

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫名稱：藉由內耳專一表現啟動子建立基因轉殖斑馬魚動物模式探討 CX26 聽障基因突變的致病機制 *
* ***** *

執行計畫學生：蘇炫安
學生計畫編號：MOST 104-2815-C-040-020-B
研究期間：104 年 07 月 01 日至 105 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授：楊建洲

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 105 年 03 月 24 日

摘要

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，可利用分子生物技術將特定基因進行突變或建立基因轉殖魚，以研究基因與發育和疾病之間的相關機制。我們實驗室主要著重於非症候群聽障的研究，從聽障患者中已發現數個 *connexin* (*CX26* 及 *CX30* 等) 基因有突變的產生，但目前 *CX26* 基因突變在人類聽障機制中，大都利用細胞模式進行相關研究，為更進一步釐清 *CX26* 突變致病機制，在本研究計畫中我們將利用斑馬魚作為模式動物來建立基因轉殖斑馬魚。藉由專一表現於內耳的啟動子來表現我們的目標基因，並利用顯微注射技術、全胚胎免疫組織化學染色及模式動物行為分析等方法來進行相關的研究。同時我們先前的研究已經證明斑馬魚的 *cx30.3* 基因與人類的 *CX26* 基因具高度同源性，因此本研究我們將利用斑馬魚 *cx30.3* 基因為目標基因來進行相關研究。

於本計畫終止時，我們已經建立了數種基因轉殖魚品系，即 Tg(*agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP*)、Tg(*agr2-96ecto:cx30.3 R186K-EGFP*)與 Tg(*agr2-96ecto:cx30.3 R186Q-EGFP*)等，其餘仍有三種轉殖魚品系正在建立中。這些基因轉殖魚乃是以專一表現於內耳支持細胞的啟動子來促進帶有 *EGFP* 的 *cx30.3* 基因表現在斑馬魚體內，其中 *cx30.3* 基因包含有野生型、*cx30.3 R186K* 突變型及 *cx30.3 R186Q* 突變型三種。我們利用全胚胎免疫組織化學染色確認其基因表現位置後，便將轉殖基因斑馬魚與野生型斑馬魚(AB strain)進行模式動物行為分析並比較之。我們預期帶有突變 *cx30.3* 基因的轉殖斑馬魚在與野生型斑馬魚比較下會在行為上有顯著的差異，藉此以動物活體實驗佐證我們實驗室先前在細胞實驗中針對 *CX26* 基因造成可能的聽障機轉的發現。計畫期間有限，而醫學研究無涯；我們將會繼續研究本計畫未結之處，並期許未來能夠確立 *CX26* 基因所扮演的角色，進一步對臨床聽障議題所有助益。

前言

先前，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]。本實驗室希望能夠深入探討 *connexin* 基因在斑馬魚內耳表現的機轉，因此需要建立基因轉殖斑馬魚之動物模式。在我們先前的研究中已知，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]，我們感謝中央研究院黃聲蘋教授提供我們含該啟動子(promoter)的質體，以利進行接續的研究進展，分別是 Tol2-exo200-*agr2*-96ecto-EGFP、Tol2-exo200-*agr2*-177ecto-EGFP 以及 Tol2-3416-*agr2*-EGFP。其中，3416 代表著起始於 *agr2* 基因-3416 處之啟動子全長 2.6kb；*exo200* 代表 *agr2* 基因前啟動子之 200bp 活性區域；96ecto 與 177ecto 則代表 otic vesicle specific element DNA，使基因能夠更專一地表現在耳囊組織。

在本實驗室先前的細胞研究中發現了來自聽障患者數種突變的 *cx30.3* 基因，本研究選取其中兩種突變型來建立突變的斑馬魚動物模式，分別是表現在細胞膜上的單點突變 *cx30.3 R186K* 以及在內質網上表現的雙點突變 *cx30.3 R186Q*。在本次實驗中，我們已透過 Cloning 方式合成出 Tol2-exo200-*agr2*-96ecto-*cx30.3 WT*-EGFP、Tol2-exo200-*agr2*-96ecto-*cx30.3 R186K*-EGFP、Tol2-exo200-*agr2*-96ecto-*cx30.3 R186Q*-EGFP、Tol2-exo200-*agr2*-177ecto-*cx30.3 WT*-EGFP、Tol2-exo200-*agr2*-177ecto-*cx30.3 R186K*-EGFP、Tol2-exo200-*agr2*-177ecto-*cx30.3 R186Q*-EGFP 等六種基因重組質體。我們將此六種載體以顯微注射技術注入斑馬魚胚胎中，建立此六種基因型的轉殖斑馬魚，分別是 Tg(*agr2*-96ecto:*cx30.3 WT*-EGFP)、Tg(*agr2*-96ecto:*cx30.3 R186K*-EGFP)、Tg(*agr2*-96ecto:*cx30.3 R186Q*-EGFP)、Tg(*agr2*-177ecto:*cx30.3 WT*-EGFP)、Tg(*agr2*-177ecto:*cx30.3 R186K*-EGFP)與 Tg(*agr2*-177ecto:*cx30.3 R186Q*-EGFP)。然而，建立斑馬魚轉殖品系不是一件容易的事情。胚胎在經過顯微注射後，我們在其 4 天大時以螢光顯微鏡觀察，挑選出有表現螢光的個體並飼養之，此時標記其為 F0。F0 的螢光表現可能是暫時性的，轉殖基因未必

