

R
008.8
4629
c.1

私立中山醫學院醫學研究所

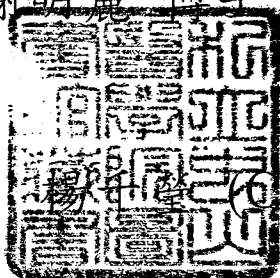
碩士論文

Machado-Joseph 疾病及第一型小腦脊髓運動
失調症的分生研究

Molecular Studies of Machado-Joseph Disease
and Spinocerebellar Ataxia Type I

指導教授：謝明麗 博士 (Mingli Hsieh, Ph.D.)

研究生 楊中欽 (Chien-Ying Yang)



參考書恕不外借

中華民國八十六年六月
June 1997

中山醫學院圖書館



C046113

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 85 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: Machado-Joseph 疾病及第一型小腦脊髓運動失調症的分生研究

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，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，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

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，不限時間與地域，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。

指導教授姓名: 謝明麗

研究生簽名: 楊千瑩 學號: R84118
(親筆正楷)

日期: 民國 86 年 6 月 30 日

-
- 備註: 1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，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。

致謝

千言萬語，不知從何敘，只因兩年的研究所生活中實在受到太多太多人的照顧。對於在這段成長過程中曾經幫助我、鼓勵我與支持我的所有師長、同學以及朋友們，在此致上無限的感激與謝意。

首先，特別感謝我的指導教授：謝明麗老師，因為她豐富的學養以及悉心的教導，使我在課業與研究思維上獲益良多，且每每在遭受挫敗，心中充滿沮喪與無力感時，也因為她的支持、鼓勵與積極的態度使我頓時又充滿了希望。我想，兩年來最幸運的事，莫過於遇到她。

另外，感謝高雄醫學院神經科主任陳順勝教授在百忙中對於本論文內容的審閱及斧正。再則，感謝本校細胞遺傳室李宣佑教授除了對於本論文提出建議，使本論文更趨完善外，更協助淋巴母細胞株的建立、指導細胞培養的技術並提供實驗器材，使得本論文得以順利完成。

感謝李娟副教授、李天翎副教授、張德卿教授在實驗設備及藥品的支援。感謝王怡鈞老師、劉蓉錦老師、李月君老師以及謝淑卿學姐在學業與實驗上的指導與協助。實驗之初，特別感謝蔡蕙芳學姐在實驗技術上耐心的教導及志忠學弟的傾力相助，以及玉雲學姐、小翠、千玲在生活上的照顧。感謝秀芬學姐、秀如學姐、歐威志學長、梅林學姐所給予的鼓勵與協助。感謝我親愛的同學們：艾麗霜、楊建洲、瓊慧、玫伶、黃亦樂、李孟訓，還有實驗室的嘉仁學弟與秀美學妹，在實驗及生活上的相互扶持與照顧。另外，感謝楊建洲同學在照片及幻燈片的製作。感謝實驗室中可愛的大學部學弟妹們：逸芸、如珊、純毓、俊強，謝謝大家對於實驗的幫忙。尤

其是逸芸，總在我急須幫助時伸出援手。感謝各大醫院醫師提供個案予研究，也謝謝病患、病患家屬們的配合。

最感謝的是我的父母、大姊、姊夫、大哥、大嫂、二姊以及弟弟，當然還有與我同甘共苦兩年，常常陪我實驗至深夜的同學兼室友小毛(孫翠蓮)，謝謝你們無比的愛心一直支持著我。最後，謹以此論文獻給我敬愛的父母、親愛的家人、以及所有關愛我的人。

楊千瑩 謹誌於

中山醫學院醫學研究所

中華民國八十六年六月

目錄

第一章、 Machado-Joseph 疾病的分生研究·····	1
中文摘要·····	2
英文摘要·····	3
序論·····	5
材料與方法·····	9
結果·····	17
討論·····	24
參考文獻·····	29
圖表·····	35
第二章、 第一型小腦脊髓運動失調症的分生研究·····	51
中文摘要·····	52
英文摘要·····	53
序論·····	55
材料與方法·····	60
結果·····	74
討論·····	77
參考文獻·····	81
圖表·····	86
附錄一、儀器設備·····	99
附錄二、試藥·····	100
附錄三、試劑及緩衝液的配法·····	102

第一章

Machado-Joseph 疾病的分子研究

Molecular Study of Machado-Joseph
Disease

中文摘要

(Chinese abstract)

Machado-Joseph 疾病，是一種晚發性的體染色體顯性的遺傳性、漸進性神經退化性疾病。此疾病的臨床徵狀，主要有小腦運動失調和錐體徑路的病徵，伴隨著不同程度的肌張力異常僵硬的外錐體徑路的病徵或末梢肌萎縮。座落於第十四對染色體的長臂上含有不穩定 CAG 三核苷酸重覆擴增的 *MJD* 基因已被証實為 Machado-Joseph 疾病的致病突變。持續對台灣地區人口進行 *MJD* 基因之中 CAG 重覆序列分佈範圍的研究時，我們又篩選出八個家族中十四個 *MJD* 病人及七個未發病者。此外我們也分析三十九個正常個體中 CAG 重覆長度的範圍，正常個體中 CAG 重覆數目範圍從 15 到 38，*MJD* 患者及未發病者則包含 75-81 個 CAG 重覆序列。我們研究結果顯示，CAG 重覆次數與發病年齡呈負相關，即 CAG 重覆次數愈多，發病年齡愈早。發現由父親傳給子代 CAG 重覆較易增加，且子代間 CAG 重覆次數變異較大，而母親傳給子代則不變或減少，子代間 CAG 重覆次數變異也較小。我們數據顯示，在 *MJD* 家族中呈現期望現象，即發病年齡會一代比一代提前，且親代間遺傳的不穩定現象，即雙親傳給子代的(CAG) n 有的會增加，有的會減少。

此外，欲探討 *MJD* 基因中 CAG 重覆序列倍增所導致的晚發性神經退化性疾病之致病機制，我們從 *MJD* 病人，包括已發病與未發病者，取得血液，進而建立淋巴母細胞株。利用這些細胞，做北方墨點法與 primer extension 來分析 *MJD* 的 RNA。這些淋巴母細胞株將提供後續分生研究的重要材料。

英文摘要

(Abstract)

Machado-Joseph disease (MJD) is an autosomal dominant spinocerebellar degeneration characterized by cerebellar ataxia and pyramidal signs associated in varying degrees with a dystonic-rigid extrapyramidal syndrome or peripheral amyotrophy as major neurologic signs. Unstable CAG trinucleotide repeats expansion in MJD gene on the long arm of chromosome 14 has been identified as the pathologic mutation for MJD. On the process to investigate the distribution of the CAG repeat lengths of MJD gene in Taiwan's population, we have identified another 14 MJD affected patients and 7 at-risk individuals in seven affected families in Taiwan. In addition, we have analyzed the range of CAG repeats in 39 control individuals. The CAG repeat number is ranging from 15 to 38 in the control individuals and 75-81 in the expanded individuals. Our results indicated that the CAG repeat number is correlated to the age of onset and the severity of the disease. The differences in CAG repeat length between parent and child and between siblings are greater in paternal transmissions than in maternal transmissions. In addition, our data show a tendency of the anticipation phenomena in the MJD families but can not support unidirectional expansion of CAG repeats during transmissions.

On the other hand, to understand the mechanism by which the expansion of the CAG trinucleotide repeat of MJD leads to neurodegeneration at late onset, lymphoblastoid cell lines from MJD patients and at-risk members have been established. Northern analysis and primer extension have been performed in this study. The six lymphoblastoid cell lines will provide valuable materials for further molecular studies.

序論

(Introduction)

Machado-Joseph Disease 簡稱 MJD，於 1972 年首先被發現於葡萄牙人 Willim Machado 的後裔，是一種晚發性的體染色體顯性 (Autosomal Dominant) 的遺傳性疾病 (Nakano et al., 1972)，而於 1976 年 Rosenberg 等人在移民美國的葡萄牙人身上發現一種 Joseph disease，其後並且發現這兩種疾病其實是同一種漸進性神經退化性疾病。此後，在世界各地之非葡萄牙民族亦陸續發現有此疾病的出現，如美國 (Healton et al., 1980)、日本 (Sakai et al., 1983)、義大利 (Livingstone and Sequeiros, 1984) 等。

此疾病的徵狀在臨床上變化很多，顯現的範圍很廣，主要有運動失調 (ataxia)、漸進性眼外肌麻痺 (progressive external ophthalmoplegia)、錐體及外錐體徑路的病徵 (Pyramidal and extra pyramidal signs)、肌張力的異常及僵硬 (dystonia with rigidity)、末梢肌萎縮 (distal muscular atrophies)、臉部及舌的顫搐 (facial and lingual fasciculation) (Coutinho et al., 1977; Lima and Coutinho, 1980)，又根據其發病年齡、發病的部位、及運動神經元退化的情形，可分為三種亞型 (Coutinho and Andrade, 1978)。第一型、早發型 (earlier onset)：此型的臨床症狀顯現的較早且嚴重，發病的年齡約在 20-30 歲 (平均約在 24.3 歲)，較顯著的病徵為錐體及外錐體徑路的症狀。第二型、中間型 (middle onset)：大都發生於中年人，發病的年齡約在 40.5 歲，主要的病症有小腦運動失調及眼肌麻痺。第三型、晚發型 (later onset)：發病的年齡約在 40-60 歲 (平均約在 46.8 歲)，主要的症狀

有末稍肌萎縮、小腦運動失調及眼肌麻痺。大部份的患者都屬於第二型。根據日本的研究統計發現：小腦脊髓退化的發生率(prevalence)為 4.53/100,000，而其中 2%為 MJD(Hirayama et al., 1994)。另外，在病理方面則發現：於黑質、橋腦核、前庭、腦神經核、Clarke 柱索、前角等處有神經元的喪失及神經膠樣變性之現象。

於 80 年代間對此疾病研究方向皆著重於臨床症狀、病理等，一直到 90 年代因為分子生物學的掘起，才藉由連鎖互換的方法(Linkage analysis)，找到此疾病的基因座落於第十四對染色體的長臂上(14q24.3-q32)(Takiyama et al., 1993)。隔年(1994)由 Kawaguchi 等人更在染色體 14q32.1 選殖出此基因，稱為 *MJD* 基因，並且在 MJD 患者的基因中，發現到靠近於 3' 端轉譯區(translated region)內，有一段不穩定的 CAG 核酸重覆序列倍增突變，正常個體中，此基因包含 13-36 個 CAG 重覆序列，MJD 患者則包含 68-79 個 CAG 重覆序列，而這段 CAG 核酸重覆序列會轉譯出一段含多個麩胺酸(polyglutamine)的蛋白質。

近幾年來已發現至少有十種疾病與三核苷酸重覆序列(trinucleotides repeat)有關(Sutherland and Richards, 1995; Warren et al., 1996)，這些疾病大致可分為兩大類：第一類是位於不轉譯區中之 CGG、CTG 及位於插入子(intron)中之 GAA 等三核苷酸重覆序列倍增突變，包括易脆 X 染色體症候群(fragile X syndrome)(Verkerk et al., 1991)、肌強直萎縮病(Myotonic Dystrophy; MD)以及 Friedreich's ataxia(Campuzano et al., 1996)等，此類疾病基因中之三核苷酸重覆序列倍增突變非常不穩定，可重覆上百甚至上千次，而病徵為多系統表現，致病機制可能為 RNA 或蛋白質的量降低，導致正常功能的喪失。第二類則是位於轉譯區

中之 CAG 三核苷酸重覆序列倍增突變，包括亨汀頓氏舞蹈症 (Huntington's Disease ; HD)(Andrew et al., 1993 ; Duyao et al., 1993 ; Snell et al., 1993)、第一型小腦脊髓幹運動失調症候群 (Spinocerebellar ataxia type 1 ; SCA1)(Joice et al., 1994 ; Ranum et al., 1994)、第二型小腦脊髓幹運動失調症候群 (Spinocerebellar ataxia type 2 ; SCA2)(Pulst et al., 1996 ; Sanpei et al., 1996 ; Imbert et al., 1996) 第六型小腦脊髓幹運動失調症候群 (Spinocerebellar ataxia type 6 ; SCA6)(Zhuchenko et al., 1997)、延髓肌萎縮症 (spinal and bulbar muscular atrophy)(La Spaa et al., 1992)、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症 (Dentatorubral-Pallidoluysian atrophy ; DRPLA/Haw River syndrome ; HRS)(Koide et al., 1994)、Machado-Joseph disease(MJD)(Kawaguchi et al., 1993 ; Maciel et al., 1995)，此類疾病基因中之三核苷酸重覆序列倍增突變呈中度不穩定，最多重覆至一百次，病徵為專一的神經退化 (neurodegeneration)，目前對於這種含有多個麩胺酸 (polyglutamine) 的蛋白產物之正常功能與致病機制尚未清楚。故目前並無治癒方法，只能做症狀治療，改善神經退化的症狀。

至今許多 MJD 疾病相關研究發現，CAG 重覆次數與發病年齡呈負相關。即 CAG 重覆次數愈多，發病年齡愈早 (Maciel et al., 1995 ; Maruyama et al., 1995)。且親代間遺傳的不穩定現象，即雙親傳給子代的 (CAG) n 有的會增加，有的會減少，發現由父親傳給子代較易增加，使得發病年齡更加提早，而母親傳給子代則不變或減少 (Maruyama et al., 1995 ; Ikeuchi et al., 1996)。若同時得到兩個相同的突變基因，此稱為純合子 (homozygotes)，其臨床症狀顯得

較嚴重，發病年齡也更早，似乎有基因劑量效應(gene dosage effect)(Kawakami et al., 1995; Takiyama et al., 1995)。而性別與發病年齡及症狀的嚴重程度則沒有相關性(Kawakami et al., 1995)。

由先前報告已知，在人類腦部確有存在 *MJD* 基因經轉錄而成的 RNA(Kawaguchi et al., 1994)，且不管是正常人或 *MJD* 患者皆有(Nishiyama et al., 1996)。另外在人類腦部亦可偵測出 *MJD* 基因轉譯出來的蛋白產物，包含 CAG 倍增的較大蛋白與正常大小的蛋白(Trottier et al., 1995)。而腦部正好是 *MJD* 之病灶所在。雖然對於此蛋白的正常功能與致病機制仍不清楚，不過，已有研究証實：*MJD* 基因中倍增的 CAG 重覆序列會誘發細胞的死亡，且經由表現 *MJD* 中的多麩胺酸擴增蛋白質片段於 Purkinje 細胞中的轉殖基因老鼠，會出現運動失調的症狀(Ikeda et al., 1996)。因此，一般相信倍增的 CAG 重覆序列可能扮演著關鍵性的角色，所以，對於 *MJD* 基因的 RNA 及蛋白產物若能有多一份了解，相信對於 *MJD* 的致病機制會有多一份的幫助。

本研究除利用聚合酶連鎖反應分析，篩選台灣區運動失調的病人及其家屬，協助醫師做分子生物之診斷，增加對本土性 *MJD* 之 CAG 重覆序列分佈範圍的瞭解，並且從篩選出之 *MJD* 病人，包含已發病及未發病之成員中抽取血液，建立淋巴母細胞株(lymphoblastoid cell line ; LCL)，再由其中抽取 RNA，藉由北方墨點法(Northern blotting)，觀察已發病與未發病及正常人之間 *MJD* RNA 的差別，另外，做 *MJD* 之 primer extension，以期對 *MJD* 之 RNA 有多一點認識。此外，將 LCL 經繼代培養後，分析 *MJD* 基因中 CAG 重覆序列之改變情形，以觀察 CAG 重覆序列的穩定性。

材料與方法

(Material and method)

一、MJD 基因中 CAG 重覆序列的鑑定

(一)、檢體來源

1. 血液：此部份的檢體來源主要為中南部各大醫院神經內科(表一)，診斷為運動失調(ataxia)的病人及其家屬之血液 10 毫升，共 29 個家族，全部包括 60 人。
2. DNA：此部份的檢體來源為光田醫院神經內科，診斷為運動失調(ataxia)的病人及其家屬。
3. 淋巴母細胞株(lymphoblastoid cell line；LCL)：首先由中山醫院神經內科呂聰明醫師從 MJD 患者處抽得血液，然後由中山醫學院細胞遺傳室李宣佑教授將之建立成淋巴母細胞株(lymphoblastoid cell line；LCL)(表二)。

(二)、周邊血球細胞 DNA 的純化：

將血液 5 ml 加入等量的 solution I (10 mM Tris-Cl pH 7.6；10 mM KCl；10 mM MgCl₂)，混合均勻後加入 120 μ l Nonidet P-40 將細胞膜溶解，待完全溶解後，離心 2000 rpm 10 分鐘，移去上清液，加入 300 μ l 的 solution I 小心將沈澱物沖散，再分裝至 1.5 ml eppendorf tube 中，加入 300 μ l 的 solution II (10 mM Tris-Cl pH 7.6；10 mM KCl；10 mM MgCl₂；1 M NaCl；1% SDS；4 mM EDTA)，混合均勻，待細

胞核溶解後，每管加入等量的 buffer saturated phenol 混合均勻（萃取時須注意離心管不可劇烈搖動，以免 DNA 嚴重斷裂），離心 14 krpm 10 分鐘。用切口的 yellow tip 吸取水層到新的 1.5 ml 離心管中，注意不要吸到界面的變性蛋白。加入等量的 phenol/chloroform 混合均勻，離心 14 krpm，10 分鐘。再用切口的 yellow tip 吸取水層到新的 1.5 ml 離心管中，加入等量的 chloroform 混合均勻，離心 14 krpm，10 分鐘。取上層，加入 0.8 倍體積的異丙醇(2-propanol)混合均勻，置於室溫中約 15-20 分鐘，離心 14 krpm，10 分鐘沈澱 DNA，再以 70%及 100%酒精各清洗一次，所得 DNA 以 200-300 μ l TE buffer 或去離子水回溶，溶好的 DNA 以光度比色儀 (Spectrophotometer ; DU-640 , Beckman)測波長 260 nm 的相對吸光值及 260 nm/280 nm 吸光比值，由此得知 DNA 的質與量。

(三)、聚合酶連鎖反應：(Polymerase Chain Reaction ; PCR)

Primer 的設計與進行方法參考 Maciel et al.(1995)。每一個總體積為 20 μ l 的 DNA 倍增反應中，含有 50 ng 的 genomic DNA，primer 各含 5 pmol 的濃度；1x buffer solution [10 mM Tris-Hcl (pH 8.8)；50 mM KCl；0.1% TritonX-100]；1.5 mM MgCl₂；1.5 unit 的 Taq polymerase (Promega)；10% dimethylsulfoxide(DMSO)；300 μ M dNTPs；1.5 μ Ci ³⁵S γ -dATP，最後以 d₂H₂O 補足至總體積為 20 μ l，然後用礦物油緩緩加在液面上，並除去界面氣泡（目的：為免於迴溫反應器中作用時蒸發掉）。將此反應溶液置於迴溫反應器（Perkin-Elmer

Cetus Inc.)，反應之熱週期循環(thermal cycler)為：DNA 的 denature 為 94 °C 8 分鐘；然後 94 °C 1 分鐘，61 °C 1 分鐘，72 °C 2 分鐘，30 個循環，extension 72 °C 10 分鐘。

(四)、Polyacrylamide gel 電泳分析：

預先製備 6% polyacrylamide-7.5 M urea gel，於 40 ml 6% polyacrylamide-7.5 M urea solution 中加入 200 μ l 10% ammonium persulfate(APS)和 20 μ l TEMED，混合均勻後，快速加入電泳玻璃槽中，待凝固後，可製成一個 40 cm x 15 cm x 0.35 cm 的 6% polyacrylamide-7.5 M urea gel。將上述的反應溶液反應結束後，取倍增之 DNA 片段加入 5 μ l formamide loading dye，加熱 90 °C 2 分鐘 denature 後，立即插回冰上，然後每一反應溶液分別取 6 μ l 依序加於膠體凹槽中，並 loading pGEM sequencing ladder 作為分子量標記，以 0.5x TBE buffer 為 running buffer，於電功率 60 W 的條件下進行膠體電泳分析，電泳時間為 2 小時 40 分。電泳完成將膠體浸置於 5% methanol 以及 5% acetic acid 溶液中 20 分鐘，經過真空乾燥，膠體固定後，以 Kodak X-OMAT 底片作自動放射顯影(autoradiography)。

