

中山醫學大學醫學研究所

Chung Shan Medical University Institute of Medicine

碩士論文

Master Thesis

***PDS* 基因造成非症候群聽障之研究**

Mutation in *PDS* causes non-syndromic deafness

指導教授：李宣佑 博士(Shuan-Yow Li, Ph. D.)

研究生：蔡錦珠(Chin-Chu Tsai)

中華民國九十二年一月

Jan 2003

本論文為中山醫學大學授予理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學大學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。

口試委員

成大醫學院教授

林秀娟

林秀娟

中山醫學大學生命科學系副教授

蕭光明

蕭光明

中山醫學大學生命科學系教授
(論文指導教授)

李宣佑

李宣佑

中華民國九十二年一月

學生蔡錦珠論文題目為「PDS 基因造成非
症候群聽障之研究」，其論文已經中山醫
學大學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： 李宣佑

簽名：李宣佑

中華民國九十二年一月

誌謝

『懂得感恩的人才會成功』這是我常勉勵自己及送給朋友的話。

回首以往，要感謝的人真的真的太多了。

取得碩士學位，最要感謝的是我的指導教授-李宣佑老師，若不是李老師多年來一直不斷的鼓勵我繼續進修，我大概也不會有勇氣考研究所。李老師除了提供了優渥的研究環境以及悉心指導並給予我很大的自由和充分的支持，同時訓練我學習獨立思考的能力。在論文寫作期間，李老師細心和耐心的指導，使我得以順利完成碩士學業。

其次感謝成大醫學院林秀娟教授兼任台中市健康局副局長的同時，能於百忙之中抽空擔任口試委員並耐心仔細閱讀這本論文，於口試時深入指出論文中不足之處及對學生許多期許與勉勵。感謝本校生科系蕭光明教授擔任學生的口試委員，並對論文中諸多缺失給與予鼓勵與指正。

在論文研究期間，感謝台中榮民總醫院耳鼻喉科蕭君毅大夫提供所有的檢體及臨床上的資料，並給予許多的協助。感謝生科系教導過的老師，尤其林明忠及王怡鈞老師對學業或實驗技術及論文的指導。非常感謝博士班秀美無論是在學業、實驗及論文上的協助，感謝秋雲在二年同窗期間所給予的幫忙包括照顧小孩。同時也要感謝文州學弟、如珊及大學部學弟妹-杰廷、建勳、仲翔、士炘、宇哲、維彬、美

Abstract

The sensorineural disorder is the most common cause in severe hearing impairment, which affects about 1 in 1000 children and more than 50% of the disorder are thought to be inherited. Pendred syndrome is an autosomal recessive disorder characterized by congenital sensorineural hearing loss combined with goiter. The hearing loss is associated with temporal bone abnormalities ranging from isolated enlargement of the vestibular aqueduct (EVA) to Mondini dysplasia. The gene for Pendred syndrome (PDS) encodes a chloride- iodide transport protein of 780 amino acids named "pendrin". Mutations of this gene are also responsible for nonsyndromic autosomal recessive hearing impairment (DFNB4). To evaluate the relationship between prelingual deaf patients with EVA and Mondini dysplasia and *PDS* gene mutation, we analyzed 10 prelingual deaf patients associated with EVA and Mondini dysplasia. All of ten patients have *PDS* gene mutations. Of these ten mutations, seven are found to be homozygous for a splice acceptor site mutation that occurred at position IVS 7 -2A→G, one heterozygous mutation for IVS 16 -6G→A and two heterozygous for IVS 15 +5G→A. We also performed family study on five probands with IVS 7 -2A→G mutation. All were found to inherit the same mutant alleles from their parents. To determine the effect of this splice acceptor site mutation on patients' *PDS* expression, total RNA extracted from transformed lymphoblastoid cell lines was reverse transcribed and amplified by polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequencing of the RT-PCR products revealed that the transcripts from the allele with IVS 7 -2A→G mutation skip exon 8 entirely, resulting in a joining of exons 7 and 9. Deletion of exon 8 resulted in frameshift and premature termination of translation. This study would support

non-syndrome hearing loss associated with EVA and Mondini dysplasia might be caused by splice site mutation in the *PDS* gene.

序論

(Introduction)

聽障可因遺傳基因突變或環境因素，或兩者兼之引起的，環境因子主要是細菌或病毒感染引起的包括有腦膜炎(meningitis)、腮腺炎(mumps)、週產併發症(perinatal complications)、母子感染(materofetal infection) [如：毒漿體(toxoplasma)、德國麻疹(rubella)和巨細胞病毒(cytomegalovirus)感染]、聽覺創傷(acoustic trauma)及耳毒藥品(ototoxic drugs，例如 aminoglycosides)。約有 1/1000 嬰兒在出生時或在小孩早期(即語言學習前時期 prelingual period)罹患重度聽障(嚴重或極嚴重)，已開發國家約有 60 %個案是遺傳因素(Marazita et al., 1993)。另有 1/1000 到成年前聽障，此型較不嚴重且為漸進性(progressive)，遺傳因素佔多少比例仍未清楚。另外為晚發型(late onset)，聽力損失大於 65 分貝(dB HL)，年齡 30~50 歲間佔全人之 0.3 %，而 60~70 歲約佔 2.3 %，一般認為此類型是遺傳與環境因素之共同作用而產生 (Kalatzis et al., 1998)。聽障可依數個標準來分類，如耳朵缺陷種類、優耳聽障程度、發病年齡與其他症狀有否關聯等來分類，在遺傳學上常以是否與其他症候群有關聯來區分為兩大類：

一、 症候群聽障(Syndromic Hearing Loss ; SHL)

根據統計語言學習前聽障中有 30 %是屬於此類，有數十種症候群

涉及，除聽障外尚有各種異常(如眼睛、肌肉、骨骼、腎臟、神經和色素的異常)，此型有許多型之遺傳方式，包含源自於粒腺體突變之母系遺傳。

二、 非症候群聽障(Nonsyndromic Hearing Loss ; NSHL)

此型僅有聽障而沒有其他症候群症狀出現，70 %聽障是屬於此類，DFNA 表示體顯性遺傳(autosomal dominant form)，DFNB 表示體隱性遺傳(autosomal recessive form)，DFN 表示性聯遺傳(X-linked)，在語言學習前聽障中 DFNB 佔 77 %的個案，而 DFNA 佔 22 %，DFN 約 1 %，另小於 1 %的比例是與粒腺體基因有關的(Morton 1991)。目前已知有 58 個已定位之基因涉及(16 個 DFNA、11 個 DFNB 和 6 個 DFN，及至少 38 個基因合併有症候群聽障)，及 2 個母系遺傳之粒腺體基因 12S rRNA 和 tRNA^{ser(UCN)} (Morton 2002)。

DFNB 的聽障通常是最嚴重的，大部份為先天性重度聽障(congenital deafness)，幾乎是因耳蝸缺陷(cochlear defects)而產生之感音神經(sensorineural)聽障，而語言學習後聽障(postlingual deafness) 由許多家族譜(pedigrees)判斷可能為體顯性遺傳或因粒腺體基因突變之母系遺傳，隱性遺傳則非常稀少，主要也是感音神經缺陷的且常為漸進性(progressive)。在晚發型(late-onset

作為前庭導管的直徑大小(朱水松等., 1999), 前庭導管的中段直徑正常範圍在 0.4-1.0 mm 之間, 平均為 0.62 mm, 當大於 1.5 mm 時, 就認為是前庭導管異常的擴大。前者三種特徵如不具有甲狀腺腫, 只有 Mondini 氏畸型和前庭導管擴大即為非症候群聽障。

Reardon 等人(2000)表示前庭導管擴大可被考慮為最有可能呈現 Pendred 症候群, 其發現 57 位有前庭導管擴大的聽障患者中有 49 位有 Pendred 症候群的徵兆。Masmoudi 等人(2000)發現一個 Pendred 症候群家族中的 23 位成員, 進行內耳電腦斷層掃描, 全都有前庭導管擴大, 但是只有 11 位具有甲狀腺腫。嚴重至極嚴重先天性聽力喪失的患者可以根據內耳形態上的異常來分析 *PDS* 基因。

Coyle 等人(1996)及 Sheffield 等人(1996)證實 *PDS* 基因位於 7q31 的位置, 此基因有 21 個 exons, open reading frame 為 2343 bp, 可譯出 780 個氨基酸之蛋白(Pendred protein)(分子量為 86 KD), Pendred protein 是一種穿膜蛋白(圖一), 具有 11 個穿膜區域(transmembrane domain), 其氨基端(amino acid terminal)位於細胞質內而其羧基端(carboxyl terminal)則位於細胞質外(Everett et al., 1997), Pendred 蛋白稱為 "pendrin", 主要功能是為氯離子(chloride ion)及碘離子(iodide ion)的運輸蛋白(transporter), 此蛋

白可高度表現於甲狀腺(thyroid)、少量表現在腎臟(kidney)(Scott et al., 2000)，而且 Pendred 蛋白被證實表現在人類胎兒耳蝸中(Everett et al., 1997)與老鼠的內淋巴管(endolymphotic duct)與內淋巴囊(endolymphotic sac)中(Evevete et al., 1999) (圖二)，對於內耳中內淋巴液的平衡有著重要影響。

至目前為止，*PDS* 基因有 47 個位置突變被發現(Campbell et al., 2001) (附表一)，但只有其中 12 種突變是與家族性有關，最常見為 L236P (16%)、T416P (15%)及 IVS 8 +1G→A (14%)。目前在台灣地區尚未有關聽障與 *PDS* 基因之研究報告，且基因異常常有地區性，因此我們想要了解非症候群感音神經性聽障與 *PDS* 基因突變之關聯性。在此研究中我們收集 10 位非症候群感音神經性聽障合併有 Mondini 異常及前庭導管擴大的聽障患者，利用 PCR、DNA 定序、SSCP 及 RT-PCR 之方法找到新的突變點：IVS 7 -2A→G/IVS 7 -2A→G (同型結合子)佔 70%；IVS 15 +5G→A/wt (異型結合子)佔 20%及 IVS 16 -6G→A/wt(異型結合子)佔 10%，以建立台灣地區 *PDS* 基因突變之基本資料。

材料與方法

(Material and Method)

一、檢體來源：

1. 正常人的血液檢體係透過自願的方式，抽取周邊血液 5 ml，共有 50 位。

2. 病人資料：

收集 10 位台中榮民總醫院耳鼻喉科門診聽障患者(3 位男性；7 位女性)，經由耳鼻喉科醫師詳細檢查及電腦斷層攝影(Computerized Tomography)影像分析(圖三、四)，臨床表徵合併有前庭導管擴大(Enlarge Vestibular Aqueduct)及 Mondini's 發育異常(Mondini's dysplasia)，並排除環境因素及學習後語言聽障(postlingual deafness)，主要以非症候群學習語言前聽障(nonsyndromic prelingual hearing loss)為對象，此包含家族性聽障及偶發性個案(sporadic deafness)，經家屬同意後，抽取周邊血液 10 ml。並依空氣傳導平均聽閾(ACPTA) 500，1000 及 2000Hz 結果區分聽障輕重程度：

Degree	ACPTA range
Mild	$25 < ACPTA \leq 39$ dB HL
Moderate	$40 < ACPTA \leq 69$ dB HL
Severe	$70 < ACPTA \leq 89$ dB HL
Profound	$ACPTA \geq 90$ dB HL

二、 血液淋巴球細胞轉型方法：

由於檢體收集不易，我們儘可能將聽障病人及家屬之淋巴球細胞轉型為 lymphoblastoid cell，淋巴球細胞轉型之方法係參考 Neitzel 的報告修改而來(Neitzel, 1986)。詳細步驟呈述如下：將 10 ml 含 heparin 之血液，用 1 倍 PBS 等量稀釋，同時準備 15 ml 之離心管並加入 1 倍 PBS 稀釋後血液量 1/2 體積的 Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech)。接著緩緩加入稀釋血液，在 1500 rpm 下離心 30 分鐘之後(離心機：HITACHI O5P-21)，將 buffy coat (離心後分四層，此為灰白色之第二層)置於新的離心管並加入 10 ml 的 1 倍 PBS 清洗(上下 pipetting 3~5 次)，離心 1,500 rpm，10 分鐘之後，倒掉上清液再重覆此清洗步驟 2 次。然後，倒掉上清液並視 pellet 之大小加入至少 2 ml 之 transformation medium [RPMI 1640 (GIBCO) + 2 μ g/ml cyclosporin A (Sandoz) + 1/7 v/v filtered Epstein-Barr virus (EBV: ATCC 1395-8) + 20% FBS (GIBCO) + 1% L-glutamine (GIBCO) + 1% PSN (GIBCO)]，混合均勻後再將約 2 ml 含淋巴球細胞的 medium 轉置到直徑為 16mm 之 well 中(每一 plate dish (NUNC)有 24 wells)，放入 incubator 中(37 °C；5 % CO₂)培養。3 天後，加入 2~3 滴(26 號針頭)之 PHA (Phytohemagglutinin；GIBCO)；4 天後，培養液更換

