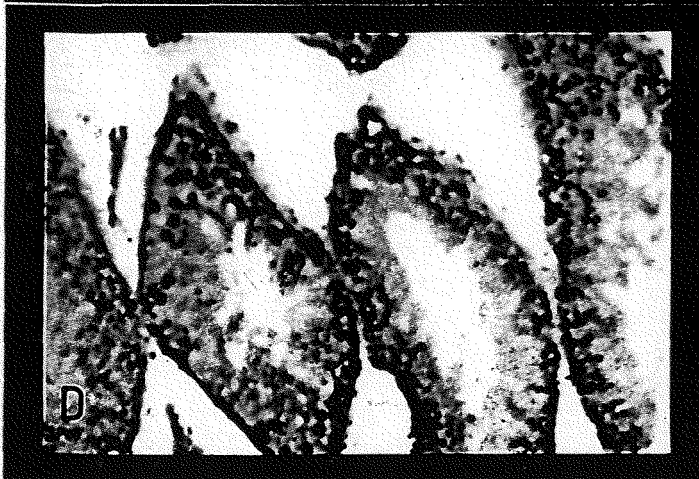
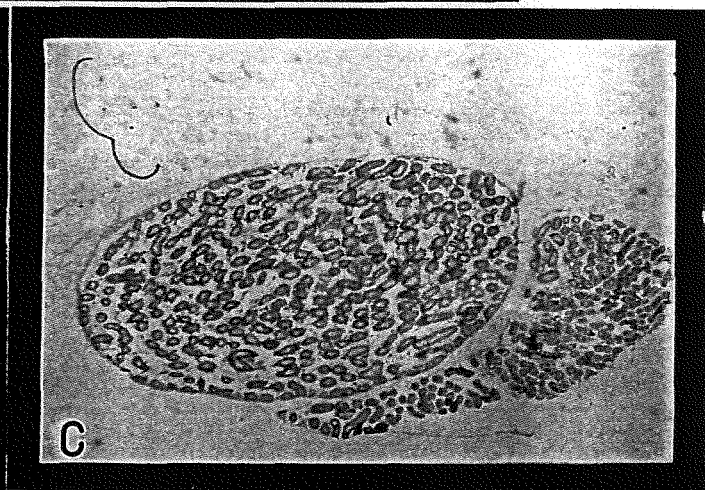
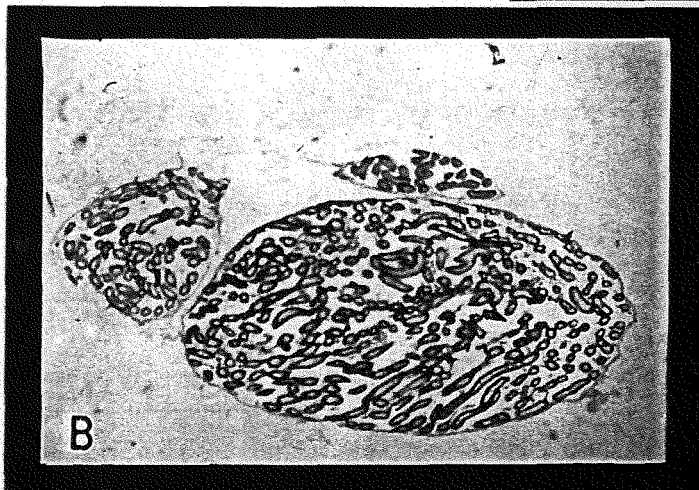
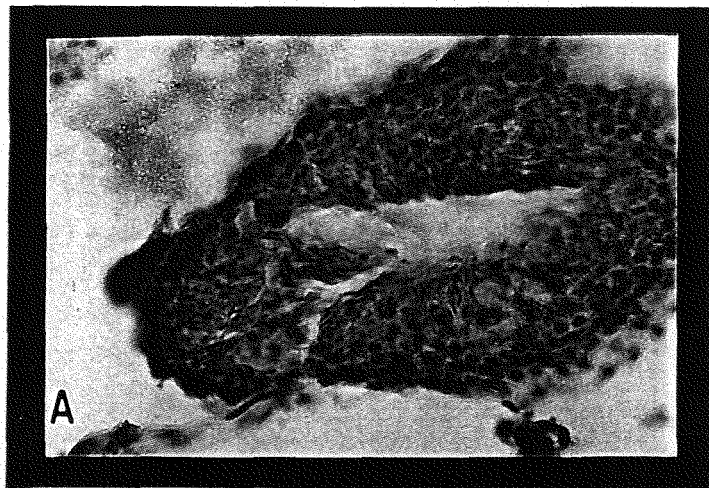
A: 控制組, 40X.

B: *mfmr-1*A 於 14 週大成鼠睪丸, 整體顯示.

C: *mfmr-1*A 於 28 週大成鼠睪丸, 整體顯示.

D: *mfmr-1*A 於 14 週大成鼠睪丸切片表現, 20 X.

E: 同上, 40 X 顯示.



圖十: mfmr-1A 組探針於成鼠睪丸與附睪丸之表現.

A: mfmr-1A 於 28 週大成鼠附睪丸切片, 20 X.

B: mfmr-1A 於 28 週大成鼠睪丸切片, 20 X.

C: mfmr-1A 於 30 週大成鼠附睪丸切片, 20 X.

D: mfmr-1A 於 30 週大成鼠睪丸切片, 20 X.

E: mfmr-1A 於 40 週大成鼠睪丸切片, 20 X.

Arrow: 呈色顆粒

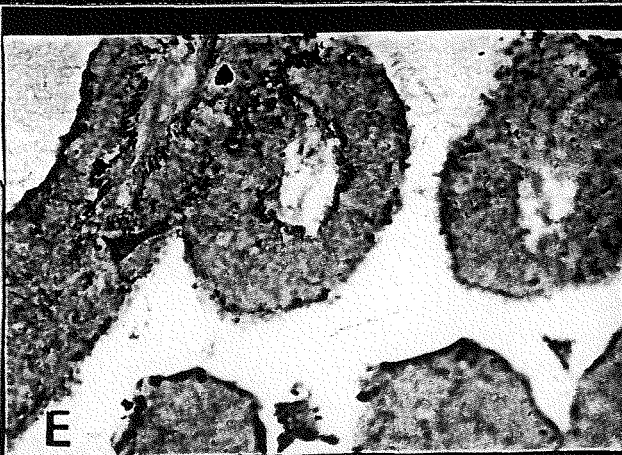
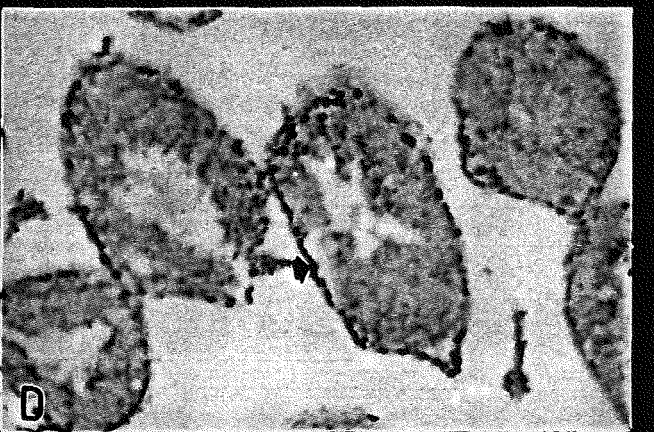
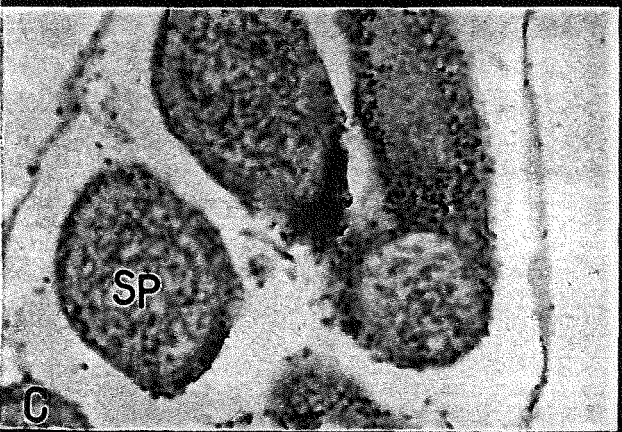
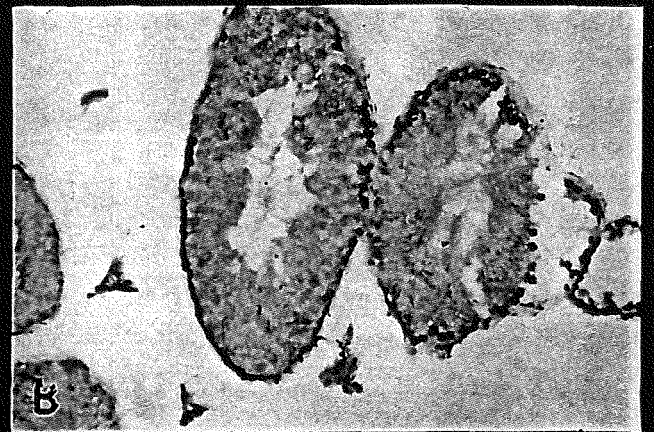
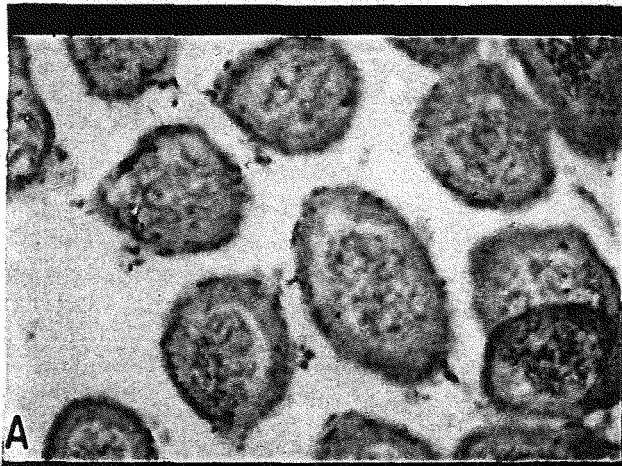
F: mfmr-1A 於 50 週大成鼠睪丸切片, 20 X.

SP: Spermatid

SP:sperm

L: leydig cell

S: sertoli cell



表四:應用探針 *pcm-'*, 以原位雜交術於不同天數大小,
成鼠腦部組織切片中 *mpcm* mRNA 之表現強度
比較。

(縱軸標示為腦部結構, 橫軸為鼠齡, 以週為單位)

組織部位	60	57	50	47	27	4	3	2	1
Bulbus olfactorius	+++	-	+	+	++	N	N	N	N
Caudate putamen	+	+++	+++	++	++	+++	+	+	++
Cerebellum(granular layer)	-	++	++	+	+++	++	+++	+++	-
Corpus callosum	+++	+	+	++	+++	+	+	+	-
Ammon's angle	+++	-	++	-	++	+++	+	++	+++
Hippocampus	++	+	+	-	++	++	+	+	+
Fibrilla of hippocampus	+++	++	+++	++	+++	+++	++	+	++
Neocortex	++	+++	++	++	+++	++	+	++	+
Pontin	+	++	+	-	+	+	+	+	+
Ventric	+++	++	+	-	++	++	+	+++	-

此表所列之強度價數, 以切片經呈色處理後, 所呈現之紫藍色色素顆

粒之多寡及呈色強弱表現形態為依據:

“-” 於該部位未見任何呈色顆粒出現;

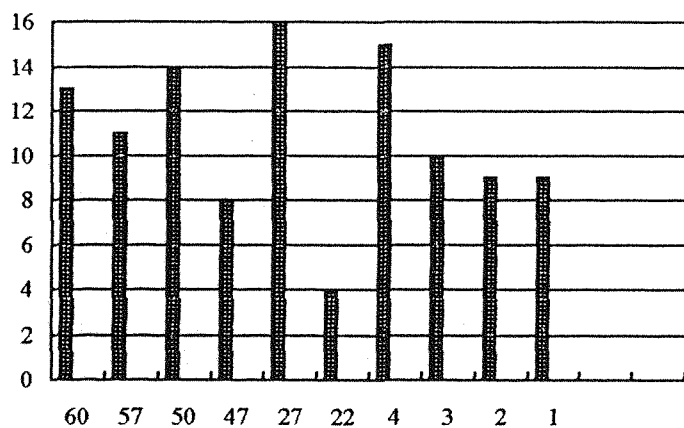
“+” 單一細胞於肉眼可見, 成點狀分布;

“++” 色澤深度增強, 成團狀分布;

“+++” 分布範圍較廣並呈片狀分布。

N: 不適用本評估法 因尚未發育或切片中未切到

線形圖三: 應用探針 *mpcm*-'' , 以原位雜交術, 於不同天數大小之成鼠, 腦部切片中觀察其 *mpcm* mRNA , 於邊緣系統和鼠齡之相對性關係。(縱軸為表現強度, 其單位與表四同; 橫軸為鼠齡, 計算單位為週。)



圖十一: pcm 組探針於成鼠腦部之表現.

A: pcm⁻ 組探針於 27 週大成鼠腦部整體顯示.

B: pcm⁻ 組探針於 57 週大成鼠腦部整體顯示.

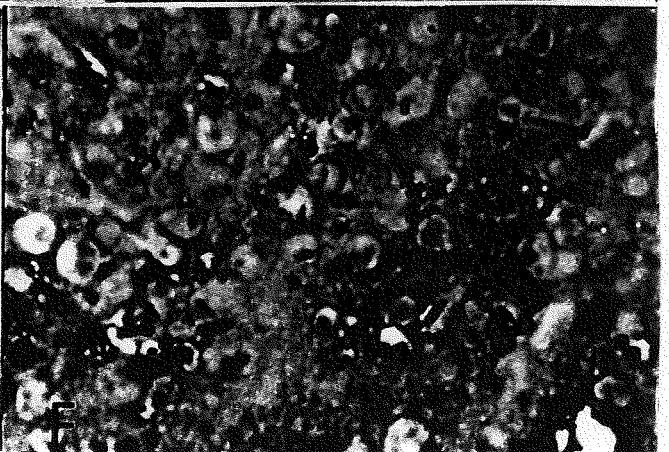
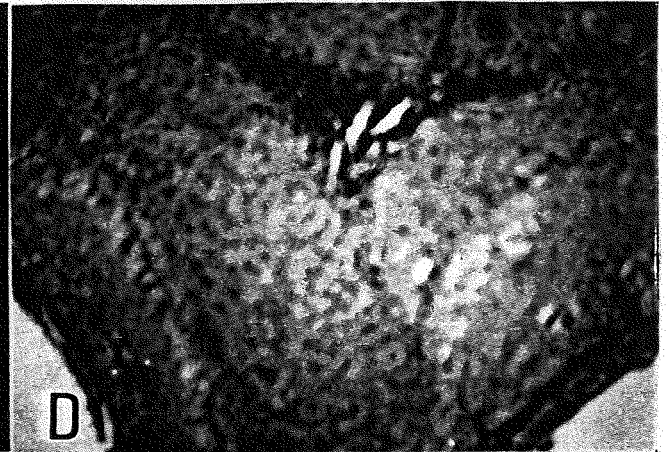
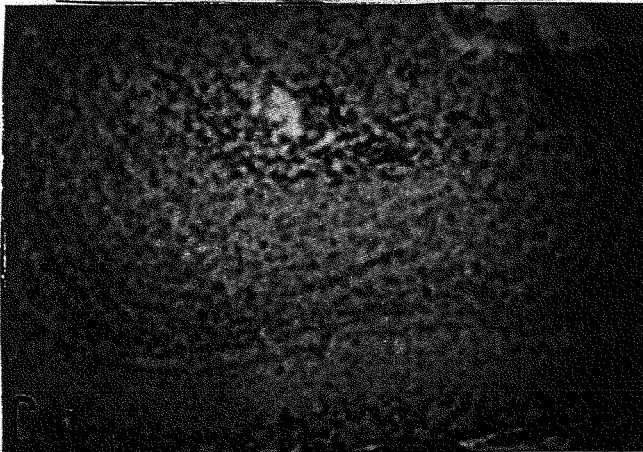
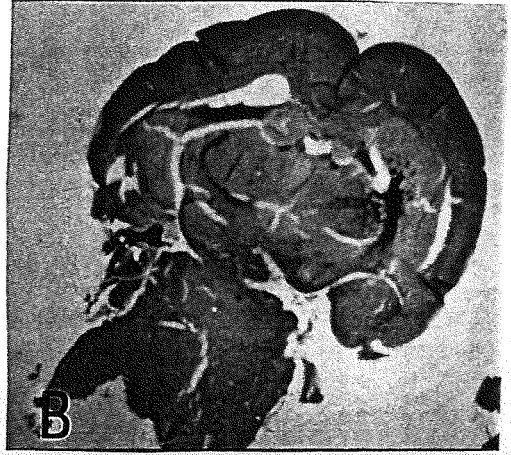
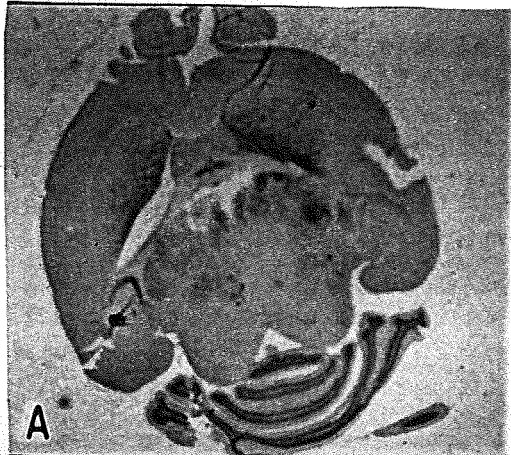
C: pcm⁻ 組探針於 4 週大幼鼠腦部嗅葉表現.

D: pcm⁺ 組探針於 4 週大幼鼠腦部嗅葉表現.

E: pcm⁻ 組探針於 60 週大成鼠腦部嗅葉表現.

F: 同上放大 40 X.

C. D. E 放大倍數為 10 X.



圖十二: pcm 組探針於成鼠腦部表現.

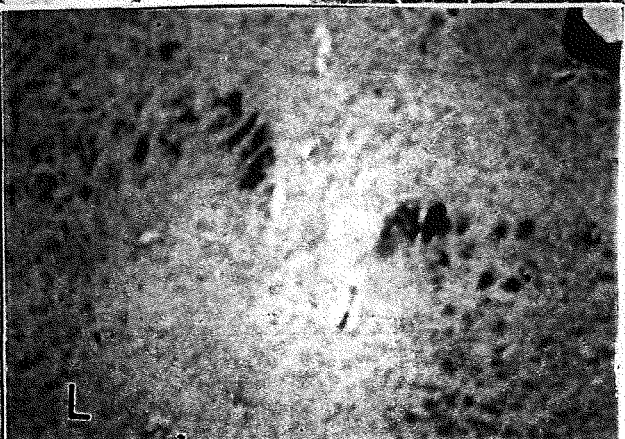
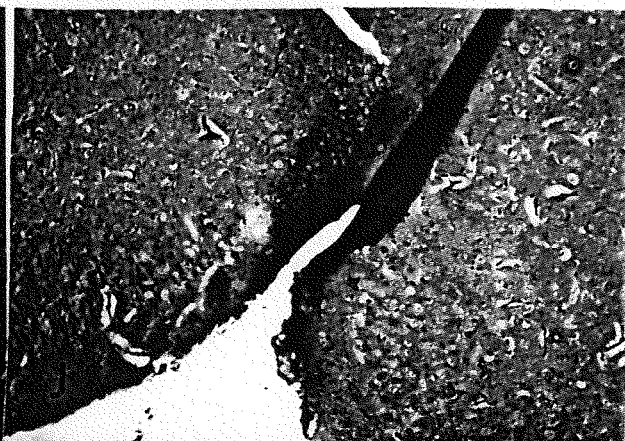
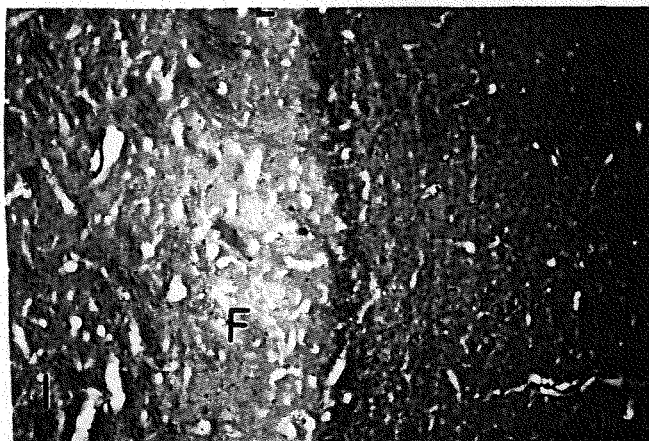
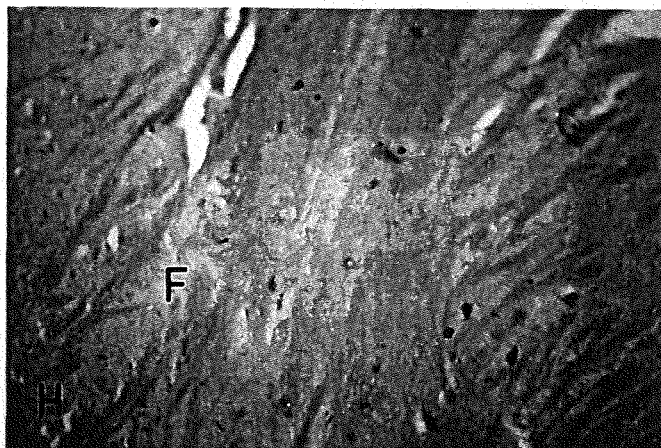
H: pcm'+' 組探針於 57 週大成鼠腦部海馬回緻部表現, 20 X.