(五)、pGEM 之核甘酸定序：

各取 2 μ l 的 dA/ddA、dG/ddG、dC/ddC、dT/ddT 四種 termination mixtures 於 0.5 ml 微離心管中，然後置於冰上，待 control reaction 配好後再分裝四個管內。首先取 5 μ l 的 pGEM-3Zf(+)-control DNA(500 fmol) 做為模板，然後加 2.5

μl 的引子 pUC/MB Forward primer(3 pmol) , 5 μl 5x sequencing buffer 與 1 μl [$\alpha\text{-}^{35}\text{S}$] dATP(>1000Ci/mmol 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) , 以及 1 μl sequencing Grade Taq DNA polymerase , 補二次去離子水至總體積為 16 μl , 然後各取出 4 μl 分裝於上述的四種 termination mixtures 的微離心管中 , 再用礦物油緩緩加在液面上 , 為防止溶液蒸發掉。最後將此反應溶液置於迴溫反應器 (Perkin-Elmer *Cetus* Inc.) , 反應之熱週期循環(thermal cycler)為 : DNA 的 denature 為 92 $^{\circ}\text{C}$ 2 分鐘 ; 然後 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒(denaturation) , 70 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒(annealing/extension) , 30 個循環 , extension 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 分鐘。反應完後再加入 3 μl stop solution 終止反應。此反應溶液即為 pGEM sequencing ladder 作為分子量標記的核苷酸定序。

二、RNA 的分析

(一)、淋巴細胞 RNA 的純化

當細胞生長至 $5\text{-}10 \times 10^6$ 時 , 取出 , 置於離心管中離心 , 1000 rpm , 10 分鐘 , 並將上清液移除 , 然後加入 ULTRASPEC RNA isolation system(Biotecx) 1 ml , 並用微量吸管予上下抽吸充份混合後 , 置放於 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 分鐘 , 再加入 200 μl 的氯仿(CHCl_3) , 使用振盪器振盪 15 秒鐘 , 並置於冰上 5 分鐘 , 然後於 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 , 12000 rpm 15 分鐘 , 以微量吸管吸取 3/4 水層到新的 1.5 ml 離心管中 , 注意不要吸到界面的變性蛋白。加入等量體積的異丙醇(2-propanol)混合均勻 , 置於 4 $^{\circ}\text{C}$ 約 15 分鐘 , 離心 12 krpm , 10 分鐘沈澱 RNA , 再以 75%

酒精清洗二次，離心 12 krpm，5 分鐘，移除上清液並置於室溫乾燥，不可太乾，否則不易回溶。所得 RNA 以 100 μ l DEPC H₂O 回溶，可加熱 55 °C 15 分鐘幫助溶解，溶好的 RNA 以光度比色儀(Spectrophotometer；DU-640，Beckman)測波長 260 nm 的相對吸光值及 260 nm/280 nm 吸光比值，由此得知 RNA 的質與量。

(二)、Primer extension

取 total RNA 50 μ g、經由放射線磷(³²P)標定末端的引子：MB(GTTTCTCGTGGAAGAGTCGACTCCATG) 25 pmole、dNTP 0.2 mM、1X buffer，於 90 °C 作用 5 分鐘，然後加入 RNase inhibitor 8 unit(promega)及 M-MLV RT(promega) 60 unit，並置於 37 °C 60 分鐘，95 °C 5 分鐘，0 °C 5 分鐘，反應完成後加入 1/10 體積的 Quench solution(4 M NH₄Oac; 20 mM EDTA)、及 2.5 倍體積的絕對酒精，置於 -80 °C 約一小時沈澱，離心 12 krpm，30 分鐘，去上清液，再以 75%酒精清洗，離心 12 krpm，10 分鐘，移除上清液並置於室溫乾燥。然後加入 5 μ l loading dye 回溶，做 Polyacrylamide gel 電泳分析。

(三)、 γ -³²P end-labeled primer

end-labeled 的反應物中有 primer MB 100 pmol、 γ -³²P ATP 3 μ l(10 uCi/ml)、5 μ l 10x kinase buffer(2 M Tris-Cl, pH 8.0; 0.5 M DTT; 1 M MgCl₂)、T4 Polynucleotide kinase 5 units(NEB)，加二次去離子水至總體積 50 μ l，反應條件

為 37 °C 2 小時。反應完成後加入 5 μ l 100 mM EDTA, pH 8.0 終止反應，然後經 column 純化。先在 1 cc 針筒中置放一濾紙，然後填入 Sephadex G50，讓水份滴乾，再離心 3000 rpm，2 分鐘。column 準備好之後，將 end-labeled 完成的 primer 加在 column 內 beads 上方，離心 3000 rpm，2.5 分鐘，離心下來的溶液就是純化好的 primer。取 1 μ l 製備好的 primer 以 scintillation counter 定量其放射強度。

(四)、北方墨點法(Northern blot)

電泳槽先以清潔劑清洗，然後用酒精擦拭，再浸泡 3% H_2O_2 ，10 分鐘，最後以 DEPC- H_2O 清洗乾淨，方可於通風廚中製作 Agarose gel。取 RNA 30 μ g，加入 5x Formaldehyde gel-running buffer(0.1 M MOPS, pH 7.0; 40 mM sodium acetate; 5 mM EDTA, pH 8.0) 4 μ l、formaldehyde 7 μ l、formamide 20 μ l，並補充 DEPC- H_2O 至總體積 40 μ l，然後加入 4 μ l Formaldehyde gel-loading buffer(50% glycerol; 1 mM EDTA, pH 8.0; 0.25% bromopheno; blue; 0.25% xylene cyanol FF)，於 Formaldehyde gel 中電泳。電泳時，每 1-2 小時需將緩衝液充份混合，以防止溶液中離子濃度不均。電泳完畢後，將 RNA marker 處的膠體切下，以 Ethidium Bromide 染色 15 分鐘，再用 H_2O destain 3-4 小時，在紫外燈下觀察，予以記錄。其餘含 RNA 的膠體，則用 DEPC- H_2O 清洗數次，然後浸泡於 0.05 N NaOH 20 分鐘，再用 DEPC- H_2O 100 ml 予濕潤，並浸泡於 20x SSC 45 分鐘，然後進行轉印(transfer)。

依下列順序鋪陳至轉印機器(stratagene)，首先放置一

張與抽吸底板同等大小經 20x SSC 濕潤的 3M filter paper，然後在正中央放置兩張四邊比膠體大約 0.5 公分經 20x SSC 濕潤的 3M filter paper，於其上放上 membrane，用保鮮膜與 3M filter paper 四邊重疊約 0.5 公分，密封，不可有空氣，然後小心將膠體置於露出的 membrane 上方，再於上方覆蓋一層經 20x SSC 濕潤的 3M filter paper，以及一層乾燥的 3M filter paper，每一部份的置放皆需小心準確，且需以平滑乾淨的玻璃棒來回滾動，以確定無氣泡存在於各組織間，最後在上方蓋上經 20x SSC 沾濕的海棉，並蓋上蓋子，對稱扣緊，通電進行轉印。

轉印後 membrane 放兩層 3M filter paper 中間，室溫乾燥。接下來以 UV 燈照射 $0.120-0.150 \text{ j/cm}^2$ 將 RNA 與 membrane 作 cross-link。然後放置於 6x SSC 5 分鐘，以洗去 membrane 上的 agarose gel。再放置室溫自然風乾。

接下來是 prehybridization，將 membrane 置於 6x SSC、5x Denhart's reagent、0.5% SDS、100 $\mu\text{g/ml}$ denatured, fragmented salmon sperm DNA 的溶液中，於 68°C shaking 16 小時。完成後，留下 5-10 c.c. 的溶液，其餘換上新鮮的探針(probe)，於 68°C shaking 16 小時。之後清洗工作分三部分：第一部份所使用清洗液是 2x SSC、0.5% SDS，5 分鐘；第二部份所使用清洗液是 2x SSC、0.1% SDS，15 分鐘；第三部份所使用清洗液是 0.1x SSC、0.5% SDS， 68°C ，30 分鐘至 1 小時。最後將 membrane 置於室溫中自然乾燥後，壓片進行放射顯影(Kodak X-AR film)。

(五)、探針(probe)的製備

將含有 MJD cDNA 的質體，用限制酶 *Sa*I 將整段 MJD cDNA 切下，利用 1% Agarose gel 電泳分析，將預期大小 2 Kb 的 DNA 片段由膠中純化出來，然後加入 Nick Translation System(Promega)的 10x buffer 5 μ l、300 μ M dNTP 10 μ l、 α -³²P dCTP 5 μ l(10 uCi/ml)、Enzyme (DNA polymerase I: 1 unit/ μ l; Dnase I: 0.2 ng/ μ l) 5 μ l，補充二次去離子水至總體積 50 μ l。作用於 15 °C 60 分鐘，反應完成加入 stop solution(0.25 M EDTA, pH 8.0) 5 μ l 終止反應，並經由 Sephadex G50 的 column 純化出來。

三、細胞培養

淋巴母細胞株培養於內含 10% 胎牛血清與 1% 抗生素(PSN)之培養液 RPMI1640(GIBCO)的 25 cm² 培養瓶中，將培養液置於 37 °C 5% 二氧化碳培養箱，待細胞長滿後，以 1 比 2 作繼代培養。

結果

(Results)

一、Genomic PCR 分析 *MJD* 基因中 CAG 重覆序列

1. *MJD* 家族成員之分析

從具有臨床症狀之小腦運動失調病人及家屬共 60 人，經由 genomic PCR 分析(圖一)，發現有 8 個家族為 *MJD* 家族。佔總篩選家族 27.6%，其中 14 人已發病，7 人則尚未顯現臨床症狀(圖二)。

Family C：I-2 帶有 75 個 CAG 重覆序列，於 50 歲開始有症狀出現。

II-1 現年 37 歲，在分生診斷帶有 77 個 CAG 重覆序列後，隨即出現症狀。II-2、3、4 雖有二分之一的機會遺傳到致病的基因，幸運的是他們的 CAG 重覆序列 15-31 皆在正常範圍內。

Family D：II-8 帶有 80 個 CAG 重覆序列，於 30 歲發病。其父親及叔叔皆於 60 歲發病。但因未取得此家族之其它成員之檢體，故只分析此病患。

Family E：II-1 CAG 重覆序列為 16、28，皆在正常範圍內。而 II-2 CAG 重覆序列為 21、78，於 27 歲即出現步態不穩的現象。其母親及舅舅約於 30 歲發病。

Family F：I-2 於二十多歲發病後現已去世。II-1、2、4 CAG 重覆序列範圍為 77-79，都很早就有症狀出現(17-30 歲)。

Family G：此家族成員中多人有小腦運動失調症狀，但僅 II-6、8 兩人提供檢體做分析，二人皆帶有 75 個 CAG 重覆序列且分別於 40、38 歲發病。

Family H：I-1 已去世，去世前並無症狀，I-2 也沒有神經退化的病徵，但 II-1、2、4 皆於 40 多歲發病，II-2 MJD 基因中 CAG 重覆序列各為 27、76。

Family I：I-1 CAG 重覆序列為 30、31，皆在正常範圍內。而 I-2 CAG 重覆序列為 15、78，於 33 歲出現症狀。II-1、3 都遺傳到母親帶有倍增突變的 *MJD* 基因，CAG 重覆序列也是 78 目前並無症狀。II-2 之重覆序列為 15、31，皆在正常範圍內。

Family A-1：此為兩家族患者分別就醫後，經追溯其家族，才發現原來都與本實驗室先前所分析的 MJD 家族 A 有血緣關係(蔡蕙芳碩士論文, 1996)。II-2、4 皆帶有倍增突變的 *MJD* 基因，CAG 重覆序列各為 78、80，分別於 26、30 歲即已發病。III-1 CAG 重覆序列在正常範圍內。III-2 CAG 重覆序列與母親相同，目前 5 歲尚未有症狀出現。

II-7 CAG 重覆序列為 26、30，皆在正常範圍內。II-8 帶有 78 個 CAG 重覆序列，於 27 歲發病。III-3、III-4 兩兄弟皆遺傳到倍增突變的 *MJD* 基因，CAG 重覆序列各為 75、78。目前年齡各為 24、25 歲，尚未有任何症狀出現。

Family A-2：此家族先前已經經由本實驗室分生診斷有多人帶有倍增突變的 *MJD* 基因(蔡蕙芳碩士論文, 1996)。II-2、3

CAG 重覆序列為 16、26，在正常範圍內。II-1 CAG 重覆序列為 79，目前年齡還小尚未有症狀出現。

Family A-3：此家族與 A-1 屬同一家族，本次僅分析 II-1，CAG 重覆序列為 80，目前尚未有症狀出現。

2. 正常人與 MJD 患者中 *MJD* 基因的 CAG 重覆序列分佈情形

MJD 基因中 CAG 重覆序列在病人及其家屬共 60 人中，經聚合酶連鎖反應的分析結果如(表三)，分佈情形如(圖三)。不管在正常人或 MJD 患者中皆可發現 CAG 重覆序列有多型性(polymorphic)的現象。正常的 CAG 重覆序列的分佈範圍從 15 個重覆到 38 個重覆，其平均值(mean)為 22.4 個重覆，約有 91.5% 為異合子(heterozygotes)，大部份的人(26%)都集中於 16 重覆。而在 MJD 患者中倍增的對偶基因之 CAG 重覆序列的分佈範圍則從 75 個重覆到 81 個重覆，其平均值(mean)為 78.0 重覆，所有帶有擴增突變的對偶基因之成員(包括已發病與未發病者)皆為異合子(heterozygotes)，也就是說他們都遺傳到一個異常的 *MJD* 基因及一個正常的 *MJD* 基因。CAG 重覆序列在正常分佈範圍與異常分佈範圍間有段間距(gap)，中間約有 39-74 個重覆沒有 intermediate alleles 的出現。此分析結果與國外過去發表之論文類似(Takiyama et al., 1995; Maciel et al., 1995; Maruyama et al., 1995)。

3. 發病年齡和 CAG 重覆序列長度的關係：

由以上幾個家族及結合本實驗室之前的研究(蔡蕙芳碩士論文, 1996)，結果發現：MJD 患者的發病年齡和 *MJD* 基因中 CAG

擴張突變(expansion mutation)的重覆序列數目兩者間的關係如圖四。其迴歸係數為-0.61，此統計數據顯示兩者間為有意義的負相關，即 *MJD* 基因中 CAG 擴張突變(expansion mutation)的重覆序列長度增加，*MJD* 患者的發病年齡就越早，如 Family C 中，I-2 CAG 重覆序列為 75，發病年齡為 53 歲，而 II-1 CAG 重覆序列為 77，發病年齡則提早到 37 歲。此結果與國外多篇報告相吻合(Takiyama et al., 1995; Maciel et al., 1995; Maruyama et al., 1995)。

4. 親代間 CAG 重覆序列長度的不穩定性：

當父親或母親將帶有倍增突變的 *MJD* 基因傳給下一代時，CAG 重覆序列長度有時會增加，有時會減少而呈現某種程度的不穩定性。圖五顯示 20 對親代間 CAG 重覆序列長度改變的情形(此部份包含本實驗室之前的研究蔡蕙芳碩士論文, 1996)。其中 16 對(80%) CAG 重覆序列長度增加或不變，然而只有 4 對(20%)的重覆數目減少，重覆的數目增加或減少的範圍從-4 到 7，傳給下一代平均約增加 1.2 個重覆。其中 12 對為遺傳自父親，8 對為遺傳自母親(圖六)，父親傳給子代的 12 對當中，有 8 對其 CAG 重覆序列的長度維持不變或增加，有 4 對的 CAG 重覆序列的長度變短，CAG 重覆增減範圍由-4 到+7，平均增加 1.9 個重覆。而在母親傳給子代的 8 對中，有 7 對其 CAG 重覆序列的長度維持不變或增加，有 1 對的 CAG 重覆序列的長度變短，CAG 重覆增減範圍由-3 到+1，平均只減少 0.1 個重覆。此結果顯示 *MJD* 基因中 CAG 重覆序列在親代間傳遞時呈現小量的、緩和的改變。此和 Maciel 等人(1995)所做配對分析結果相似。

5. 期望現象(Anticipation)

因為先前的研究對於 MJD 疾病的期望現象有不同的見解 (Maruyama et al., 1995; Maciel et al., 1995)，然而其它的神經退化性疾病中，例如 SCA1、SCA5 (Zoghbi et al., 1988; Ranum et al., 1994)，均被報告有期望現象，也就是說子代的發病年齡大多比親代的發病年齡要早。因此我們針對以上幾個 MJD 家族中，患者的發病年齡做一統計分析(表四)，發現親代的發病年齡較子代的平均發病年齡提早了 10.24 年，證明兩者間有相當意義的差異性($p < 0.001$)。我們的結果支持 MJD 中也有期望現象。

二、MJD 之 RNA 的分析

1. 北方墨點法(Northern blot)的分析

為了要瞭解 MJD 基因的轉錄是否在致病機制中扮演某種角色，所以，藉由北方墨點法來分析、比較正常人與 MJD 患者(包括已發病及未發病者)之 MJD RNA 量的差異，使用 MJD cDNA 當探針(probe)。結果如圖七。line 1 為正常人，line 2、3、7、8 為未發病之 MJD 患者，line 4、5、6 為已發病之 MJD 患者。此結果可發現並無明顯的訊息(signal)，所以，並無法判別以上的各種情況，雖重覆此實驗三次，結果仍然一樣，故推測可能由於 MJD 轉錄之 RNA 量極少所致。此結果與 1995 年 Kawaguchi 等人所發表：北方墨點法不夠靈敏，無法偵測出老鼠 *mjd* 之 RNA 一致。

2. Primer extension

先前 Kawaguchi 等人曾分析 *MJD* 的 RNA，得到幾種 isoforms，大致包含 2000 bp，但仍未十分確定 *MJD* 轉錄的長度及其轉錄起始點的位置。所以我們設計一個引子序列，可由轉譯起始處往 5' 端處執行 primer extension，希望藉此對 *MJD* 的 RNA 有多一份瞭解。結果如圖八，line 1、2、3、4 各為 M13 之序列：A、T、C、G，line 5 為正常人的 RNA，line 6 為 *MJD* 患者的 RNA，line 7、8 為負的控制組(negative control)，line 7 未加入任何 RNA，line 8 則未加入逆轉錄酶，在 30 bp 處皆可見一明顯的訊號(signal)，此為經由放射線磷(³²P)所標定的引子(primer)，另外，在 50-60 bp 處亦可見一明顯的訊號，因為此訊號同時出現於負的控制組，所以判定此應為非專一性的訊號。懷疑此結果是因為 *MJD* 之 RNA 量不足所致，故提高 total RNA 的量至 150 µg，且重覆此實驗數次，但結果仍然與此相同。

三、*MJD* 基因中 CAG 重覆序列在繼代培養之淋巴母細胞株內的穩定性

本實驗主要目的在於瞭解：(1) 在繼代培養之淋巴母細胞株內，*MJD* 基因中 CAG 重覆序列是否穩定。(2) 是否與血液樣本之重覆次數相同，假如細胞株經繼代培養後，*MJD* 基因中 CAG 重覆序列呈現不穩定的現象，亦即重覆次數增加或減少許多，那麼，我們可以得知此 CAG 擴增突變的基因於細胞分裂時即具不穩定性，若我們拿繼代培養之淋巴母細胞株當作研究 *MJD* 的材料，結果將產生許多誤差，但是如果細胞