為 maintenance medium [1 $\mu\text{g/ml}$ cyclosporin A + RPMI-1640 (GIBCO) + 20 % FBS(GIBCO) + 1 % L-glutamine (GIBCO) + 1% PSN(GIBCO)]。每七天換一次培養液，視細胞生長狀況 (colony 之多寡)，二至四週後將細胞換到 25 cm^2 flask 中培養至足夠量後，冷凍細胞於 -196°C 液態氮中長期保存。

三、 *Genomic DNA* 的抽取：

以含有 heparin 的 5 ml 周邊血液，利用 PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra；方法參照附錄 A) 進行 genomic DNA 的抽取。純化後的 genomic DNA 以光度比色儀 (Spectrophotometer DU-640, Beckman) 測波長 260nm 的相對吸光值及 260 nm/280 nm 吸光比值，由此得知 DNA 的量與質，將此 genomic DNA 保存至 -20°C 。

四、 *PDS* 基因的分析：

我們主要針對 *PDS* 基因 21 個 exons 進行突變點的偵測，Primer 的設計與進行方法參考 Scott 等人(2000) (附表二)，運用 DNA 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)以擴增出各段完整的 coding sequences，反應體積為 25 μl ，溶液濃度為 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)，50 mM KCl，1.5 mM MgCl_2 ，dNTP 100 μM ，0.25 units/25 μl pro Taq DNA

polymerase (Promega), 200 μ M primers, 4 % DMSO 及 100 ng genomic DNA, 將此反應溶液置於迴溫反應器(Perkin-Elmer 9700)中進行, 反應條件依 exons 不同而有所變化。取反應溶液 5 μ l 以 2 % 洋菜膠(agarose)電泳分析, 以確定合成片段長度是否正確及 PCR 產物的品質, 再使用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)純化 PCR 產物(方法參照附錄 B)。定序使用 ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems; 方法參照附錄 C)及 ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)進行兩端序列比對並定序。

五、 DNA 單股構型多形性分析：

(Single Strand DNA Conformation Polymorphism; SSCP)

因為 *PDS* 基因含蓋許多 exons, 可先運用 DNA 單股構型多形性分析(Single Strand DNA Conformation Polymorphism; SSCP)來進行大量的篩選(圖六), 當發現 DNA 單股構型中變異現象表示可能由於突變點造成 DNA 有不同的構型, 再進一步針對疑似突變點之 exon 進行 DNA 序列分析, 以突變型當做正的對照組, 以已知正常檢體(已確定正常之定序)做為負的對照組, 快速進行實驗對照組的篩選。因此將 PCR 反應結束後的

產物加入 10 μ l formamide loading dye，加熱 95 $^{\circ}$ C 10 min 後立即放置冰上，其目的在於將雙股的 DNA 打開成單股，loading 2.5 μ l 於含 5 % glycerol、0.5 倍 TBE buffer 之 8 % Polyacrylamide (acrylamide:bisacrylamide=49:1)膠體電泳，電泳條件為 24 $^{\circ}$ C、15 瓦、5~6 小時進行 DNA 片段的分離，電泳完成後將膠體使用 DNA Silver Staining Kit (Pharmacia Biotech) (方法參照附錄 D)，膠體銀染呈色後放置室溫自然乾燥後存放。

六、RT-PCR 反轉錄 DNA 聚合酶鏈鎖反應 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

經由突變點的偵測發現 prelingual deafness 患者 *PDS* 基因突變型都在 intron 與 exon 交接處的 splice site 突變，所以由 RT-PCR 方法分析這些突變是否也會造成 mRNA 異常。將轉型後的血液淋巴球細胞從 25 cm^2 flask 中抽至 15 ml 離心管，離心 1,500rpm，10 min 去除上清液後利用 PURETRANSCRIP RNA isolation kit (GENTRA) (方法參照附錄 E)抽取 total RNA，取 3 μ l 以 2 % 洋菜膠(agarose)電泳分析，以確定 RNA 產物，再取 5 μ l RNA、200 units 反轉錄酶(M-MLV Reverse Transcriptase ; Promega)與 50-250ng Random Hexamers oligo(dT)₁₅ 進行 cDNA

的合成。此實驗主要是針對 PDS 基因突變點分析其 mRNA 的表現，因此將合成的 cDNA 進行 PCR 擴增。為了分析 IVS 7 -2A→G 變異 mRNA 的表現，PCR 所使用的正向引子序列為：5'-GTGAGGTACTTGGCAGATCCTT-3'，反向引子序列為：5'-CCTACTGCACTGCAATAGC-3'，總反應體積為 25 μ l，溶液濃度為 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)，50 mM KCl，1.5 mM MgCl₂，100 μ M dNTP，0.25 unit ProTaq DNA polymerase (Promega)，200 μ M primers 及 1-10 μ l cDNA，將此反應溶液置於迴溫反應器(Perkin-Elmer 9700)中進行。取 PCR 反應溶液 10 μ l 以 2 % 洋菜膠(agarose)電泳分析，以確定合成片段長度及 RT-PCR 產物的品質。再使用 Gel-M™ Gel extraction System (VIOGEN) (方法參照附錄 F)，由膠體回收 PCR 產物將回收產物進行定序，定序使用 ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)及 ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)分析軟體進行兩端序列比對並定序。

結果

(Result)

本研究分析 10 位臨床上具有前庭導管擴大及耳蝸發育不全的非症候群語言學習前感音神經性聽障兒童的 *PDS* 基因，由電腦斷層掃描結果顯示，聽障患者前庭導管中段及腦部開口的直徑較正常人大(圖三)。由表一中可得知，9 位患者多為兩側性前庭導管擴大，另 1 位患者(PDS-004)則無法取得其原始資料。根據表一顯示右側耳朵前庭導管中段平均為 3.2 mm，左側耳朵前庭導管中段平均 2.54 mm，同時合併有 Mondini 氏畸型(圖四)，聽力受損程度為重度及極重度，10 位 *PDS* 患者之左右耳的三個音頻 500 Hz、1000 Hz 及 2000 Hz 之平均值其數據顯示於(表一)。其平均聽閾分佈測試圖顯示，在音頻 500 Hz、1000 Hz 及 2000 Hz 之各別平均值(右耳：76±4.4 dB、84.5±4.74 dB、93.5±4.95 dB；左耳：76.5±3.34 dB、87±3.67 dB、92.5±2.91 dB)(圖五)，其對音閾感度明顯高於聽力正常人(< 25 dB)。以 PCR 方法及逐一定序分析 *PDS* 基因上 21 個 exons，發現三個 *PDS* 基因的突變點。另外我們也收集 50 位聽力正常人的檢體，以 SSCP 的方法快速進行 *PDS* 基因的篩檢(圖六)並無發現異常或 *PDS* 基因多型性。

10 位患者結果分析整理於表(二)，在患者 PDS-001、PDS-002、PDS-003、PDS-004、PDS-006、PDS-009 的 *PDS* 基因分析結果發現

IVS 7 -2A→G/IVS 7 -2A→G 為同型接合子突變型(Homozygous mutant) (圖七、八)，PDS-010 的 *PDS* 基因分析結果發現為 IVS7-2A→G/wt 異型接合子突變型(Heterozygous mutant) (圖七、八)，在患者 PDS-005 *PDS* 基因分析結果發現為 IVS 16 -6G→A/wt 異型接合子突變型(Heterozygous mutant)(圖九、十)，在患者 PDS-007 與 PDS-008 的 *PDS* 基因分析結果發現為 IVS 15 +5G→A/wt 異型接合子突變型(Heterozygous mutant)(圖十一、十二)。實驗分析的結果與國外已知的 47 個位置突變完全不同，是否 *PDS* 基因的突變存在有族群的特異性，還需要收集更多的具有前庭導管擴大及耳蝸發育不全的非症候群語言學習前感音神經性聽障兒童的 *PDS* 基因進行分析。

為能更深入了解突變型 *PDS* 基因是否為親代遺傳或是 *de novo*，故收集 5 個家族(共 11 位成員)(圖十三)進行分析，針對其 *PDS* 基因 IVS 7 -2A→G 同型接合子突變型(Homozygous)患者的雙親進行序列比對(表三)，結果發現 PDS-001 家族之父母親 *PDS* 基因皆為 IVS 7 -2A→G/wt 異型接合子突變型(Heterozygous mutant)且為聽力正常，PDS 001 家族之聽障弟弟其 *PDS* 基因分析結果為 IVS 7 -2A→G/IVS 7 -2A→G 同型接合子突變型(Homozygous mutant)，而其他家族之父母親 *PDS* 基因也皆為 IVS 7 -2A→G/ wt 異型接合子突變型(Heterozygous mutant)且為聽力正常。

已知 IVS 7 -2A→G 突變點是位於 splice acceptor site，這個突變最可能影響 *PDS* 基因的剪接(splicing)改變，而造成不正常的 RNA 產物，因此藉由 mRNA 的分析 *PDS* 基因 IVS 7 -2A→G 突變型是否對 RNA 產物造成影響。

由 RT-PCR 的電泳圖結果得知(圖十四)，正常對照組的 *PDS* 基因 mRNA 的片段長度為 295 bp (lane 2、3)，而 IVS 7 -2A→G 突變型 *PDS* 基因的 mRNA 的片段長度較正常對照組短(lane 4)，兩者相差的片段長度猜測可能是 IVS 7 -2A→G 突變會改變 *PDS* 基因的 RNA 序列。因此將此 RT-PCR 的產物經由電泳膠體回收後純化，於 ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)進行兩端序列，定序結果顯示於(圖十五 A)，同時與正常對照組的序列相比較的結果顯示於(圖十五 B)。IVS 7 -2A→G 突變型 *PDS* 基因的 mRNA 序列較正常對照組減少了 83 bp，比較其結果顯示，缺失的片段為 *PDS* 基因完整的 exon 8 序列以卡通圖顯示(圖十六)。

討論

(Discussion)

前庭導水管乃介於耳前庭內側壁與岩錐(petrous pyramid)後表面之骨性管道，其內有由橢圓囊管與球囊管匯合而成的內淋巴管通過。此內淋巴管經圓囊與耳蝸管(cochlear duct)相接於連合管(ductus reuniens)，而另端則終於內淋巴囊，始見於胚胎時期的第4週，於第5週到其最大直徑，此時的前庭導水管明顯較成人時為寬短。其後隨著後顱窩的發育，於第5週至第8週間逐漸地變窄變長，特別是遠端3分之2的部份受到後顱窩硬腦膜與乙狀靜脈竇(sigmoid sinus)的牽引而在半規管的共同腳(common crus)後方轉彎(接近90度)行向後下內聽道口與乙狀竇間的岩錐的後顱窩面。

本研究根據臨床症狀表徵非症候群學習語言前聽障(nonsyndromic prelingual hearing loss)之10位兒童合併有前庭導管擴大(Enlarge Vestibular Aqueduct; EVA)及 Mondini's 發育異常(Mondini's dysplasia)，經過 DNA 聚合酶鏈鎖反應與定序之分析的所得結果發現，收集到的患者 *PDS* 基因異常在本篇研究中佔相當大的比例，分別是 IVS 7 -2A→G (70%)，IVS 15 +5G→A (10%)，IVS 16 -6G→A (20%)三種突變型，推測這三種突變型會造成前庭導管與顱骨(temporal bone)異常。所以非症候群學習語言前聽障之患者可以藉由

臨床電腦斷層掃描，發現有前庭導管擴大(Enlarge Vestibular Aqueduct)及 Mondini's 發育異常(Mondini's dysplasia)之患者，可以很快速的以分子生物技術篩檢出是否有 *PDS* 基因異常。

雖然 10 位聽障患者都有前庭導管擴大(Enlarge Vestibular Aqueduct)及 Mondini's 發育異常(Mondini's dysplasia)，但是其 *PDS* 基因表現型有六位是 IVS 7 -2A→G 突變的同型接合子，一位是 IVS 7 -2A→G 突變的異型接合子，一位是 IVS 16 -6G→A 突變的異型接合子，二位是 IVS 15 +5G→A 突變的異型接合子，經由分析患者的雙親的序列比對結果，顯示父母親 *PDS* 基因皆為 IVS7-2A→G 突變的異型結合子且為聽力正常，由此結果暗示 *PDS* 基因異常是造成體染色體隱性遺傳性聽障，經分子生物技術方法發現 *PDS* 基因突變的異型接合子的聽障患者可能有合併其它的基因異常所引起，並非由單純的單一基因異常所引起聽障。