I: pcm'+' 組探針於 57 週大成鼠大腦皮質之表現, 10 X.

J: pcm'+' 組探針於 60 週大成鼠大腦皮質之表現, 10 X .

K:Pcm'+'組探針於 47 週大成鼠大腦皮質之表現, 10X.

L: pcm'-'組探針於 2 週大成鼠大腦皮質之表現, 10 X.



圖十三: pcm 組探針於成鼠腦部切片之表現. 紫黑色顆粒為 positive reaction.

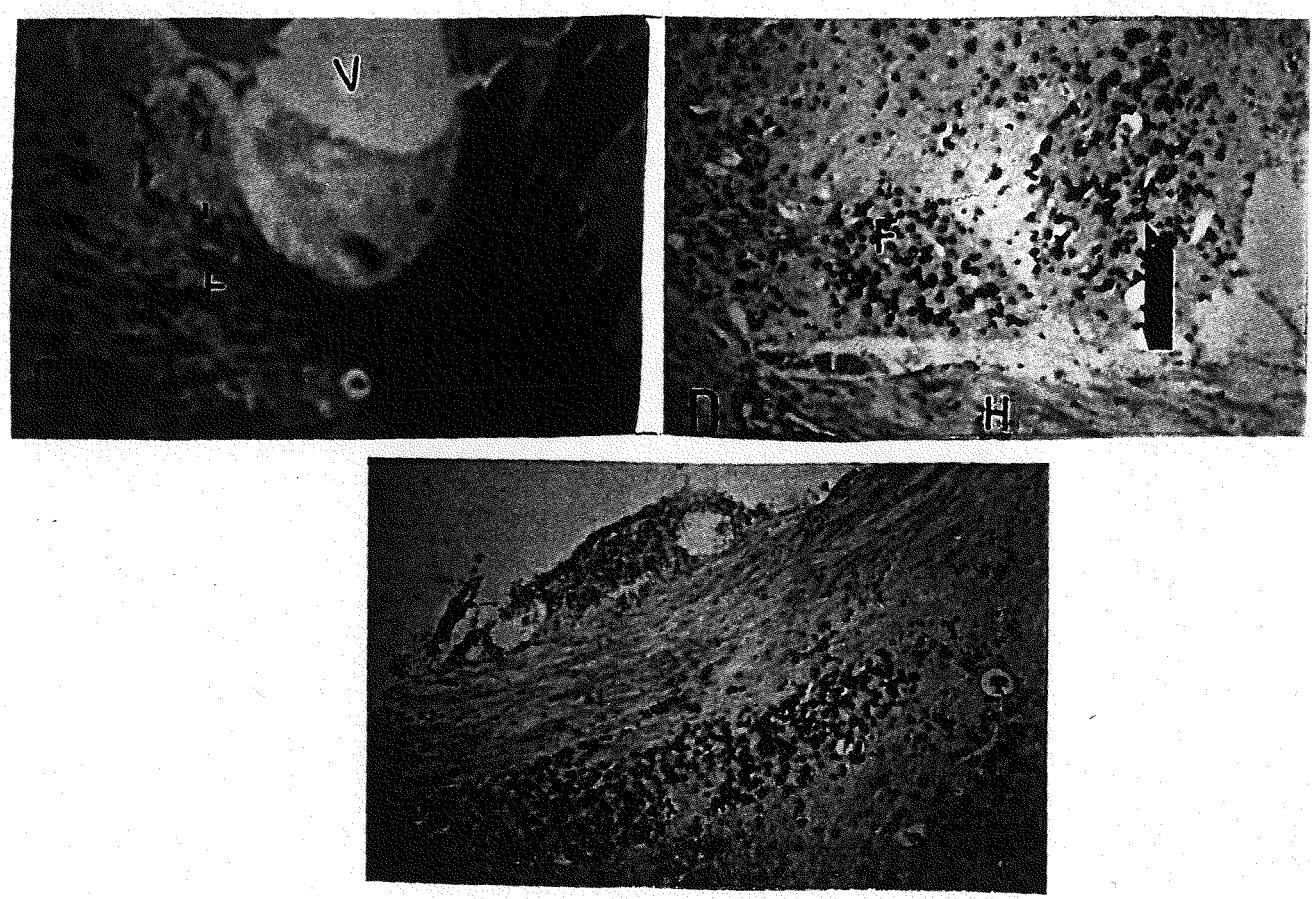
C: pcm-'組探針於 57 週大成鼠腦部織部之表現.

D: pcm-'組探針於 4 週大幼鼠腦部織部表現.

E: pcm-'組探針於皮下組織.

C. D. E 顯示倍數為 20 X. C: corpus, F: fimbria

H: hippocampus



圖十四: pcm 組探針於成鼠腦部之表現。

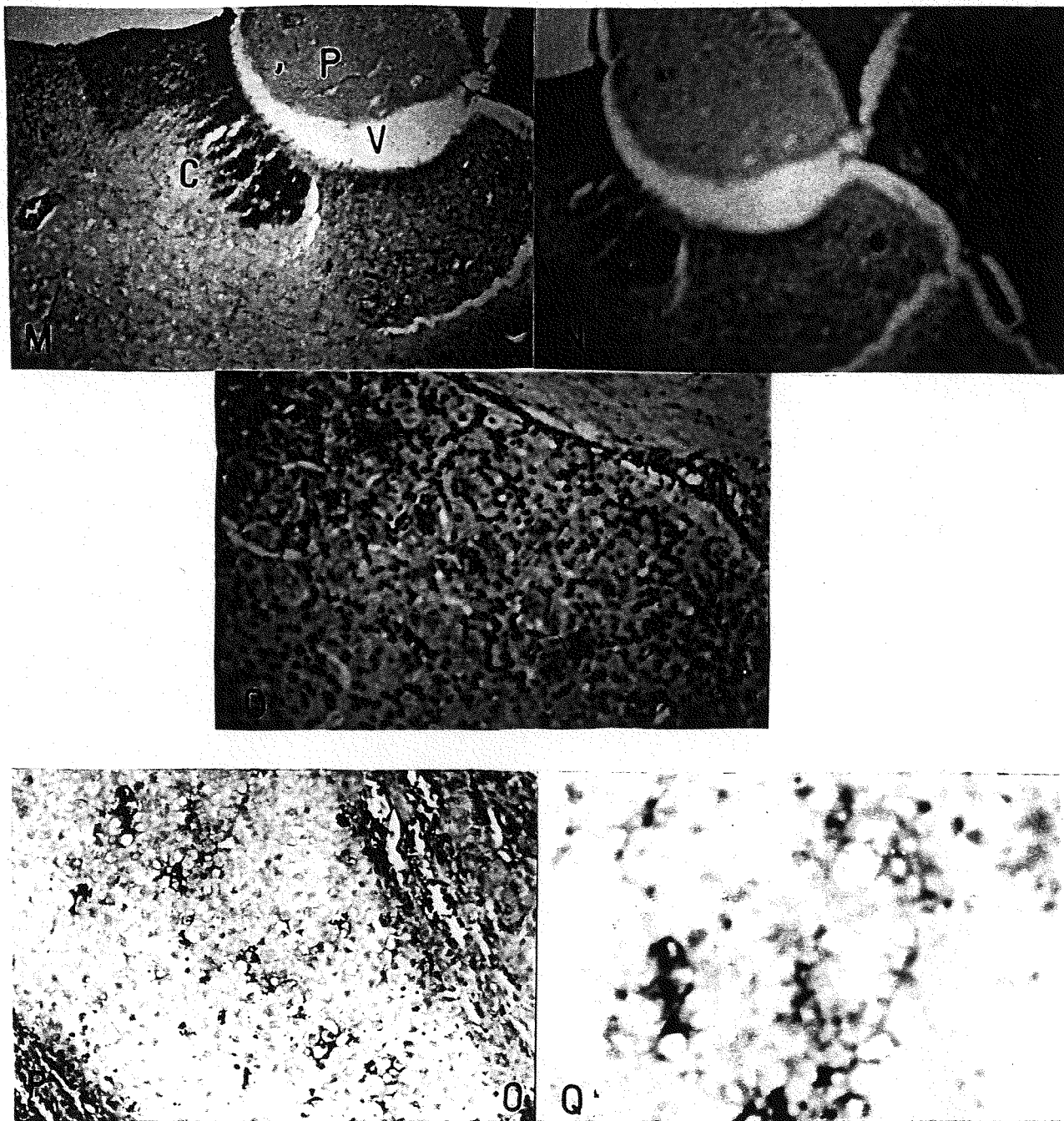
M: pcm⁻ 組探針於 57 週大成鼠腦室, 胼胝體與尾狀殼之表現。

N: 同上放大 20 X.

O: pcm⁻ 組探針 4 週大幼鼠之尾狀殼, 20 X.

P: pcm⁻ 組探針於 50 週大成鼠之尾狀殼表現, 20 X.

Q: 同上放大 40 X. V: 腦室, C: 胼胝體, P: 尾狀殼.



圖十五: pcm 組探針於成鼠腦部海馬回 (CA1-3 of the hippocampus) 之表現 .

R: pcm^{'-}組探針於 2 週大幼鼠腦部, 10 X.

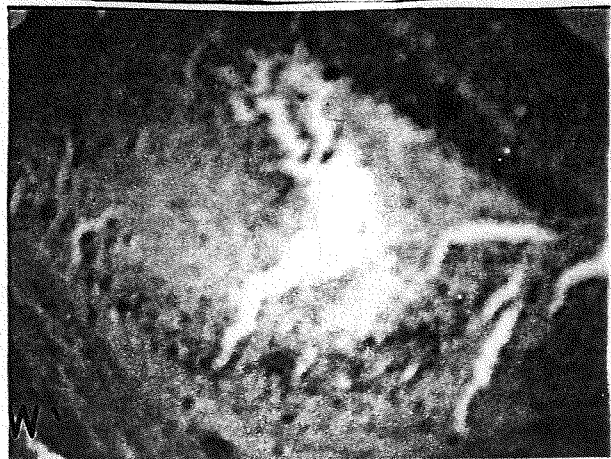
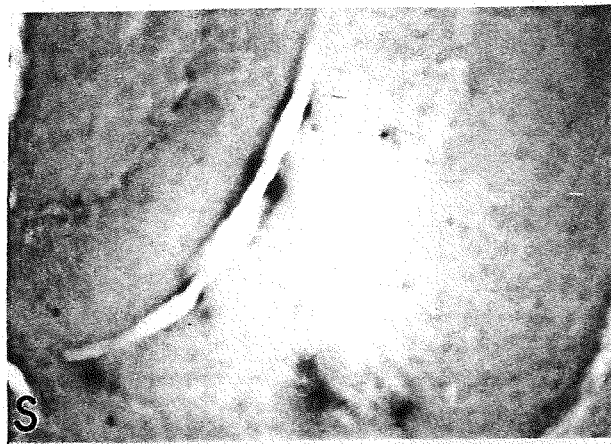
S: pcm^{'-}組探針於 3 週大幼鼠腦部, 10 X.

T: pcm^{'-}組探針於 4 週大幼鼠腦部, 10 X.

U: pcm^{'+}組探針於 27 週大成鼠腦部, 10 X.

V: pcm^{'-}組探針於 47 週大成鼠腦部, 10 X.

W: pcm^{'-}組探針於 57 週大成鼠腦部, 10 X.



表五:應用探針 *mpcm*-“-” , 以原位雜交術於不同發育天數,
 之老鼠胚胎切片中, *mpcm* mRNA 之表現強度。
 (縱向標示為組織部位, 橫向標示為胚胎成長天數, 單位為天。)

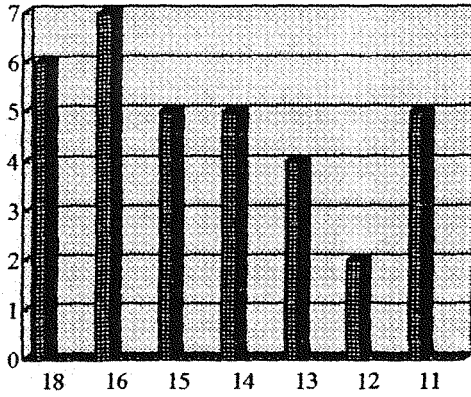
組織部位	18	16	15	14	13	12	11
Bone osteoblasts	+	+	+	+	+	-	-
Epidermis	+	+	-	-	-	-	-
Hair follic	-	-	-	-	-	-	N
pericardium	-	-	++	-	N	N	N
Intestinal epithelium	+	-	-	-	-	-	-
Kidney(Brown an's Capsule)	++	-	++	-	N	N	N
Liver	+	+	+	-	-	-	N
Lung	+	+	+	-	N	N	N
Skeletal muscle	++	++	++	++	++	+	+
Smooth muscle	++	+	+	-	-	-	-
Spleen	-	-	-	-	N	N	N
Notocord	+	++	+	++	+	-	+++
telencephalon	++	+	+	+	+	+	+
Hidbrain	+	+	++	+	+	+	+
Ventric	++	-	+	-	-	-	-
Genital ridge	++	+	+	-	-	-	+
Diaphragm	-	-	+	-	-	-	-
Tracheal	-	-	-	-	-	+	-
Eye	+	+	-	-	-	-	N
Tongue	-	++	-	-	-	-	-

強度價數估計以表一為準。

線形圖四：各系統表現強度圖示：

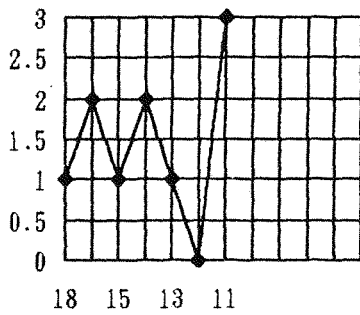
a. 肌肉骨骼系統：

(縱軸為表五之肌肉骨骼系統，強度之總數相加；橫軸為胚胎鼠)

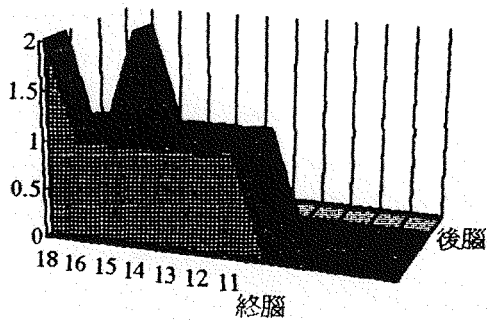


b. 腦神經系統：縱軸為強度以價數為單位，橫軸為胚胎天數。

I: pcm mRNA 於神經管中表現強度與胚胎發育之關係。



II. 終腦(telecephalon) 與後腦(hind brain) 和胚胎發育之關係。



圖十六: pcm 組探針於胚胎與各組織之表現.

a: pcm⁻ 組探針於 14 天大胚胎矢狀切片中表現.

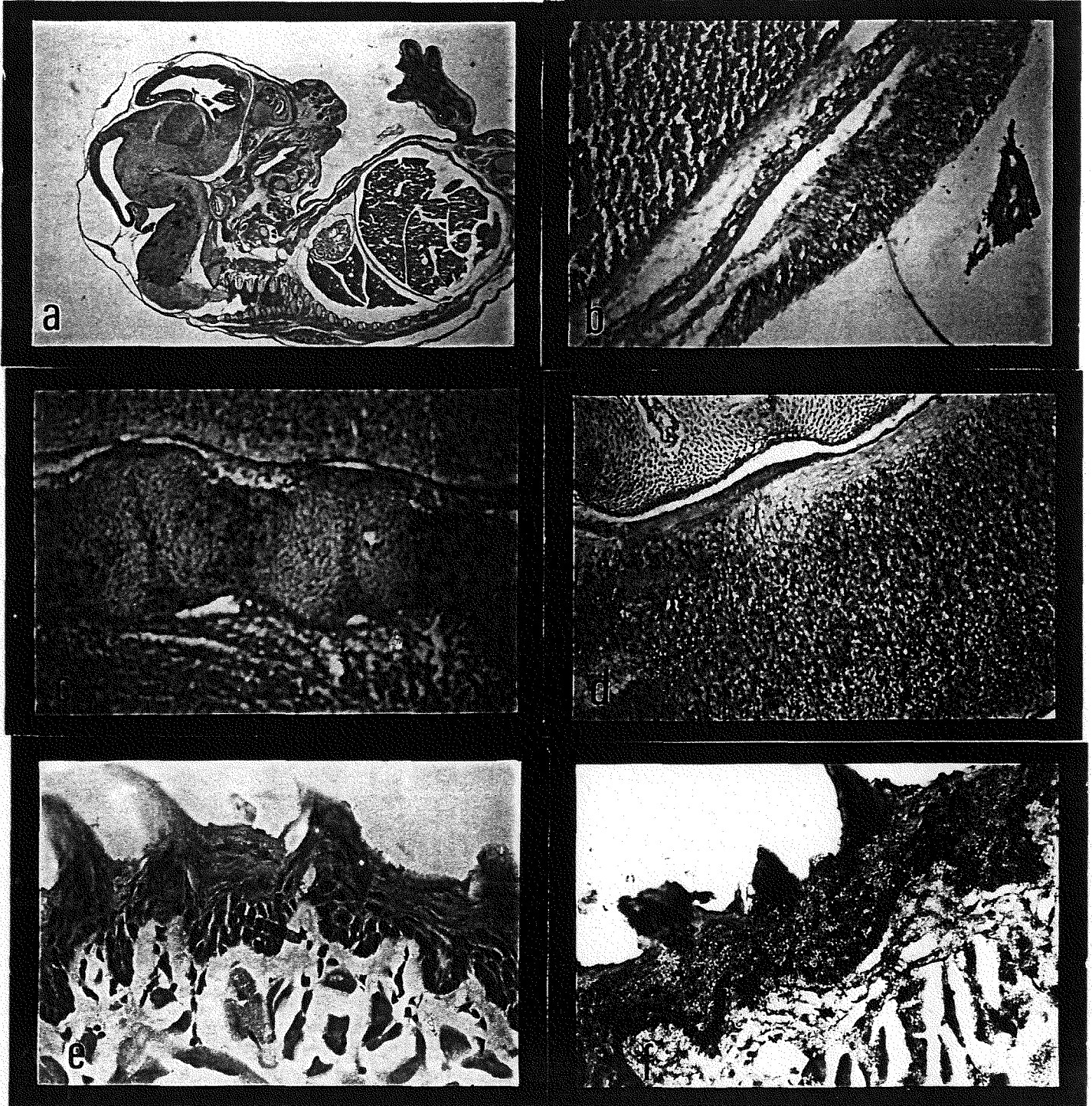
b: pcm⁻ 組探針於 15 天大胚胎之橫隔膜上表現, 20 X.

c: pcm⁻ 組探針於 16 天大胚胎之脊椎骨與 spinal 中表現, 20 X.

d: pcm⁻ 組探針於 14 天大胚胎神經管之表現, 20 X.

e: pcm⁺ 組探針於 40 週大成鼠舌頭表現, 20 X.

f: pcm⁻ t 組探針於同一週數之舌頭組織切片之表現.



圖十七: pcm 組探針於胚胎各組織部位之表現.

g: pcm⁻ 組探針於 15 天大胚胎心包腔, 10 X.