株經繼代培養後，*MJD*基因中CAG重覆序列並無改變，那麼，我們拿繼代培養之淋巴母細胞株當作研究MJD的材料，結果才會具有意義。

因此，在建立淋巴母細胞株後，分別在不同代數時，萃取出其中之DNA，並藉由聚合酶連鎖反應來分析*MJD*基因中CAG重覆序列(圖九)，line 1、2、3、4各為pGEM之序列：A、T、C、G，line 5~9為MJD患者的樣本，由左到右分別為血液、第五代、第七代、以及第十代、第十二代，於line 5~9，皆可見兩個聚合酶連鎖反應的產物，下方為包含正常的CAG重覆序列的產物，上方則為包含倍增突變的CAG重覆序列的產物，可發現，MJD患者的繼代培養淋巴母細胞株中，CAG重覆序列皆維持一定的穩定性。也就是說，細胞株經繼代培養後，仍可被用來研究MJD，而不會有太大的誤差。

討論

(Discussion)

由本篇研究分析臺灣地區運動失調患者及其家屬共 60 人，結果發現 21 個 MJD 患者，*MJD* 基因中 CAG 重覆序列的數目在正常範圍為 15-38，而倍增突變範圍則為 75-81，此分佈範圍皆與國外許多報告之分佈範圍相仿，如日本的 Takiyama 等人 1995 年發表的正常 *MJD* 對偶基因(alleles)的 CAG 重覆序列的數目是 14-37 個重覆，而倍增突變的對偶基因為 68-84 個重覆，加拿大的 Maciel 等人 1995 年發表的正常 *MJD* 對偶基因的 CAG 重覆序列的數目是 12-37 個重覆，而倍增突變的對偶基因為 62-84 個重覆(Takiyama et al., 1995; Maciel et al., 1995)。正常與異常範圍間有一段間距，中間並沒有重疊的現象，此與 HD 正常與異常範圍間有一段重疊的現象不同(Goldberg et al., 1993)。倍增突變的範圍大約是正常範圍中最長的 CAG 重覆序列的兩倍，最大也未達 100 個重覆，此與其它因 CAG 重覆序列倍增所造成的疾病如 SCA1、HD、DRPLA 等相似，而與另一類三核苷酸重覆序列倍增突變所造成的疾病如易脆 X 染色體症候群(fragile X syndrome) CGG 倍增、Friedreich's ataxia 之 GAA 倍增重覆次數可達上百甚至上千(Verkerk et al., 1991; Campuzano et al., 1996)不同。造成三核苷酸重覆序列倍增突變的原因目前並不清楚，近年來陸續有學者提出可能的原因，例如減數分裂的不安定性(meiotic instability)、創始者的染色體效應(Founder Chromosome Effect)(Richards et al., 1992)、及非對等交換(unequal crossing over)等，這些因素都可能是造成 CAG 重覆的長度變化，但確切原因

仍有待未來更進一步的研究與探討。無論如何，由本篇研究結果可知，經由分子生物的分析，確可將正常與倍增突變之 *MJD* 基因鑑定出來，此有利於臨床醫師對 *MJD* 疾病的診斷，更可應用於尚無症狀的個體(asymptomatic individuals)其突變基因的篩檢。

在本研究統計分析中也發現，*MJD* 患者的發病年齡和 *MJD* 基因中 CAG 擴張突變(expansion mutation)的重覆序列數目之間呈現有意義的負相關($r=-0.61$ $p<0.05$)，即 *MJD* 基因中 CAG 擴張突變(expansion mutation)的重覆序列長度增加，*MJD* 患者的發病年齡就趨越早。此結果與國外多篇有關 *MJD* 的報告相吻合(Takiyama et al., 1995; Maciel et al., 1995; Maruyama et al., 1995)。這種因 CAG 倍增突變數目的增加造成患者的發病年齡提早的情形在亦可見於其它 CAG 倍增突變所造成的疾病，如 HD(The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993)、*SCA1*(Orr et al., 1993)等。但為何 CAG 倍增突變數目的增加會造成患者的發病年齡提早？為何這些 CAG 倍增突變所造成的不同神經症狀是在 30-40 歲時才出現？為何同樣的 CAG 重覆序列長度，發病年齡卻並不一定相同？這些問題均有待研究。然而目前分析顯示還有其他調控因子或環境因素促使病徵的產生，才會造成此種個體差異情形。

MJD 在親代間 CAG 重覆序列長度的不穩定性方面，由本篇研究可發現，子代的 CAG 倍增突變數目有時比親代多，有時卻會減少，此與日本的 Maruyama 等人所做的結果 CAG 重覆是單向增加有所不同，但與 *SCA1* 基因的報告類似(Chung et al., 1993)。而親代的性別也會影響此種差異性，許多統計分析發現，父親傳給子代的 CAG 重覆長度變異性要比女性長，當父親傳給子代時，多數 CAG 重覆的長度會增加，母親傳給子代時，則大部份不會改變或減少，此現象在其

它疾病亦曾被報導(Orr et al., 1993; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; La Spada et al., 1991; Fu et al., 1991) 為何會有這種性別上的差異? 已有學者提出, 或許是男性的精子形成過程中行有絲分裂的次數遠比卵子多, 在有絲分裂的不安定性(mitotic instability)中, 造成子代的 CAG 重覆的長度增加(Chong et al., 1995), 但實際原因仍有待進一步的探討。

許多有關 MJD 的研究指出, MJD 的純合子(homozygotes)患者有較早發病的傾向, 其臨床症狀也顯得較嚴重, 似乎有基因劑量效應(gene dosage effect)(Kawakami et al., 1995; Takiyama et al., 1995), 但 HD 卻沒有這種情形(Wexler et al., 1987; Myers et al., 1989), 也許因為這兩種疾病的致病機制不同所致。無論如何, 如果純合子患者因為得到兩個倍增的 CAG 重覆的對偶基因而有較高濃度的 RNA 及蛋白質產物, 可以造成病症的提早進行, 那麼, 由北方墨點法分析已發病、未發病及正常人, 應可觀察出他們的 MJD RNA 量的差異, 可惜在本研究中, 無法得到這方面的結果, 這可能由於 MJD 之 RNA 的量存在於 LCL 細胞中極少而北方墨點法的靈敏度不足所致。這和稍早 Kawaguchi 等人提出北方墨點法無法偵測出老鼠 *mjd* 的 RNA, 是相同的結果。事實上, 在 HD、SCA1 之北方墨點法分析中, 皆可偵測出其 RNA(Banfi et al., 1994; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993)。且在 1996 年 Ishiyama 等人藉由原位雜交發現, MJD RNA 在人類腦部中所表現的量於病人與正常人中並沒有顯著的差異, 所以作者們推論此疾病之致病機制應與蛋白質產物有關而與此基因的轉錄, 也就是 RNA 無關。但是, 在這個實驗中有個缺點, 即由原位雜交觀察結果只能約略估計所有 MJD RNA 的量, 卻無法區分出倍增突變與正常的基因所轉錄

出的 RNA，是否此二者所轉錄的 RNA 在量的表現即有所差異？或許可經由定量反轉錄聚合酶連鎖反應來得知此答案。所以，本研究中也觀察出正常人及已發病與未發病者之淋巴母細胞株，經繼代培養後 *MJD* 基因中 CAG 重覆並不會有不穩定的現象，因此未來可利用此材料，來繼續研究 *MJD* 基因。以期對整個疾病有更進一步的認識。另外，在 *SCA1* 也有此類研究報告，從比較分析患者週邊血液的 DNA 和培養的淋巴母細胞(cultured lymphoblasts) DNA 中，發現 *SCA1* 基因的 CAG 重覆在體細胞較穩定，但是在培養的淋巴母細胞就顯現出有絲分裂的不穩定(Mitotic instability)(Chung et al., 1993)。而在 *SBMA* 中則發現，週邊血液的 DNA 和不同代數的繼代培養淋巴母細胞中 CAG 重覆次數都很穩定(Spiegel et al., 1996)。而除了量的變化外，有學者實驗證明，當 RNA 中的 CAG 重覆次數越多時，就能與更多的 RNA 結合蛋白(RNA binding protein)結合(McLaughlin et al., 1996)，也就是說當 RNA 產生了質的變化，也可能造成某些影響，進而造成疾病。當然，確實的情形有待未來更進一步的探討。

此病目前尚無有效的治療方法，且因為是一種晚發型的遺傳疾病，大多數在成年以後才發病(平均值約在 37.4 歲)(Sequeiros and Coutinho, 1993)，此時期的人大都已成家立業，若在這時發病，不僅造成家庭的損傷，也可能又將致病的基因傳給下一代，而這些子代卻因為猜測是否自己是 *MJD* 患者，而生活在恐懼中。所以本研究的主要目的，一方面是希望對於台灣區 *MJD* 疾病的篩檢，及對此疾病的家屬成員做追蹤調查，並對疾病的患者及家屬提供一些遺傳諮詢。未來預期能利用絨毛細胞或羊水細胞的 DNA 分析 *MJD* 基因中的 CAG 擴張重覆序列，並且實際應用於產前診斷，以期達到優生保健的

目的。另一方面，更從分子生物學的角度來探討此病，希望對此疾病多一份的瞭解，以期未來除了預防外，更能有效的治療。

參考文獻

(References)

Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theimann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M.A., Graham, R.K., and Hayden, M.R. (1993) The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature Genet.*, 4, 398-403.

Banfi, S., Servadio, A., Chung, M-y., Kwiatkowski, T. J., Jr., McCall, A. E., Duvick, L. A., Shen, Y., Roth, E. J., Orr, H. T., and Zoghbi, H.Y. (1994). Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia. *Nature Genet.*, 7, 513-519.

Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M.D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Cañizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S.I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., Michele, G.D., Filla, F., Frutos, R.D., Palau, F., Patel, O.I., Donato, S.D., Mandel, J-L., Coccozza, S., Koenig, M., Pandolfo, M.(1996) Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion. *Science.*, 271, 1423-1427.

Coutinho, P., and Andrade, C. (1978) Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands: a new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology.*, 28, 703-709.

Coutinho, P., Calheiros, J.M., and Andrade, C. (1977) On a new degenerative disorder of the central nervous system, inherited in an autosomal dominant mode and affecting people of Azorean extraction. *O Medico.*, 82, 446-448.

Chung, M-y, Ranum, L.P.W., Duvic, L.A., Servadio, A., Zoghbi, H.Y., Orr, H.T. (1993) Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nature Genet.*, 5, 254-258.

Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Fontali, M., Folstein, S., et al., (1993) Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nature Gene.*, 4, 387-892.

Fu, Y.-H., Kuhl, D.P.A., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Richards, S., Verkerk, A.J.M.H., Holden, J.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 results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 67, 1047-1058.

Goldberg Y.P., Andrew S.E., Clarke L.A., Hayden M.R. (1993) A PCR method for accurate assessment of trinucleotide repeat expansion in Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 635-636.

Healton, E.B., Brust, J.C.M., Kerr, D.L., Resor, S., Penn, A. (1980) Presumably Azorean disease in presumably non-Portuguese family. *Neurology*, 30, 1084-1089.

Hirayama, K., Takanagi, T., Nakamura, R., Yanagisawa, N., Hattori, T., Kita, K., Yanagimoto, S.; Fujita, M.; Nagaoka, M., Satomura, Y., Sobue, I., Iizuka, R., Toyokura, Y., Satoyoshi, E. (1994) Spinocerebellar degenerations in Japan: a nationwide epidemiological and clinical study. *Acta Neurol. Scand*, 89(suppl. 153), 1-22.

Ikeda, H., Yamuguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S., Kakizuka, A. (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nature Genet.*, 13, 196-202.

Imbert, G., Saudou, F., Yvert, G., Devys, D., Trottier, Y. et al. (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/Glutamine repeats. *Nature Genet.*, 14, 285-291.

Jodice, C., Malaspina, P., Persichetti, F., Novelletto, A., Spadaro, M., Giunti, P., Morocutti, C., et al., (1994) Effect of trinucleotide repeat length and parental sex on phenotypic variation in spinocerebellar ataxia 1. *Am. J. Hum. Genet.*, 54, 959-965.

Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., et al. (1994) CAG expansions in a novel gene from Machado-Joseph Disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet.*, 8, 221-227.

Kawakami, H., Maruyama, H., Nakamura, S., Kawaguchi, Y., Kakizuka, A., Doyu, M., Sobue, G. (1995) Unique features of the CAG repeats in Machado-Joseph disease. *Nature Genet.*, 9, 344-345.

Koide, R., Ikeuchi, T., Onodera, O., Tanaka, H., Igarashi, S., Endo, K., Takahashi, H., Kondo, R., Ishiawa, A., Hayashi, T., Saito, M., Tomoda, A., Miike, T., Naito, H., Ikuta, F. and Tsuji, S. (1994) Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nature Genet.*, 6, 9-13.

La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E., Fischbeck, K.H. (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.*, 352, 77-79.

Lerer, I., Merims, D., Abeliovich, D., Zlotogora, J., and Gadoth, N. (1996) Machado-Joseph Disease: Correlation between the clinical features, the CAG repeat length and homozygosity for the mutation. *Eur. J. Hum. Genet.*, 4, 3-7.

Lima, L., and Coutinho, P., (1980) Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorean Portuguese family. *Neurol.*, 30, 319-322.

Livingstone, I. R., Sequeiros, J. (1984) Machado-Joseph disease in an American-Italian family. *J. Neurogenet.*, 1, 185-188.

Macil, P., Gaspar, C., DeStefano, A.L., Silveira, L., Coutinho, P., Radvany, J., Dawson, D.M., Sundarsky, L., Guimaraes, J., Loureiro, J.E.L., Nezarati, M.M., Corwin, L.L., LopesCendes, I., Rooke, K., Rosenberg, R., MacLeod, P., Farrer, L.A., Sequeiros, J. and Rouleau, G.A. (1995) Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 57, 54-61.

Maruyama, H., Nakamura, S., Matsuyama, Z., Sakai, T., Doyu, M., Sobue, G., Seto, M., Tsujihata, M., Oh-i, T., Nishino, T., Sunohara, N., Takahashi, R., Hayashi, M., Nishino, I., Ohtake, T., Oda, T., Nishimura, M., Saida, T., Matsumoto, H., Baba, M., Kawaguchi, Y., Kakizuka, A. and Kawakami, H. (1995) Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 807-812.

McLaughlin, B.A., Spencer, C., Eberwine, J. (1996) CAG Trinucleotide RNA repeats interact with RNA-binding proteins. *Am. J. Hum. Genet.*, 59, 561-569.

Myers, R.H., Leavitt, J., Farrer, L.A., Jagadeesh, J., McFarlane, H., Mastromauro, C.A., Mark, R.J., et al. (1989) Homozygote for Huntington disease. *Am J Hum Genet.*, 45, 615-618.

Nagafuchi, S., Yanagisawa, H., Sato, K., Shirayama, T., Ohsaki, E., Bunda, M., Takeda, T., Tadokoro, L., Murayama, N., Tanaka, Y., Kikushima, H., Umino, K., Kurosawa, H., Furukawa, T., Nihei, K., Inoue, T., Sano, A., Komure, O., Takahashi, M., Yoshizawa, T., Kanazawa, I. and Yamada, M. (1994) Dentatorubral and pallidolusian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nature Genet.*, 6, 14-18.

Nakano, K.K., Dawson, D.M., Spence, A. (1972) Machado Disease: a hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Masschusetta. *Neurology.*, 22, 49-55.

Nishiyama, K., Murayama, S., Goto, J., Watanabe, M., Hashida, H., Katayama, S., Nomura, Y., Nakamura, S., Kanazawa, I. (1997) Regional and cellular expansion of the Machado-Joseph Disease gene in brains of normal and affected individuals. *Annals of Neurology.*, 40, 776-781.

Orr, H.T., Chung, M., Banfi, S., Kwiatkowski, T.J., Servadio, A., Beaudet, A.L., McCall, A.E., Duvick, L.A., Ranum, L.P.W., and Zoghbi, H.Y. (1993) Expansion of an unstable trinucleotide CAG Repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet.*, 4, 221-226.

Pulst, S.-M., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X.-N., Lopes-Cendes, I., Pearlman, S., Starkman, S. et al. (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet.*, 14, 269-276.

Ranum L.P.W., Chung, M., Banfi, S., Bryer, A., Schut, L.J., Rameser, R., Duvick, L.A. et al. (1994) Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1: evidence for familial effects on the age at onset. *Am. J. Hum. Genet.*, 55, 244-252.

Ranum, L.P.W., Schut, L.J. Lundgren, J.K., Orr, H.T., Livingston, D.M. (1994) Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. *Nature Genet.*, 8, 280-284.

Sakai, T., Ohta, M., Ishino, H. (1983) Joseph disease in a non-Portuguese family. *Neurology.*, 33, 74-80.

Sanpei, K., Takano, H., Igarashi, S., Sato, T., Oyake, M., Sasaki, H., Wakisaka, A. et al. (1996) Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct

identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nature Genet.*, 14, 277-284,

Sequeiros, J., Silveira, I., Maciel, P., Coutinho, P., Manaia, A., Gaspar, C., Burlet, P., et al. (1994) Genetic linkage studies of Machado-Joseph disease with chromosome 14q STRPs in 16 Portuguese-Azorean kindreds. *Genomics.*, 21, 645-648.

Snell, R.G., MacMillan, J.C., Cheadle, J.P., Fenton, I., Lazarou, L.P., Davies, P., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Harper, P.S. and Shaw, D.J. (1993) Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nature Genet.*, 4, 393-397.

Spiegel, R., La Spada, A.R., Kress, W., Kenneth, H., Fischbeck, Schmid, W. (1996) Somatic Stability of the expanded CAG trinucleotide repeat in X-linked spinal and bullar muscular atrophy. *Human Mutation.*, 8, 32-37.

Sutherland, G.R. and Richards, R.I. (1995) Simple tandem repeats and human genetic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 3636-3641.

Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Kawashima, S., Sakamoto, H., Karube, Y., Shimazaki, H. et al. (1993) The gene for Machado-Joseph disease is mapped to chromosome 14q. *Nature Genet.*, 4, 300-304

Takiyama, Y., Igarashi, S., Rogaeva, E.A., Endo, K., Rogaev, E.I., Tanaka, H., Sherrington, R., et al. (1995) Evidence for intergenerational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 1137-1146.

The Huntington's disease Collaborative Research Group. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosome. *Cell.*, 72, 971-983.

Twist, E.C., Causaubon, L.K., Ruttledge, M., Rao, V.S., MacLeod, P.M., Radvany, J., Zhao, Z. et al. (1995) Machado-Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. *J. Med. Genet.*, 31, 823-829.

Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanun, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G., Saudou, F., Weber, C., David, G., Tora, L., Agid, Y., Alexis Brice & Jean-Louis Mandel. (1995) Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature.*, 378, 403-405.

Verkerk, A.J.M.H., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.-H., Kuhl, D.P.A., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F., Zhang, F., Eussen, B.E., Van Omen, G.J.B., Galjaard, H., Caskey, C.T., Nelson, D.L., Oostra, B.A., & Warren, S.T. (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.

Wexler N.S., Young A.B., Tanizi R.E., Travers H., Starosta-Rubinsten S., Penney J.B., Snodgrass S.R. et al. (1987) Homozygotes for Huntington's disease. *Nature.*, 326, 194-197.

Zoghbi, H.Y., Jodice, C., Sandkuijl, L.A., Kwiakowski, T.J., McCall, A.E., Huntoon, S.A., Lulli, P., Spadaro, M., Litt, M., Cann, H.M., Frontali, M., and Terrenato, L. (1991) The gene for autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA1) maps telomeric to HLA complex and is closely linked to the D6S89 locus in three large kindreds. *Am. J. Hum. Genet.*, 49, 23-30.

Zoghbi, H.Y., Pollack, M.S., Lyons, L.A., Ferrell, R.E., Daiger, S.P., Beaud et al. (1988) Spinocerebellar ataxia: Variable age of onset and linkage to human leukocyte antigen in a large kindred. *Ann Neurol.*, 23, 580.