Lopez-Bigas 等人(1999)發表 *PDS* 基因 intron 4 上核酸位置 639+7A→G 會造成新的 donor splice site，導致 mRNA 多產生 6 個核酸，產生新的 stop codon，而造成不成熟截斷蛋白質(truncated protein)。我們經由突變點的偵測發現 prelingual deafness 患者 *PDS* 基因突變點位於 intron 上，為了進一步了解 IVS 7 -2A→G 對於 acceptor splice site 的影響，藉由 RT-PCR (圖十四)實驗結果證實 *PDS* 基因

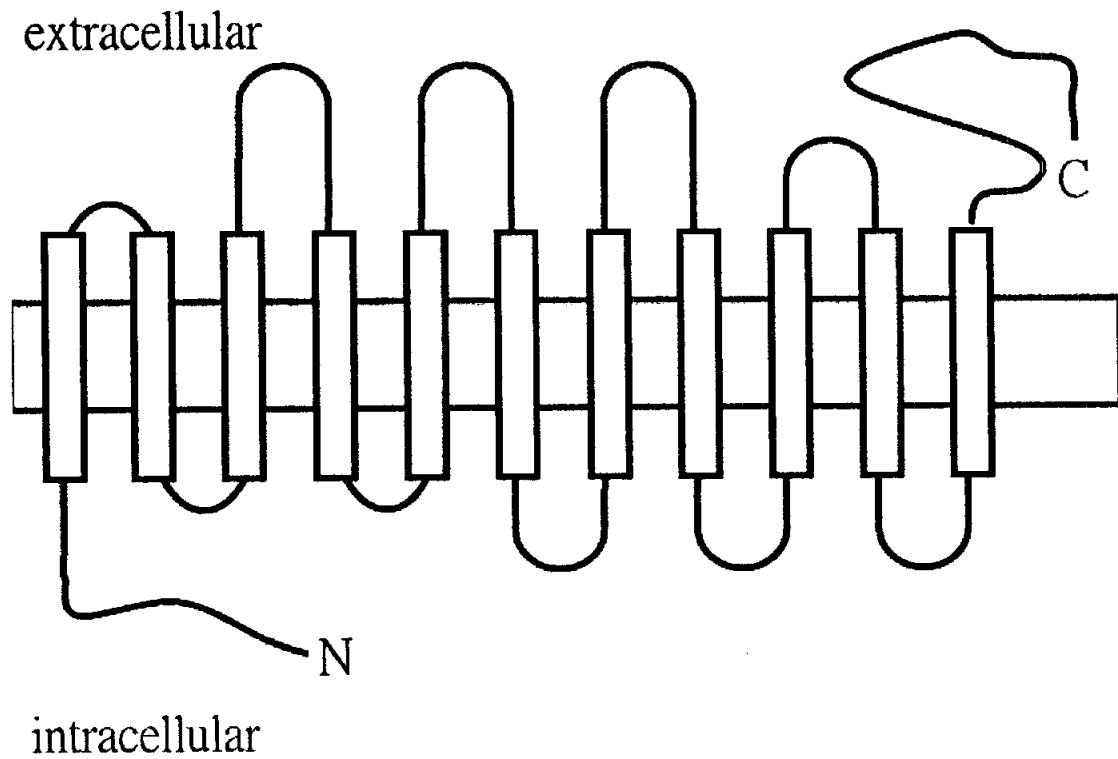
IVS7-2A→G 突變造成剪接的異常，使 DNA 轉錄成 mRNA 時，造成整段 exon 8 mRNA 的缺失，IVS 7 -2A→G 突變會造成轉譯前 mRNA 剪接的錯誤，造成完整的 Exon 8 序列缺失，因而引起 frameshift，並在第 311 個胺基酸位置形成停止密碼(stop codon)而造成 PDS 截斷蛋白(truncated protein) (圖十七)。而另外兩種異型接合子 IVS 15 +5G→A 與 IVS 16 -6G→A，我們推測可能會產生一個 cyptic donor/acceptor splice site，而形成不正常剪接，可能會產生正常及異常的 RNA 產物，我們曾經以 RT-PCR 方法來證明這兩種突變型 RNA 的表現，但是一直無法得到完整的結果。因此針對這兩種異型接合子 IVS 15 +5G→A 與 IVS16 -6G→A 的表現有待來日藉由 Northern blot 分析 RNA 的表現，或是以直接分析 PDS 蛋白的產物表現之實驗證明。後續研究將探討並分析 *PDS* 基因之功能，進行(1)建構 wild type 及 mutated *PDS* cDNA 載體分析 *PDS* protein 功能影響之研究，(2)*PDS* 基因正常和突變之蛋白運輸至細胞膜上功能的影響之探討，(3)探討正常 *PDS* 與 mutated *PDS* 蛋白在氯離子電流的攝取與電生理功能上的差異。

Scott 等人(2000)發表 *PDS* 症候群的 *PDS* 蛋白 (pendrin)突變包括 L236P、V480D 與 V653A 會完全喪失氯離子及碘離子的運輸，造成嚴重的甲狀腺腫症狀產生；然而 I490L/G497S、V653A 和 V480D 仍有殘餘的氯離子及碘離子足夠維持甲狀腺正常的功能，但是在

DFNB4 的聽障患者中造成聽力喪失與內耳的發育畸型。將 *PDS* 基因完全剔除掉的老鼠(-/-)，會造成聽力的完全喪失但不會造成甲狀腺功能的異常(Everett et al, 2001)，顯示 *PDS* 蛋白對於內耳影響可能比甲狀腺更重要，因為甲狀腺對於碘的攝取除了經由 *PDS* 蛋白的運輸之外還可經由其它的管道來進行(Scott et al, 2000)。

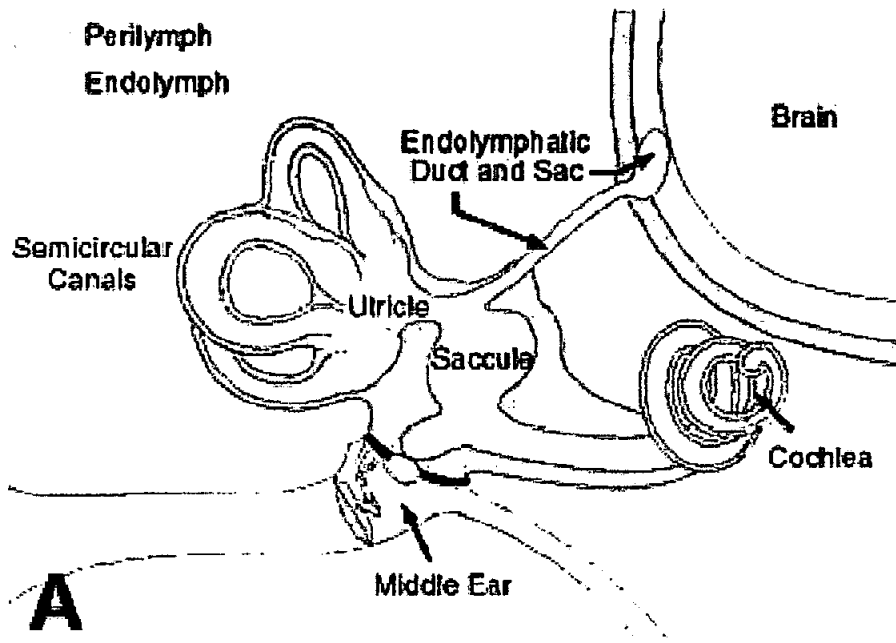
由於 *PDS* 基因的突變點位於 intron，造成 *PDS* 基因無法形成正常 pendrin 或造成量的減少，pendrin 對陰離子的運輸正常與否，在維持內耳淋巴液的離子平衡在聽力的傳導過程中是非常重要的。

本研究雖然只收集 10 位聽障患者，所得到的結果令人相當興奮，實驗結果證明具有 Modini 氏畸型及前庭導管擴大之聽障患者的 *PDS* 基因皆有突變，在正常人 *PDS* 基因並沒有發現有核苷酸變異，因此分子診斷技術可以提供臨床醫師做為 Modini 氏畸型及前庭導管擴大之聽障患者的基因檢測指標。



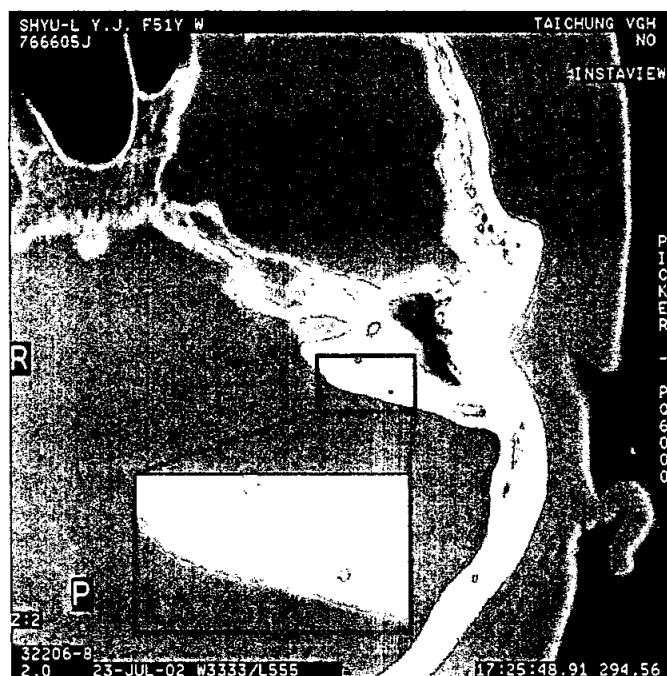
● Model of the human pendrin protein

圖一 Human pendrin protein 之構造。Pendrin 是一膜蛋白，共有 11 個 transmembrane 區域，其 N-端位於細胞質而 C-端位於細胞外。

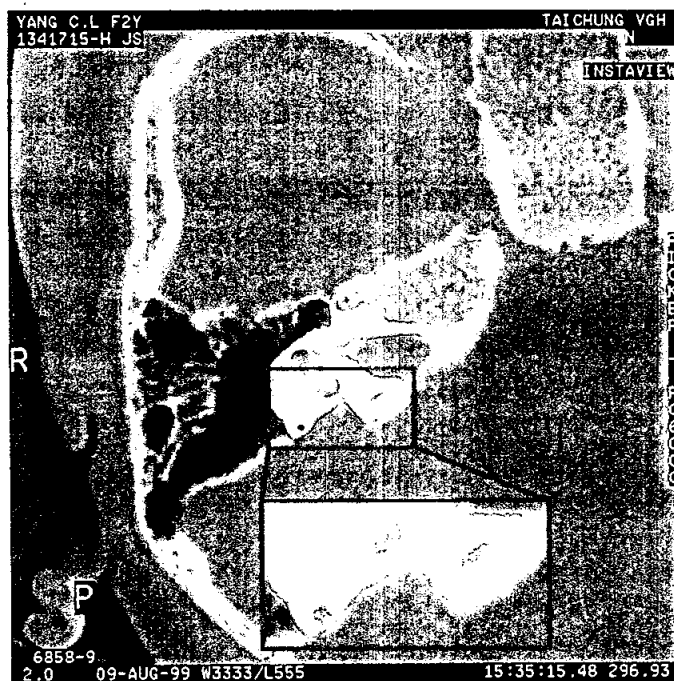


圖二 Pendred 蛋白表現在人類胎兒耳蝸中(Everett et al.,1997)與內淋巴管(endolymphatic duct)和內淋囊(endolymphatic sac)。(PNAS vol 96, 9727, 1999)。