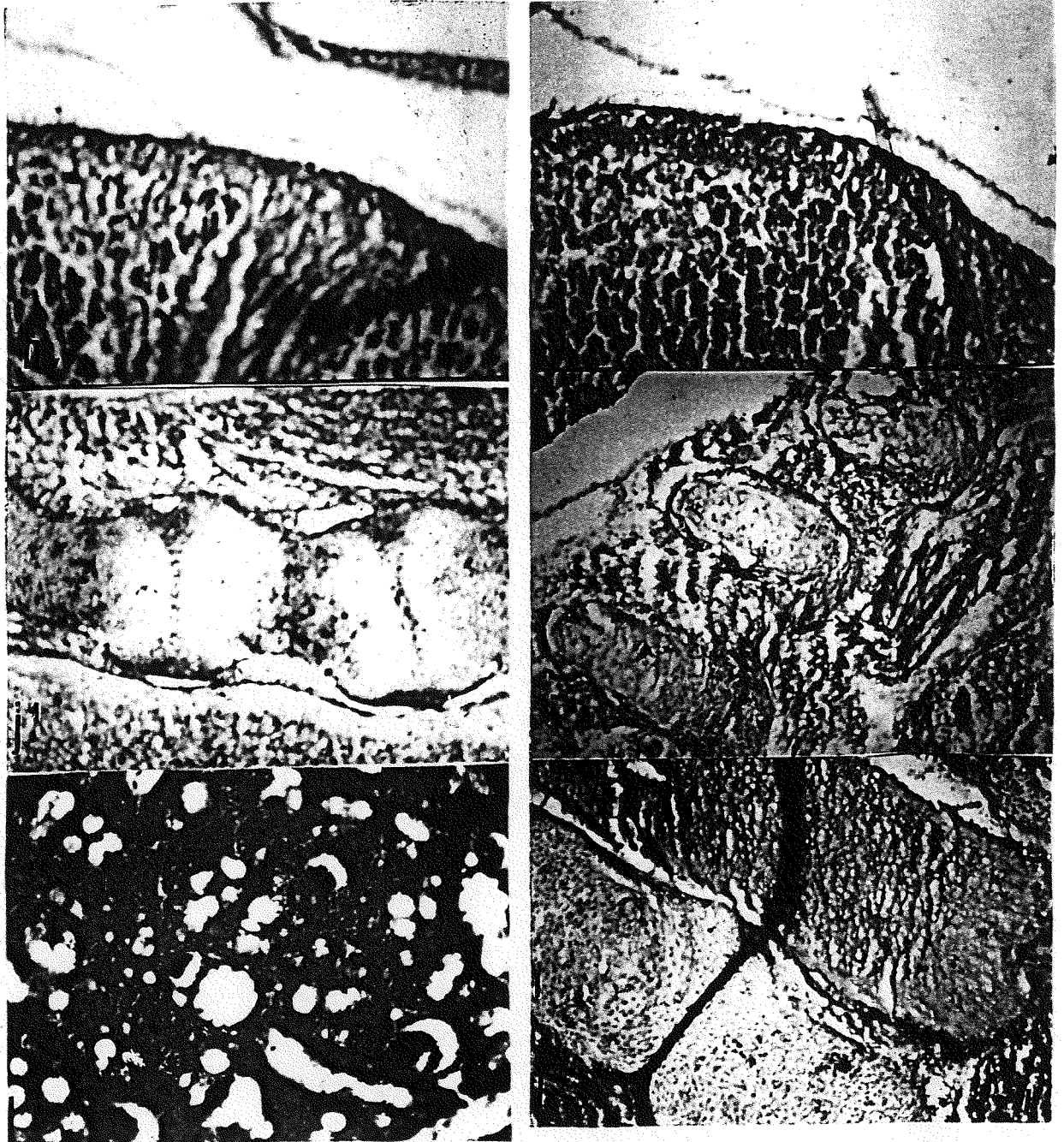
h: pcm⁺ 組探針於 15 天大胚胎心包腔, 10 X.

i: pcm⁻ 組探針於 15 天大胚胎之脊髓 (spinal), 10 X.

j: pcm⁻ 組探針於 14 天大胚胎之脊髓 (spinal), 10 X.

k: pcm⁻ 組探針於 15 天大胚胎之脊椎骨, 10 X.

l: pcm⁺ 組探針於 16 天大胚胎之肺部表現, 10 X.



圖十八: pcm 組探針於胚胎之表現.

m: pcm⁻ 組探針於 18 天大胚胎之肝臟 (liver) 表現, 20 X.

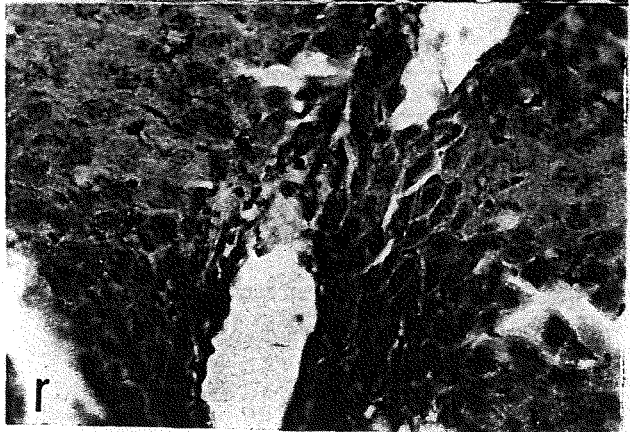
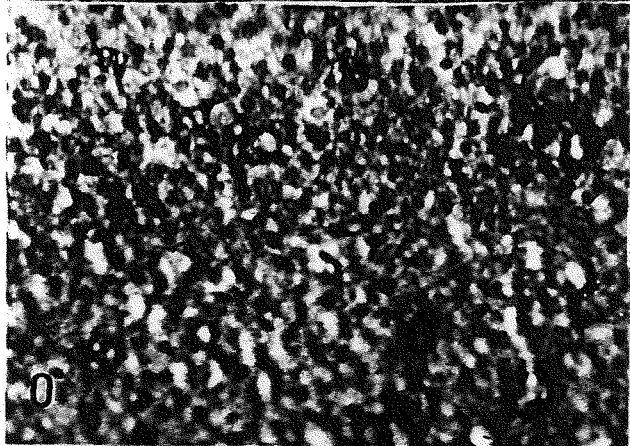
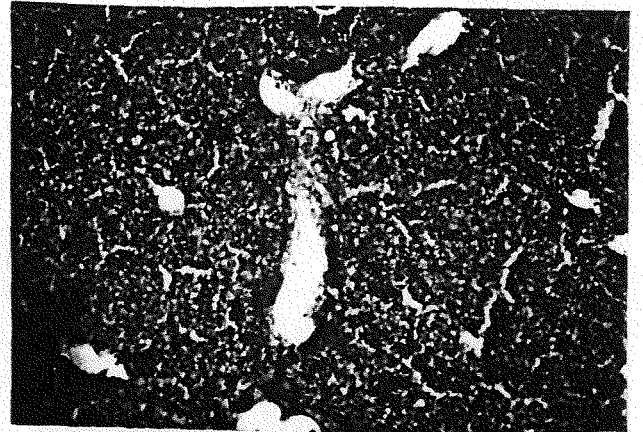
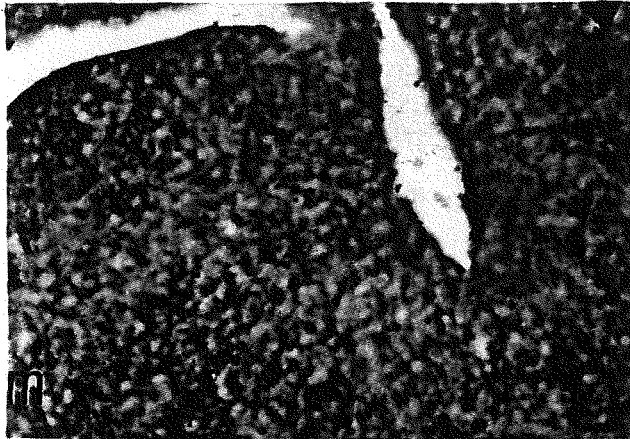
n: pcm⁺ 組探針於 18 天大胚胎之肝臟, 20 X.

o: pcm⁻ 組探針於 18 天大胚胎之腦部海馬回表現, 40 X.

p: pcm⁻ 組探針於 18 天大胚胎之相同位置之表現, 20 X.

r: pcm⁻ 組探針於 40 週大成鼠之肝臟表現, 40 X.

s: pcm⁻ 組探針於 18 天大胚胎腦部海馬回 (CA1-3of hippocampus) 表現, 10X.

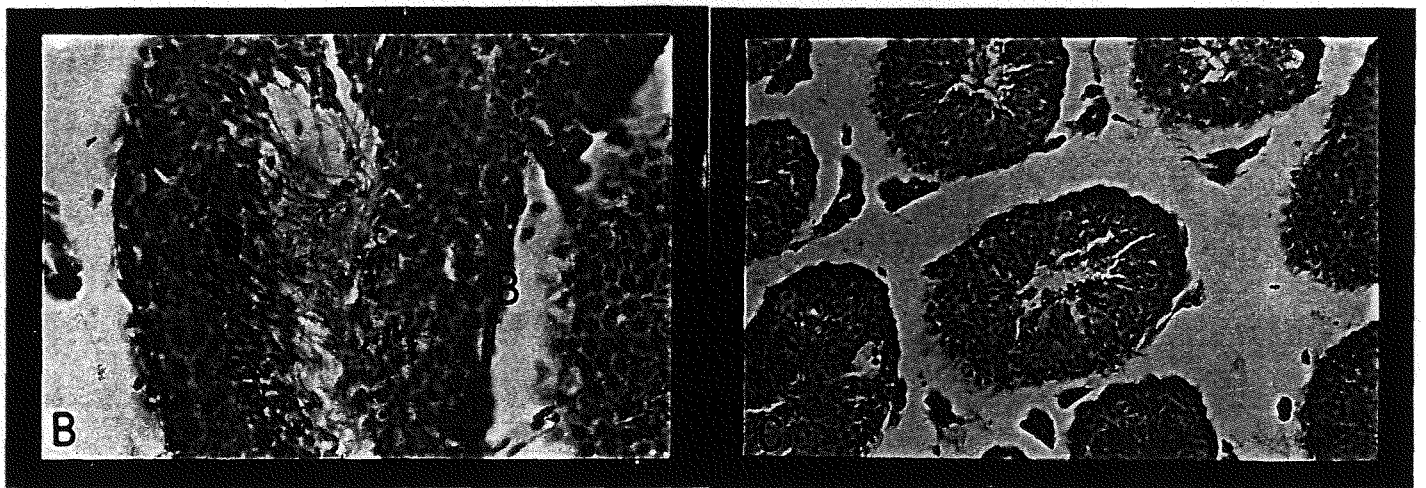
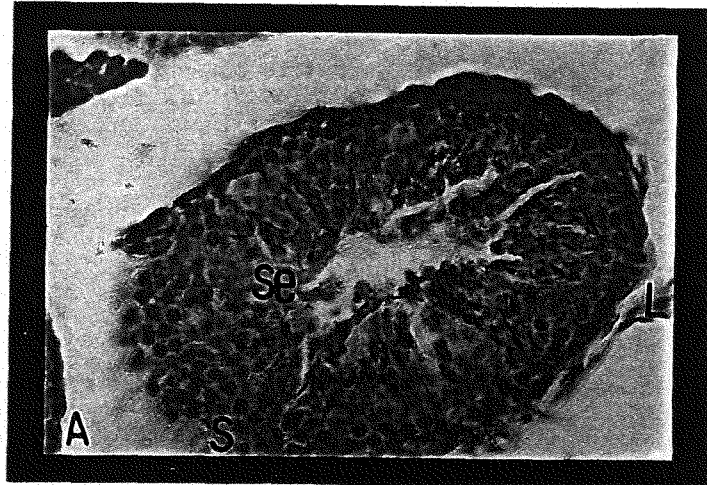


圖十九:mpcm⁻組探針於 40 週大成鼠睪丸石蠟切片(厚度 10 μ m)中進行原位雜交術後以 Fast red 作對照染色,於學顯微鏡下其 positive reaction 應為紫色顆粒。 A: 控制組, 40 X.

B: mpcm⁻組探針, 40 X. 本圖可視為陰性反應。

C: mpcm⁺組探針, 20 X.

L: leydig cell S: sertoli cell Se: Spermatid B: Basememt membrane



圖二十一: mfmr-1 splicing form 三組探針 fmr-1C0, C39, C75 於胚胎與成鼠
腦部切片表現強度之比較.

A: fmr-1C75 探針於 16 天大胚胎矢狀切片整體顯示深色處為呈現反應處

B: fmr-1C39 於同組切片表現.

C: fmr-1C0 於相同條件下表現於 16 天胚胎.

D: fmr-1 C75 於 40 週大成鼠腦部切片表現.

E: fmr-1 C39 於相同切片表現.

F: fmr-1 C0 同組腦部切片表現.



表六: 應用 *fmr-1ac* 該組探針，於 16 天大之老鼠胚胎切片。
 (縱軸為探針標示，橫軸為組織部位。)

	Ventricular	Genital ridge	Liver	Spleen	Spinal	epidermal
<i>fmr-1ac</i>	+	+	-	-	+	+
<i>fmr-1a</i>	-	+	+	+	+	+
control	-	-	-	-	-	-

圖二十: mfmr-1 ac 組探針在成鼠睪丸切片(10 μm)中進行非放射性原位雜交後以 fast green 作對照染色,於顯微鏡下 positive reaction 呈現紫黑色顆粒。

A: 控制組, 20 X。

(X: 顯微鏡放大倍數)

B: mfmr-1ac 組探針, 40 X。

C: mfmr-1a 組探針, 20 X。

L: leydig cell

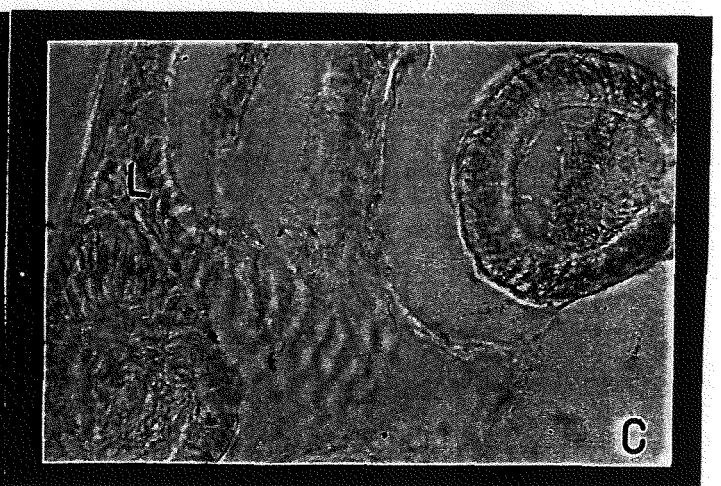
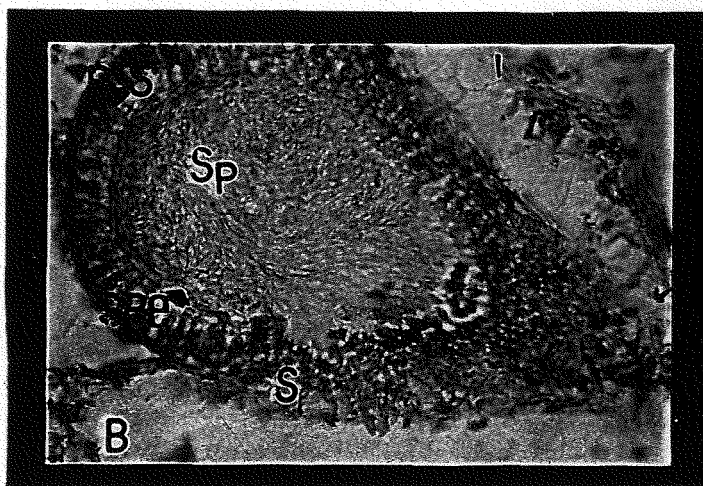
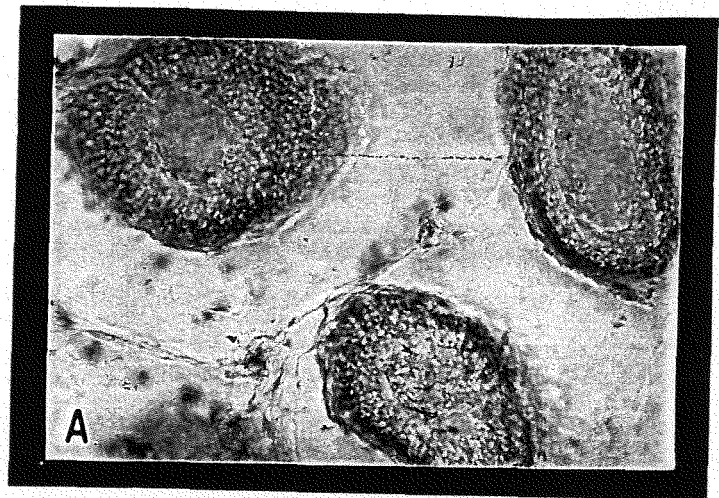
Se: Sertoli cell

Sp: Spermatid 精細胞

Spe: Spermatogonia 原精細胞

P. S: primary spermatogonia 初級精母細胞

B: Basement membrane 基底膜



表七：應用探針 *fmr-1C75*，以原位雜交術於不同天數大小

成鼠腦部切片中 *fmr-1* mRNA 之表現強度與分布區域之比較。

(縱軸為腦部結構，橫軸為鼠齡以週數為單位)

組織部位	60	57	50	47	43	40	27	4	3	2
Bulbus olfactoris	N	N	-	N	+	N	N	-	+	N
Caudate putamen	+	+	+	+	-	+	++	++	+	+
Cerebellum (gray layer)	+	+	++	+	++	+	+++	+++	+	N
Corpus callosum	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+
Amon's horn	++	+	-	+++	-	++	++	+++	+	+
Hippocampus	+	+	++	-	+	+	+	+	+	+
Fimbria	++	+	-	+	+++	+	+++	++	++	++
Neocortex	+	+	-	-	++	+	++	+	+	+
Pontin	+	-	-	+++	+	++	++	++	+++	+++
Ventric	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

此表所列之強度價數，以切片經呈色處理後，所呈現之紫藍色色素顆

粒之多寡及呈色強弱表現形態為依據：

“-” 於該部位未見任何呈色顆粒出現；

“+” 單一細胞於肉眼可見，成點狀分布；

“++” 色澤深度增強，成團狀分布；

“+++” 分布範圍較廣並呈片狀分布。

N: 不適用本評估法 因尚未發育或切片中未切到

表九：應用探針 *fmr-1C0*，以原位雜交術於不同天數大小

成鼠腦部切片中 *fmr-1* mRNA 之表現強度與分布區域之比較。

(縱軸為腦部結構，橫軸為鼠齡以週數為單位)

組織部位	60	57	50	47	43	40	27	4	3	2
Bulbus olfactoris	N	N	-	N	-	N	N	-	N	N
Caudate putamen	+	+	+	-	+	++	++	+	+	-
cerebellum (gray layer)	+	N	+	+	N	N	++	-	+	-
Corpus callosum	++	++	+	+	-	+++	++	+	-	+
Amon's horn	++	++	+	+	+	+++	++	+	-	+
Hippocampus	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Fibrilla	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+
Neocortex	-	+++	+	+	++	-	++	-	-	-
Pontin	+	++	++	++	++	+	+	++	-	+
Ventric	+	++	+	+	-	-	+	++	-	-

此表所列之強度價數，以切片經呈色處理後，所呈現之紫藍色色素顆

粒之多寡及呈色強弱表現形態為依據：

“-” 於該部位未見任何呈色顆粒出現；

“+” 單一細胞於肉眼可見，成點狀分布；

“++” 色澤深度增強，成團狀分布；

“+++” 分布範圍較廣並呈片狀分布。

N: 不適用本評估法 因尚未發育或切片中未切到

圖二十二: mfmr-1 三組探針於成鼠小腦顆粒層之表現.

G: mfmr-1C0 於 27 週大成鼠小腦顆粒層表現, 10 X.

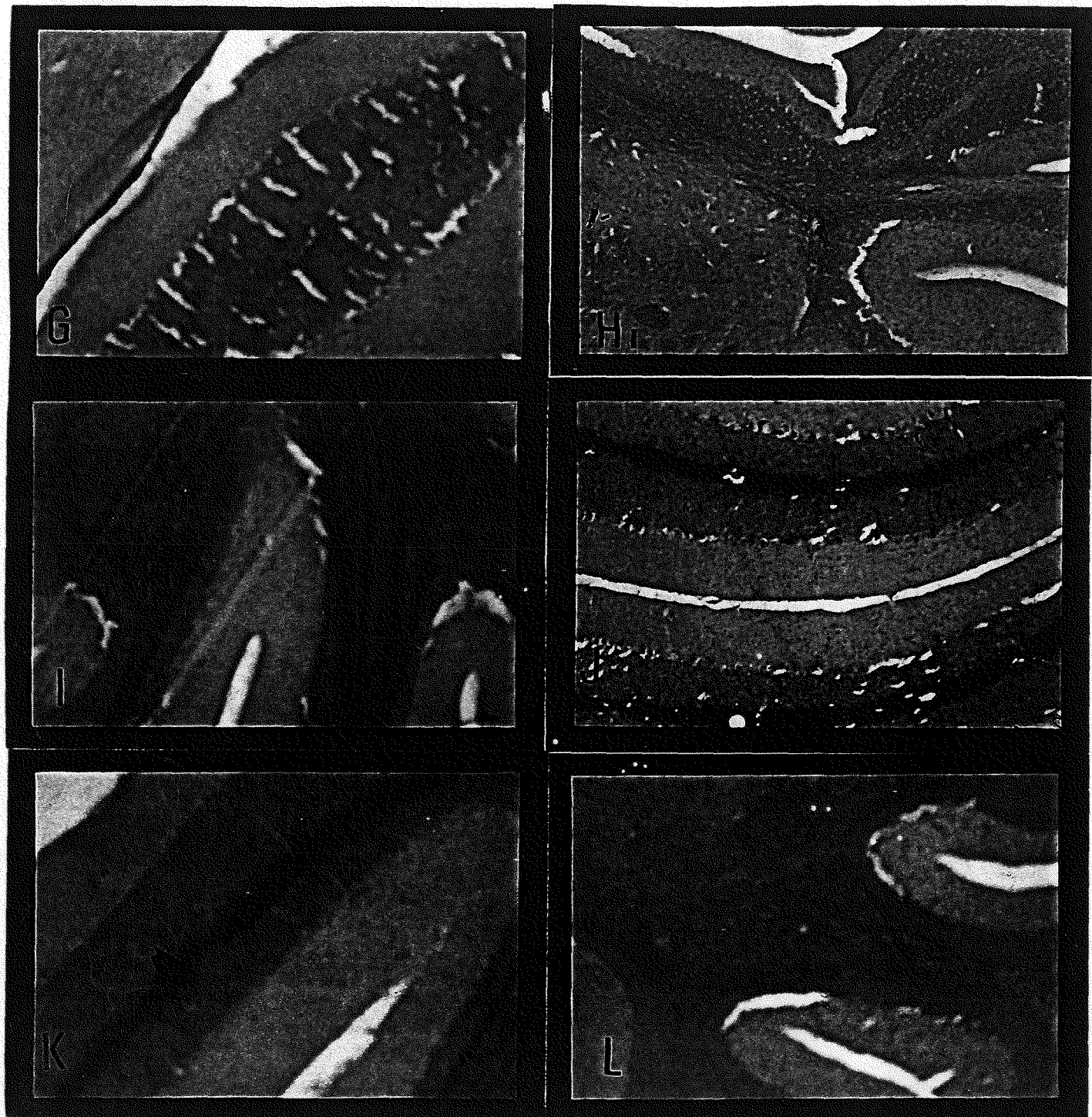
H: mfmr-1C0 於 60 週大成鼠小腦顆粒層表現, 10 X.

