

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計畫：利用 Tol2 轉殖系統分析和評估 otop1 和 otolla 啟動子
* 名稱：是否可作為基因在斑馬魚內耳專一表現的啟動子
* *****

執行計畫學生： 彭韻如
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-019-B
研究期間： 102 年 07 月 01 日至 103 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 103 年 03 月 31 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，先前文獻指出斑馬魚重要的調控蛋白質其表現位置和時間都和哺乳類動物類似，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。先前我們已利用生物資訊學於斑馬魚基因庫中搜尋兩個與內耳發育相關的基因(*otop1* 和 *otolla*)，並將啟動子區域自斑馬魚基因體中選殖至 pGL3-basic vector 載體，藉由 luciferase activity 活性測定分別初步篩選出含有啟動子活性的片段，先前實驗室的研究已經排除 *otop1* 的可能性，因此本計畫的動機及目的便是希望藉由 Tol2 基因轉殖系統來評估 *otolla* 此基因之不同片段大小的啟動子，於斑馬魚系統是否為內耳專一表現的啟動子。本計畫的結果，根據 luciferase activity 活性測定我們進一步篩選出四段含有較高啟動子活性的片段，經由 Tol2 基因轉殖系統的完成，顯微注射於斑馬魚胚胎中，結果發現此四段基因序列的表現位置皆位於斑馬魚的心臟，在內耳中則無表現，因此判定我們所篩選的 *otolla* 序列片段並非內耳專一性表現的啟動子，而是心臟專一表現的啟動子。雖然實驗結果未如我們預期，但是我們已經建立了一個如何尋找和分析啟動子區域功能的方法和平台，這將有利於我們未來繼續使用 ZFIN 資料庫和 Ensemble Zebrafish 資料庫及利用 Neural Network Promoter Prediction 進行啟動子區域的預測找到其他可能可以調控基因專一表現在內耳啟動子區。若能確定內耳專一表現的啟動子，將可建立一個模式動物來探討聽障的致病機轉。

研究動機與研究問題

研究動機：

先前實驗室對於非症候群聽障的研究，在聽障患者中已發現幾個基因 (*connexin 26*、*connexin 29*、*connexin 30*、*connexin 30.3*、*connexin 31*、*connexin 43*) 有突變的發生，且在細胞模式的研究中亦發現其突變會影響基因的正常功能 (Yang et al., 2007)。然而實驗室希望藉由動物模式--基因轉殖斑馬魚--來探討 *connexin* 基因在斑馬魚內耳表現的機轉。為了進行基因轉殖斑馬魚系統的建立，尋找在內耳專一表現的啟動子 (promoter) 是很重要的，因此本研究的目的是利用斑馬魚 Tol 2 基因轉殖系統來確認和評估由生物資訊學所找到與內耳早期發育有關的基因- *otopl* 和 *otolla* -之啟動子是否可做為調控基因在內耳專一表現的啟動子 (promoter)。

研究問題：

1. 利用 luciferase 活性表現分析方法找尋 *otopl* 和 *otolla* 的啟動子調控區
2. 利用斑馬魚 Tol 2 基因轉殖系統確認內耳專一表現的啟動子

研究方法及步驟

1. Polymerase chain reaction (PCR)

運用 DNA 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)，擴增出想要的片段。反應總體積為 $20\ \mu\text{l}$ ，含有 $1\ \mu\text{l}$ DNA、 $0.4\ \mu\text{l}$ 10mM dNTP、 $4\ \mu\text{l}$ 5X buffer、forward primer $1\ \mu\text{l}$ 、reverse primer $1\ \mu\text{l}$ 、 $0.4\ \mu\text{l}$ DNA polymerase 以及補 dH₂O 至 $20\ \mu\text{l}$ 。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 35 分鐘、 98°C 8 秒、annealing 8 秒、elongation 72°C 30~180 秒(35 個循環數)， 72°C 10 分鐘，最後溫度維持在 25°C 。