會成功嵌入斑馬魚染色體中。此外，當轉殖基因的大小愈大時，也愈不容易嵌入染色體中造成穩定表現。俟轉殖斑馬魚 F0 六個月大後，始適合與 AB strain 野生型斑馬魚(aa)進行試交，產下 F1 子代。我們一樣在 F1 胚胎第 4 天大時以螢光顯微鏡觀察，若在內耳處有正確的螢光表現情形則挑選並飼養之；反之，若在內耳處無螢光表現則淘汰其親代 F0 基因轉殖魚。經過淘汰了 42 隻 F0 轉殖斑馬魚，我們非常遺憾目前僅確認成功建立 Tg(agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP)、Tg(agr2-96ecto:cx30.3 R186K-EGFP)、Tg(agr2-96ecto:cx30.3 R186Q-EGFP)的轉殖斑馬魚品系，其餘轉殖品系仍持續篩選中。

研究目的

本研究的目的是希望建立利用 *agr2* 啟動子於內耳中表現正常的 *cx30.3 WT* 基因之轉殖斑馬魚系統，再建立利用 *agr2* 啟動子於內耳中表現突變的 *cx30.3 R186K* 與 *cx30.3 R186Q* 基因之轉殖斑馬魚系統，觀察並比較其螢光位置表現情形與行為模式差異，進一步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. 利用斑馬魚 Tol2 基因轉殖系統與顯微注射技術，建立 Tg(agr2:cx30.3 WT-EGFP)轉殖基因魚，以螢光顯微鏡與全胚胎免疫組織化學染色方法觀察其正常的 *cx30.3* 螢光蛋白是否表現在內耳的支持細胞中。
2. 建立突變的 Tg(agr2:cx30.3 R186K-EGFP)與 Tg(agr2:cx30.3 R186Q-EGFP)基因轉殖魚，觀察並比較其與正常的 Tg(agr2:cx30.3 WT-EGFP)基因轉殖魚之表現差異。

文獻探討

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、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，且在藥物篩檢上也扮演重要角色[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 *CX26* 基因的數個突變點

【Table 1】，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 HeLa 細胞實驗發現，突變的斑馬魚 connexin 蛋白表現在細胞膜上，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。

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，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

1. 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)，自 pLEGFP-cx30.3 質體擴增出 *cx30.3* 的 DNA 片段。反應總體積為 50 μ l，含有 4 μ l 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 2】、2.5 μ l reverse primer【Table 2】、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 62°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。

2. 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 700 μ l 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 35 μ l 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。

3. 限制酶作用(Restriction Enzyme Digestion)

以特定的酵素針對對應的酵素作用序列，將載體(Vector)與插入子(Insert)切割出相同的連接端點。載體部份，反應總體積為 48.5 μ l，含有 DNA 3 μ l(3000ng)、10x No. 3 Buffer 5 μ l、100x BSA 0.5 μ l、限制酶 *EcoRI* 1.5 μ l 以及 d₂H₂O 38.5 μ l；插入子部分，反應總體積為 50 μ l，含有 DNA 10 μ l(3000ng)、10x No. 3 Buffer 5 μ l、100x BSA 0.5 μ l、限制酶 *EcoRI* 1.5 μ l 以及 d₂H₂O 31.5 μ l。反應溶液配置完成後，置於 37°C 下反應 1.5 個小時，再各別加入

限制酶 *Bam*HI 1.5 μ l 於 37°C 下反應 2 小時。

4. 黏合作用(Ligation)

目的為使載體與插入子於相同限制點處結合，總反應體積為 10 μ l，取載體 DNA 2 μ l(依濃度調整)、插入子 DNA 5 μ l(依濃度調整)、10x T4 DNA Ligase Buffer 1 μ l、T4 DNA Ligase 1 μ l、d₂H₂O 1 μ l，配置完成後，置於 16°C 下反應 12 個小時以上。

5. 基因轉殖(Transformation)

先將 competent cell 從 -80°C 冰箱取出，置於冰上溶解。將 10 μ l 的 ligation 產物，加入 competent cell 中，輕輕敲打 eppendorf 使其混合均勻，再放置冰上 10 分鐘。之後將 eppendorf 放在 42°C 的水浴槽 1 分鐘進行 heat-shock，再迅速置於冰水裡搖晃 10 秒鐘，隨即將 eppendorf 插入冰上靜置 10 分鐘。之後加入 1 μ l 的 LB broth，並放置於 37°C 的培養箱，旋轉 45~60 分鐘。之後將 eppendorf 以轉速 3000rpm 離心 5 分鐘，再去除上清液，並將底部菌塊拍散並均勻塗抹在含有 ampicillin 抗生素的 LB agar plate 上，最後放入 37°C 培養箱裡隔夜培養 16 小時，利用 agar plate 所含的抗生素來篩選菌株。