蔡蕙芳 (1996) 臺灣區小腦脊髓運動失調症候群疾病中第一型及第三型/Machado-Joseph 疾病其基因座內 CAG 三核苷酸重複序列之研究。(中山醫學院醫學研究所碩士論文)

表一、檢體來源

檢體編號	家族編號	受檢日期	醫院及醫師	檢體編號	家族編號	受檢日期	醫院及醫師
54	9C	96/6/5	彰基 吳鴻明	84	21	96/10/23	光田 劉青山
55	9C	96/6/5	彰基 吳鴻明	85	22	96/10/23	光田 劉青山
56	9C	96/6/5	彰基 吳鴻明	86	14	96/10/24	彰基 黃信良
57	9C	96/6/5	彰基 吳鴻明	87	1A-2	96/11/5	中山 呂聰明
58	9C	96/6/5	彰基 吳鴻明	88	1A-3	96/11/7	中山 呂聰明
59	10	96/6/8	中榮 賈力耕	89	1A-3	96/11/7	中山 呂聰明
60	11	96/6/15	中榮 賈力耕	90	1A-3	96/11/7	中山 呂聰明
61	11	96/6/15	中榮 賈力耕	91	23	96/11/20	光田 劉青山
62	11	96/6/15	中榮 賈力耕	92	1A-1	96/11/20	光田 劉青山
63	12	96/6/24	中山 呂聰明	93	1A-1	96/11/20	光田 劉青山
64	13D	96/7/18	光田 孫明輝	94	1A-1	96/11/20	光田 劉青山
65	14	96/8/9	彰基 吳鴻明	95	1A-1	96/11/20	光田 劉青山
66	14	96/8/9	彰基 吳鴻明	96	24	96/12/19	長庚 吳逸如
67	14	96/8/9	彰基 吳鴻明	97	25G	97/1/22	高醫 陳順勝
68	14	96/08/09	彰基 吳鴻明	98	25G	97/1/23	高醫 陳順勝
69	14	96/08/09	彰基 吳鴻明	99	26	97/3/12	光田 劉青山
70	15E	96/09/06	成大 黃文柱	100	27	97/3/12	光田 劉青山
71	1A-1	96/9/11	光田 劉青山	101	28	97/3/12	光田 劉青山
72	1A-1	96/9/11	光田 劉青山	103	29	97/3/12	光田 劉青山
73	1A-1	96/9/11	光田 劉青山	107	30	97/3/26	光田 劉青山
74	1A-1	96/9/11	光田 劉青山	108	31	97/3/26	光田 劉青山
75	16	96/9/15	高醫 詹金賜	109	32	97/3/26	光田 劉青山
76	16	96/9/15	高醫 詹金賜	110	33	97/3/26	光田 劉青山
77	17F	96/9/16	楊振承 家醫	111	34	97/3/26	光田 劉青山
78	17F	96/9/16	楊振承 家醫	112	35H	97/4/15	高醫 藍旻瑜
79	17F	96/9/16	楊振承 家醫	113	36I	97/4/28	成大 陳志弘
80	18	96/10/7	彰基 吳鴻明	114	36I	97/4/28	成大 陳志弘
81	15E	96/10/8	成大 黃文柱	115	36I	97/4/28	成大 陳志弘
82	19	96/10/9	彰基 黃信良	116	36I	97/4/28	成大 陳志弘
83	20	96/10/23	光田 劉青山	117	36I	97/4/28	成大 陳志弘

表二、MJD 患者之淋巴母細胞株

樣本編號	家族	年齡	MJD 基因中 CAG 重覆次數	發病年齡
MJD001	A-1 II-8	40	23, 78	36
MJD002	A-1 III-4	23	26, 78	未發病
MJD003	A-1 III-3	24	15, 78	未發病
MJD004	A IV-3	30	16, 84	25
MJD005	A IV-16	6	16, 85	未發病
MJD006	A III-27	46	15, 83	31

附註：家族 A 為本實驗室先前經分生診斷，家族成員中許多人帶有 CAG 重覆序列倍增突變的 *MJD* 基因。(蔡蕙芳碩士論文，1996)

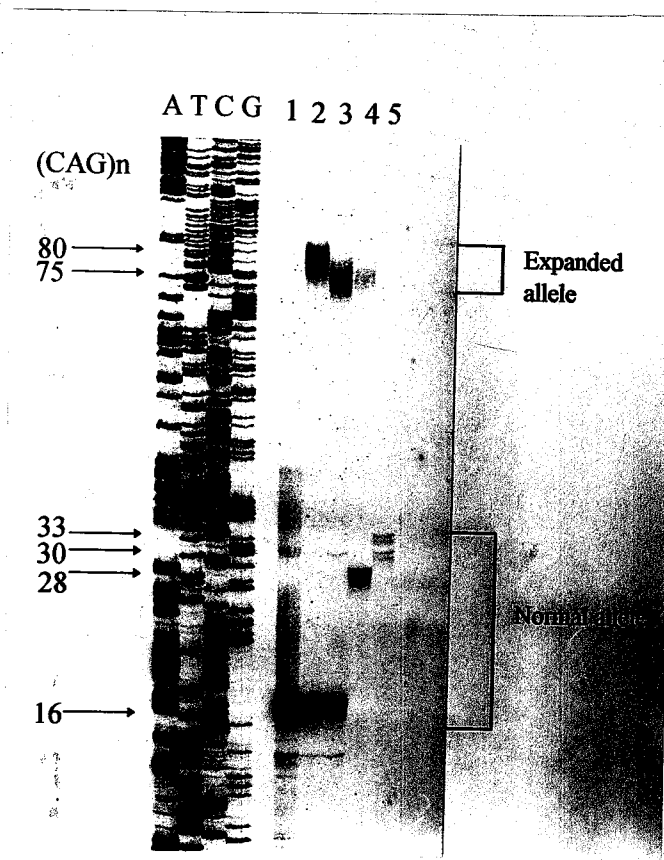
表三、MJD 基因中 CAG 重覆序列的分析結果

檢體編號	家族編號	MJD 基因中CAG重覆序列次數		
		正常分佈範圍		倍增突變
54	9C	21		75
55	9C	31		77
56	9C	15	21	
57	9C	15	21	
58	9C	21	31	
59	10	16	16	
60	11	16	29	
61	11	16	29	
62	11	16	26	
63	12	30	38	
64	13D	21		80
65	14	16	21	
66	14	16	21	
67	14	16	21	
68	14	16	21	
69	14	16	21	
70	15E	21		78
71	1A-1	26	30	
72	1A-1	23		78
73	1A-1	26		75
74	1A-1	15		78
75	16	15	15	
76	16	15	28	
77	17F	23		80
78	17F	23		80
79	17F	23		81
80	18	21	21	
81	15E	16	28	
82	19	15	31	
83	20			

84	21	30	33	
85	22	15	31	
86	14			
87	1A-2	29		80
88	1A-3	16		79
89	1A-3	16	26	
90	1A-3	16	26	
91	23	15	31	
92	1A-1	15		78
93	1A-1	23		80
94	1A-1	15	23	
95	1A-1	15		80
96	24	16	29	
97	25G	30		75
98	25G	22		75
99	26	16	32	
100	27	16	30	
101	28	16	16	
103	29	16	30	
107	30	16	31	
108	31	16	16	
109	32	31	38	
110	33	30	35	
111	34	16	25	
112	35H	27		76
113	36I	15	31	
114	36I	30	31	
115	36I	15		78
116	36I	31		78
117	36I	31		78

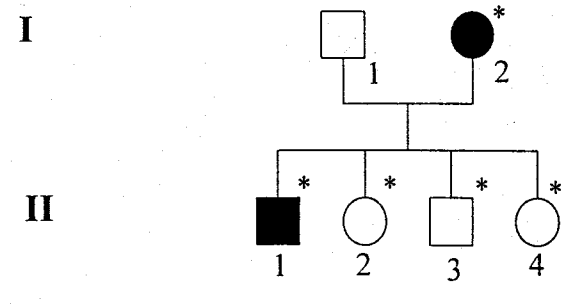
表四、親代與子代間發病年齡之差異

親代發病年齡	子代發病年齡	差距
40	30	-10
45	36	-9
45	30	-15
45	26	-19
31	35	4
31	30	-1
52	31	-21
35	32	-3
35	25	-10
25	13	-12
42	29	-13
40	41	1
40	30	-10
53	37	-16
60	30	-30
60	30	-30
30	27	-3
25	30	5
25	17	-8
25	21	-4
45	40	-5
45	25	-20
45	40	-5
45	30	-15
45	38	-7
平均發病年齡提早 10.24 歲		

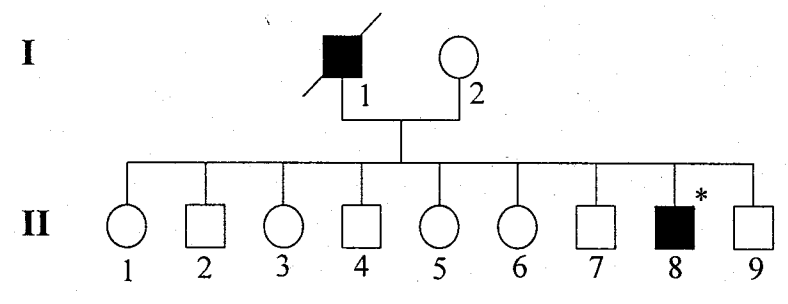


圖一、利用聚合酶連鎖反應分析 *MJD* 基因中 CAG 重覆次數。對照左方 ATCG 定序標記，箭頭所指位置為經換算後 CAG 重覆次數，得知 line 2、3、4 帶有 CAG 重覆序列倍增的 *MJD* 基因，line 1、5 則在正常分佈範圍。

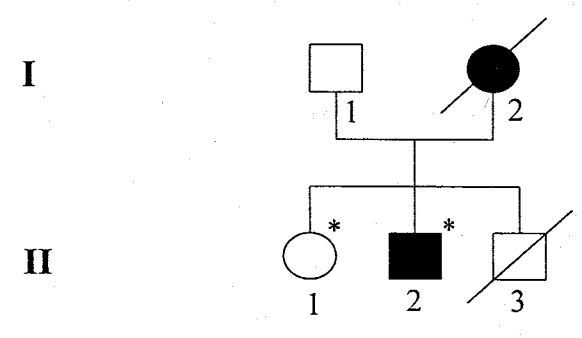
C :



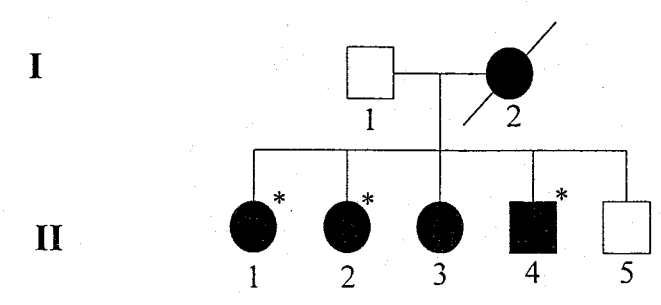
D :



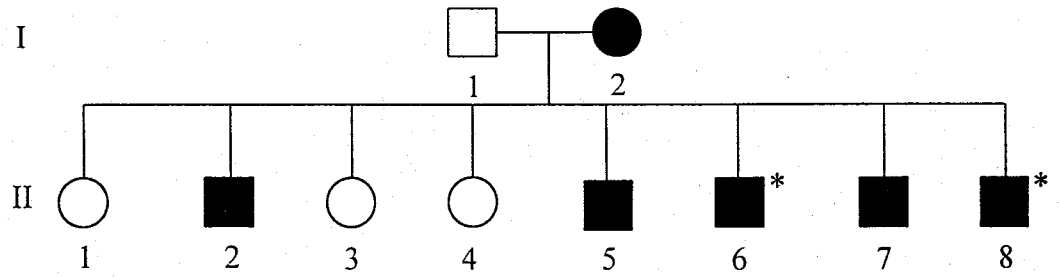
E :



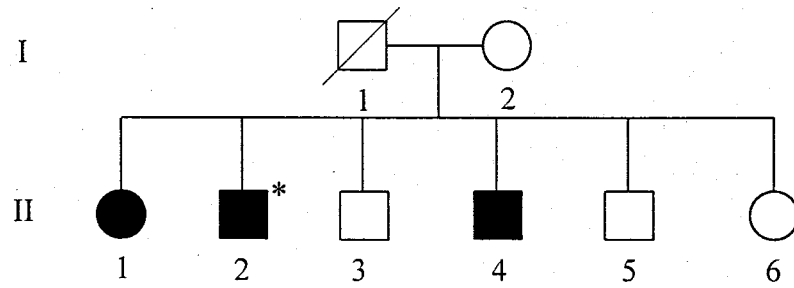
F :



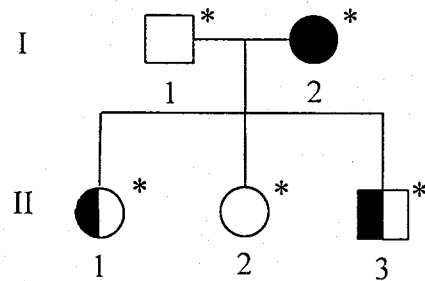
G :



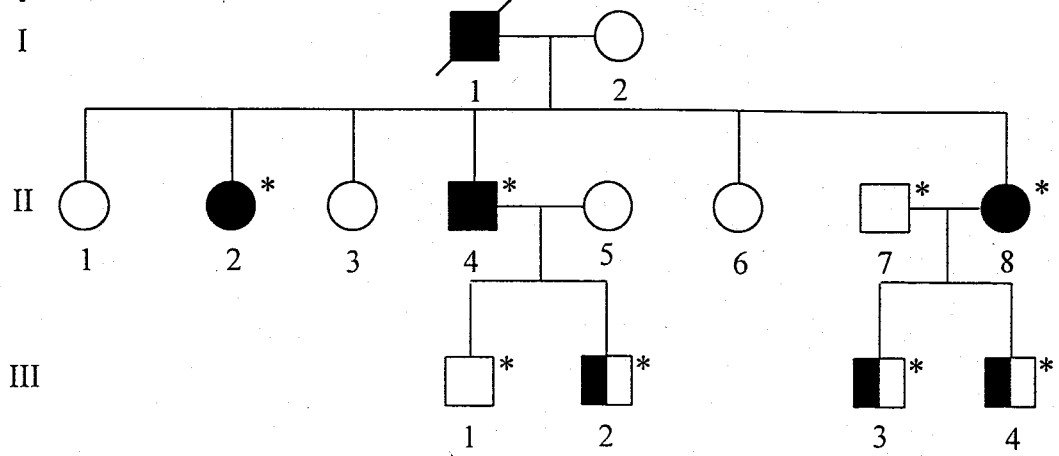
H :



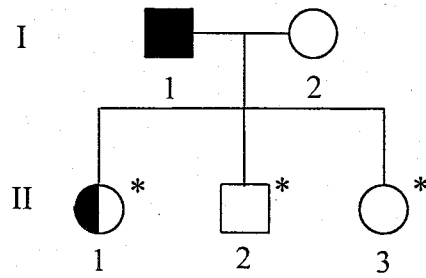
I :



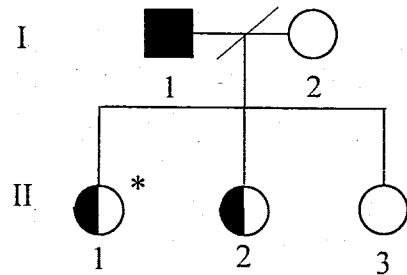
A-1 :



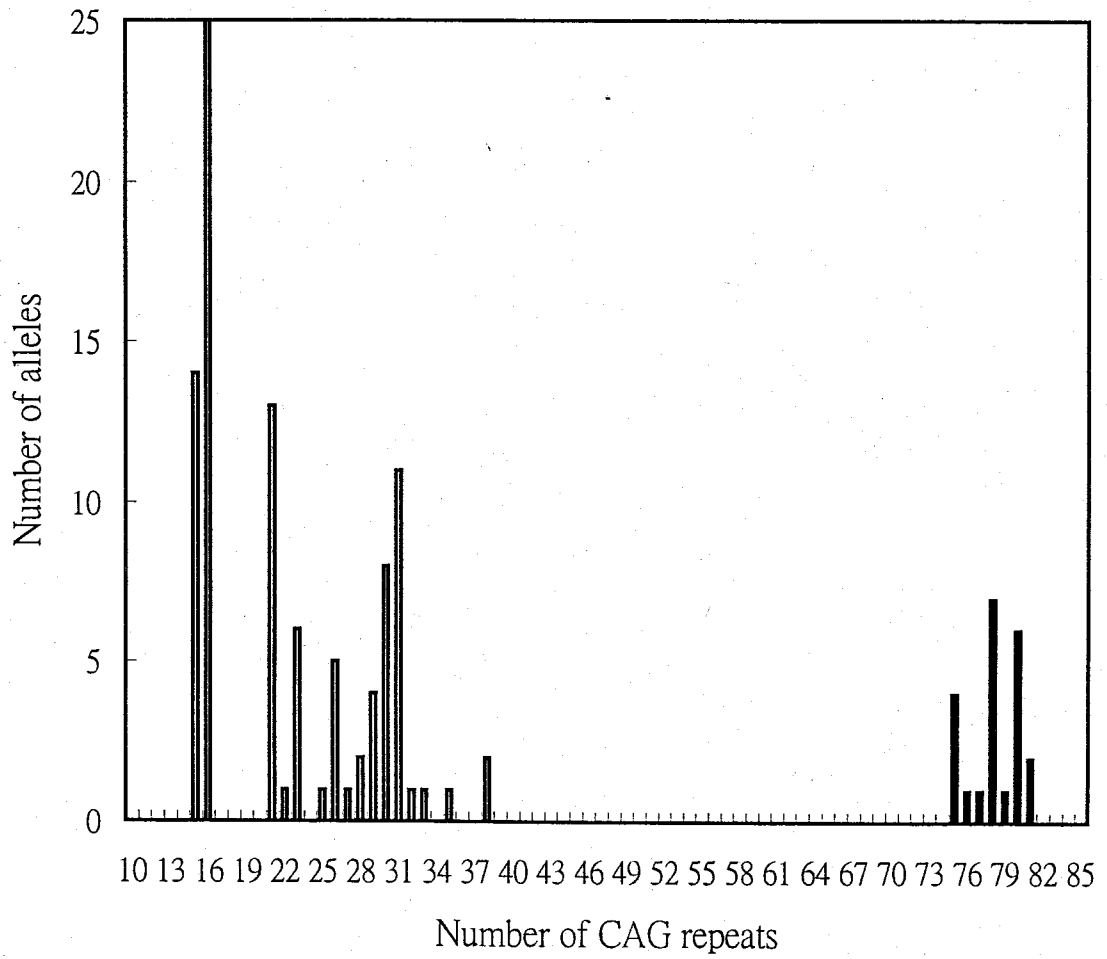
A-2 :



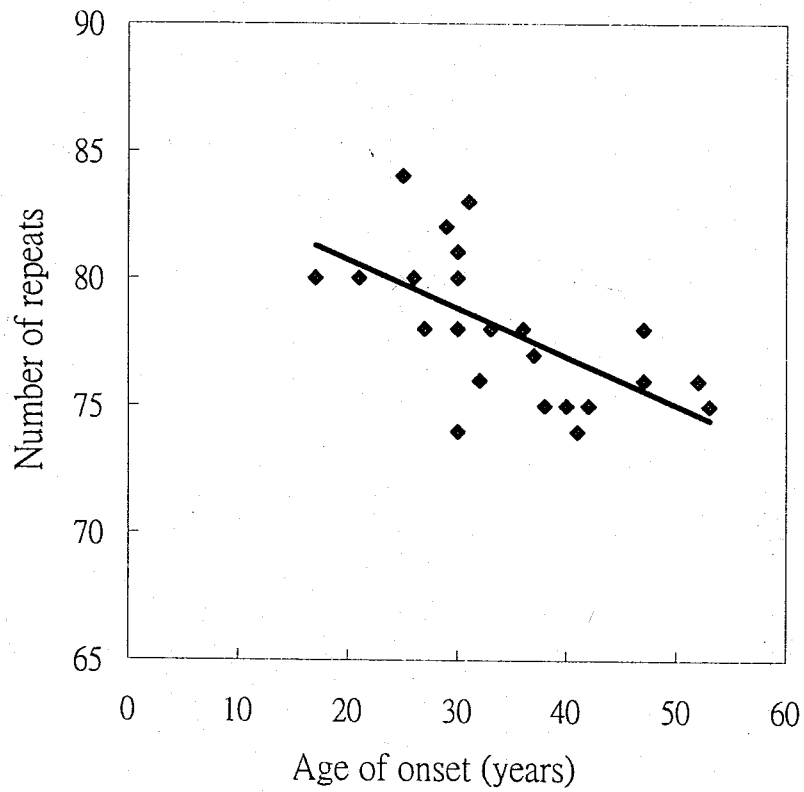
A-3 :