A

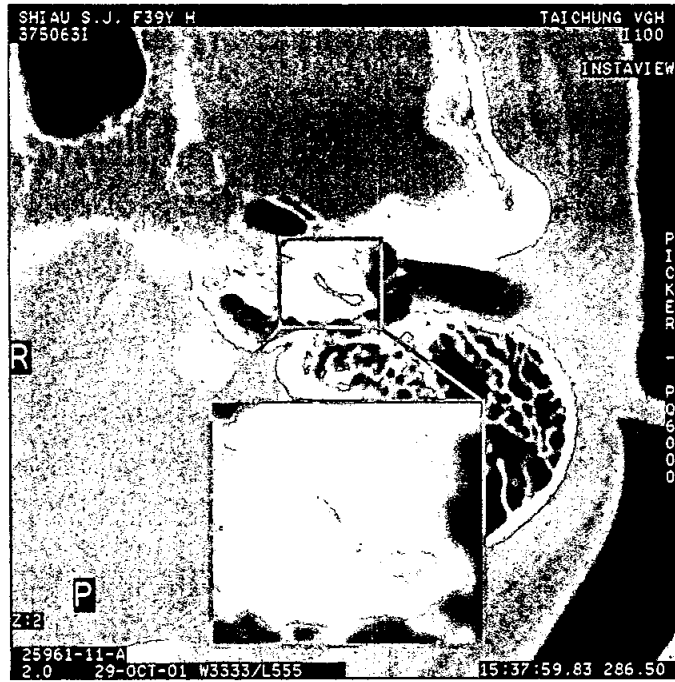


B

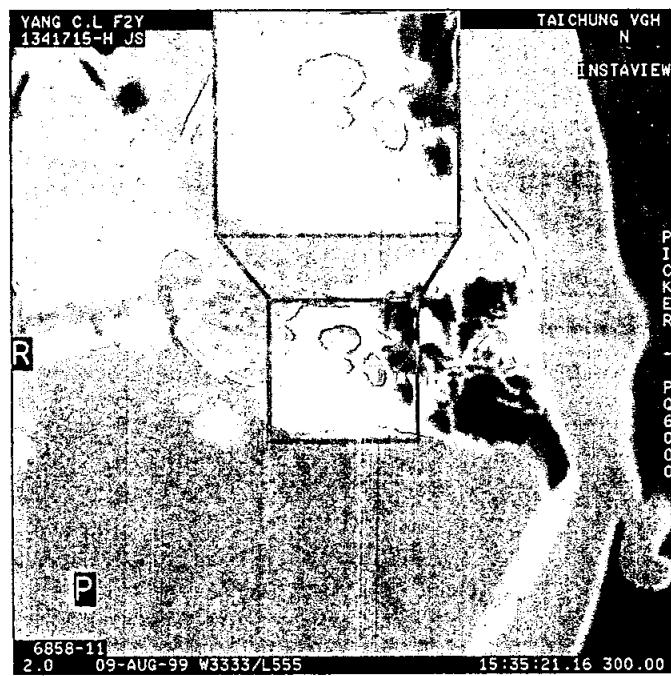


圖三 前庭導管之電腦斷層掃瞄。(A)正常前庭導管之電腦斷層掃瞄；(B)前庭導管擴大之電腦斷層掃瞄(PDS-010)。

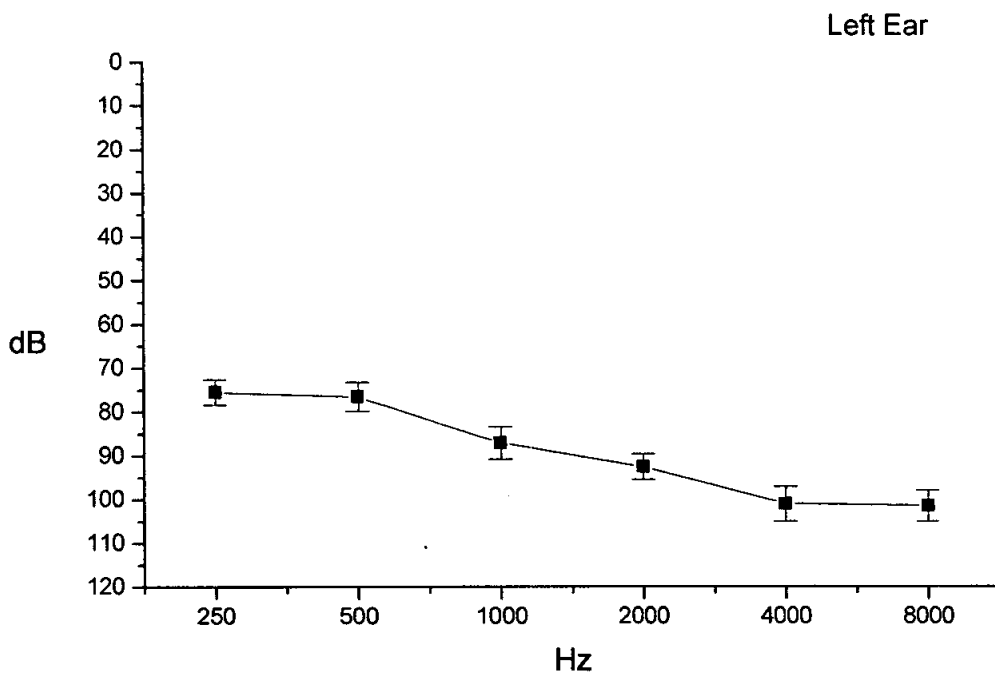
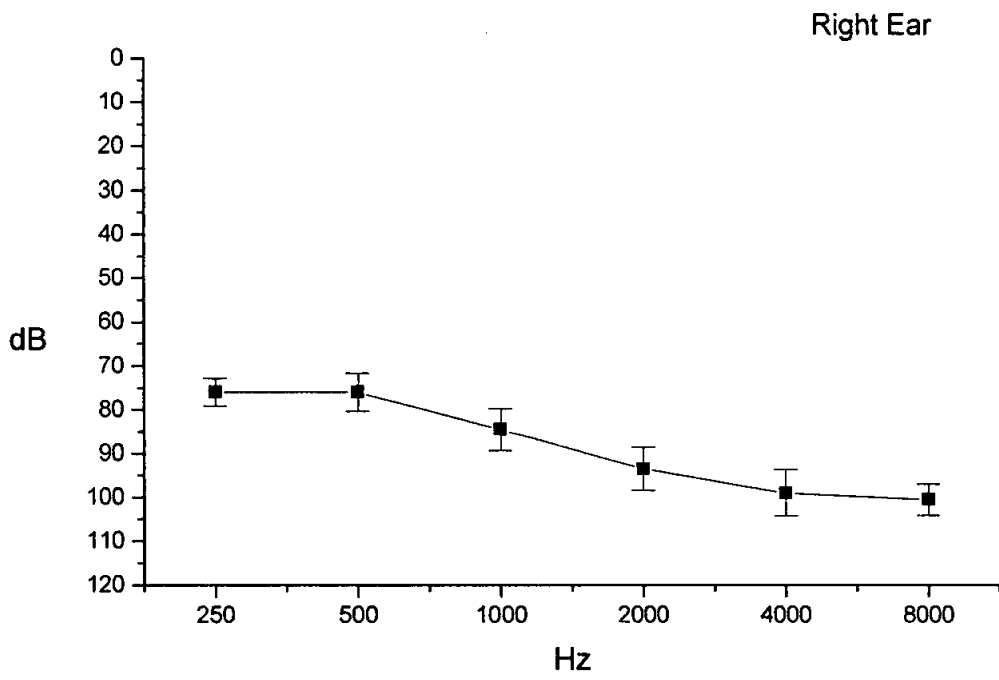
A



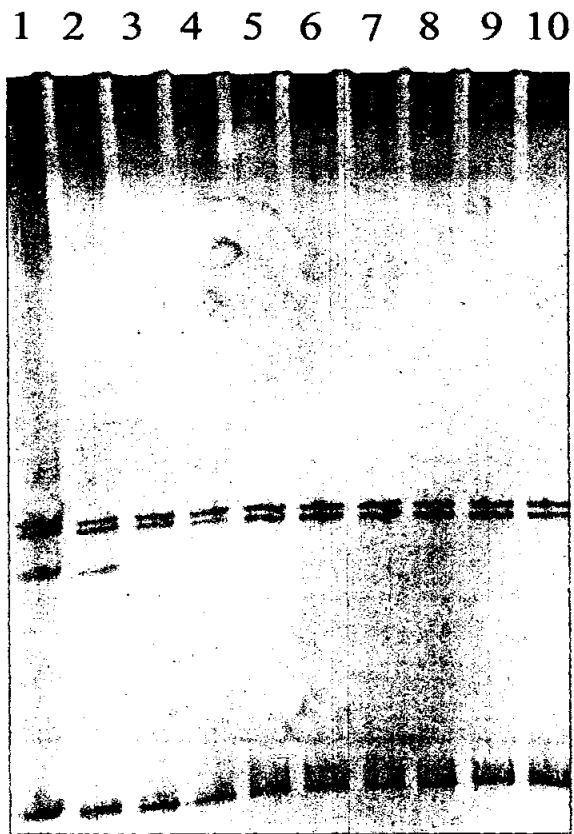
B



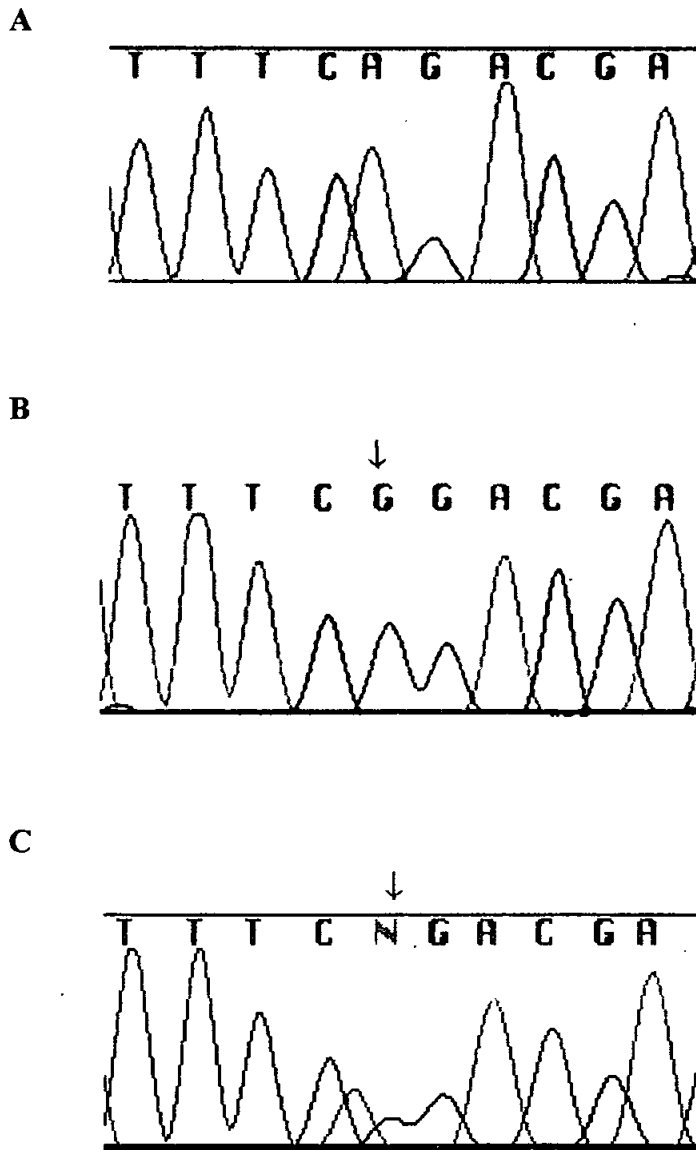
圖四 耳蝸之電腦斷層掃描。(A)正常耳蝸之電腦斷層掃描；(B) Mondini's 耳蝸之電腦斷層掃描(PDS-010)。



圖五 10 位 PDS 患者平均聽力圖

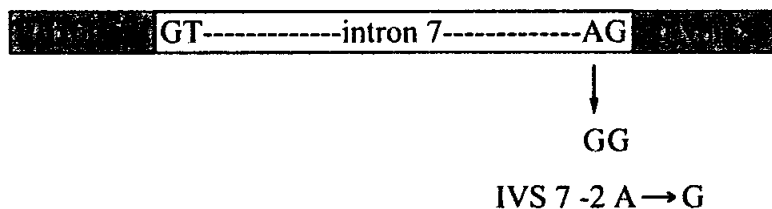


圖六 *PDS* 基因 exon 15 之 DNA 單股構形多型性分析(Single Strand DNA Conformation Polymorphism, SSCP)。Lane 1、2：已知 *PDS* exon 15 突變型；Lane 3、4：已知正常 *PDS* exon 15；Lane 5~10：正常人 DNA。



圖七 *PDS* Genomic DNA sequence from PCR-directed DNA sequencing. (A) Normal individual; (B) Homozygous of IVS 7 -2A→G; (C) Heterozygous of IVS 7 -2A→G. Vertical arrow indicates the nucleotide changed.