6. 細菌培養

培養含有所需質體的細菌，透過細菌的繁殖產生大量所需的質體 DNA。取 15ml 養菌管，加入 5ml Luria-Bertani Medium 培養液以及 10 μ l ampicillin 做為篩選抗生素。選取菌落加入培養液中，置於 37°C 下 12~16 小時，過程保持緩慢旋轉、避免沉積。

7. 質體 DNA 的製備

本步驟目的是將我們送進去細菌內繁殖的質體與細菌本身、細菌的染色體 DNA 分離。將 5ml 的菌液以 3000rpm 離心 10 分鐘，丟棄上清液，再使用 High-speed plasmid mini kit(Geneaid)抽取細菌質體。首先加入 PD1 200 μ l，與細菌充份混合均勻後，移至 eppendorf。

加入 PD2 200 μ l，緩慢均勻搖 5-6 次，靜至 2 分鐘。PD3 300 μ l，緩慢均勻搖 5-6 次後以 13200rpm 離心 10 分鐘。之後抽取上清液至 column，離心 30 秒，並去除離心液。加入 W1 buffer 400 μ l，離心 30 秒，倒掉離心液。加入 600 μ l wash buffer 離心 30 秒，去除離心液後，再離心 3 分鐘。之後將 column 置於 eppendorf 並加入 50 μ l 的 DEPC H₂O。

8. 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。

9. 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。用高度密合鎢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 10 μ l，體積依照濃度調整，含有 Tol2 表現質體 30ng/ μ l、Transposase cRNA 30ng/ μ l、0.5% Phenol Red 2 μ l 以及加入 DEPC H₂O 至總體積 10 μ l。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。

10. 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呈色，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：

10.1. 第一階段

- 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。

10.2. 第二階段

- 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%	配製 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 Rabbit Anti-Sox2 pAb (ab97959)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。

10.3. 第三階段

- 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。

10.4. 第四階段

- 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 中避光存放，染色完成。

11. 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。

12. 模式動物行為分析

將正常與基因改造之斑馬魚置 24 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 Noldus 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。

結果與討論

1. 基因轉殖

本實驗中，我們運用基因轉殖技術(Cloning)，將已有的 *agr2* 啟動子與 *cx30.3* 基因同時重組進入細菌質體中，使來自 pLEGFP-*cx30.3* 質體【Figure 1】的 *cx30.3* 基因接續在 *agr2* 啟動子之後並受其調控。其中，*agr2* 啟動子包含 *177ecto* 與 *96ecto* 兩種，*cx30.3* 基因則包含 *cx30.3 WT*、*cx30.3 R186K*、*cx30.3 R186Q* 等三種，故有六種組合，如【Table 3】所示，重組質體示意圖請見【Figure 2】。我們呈現 Cloning 時的電泳圖【Figure 3】，顯示在嵌入一段約 800bp 的 *cx30.3* 基因後，轉殖載體的大小確實較對照組稍大，並且在以相同的 Restriction Enzyme 作用之後，產生大小相同的 Insert 片段。我們亦將此基因重組載體交由明欣生物科技公司進型基因定序，將定序結果與已知的 *cx30.3* 基因進行比對後，基因序列已確認無誤。

關於 Tol2-3416-*agr2*-EGFP 質體所搭載之啟動子，在我們實驗測試之後發現其作為啟動子之驅動能力與專一性不如 Tol2-*exo200*-*agr2*-*96ecto*-EGFP 與 Tol2-*exo200*-*agr2*-*177ecto*-EGFP 二種，因此後續研究皆暫不以 Tol2-3416-*agr2*-EGFP 進行實驗。

2. 基因轉殖魚之篩選

基因轉殖魚的篩選是本研究期間主要的執行重點，包含 Tg(*agr2*-*96ecto*:*cx30.3 WT*-EGFP)、Tg(*agr2*-*96ecto*:*cx30.3 R186K*-EGFP)、Tg(*agr2*-*96ecto*:*cx30.3 R186Q*-EGFP)、Tg(*agr2*-*177ecto*:*cx30.3 WT*-EGFP)、Tg(*agr2*-*177ecto*:*cx30.3 R186K*-EGFP) Tg(*agr2*-*177ecto*:*cx30.3 R186Q*-EGFP) 等六種品系，在總共篩選淘汰了 42 隻 F0 斑馬魚之後，目前有 Tg(*agr2*-*177ecto*:*cx30.3 WT*-EGFP) 篩選成功，並繁殖至 F2，預期在約半年後可以確認得到 AA 基因型的 Tg(*agr2*-*177ecto*:*cx30.3 WT*-EGFP) 品系。另外，目前 Tg(*agr2*-*96ecto*:*cx30.3 R186K*-EGFP) 與 Tg(*agr2*-*96ecto*:*cx30.3 R186Q*-EGFP) 也已成功挑選出 F1 子代，然而由於數量不多，仍需要累積子代數目。