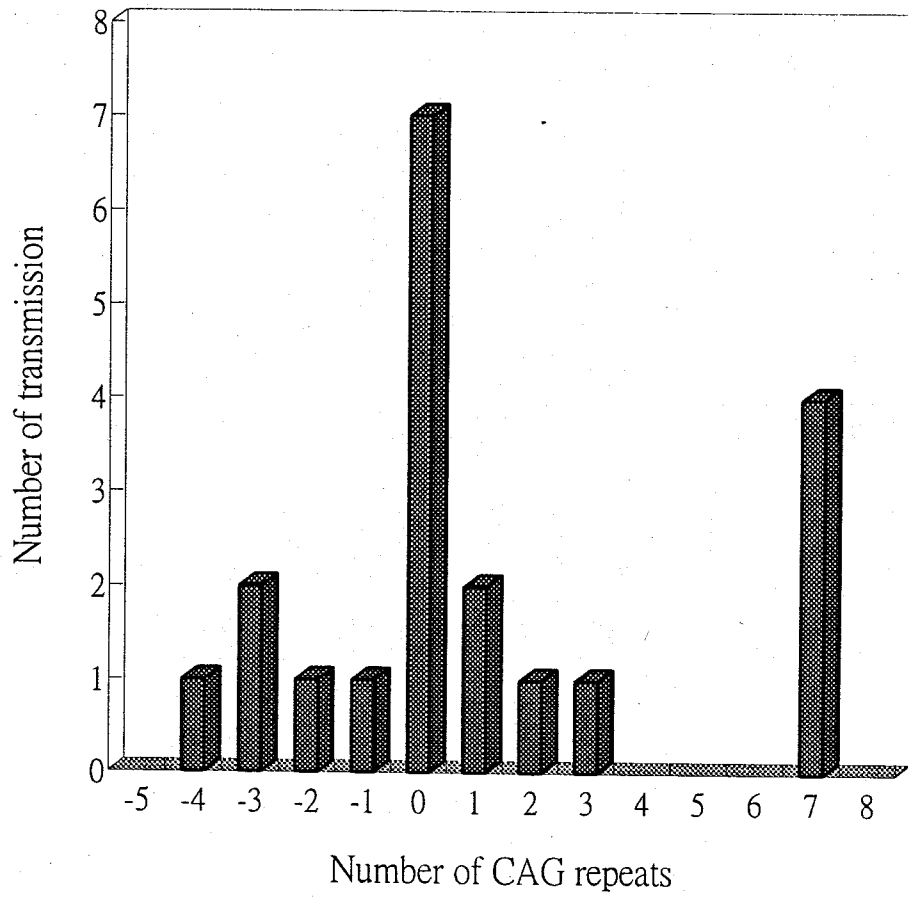
圖二、MJD 家族圖譜。符號 *，代表有提供檢體做分析者。全黑代表已發病。半黑則表示帶有 CAG 重覆序列倍增突變的 *MJD* 基因，但未出現病徵者。空心圓及空心方塊代表正常個體。



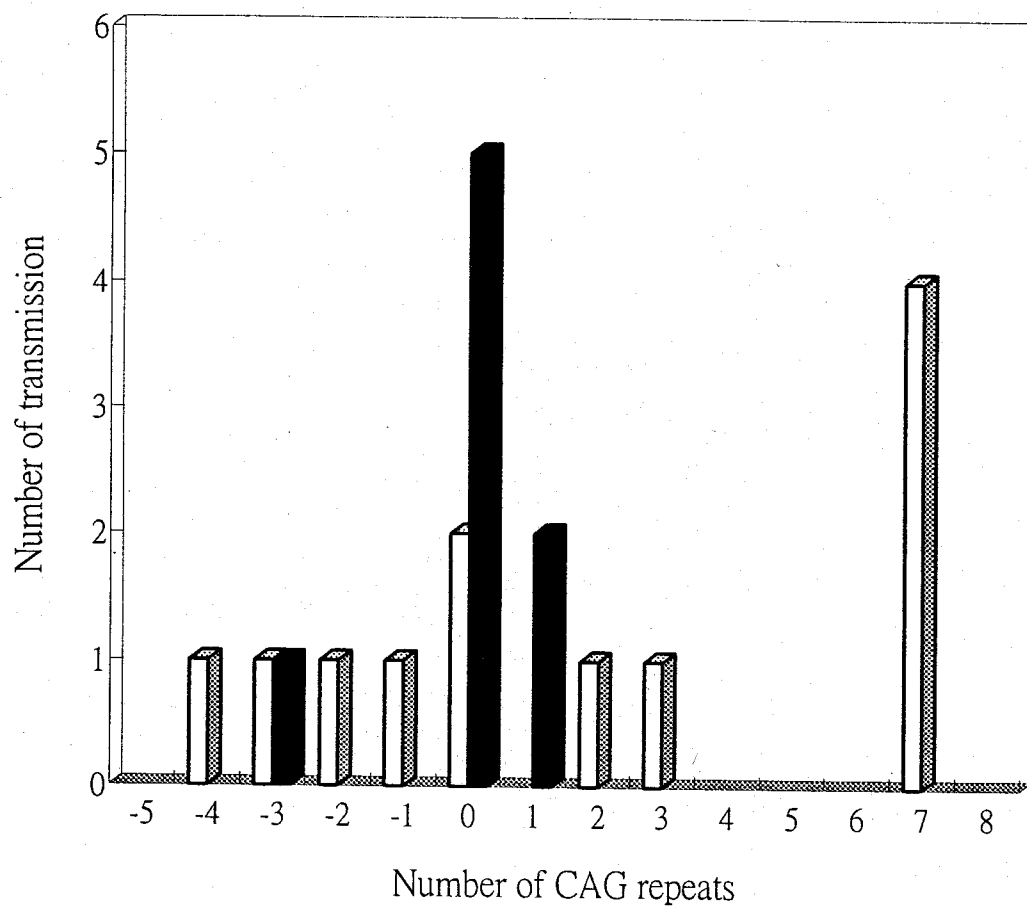
圖三、*MJD* 基因中 CAG 重覆次數之分佈情形。白色長條圖表示正常分佈範圍，而黑色條形圖則代表倍增突變的範圍。



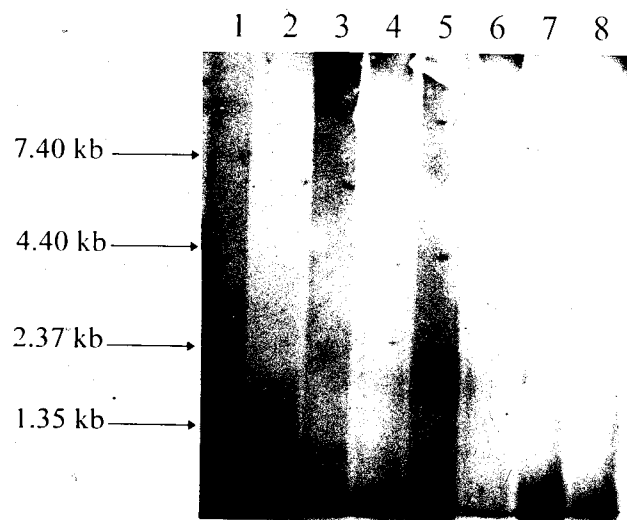
圖四、*MJD* 基因中 CAG 重覆次數與患者發病年齡間之相關。兩者之相關係數為 -0.61 ($p < 0.05$)。包括 23 個病人的統計結果。
($y = -0.189X + 84.481$; X : 患者發病年齡 ; y : *MJD* 基因中 CAG 重覆次數)



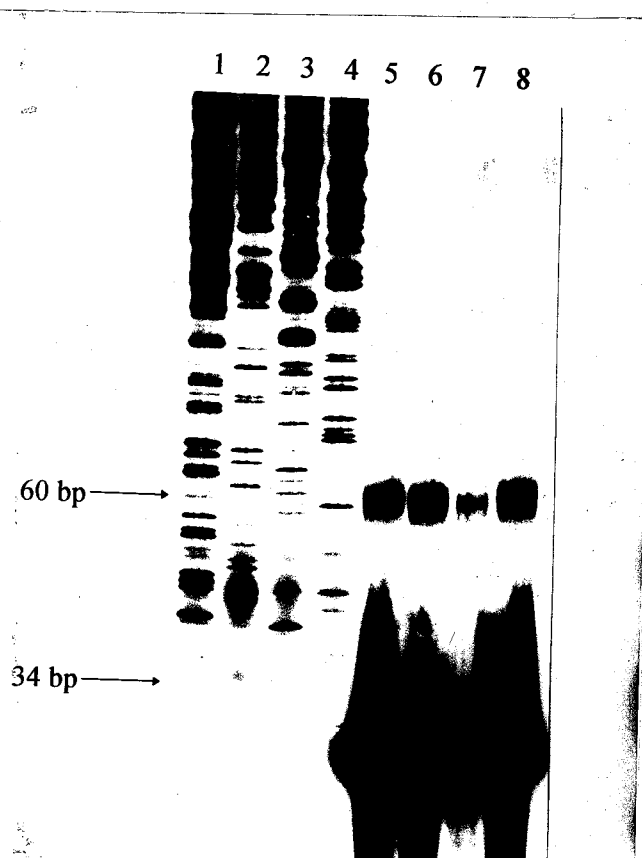
圖五、親代與子代間 *MJD* 基因中 CAG 重覆次數的不穩定性。(+)表示增加，(-)號則表示減少。



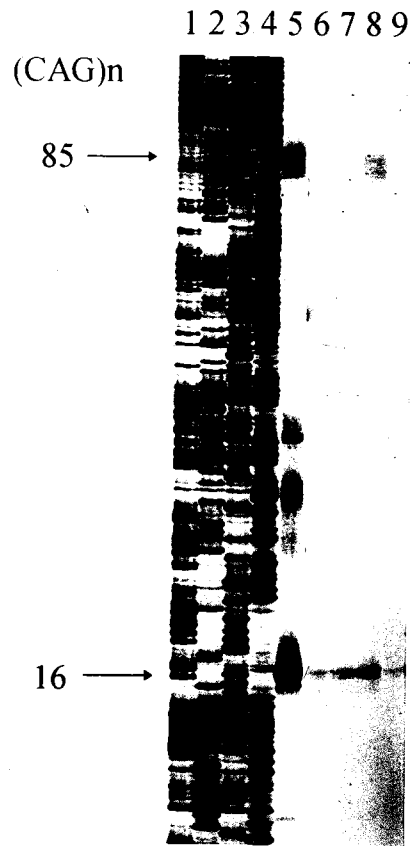
圖六、親代與子代間 *MJD* 基因中 CAG 重覆次數的不穩定性。白色條形圖代表由父親傳給子代的改變數值，黑色條形圖代表由母親傳給子代的改變數值。



圖七、北方墨點法分析 *MJD* 之 RNA 的結果。line 1 為正常人，line 2、3、7、8 為未發病之 *MJD* 患者，line 4、5、6 為已發病之 *MJD* 患者的 RNA。結果可發現並無明顯的訊號 (signal)。



圖八、primer extension 的分析結果。line 1、2、3、4 各為 M13 之序列：A、T、C、G，line 5 為正常人的 RNA，line 6 為 MJD 患者的 RNA，line 7、8 為 negative control，line 7 未加入任何 RNA，line 8 則未加入反轉錄酶。



圖九、經聚合酶連鎖反應分析繼代培養細胞中 *MJD* 基因 CAG 重覆序列的結果。line 1、2、3、4 各為 pGEM 之序列：A、T、C、G，line 5~9 的 genomic DNA 分別來自 MJD005 的血液、第五代、第七代、第十代、以及第十二代繼代培養細胞。

第二章

第一型小腦脊髓運動失調症的分生研究

Molecular Study of Spinocerebellar Ataxia

Type I

中文摘要

(Chinese abstract)

第一型小腦脊髓幹運動失調症候群，簡稱 SCA1，是一種體染色體顯性的遺傳性疾病。其特性為小腦、脊髓、和腦幹的神經退化。這種神經退化性疾病主要是由於此基因的轉譯區內有一段 CAG 核酸重覆序列發生倍增突變所致。本實驗室針對台灣區正常人及疑似此病的病人之 SCA1 基因中 CAG 序列重覆次數作統計分析。我們又收集了 29 位正常人及 25 位顯性遺傳運動失調的病人及其家屬之周邊血液，並且利用聚合酶連鎖反應(PCR)來分析 SCA1 基因中 CAG 三核苷酸重覆序列。目前為止，雖尚未發現 SCA1 病人，但我們已完成臺灣地區正常族群的 SCA1 基因中 CAG 三核苷酸重覆序列的分布範圍，其正常範圍為 21 至 33 個重覆，且其中大部分為 28-29 個重覆。此結果與國外其它種族的報告比較，分布範圍顯得較為狹窄。除此之外，本實驗室利用 PCR 的方法，已成功的從絨毛細胞分析到 SCA1 基因。我們於此展現這套分生的偵測方法能夠快速且正確的鑑定 SCA1 病人，未來更可應用於 SCA1 患者家庭中孕婦的產前診斷。

另一方面，SCA1 的蛋白質產物 ataxin-1，其功能也是我們感到有興趣的研究課題。許多轉錄活化因子都富含 CAG 三核苷酸重覆序列所轉錄出來的多個麩胺酸片段，為了探討 ataxin-1 是否扮演著轉錄活化因子的角色，我們將整段 SCA1 基因及去除 SCA1 基因中 CAG 重覆序列的 DNA，與酵母菌 Gal4 的 DNA 鍵結作用區融合，然後分析它們在 COS-7 細胞中對轉錄活性的影響。分析結果顯示：正常的 ataxin-1 蛋白與轉錄的調節應無直接的關連。

英文摘要

(Abstract)

Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) is an autosomal dominant disorder characterized by neurodegeneration of the cerebellum, spinal cord and brainstem. This neurodegeneration disease is associated with expansion of an unstable CAG repeats within the coding region of the gene. We are conducting a local survey of the normal population and the candidate patients to analyze the CAG repeats in SCA1 gene. So far, we have analyzed the peripheral blood from 54 normal individuals to assay the SCA1 trinucleotide repeat by the use of genomic polymerase chain reaction (PCR). We have found that the normal range is from 21 to 33 repeats, with the most common of 28-29 repeats. The range is relatively narrow compared to what reported in other ethnic groups. In addition, the direct molecular analysis of SCA1 gene from villous and amniotic DNA have been successful in our study. Our technique enables the quick and accurate diagnosis of SCA1 patients and prenatal screening for the SCA1 families in the future.

On the other hand, the biological function(s) of the SCA1 protein (ataxin-1) is of interest to us. Polyglutamine tract encoded by trinucleotide CAG repeats has been reported as a transcription activation domain in some transcription activators. To study whether ataxin-1 play roles in transcription regulation, we fused either normal intact SCA1 cDNA or SCA1 without CAG repeats to DNA binding domain of a yeast transcription activator, Gal 4. The fusion protein plasmids were co-transfection with reporter gene into COS-7 cells. Transcription activation of the reporter system were then measured in duplicates. Our results

revealed that the normal ataxin-1 protein may not directly involve in the transcription regulation.

序論

(Introduction)

遺傳性小腦脊髓幹運動失調症候群(Spinocerebellar ataxias ; SCA)的疾病特徵為小腦、脊髓幹、腦幹等處之神經退化。在 1863 年時 Friedreich 首先提出一種遺傳性運動失調的疾病，而在 1893 年時 Marie 由其中區分出一種顯性遺傳之晚發性運動失調疾病，幾年後(1904 年)Holmes 從臨床症狀及病理學發現，這種”Marie’s ataxia”又可區分為許多種類型，此後不同類型的顯性遺傳小腦脊髓幹運動失調症候群(Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia ; ADCA)陸續被報導。

SCA1 的臨床表徵主要為四肢步伐產生運動失調(ataxia)、構音困難(dysarthria)、辨距不良(dysmetria)、及反射過強(hyperreflexia)、震顫(Vibration)以及本體感覺(proprioceptive)的喪失。在病理學上主要的特徵則為小腦皮質的 Purkinje 細胞的數目減少及小腦脊髓幹的神經退化(Haines et al., 1984)。此疾病是一種典型的成年才發生的疾病(adult-onset disorder)，一般疾病的發生年齡大約在 30-40 歲之間，並且在發病的 10-30 年這段期間其病徵產生漸進性的惡化。據日本的研究統計分析，小腦脊髓退化約佔 100,000 分之 4.53，而”Marie’s ataxia”又佔其中之 12.6% (Hirayama et al., 1994)。

近年來，藉由連鎖互換的分析(linkage analysis)已發現各類型小腦脊髓幹運動失調症候群的調控基因分別位於不同染色體上：第一型小腦脊髓幹運動失調症候群(SCA1)座落於 6p22-p33(Orr et al., 1993)、第二型(SCA2)位於 12q24.1(Pulst et al., 1996)、第三型

(SCA3)/MJD 位於 14q32.1(Kawaguchi et al., 1994)、第四型(SCA4)位於 16q22.1(Koide et al., 1994)、第五型(SCA5)位於第 11 對染色體(正確位置尚未明確)(Ranum et al., 1994)、第六型(SCA6)位於 19p13.1(Zhuchenko et al., 1997)、第七型(SCA7)位於 3p12-p21.1(Benomar et al., 1995)。其中第一型、第二型、MJD、以及第六型小腦脊髓幹運動失調症候群的基因已經被選殖出來，在這幾種致病基因中皆可發現，位於轉譯區(translation region)中包含一段 CAG 重覆序列的倍增(expansion)突變，CAG 重覆序列會轉譯出一段含多個麩胺酸(polyglutamine)的蛋白質。

在正常的族群中，其染色體內的 *SCA1* 基因也會有 CAG 重覆序列的出現，而且約有 84% 以異合子(heterozygotes)的型態組合，並呈現出高度的多形性(highly polymorphic)(Ranum et al., 1994)，其 CAG repeat 的正常值為 19-36 個重覆，在異常擴增的 CAG 重覆序列中，其異常範圍是 43-81 個重覆(Chung et al., 1993)。從序列分析(sequence analysis)的研究中，發現到正常人和患者之間 CAG 重覆序列的差異性，在正常人的未擴增序列中約有 98% 至少有一個到三個 CAT 插入 CAG 重覆序列的區域中，另有 2% 則完全沒有 CAT 的插入，但是其 CAG 重覆次數至少都在 20 個以下，而在患者擴增的 *SCA1* 對偶基因(alleles)中，則有一完整的 CAG 擴增的重覆序列中間並沒有 CAT 的插入(Chung et al., 1993)。從被中斷的正常對偶基因和未被中斷的擴增對偶基因中，發現它們之間具有不同的穩定性。若有 CAT 的中斷則此段重覆序列的遺傳較穩定，而未被 CAT 中斷的擴增對偶基因，則在遺傳中約有 70% 會改變重覆序列的大小，而且具有高度的不穩定性(Chung et al., 1993 ; Ranum et al., 1994)。由於減數分裂的不穩定(Meiotic instability)而影響到父親遺傳給子代時，大部份子代 CAG