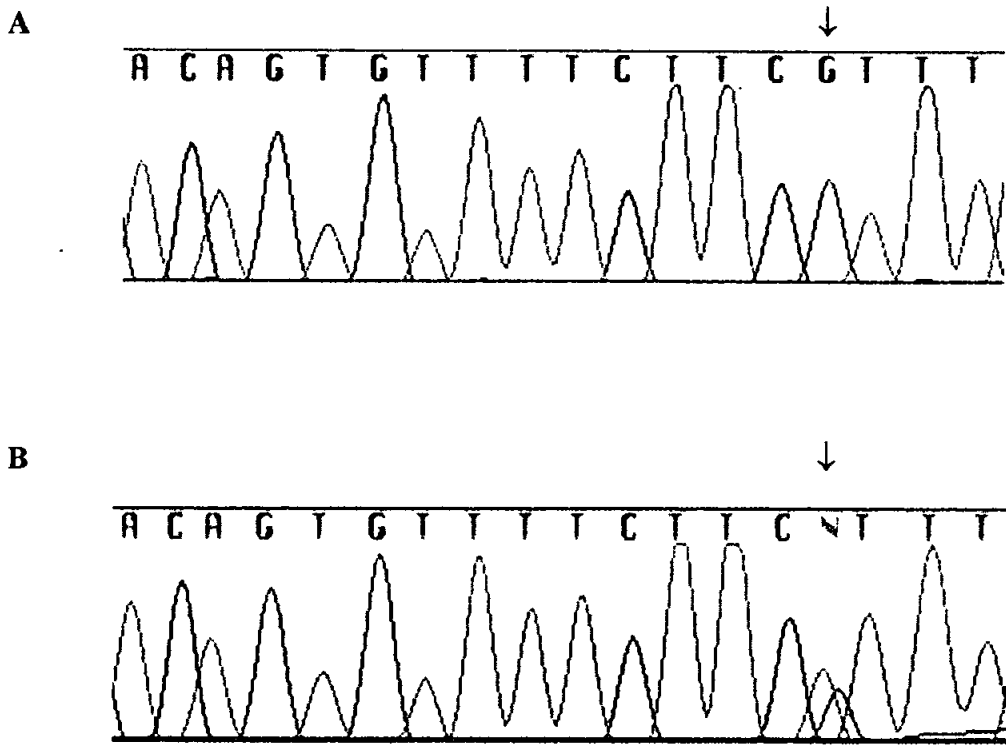
(I)



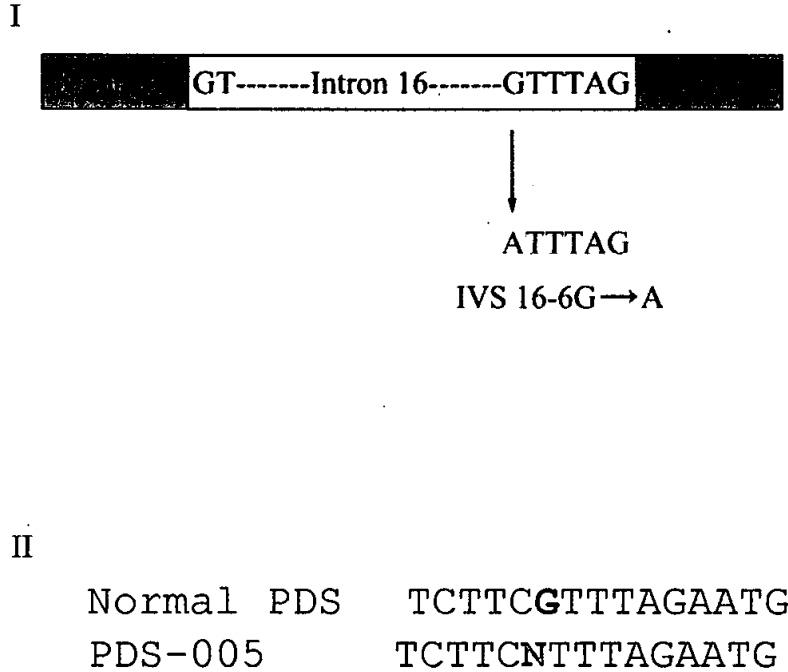
(II)

Normal PDS	TTTCAGACCA
PDS001	TTTCGGACGA
PDS002	TTTCGGACGA
PDS003	TTTCGGACGA
PDS004	TTTCGGACGA
PDS006	TTTCGGACGA
PDS009	TTTCGGACGA
PDS010	TTTCNGACGA

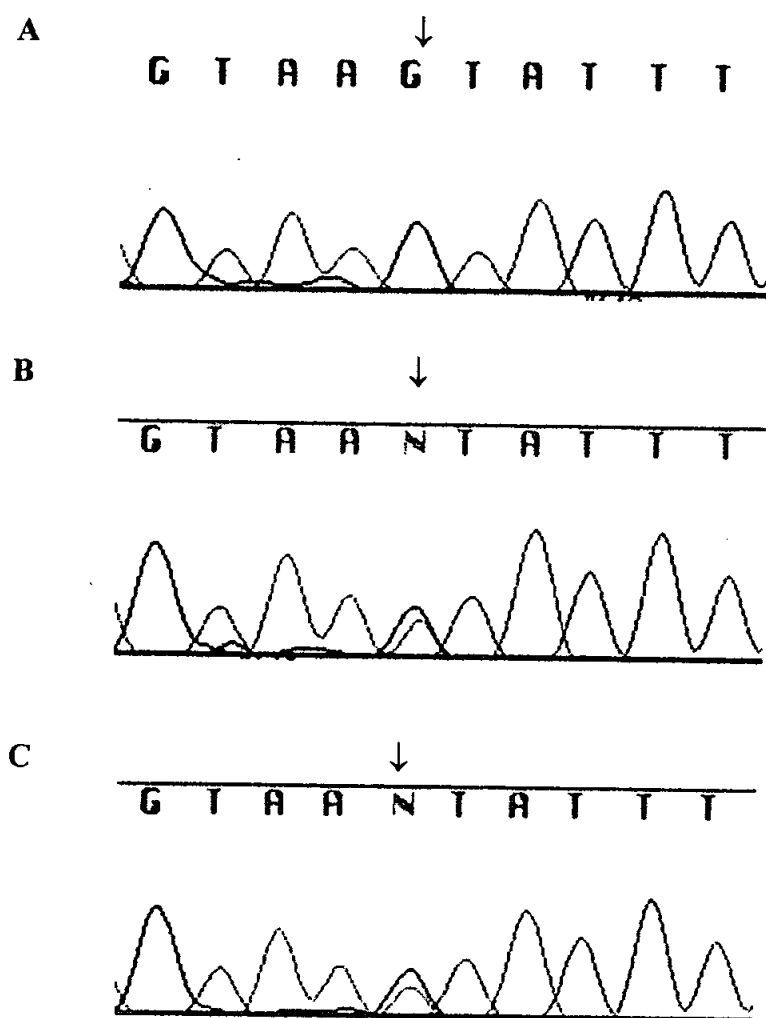
圖八 正常與突變 *PDS* 基因 intron 7/exon 8 區域的序列比較以及正常人與病人之 genomic DNA 經 PCR-directed DNA sequencing 之後，序列比較。(I) 正常的 *PDS* 基因 intron 7/exon 8 區域之結構示意圖，及 IVS 7-2A→G 的突變位置。(II) 正常人與病人之 DNA 序列比較，PDS-010 序列中的 N 表示核苷酸 A 與 G 並存。



圖九 *PDS* 基因 IVS 16 -6G→A 突變基因的序列比較。(A) Normal DNA sequence (B) Heterozygous IVS 16 -6G→A

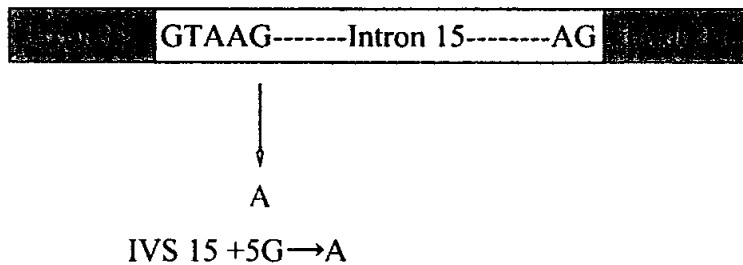


圖十 正常與突變 *PDS* 基因 intron 16/exon 17 區域的序列比較以及正常人與病人之 genomic DNA 經 PCR-directed DNA sequencing 後，序列之比較。(I)正常的 *PDS* 基因 intron 16/exon 17 區域之結構示意圖，及 IVS 16 -6G→A 的突變位置。(II)正常人與病人之 DNA 序列比較，PDS-005 序列中的 N 表示核苷酸 A 與 G 並存。



圖十一 *PDS* 基因 IVS 15 +5G→A 突變的序列。(A) Normal DNA sequence, (B)及(C) Heterozygous IVS 15 +5G→A

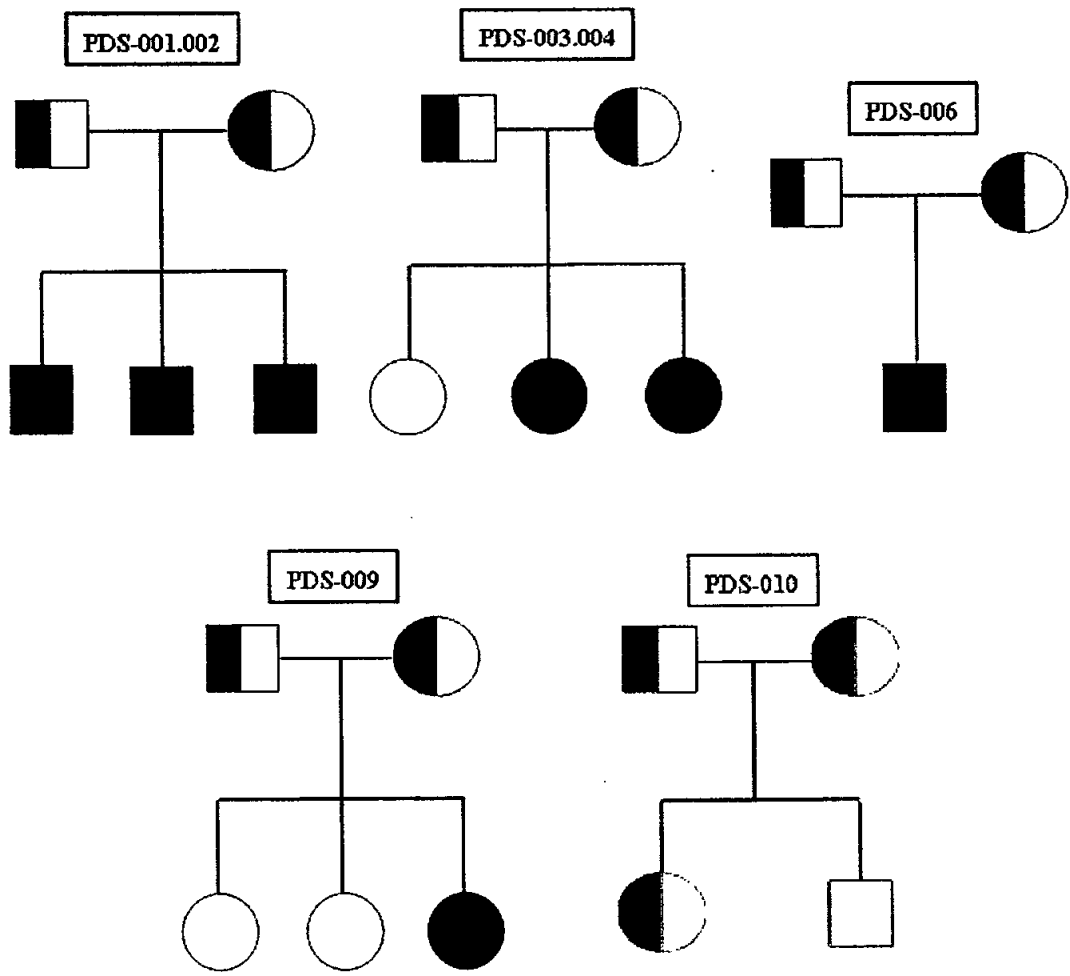
I





II

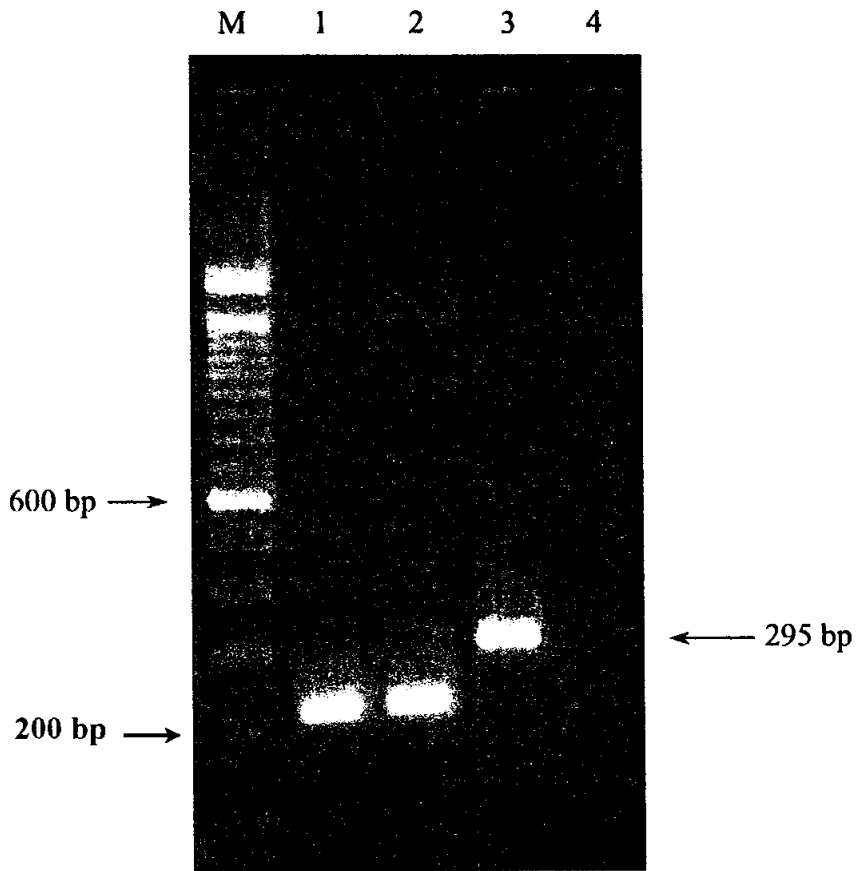
Normal PDS	CCACAGTAAG G TATTT
PDS-007	CCACAGTAANTATTT
PDS-008	CCACAGTAANTATTT