2. 基因轉殖 transformation

先將 competent cell 從 -80°C 冰箱取出，置於冰上溶解。將 $4\ \mu\text{l}$ 的 ligation 產物，加入 competent cell 裡，輕輕拍打 eppendorf 使其混勻，再放置冰上 30 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 0°C 冰水裡 shake 10 秒鐘，隨即將 eppendorf 插入冰上靜置 2 分鐘。之後加入 $1\ \text{ml}$ 的 LB broth，並放置於 37°C 的培養箱，旋轉 45~60 分鐘，以增加 LB 的溶氧量，使菌生長更加快速。之後將 eppendorf 以轉速 13200rpm 離心 12 秒，離心後去除上清液，並將底部菌塊拍散並均勻塗抹在含有抗生素的 LB agar plate 上，最後放入 37°C 培養箱裡隔夜培養 16 小時，利用 plate 所含的抗生素來篩選菌株。

3. 質體 DNA 的製備

目的是將我們送進去細菌內繁殖的質體與細菌本身以及細菌的染色體 DNA 分離。將 5ml 的菌液離心 3000rpm/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，gently 均勻搖 5-6 次，靜至 2 分鐘。PD3 300 μ l，gently 均勻搖 5-6 次後進行離心 13200rpm/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 d2H2O。

4. 細胞培養

HeLa 細胞在基因轉殖感染前培養在含 88%DMEM、10%COSMIC CALF SERUM、1%Penicillin 和 1%L-Glutamin 培養液中。將 HeLa 細胞培養在 3.7cm² 的培養皿中，當細胞濃度達到 80 %時，即可使用基因轉殖感染。

5. 啟動子活性分析

5.1 luciferase activity 測定

以 Promega kit 之 substrate 來測定 luciferase 表現量。先稀釋 cell culture lysis reagent 至 1X，每個 3.7cm² 的培養皿各加 100 μ l，室溫靜置 15 min。將細胞刮下，收集於 1.5ml 離心管，vortex 2~3 次增加 lysis 量，離心 12000g 4°C 5 分鐘。將上清液吸取置新的離心管內供測定。準備 96well 盤，將 10 μ l 細胞上清液加入 well 內，再加入 60 μ l substrate，以冷光測定儀測定。

5.2 β -gal assay

β -galactosidase substrate solution 製備：200mM Sodium phosphate buffer(pH=7.3)、2mM MgCl₂、100mM β -mercaptoethanol 350 μ l、1.33mg/ml ONPG。將細胞上清液 50 μ l 加入 50 μ l β -galactosidase substrate solution 於 37°C 反應 30 分鐘。取 80 μ l 加入 96 Well 中，以 ELISA reader 在 O.D. 420 測定。將 luciferase 測定值除以 β -gal 所測得的值即為此 promoter region 所表現的值。

6. 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。

7. 基因轉殖系統

最近在斑馬魚的基因轉殖主要是利用 MultiSite Gateway Technology (Tol2 system)，此系統可以快速和有效率的將異源性基因(heterologous)的建構在多位點的載體去進行蛋白質表現和功能分析。整個質體建構包括基因選殖的方法和步驟，主要依據 MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit(Catalog no. 12537-032)的操作手冊進行。建構好的質體利用顯微注射 (Microinjection) 的方式打入 1-2cell 時期斑馬魚胚胎 (不要超過 8 個 cell 期)，方法和步驟如前所述。因斑馬魚體內有 Tol2 酵素是一種 transposase，所以可以將基因插入斑馬魚的染色體內。基因轉殖魚可以利用螢光顯微鏡和 RT-PCR 的方式來加以確定。

8. 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。用高度密合鑷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，將準備好的毛細管針架上顯微注射器(Drummondsc, Nanoject II)，把注射液體吸入毛細管中，再注射至 1~2 cell 時期胚胎之卵黃內，每次 2.3nl。將注射過的胚胎加入 egg water (μ g instant salt/ml distilled water) 置於 28°C 恆溫培育觀察。