重覆數目會增加，並且發病的年齡也提早。相反的，若是由母親遺傳則大部份子代的 CAG 重覆數目會維持不變或減少(Chung et al., 1993)。另外，從比較分析患者週邊血液的 DNA 和培養的淋巴母細胞(cultured lymphoblasts) DNA 中，發現 *SCA1* 基因的 CAG 重覆在體細胞較穩定，但是在培養的淋巴母細胞就顯現出有絲分裂的不穩定(Mitotic instability)(Chung et al., 1993)。

先前的研究已顯示：經由反轉錄-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)與北方墨點法(Northern blotting)分析發現，*SCA1* 基因轉錄出一段 10.66 kb 的 RNA，除了存在於腦部外，還可見於其它非神經系統，如骨骼肌、胰臟、腎臟、肺臟、以及心臟等處，也就是說 RNA 的表現並沒有組織特異性(Orr et al., 1993; Banfi et al., 1994)。

SCA1 基因所轉譯出的蛋白質為 ataxin-1，大小約有 87kD，此蛋白質有一個特性，就是在 5'端轉譯區(5'-coding region)有一段多型性的 CAG 重覆序列所轉錄出的多麩胺酸蛋白質(polyglutamine stretch)。利用免疫組織化學法(Immunohistochemical)的研究，發現在非神經細胞的地方 ataxin-1 位於細胞質內，若在腦內的神經細胞則 ataxin-1 位於細胞核。但是有一個特別例外，就是位於小腦內的 Purkinje 細胞，從 *SCA1* 的病理學上觀察小腦內的 Purkinje 細胞，發現在細胞核和細胞質內皆可看到 ataxin-1 蛋白質的存在。

Ataxin-1 的正常生理功能目前仍不清楚，但於 *SCA1* 的轉殖基因老鼠(transgenic mice)中發現，帶有多麩胺酸倍增的 ataxin-1 蛋白之老鼠，確有 *SCA1* 的病徵出現，且小腦的 Purkinje 細胞有退化的情形，反之，若只帶有正常 ataxin-1 蛋白，則顯現正常情況(Burright, et al., 1995)，因此更讓我們相信多麩胺酸倍增在致病機制中確實扮演著關鍵性的角色。因為此類疾病都是顯性遺傳，且曾有報導指出帶有 HD

之純合子(homozygotes)患者並沒有較異合子(heterozygotes)的患者有較嚴重的病徵出現(Wexler et al., 1987; Myers et al., 1989)，所以，一般認為此類疾病之致病原因可能因為蛋白中多麩胺酸不正常倍增後獲得了原來所沒有的功能(gain of function)，並非喪失原有正常生理功能。但確實原因還在研究探討中。

本篇論文主要分為兩部份：第一部份是利用聚合酶連鎖反應(PCR)，針對臺灣地區各醫院診斷有小腦運動失調之病人及其家屬做 *SCA1* 基因中 CAG 重覆序列次數的鑑定，並作統計分析，且希望藉此發現 *SCA1* 病人，以針對此基因做進一步的研究。結果共分析了 29 個正常的個體(含絨毛細胞與羊水細胞)及 25 個小腦運動失調症病人及其家屬，其 CAG 重覆序列的分佈範圍從 21 個重覆到 33 個重覆，其平均值(mean)為 27.2 重覆，至今尚未發現 *SCA1* 病人。

第二部份，則應用基因工程對於 *SCA1* 基因產物做進一步的探討，因為許多轉錄活化因子(transcription activator)蛋白結構中都以富含麩胺酸作用區(glutamine-rich domain)作為活化作用區，而 ataxin-1 中即含有此類似結構，加上 ataxin-1 存在於腦部神經細胞的細胞核中及小腦的 Purkinje 細胞中之細胞核中，所以有可能與轉錄調控機制有關，另外，在 1994 年時由 Gerber 等人使用不同長度的麩胺酸，接在酵母菌 Gal 4 的 DNA 鍵結作用區(DNA binding domain)後形成融合蛋白(fusion protein)實驗證明，在試管中(*in vitro*)轉錄活性隨著麩胺酸長度的增加(0-98)而提高，但在 *in vivo* 中則發現這種隨著麩胺酸長度的增加而提高轉錄活性的情形只有在麩胺酸長度至 40 為止，此後反而開始下降，這證明不同長度的麩胺酸胜肽會造成不同的轉錄活性，因此，我們猜測是否 ataxin-1 蛋白在轉錄中也扮演著某種角色，所以我們也利用酵母菌的 Gal 4 融合蛋白的技術，製作 Gal4-*SCA1*(包

含 Gal4 與整個轉譯區的 *SCA1* 融合基因)、Gal4-*SCA1* Δ Q(包含 Gal4 與切除 *SCA1* 基因中 CAG 重覆序列片段的融合基因), 再加上控制組 Gal4-SP1(包含 Gal4 與已知為轉錄活化因子 SP1)、以及不含任何插入片段(insert)的 DNA, Gal4, 觀察它們對轉錄活性的影響情形。經由報導基因(reporter gene)Luciferase 的活性, 發現正常 *SCA1* 基因與切除其中 CAG 重覆序列片段都與轉錄之調節沒有可偵測到的相關性。可惜的是, 本次實驗中並沒有 CAG 重覆序列倍增突變的 *SCA1* 基因, 因此, 是否因為 CAG 重覆序列倍增突變, 使得 *SCA1* 基因與轉錄的調節產生關連性, 由本篇實驗結果無從得知。

材料與方法

(Material and method)

一、SCA1 基因中 CAG 重覆序列的鑑定

(一)、檢體來源

1. 血液：此部份的檢體來源主要為中南部各大醫院神經內科，診斷為運動失調(ataxia)的病人及其家屬之血液 10 毫升，共 12 個家族，全部包括 25 人。另外，自願捐血之正常人 18 人。
2. 絨毛細胞及羊水細胞：此部份的檢體來源為中山醫學院細胞遺傳室提供。因為 SCA1 為顯性遺傳疾病，所以本實驗室希望此分生診斷的技術除可直接分析疑似的病人外，更可應用於產前診斷，故取胎兒之絨毛細胞及羊水細胞來做此實驗。

(二)、周邊血球細胞 DNA 的純化：

將血液 5 ml 加入等量的 solution I (10 mM Tris-Cl pH 7.6 ; 10 mM KCl ; 10 mM MgCl₂)，混合均勻後加入 120 μ l Nonidet P-40 將細胞膜溶解，待完全溶解後，離心 2000 rpm 10 分鐘，移去上清液，加入 300 μ l 的 solution I 小心將沈澱物沖散，再分裝至 1.5 ml eppendorf tube 中，加入 300 μ l 的 solution II (10 mM Tris-Cl pH 7.6 ; 10 mM KCL ; 10 mM MgCl₂ ; 1 M NaCl ; 1% SDS ; 4 mM EDTA)，混合均勻，待細胞核溶解後，每管加入等量的 buffer saturated phenol 混合均勻 (萃取時須注意離心管不可劇烈搖動，以免 DNA 嚴重斷

裂)，離心 14 krpm 10 分鐘。用切口的 yellow tip 吸取水層到新的 1.5ml 離心管中，注意不要吸到界面的變性蛋白。加入等量的 phenol/chloroform 混合均勻，離心 14 krpm，10 分鐘。再用切口的 yellow tip 吸取水層到新的 1.5 ml 離心管中，加入等量的 chloroform 混合均勻，離心 14 krpm，10 分鐘。取上層，加入 0.8 倍體積的異丙醇(2-propanol)混合均勻，置於室溫中約 15-20 分鐘，離心 14 krpm，10 分鐘沈澱 DNA，再以 70%及 100%酒精各清洗一次，所得 DNA 以 200-300 μ l TE buffer 或去離子水回溶，溶好的 DNA 以光度比色儀 (Spectrophotometer ; DU-640 , Beckman)測波長 260 nm 的相對吸光值及 260 nm/280 nm 吸光比值，由此得知 DNA 的質與量。

(三)、絨毛細胞與羊水細胞 DNA 的純化

絨毛細胞與羊水細胞以 TES buffer solution (10 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 25 mM Na₂EDTA) 清洗，離心後，吸掉上清液，留下細胞。加入 20 μ l lysis buffer (0.1 N NaOH, 2 M NaCl, 0.5% SDS)，輕輕的 pipetting 將細胞打散，然後於 100 °C 的水浴中作用 2 分鐘，離心 14,000 rpm 10 分鐘，將上清液吸到新的 1.5 ml 離心管中，此溶液即為 DNA，取出 1 μ l 以光度比色儀 (Spectrophotometer ; DU-640 , Beckman)測波長 260 nm 的相對吸光值及 260 nm/280 nm 吸光比值，由此得知 DNA 的質與量。

(四)、聚合酶連鎖反應：(Polymerase Chain Reaction ; PCR)

Primer 的設計與進行方法參考 Orr et al., 1993。每一個總體積為 20 μ l 的 DNA 倍增反應中，含有 50 ng 的 genomic DNA，primer 各含 5 pmol 的濃度；1x buffer solution [10 mM Tris-HCl (pH 8.8)；1.5 mM MgCl₂；50 mM KCl；0.1% TritonX-100]；1.5 unit 的 pfu polymerase (stratagene)；10% dimethylsulfoxide(DMSO)；2% Formamide；300 μ M dNTPs；1.5 μ Ci ³²P γ -dATP，最後以 d₂H₂O 補足至總體積為 20 μ l，然後用礦物油緩緩加在液面上，並除去界面氣泡（目的：為免於迴溫反應器中作用時蒸發掉）。將此反應溶液置於迴溫反應器（Perkin-Elmer *Cetus* Inc.），反應之熱週期循環(thermal cycler)為：DNA 的 denature 為 94 °C 8 分鐘；然後 94 °C 1 分鐘，56 °C 1 分鐘，72 °C 2 分鐘，28 個循環，extension 72 °C 10 分鐘。

(五)、Polyacrylamide gel 電泳分析：

預先製備 6% polyacrylamide-7.5 M urea gel，於 40 ml 6% polyacrylamide-7.5 M urea solution 中加入 200 μ l 10% ammonium persulfate(APS)和 20 μ l TEMED，混合均勻後，快速加入電泳玻璃槽中，待凝固後，可製成一個 40 cm x 15 cm x 0.35 cm 的 6% polyacrylamide-7.5 M urea gel。將上述的反應溶液反應結束後，取倍增之 DNA 片段加入 5 μ l formamide loading dye，加熱 90 °C 2 分鐘 denature 後，立即插回冰上，然後每一反應溶液分別取 6 μ l 依序加於膠體凹槽中，並 loading pGEM sequencing ladder 作為分子量標記，以 0.5x TBE buffer 為 running buffer，於電功率 60W

的條件下進行膠體電泳分析，電泳時間為 2 小時 40 分。電泳完成將膠體浸置於 5% methanol 以及 5% acetic acid 溶液中 20 分鐘，經過真空乾燥，膠體固定後，以 Kodak X-OMAT 底片作自動放射顯影(autoradiography)。

(六)、pGEM 之核苷酸定序：

各取 2 μ l 的 dA/ddA、dG/ddG、dC/ddC、dT/ddT 四種 termination mixtures 於 0.5 ml 微離心管中，然後置於冰上，待 control reaction 配好後再分裝四個管內。首先取 5 μ l 的 pGEM-3Zf(+)control DNA(500 fmol) 做為模板，然後加 2.5 μ l 的引子 pUC/MB Forward primer (3 pmol)，5 μ l 5x sequencing buffer 與 1 μ l [α -³⁵S] dATP(>1000 Ci/mmol 10 μ Ci/ μ l)，以及 1 μ l sequencing Grade Taq DNA polymerase，補二次水至總體積為 16 μ l，然後各取出 4 μ l 分裝於上述的四種 termination mixtures 的微離心管中，再用礦物油緩緩加在液面上，為防止溶液蒸發掉。最後將此反應溶液置於迴溫反應器 (Perkin-Elmer *Cetus* Inc.)，反應之熱週期循環 (thermal cycler) 為：DNA 的 denature 為 92 $^{\circ}$ C 2 分鐘；然後 95 $^{\circ}$ C 30 秒(denaturaton)，70 $^{\circ}$ C 30 秒(annealing/extension)，30 個循環，extension 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘。反應完後再加入 3 μ l stop solution 終止反應。此反應溶液即為 pGEM sequencing ladder 作為分子量標記的核苷酸定序。

二、SCA1 基因與轉錄活性(transcription activation)的調節研究

1. 使用質體與實驗原理

本實驗主要利用酵母菌 Gal4 DNA 鍵結作用區融合蛋白基因與報導基因(reporter gene), Luciferase, 來研究 SCA1 基因與轉錄活性(transcription activation)的調節之關連性。在真核細胞中,促進轉錄的調節因子(enhancer elements)可被轉錄活化蛋白專一性的結合(binding),進而刺激臨近的基因轉錄。這種轉錄活化蛋白依其功能區域的不同可區分為專一性的 DNA 結合作用區(specific DNA binding domain)以及轉錄活化作用區(transcription activator domain)。這些功能區域能夠與其它不同種蛋白形成融合蛋白,應用於研究此蛋白的轉錄活化與調節功能。在 1989 年時,由 Ivan Sadouski 和 Mark Ptashre 研究發展出一種可在哺乳類細胞中表現的質體 pSG424,它包含酵母菌的 Gal4(1-147)轉譯密碼序列,此段序列所做出的蛋白質即為專一性與 DNA 結合作用區,本身並不會改變轉錄的活性。因此,將欲研究之蛋白接於此序列之後,形成融合蛋白,即可觀察出蛋白的轉錄活化功能。

另外,使用 G5T-Leu 質體為報導基因(reporter gene),此質體包含 5 個 Gal4 結合位(binding site), TATA box 及 Luciferase 基因。當 Gal4 融合蛋白結合於結合位後,會影響 Luciferase 基因的轉錄。所以只要偵測 Luciferase 之活性,即可得知 Gal4 融合蛋白是否為轉錄活化子。

本實驗應用的正的控制組(positive control)是 pSG424 與一已知的轉錄活化因子 SP1 之基因,形成融合蛋白之質體 Gal4-SP1。而負的控制組(negative control): Gal4 alone 則為 pSG424 未加入任何 DNA。

(一)、各種結構的質體選殖(cloning)

1. 切除 5' 端的非轉譯區(5'-untranslated region)之 SCA1 cDNA 質體(SCA1 Δ 5'UTR)的選殖

將包含 SCA1 cDNA 之 pBluscript SK(-)質體 3l.5(Banfi et al., 1994), 加入限制酶 *EcoR* V(NEB)、1X NEBuffer 2、1X BSA, 於 37°C 作用 2 小時, 此時已在 SCA1 基因 5' 端的非轉譯區前方形成一個鈍端切口, 再於此反應溶液中加入限制酶 *Bsm* I(NEB), 並補充 1X NEBuffer 2 及二次去離子水, 於 65°C 作用 3 小時, *Bsm* I 切點位於 SCA1 基因轉譯起始點 ATG 後方轉譯 11 個胺基酸的序列處, 形成 3' 端突出的切口, 欲將此一邊為 3' 端突出與另一邊為鈍端之 DNA 連結, 故再加入 T4 DNA polymerase(NEB)、1X T4 DNA polymerase buffer, 1X BSA 以及 dNTP 100 μ M, 於 12°C 作用 20 分鐘再加熱 75°C, 10 分鐘以去活化, T4 DNA polymerase 可移除 3' 端突出之序列並可填補 5' 端突出之序列, 使 DNA 末端成為鈍端, 故此時之 DNA 已形成兩端為鈍端的線形 DNA(圖一)。

將已上反應溶液以 0.8% 的洋菜膠(agarose gel)電泳分離, 使被切除的小片段 DNA 與大片段 DNA 分開, 然後將預期的 5.4 Kb 大的膠切下, 再從膠內純化出 DNA, 然後加入 T4 DNA ligase(NEB) 及 1X T4 DNA ligase buffer, 補充二次去離子水至總體積 10 μ l, 於 16°C 作用一個晚上, 使其形成一個自我連接(self-ligation)的質體 SCA1 Δ 5'UTR。

隔日, 將此連結作用後的 DNA 轉型(transformation)至宿主細胞, 再抽取少量質體, 除以限制酶作用檢查大小無誤後, 並用

pBlu SK 上之一段序列為引子 (M13-20 primer : TTGTAACGACGGCCAGT) 做 DNA 定序。

2. Gal4-SCA1 質體的選殖

插入片段(insert)的準備是將 SCA1 Δ 5'UTR 加入限制酶 *Sac* I(NEB)與 *Sal* I(NEB)、1x *Sac* I buffer 以及 1X BSA，於 37 °C 作用 4 小時，如此，可將整段 SCA1 cDNA 切出。而於載體的準備，也是利用 Gal(1-147)後方的這兩個限制酶切點 *Sac* I 與 *Sal* I，於 37 °C 作用 4 小時，將已上兩個質體以 1.2% 的洋菜膠(agarose gel)電泳分離，在預期大小：載體約 3.4 Kb、插入片段約 2.5 Kb 膠切下，再從膠內純化出 DNA，然後以 1 比 3 的量放入離心管中，並加入 T4 DNA ligase(NEB)及 1X T4 DNA ligase buffer，補充二次去離子水至總體積 10 μ l，於 16 °C 作用一個晚上，使其形成 Gal4-SCA1 質體(圖二)。

隔日，將此連結作用後的 DNA 轉型(transformation)至宿主細胞，再抽取少量質體，除以限制酶作用檢查大小無誤後，並用 pSG424 上之一段序列為引子(pSGF primer : GGAGACTGATATGCCTC) 做 DNA 定序。

3. SCA1 Δ Q 質體的選殖

為了要製備 Gal-SCA1 Δ Q 質體，所以想利用 *SCA1* 基因中 CAG 重覆序列的兩側之限制酶切點 *Sfi* I，直接將 *SCA1* 基因中 CAG 重覆序列切除，但是因為 pSG424 上面也有 *Sfi* I 限制酶切點，所以必須先製備 SCA1 Δ Q 質體。

將 31.5 加入限制酶 *Sfi* I(NEB)、1X NEBuffer 以及 1X BSA，

於 50 °C 作用 4 小時，以 0.8% 的洋菜膠(agarose gel)電泳，將未作用完全只切一刀的 DNA 約 5.5 Kb 大小與作用完全，成為 5 Kb 大小的 DNA 分離，故電泳後將 5 Kb 大小的片段切下，再從膠內純化出 DNA。因為 *Sfi* I 所切之處為二個 GGCC 序列所包圍住的任一組 5 個核苷酸，所以，此時質體雖然兩端都是 *Sfi* I 所切出來的，但由於序列並不互補，故彼此無法連接，所以將此 DNA 加入 T4 DNA polymerase(NEB)；1X T4 DNA polymerase buffer、50 ug/ml BSA 及 dNTPs，於 12 °C 作用 20 分鐘，並加熱 75 °C 10 分鐘去活化，使其兩端皆成為鈍端，然後再加以 T4 DNA ligase(NEB)及 1X T4 DNA ligase buffer，補充二次去離子水至總體積 10 μ l，於 16 °C 作用一個晚上，使其形成 SCA1 Δ Q 質體(圖三)。

隔日，將此連結作用後的 DNA 轉型(transformation)，抽取少量質體，除以限制酶作用檢查大小無誤後，並用 pBlu SK 上之一段序列為引子(M13-20 primer：GGAGACTGATATGCCTC)做 DNA 定序。

4. Gal4-SCA1 Δ Q 質體的選殖

與 Gal4-SCA1 同樣方法，利用插入片段與載體上兩相同限制酶切點，*Sac* I 與 *Sal* I，經酵素作用 4 小時後，將已上兩個質體以 1.2% 的洋菜膠(agarose gel)電泳分離，在預期大小：載體約 3.4 Kb、插入片段約 2 Kb 的片段切下，再從膠內純化出 DNA，然後以 1 比 3 的量放入離心管中，並加入 T4 DNA ligase(NEB)及 1X T4 DNA ligase buffer，補充二次去離子水至總體積 10 μ l，於 16 °C 作用一個晚上，使其形成 Gal4-SCA1 Δ Q 質體。