圖十二 正常與突變 *PDS* 基因 exon 15/intron 15 區域的序列比較以及正常人與病人之 genomic DNA 經 PCR-directed DNA sequencing 後，序列之比較。(I) 正常的 *PDS* 基因 exon 15/intron 15 區域之結構示意圖，及 IVS 15 +5A→G 的突變位置。(II) 正常人與病人之 DNA 序列比較，PDS-007、PDS-008 序列中的 N 表示核苷酸 A 與 G 並存。

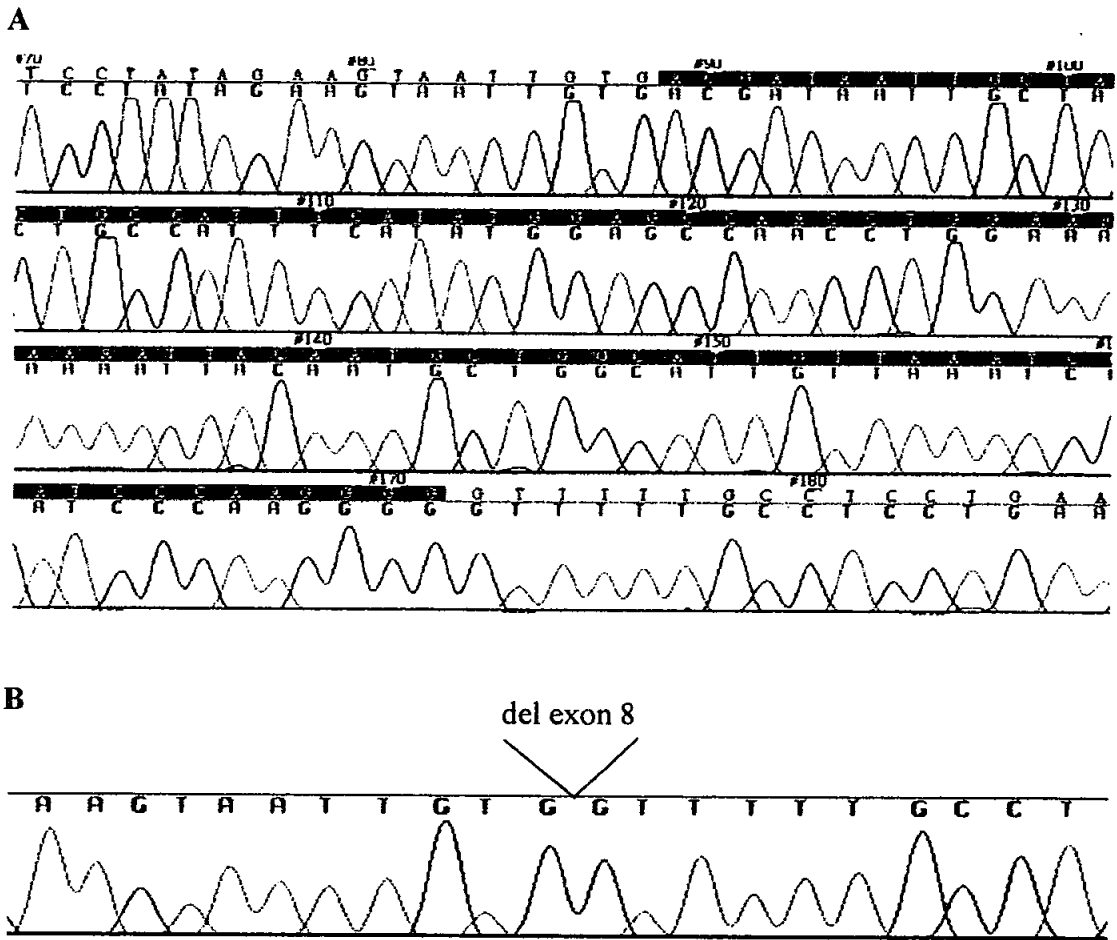


圖十三 IVS 7 -2A→G 五個家族族譜。

 —Homozygous IVS 7 -2A→G
 —Heterozygous IVS 7 -2A→G/wt

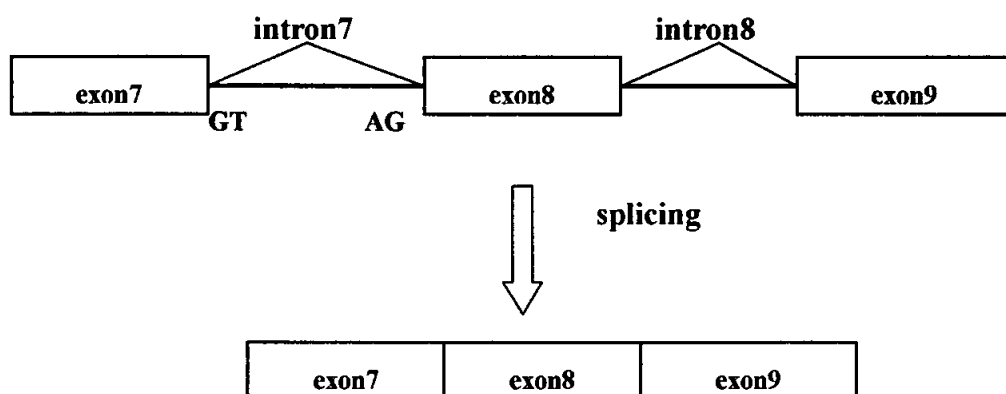


圖十四 *PDS* 基因 mRNA 之 RT-PCR 產物。*PDS* 基因之 RNA 產物，由 RT-PCR 擴增出帶有 exon7~exon9 之 DNA 片段。右方箭頭表示該 DNA 片段大小。M: 100 bp DNA ladder, Lane1: PDS-001, Lane 2: PDS-002, Lane 3: Normal control, and Lane 4: blank

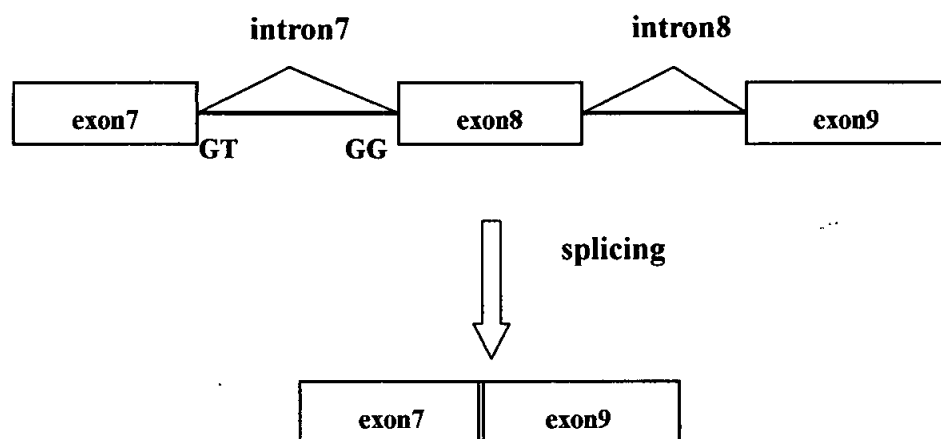


圖十五 (A) Normal *PDS* 之 RT-PCR 產物的序列分析結果。文字反白區域表 exon 8 範圍。(B) *PDS* IVS 7-2A→G mutant allele 之 RT-PCR 產物的序列分析結果。

Normal



突變型 IVS 7-2 A→G



圖十六 正常 *PDS* 基因與 IVS 7-2 A→G 突變基因其 mRNA splicing 之差異。

Amino acid sequence deduced from normal allele (780 a. a.)

1 MAAPGGRSEP PQLPEYSCSY MVS RPVYSEL AFQQQHERRL QERKTLRESL AKCCSCSRKR
61 AFGVLKTLVP ILEWLPKYRV KEWLLSDVIS GVSTGLVATL QGMAYALLAA VPVGYGLYSA
121 FFPILT YFIF GTSRHISVGP FVVVSLMVGS VVLSMAPDEH FLVSSSNGTV LNTTMIDTAA
181 RDTARVLIAS ALTLVGGIIQ LIFGGLQIGF IVRYLADPLV GGFTTAAAFQ VLVSQKIVL
241 NVSTK NYNGV LSI IYTLVEI FQ NIGDTNLA DFTAGLLTIV VCM AVKELND RFRHKIPVPI
301 PIEVIV**TIIA** TAISYGANLE KNYNAGIVKS IPRGFLPPEL PPVSLFSEML AASFSIAVVA
361 YAIAVSVGKV YATKYDYTID GNQEFIAFGI SNIFSGFFSC FVATTALSRT AVQESTGGKT
421 QVAGIISAAI VMIAILALGK LLEPLQKSVL AAVVIANLKG MFMQLCDIPR LWRQNKIDAV
481 IWVFTCI VSI ILGLDLGLLA GLIFGLLTVV LRVQFPSWNG LGSIPSTDIY KSTK NYKNIE
541 EPQGVKILRF SSPIFYGNVD GFKKCIKSTV GFDAIRVYNK RLKALRKIQK LIKSGQLRAT
601 KNGIISDAVS TNAFEPDED IEDLEELDIP TKEIEIQVDW NSELPVKVNV PKVPIHSLVL
661 DCGAISFLDV VGVRS LR VIV KEFQRIDVNV YFASLQDYVI EKLEQCGFFD DNIRKDTFFL
721 TVHDAILYLQ NQVKSQEGQG SILETITLIQ DCKDTLELIE TELTEEELDV QDEAMRTLAS

Amino acid sequence deduced from IVS 7 -2A→G mutant allele (310 a. a.)