I: mfmr-1C39 於 4 週大幼鼠小腦顆粒層表現, 10X.

J: mfmr-1C39 於 57 週大成鼠小腦顆粒層表現, 10X.

K: mfmr-1C75 於 27 週大成鼠小腦顆粒層表現, 10X.

L: mfmr-1C75 於 60 週大成鼠小腦顆粒層表現, 10 X.



圖二十三: mfmr-1 三組探針於海馬回織部之表現.

S: mfmr-1C75 於 3 週大幼鼠之織部表現, 10 X.

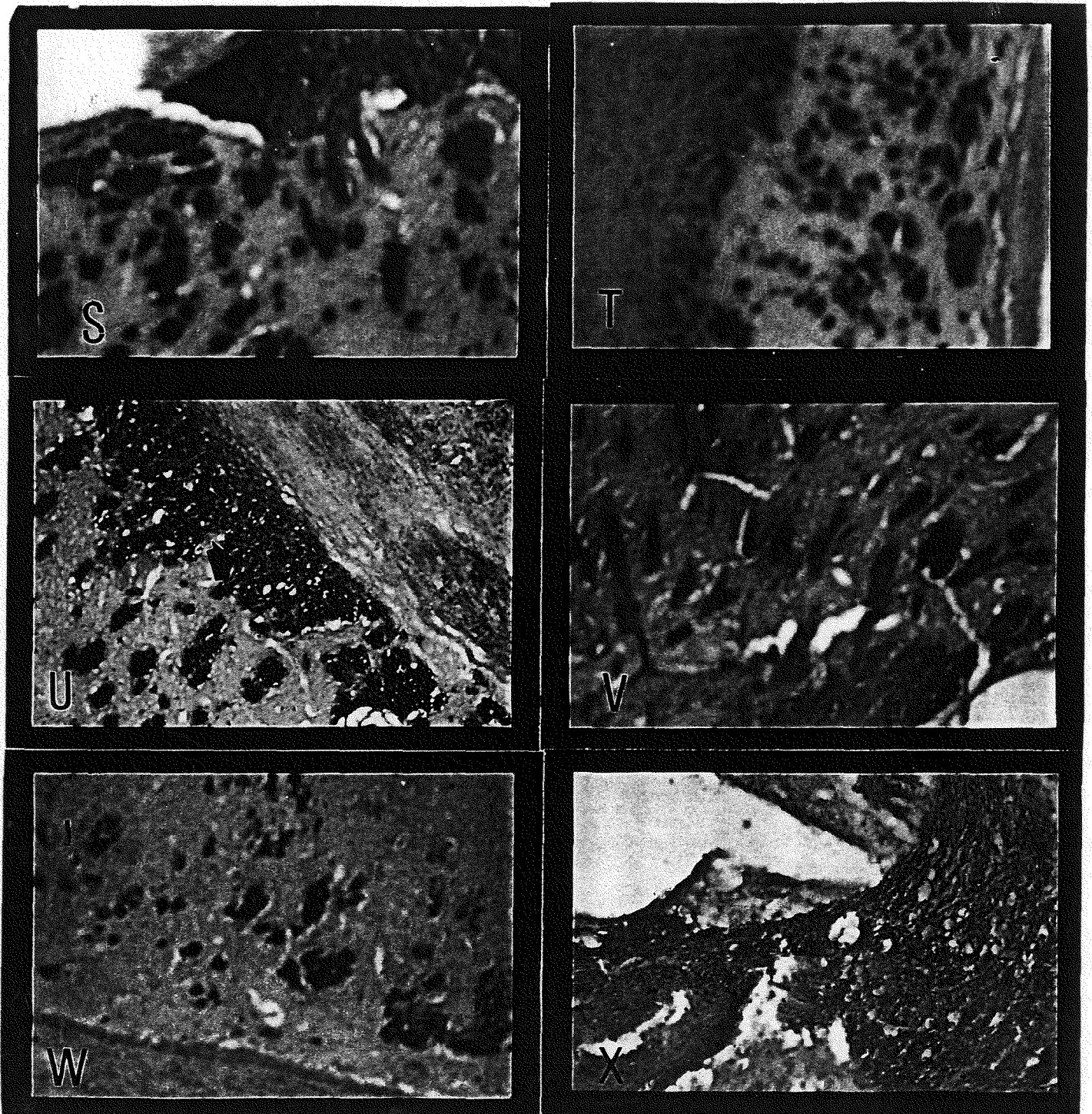
T: mfmr-1C75 於 57 週大成鼠相同部位表現, 10 X.

U: mfmr-1C39 於 4 週大幼鼠之織部表現, 10X.

V: mfmr-1C39 於 60 週大成鼠相同部位表現, 10 X.

W: mfmr-1C0 於 4 週大幼鼠之織部表現, 10 X.

X: mfmr-1C0 於 60 週大成鼠相同部位表現, 10 X.



圖二十四: mfmr-1 三組 splicing form 探針於成鼠海馬回(CA1-3 of the hippocampus) 中表現.

M: mfmr-1C75 於 40 週大成鼠腦部切片表現, 10 X.

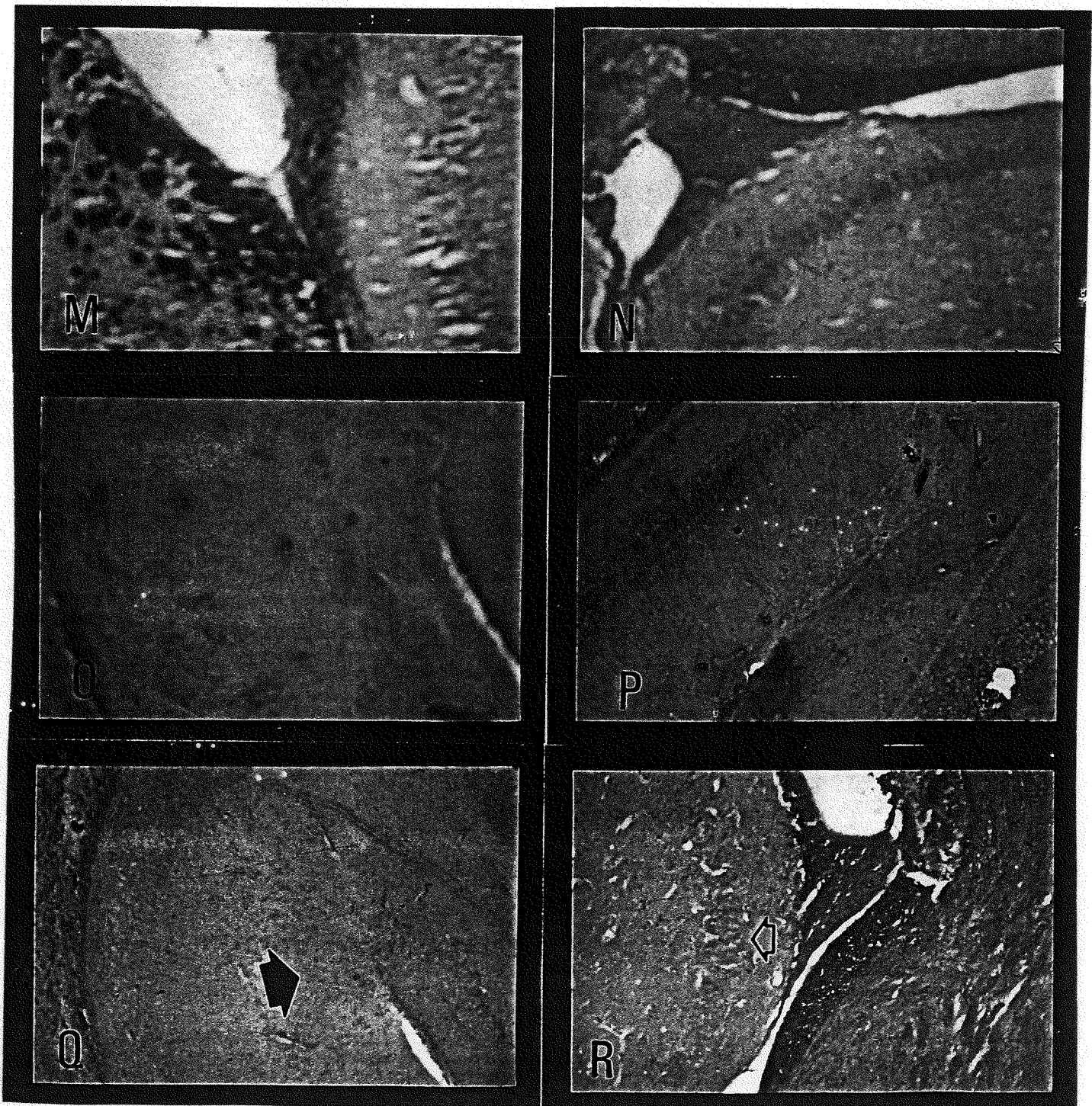
N: mfmr-1C75 於 60 週大成鼠腦部切片表現, 10 X.

O: mfmr-1C39 於 27 週大成鼠腦部切片表現, 10 X.

P: mfmr-1C39 於 50 週大成鼠腦部切片表現, 10 X.

Q: mfmr-1C0 於 3 週大幼鼠腦部切片表現, 10 X.

R: mfmr-1C0 於 60 週大成鼠腦部切片表現, 10 X.



圖二十五: mfmr-1 三組探針於成鼠橋腦(pontin) 之表現.

M: mfmr-1C75 於 3 週大幼鼠橋腦之表現, 10X.

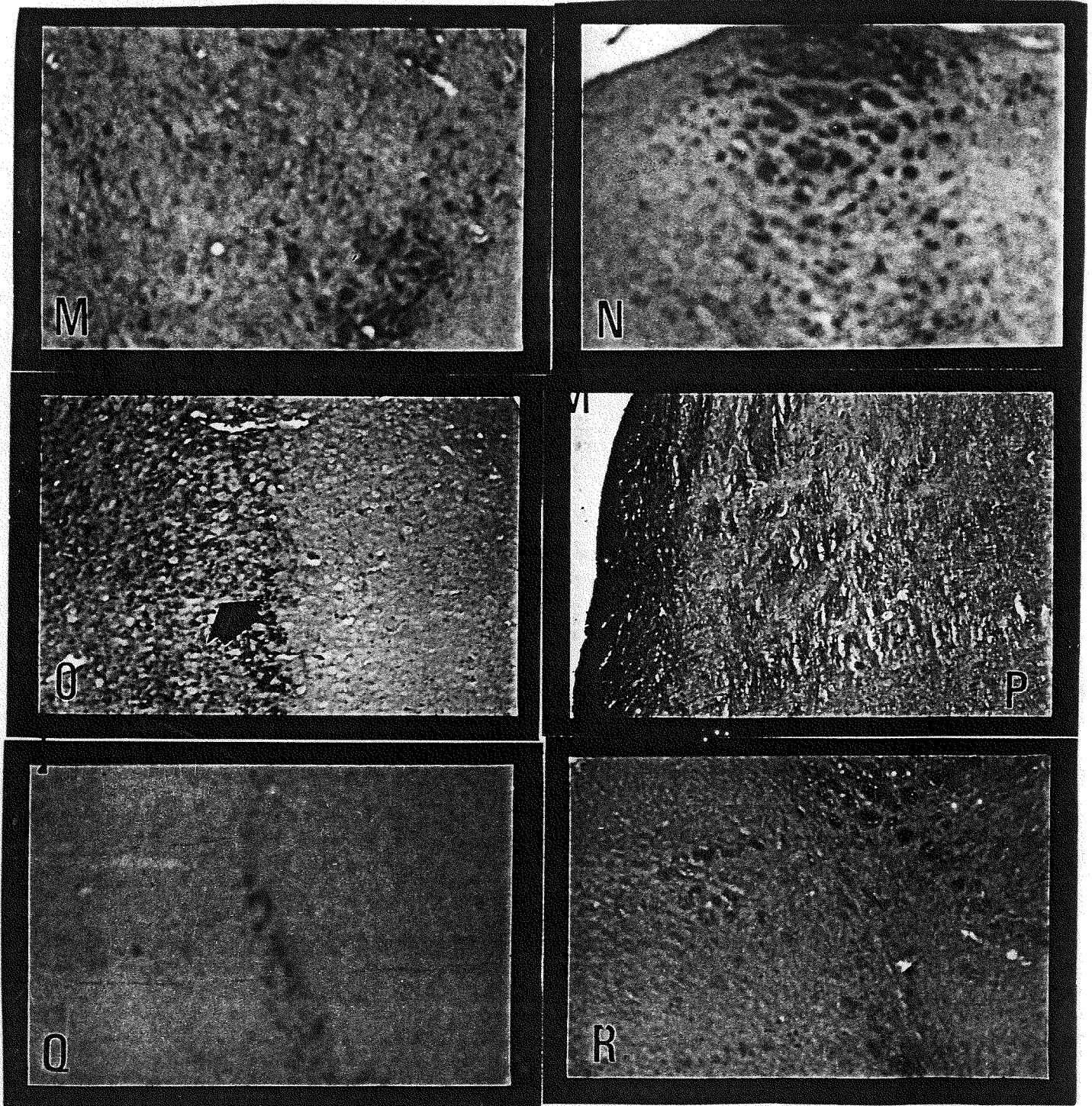
N: mfmr-1C 75 於 47 週大成鼠橋腦之表現, 10X.

O: mfmr-1C39 於 4 週大幼鼠橋腦表現, 10X.

P: mfmr-1C39 於 57 週大成鼠橋腦表現, 10X.

Q: mfmr-1 C0 於 3 週大幼鼠橋腦表現, 10 X.

R: mfmr-1C0 於 57 週大成鼠橋腦表現, 10 X.



表十：應用探針 *fmr-1C0*，以原位雜交術於不同天數大小

胚胎切片中 *fmr-1* mRNA 之表現強度與分布區域之比較。

(縱軸為鼠胚各部份結構，橫軸為胚胎天數)

組織部位	18	17	16	15	14	13	12	11	10
Bone, osteoblast	++	++	+++	+++	+	++	++	+	N
Epidermic	+	+	+	+	+	+	++	+	-
Hair folic	+	+	+	++	N	N	++	N	N
Pericardium	N	+	-	++	N	+	++	-	N
Tongue	+	-	-	++	-	N	++	-	-
Intestinal	N	+	+	++	-	N	++	-	-
kidney	-	-	-	N	N	N	N	N	N
Liver	-	-	-	++	-	-	++	-	N
Lung	-	-	-	-	-	-	++	-	N
Skeletal muscle	++	++	++	+	+	+	++	+	N
Smooth muscle	+	+	+	+	-	+	+	-	N
Spleen	N	-	N	+	N	N	N	N	N
Notocord	+	++	+++	++	+	+	++	+	+++
Telecephalon	++	+	+	+	+	++	++	+	++
Hind brain	-	+	+	+	-	+	++	+	++
Ventric	-	-	+	+	-	+	++	+	N
genital redge	+	+++	-	N	-	+	-	-	-

此表所列之強度價數，以切片經呈色處理後，所呈現之紫藍色色素顆

粒之多寡及呈色強弱表現形態為依據：

“-” 於該部位未見任何呈色顆粒出現；

“+” 單一細胞於肉眼可見，成點狀分布；

“++” 色澤深度增強，成團狀分布；

“+++” 分布範圍較廣並呈片狀分布。

N: 不適用本評估法，因尚未發育或切片中未切到

表十一：應用探針 *fmr-1C39*，以原位雜交術於不同天數大小

胚胎切片中 *fmr-1* mRNA 之表現強度與分布區域之比較。

(縱軸為鼠胚各部份結構，橫軸為胚胎天數)

組織部位	18	17	16	15	14	13	12	11	10
Bone, osteoblast	++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++
Epidermic	++	++	++	++	++	+	N	N	N
Hair folic	++	++	++	++	++	++	+	N	N
Pericardium	N	-	-	-	-	N	-	N	N
Tongue	-	-	+	-	-	-	-	-	N
Intestinal	+	+	-	-	-	-	-	N	N
kidney	N	++	-	-	-	N	N	N	N
Liver	+	-	-	-	-	-	N	N	N
Lung	-	-	-	-	-	-	++	-	N
Skeletal muscle	+	++	++	+	+	+	+	N	N
Smooth muscle	+	+	+	+	-	-	+	-	N
Spleen	N	-	N	+	N	N	N	N	N
Notocord	++	-	+	+	+++	+	++	++	+++
Telecephalon	+	+	+	+	-	+	+	++	++
Hind brain	+	+	+	+	-	+	+	++	++
Ventric	-	+	+	+	+	+	-	+	N
genital redge	-	+++	++	+++	+++	N	+	-	-

此表所列之強度價數，以切片經呈色處理後，所呈現之紫藍色色素顆

粒之多寡及呈色強弱表現形態為依據：

“-” 於該部位未見任何呈色顆粒出現；

“+” 單一細胞於肉眼可見，成點狀分布；

“++” 色澤深度增強，成團狀分布；

“+++” 分布範圍較廣並呈片狀分布。

N: 不適用本評估法 因尚未發育或切片中未切到

表十二：應用探針 *fmr-1C75*，以原位雜交術於不同天數大小

胚胎切片中 *fmr-1* mRNA 之表現強度與分布區域之比較。

(縱軸為鼠胚各部份結構，橫軸為胚胎天數)

組織部位	18	17	16	15	14	13	12	11	10
Bone, osteoblast	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+++
Epidermic	++	++	++	+	+	+	++	N	+
Hair folic	+	+	+	-	-	+	N	N	N
Pericardium	-	+	-	-	-	N	-	N	N
Tongue	-	+	-	-	-	N	N	-	N
Intestinal	-	N	-	++	N	+++	-	N	++
kidney	N	++	-	-	-	N	N	N	N
Liver	+	-	-	-	-	-	N	N	N
Lung	-	-	-	-	-	-	++	-	N
Skeletal muscle	++	+++	++	+	+	+	-	N	+
Smooth muscle	+	++	+	+	+	+	+	-	+
Spleen	N	-	N	+	N	N	N	N	N
Notocord	+	++	-	+++	++	+++	+	++	+++
Telecephalon	++	++	++	+++	+++	++	+	++	++
Hind brain	+	+	++	++	+++	+	+	++	++
Ventric	-	+	+	+	+	+	-	+	N
genital redge	+++	+++	+	+++	+++	-	+	-	N

此表所列之強度價數，以切片經呈色處理後，所呈現之紫藍色色素顆

粒之多寡及呈色強弱表現形態為依據：

“-” 於該部位未見任何呈色顆粒出現；

“+” 單一細胞於肉眼可見，成點狀分布；

“++” 色澤深度增強，成團狀分布；

“+++” 分布範圍較廣並呈片狀分布。

N: 不適用本評估法 因尚未發育或切片中未切到

圖二十六: mfmr-1 三組探針應用於胚胎脊髓 (spinal) 中表現.

T: mfmr-1C75 於 17 天大胚胎切片表現, 10 X.

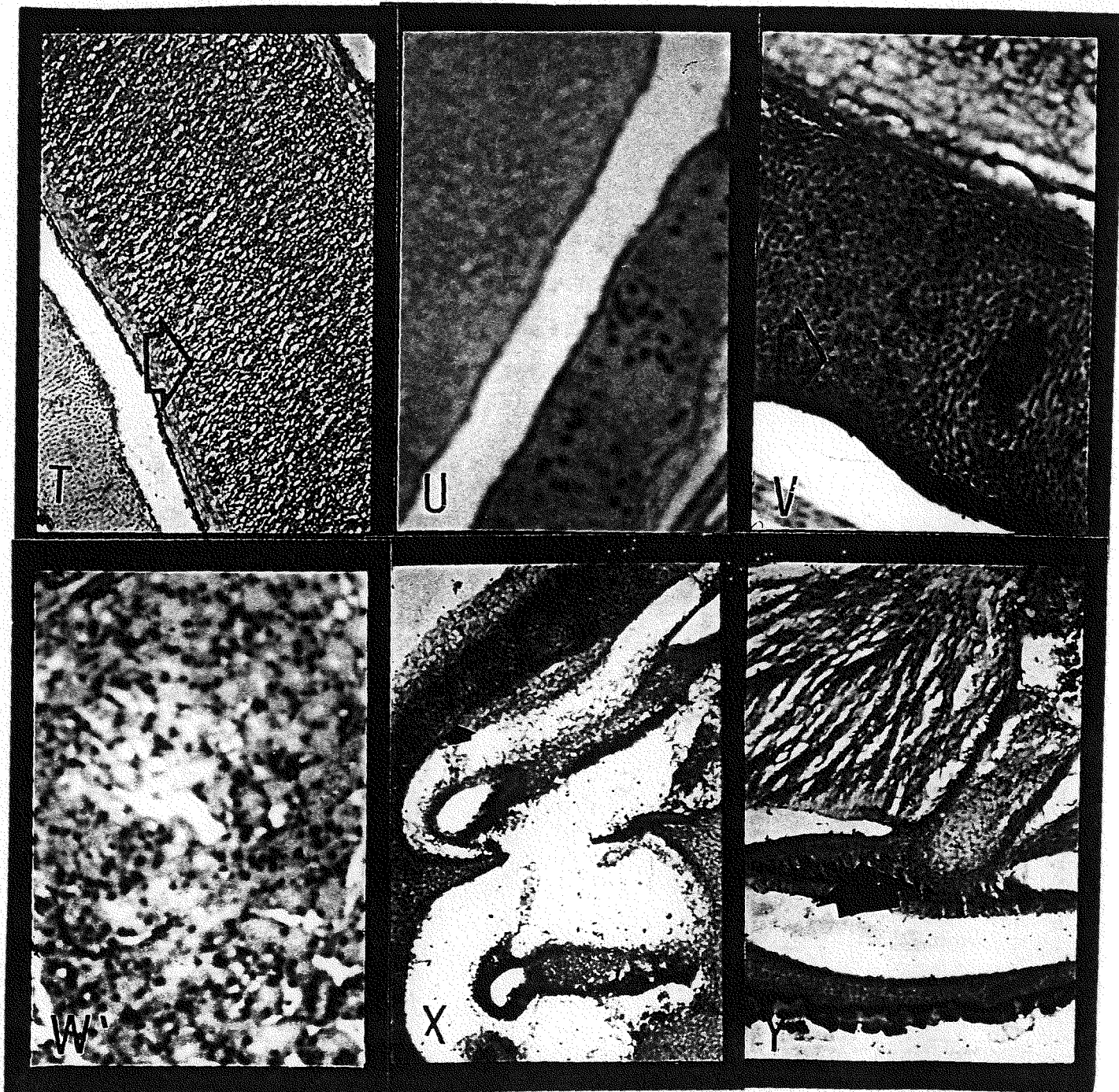
U: mfmr-1C39 於 17 天大胚胎切片表現, 10 X.