9. Whole mount in situ hybridization

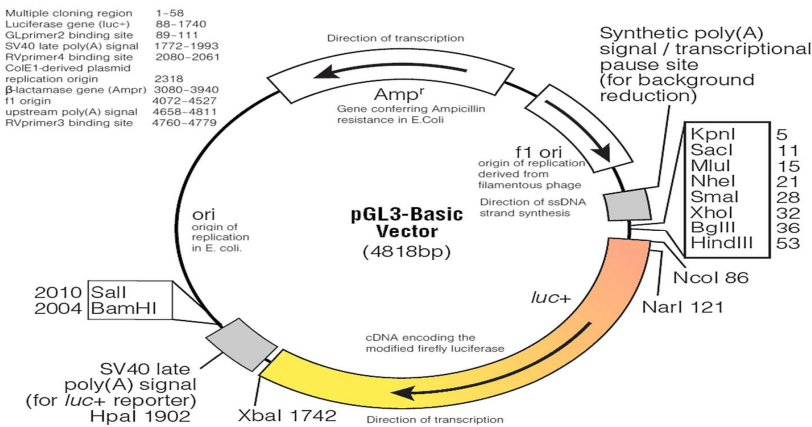
以 PBS wash 3 次，2% PFA 固定 2 小時，PBST wash 4 次/5 分鐘，脫色(1% KOH + 30% H2O2) 20 分鐘，PBST wash 4 次/5 分鐘，Acetone 打洞 -20°C 30 分鐘，PBST wash 4 次/5 分鐘，PBS wash 2 次，2% PFA 再固定 15 分鐘，PBS triton (PBS + 0.1% Triton X-100) wash 5 次/5 分鐘，加入 HYB+ 放置 4°C 16 小時，以 25%，50%，75% PBS Triton + HYB+ wash 1 次/10 分鐘，PBS triton wash 3 次/10 分鐘，blocking(PBS triton + 5%血清 + 2.5% DMSO)3 小時，加一抗 1:1000 放置 4°C overnight，PBS triton wash 4 次/1 小時，加二抗 1:200 4°C 18 小時，PBS triton wash 4 次/45 分鐘，最後以 0.5% agar 包埋，拍照。

結果與討論

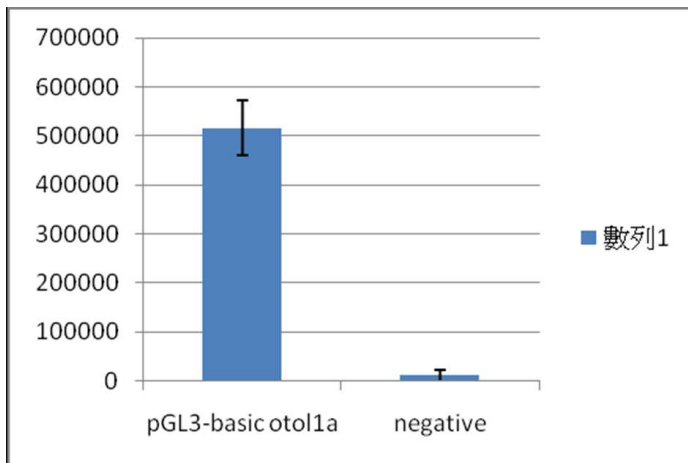
先前利用生物資訊學的方法從 ZFIN 資料庫中找到兩個可能專一性表現在內耳的基因，此二者基因為 *otopetrin 1(otopl)*與 *otolin 1a(otolla)*，使用 Ensemble Zebrafish 資料庫找到這兩個基因的相關基因序列，並以 Neural Network Promoter Prediction 預測 *otopl* 和 *otolla* 的啟動子序列區域所在，設計 *otopl* 和 *otolla* 相關引子，分別將這兩個基因建構至載體 pGL3-basic vector 【Figure 1】上。同時在先前的實驗室的研究已經排除 *otopl* 的啟動子序列區域可當內耳專一表現的啟動子。因此本研究進行 *otolla* 的啟動子序列區域是否可當內耳專一表現的啟動子。首先將已建構的 pGL3-basic-otolla 分別與做為 internal control 的 β -galactosidase plasmid 以 1600ng/ μ l : 800 ng/ μ l 的比例共同轉染(co-transfection)到 HeLa cell 內，分別測定 luciferase activity 及 β -gal 的數值，並將 luciferase 數值除以相對應之 β -gal 值以得到啟動子活性表現值。結果發現 pGL3-basic-otolla 表現與 pGL3-basic vector(作為 negative control)有明顯的差別 【Figure 2】。隨後對 *otolla* 進行片段刪除與活性測定，藉此縮小可能的啟動子範圍，目前已將 *otolla* promoter(-1134~-109)、*otolla* promoter(-364~-109)、*otolla* promoter(-275~-109)、*otolla* promoter(-275~-1)建構到 pGL3-basic vector 載體上，並分別與 β -galactosidase plasmid 以 1600ng/ μ l : 800 ng/ μ l 的比例共同轉染到 HeLa cell 內，經過同樣的校正方式得到數值 【Figure 3】。結果發現 *otolla*(-1134~-109)、*otolla*(-364~-109)、*otolla*(-275~-109)、*otolla*