隔日，將此連結作用後的 DNA 轉型(transformation)至宿主細胞，抽取小量質體，除以限制酶作用檢查大小無誤後，並用 pSG424 上之一段序列為引子(pSGF primer：GGAGACTGATATGCCTC)做 DNA 定序。

(二)、由膠體中萃取出 DNA

本實驗是利用 QIAquick Gel Extraction kit(QIAGEN)，將膠體中的 DNA 純化出來，首先將含有 DNA 的洋菜膠秤重，並置於離心管中，加入膠體中量倍體積的緩衝液 QX1，然後水浴 50 °C 至少 10 分鐘，且每 2 分鐘取出上下倒置混合均勻，幫助膠體溶解，之後再加入 10 μ l pH 5.0 的 3 M Sodium acetate 與膠體同等體積的異丙醇(isopropanol)，並混合均勻，然後將 QIAquick spin column 置於 2 c.c. 收集管中，並將以上的溶液放入，離心，轉速 13000 rpm，1 分鐘，將收集管內的溶液丟棄，然後加入 0.5 ml 的緩衝劑 QX1 至 QIAquick column，離心，轉速 13000 rpm，1 分鐘，接著加入 0.75 ml 的緩衝劑 PE 至 QIAquick column，並離心，轉速 13000 rpm，1 分鐘，在移除收集管內的溶液後，再次離心，轉速 13000 rpm，1 分鐘，然後把 QIAquick column 換到 1.5 ml 的離心管中，放入 50 μ l 的二次去離子水，並離心，轉速 13000 rpm，1 分鐘，即可將 DNA 萃取出來。

(三)、competent cells and transformation

1. competent cells 的製備：

本實驗的宿主細胞為大腸桿菌 JM109，JM109 無抗

ampicillin 的基因，所以若轉型入含抗 ampicillin 的質體，即可利用含 ampicillin 的培養基來篩選。

先取 LB 於無菌試管中，然後用無菌竹棒取一些菌種，培養於 LB 培養液內，放置於 37 °C，一個晚上。第二天，取 200 μ l 的 LB 菌液至 10 ml LB 培養液內培養，至 600 nm 吸光值 (O.D.) 0.3-0.4，然後取 2 ml 菌液，4 °C 離心，轉速 5000 rpm，5 分鐘，將上清液移除，並加入 1 ml Mops/RbCl (10 mM/10 mM) 回溶，然後離心，條件同上，再將上清液移除，並加入 1 ml Mops/RbCl/CaCl₂ (100 mM/10 mM/50 mM) 回溶，此時須輕輕拍打混合均勻，不可太用力，且隨時置於冰上，然後再置於冰上 30 分鐘以上，再離心，條件同上，並將上清液移除，再加入 0.2 ml Mops/RbCl/CaCl₂ (100 mM/10 mM/50 mM) 回溶，及形成 competent cells。

2. 轉型作用(transformation)

取 0.2 ml competent cells，加入 3 μ l DMSO 與 5 μ l 質體，冰浴 30 分鐘，熱休克 42.5 °C，30 秒鐘，緊接著，馬上置於冰上 2 分鐘，然後加入 1 ml 的 LB，保溫 37 °C，1 小時，使細胞修復，之後再取 200 μ l 塗佈於培養皿，置放於 37 °C，隔日，取出看菌落生長情形，挑選單一菌落，培養於 LB 中，準備抽取質體。

(四)、小量質體的製備(mini-prep)

將 1.5 ml 的菌液置於離心管中，於 4 °C 離心機離心，5000 rpm，5 分鐘，然後移除上清液，並加入 100 μ l solution I (50

mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0) , 快速振盪, 使沉澱物溶解, 放置於室溫下, 5 分鐘, 再加入 200 ul 新鮮配製的 solution II(0.2 N NaOH, 1.0% SDS) , 很快的將離心管上下倒置, 使溶液混合均勻, 但不可振盪, 然後放置於冰上 5 分鐘, 再加入冰的 150 ul solution III(KOAc, glacial acetic acid) , 快速但溫和的上下倒置, 使溶液混合均勻, 然後放置於冰上 5 分鐘, 於 4 °C 離心機離心, 12000 rpm , 5 分鐘, 然後小心抽取上層溶液至新的離心管中, 並加入等量體積的 phenol 與氯仿(CHCl_3) , 快速振盪, 使溶液混合均勻, 然後離心, 12000 rpm , 5 分鐘, 再將上層溶液抽取至新的離心管中, 並加入等量體積的氯仿, 然後離心, 12000 rpm , 5 分鐘, 再次將上層溶液抽取至新的離心管中, 加入 2 倍體積的 98% 酒精, 並放置於 -80 °C 冰箱中沉澱, 1 小時後, 取出, 於 4 °C 離心機離心, 12000 rpm , 30 分鐘, 移除上清液, 並加入 75% 酒精來洗去鹽類, 再離心, 12000 rpm , 10 分鐘, 並移除上清液, 待沉澱物乾燥後, 加入 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)溶解。

(五)、大量質體的製備(Maxi-prep)

本實驗是利用 Plasmid Mixi Kit(QIAGEN)完成, 先取 LB 於無菌試管中, 然後用無菌竹棒取一些菌種, 培養於 5 ml LB 培養液內, 放置於 37 °C , 一個晚上。第二天早上, 取 1 ml 的 LB 菌液至 100 ml LB 培養液內培養, 待晚上, 再取 5 ml 菌液至 500 ml LB 培養液內培養, 隔日, 取出 500 ml 菌液於 4 °C 離心機離心, 轉速 5000 rpm , 5 分鐘, 將上清液移除, 並加

入 10 ml Buffer P1(50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 ug/ml RNase A)回溶，再加入 10 ml Buffer P2(200 mM NaOH, 1.0% SDS) ，很快的將離心管上下倒置，使溶液混合均勻，但不可振盪，然後放置於室溫 5 分鐘，再加入冰的 10 ml Buffer P3(3.0 M potassium acetate, pH 5.5) ，快速但溫和的上下倒置，使溶液混合均勻，然後放置於冰上 20 分鐘，於 4 °C 離心機離心，20000 xg，30 分鐘，然後小心抽取上清液至新的離心管中，再於 4 °C 離心機離心，20000 xg，15 分鐘，然後小心抽取上層溶液至新的離心管中，另外，取 10 ml Buffer QBT(750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% ethanol; 15% Triton X-100)至 QIAGEN-tip 500 ，待溶液因地心引力通過 column 後，再將剛剛抽取的上層溶液放進去，至溶液完全通過 column 後，再用 30 ml Buffer QC(1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% Ethanol)清洗兩次，接著加入 15 ml Buffer QF(1.25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8.5; 15% ethanol)將質體洗出，並加入溶液總體積的 0.7 倍的異丙醇(isopropanol)使之沉澱，然後於 4 °C 離心機離心，15000 xg，30 分鐘，移除上清液，並加入 5 ml 75% 酒精來洗去鹽類，再離心，15000 xg，10 分鐘，並移除上清液，待沉澱物乾燥後，加入 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)溶解。

(六)、哺乳動物細胞的轉型作用(transfection)

本實驗宿主細胞為 COS-7，一種猴類腎臟腫瘤細胞，欲轉型的質體是經由大量質體的製備而來，包括四種欲分析的質體以及報導基因質體兩類質體，所以為共同轉型

(cotransfection)。於轉型作用(transfection)前日，將細胞 COS-7 拆為數盤直徑 10 公分的培養皿中，待當日約生長至 50-80%的細胞數，用 10 ml PBS 清洗後，重新加入培養液 Dulbecco's modified Eagles's medium(DMEM)10 ml。37 °C，3 小時後，取質體各 10 ug，加入 CalPhos Maximizer (CLONTECH) 150 μ l、2 M Calcium solution 62 μ l，並補充二次去離子水至 500 μ l，然後用微量吸管非常緩慢的滴入 500 μ l 的 2x HBS 中，於滴入同時，邊用電動微量吸管打泡泡，以幫助混合並形成微小顆粒，然後放置室溫 20 分鐘，再加入細胞培養，待 37 °C，6 小時後，將細胞培養液吸除，再加入含 15% Glycerol 的 PBS 5 ml，於室溫下作用 1 分鐘，然後用 PBS 清洗兩次，加入新的培養液，37 °C，待 48 小時後，分析基因的表現。

(七)、Luciferase 的分析

本實驗是利用 Luciferase Assay System Kit(Promega) 來分析 Luciferase 的活性，先將轉型作用後的細胞由保溫箱中取出，用 PBS 清洗兩次，然後加入 200 μ l Lysis buffer(25 mM Tris-phosphate, pH 7.8; 2 mM DTT; 2 mM 1,2-dimino-cyclohexane-N,N',N',-tetraacetic acid; 10% glycerol; 1% Triton X-100)，置於室溫 15 分鐘，再用刮棒將細胞刮下，並吸取至離心管中，離心 5 秒鐘，轉速 14000 rpm，然後取上清液 20 μ l，加入 100 μ l Luciferase reagent(20 mM Tricine; 1.07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 2.67 mM MgSO_4 ; 0.1 mM EDTA; 33.3 mM DTT; 270 μ M coenzyme A; 470 μ M luciferin;

530 μM ATP)，迅速混合並立刻置於冷光儀 (LUMAC Biocounter)，即可偵測出 Luciferase 的活性。

(八)、COS-7 細胞培養

COS-7 為一種猴類腎臟腫瘤細胞，培養於含 10% 胎牛血清與 1% 抗生素 (PSN) 的培養液 DMEM 內之 75 cm^2 培養瓶中，待細胞長滿後以 PBS 清洗細胞一次，加入 0.25%/1 mM EDTA，把細胞自培養瓶剝離，再加入 10 ml 培養液使細胞均勻沖散，然後取 5 ml 細胞種到新的培養瓶繼續培養。

結果

(Results)

一、SCA1 基因中 CAG 重覆序列的正常分佈情形

本研究主要利用 SCA1 基因中 CAG 重覆序列兩側的 DNA 序列作為引子(primers)，經由聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction；PCR)的分析，針對台灣區運動失調的病人及其家屬共 25 人，做 SCA1 基因中 CAG 序列重覆次數的鑑定，並分析了 18 個正常的個體，作統計分析。PCR 分析結果如圖四，左邊是 pGEM Sequencing ladder 做為比對 CAG 重覆序列的數目，而 line 1-14 則為不同 genomic DNA 的 PCR 產物。此外，從細胞遺傳實驗室取得不同來源的 9 個絨毛細胞及 2 個羊水細胞 DNA，進行 PCR 的分析，結果這 11 個檢體的 CAG repeat 數目從 21 到 32 個重覆 (圖五顯示其中 5 個 PCR 的分析結果)，落於正常範圍內。此實驗顯示出我們可以成功的將 SCA1 基因中的 CAG 重覆序列由絨毛細胞中偵測出來，日後我們將可提供此產前診斷予 SCA1 患者及其家屬，以達成優生保健的目的。另一方面，因為我們分析的小腦運動失調症病人及其家屬的 DNA 樣本，沒有 SCA1 基因的 CAG 倍增突變，所以我們將其結果併入正常族群分析數據。由 PCR 的實驗結果統計出，正常人其 CAG 重覆序列的分佈範圍從 21 個重覆到 33 個重覆 (圖六)，其平均為 27.2 個重覆，約有 88.9% 為異合子 (heterozygotes)，而且大部份的人(64.8%)都集中於 28、29 個重覆。由此結果可看出在正常的族群中，CAG 重覆序列的出

現，會呈現高度的多形性(highly polymorphic)。此結果與國外統計分析結果類似(Ranum et al., 1994)。

二、SCA1 基因與轉錄活性(transcription activation)間的關連性

為了瞭解 SCA1 基因與轉錄活性(transcription activation)間的關連性，所以，本實驗分別比較 SCA1 基因、切除 SCA1 基因中 CAG 重覆序列片段之 DNA、控制組：轉錄活化因子 SP1 及不含任何插入片段(insert)的 DNA 等的轉錄活性。

首先，為了將 SCA1 基因接在酵母菌 Gal 4 的 DNA 鍵結作用區之後，以形成融合蛋白，所以分別利用質體 31.5(含有整段 SCA1 cDNA 之 pBlu SK 質體，詳細構造請參考材料與方法)載體上與 SCA1 基因上之限制酶切點 *EcoR V* 及 *Bam I*，將 SCA1 基因 5'端非轉譯區(5'-untranslated region)及轉譯起始點 ATG 切除。此時，使用載體上的一段特定序列 M13-20 當引子，做序列分析(圖七)。

接著，再利用 pBlu SK 上的限制酶切點 *Sac I* 及 *Sal I* 將整段 SCA1 基因接在載體 PSG424 中 Gal 4 的 DNA 鍵結作用區(DNA binding domain)之後。此時，亦利用載體上的一段特定序列 M13-20 當引子，做序列分析(圖八)。

另外，為了得知 SCA1 基因中 CAG 重覆序列對轉錄活性有無影響，所以利用限制酶切點 *Sfi I* 將 SCA1 基因中 CAG 重覆序列片段切下，T4 DNA polymerase 將兩側 3'端的凸出切除，造成鈍端，然後自我連接(self-ligation)，並用 M13-20 當引子，做序列分析(圖九)。然後，再將此 DNA 如上述方法，接在酵母菌 Gal 4 的鍵結位置之後，且一樣利用 pSGF 當引子，做序列分析(圖

十)。

最後，將以上兩種接在酵母菌 Gal 4 的 DNA 鍵結作用區之後的 SCA1 基因，加上控制組：Gal4-SP1 及只有 Gal4 的四種質體分別與報導基因(reporter gene)： luciferase 基因共同轉型(cotransfection)至哺乳動物細胞 COS-7，此為一種猴類的腎臟腫瘤細胞，再經由 luciferase 的活性偵測，分析這些細胞的萃取物，來比較得知 SCA1 是否在轉錄中扮演著轉錄活化因子(transcription activator)的角色。

實驗結果藉由統計圖示(圖十一)，為了本實驗的準確性，除了在轉型時將同一質體分成兩組同時操作外，整個轉型實驗亦重覆二次。可以很明顯的發現，正控制組(positive control)，即轉錄活化因子 SP1 至少比負的控制組(negative control)，即不含任何插入片段(insert)的 DNA 的轉錄活性高出 9-10 倍，而 SCA1 基因的加入與否，轉錄活性並沒有明顯的改變，且不含 CAG 重覆序列的 SCA1 基因，即除去轉譯麩胺酸的序列後，其結果亦相同。由此結果可知 SCA1 基因的正常生理功能應與轉錄的調節無直接的關係。

討論

(Discussion)

延續先前對於 SCA1 中三核苷酸重覆序列數的研究，針對臺灣各醫院運動失調患者及其家屬共 25 人，由其周邊血液中抽取 DNA，經聚合酶連鎖反應，分析 SCA1 基因中 CAG 重覆序列的數目，加上分析正常族群中 18 人及 9 個絨毛細胞、2 個羊水細胞的 SCA1 基因，分佈範圍為 21-33 個重覆，平均值為 27.7，這些染色體中，約有 88.9% 為異合子(heterozygotes)，且多數(64.8%)集中於 28、29 個重覆，此結果和 Ranum 等人在 1994 年的報告相似，他們一共分析了 304 個正常人的染色體，其 SCA1 的正常值為 19-36 個重覆，平均為 29.1 個重覆，有 95% 的正常對偶基因(alleles)分佈在 25-33 個重覆，而且大部份(65%)都集中於 28-30 個重覆。另外，由於我們成功的由絨毛細胞及羊水細胞中分析出 SCA1 基因中 CAG 重覆序列的數目，相信未來可應用此技術，繼續為運動失調的患者及其家屬做篩選，並且可實際應用於產前診斷，以達到優生保健的目的。

許多 CAG 三核苷酸重覆序列倍增突變所引起的疾病，如 DRPLA、SCA1、HD 等，目前對於其蛋白質產物的正常功能仍然不清楚，但於 SCA1 的轉殖基因老鼠身上，確可發現帶有多麩胺酸片段擴增的老鼠有運動失調的病徵出現，且小腦的 Purkinje 細胞有退化的情形(Burright et al., 1995)，因此讓人相信多麩胺酸片段擴增在致病機制中確實扮演著關鍵性的角色，雖然有關疾病的機制尚未明瞭，但一般推測原因可能為(一)獲得某種功能(gain of function)，也就是說當多麩胺酸蛋白質的長度增加使得此蛋白的結構改變時，多

出了原本所沒有的功能。(二)negative dominate effect，即突變的蛋白質對正常生理功能造成了負面的影響效果。不過確實情形仍需進一步的研究。多麩胺酸蛋白質對轉錄調節的影響，於1994年時由Gerber等人已證明不同長度的麩胺酸胜肽(peptide)確實會造成不同的轉錄活性，是否意味著在SCA1疾病中，多麩胺酸片段增長，改變了某基因的轉錄調節，因此而促進或者是降低了此種蛋白質的表現，進而導致疾病的產生，是我們有興趣的研究課題。因此，我們設計了利用Gal4鍵結作用區融合蛋白的實驗，雖然我們並沒有找到SCA1患者，也就是說沒有CAG重覆序列倍增突變的基因，所以本研究只探討了正常SCA1基因及去除CAG重覆序列的SCA1基因，與轉錄調節的相關性。由實驗結果可發現SCA1基因的正常生理功能與轉錄的調節應無直接的關係，且當SCA1基因除去轉譯麩胺酸的序列後，仍然不影響轉錄的調節。事實上，若本篇也能加入不同長度之CAG重覆序列的SCA1基因來做比較，相信結果會更加完善。而由本篇實驗結果，不禁令人想起另一個也是CAG重覆序列倍增突變所造成的疾病：延髓肌萎縮症(Spinal and bulbar muscular atrophy; SBMA)，SBMA基因所轉錄的蛋白產物已知其正常功能為Androgen receptor(hAR)，在1995年時由Kazemi-Esfarjani等人實驗證明，hAR中多麩胺酸蛋白質的長度與轉錄的活性成反比(n=0>12>20>40>50)，且在1996年時亦有學者將hAR接在酵母菌Gal4鍵結位後，形成融合蛋白，結果發現，含正常長度多麩胺酸蛋白質的AR會增加轉錄的活性，但當polyglutamine的長度增加時，轉錄活性卻反而下降(Nakajima et al., 1996)。

另一方面，1993年時，就曾有學者提出蛋白質中多麩胺酸片段擴增時，可經由transglutaminase-catalysed isopeptide的交叉結合

(cross-linking)，而與其它蛋白質相接合(Green et al., 1993)。1994年時，Pertz 等人也提出一個解釋的模式：當多麩胺酸片段擴增時，會經由氫鍵的鍵結而形成 β -sheets，進而造成 polar zipper 結構，導致 homodimerization 或非專一性的鍵結到其它調節蛋白。而在 1996 年時，Kahlem 等人更提出：當胜肽中包含多麩胺酸時，其可當成 transglutaminase-catalysed 的受質，與腦部萃取出蛋白質以共價鍵結的方式形成不可溶的集合體。在神經性蛋白中的多麩胺酸片段會暴露於此蛋白的表面，當鈣離子出現，活化了多麩胺酸轉移酶(transglutaminase)時，多麩胺酸蛋白質便可當成 amine 接受體，而形成交叉結合。以上種種再再說明了此類含有多麩胺酸的蛋白質與其它蛋白質鍵結的可能性。

再者，於 Machado-Joseph Disease(MJD)的研究中發現，MJD 中的多麩胺酸擴增胜肽即可造成細胞的死亡，且經由表現 MJD 中的多麩胺酸擴增蛋白質片段於 Purkinje 細胞中的轉殖基因老鼠，會出現運動失調的症狀(Ikeda et al., 1996)。而在亨汀頓氏舞蹈症(Huntington's Disease ; HD)的研究中也發現，HD 基因的蛋白質產物 huntingtin，可被一種存在於細胞計劃性死亡(apoptosis)過程中的蛋白質分解酶 apopain 所切割，且當 huntingtin 中的多麩胺酸長度增加時，此種分解情形亦增加(Goldberg et al., 1996)。這也說明了蛋白質中多麩胺酸擴增造成疾病的機轉，可能與細胞計劃性死亡(apoptosis)有相當的關係。

綜合以上所述，當這些疾病的蛋白質中的麩胺酸增加時，可能因此而(一)促使其它蛋白質轉錄調節的改變(二)經由蛋白質結構的變異，與其它蛋白質產生交互作用。進而造成其它蛋白質的量或質的改變，導致細胞的死亡。並且這某種蛋白質可能與神經細胞有直接

的關係，所以，雖然這幾種疾病的基因並沒有組織特異性，但卻只對某些神經細胞造成影響。這些尚未定論的推測，相信不久的將來，將能有所突破，讓我們不僅能消極的為患者及其家屬做篩選外，更能積極的面對、治療它。

參 考 文 獻

(Reference)

Banfi, S., Chung, M.-y., Kwiatkowski, T. J., Jr., Ranum, L. P. W., McCall, A. E., Chinault, A. C., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (1993) Mapping and cloning of the critical region for the spinocerebellar ataxia type 1 gene in a yeast artificial chromosome contig spanning 1.2 Mb. *Genomics*, 18, 627-635.