V: mfmr-1C0 於 17 天大胚胎切片中表現, 10 X.

W: mfmr-1c75 於 40 週大成鼠腎臟切片中表現, 10 X.

X: mfmr-1C75 於 15 天大胚胎心胞腔表現, 10 X.

Y: mfmr-1C75 於 15 天大胚胎骨骼肌表現, 10 X.



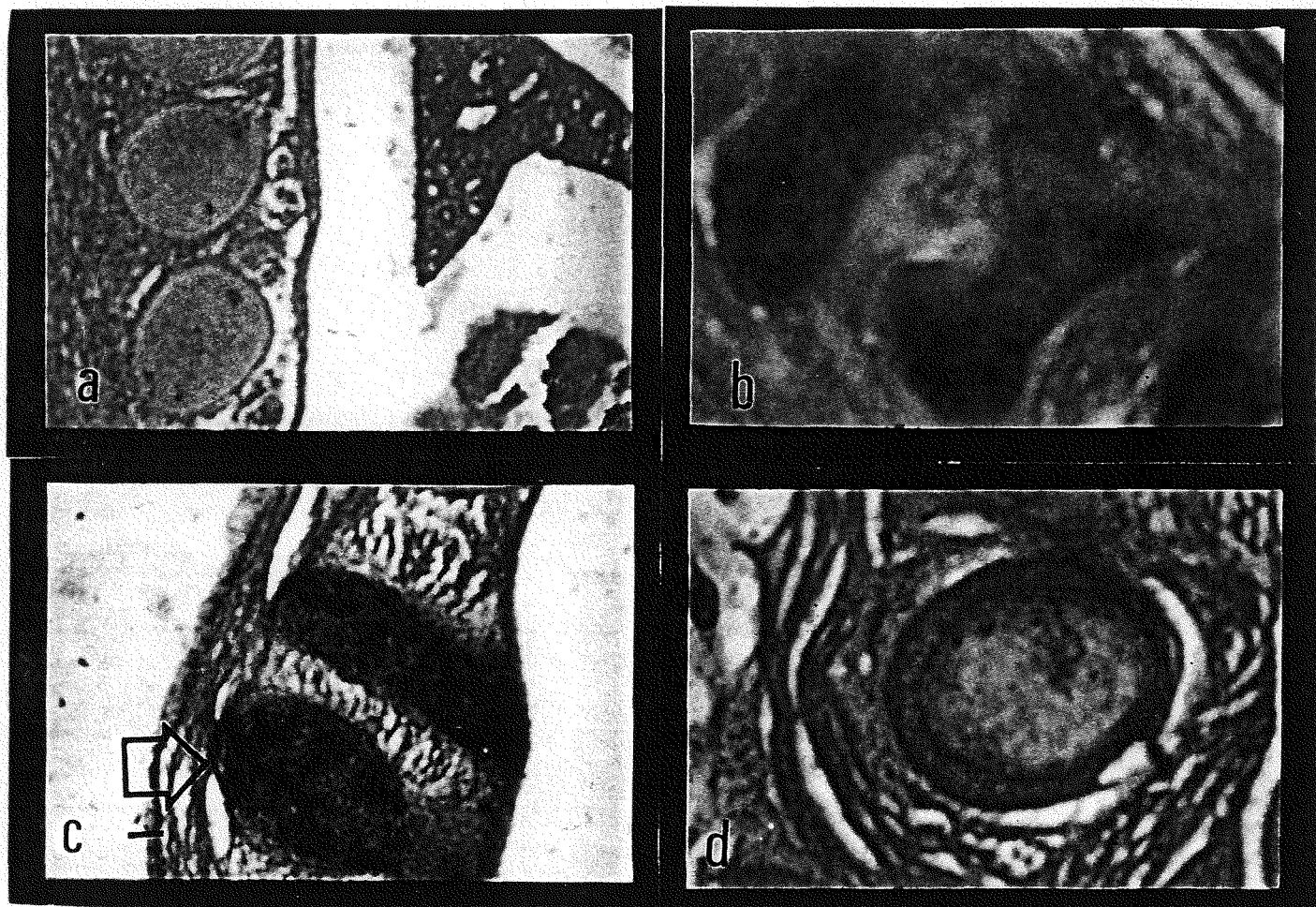
圖二十七: mfmr-1C75, C39, C0 等探針於胚胎脊椎骨(vertebrate) 中表現.

A: 控制組, 10 x.

B: mfmr-1C75 於 16 天大胚胎中表現, 10 X.

C: mfmr-1C39 於 17 天大胚胎中表現, 10 X.

D: mfmr-1C0 於 17 天大胚胎中表現, 10 X.



圖二十八: mfmr-1 三組探針於海馬回(CA1-3 of the hippocampus) 中表現.

A: mfmr-1C75 於 13 天大胚胎腦部表現, 10 X.

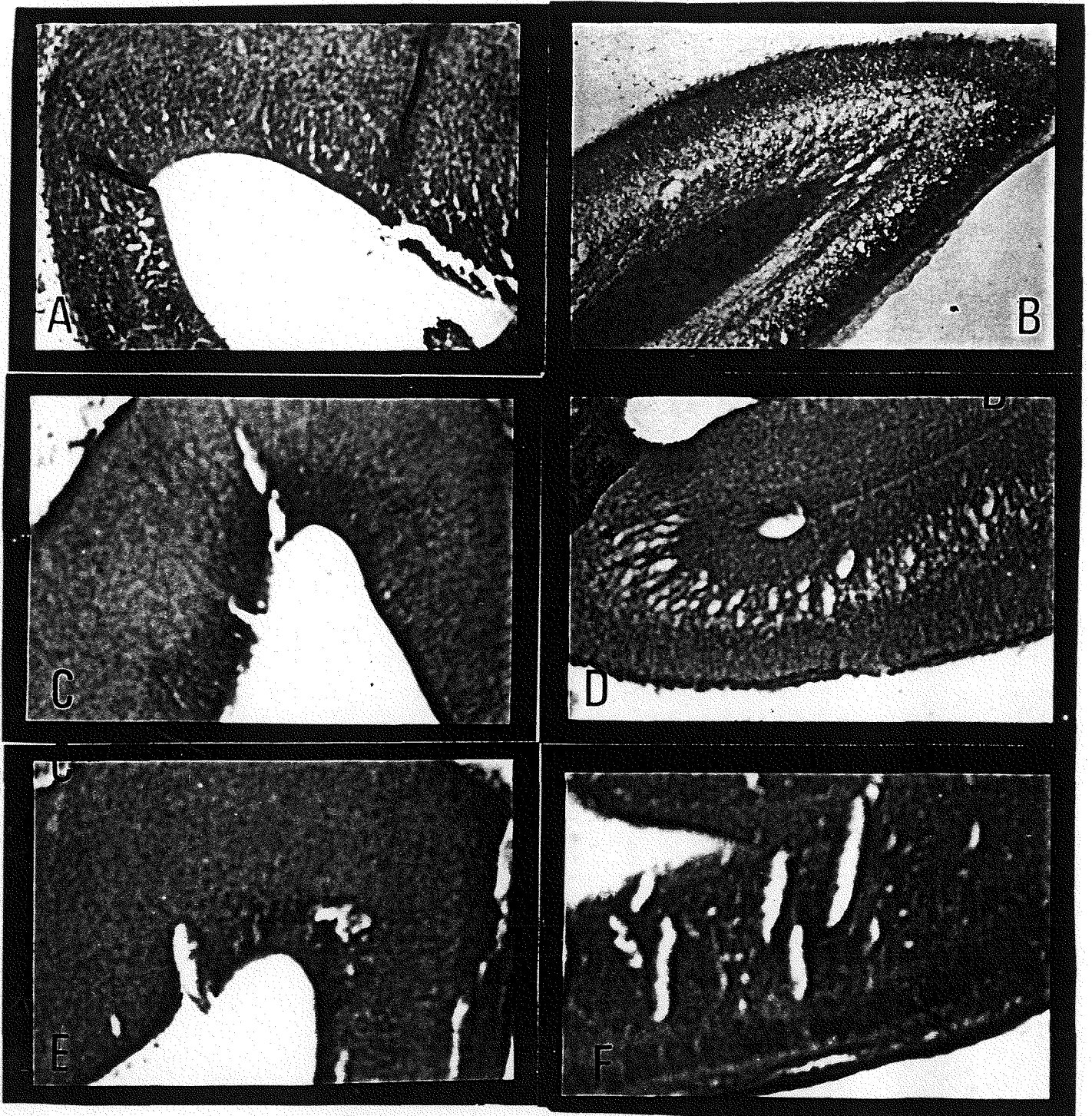
B: mfmr-1C75 於 18 天大胚胎腦部表現, 10 X.

C: mfmr-1C39 於 13 天大胚胎腦部表現, 10 X.

D: mfmr-1C39 於 17 天大胚胎腦部表現, 10 X.

E: mfmr-1C0 於 13 天大胚胎腦部表現, 10 X.

F: mfmr-1C0 於 17 天大胚胎腦部表現, 10 X.



圖二十九: mfmr-1 三組探針於成鼠胼胝體(corpus)與胚胎生殖膈(genital)

G: mfmr-1 C75 於 31 週大成鼠腦部胼胝體表現, 10X.

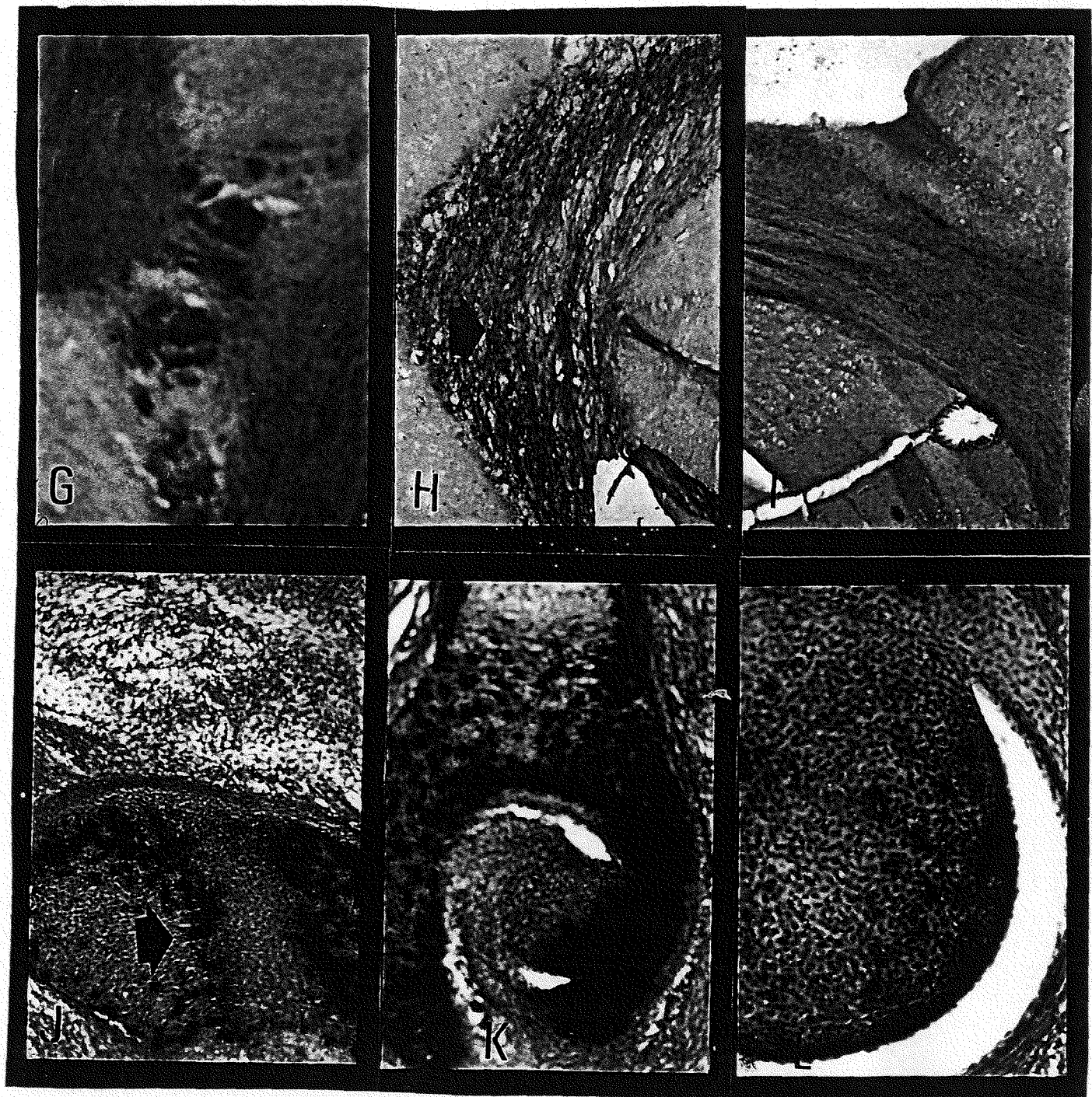
H: mfmr-1 C39 於 4 週大幼鼠腦部胼胝體表現, 10X.

I: mfmr-1 C0 於 40 週大成鼠腦部胼胝體之表現, 10X.

J: mfmr-1C75 於 17 天大胚胎生殖膈表現, 10X.

K:mfmr-1C39 於 17 天大胚胎生殖膈表現, 10X.

L: mfmr-1C0 於 17 天大胚胎生殖膈表現, 10X.



圖三十: mfmr-1 組 splicing form 探針於成鼠睪丸切片之表現.

A: 控制組, 40 X.

B: mfmr-1 C75 探針於 40 週大成鼠睪丸切片, 40 X.

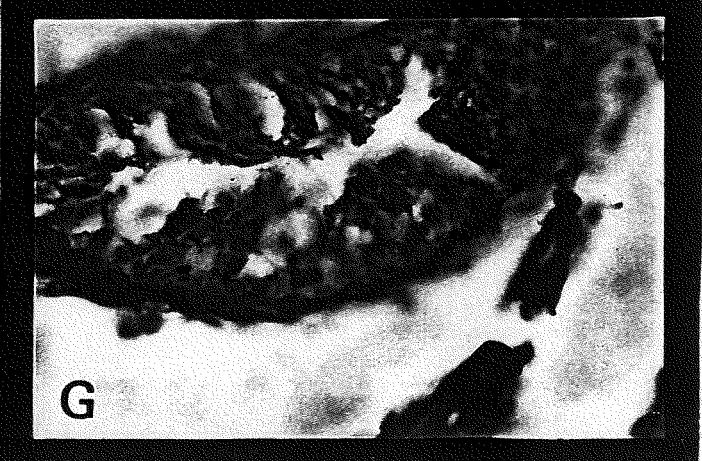
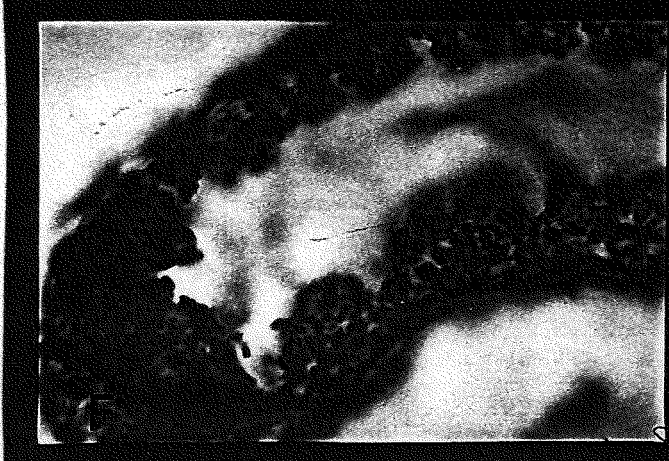
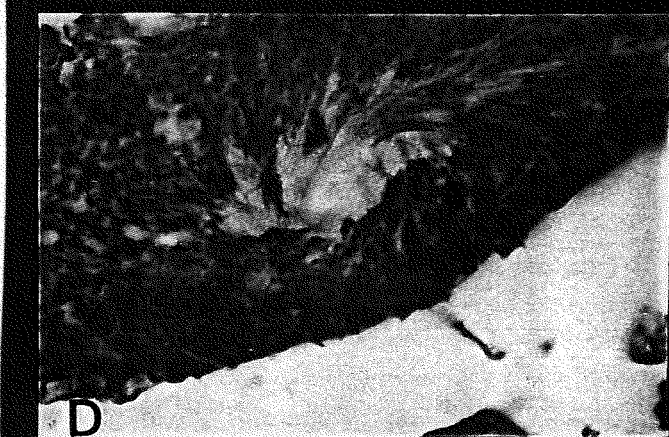
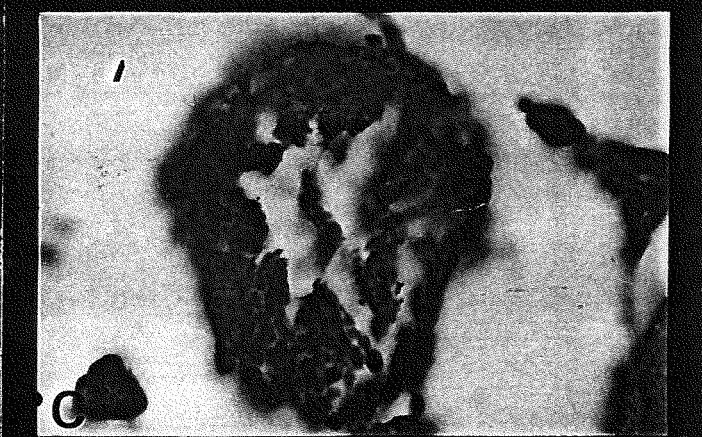
C: mfmr-1 C75 探針於 28 週大成鼠睪丸切片, 40 X.

D: mfmr-1 C39 探針於 40 週大成鼠睪丸切片, 40 X.

E: mfmr-1 C39 探針於 28 週大成鼠睪丸切片, 40 X.

F: mfmr-1 C0 探針於 40 週大成鼠睪丸切片, 40 X.

G: mfmr-1 C0 探針於 28 週大成鼠睪丸切片, 40 X.