(-275~-1) 與 negative control(pGL3-basic vector)有明顯的差別。依據此結果設計 *otolla* 的序列引子【Table 1】，使用 Tol2 基因轉殖系統【Figure 4】，將目標序列 *otolla* promoter(-1134~-109)、*otolla* promoter(-364~-109)、*otolla* promoter(-275~-109)、*otolla* promoter(-275~-1)與 TagGFP 共同置換入目標載體中，完成 *otolla*(-1134~-109)-TagGFP-polyA-Tol2pA、*otolla*(-364~-109)-TagGFP-polyA-Tol2pA、*otolla*(-275~-109)-TagGFP-polyA-Tol2pA、*otolla*(-275~-1)-TagGFP-polyA-Tol2pA 等四段序列片段，再分別經由顯微注射 20.7pg 到 wt 斑馬魚胚胎【Table 2】，在三天大時於螢光倒立顯微鏡下觀察基因的螢光表現，結果發現表現位置皆位於心臟，而在身體的其他部位皆無產生【Figure 5~8】。使用 whole mount in situ hybridization，以一抗 M20 1:1000、二抗 antimouseIgG594 1:200 進行螢光染色，可得出斑馬魚心臟的心房與心室的相對位置。由此可對照出經由顯微注射到斑馬魚的基因序列，其螢光表現位置在心房與心室皆有表現【Figure 9】。由基因轉殖的實驗結果發現我們所分析的 *otolla* 的啟動子序列區域並不能當內耳專一表現的啟動子。同時在我們的研究成果中我們獲得 *otolla* 的啟動子序列區域可當心臟專一表現的啟動子。本研究雖然沒能找到在內耳專一表現的啟動子，然而我們已經建立了一個如何尋找和分析啟動子區域功能的方法和平台，這將有利於我們後續的實驗。因此之後我們除繼續利用生物資訊學和 Tol2 基因轉殖系統的方式找出其他可能專一性表現在內耳的啟動子。若能確定內耳專一表現的啟動子，將可以用來探討我們實驗室在非症候群聽障病人當中發現有突變發生的基因之功

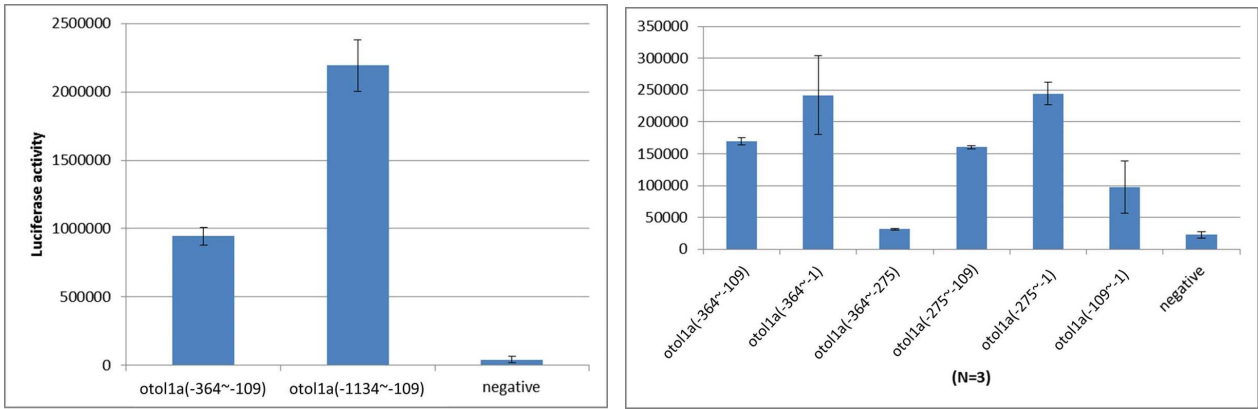
能。另外我們也將更進一步的分析這 *otolla* 的啟動子在心臟內的表現是在甚麼樣的組織和細胞，並建立 *otolla* 調控的心臟螢光斑馬魚，提供作為心臟相關疾病的動物模式。