轉殖模式動物品系之建立是一項需要時間的任務，雖然斑馬魚是一種繁殖速度相對快速的模式動物，但其性成熟仍需三個月，飼育至能交配時也需至少四個月的時間。

有關斑馬魚篩選品系的時程，在顯微注射之後的斑馬魚胚胎我們稱之為 F0 代，在 F0 代 3 至 4 天大時，我們以螢光顯微鏡觀察並挑選出有表現螢光的個體起來飼養。然而，其螢光不必然會穩定存在其基因體中持續表現。因此，俟其成長至至少四個月大後，我們可以開始挑選其體型較大的個體與野生型斑馬魚試交。若試交後子代有表現螢光，則我們會挑選其表現螢光的子代並飼養之，即為 F1，此 F1 子代可預期已經具有穩定表現轉殖基因的能力；反之，若試交後子代皆無螢光表現，則我們淘汰該 F0，繼續嘗試其他 F0 轉殖魚與野生型斑馬魚試交。F1 子代挑選成功後，我們預期其基因型為 Aa，並且同樣地將其飼養至至少四個月大後，再嘗試與 F1 自交，產下會表現螢光的 AA 與 Aa，即為 F2。再四個月後，我們將 F2 與野生型試交後觀察其子代螢光表現比例，即可確定該 F2 的基因型為 AA 或 Aa，並完成轉殖魚品系之建立。

在挑選螢光魚時，我們使用倒立螢光顯微鏡觀察 3~4 天大的胚胎，因其基因會將 EGFP 螢光蛋白表現在內耳支持細胞中，故我們針對內耳支持細胞觀察，挑選出適合的個體。觀察的重點在於耳囊中的前聽班(Anterior Macula)，FITC 濾鏡下，我們觀察到 Tg(agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP)F3 品系表現的螢光情形有如齒狀排列，且下多上少，即勾勒出支持細胞在下並向上包覆著毛細胞的構型；另一方面，FITC 濾鏡下，我們觀察到 Tg(agr2-96ecto:cx30.3 R186K-EGFP)F1 品系表現的螢光情形則不易辨認出支持細胞的形狀，而是如繁星點點狀【Figure 4】。基因轉殖魚的螢光表現情形在繁殖出穩定的 AA 子代後，仍會使用螢光顯微鏡確認其螢光表現是否有發生變化。

非常遺憾地，本研究期間在繁雜、不易的實驗之下顯得猶如白駒過隙，我們將會繼續以顯微注射轉殖基因載體來預備更多的 F0 以供日後篩選，並且持續將現有的 F0 試交，期望能夠早日建立完整的轉殖斑馬魚品系。

3. 全胚胎免疫組織化學染色

為了了解我們轉殖的 *cx30.3* 基因透過 *agr2* 啟動子表現後是否會專一表現在內耳的支持細胞中，我們利用全胚胎免疫組織化學染色(Whole-mount Immunohistochemistry Staining, WIHC)來觀察其表現位置。我們利用 Sox2(Rabbit Anti-Sox2 Antibody)蛋白抗體表現在內耳支持細胞的特性，再使用 Goat Anti-rabbit IgG 594 的二級抗體表現紅色螢光，來觀察並記錄抗體紅色螢光與轉殖基因中 EGFP 綠色螢光的表現相對位置。

在每次 WIHC 染色之前，我們五天前先準備使 Tg(*agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP*)的親代轉殖魚交配，隔天產卵後再將所得子代培養至第四天大，經倒立螢光顯微鏡挑選出螢光強度足夠的個體進行為期四天的 WIHC 染色。染色的結果顯示【Figure 5】，在 400 倍放大倍率下，Sox2 抗體表現紅色螢光在內耳的支持細胞上，與 EGFP 的綠色螢光重疊，可知我們轉殖入的 *cx30.3-EGFP* 基因確實是被 *Agr2* 啟動子專一表現在內耳的支持細胞上。