第四章

討論

(DISCUSSION)

本實驗結果，應用不同組探針作用於胚胎及成鼠腦部和各項器官切片中，經原位雜交術後之呈色反應於顯微鏡下可見其具有表現型態的一致性：六組皆為細胞內藍紫色細小顆粒。但於不同基因其分佈區域以及於切片中出現之時間與空間之表現各有其相異處，印證此法之特異性及適用性。

本次實驗早期設計僅 40 mer 之 *fmr-1* 組探針，期望能經由此組探針能於胚胎切片中使不同 *fmr-1* cDNA 之 alternative splicing product (Ashley; 1993) 在組織發展之時間與空間上所扮演的角色能經此一實驗而得到佐證之基礎。但經多次實驗後發現其結果之穩定性差，同時其 sense strand 組探針於組織及胚胎中亦有反應，其特異性明顯不足。

為證明上述失敗之原因可能是出自探針本身的問題，而非實驗方法之正確性有誤，因此加入以 Hinds 等人 1993 年發表報告中所應用之探針序列進行實驗，結果顯示此組長度 45 mer 之探針於切片中之表現高度特異性，其 sense strand 與控制組於切片中並不形成呈色反應之結果。前人實驗 (如 Hinds et. al., 1993) 所使用之探針長度為 45 mer，顯示探針長度影響實驗之專一性；同時前人實驗多應用放射性同位素進行標誌，而本次實驗採用非放射性 (Digoxigenin, DIG) 來標誌寡核甘酸 (oligonucleotide)，於組織切片中尋找 mRNA 之表現，這使得實驗程序所需之特殊處理與嚴謹性倍增，相信此為我們無法成功應用 *fmr-1ac* 40-mer 組探針之因。

本實驗以非放射性標誌法，成功的重複了1993年Hinds等人之實驗，同時再度經由此項實驗證明 *fmr-1* 基因的表現與胚胎之發育以及精子之生發過程有密切關係，在 *fmr-1A* 組實驗中我們發現其 mRNA 多表現於睪丸切片之周邊組織推測應為 sertoli cell 與未成熟之精原細胞；將其與 pcm 組睪丸切片做一比較可輕易發現其不同，pcm 組探針於睪丸幾乎無法偵測到 pcm mRNA 之表現，這是否表示睪丸組織不具 pcm mRNA？1994年 Mizobuchi 等人利用出生後不同天數之大白鼠抽取其睪丸之 mRNA 並測定其酵素活性，其數值為21天以下約1.93左右（其單位為 $\mu\text{mol of -CH}_3/\text{min}/\text{mg}$ ）而超過30天其數值便增加至5.42以上。（Mizobuchi et. al., 1994）但在本次實驗中，我們採用14、28、40週大 Balb-c 小白老鼠之睪丸切片進行雜交實驗，卻並未發現其有年齡之相關性且其表現強度亦甚弱，其分佈並未如 *mfmr-1A* 有明顯表現之區域。

究其可能因素其中大白鼠與小白鼠生長週期不同，以及切片處理後其 mRNA 之流失雖然可能為一影響因素，但此可能性於本實驗中應不成問題。另於1994年 Galus (Galus et. al., 1994) 等人的實驗中發現無法生育 (germ cell deficient) 之成鼠其睪丸中 PCMT (protein carboxyl methyltransferase) 的表現極少，這或許是另一為何本實驗結果與 Mizobuchi 等人實驗結果不同之可能因素。

在 *fmr-1* 與 pcm 組探針實驗結果中顯示 *mfmr-1* mRNA 在幼齡鼠之腦部及鼠胚中，有較強而廣泛之表現，顯示該基因之表現確與早期生命之發展有相關性；其於神經系統、泌尿生殖系統與肌肉骨骼系統等高度發分化活力之區域有高度表現，和其臨床症狀之表現具有正相關性。相信藉由此一簡易之 mRNA 偵測之表現可作為研究 FMR-1 蛋白質功能之依據，進而對此遺傳性疾病之致病機轉有更深

的瞭解。

邊緣系統 (Limbic System) 是由大腦半球及間腦 (Diencephalan) 的一些成分所構成，邊緣系統與比生存重要的情緒有關，加上與防衛、生殖相關的臟腑運動反應，以及一些有關記憶的程序，邊緣系統也曾被稱為內臟的腦 (Visceral brain)。因為它可以透過自主神經來影響內臟的功能，而本次實驗於 pcm 組探針之結果顯示此一與老化相關之修補性蛋白基因，其 mRNA 分佈區域，明顯集中於邊緣系統且其強度與年齡之增加有相關性，其於胚胎中之表現並不顯著。1994 年 Mizobuchi 等人由大白鼠腦部各部份抽取 mRNA，其結果顯示於海馬回、視丘、紋狀體、中腦、橋腦等與邊緣系統相關之區域有 pcm mRNA 之表現此一現象似乎說明:pcm 此一 L-isoaspartyl / D aspartyl methyltransferase 對於邊緣系統可能有其重要性。

本次實驗另三組探針為根據 1993 年 Ashley 等人發表之 fmr-1 cDNA 基因序列而來，Ashley 等人應用 RT-PCR 方法發現其中由於 exon 之 alternative splicing 之不同，形成十數種不同序列組合之 mRNA 而此十數種 mRNA 又可分為幾個類型。

以往未曾有直接設計寡核甘酸探針於組織切片上直接觀察特殊 Alternative splicing 產物，本實驗設計乃為擴大寡核甘酸探針於原位雜交之應用而設計了 C 75 等三個探針(見方法中探針製備)來偵測於 exon 15 處不同 acceptor site 之 splicing 產物。

結果發現該三組探針所測得之訊息於胚胎中表現並非廣泛性存在而是著重於肌肉骨骼系統、腦神經組織和泌尿生殖系統，與 fmr-1A 組具主要區域序列之探針於胚胎之表現不同。同時其表現訊號強度大於其它組探針表現，而於成鼠睪丸之表現多見於精細

胞 (spermatid) 之層次且其訊號表現形式與強度皆不同於 *fmr-1A* 組之表現；另此三組探針於成鼠腦部之表現區域與形式亦不同於 *fmr-1A* 組表現，集中表現於邊緣系統等與生命中樞相關區域而不似 *fmr-1A* 組之廣泛，同時與時間之相關性並不明顯。

此三組探針於組織之表現強度與其序列之互補性相關，一般多為 *fmr-1C75* > *fmr-1C39* > *fmr-1C0*。

由上述結果我們已知 *FMR-1A* 組表現為廣泛性而 *fmr-1C0* 組為專一性，顯示 *FMR-1* 基因具多形性表現，不同組織之發育有不同之 mRNA 作為引導，這可能可以作為何以 *fmr-1* 基因不能表現時會形成臨床上病人表現形態之多樣性的解釋之一。

於原位雜交術之施行中 *formamide* 主要與基因序列中氫鍵之形成有關，在本實驗中，我們運用改變單一藥物 *formamide* 的濃度，可使得不同 *TM* 值之探針於同一操作情況下進行雜交反應；僅改變 *formamide* 的濃度即可達到應用於不同組之探針，這使得本實驗之適應性及應用性增加。其它如雜交溫度、雜交後沖洗的嚴謹度、緩衝液所含鹽類濃度，對實驗的進行以及結果的呈現影響亦甚巨。

本次實驗中所用之探針其 G、C 所含比例各組皆不相同，將其換算為固定 *TM* 值：50 °C 後依此加入不同劑量之 *formamide* 但其餘之雜交溫度與緩衝液之鹽類濃度則不變其結果呈現相當穩定。

由於此項特性我們可以節省實驗所耗費之時間，同時由於操作程序之單純化使得實驗之干擾降低，結果的判定亦更具其可信性。

欲對基因之作用機轉有更多的認知，是期盼能因而對該項基因受損所致疾病有更多的治療方法可以被發現，更進一步去避免產生缺憾。期盼未來對此能有更多的訊息被發現。我們希望未來能在此一非放射原位雜交術之基礎上配合其它生物學技術，藉此能對本實驗中未竟之缺憾作一補足。

結語：

經一系列實驗比較後，總結下列幾項結論：

- 一：我們成功的重覆了 1993 Hinds 等人的實驗，再度證實 FMR-1 基因主要表現於神經系統以及泌尿生殖系統。
- 二：由 *fmr-1A* 含主要序列和 *fmr-1C75* 組針對 alternative splicing product 設計之探針雜交實驗中於睪丸切片中發現兩組表現不同，配合 1993 年 Ashley 等人的實驗結果推測不同的 *fmr-1m* RNA 顯然有其組織專一性。
- 三：簡易施行的方法且其結果於三組不同探針各有其特異性，顯示本非放射性原位雜交術具穩定性及適應性。
- 四：本實驗為 Ashley 等人 1993 年以 RT-PCR 法研究發現 *fmr-1* 有 alternative splicing product 作一組織學上的應證。
- 五：應用非放射性原位雜交術我們將 *pcm* gene 於組織上的表現形態與前人所作之 *pcm* mRNA 抽出實驗結果作一比對、映照。

第五章

參考資料

(REFERENCE)

1. Abitbol, M., Menini, C., Delezoid, A. L., Rhyner, T., Vekemans, M., & Mallet, J., (1993) Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major site of FMR-1 expression in the human fetal brain . *Nature Genetics* 4, 147- 153.
2. Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Kunst, C. B., Leiner, H. A., Eichler, E. E., Nelson, D. L., & Warren, S. T., (1993) Human and murine FMR-1 : alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nature Genetics* 4, 244- 251.
3. Auguzzi, A., Theuring, F., (1994) Improved in situ β - galactosidase staining for histological analysis of transgenic mice. *Histochemistry* 102, 477- 481.
4. Axelrod, J. and Daly, J., (1965) *Science* 150 : 892 - 893.
5. Barten, D. M., and O'Dea, R. F., (1990) The function of protein carboxylmethyltransferase In eucaryotic cells. *Life Science* 47, 181- 194.
6. Bachner, H., Manca, A., Steinbach, P., Walter, D., Just, W., Vogel, W., Hameister, H., Poustka, A., (1993) Enhanced expression of the murine FMR-1 gene during germ cell proliferation suggest a special function in both the male and female gonad. *Human Molecular Genetics* 2, 2043- 2050.
7. Bakker, C. E., Verheij, C., Willemsen, R., Heim , R. V. D., et al (1994) FMR-1 knock out mice: A model to study fragile X mental

- retardation . Cell 778, 23- 33.
8. Bakker, C. V. E. D. G. e., Willemsen, R., Willems, P., Meijer, N., Gaijaard, H., Reuser, A. J. J. Oostra, B. A., and Hoogeveen, A. T., (1995) Characterization of FMR-1 proteins isolated from different tissues . Human Molecular Genetics 4, 895- 901.
 9. Bell, M. V ., Hirst, M. C., Nakahori, Y., Mackinnon, R. N., Roche, A., Flint, T. J., Jacobs, P. A., et al (1991) Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expressiion of the fragile X syndrome. Cell 64, 861- 866.
 10. Brennan, T. V., Anderson, J. W., Jian, Z., Waygood, E. B., and Clark, S., (1994) Repair of spontaneously deaminated Hpr phosphocarrier protein catalyzed by the L- isoaspartate - (D- aspartate) O-methyltransferase . The Journal of Biological Chemistry 269, 24586- 24595.
 11. Clarke, S.,(1985) Protein carboxyl methyltransferase : two distinct classes of enzymes . Ann. Rev. Biochem. 54 , 479- 505.
 12. Coy, J. F., Sedlacek, Z., Bachner, D., Hameister,H., Joos, S., Lichter, O., Delius, H., and Poustka, A., (1995) Highly conserved 3'UTR and expression pattern of FXR-1 point to a divergent gene regulation of FXR-1 and FMR-1 . Human Molecular Genetics 4, 2209- 2218.
 13. Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J. P., & Mandel, J. L., (1993) The FMR-1 protein is cytoplasmic most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation . Nature Genetics 4, 335- 340.
 14. De Boulle, K., Verkerk, A. J. M. H., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickerx, J., Van Roy, B., Van Den Bos, F., de Graaft, E., Oostra, B. A., and Willems, P. J. (1993) A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation . Nature Genet. 3,

31- 35.

15. Dresen, J. C. F. M., Geraedts, J. P. M., Dumoulin, C. M., Johannes, L. H., Math, E., Pieters, H. E. C., (1995) Rs46 (Dxs548) genotyping of reproductive cells : approaching preimplantation testing of fragile X syndrome . *Human Genet* 96, 323-329.
16. Dyke, R.H., Chief illustratoe .(1968) The mouse its reproduction and development .
17. Eichler, E. E., Richards, S., Richard, A., Gibbs and Nelson , D. L., (1993) Fine structure of the human FMR-1 gene. *Human Molecular Genetics* 2, 1147- 1153.
18. El-Aleem, A. A., Bohm, I., El-Awady, S. T. M., Schmidtke, M. A. J., Stuhmann, M., (1995) Direct molecular analysis of the fragile X syndrome in a sample of egyptian and german patient using nonradioactive PCR and Southern blot floowed by chemiluminescent detection. *Hum Genet* 96, 577- 584.
19. Fu, Y. H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J., Richards, S., Verkerk, A. J. K. H., Holden, J. A., Fenwick, R. G., Warren, S. T., Oostra, B. A., Nelson, D. L. and Caskey, C. T., (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site result in genetic instability : resolution of the sherman paradox. *Cell* 13.
20. Galus, A., Lagous, A., Romanik, E. A., and O'Connor, C.M., (1994) Structure analysis of transcripts of the protein L-isoaspartyl methyltransferase reveals mutiple transcription iniciation sites and distict pattern of expression in mouse testis: indentification of 5'-flanking sequence with promotor activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 312, 524- 533.
21. Gedeon, A. K., Baker, E., Robinson, H., Partington, M. W., Gross, B., Manca, J. C. (1992). Fragile X syndrome without CGG

- amplification has an *FMR-1* deletion . *Nature Genet.* 1, 341- 344.
22. Grosveld, F., Robb, L. J., Rouillard, P., and Kaloustian, V. M. D., (1994) No mental retardation a man with 40 % abnormal methylation at the *FMR-1* locus and transmission of sperm cell mutation as premutation . *Human Molecular Genetics* 3, 927- 930.
23. Hanzlik, A. J., Osemlak- Hanzlik, M. M., Hauser, M. A., & Kurnit, D. M., (1993) A recombination- based assay demonstrates that the fragile X sequence is transcribed widely during development. *Nature Genetics* 3, 44- 47 .
24. Hagerman, R. J., Wilson, P., Staley, L. W., Lang, K. A., Fan, T., Uhlhorn, C., Smart, S. J., Hull, C., Drisko, J., Flom, K., and Taylor, A. K., (1994) Evaluation of school children at high risk for fragile X syndrome utilization buccal cell *FMR-1* testing . *American Journal of Molecular Genetics* 51, 471- 481.
25. Harvey, J., Judge, C., and Wiener, S. (1977) Family X - linked mental retardation with an X chromosome abnormality. *J. Med. Genet.* 14, 46- 50.
26. Hergersberg, M., Matsuo, K., Gassmann, M., Schaffner, W., Luscher, B., Rulicke, T., and Aguzzi, A., (1995) Tissue specific expression of a *FMR-1* / β galactosidase fusion gene in transgenic mice. *Human Molecular Genetics* 4, 359- 366.
27. Hinds, H. L., Ashley, C. T., Sutcliff, J. S., Nelson, D. L., Warren, S. T., Housman, D. E., & Schalling, M., (1993) Tissue specific expression of *FMR-1* provides evidence for a functional role in fragile X syndrome . *Nature Genetics* 3, 36- 43.
28. Humason, G. H., (1977) *Animal tissue techniques.*
29. Jenkins, E. C., Morys, I., Henderson, J., Genovese, M., Carter, M., Li, S. Y., George, E., Houck, J., Ding, X., Sandra, L., Houck, S., Dobkin,

- C. S., and Brown, W. T., (1994) Fragile X induction systems in CVS cultures: effect on cytogenetic, PCR, and genomic southern blot DNA analysis of the FMR-1 gene. *American Journal of Medical Genetics* 51, 436- 442.
30. Johnson, B. A., Ngo, S. Q., and Aswad, D. W., (1991) Widespread phylogenetic distribution of a protein methyltransferase that modifies L-isoaspartyl residues. *Biochem. Int.* 24 , 841 - 847.
31. Khandijan, E. W., Fortin, A., Thibodeau, A., Tremblay, S., Devys, F. C. D., Mandel, J. L., and Rousseau, F., (1995) A heterogeneous set of FMR-1 protein is widely distributed in mouse tissues and in modulated cell culture. *Human Molecular Genetics* 4, 738- 789.
32. Kluver, H., and Barrera, E., (1953) A method for the combined staining cells and fibers in the nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 12 , 400- 403.
33. Tuffery editor (1995) *Laboratory Animals : an introduction for new experimenters . tabel 4.1 Data on reproduction for common laboratory animals.* *Biological Sciences, North East Surrey College of Technology,* page 133.
34. Lachiewicz, A. M., and Spiridigliozzi, G. A., Gullion, C. M., Ransford, S. M., Rap, K., (1994) Aberrant behavior of young boys with fragile X syndrome. *American Journal on Mental Retardation* 98, 567- 579.
35. Lachiewicz, A. M., MD and Dawson, D. V., (1994) Do young boys with fragile X syndrome have macrochidism . *Pediatrics* 93, 992- 995.
36. Li, C., and Clarke, S. (1992) Distribution of an L-isoaspartyl protein methyltransferase in eubacteria. *Journal of Bacteriology* , 174, 355- 361.

37. Lubs, H. A. (1969) A marker X chromocome. *Am. J. Hum. Genet.* 21, 231- 244.
38. Maclaren, D. C., O'Connor, C. M., Xia, Y.R., Mehrabian, M., Klisak, I., Sparkers, R. S., Clarke, S., Luisis, A. J., (1992) The L-isoaspartyl / D- aspartyl protein methyltransferase gene (PCMT1) maps to human chromosome 6 q 22.3- 6 q 24 and the syntenic region of mouse chromosome 10. *Genomics* 14, 852-856.
39. Maes, B., Fryns, J. P., Walleghe, M. V., and Berghe, H. V. D., (1994) Cognitive functioning and information processing of adult mentally retarded men with fragile X syndrome . *American Journal of Medical Genetics* 50, 190- 200.
40. Martin, J. P., Bell, J., (1943) A pedigree of mental defect showing out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16 :1215 .
41. Miley, S. Y. J., Loesch, D., Turmner, G., Donnelly, A., Geodon, A., Kremer, D. H. E., Lynch, M., Pritchard, M., Sutherland, G. R., and Richard, R. I., (1992) Fragile X syndrome : unique genetics of the heritable unstable element . *Am. J. Hum. Genet* 50, 968- 980.
42. Mizobuchi, M., Murao, K., Takeda, R., and Kakimoto, Y., (1994) Tissue specific expression of isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase in wheat . *The Journal of Neurochemistry* 62, 322- 328.
43. Mizobuchi, M., Murao, K., Takeda, R. and Kakimoto, Y., (1994) Tissue specific expression of isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase gene in rat brain and testis. *Journal of Biological Chemistry* 269, 25605- 25612.
44. Sambrook, . Fritsch, . Maniatis., (1989) *Molecular Cloning : A laboratory manual second edition* . Cold Spring Harbor Laboratory

press.

45. Mudguet, M. B. and Slarke, S., (1993) Characterization of plant L-isoaspartyl methyltransferase that may be involved in seed survival : purification, cloning, and sequence analysis of the wheat germ enzyme . *Biochemistry* 32, 11100- 11111.
46. Mudguet, M. B. and Clarke, S., (1994) Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat . *The Journal of Neurochemistry* 62, 322- 328.
47. Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M. F., and Mandel, J. -L. (1991) . Instability of a 550 -base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome . *Science* 252, 1097- 1102.
48. O'Connor, C. M., and Clarke, S. (1985) . Analysis of erythrocyte protein methyl esters by two- dimensional gel electrophoresis under acidic separating conditions. *Anal. Biochem.* 148, 79- 86.
49. Pieretti, M., Zhang, F., Fu, Y.-H., Warren, S. T., Oostra, B. A., Caskey, C. T., and Nelson, D. L. (1991) . Absence of expression of the *FMR-1* gene in fragile X syndrome. *Cell* 66, 817-822.
50. Puissant, H., Malinge, M. C., Largetpiet, A., Martin, D., Chauveau, P., Odent, S., Plessis, G., Lemarec, P. P. B., and Larget- piet, L., (1993) Molecular analysis of 53 fragile X families with the probe StB 12.3 . *American Journal of Medical Genetics* 53, 370- 373.
51. Reyniers, E., Vits, L., Boulle, K. D., Roy, B. V., Velzen, D. V., Graaff, E. D., Verkerk, N. J. M. H., Jorens, H. Z. J. J., Darby, J. K., Oostra, B., & Willems, P. J., (1993) The full mutation in the *FMR-1* gene of male fragile X patients is absent in their sperm . *Nature Genetics* 4, 143- 146.

52. Rousseau, F., Heitz, D., Tarleton, J. M., Malmgren, H., Dahl, N., Bartnicoat, A., et al., (1994) A multicenter study on genotype - phenotype correlations in with fragile X syndrome , using direct diagnosis with probe StB 12.3 L: the first 2, 253 cases. *Am. J. Hum. Genet* 55, 225- 237.
53. Romanik, E.A., Ladino, C. A., Killoy, L. C., D'aredenne, S. C. and O'conor, C. M., (1992) Genomic organization and tissue expression of the murine gene encoding the protein β -aspartate methyltransferase. *Gene* 118, 217- 222.
54. Schalling, M., Hudson, T. J., Buetow, K. H., & Housman, D. E., (1993) Direct detection of novel expanded trinucleotide repeats in the human genome . *Nature Genetics* 4, 135- 139.
55. Sherman S. L., Jacobs, P. A., Morton, N. E., Froster- Iskenius, U., Howard-Peedles, P. N., Nilsen, K. B., Partinton, N. w., Sutherland, G. R., Turner, G., Watson, M. , (1985) Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Human Genetics* 69, 3289- 3299.
56. Siomi, H., Mikikio, C., Robert, S., Nussbaum, L., and Dreyfuss, G., (1993) The protein product of the fragile X gene, FMR-1 has characteristics of an RNA- binding protein. *Cell* 74, 291- 298.
57. Siomiu, H., Chioi, M., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L., and Dreyfuss, G., (1994) Essential role for KH domains in RNA binding : impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR-1 that causes fragile X syndrome . *Cell* 77, 33- 39.
58. Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Zhang, F., Pieretti, M., Caskey, C. T., Saxe, D., and Warren, S. T. (1992). DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome . *Hum, Mol. Genet.* 1, 397- 400.