【Figure 1】 pGL3-basic 質體圖



【Figure 2】 將建構好的質體 pGL3-basic-otolla 分別與 β -galactosidase co-transfection 到 HeLa cell 內，經過測定 Luciferase activity 及 β -gal 的值後，將 luciferase 結果除以對應的 β -gal 值，所得校正之 promoter 活性表現值利用 Microsoft Excel 所畫出的圖表。結果顯示 pGL3-basic-otolla promoter 活性表現高於 negative control，有明顯差異。

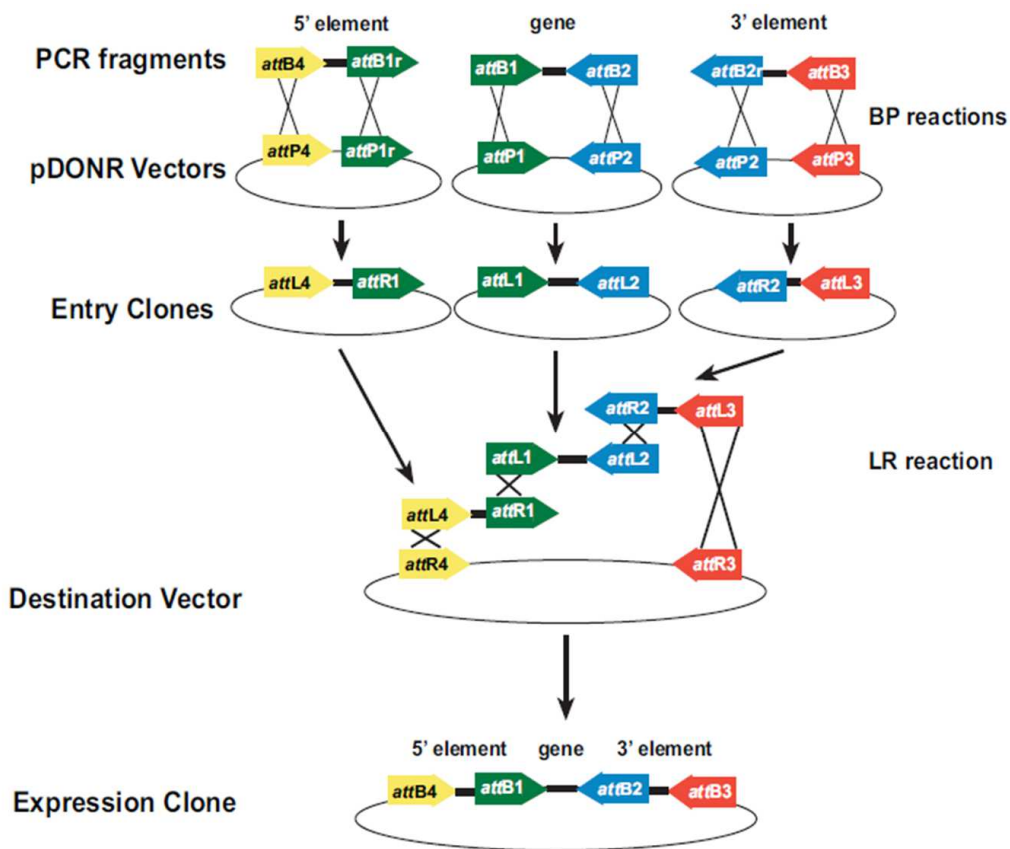


【Figure 3】 啟動子序列刪減 (series deletion) 活性分析圖

由結果可看到將所預測的啟動子片段縮短至 otolla (-364~-109) 仍有啟動子活性，但是活性比 otolla (-1134~-109) 少了大約 55%。隨後將所預測的啟動子序列進一步縮小至 otolla (-275~-109)，另外也想知道 -1 至 -109 對所預測的啟動子區域的影響，因此分別建構 otolla (-364~-1)、 otolla (-275~-1)。從結果可知 -1 至 -110 可以增強所預測之啟動子活性，而 otolla (-275~-109) 仍然有啟動子的活性。因此我們便從中多加挑選 otolla (-275~-109)、 otolla (-275~-1) 兩段進行 Tol2 基因轉殖系統。