4. 模式動物行為分析

我們首先嘗試將 Tg(*agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP*)與 AB strain 野生型斑馬魚做比較，各取 6 天大的 72 隻斑馬魚進行測試，放置在同一 24 孔盤中，共有 6 盤。其中，Tg(*agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP*)品系有 14 隻、AB strain 有 2 隻由於活動力不佳無法受攝影機偵測追蹤，故由樣本中剔除。我們利用 Noldus EthoVision 軟體設定測試的程序，每 15 秒藉機器以相同力道敲擊 24 孔盤，敲擊 4 次，共記錄 1 分 15 秒。我們藉由軟體分析斑馬魚在測試中的移動距離，結果顯示 Tg(*agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP*)的移動距離顯著地小於 AB strain。另外，Tg(*agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP*)的結果變異數大於 AB strain【Table 4】【Figure 6】。這可能說明了 Tg(*agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP*)的反應或活動力較 AB strain 弱，且個體間狀況差異大。雖然 Tg(*agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP*)轉殖的基因型是 *cx30.3 WT*，因此我們預期牠們應該會有和 AB strain 相同的結果，但我們仍須考慮到轉殖基因魚的整體健康狀況本身就 不如 AB strain，於平常飼養時亦可發現其死亡率也明顯高於 AB strain。當然，我們之後的實驗勢必會考慮要放大測試的樣本數，以減少誤差並且取得更有說服力的結果。對於 Tg(*agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP*)與 AB strain 在結果上的差異，我們仍然認為此數據可以以轉殖魚的整

體健康條件較差來合理解釋之，我們預期在測試帶有突變 *cx30.3 R186K* 與 *cx30.3 R186Q* 基因的轉殖魚品系時，此二者的移動距離會有意義地低於 Tg(*agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP*)。

【Table. 1】*cx30.3* 與 *CX26* 同源之突變點

Mutations		Mutation Type	Cellular Location
Single-Point	011G→A/wt, G4E	Missense	Cell membrane
	224G→A/wt, R75H	Missense	Cell membrane
	557G→A/wt, R186K	Missense	Cell membrane
Double-Points	011G→A/wt, 012A→C/wt, G4D	Missense	Cell membrane
	224G→A/wt, 225T→G/wt, R75Q	Missense	Cell membrane
	556A→C/wt, 557G→A/wt, R186Q	Missense	ER

【Table. 2】用來建構 Tol2 表現載體之 Primer 序列

Primer名稱	序列
zf <i>cx30.3</i> cds 5' -EcoRI	5' -CGCGAATTCATGAGTTGGGGAGCACTTTATGC-3'
zf <i>cx30.3</i> cds-stop 3' -BamHI	5' -CGCGGATCCGGAACAGTCTTATTGCTCGATGAGTC-3'

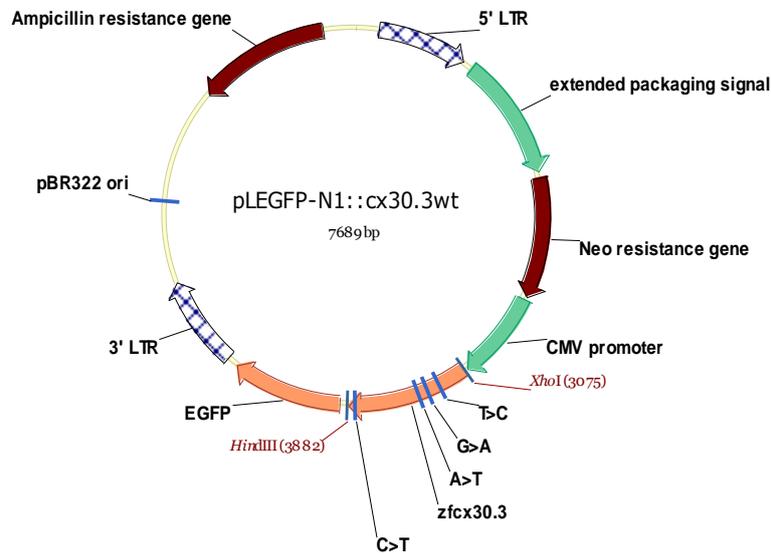
【Table 3】 基因重組質體名稱

質體名稱	簡稱
To12-exo200-agr2-96ecto-cx30.3 WT-EGFP	96-cx W
To12-exo200-agr2-96ecto-cx30.3 R186K-EGFP	96-cx K
To12-exo200-agr2-96ecto-cx30.3 R186Q-EGFP	96-cx Q
To12-exo200-agr2-177ecto-cx30.3 WT-EGFP	177-cx W
To12-exo200-agr2-177ecto-cx30.3 R186K-EGFP	177-cx K
To12-exo200-agr2-177ecto-cx30.3 R186Q-EGFP	177-cx Q

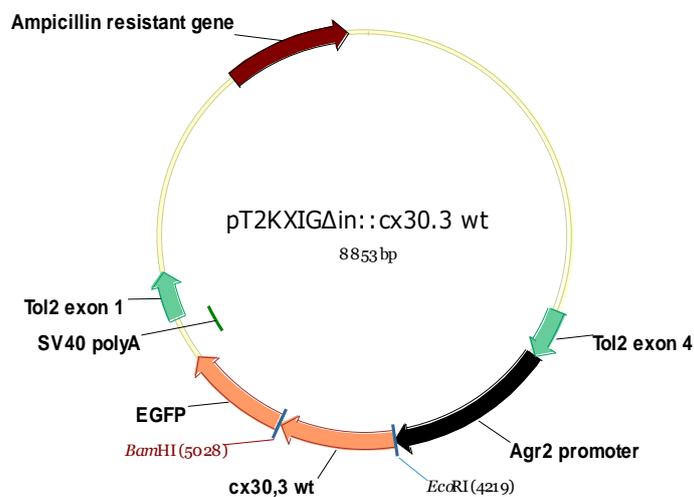
【Table 4】 模式動物行為分析結果。

Group	Number	Distance moved (cm)	Standard Error
AB strain	70	67.7107	0.806044
Tg(agr2-177ecto:cx30.3 WT)	58	58.2508	2.37674