59. Tazi, J., Bird, A., (1990) Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 60, 909- 920.
60. Verkerk, A. J. M. H., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., et al., (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65, 905- 914.
61. Verkerk, A. J. M. H., Boule, E. D. G. K. D., Eichler, E. E., Sconceki, D., Reyniers, E., Manca, A., Poustka, A., Willems, P. P. J., Nelson, D. L., and Oostra, B. A., (1993) Alternative splicing in the fragile X gene FMR-1. *Human Molecular Genetics* 2, 399- 404.
62. Verheij, C., Bakker, C. E., Graan, E. D., Keulemans, J., Willemsen, R., Verkerk, A. J. M. H., Gaijaard, H., Reuser, A. J. J., Hoogeveen, A. T., & Oostra, B. A., (1993) Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* 363, 722- 724.
63. Wohrle, D., Vogel, I. H. W., & Steinbach, P., (1993) Mitotic stability of the fragile X mutations in differentiated cells indicates early post- conceptional trinucleotide repeat expansion. *Nature Genetics* 4, 140- 142.
64. Zhong, N., Dobkin, C. & Brown, W. T., (1993) A complex mutable polymorphism located within the fragile X gene. *Nature Genetics* 5, 248- 253.
65. Zhang, Y., O'conor, J. P., Siomi, M. C., Srinivasan, S., Dutra, A., Nussbaum, R. L., and Dreyfuss, G., (1996) The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *The EMBO Journal* 14, 5358- 5366.
66. 陳志鴻編譯 (1992) 神經系統解剖學, 第三版. 合記出版社.

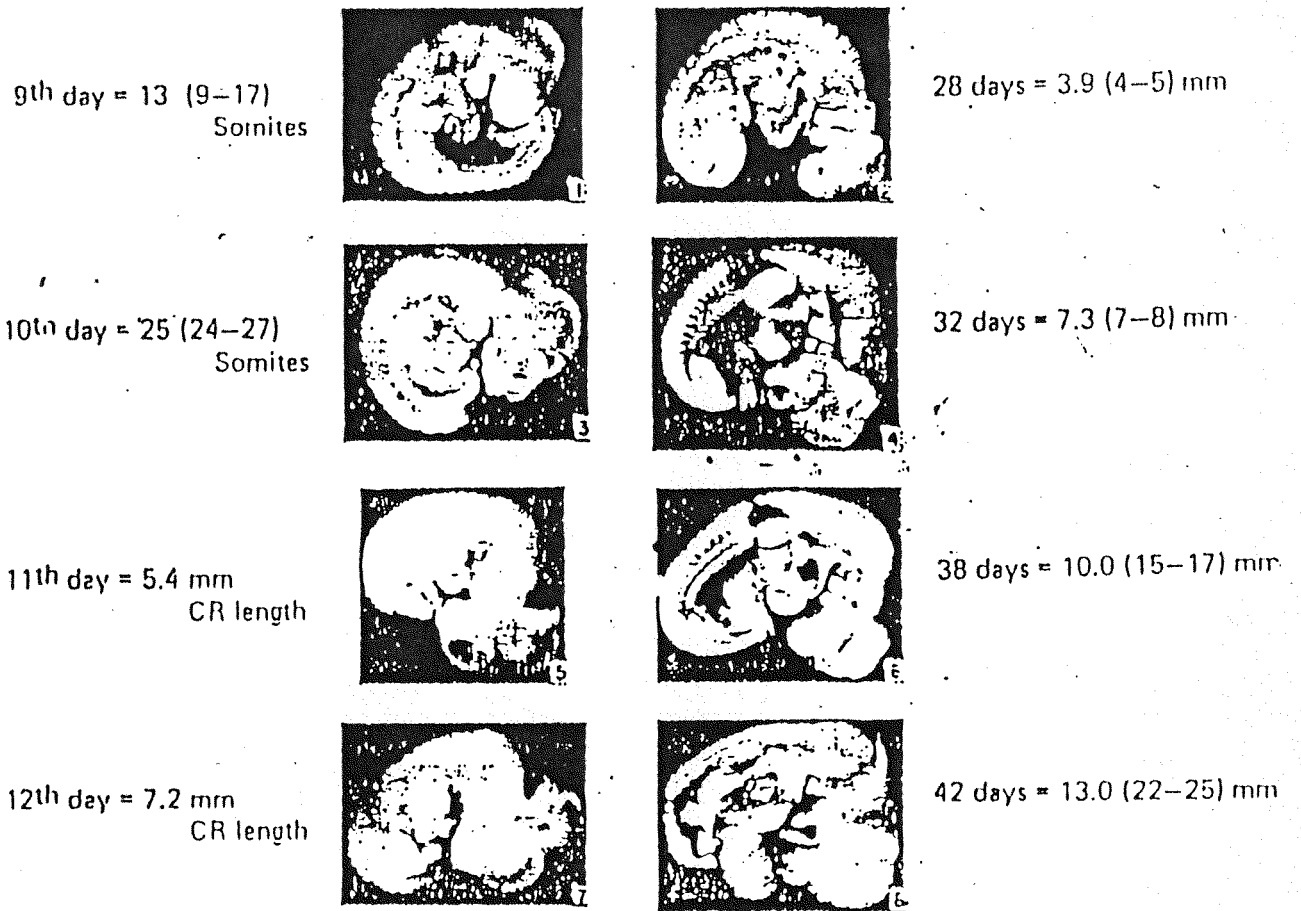
67. 丁鴻志 (1993) 對老鼠二個細胞胚胎施以顯微輔助孵化操作技術與否對胚胎發育及孵化影響之比較。(中山醫學院醫學研究所碩士論文)
68. 謝淑卿 (1995) 易脆染色體症候群患者家族成員之分子生物學與細胞遺傳學研究。(中山醫學院醫學研究所碩士論文)
69. 李權益 (1996) 老年癡呆症的根源。(科學月刊第二十七卷第一期第 51-53 頁)

附錄

圖片與圖表來源標示於句末，詳見參考資料。

圖一：老鼠胚胎與人類胚之比較。

(Alden, C., "Labopratory Atlas of mouse Embryo" and carnegie institute of washington)



COMPARISON OF MOUSE AND HUMAN EMBRYOS
(Courtesy Alden "Laboratory Atlas of the Mouse Embryo" and
Carnegie Institute of Washington)

圖二: 蛋白甲基轉移酶於真核類生物中之修補假說:

本圖摘自: Barten et al., 1990; Life Science 47, page 190.

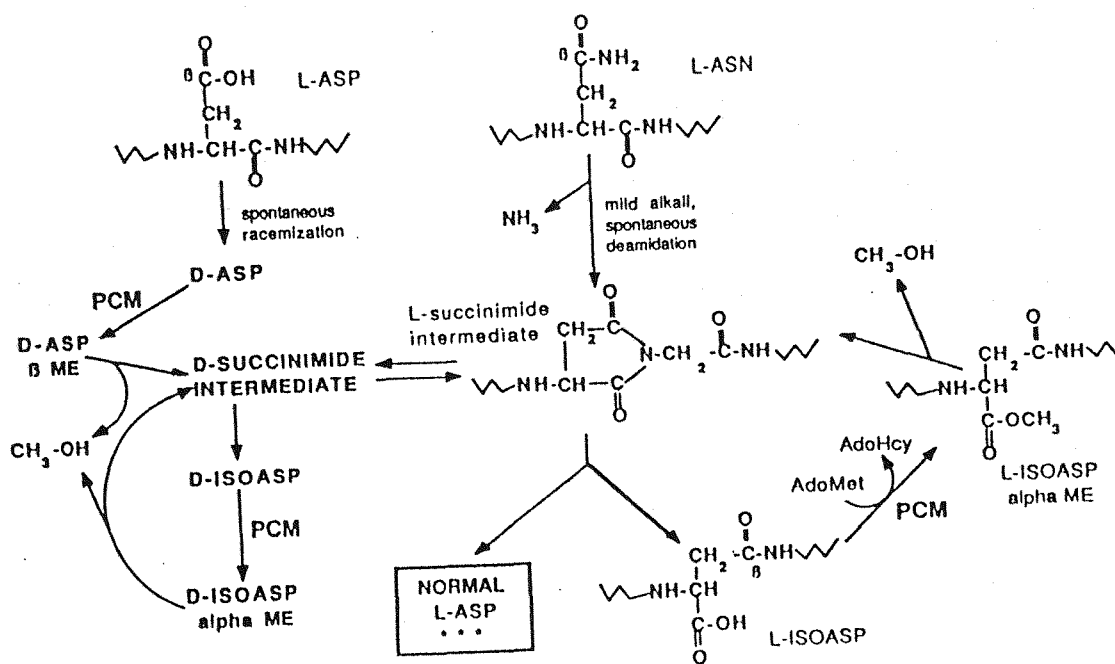
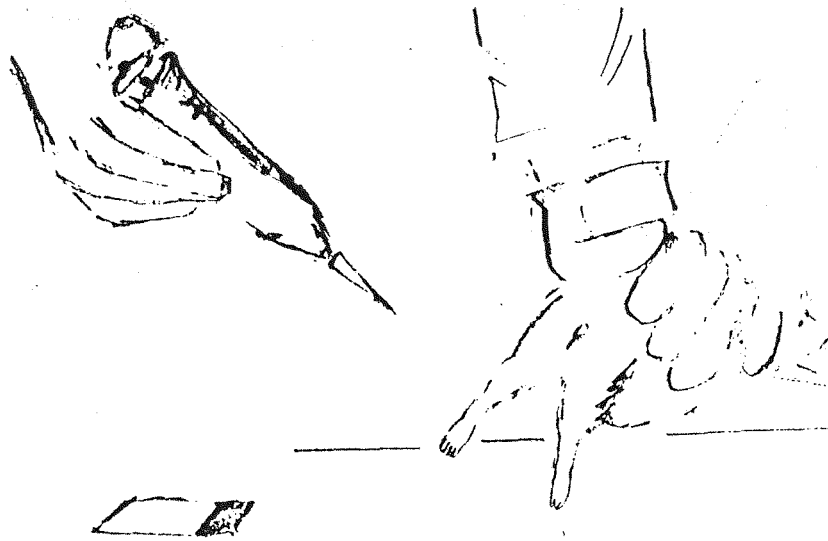


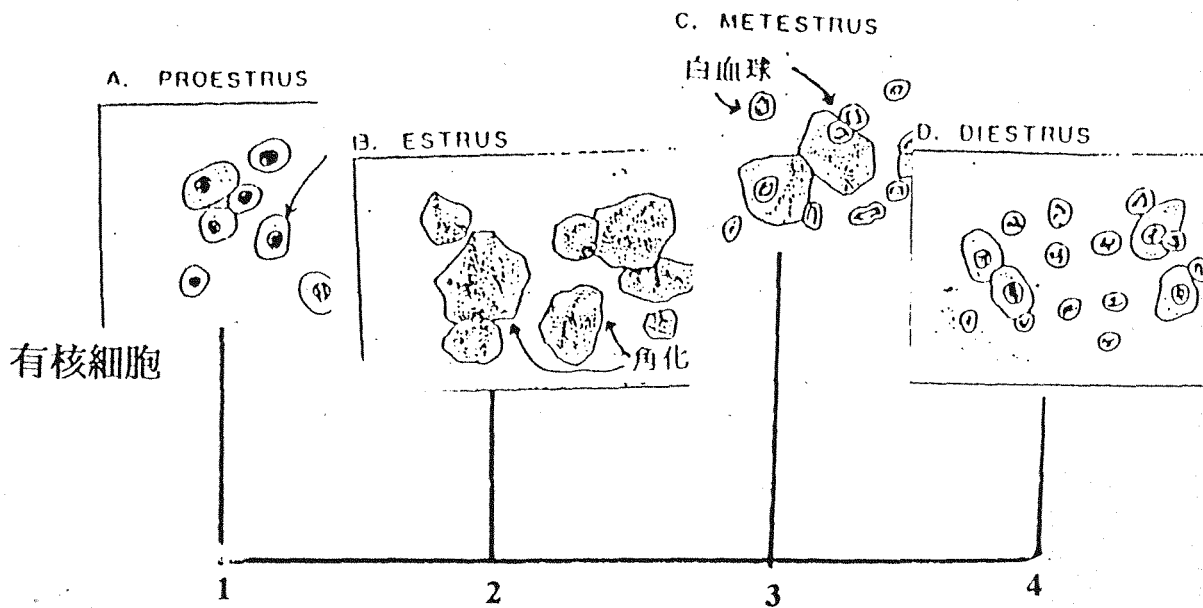
Fig. 2

The Aspartate Repair Hypothesis for PCM

圖三 a：陰道抹片製作前取陰道抹片法。



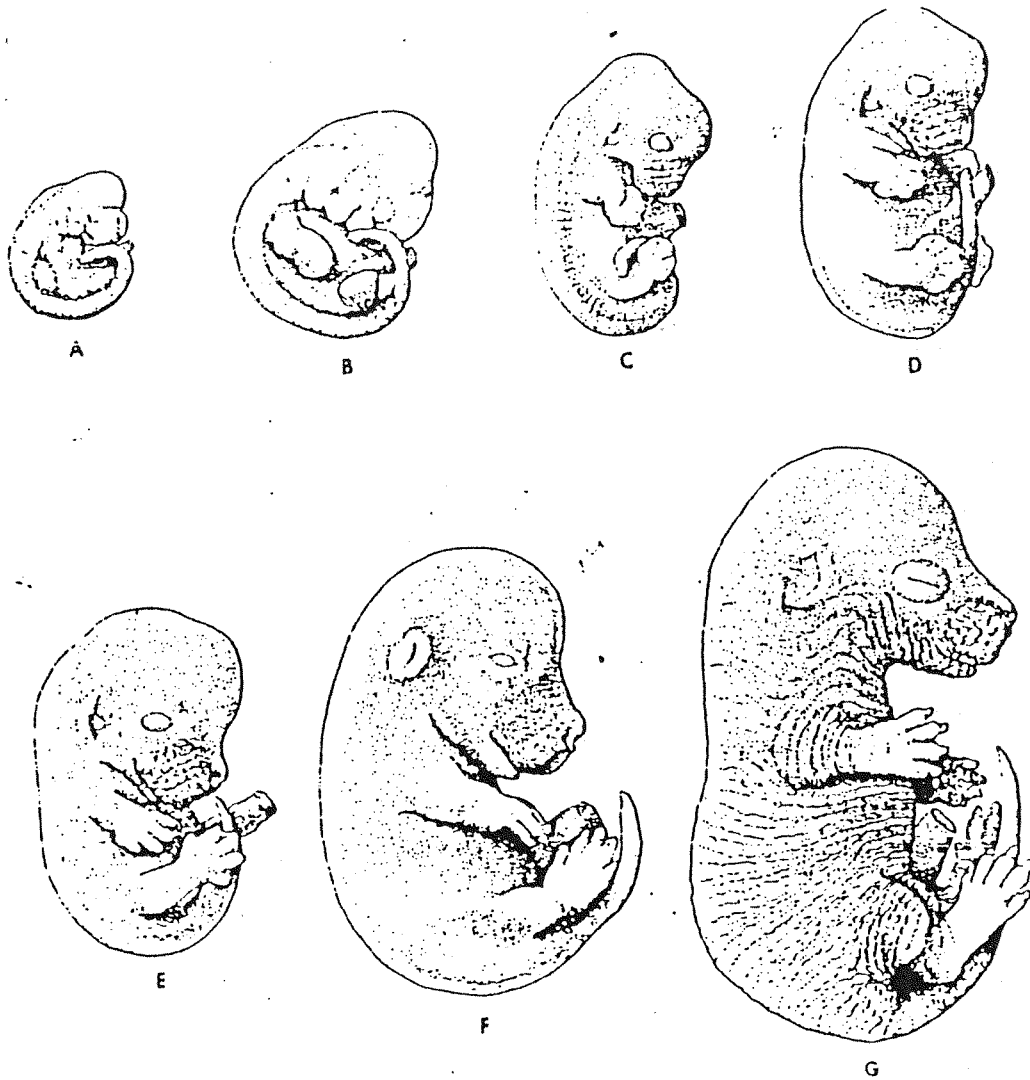
圖三 b：雌鼠陰道細胞隨動情週期而發生變化。
動情週期以 4-5 天為一週期



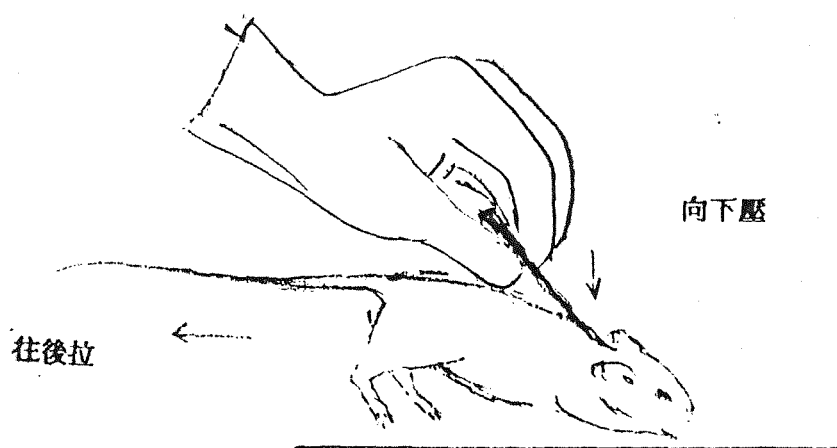
分別以 角化上皮細胞 白血球 巨噬細胞為主

圖四：老鼠胚胎自 10.5 天至 16.5 天之發育序列圖示。

(本圖摘自 Dyke, R. h. v., 1969; the mouse its reproduction and development)



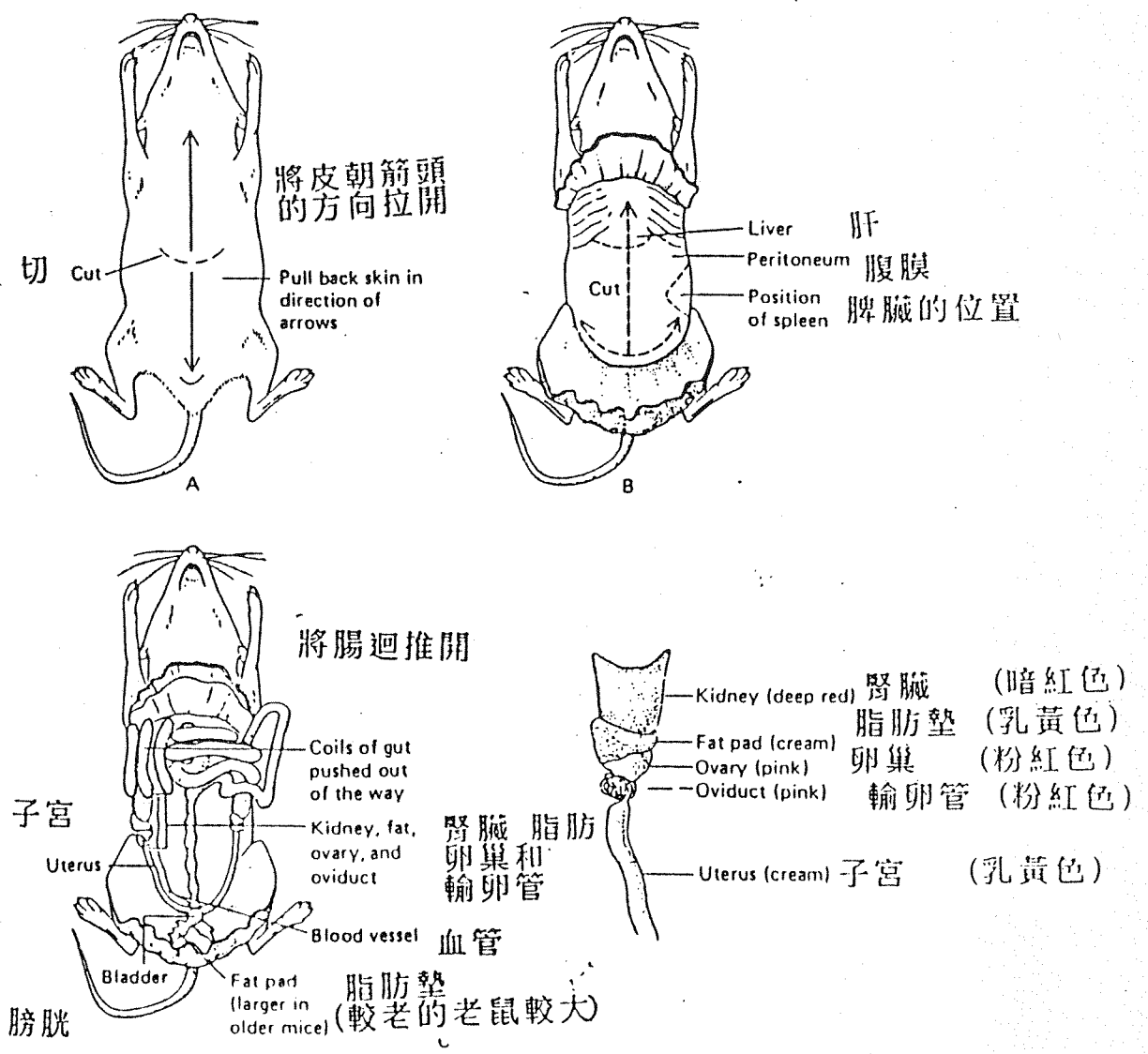
圖五：以快速人道的頸椎脫臼處理老鼠。



圖六：母鼠生殖器官解剖圖示。

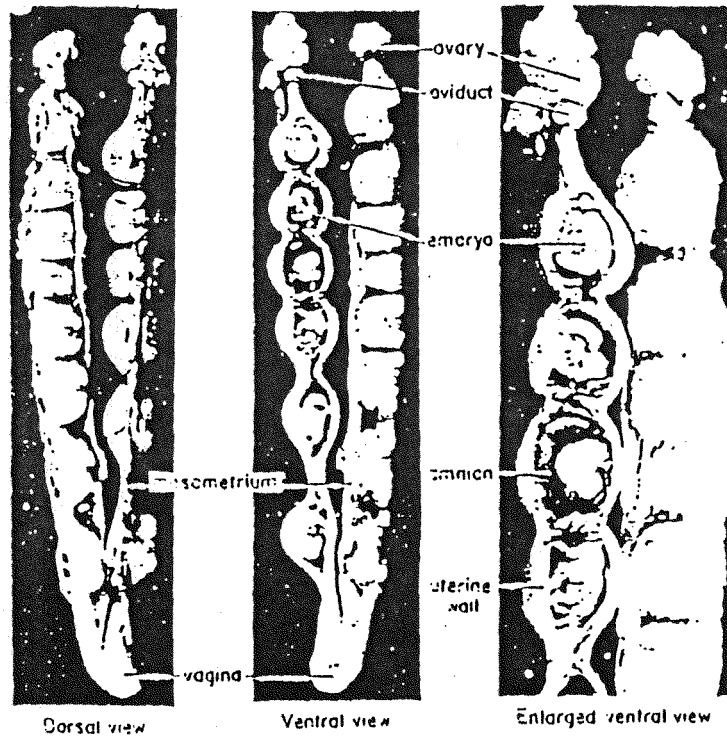
- A. 虛線表示切開皮膚位置，實線表示拉開皮膚方向。
- B. 虛線箭頭表示腹膜拉開方向。
- C. 將腸道推開以露出體腔底部的生殖器官。