1 MAAPGGRSEP PQLPEYSCSY MVS RPVYSEL AFQQQHERRL QERKTLRESL AKCCSCSRKR
61 AFGVLKTLVP ILEWLPKYRV KEWLLSDVIS GVSTGLVATL QGMAYALLAA VPVGYGLYSA
121 FFPILT YFIF GTSRHISVGP FVVVSLMVGS VVLSMAPDEH FLVSSSNGTV LNTTMIDTAA
181 RDTARVLIAS ALTLVGGIIQ LIFGGLQIGF IVRYLADPLV GGFTTAAAFQ VLVSQKIVL
241 NVSTK NYNGV LSI IYTLVEI FQ NIGDTNLA DFTAGLLTIV VCM AVKELND RFRHKIPVPI
301 PIEVIV**VFAS**

圖十七 正常與 IVS 7 -2A→G 變異 *PDS* mRNA 轉譯之蛋白序列比較。

表一 PDS 病人之臨床資料

編號	性別	年齡		Mid-point of V.A. (mm)	Orifice of V.A. (mm)	Diagnosis	PTA (dB)
PDS- 001	男	13	Rt	2.86	5.7	Mondini + E.V.A.	77
			Lt	1.17	3.43	Mondini + E.V.A.	95
PDS- 002	男	9	Rt	3.5	6.3	Mondini + E.V.A.	80
			Lt	3.5	8.18	Mondini + E.V.A.	80
PDS -003	女	12	Rt	4.4	8	Mondini + E.V.A.	86
			Lt	4.37	6.25	Mondini + E.V.A.	90
*PDS- 004	女	10					105
							100
PDS-005	女	6	Rt	2.5	5.6	Mondini + E.V.A.	107
			Lt	1.5	3.1	Mondini + E.V.A.	83
PDS-006	男	4	Rt	2.6	5.27	Mondini + E.V.A.	80
			Lt	2.05	4.98	Mondini + E.V.A.	90
PDS-007	女	9	Rt	4.1	5.9	Mondini + E.V.A.	90
			Lt	3	7.1	Mondini + E.V.A.	83
PDS-008	女	11	Rt	2.5	5.5	Mondini + E.V.A.	62
			Lt	3	5	Mondini + E.V.A.	72
PDS-009	女	10	Rt	2.36	5.33	Mondini + E.V.A.	88
			Lt	1.2	5.31	Mondini + E.V.A.	85
PDS-010	女	5	Rt	3.9	7.9	Mondini + L.V.A.	72
			Lt	3	7.1	Mondini + L.V.A.	78

Mondini=Mondini's dysplasia, E.V.A.=Enlarge Vestibular Aqueduct,

V.A.=Vestibular Aqueduct, PTA=Pure Tone Audiometry

* 此患者無臨床資料

表二 PDS 患者之基因分析結果

病人編號	基因型
PDS 001	IVS 7 -2A→G/IVS 7 -2A→G
PDS 002	
PDS 003	
PDS 004	
PDS 006	
PDS 009	
PDS 010	IVS 7 -2A→G/wt
PDS 007	IVS 15 +5G→A/wt
PDS 008	
PDS 005	IVS 16 -6G→A/wt

表三 分析 5 個聽障家族 PDS 基因之突變

編號	基因型	家族	基因型	聽力狀況
PDS 001 PDS 002	IVS 7 -2A→G/ IVS 7 -2A→G	Father	IVS 7 -2A→G/wt	正常
		Mother	IVS 7 -2A→G/wt	正常
		Brother	IVS 7 -2A→G/IVS 7 -2A →G	聽障
PDS 003 PDS 004	IVS 7 -2A→G/ IVS 7 -2A→G	Father	IVS 7 -2A→G/wt	正常
		Mother	IVS 7 -2A→G/wt	正常
		Sister	IVS 7 -2A→G/wt	正常
PDS 006	IVS 7 -2A→G/ IVS 7 -2A→G	Father	IVS 7 -2A→G/wt	正常
		Mother	IVS 7 -2A→G/wt	正常
PDS 009	IVS 7 -2A→G/ IVS 7 -2A→G	Father	IVS 7 -2A→G/wt	正常
		Mother	IVS 7 -2A→G/wt	正常
PDS 010	IVS 7 -2A→ G/wt	Mother	IVS 7 -2A→G/wt	正常

附表一

PDS Mutation

Exon	Nucleotide Change	Amino acid Change	Families in this study	Other families (references)	Total families
2	85G>C	E29Q	1	0	1
3	279delT	X96	0	1 (Kopp et al., 1999)	1
4	314A>G	Y105C	1	0	1
4	317C>A	A106D	1	0	1
4	336-337insT	X180	0	1 (Coyle et al., 1998)	1
4	412G>T	V138F	1	1 (Van Hauwe et al., 1998)	2
4	IVS 4 +7A>G	X141	0	1 (Lopez-Bigas et al., 1999)	1
5	416G>C	G139A	0	1 (Lopez-Bigas et al., 1999)	1
5	580C>T	T193I	0	1 (Adato et al., 2000)	1
6	626G>T	G209V	2	1 (Lopez-Bigas et al., 1999)	3
6	707T>C	L236P	2	17 (Van Hauwe et al., 1998 ; Coyle et al., 1998)	19
6	753-756delCTCT	X286	0	1 (Coyle et al., 1998)	1
7	783-784insT	X286	1	0	1
7	811G>C	D271H	0	1 (Van Hauwe et al., 1998)	1
7	917delT	X308	0	1 (Usami et al., 1998)	1
5'Int 7	IVS 7 +1G>A	Splice donor	0	1 (Coyle et al., 1998)	1
5'Int 8	IVS 8 +1G>A	Splice donor	7	9 (Coyle et al., 1998 ; Everett et al., 1987)	16
9	1003T>C	F335L	1	0	1
9	1105A>G	K369E	0	1 (Usami et al., 1999)	1
9	1115C>T	A372V	0	1 (Usami et al., 1999)	1
9	1149delC	FS383	0	1 (Van Hauwe et al., 1998)	1
10	1151A>G	E384G	0	6 (Coyle et al., 1998)	6
10	1197delT	FS400	0	5 (Van Hauwe et al., 1998)	5
10	1226G>A	R409H	0	1 (Van Hauwe et al., 1998)	1
10	1229C>T	T410M	0	1 (Coyle et al., 1998)	1
10	1246A>C	T416P	5	12 (Van Hauwe et al., 1998 ; Coyle et al., 1998)	17
11	1284-1286delTGC	A429del	0	1 (Coyle et al., 1998)	1
11	1334T>G	L445W	0	3 (Masmoude et al., 2000)	3
12	1334-1335insAGTC	X467	0	1 (Coyle et al., 1998)	1
12	1341delG	X454	0	1 (Everett et al., 1987)	1
13	1440T>A	V480D	1	0	1
13	1489G>A	G497S	0	1 (Li et al., 1998)	1
13	1523C>A	T508N	0	1 (Bogazzi et al., 2000)	1
13	1536-1537delAG	X524	0	1 (Coyle et al., 1998)	1
14	1588T>C	Y530H	2	1 (Coyle et al., 1998)	3
15	1667A>G	Y556C	0	1 (Van Hauwe et al., 1998)	1
15	1694G>A	C565Y	0	1 (Van Hauwe et al., 1998)	1
16	1790T>C	L597S	3	0	3
17	1898delA	FS634	0	1 (Van Hauwe et al., 1998)	1
17	1958T>C	V653A	1	0	1
17	2000T>G	F667C	0	1 (Everett et al., 1987)	1
17	2015G>T	G672E	2	1 (Coyle et al., 1998)	3
19	2111insGCTGG	X722	0	1 (Usami et al., 1999)	1
19	2127delT	X719	0	1 (Coyle et al., 1998)	1
19	2162C>T	T721M	0	1 (Usami et al., 1999)	1
19	2168A>G	H723R	0	2 (Usami et al., 1999)	2
19	2182-2183insG	Y728X	0	1 (Fugazzola et al., 2000)	1

Campbell et. al., 2001

附表二 PDS Primers

Exon	Primer name	Primer	Tm(°C)	BP
1	PDS-EX1-2F	GTAACGGGATGAGTGAGGAT	60	162
	PDS-EX1-2R	GTCGAAGGGAAAGACACACA	60	
	PDS-EX1-3F	GATAGGATCGGTTGGGAAAG	60	190
	PDS-EX1-R	GTGTGGGCATCTTCAGGG	58	
2	PDS-EX2-4F	CTCCGATCGTCCTCGCTTA	60	172
	PDS-EX2-2R	GCTCGTGCTGTTGCTGGAAA	62	
	PDS-EX2-3F	CAGCTGCAGCTACATGGTGT	62	154
	PDS-EX2-3R	CTCCGCTTCTCTTACGCA	60	
3	PDS-EX3-2F	GTTGTGACTGAGATTGGATTG	62	138
	PDS-EX3-2R	GCAGCCATTCTTGACTCGGT	62	
	PDS-EX3-3F	GTGCCATCTTGGAGTGGCT	62	135
	PDS-EX3-3R	GGAGACCAGAACTCTCAATCT	62	
4	PDS-EX4-F	TAATCACTTTGCATGTGCTTT	56	190
	PDS-EX4-R	GCCAAAACACTTTAAACATGA	56	
5	PDS-EX5-F	CCTATGCAGACACATTGAACATTTG	70	190
	PDS-EX5-2R	GCTGCAGTGTCTATCATAGTAGT	66	
	PDS-EX5-3F	CCAGCAGCAATGGAAGTGTAT	62	160
	PDS-EX5-R	ACCTGTATAATTCCAACCAGCA	62	
6	PDS-EX6-F	GGTTTCTATCTCAGGCAAACAT	62	130
	PDS-EX6-2R	GCTGTTGTGAAGCCACCAAC	62	
	PDS-EX6-3F	GTGAGGTAAGTGGCAGATCCTT	66	190
	PDS-EX6-R	ATTGTTTCTGGAATGAACAGTGACC	70	
7	PDS-EX7-2F	GCGTGTAGCAGCAGGAAGTA	62	132
	PDS-EX7-2R	CTGCCATACAGACGACAATGG	64	
	PDS-EX7-3F	GCTGATTTCACTGCTGGATTG	62	164
	PDS-EX7-3R	CCTTGTTTGTCAACCAAATAATGC	62	
8	PDS-EX8-2F	GTTCAGCATATTGGTTGAC	58	210
	PDS-EX8-2R	GACTGACTTACTGACTTAATG	58	
9	PDS-EX9-F	GTGGTCAAATCTTCACAGCA	58	145
	PDS-EX9-2R	CCTACTGACACTGCAATAGC	60	
	PDS-EX9-3F	CCATCGCTGTGGTGGCTTAT	62	178
	PDS-EX9-R	CCCTTCTTTAGCTGACACCA	60	

10	PDS-EX10-4F	GTAGGATCGTTGTCATCCAG	60	106
	PDS-EX10-2R	GAAAGAGCAGTGGTGGCCACA	62	
	PDS-EX10-3F	GGATCAGCAACATCTTCTCA	58	167
	PDS-EX10-R	CGAGAATTCCTCTGTTTGC	58	
11	PDS-EX11/12F	ACACATCCAGTGAGCTGGAA	60	180
	PDS-EX11-2R	GCAATCGGTATGCAGAGAAG	60	
12	PDS-EX12-2F	CCATTCCTGAATAACACAGC	62	206
	PDS-EX12-2R	GTGATATGGCAGGAAGCATAT	60	
13	PDS-EX13-2F	CACATGATGGTACCTGCTACA	60	120
	PDS-EX13-2R	GCTAGTAAACCGAGATCCAG	60	
	PDS-EX13-3F	CGTGTATAGTGTCCATCATTC	60	154
	PDS-EX13-3R	GGTATAAGGAAGCTCAGAGTG	62	
14	PDS-EX14-F	CAAAATCCGGCTGTTCCAAA	56	186
	PDS-EX14-R	AATGGAGCTGCTGAAACTTC	54	
15	PDS-EX15-F	CCCAGACAATTTCTTTATGC	58	199
	PDS-EX15-R	TTGGACCCAGTAAATACTTGT	62	
16	PDS-EX16-2F	AGCTTTAGGTGCCAGGCATT	60	211
	PDS-EX16-R	GACCCTCTAACTGCTCTCATCA	66	
17	PDS-EX17-2F	CCAAGGAACAGTGTGTAGGT	60	188
	PDS-EX17-2R	GGTTGGGATATCAAGTTCCTC	62	
	PDS-EX17-3F	GAGCCTGATGAGGATATTGA	58	234
	PDS-EX17-R	ATTGXXAAAGXTXXAAATGT	56	
18	PDS-EX18-F	TGAATGCTACTGAATTATGGGGC	66	183
	PDS-EX18-R	AGATAGGAGAAAGGGCTTACGG	66	
19	PDS-EX19-2F	GGCAATAGAATGAGACTCTGT	60	175
	PDS-EX19-2R	GTATAGCATCATGGACCGTC	60	
	PDS-EX19-3F	CGACAACATTAGAAAGGACAC	60	187
	PDS-EX19-3R	CTAGACTTGTGTAATGTTTGCC	62	
20	PDS-EX20-2F	GGTGGGTTGATGCTATTCTAT	60	247
	PDS-EX20-R	GCATTTGGGGGAATTATGTT	56	
21	PDS-EX21-F	ACACTTGTITTTAAAATTGC	58	109
	PDS-EX21-R	GCATTGAGGAGTTTTGTCTTG	60	

Scott et al., 2000

參考文獻

(Reference))

- Campbell C, Cucci RA, Prasad A, Green GE, Edeal JB, Galer CE, Karniski LP, Sheffield VC, and Smith RJH (2001) Pendred syndrome, DFNB4, and *PDS/SLC26A4* identification of eight novel mutation and possible genotype-phenotype correlations. *Hum. Mut.* 17:403-411
- Coyle B, Coffey R, Armour JA, Gausden E, Hochberg Z, Grossman A, Britton K, Pembrey M, Reardon W, Trembath R (1996) Pendred syndrome (goiter and sensorineural hearing loss) maps to chromosome 7 in the region containing the nonsyndromic deafness gene DFNB4. *Nature Genet.*, 12:423-426
- Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevanis A, Sheffield VC, Green ED (1997) Pendred syndrome is caused by mutation in a putative sulphate transporter gene (*PDS*) *Nature Genet.* 17:411
- Everett LA, Morsli H, Wu DK, Green ED (1999) Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred's syndrome gene (*Pds*) suggests a key role for pendrin in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 727-32
- Everett LA, Belyantseva LA, Noben-Trauth K, Cantos R, Chen A, Thakkar SI, Hoogstraten-Miller SL, Kachar B, Wu DK and Green ED (2001) Targeted disruption of mouse *Pds* provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 10, 153-161.