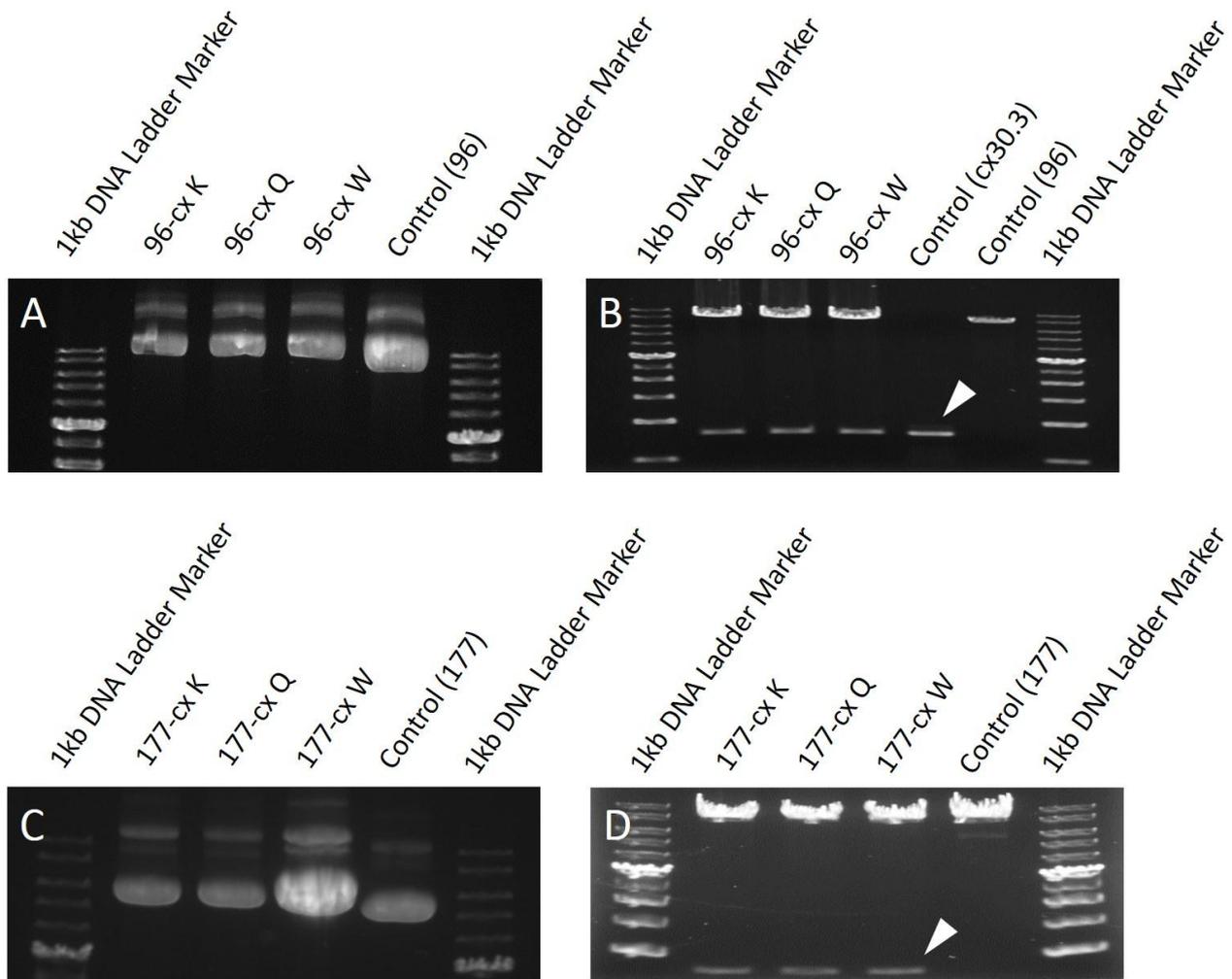
【Figure 1】攜帶 *cx30.3* 基因之 pLEGFP-*cx30.3* 質體圖。此質體含有 Neomycin 與 Ampicillin 等抗抗生素基因，在細胞或活體可以利用 CMV promoter 表現 *cx30.3*-EGFP 融合螢光蛋白。