【Table 1】 Tol2 基因轉殖系統引子序列

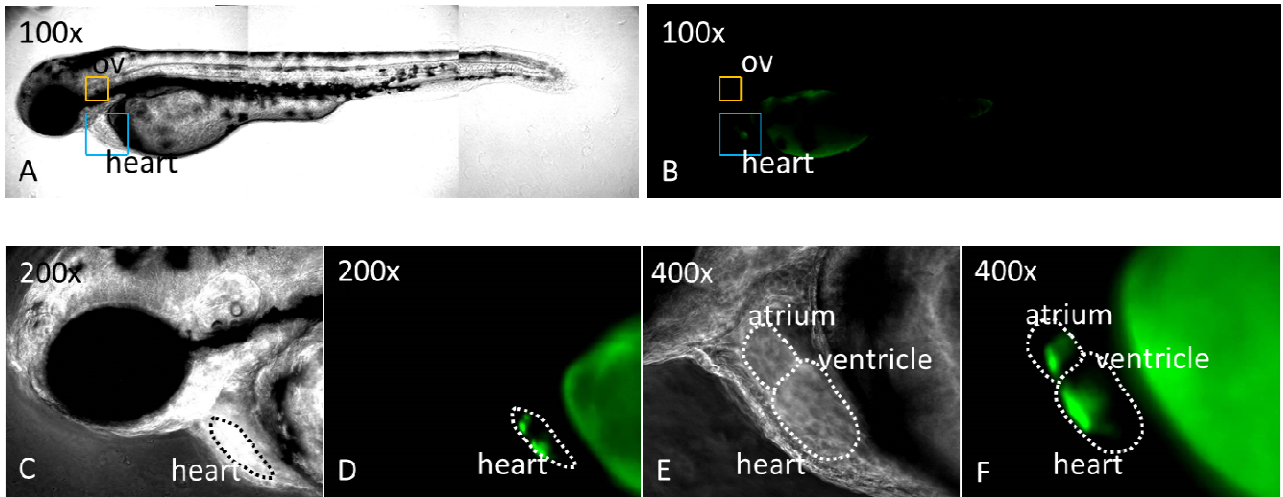
otol1a primer 名稱	序列
Tol2-otol1a promoter(-1134) attB4	5'GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCCCGAGCATAACTGAATTTGTA3'
Tol2-otol1a promoter(-364) attB4	5'GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCGCATCTGCACTTGAATTGCC3'
Tol2-otol1a promoter(-275) attB4	5'GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTCCGCCATCACATTAGATTCTCCTCAGG3'
Tol2-otol1a promoter(-109) attB1r	5'GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGGCCTCCTCTTCGTTCTCTTCA3'
Tol2-otol1a promoter(-1) attB1r	5'GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGGTGTACAAATACCCGCTGACAACAG3'