- Gorli RJ (1995) Genetic hearing loss associated with endocrine and metabolic disorders. In Gorlin, R.J.(ed.), Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford University Press, New York, pp. 337-339.
- Johnsen T, Jorgensen MB, and Johnsen S (1986) Mondini cochlea in Pendred's syndrome. A historical study. *Acta Oto-Laryngol.*, 102, 239-247.
- Kabakkaya Y, Bakan E, Yigitoglu MR, Gokce G and Dogan M (1993) Pendred's syndrome. *Ann. Oto-Laryngol.*, 102, 285-288.
- Kalatzis V and Petit C.(1998) The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 7, 1589-1597.
- Li XC, Everett LA, Lalwani AK, Desmukh D, Friedman TB, Green ED, Wilcox ER (1998) A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 18:215-7
- Lopez-Bigas N, Rabionet R, de Cid R, Govea N, Gasparini P, Zelante L, Arbones ML, Estivill X (1999) Splice-site mutation in the PDS gene may result in intrafamilial variability for deafness in Pendred syndrome. *Hum Mutat* 14:520-6
- Luppari R and Arslan E (1996) Neonatal screening : risk factors and outcome in 4400 children. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* 16, 501-507.
- Marizita ML, Plongphman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos and Nabce WE (1993) Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet* 46,

486-491.

- Masmoudi S, Charfedine I, Hmani M, Grati M, Ghorbel AM, Elgaied-Boulila A, Drira M, Hardelin JP and Ayadi H (2000) Pendred syndrome: phenotypic variability in two families carrying the same PDS missense mutation. *Am. J. Med. Genet.* 90:38-44
- Morton NE (1991) genetic epidemiology of hearing impairment . *Ann NY Acad. Sci.* 630:16-31.
- Morton CC (2002) Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Human. Mol. Genet.* 11:1229-1240.
- Neitzel H (1986) A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines *Hum Genet.* 73(4):320-6.
- Pnina Rotman-Pikielny, Koret Hirschberg, Padma Maruvada, Koichi Suzuki, Ines E. Royaux², Eric D. Green, Leonard D. Kohn, Jennifer Lippincott-Schwartz³ and Paul M. Yen¹. (2002) Retention of pendrin in the endoplasmic reticulum is a major mechanism for Pendred syndrome. *Hum. Mol. Genet* 11:2625–2633
- Reardon W, OMahoney CF, Trembath R, Jan H, Phelps PD (2000) Enlarged vestibular aqueduct: a radiological marker of pendred syndrome, and mutation of the PDS gene. *Quart. J. Med.* 93:99-104
- Scott DA, Wang R, Kreman TM, Andrew M, McDonald JM, Bishop JR, Smith RJH, Karniski LP, Sheffield VC (2000) Functional differences of the PDS gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss (DFB4). *Hum. Mole. Genet.* 9:1709-1715
- Sheffield VC, Kraiem Z, Beck, JC, Nishimura D, Stone EM, Salsmeh M, Sadeh O and Glaser M (1996) Pendred syndrome is located

between D7S501 and D7S692 in a 1.7-cM region on chromosome 7q. *Genomics*, 40:48-54

Steel KP (1999) Perspective: biomedicine. The benefits of recycling. *Science* 285:1363-1364

Usami S, Abe S, Weston MD, Shinkawa H, Van Camp G and Kimberling WJ. (1999) Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by *PDS* mutation. *Hum. Genet.* 104:188-192

朱水松，許權振，林凱南 大前庭導水管症候群-病例報告(1999); 中耳醫誌 34:173-177

附錄

(Appendixes)

I. 實驗方法(Procedure)

A. PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra)

1. Add 3 ml whole blood to a 15 ml centrifuge tube containing 9 ml RBC Lysis Solution. Invert to mix and incubate 10 minutes at room temperature.
2. Centrifuge at $2000\times g$ for 10 minutes. Remove supernatant leaving behind the white cell pellet.
3. Vortex the tube to resuspend the cells.
4. Add 3 ml Cell Lysis Solution to the resuspended cells.
5. Add 15 μ l RAase A Solution to the cell lysate.
6. Mix the sample by inverting the tube and incubate at 37 °C for 15-60 minutes.
7. Add 1 ml Protein Precipitation Solution to the cell lysate.
8. Vortex at high speed for 20 seconds.
9. Centrifuge at $2000\times g$ for 10 minutes
10. Pour the supernatant containing the DNA into a clean 15 ml centrifuge tube containing 3 ml 100 % Isopropanol.
11. Mix the sample by inverting the tube.
12. Centrifuge at $2000\times g$ for 3 minutes.
13. Pour off supernatant and add 3 ml 70 % Ethanol to invert tube several times to wash the DNA pellet.
14. Centrifuge at $2000\times g$ for 1 minutes.
15. Air dry for 10-15 minutes.

16. Add 250 μ l DNA Hydration Solution

17. Store DNA at -20 °C for long term.

B. QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)

1. Add 5 volumes of Buffer PB to 1 volume of PCR reaction and mix.
2. Apply the sample to the QIAquick spin column and centrifuge for 60 seconds.
3. Discard flow-through.
4. Add 750 μ l Buffer PE to the QIAquick spin column and centrifuge for 60 seconds.
5. Discard flow-through.
6. Centrifuge for an additional 60 seconds at maximum speed.
7. Place QIAquick spin column in a 1.5 ml centrifuge tube.
8. Add 32 μ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) to the center of the QIAquick membrane, let stand for 1 minute and centrifuge the column for 1 minute.

C. ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)

1. Sequencing Reaction :

Template DNA (ds)	200 ng
Primer (10 p mole)	0.3 μ l
DMSO	1 μ l
Big Dye	2 μ l
5x buffer	3 μ l
d ₂ H ₂ O	11.7 μ l

Total 20 μ l

2. Cycle Sequencing Program:

96 °C, 10 seconds
50 °C, 5 seconds
60 °C, 4 minutes
4 °C, hold.

25 cycles

3. Purification of PCR Products for sequencing:

- 3-1 Take 2 μ l of 3 M Sodium acetate (pH 4.6) and 50 μ l of 95 % Ethanol.
- 3-2 Vortex and leave at room temperature for 15 minutes.
- 3-3 Centrifuge for 20 minutes at maximum speed (13000 rpm).
- 3-4 Discard the supernatant.
- 3-5 Add 1 ml 70 % Ethanol to invert tube several times to wash the DNA pellet.
- 3-6 Centrifuge for 5 minutes and discard the supernatant.
- 3-7 Air dry the pellet.
- 3-8 Add 12 μ l of TSR to a vial containing dried DNA.
- 3-9 Heat for 2 minutes at 95°C.
- 3-10 Chill on ice for about 5 minutes. Transfer the sample to a vial and cover with a vial septa.

D. DNA Silver staining Kit (Pharmacia Biotech)

1. Soak the gel in the fix solution for 30 minutes.
2. Replace fixing solution with 125ml silver solution for 30 minutes.
3. Pour off silver solution add water for 1 minute.
4. Pour off water, add 125ml developing solution for 6 minutes.
5. Soak gel in stopping and preserving solution and incubate 30

minutes.

(All steps need to shake gently)

E. PURETRANSCRIP RNA Isolation Kit (Gentra)

1. Add 3 ml whole blood to a 15 ml centrifuge tube containing 9 ml RBC Lysis Solution. Invert to mix and incubate 10 minutes at room temperature.
2. Centrifuge at $2000\times g$ for 10 minutes. Remove supernatant leaving behind the white cell pellet.
3. Vortex the tube to resuspend the cells.
4. Add 3 ml Cell Lysis Solution to the resuspended cells.
5. Add 1 ml Protein-DNA Precipitation Solution to the cell lysate.
6. Vortex at high speed for 20 seconds.
7. Centrifuge at $2000\times g$ for 10 minutes
8. Pour the supernatant containing the DNA into a clean 15 ml centrifuge tube containing 3 ml 100 % Isopropanol.
9. Mix the sample by inverting the tube.
10. Centrifuge at $2000\times g$ for 3 minutes.
11. Pour off supernatant and add 3 ml 70 % Ethanol to invert tube several times to wash the DNA pellet.
12. Centrifuge at $2000\times g$ for 1 minutes.
13. Air dry for 10-15 minutes.
14. Add 60 ml RNA Hydration Solution.
15. Store DNA at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for long term storage.

F Gel-MTM Gel extraction System (VIOGEN)

1. Use a clean, sharp scalpel or razor blade to excise the gel slice containing the DNA fragment of interest.

2. Measure the weight of the gel slice (about 50-200 mg) and place it into a sterile 1.5 ml or 2 ml centrifuge tube. Add 0.5 ml GEX Buffer to it.
3. Incubate at 60°C for 5 to 10 minutes until the gel is completely dissolved. Invert mix the tube every 1-2 minutes during incubation. Stop incubation when the gel has been completely dissolved. Let the gel mixture cool down to room temperature.
4. Place a Gel-M™ Column onto a Collection Tube. Load on more than 0.7 ml dissolved gel mixture into the column.
5. Centrifuge for 30-60 seconds. Discard the flow-through. Repeat step 4 for the rest of the mixture.
6. Wash the column once with 0.5 ml of WF Buffer by centrifuging for 30-60 seconds. Discard the flow-through.
7. Wash the column once with 0.7 ml of WS Buffer by centrifuging for 30-60 seconds. Discard the flow-through.
8. Centrifuge the column at full speed for another 3 minutes to remove residual ethanol.
9. Place the column onto a new 1.5 ml centrifuge tube. Add 30-50 ml of Elution Buffer onto the center of the membrane.
10. Stand the column for 1-2 minutes, and centrifuge for 1-2 minutes to elute DNA.
11. Store DNA at -20°C

II. 藥品製備(Preparation of reagents and buffer)

Solution	Method of preparation
0.5M EDTA (pH 8.0)	186.1g disodium ethylene diamine tertacetate 2H ₂ O 800 ml d ₂ H ₂ O Adjust pH to 8.0 with NaOH
10X TBE	108g Tris base 55g boric acid 40 ml 0.5M MDTA (pH 8.0) Bring the volume to 1000ml
50X TAE	242g Tris base 57.1g acetic acid 100 ml 0.5M MDTA (pH 8.0) Bring the volume to 1000ml

10X DNA loading dye	50 % glycerol 12.5mM Tris-Cl (pH 8.0) 60mM EDTA (pH 8.0) 0.01 % bromophenol blue 0.01 % xylene cyanol FF
Fixing solution	25 ml Fixing solution, 5X 100 ml 24% ethanol
Staining solution	25 ml Staining solution, 5X 100 ml water
Developing solution	25 ml Sodium carbonate, 5X 125 ul sodium thiosulphate 125 ul Formadehude 100 ml of water
Stopping & Preserving solution	25 ml Stopping & Preserving solution, 5X 100 ml water > 125 ml

博碩士論文授權書

(國科會科學技術資料中心版本：92.6.17)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學 大學(學院) 醫學研究所
研 組 九十一 學年度第 三 學期取得 碩士 學位之論文。
論文名稱：ROS 基因造成非耗候群身軀障之研究

同意 不同意 (政府機關重製上網)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：____，註明文號者請將全文資料延後半年後再公開。

同意 不同意 (圖書館影印)

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

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。上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：

研究生簽名：
(親筆正楷)

蔡顯璋

學號：8902034
(務必填寫)

日期：民國 92 年 1 月 10 日

1. 本授權書(得自<http://stic.pcc-stic.gov.tw/sticweb/html/theses/authorize.html> 下載或至<http://www.stic.gov.tw/> 首頁右下方下載)請以黑筆填寫並影印裝訂於卷名頁之次頁。
2. 授權第一項者，請確認學校是否代收，若無者，請個別再寄論文。本至台北市(106-36)和平東路二段106號1702室 國科會科學技術資料中心 黃善平小姐。(電話:02-27377606 傳真:02-27377689)
3. 本授權書已民國85年4月10日送請內政部著作權委員會(現為經濟部智慧財產局)修正定稿，89.11.21部份修正。
4. 本案依據教育部國家圖書館85.A.19台(85)圖編字第712號函辦理。