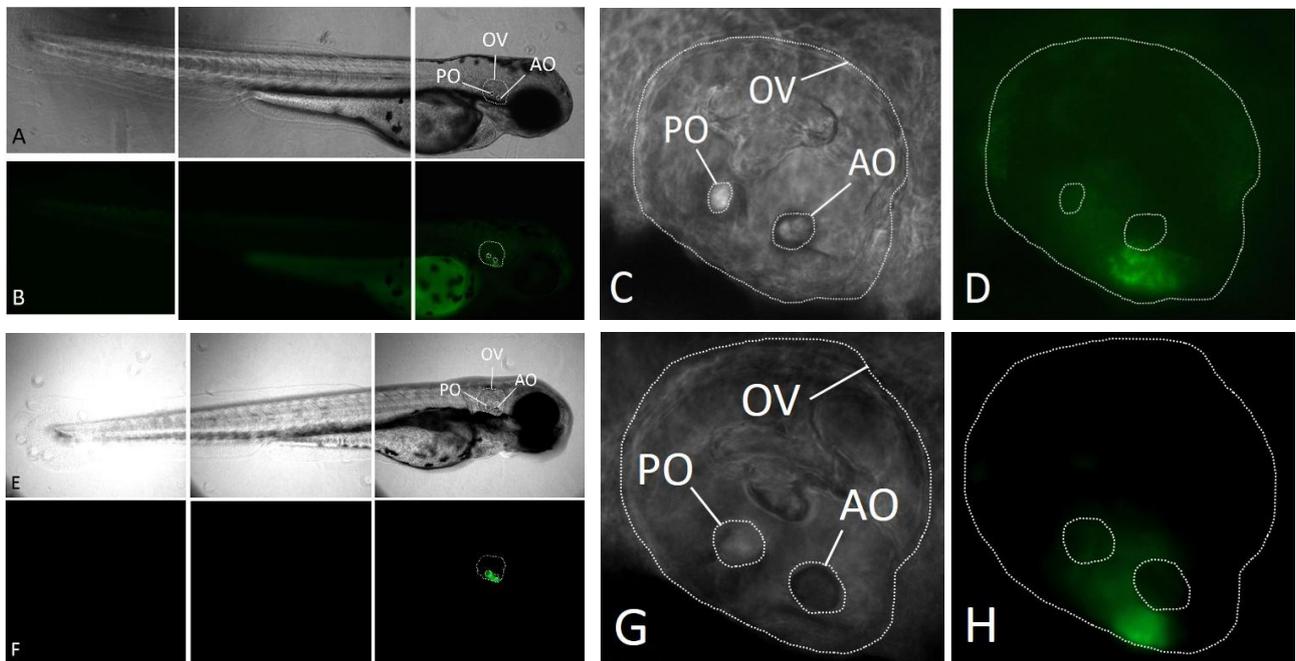
【Figure 2】應用於轉殖基因魚之質體示意圖，包含 Tol2-exo200-*agr2*-96ecto-*cx30.3*-EGFP、Tol2-exo200-*agr2*-177ecto-*cx30.3*-EGFP 以及 Tol2-3416-*agr2*-*cx30.3*-EGFP，其中 *agr2* promoter 區段代表 *exo200-*agr2*-96ecto*、*exo200-*agr2*-177ecto* 或 *3416-*agr2** 序列。載體中，包含了 Tol2 exons、*agr2* promoter、*EcoRI* 限制酶切點、*cx30.3 wt*、*BamHI* 限制酶切點、EGFP 螢光蛋白序列以及 Ampicillin 抗抗生素基因。