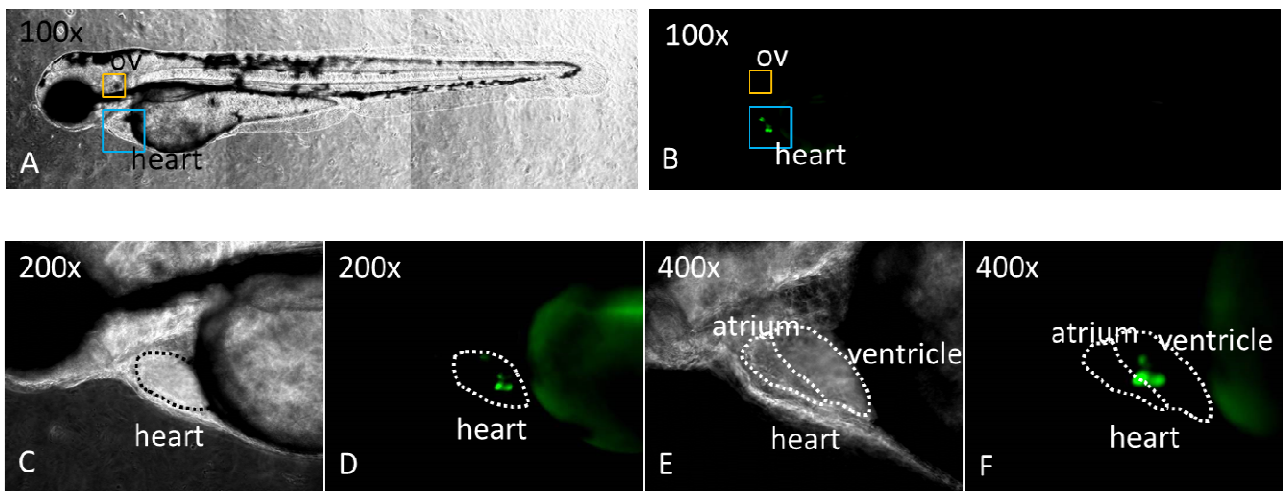
【Figure 4】 Tol2 基因轉殖系統流程圖

【Table 2】 顯微注射的質體整理

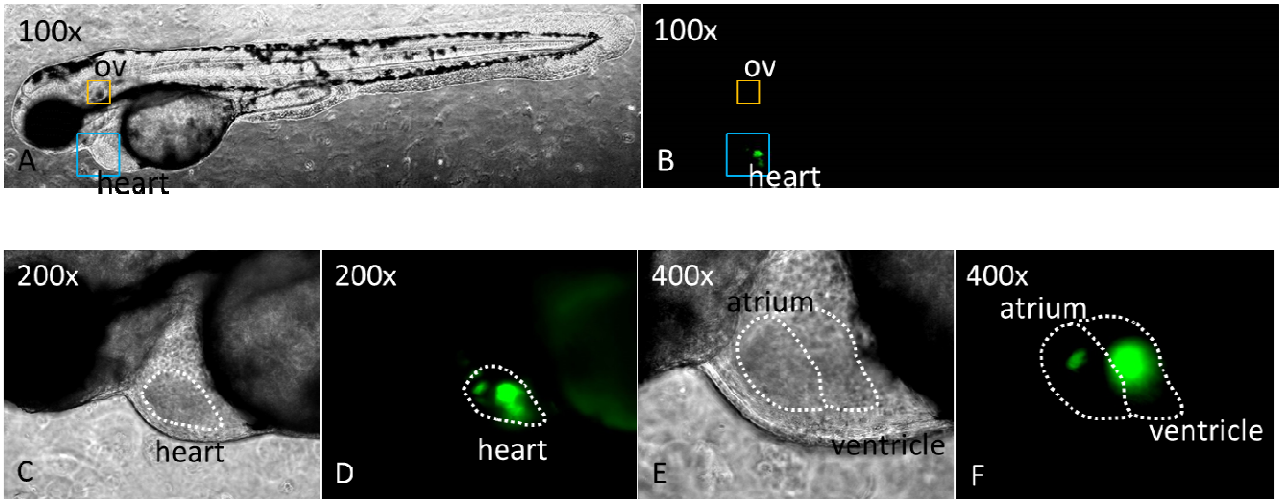
質體	大小 (base pair)	濃度 (ng / μ l)	260/280
otol1a(-1134~-109)-TagGFP-poIA-Tol2pA	8239	610	1.848
otol1a(-364~-109)-TagGFP-poIA-Tol2pA	7468	470	1.856
otol1a(-275~-109)-TagGFP-poIA-Tol2pA	7380	650	1.803
otol1a(-275~ -1)-TagGFP-poIA-Tol2pA	7488	500	1.789



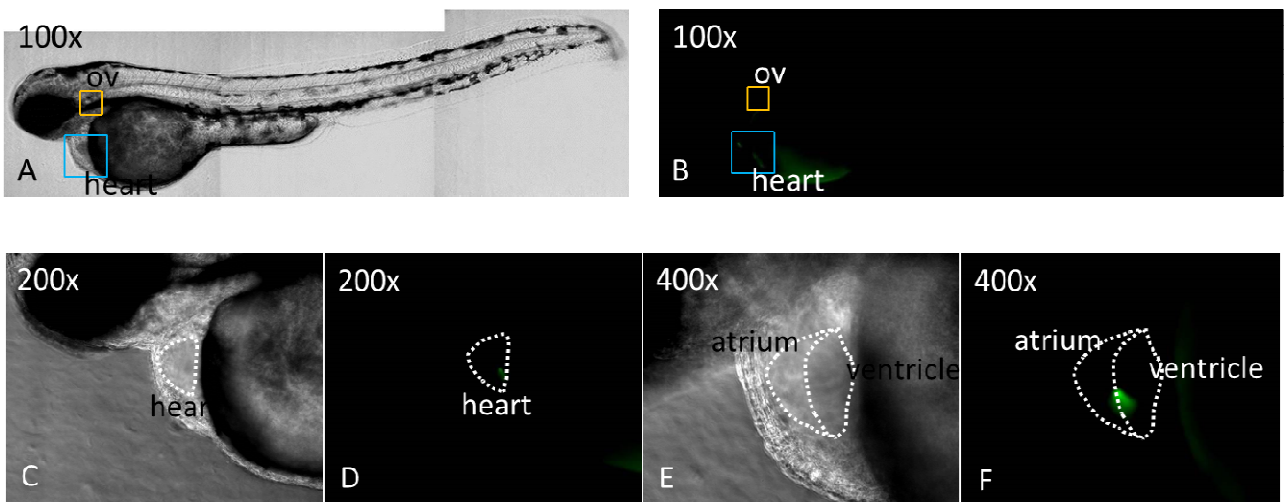
【Figure 5】顯微注射 20.7pg otolla(-1134~-109)-TagGFP-polyA-Tol2pA，觀察基因序列螢光位置，結果顯示位於心房與心室。