(本圖摘自 丁鴻志,1993;對老鼠二個胚胎施以顯微輔助孵化操作技術與否對胚胎發育及孵化影響之比較, 中山醫學院碩士論文 p: 36)



圖七: 10.5 天之子宮剖面圖示。

(本圖摘自 Dyke, R. H. V., 1969; the mouse its reproduction and development)



圖八：DIG 標示系統圖解。

(本圖摘自 Boehringer Mannheim 公司 1996 出版之 *in situ hybridization* 操作手冊)

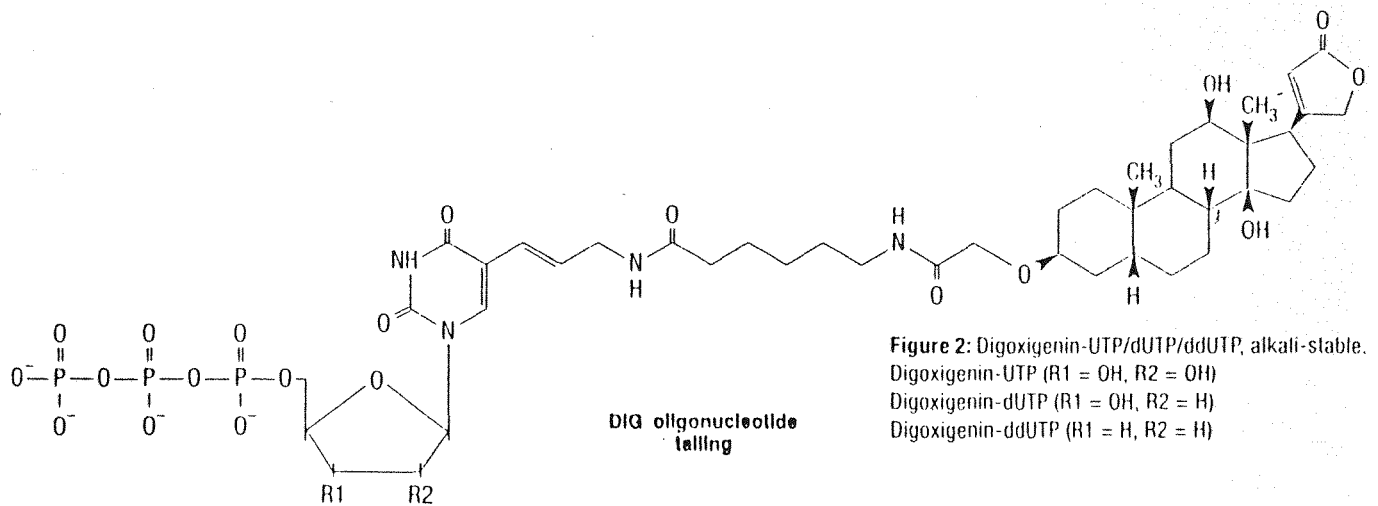
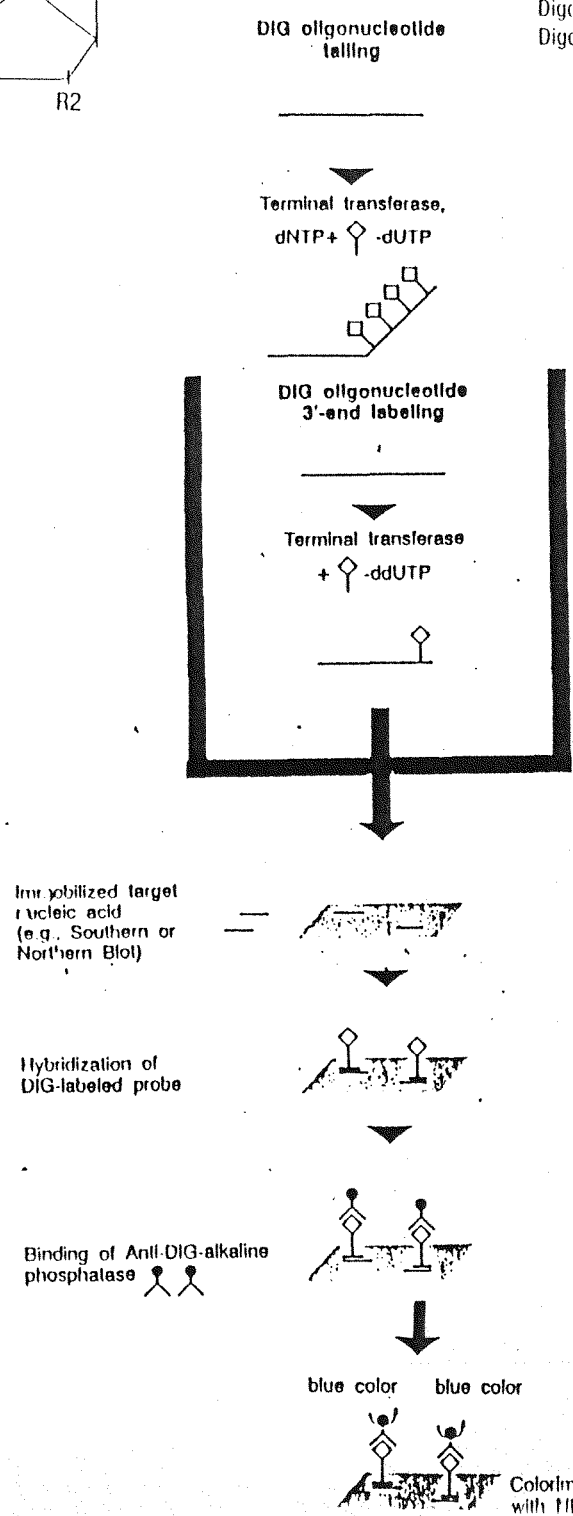


Figure 2: Digoxigenin-UTP/dUTP/ddUTP, alkali-stable.
 Digoxigenin-UTP (R1 = OH, R2 = OH)
 Digoxigenin-dUTP (R1 = OH, R2 = H)
 Digoxigenin-ddUTP (R1 = H, R2 = H)



Immobilized target nucleic acid (e.g., Southern or Northern Blot)

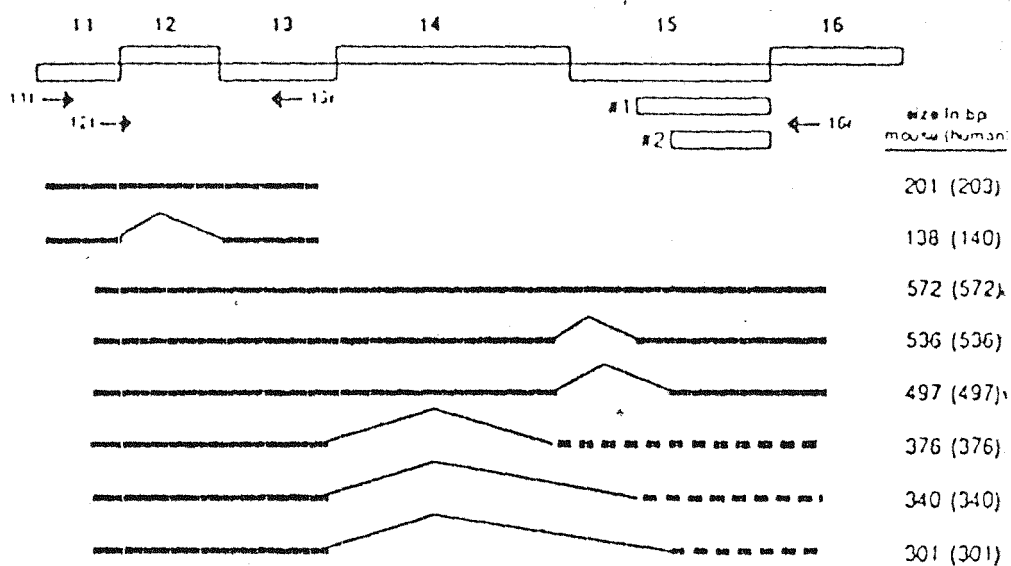
Hybridization of DIG-labeled probe

Binding of Anti-DIG-alkaline phosphatase

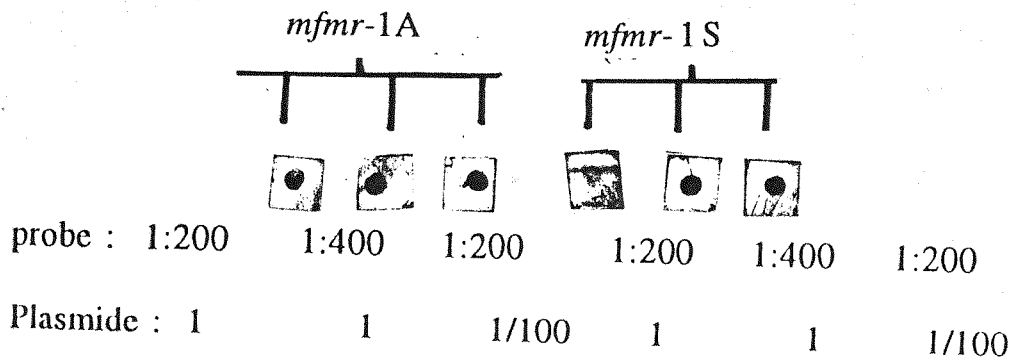
blue color blue color

Colorimetric detection with NBT and 5'-Phosphate

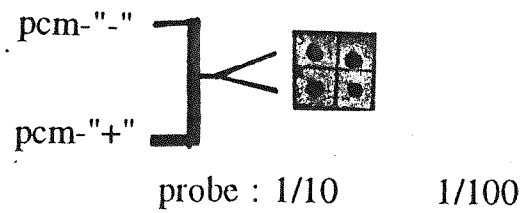
圖九 b: 1993 年 Ashley 等人以 RT-PCR 方法研究發展之
 FMR-1 alternative splicing product 圖示。
 (本圖摘自 Ashley 等人 1993; Nature Genetics V:4, p:248)



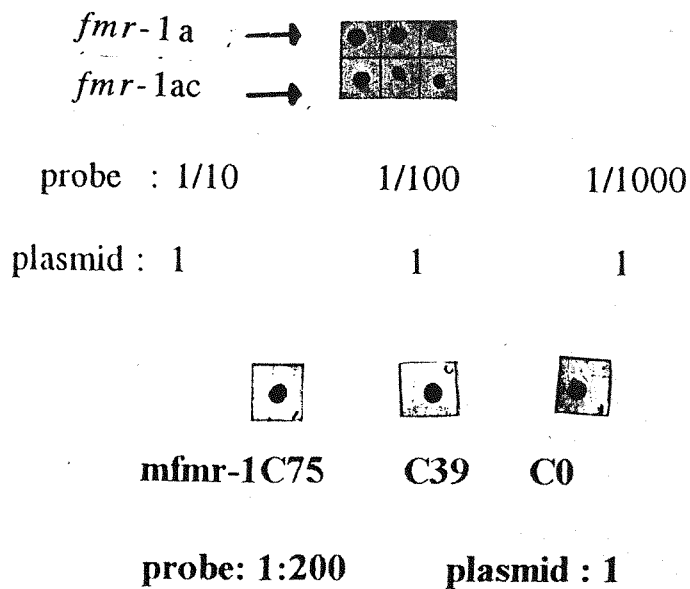
圖十：探針標誌 (Dot Blot) 檢測結果顯示。



* Fix the plasmide (MC2.17) on the membrane .

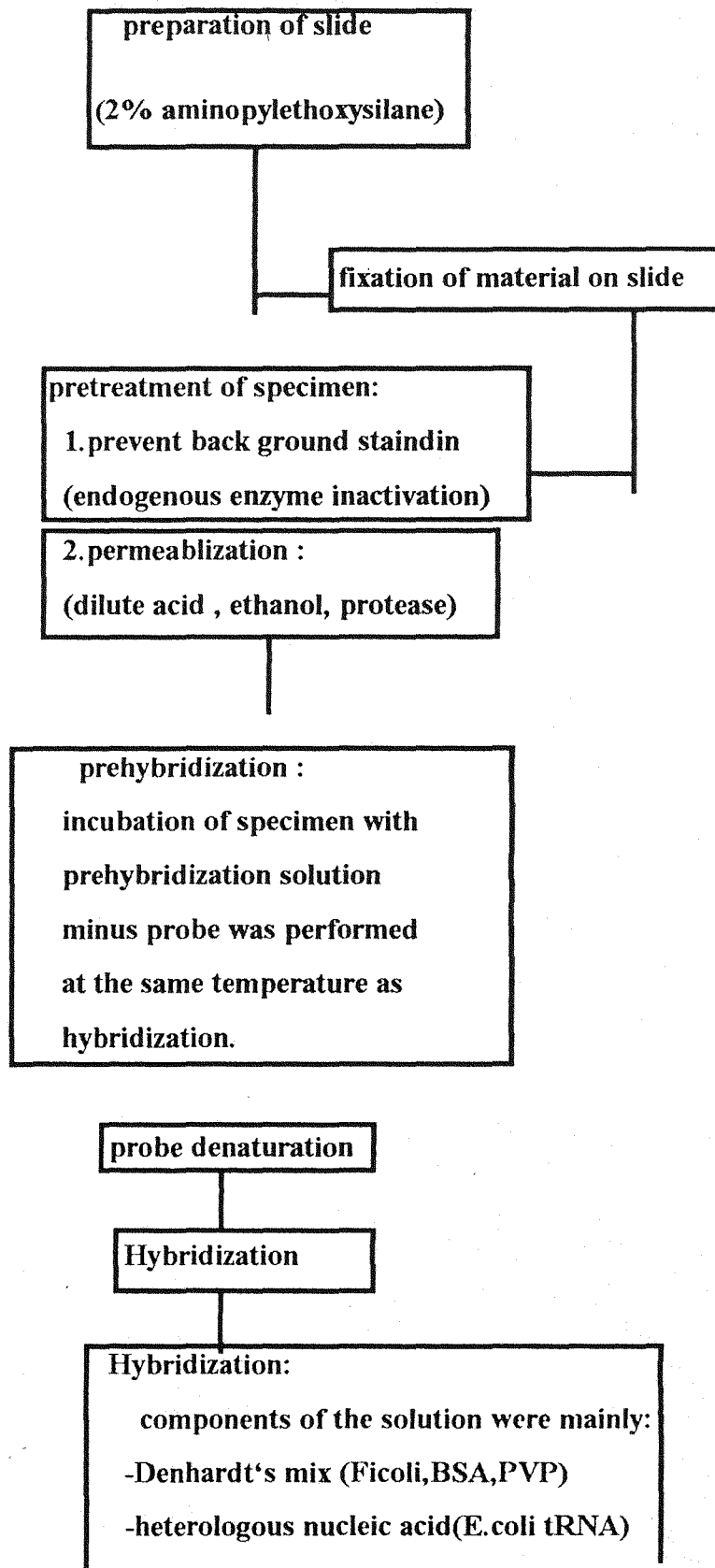


* Direct fix the probe on the membrane for Dot Blot .



* Fix the plasmide (MC2.17) on the membrane .

圖十一：原位雜交術實驗流程：



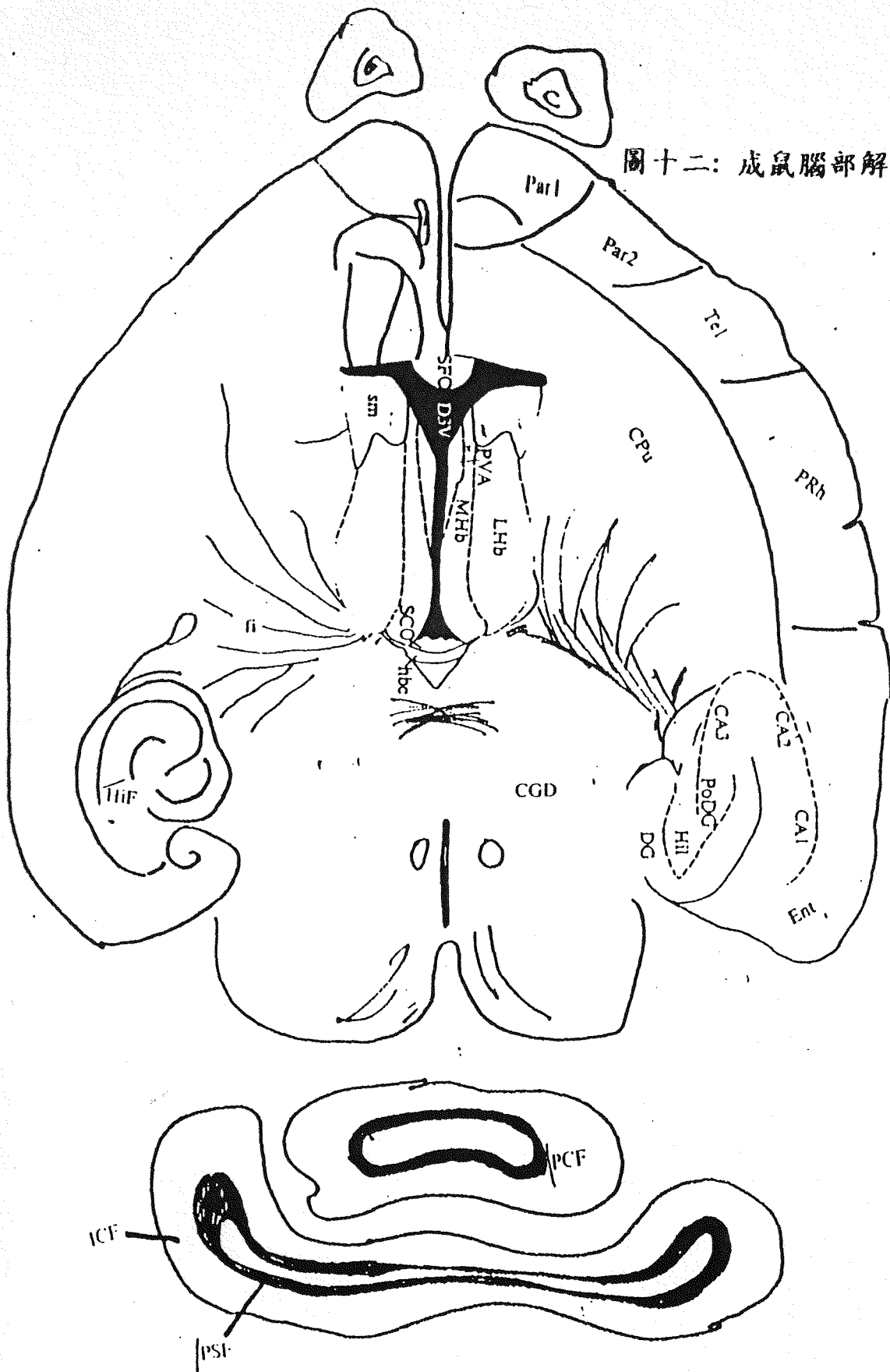
-sodium-phosphate ,EDTA,SDS,salt
-foremamide.
-dextran sulfate.

post-hybridization step:
-striengency washes

immunological detection:
-blocking step.

-antibody incubation.
-colorimetric substract.
-counter staining .
-mounting.

圖十二：成鼠腦部解剖橫切面圖示。



BSTs : bed nu stria ter supracapsular div

CA1-3 : fields Ca1-3 of Ammon's horn

CP u : caudate putamen

D3 V : dorsal third ventricle

fl : fimbria hippocampus

CGD : central gray, dorsal

hbc : habenular commissure

HIF : hippocampal fissure

Hll : hilus dentate gyrus

ic : internal fissure

ICF : Intercrural fissure

Mhb : medial habenular

Par 1 : parietal cortex, area 1

Par 2 : Parietal cortex, area 2

PaS : Parasubiculum

PCF : Perculminate fissure

Prh : Perirhinal cortex

PoDG : polymorph layer dentate gyrus

PVA : Paraventricular thal nu, anterior

Rt : reticular thal nu

S : subiculum

SCO : subcommissural organ