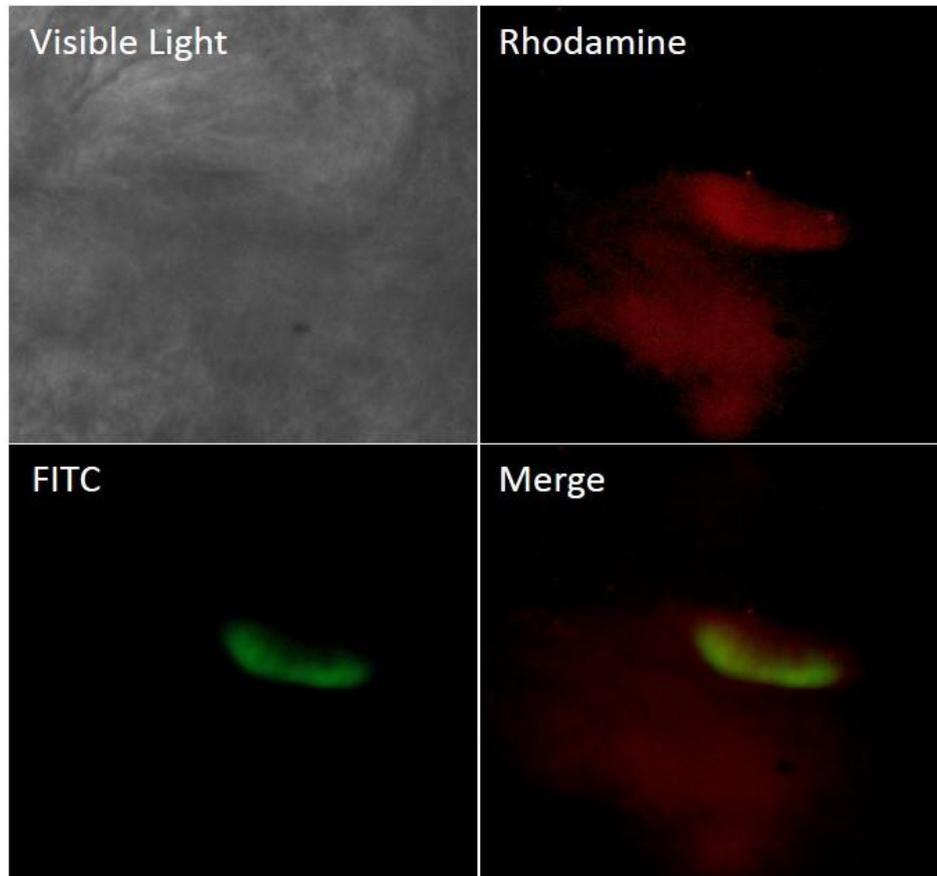
【Figure 3】 基因重組電泳圖。(A) 基因轉殖 *cx30.3 R186K*、*cx30.3 R186Q*、*cx30.3 WT* 進入 Tol2-exo200-agr2-96ecto-EGFP 載體，電泳圖顯示插入 Insert 片段之重組質體大小略大於不含 *cx30.3* 基因之對照組。(B) 為確認基因轉殖結果，我們同樣以 *EcoRI*、*BamHI* 酵素切割重組基因載體，產生了大小相符的 *cx30.3* 基因片段。白色箭頭所示為大小約 700bp 之 *cx30.3* 基因片段。(C) 基因轉殖 *cx30.3 R186K*、*cx30.3 R186Q*、*cx30.3 WT* 進入 Tol2-exo200-agr2-177ecto-EGFP 載體，電泳圖顯示插入 Insert 片段之重組質體大小略大於不含 *cx30.3* 基因之對照組。(D) 為確認基因轉殖結果，我們同樣以 *EcoRI*、*BamHI* 酵素切割重組基因載體，產生了大小相符的 *cx30.3* 基因片段。白色箭頭所示為大小約 700bp 之 *cx30.3* 基因片段。



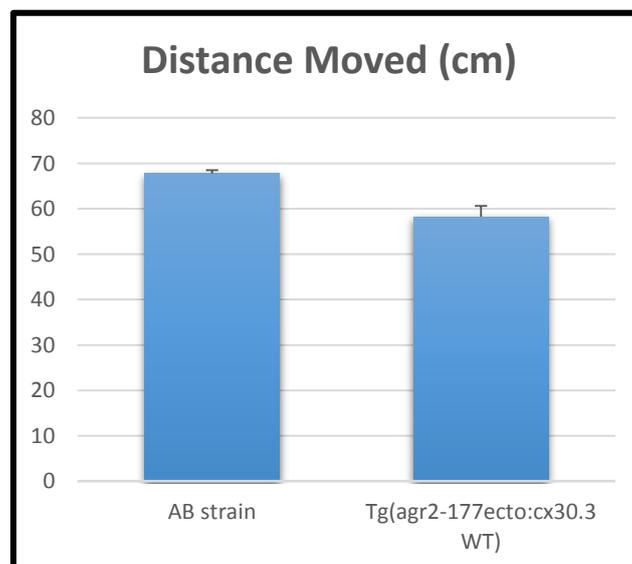
【Figure 4】倒立螢光顯微鏡下的 $Tg(agr2-96ecto:cx30.3 R186K-EGFP)$ 與 $Tg(agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP)$ ，F1 子代，四天大。當我們在篩選 F1 子代有無螢光時，應辨認如圖所示的螢光表現情形，即主要在耳囊前下方的前聽班處，始可挑選之。(A、B) $Tg(agr2-96ecto:cx30.3 R186K-EGFP)$ 全魚在可見光及 FITC 濾鏡下觀察情形(100x)。(C、D) $Tg(agr2-96ecto:cx30.3 R186K-EGFP)$ 內耳部分在可見光及 FITC 濾鏡下觀察情形(400x)。(E、F) $Tg(agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP)$ 全魚在可見光及 FITC 濾鏡下觀察情形(100x)。(G、H) $Tg(agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP)$ 內耳部分在可見光及 FITC 濾鏡下觀察情形(400x)。(OV : Otic Vesicle ; AO : Anterior Otolith ; PO : Posterior Otolith)



【Figure 5】經過全胚胎免疫組織化學染色的 Tg(agr2-177ecto:cx30.3 WT-EGFP)轉殖斑馬魚內耳在倒立螢光顯微鏡不同濾鏡下的螢光表現情形(400x)。



【Figure 6】模式動物行為分析結果作圖。



參考資料

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 (Oncorhynchus mykiss and Scophthalmus maximus)*. *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.