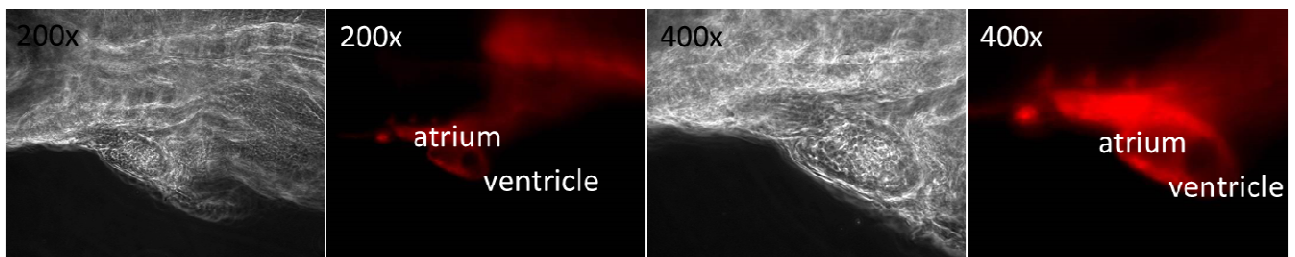
【Figure 6】顯微注射 20.7pg otolla(-364~-109)-TagGFP-polyA-Tol2pA，觀察基因序列螢光位置，結果顯示位於心房與心室。



【Figure 7】顯微注射 20.7pg otolla(-275~-109)-TagGFP-polyA-Tol2pA，觀察基因序列螢光位置，結果顯示位於心房與心室。



【Figure 8】顯微注射 20.7pg otolla(-275~-1)-TagGFP-polyA-Tol2pA，觀察基因序列螢光位置，結果顯示位於心房與心室。



【Figure 9】Whole mount in situ hybridization，觀察心房與心室位置分布。

參考文獻

1. George Streisinger , THE ZEBRAFISH BOOK
2. Yang JJ, Huang SH, Chou KH, Liao PJ, Su CC, Li SY(2007). Identification of mutations in members of the connexin gene family as a cause of nonsyndromic deafness in Taiwan. *Audiol Neurootol.* 2007;12(3):198-208
3. Hong HM, Yang JJ, Su CC, Chang JY, Li TC, Li SY(2010). A novel mutation in the connexin 29 gene may contribute to nonsyndromic hearing loss. *Hum Genet.* 2010 Feb;127(2):191-9
4. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF(1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995 Jul;203(3):253-310
5. Moorman SJ (2001). Development of sensory systems in zebrafish (*Danio rerio*). *ILAR J.* 2001;42(4):292-8.
6. Popper AN and Platt C (2003) Inner ear and lateral line. Chapter 4 of *The Physiology of fishes* Boca Raton: CRC Press, c1993 Evans, David H., (David Hudson), 1940 [ISBN0849380421]
7. Mayer-Gostan N, Kossmann H, Watrin A, Payan P and Boeuf G (1997) Distribution of ionocytes in the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts (*Oncorhynchus mykiss* and *Scophthalmus maximus*). *Cell Tissue Res* 289, 53 - 61

8. Pizam M, Payan P, LeMoal C, Edeyer A, Boeuf G and Mayer-Gostan N (1998)
Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two teleosts, *Oncorhynchus mykiss* and *Psetta maxima* *Cell and Tissue Research* 294, 261-270
9. Whitfield TT, Granato M, van Eeden FJM, Schach U, Brand M, Furutani-Seiki M, Haffter P, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J and Nüsslein-Volhard C (1996)
Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development* 123, 241-254
10. Kawakami K, Shima A (1999) Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene* 240, 239-244