Banfi, S., Servadio, A., Chung, M.-y., Kwiatkowski, T. J., Jr., McCall, A. E., Duvick, L. A., Shen, Y., Roth, E. J., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (1994) Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia. *Nature Genet.*, 7, 513-519.

Benomar, A., Le Guern, E., Dur, A., Ouhabi, H., Stevanin, G., Yahyaoui, M., Chkili, T., Agid, Y., Brice, A. (1994) Autosomal-dominant cerebellar ataxia with reinal degeneration (ADCA type II) is genetically different from ADCA type I. *Ann Neurol.*, 35, 439-444.

Burright, E. N., Clark, H. B., Servadio, A., Matilla, T., Feddersen, R. M., Yunis, W. S., Duvick, L. A., Zoghbi, H. Y., Orr, H. T. (1995) SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell.*, 82, 937-948.

Chong S. S., McCall, A. E., Cota, J., Subramony, S. H., Orr, H. T., Hughes, M. R., and Zoghbi, H. Y. (1995). Gametic and somatic tissue-specific heterogeneity of the expanded SCA1 CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet.*, 10, 344-350.

Chung, M.-y., Ranum, L. P. W., Duvick, L. A., Servadio, A., Zoghbi, H. Y., and Orr, H. T. (1993) Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat

instability in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet.*, 5, 254-258.

Friedreich N. (1863) Ueber degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. Virchows. *Arch Pathol Anat.*, 26, 433.

Gacy, A. M., Goellner, G., Juranic, N., Macura, S., and McMurray, C. T. (1995). Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro. *Cell.*, 81, 533-540.

Gerber, H-P., Seipel, K., Georgiev, O., Höfferer, M., Hug, M., Rusconi, S., Schaffner, W. (1994) Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science.*, 263, 808-810.

Goldberg, Y. P., Nicholson, D. M., Nicholson, D. W., Rasper, D. M., Kalchman, H. B., Koide, H. B., Graham, R. K., Bromm, M., Kazermi-Eafarjani, P., Thornberry, N. A. (1996) Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nature Genetics.*, 13, 442-449.

Green, H. (1993) Human genetic disease due to codon reiteration: Relationship to an evolutionary mechanism. *Cell.*, 74, 955-956.

Haines, J.L., Schut, L.J., Weitamp, L.R., Thayer, M., Anderson, V.E. (1984) Spinocerebellar ataxia in a large kindred: age at onset, reproduction, and genetic linkage studies. *Neurology.*, 34, 1542-1548.

Hirayama, K., Takayanagi, T., Nakamura, R., Yanagisawa, N., Hattori, T., Kita, K., Yanagimoto, S., Fujita, M., Nagaoka, M., Satomura, Y., Sobue, I., Iizuka, R., Toyokura, Y., Satoyoshi, E. (1994) Spinocerebellar degenerations in Japan: a nationwide epidemiological and clinical study. *Acta Neurol. Scand.*, 89(suppl. 153), 1-22.

Holmes, G. (1907) An attempt to classify cerebellar disease with a note on Marie's hereditary cerebellar ataxia. *Brain.*, 105, 1.

- Housman, D. (1995) Gain of glutamines, gain of function? *Nature Genetics.*, 10, 3-4.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell.*, 72, 971-983.
- Ikeda, H., Yamuguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S., Kakizuka, A. (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nature Genet.*, 13, 196-202.
- Jodice, C., Malaspina, P., Persichetti, F., Noveletto, A., Spadaro, M., Giunti, P., Morocutti, C., Terrenato, L., Harding, A. E., and Frontali, M. (1994) Effect of trinucleotide repeat length and parental sex on phenotypic variation in spinocerebellar ataxia 1. *Am. J. Hum. Genet.*, 54, 954-965.
- Kahlem, P., Terré, C., Green, H., Djian, P. (1996) Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 14580-14585.
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Yaniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., Kimura, J., Narumiya, S., and Kakizuka, A. (1994) CAG expansion in a novel gene from Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet.*, 8, 221-227.
- Kazeemi-Esfarjani, P., Trifiro, M. A. and Pinsky, L. (1995) Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)_n-expanded neuronopathies. *Human Molecular Genetics.*, 4, 523-527.
- La Spada, A.R., Paulson, H.L., Fischbeck, K.H. (1994) Trinucleotide repeat expansion in neurological disease. *Ann Neurol.*, 36, 814-822.
- Marie P. (1893) Sur l'héredoataxie cérébelleuse. *Semin Med (Paris).*, 13, 444.

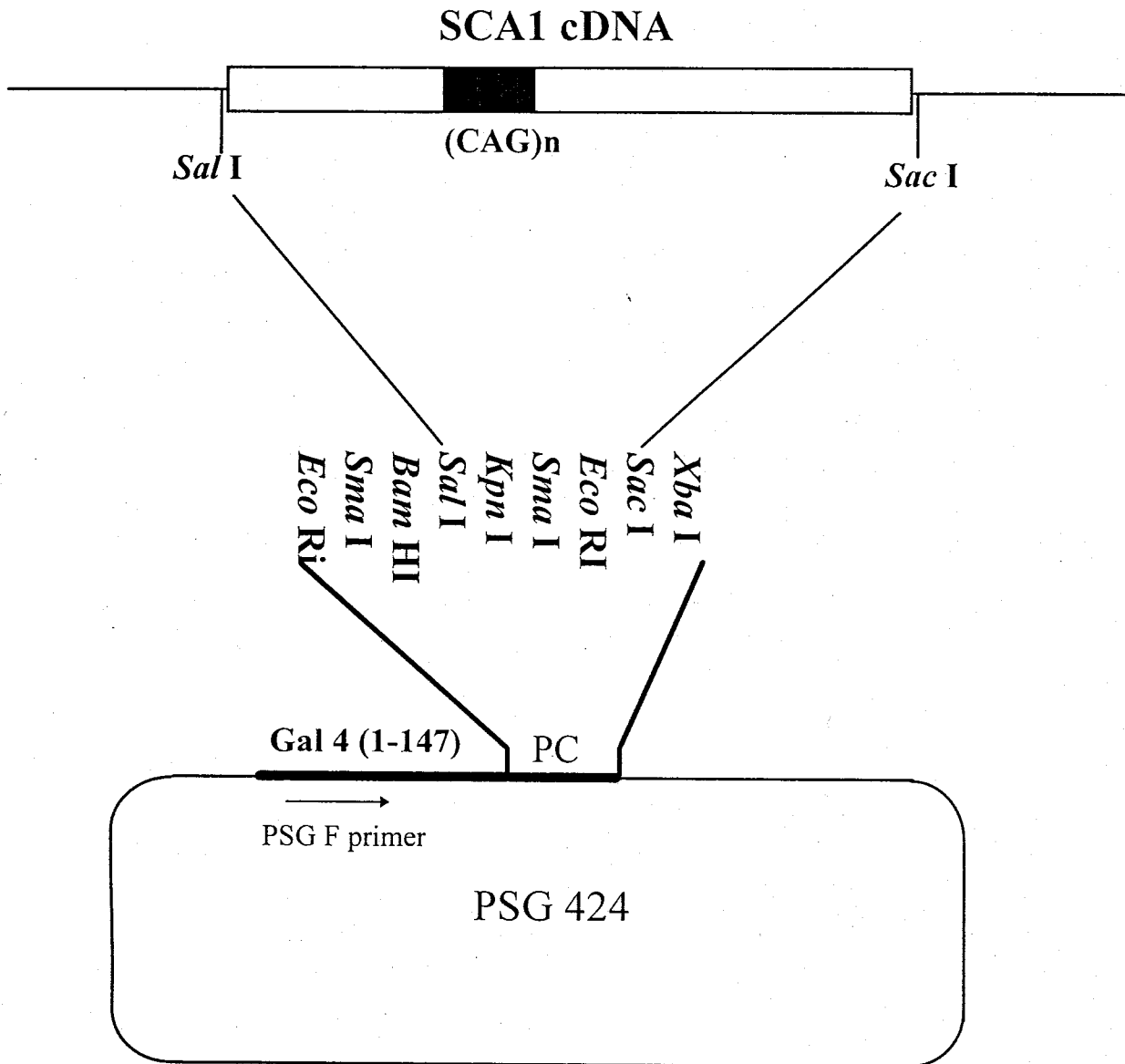
- Matilla, T., Volpini, V., Genis, D., Rosell, J., Corral, J., Davalos, A., Molins, A., and Estivill, X. (1993) Presymptomatic analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) via the expansion of the SCA1 CAG-repeat in a large pedigree displaying anticipation and parental male bias. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 2123-2128.
- Myers, R.H., Leavitt, J., Farrer, L.A., Jagadeesh, J., McFarlane, H., Mastromauro, C.A., Mark, R.J. et al. (1989) Homozygote for Huntington disease. *Am J Hum Genet.*, 45,615-618.
- Nasir, J., Floresco, S. B., O'Kuskey, J. R., Diewert, V. M., Richman, J. M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J. D., Phillips, A. G., and Hayden, M. R. (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell.*, 81, 811-823.
- Nakajima, H., Kimura, F., Nakagawa, T., Furutama, D., Shinoda, K., Shimizu, A., Ohsawa, N. (1996) Transcriptional activation by the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Journal of Neurological Sciences.*, 142, 12-16.
- Orr, H. T., Chung, M.-y, Banfi, S., Kwiatkowski, T. J., Jr., Servadio, A., Beaudet, A. L., McCall, A. E., Duvick, L. A., Ranum, L. P. W., and Zoghbi, H. Y. (1993) Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genet.*, 4, 221-226.
- Perutz, M. (1994) Polar zippers: Their role in human disease. *Protein Sci.*, 3, 1629-1637.
- Pulst, S.-M., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X.-N., Lopes-Cendes, I., Pearlman, S., Starkman, S. et al. (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature Genet.*, 14, 269-276.
- Ranum, L. P. W., Chung, M.-y., Banfi, S., Bryer, A., Schut, L. J., Ramesar, R., Duvick, L. A., McCall, A. E., Subramony, S. H., Golofarb, L., Gomez, C., Sandkuijl, L. A., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (1994) Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1): evidence for familial effects on the age of onset. *Am. J. Hum. Genet.*, 55, 244-252.

- Ranum, L. P. W., Schut, L. J. Lundgren, J. K., Orr, H. T., Livingston, D. M. (1994) Spinocerebellar ataxia type 5 in a family descended from the grandparents of President Lincoln maps to chromosome 11. *Nature Genet.*, 8, 280-284.
- Servadio, S., Koshy, B., Armstrong, D., Anatakfy, B., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (1995) Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals. *Nature Genet.*, 10, 94-98.
- Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanin G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G., Saudou, F., Weber, C., Davld, G., Tora, L., Agid, Y., Brice A. & Mandel J.L. (1995) Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature.*, 378, 403-405.
- Wexler, N. S., Young, A. B., Tanzi, R. E., Starosta-Rubenstein, S., Penny, J. B., Snodgrass, S. R., Shoulson, I., Gomez, F., Ramos-Arryo, M. A., Penchaszadeh, G., Moreno, R., Gibbons, K., Faryniarz, A., Hobbs, W., Anderson, M. A., Bonilla, E, Conneally, P. M., and Guesella, J. F. (1987) Homozygotes for Huntington disease. *Nature.*, 326, 194-197.
- Zhuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D. W., Amos, C., Dobyns, W. B., Subramony, S. H., Zoghbi, H. Z. & Lee C.C. (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α_{1A} -voltage-dependent calcium channel. *Nature Genetics.*, 15, 62-69.
- 蔡蕙芳 (1996) 臺灣區小腦脊髓運動失調症候群疾病中第一型及第三型/Machado-Joseph 疾病其基因座內 CAG 三核苷酸重複序列之研究。(中山醫學院醫學研究所碩士論文)

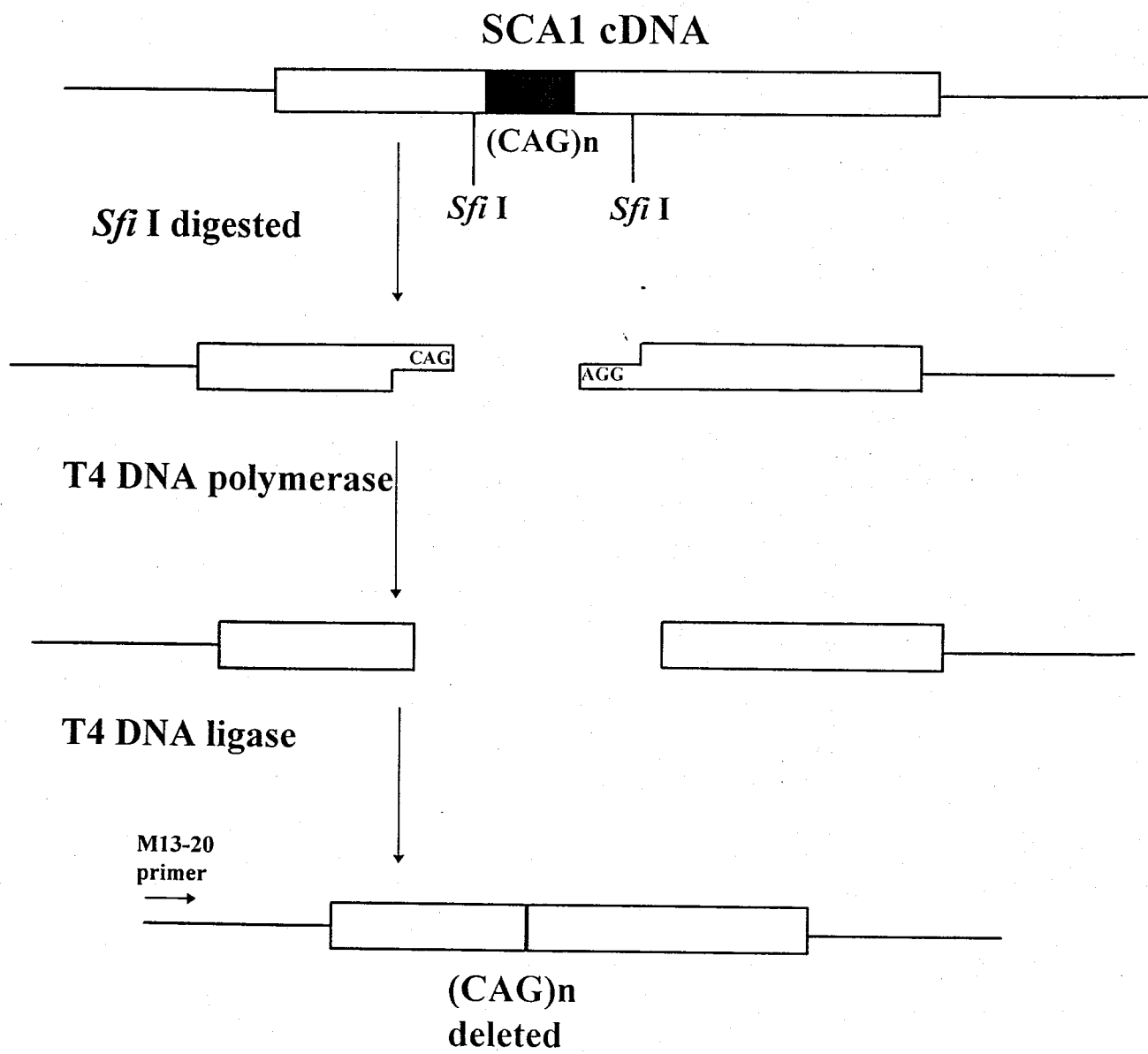
表一、SCA1 基因中 CAG 重覆序列的次數分析結果

檢體編號	家族編號	SCA1 基因中CAG重覆次數	
36	1A	23	31
56	9C	23	28
57	9C	28	30
60	11	26	31
61	11	26	26
62	11	30	31
63	12	26	28
65	14	25	25
66	14	22	29
67	14	22	25
68	14	22	25
69	14	25	29
75	16	24	27
76	16	27	28
80	18	29	31
85	22	27	28
91	23	26	28
96	24	29	30
112	35H	26	29
113	36I	26	29
114	36I	26	28
115	36I	28	30
116	36I	28	30
117	36I	28	29
正常染色體編號		SCA1 基因中CAG重覆次數	
N1		27	31
N2		25	29
N3		26	31

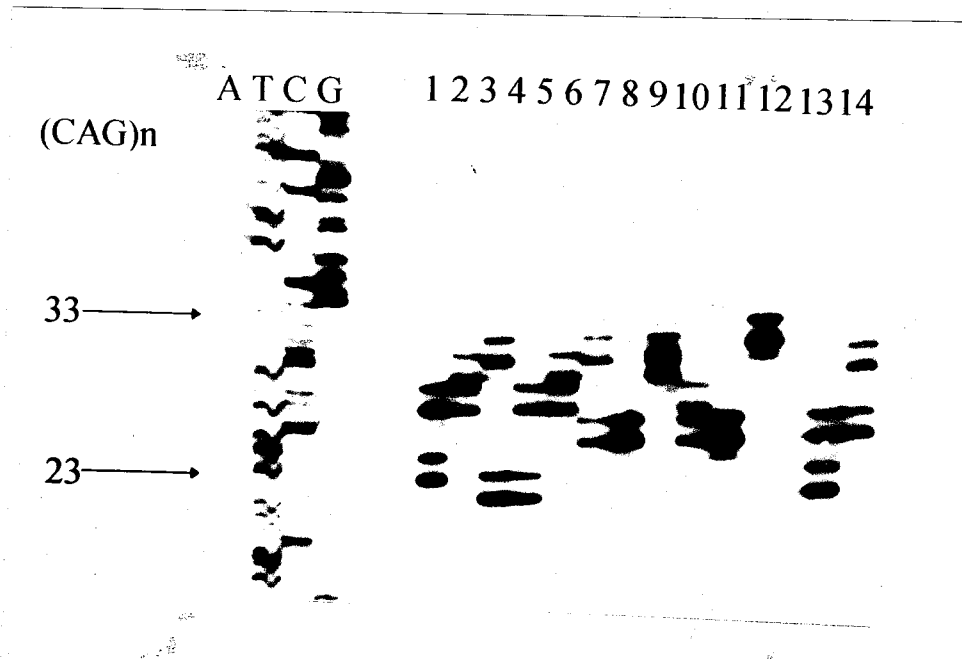
N4		25	31
N5		26	28
N6		31	31
N7		31	31
N9		25	33
N11		28	32
N12		27	29
N13		22	29
N14		27	31
N15		27	31
N16		25	28
N17		27	31
N18		28	31
2007		25	27
2049		27	28
絨毛細胞編號		SCA1 基因中CAG重覆次數	
91		26	28
97		27	31
98		26	30
99		26	30
2		29	29
3		28	29
4		29	29
5		28	29
6		27	32
羊水細胞編號		SCA1 基因中CAG重覆次數	
B		21	26
C		26	27



圖二、Gal4-SCA1 質體的選殖過程。PC: polylinker cloning site.

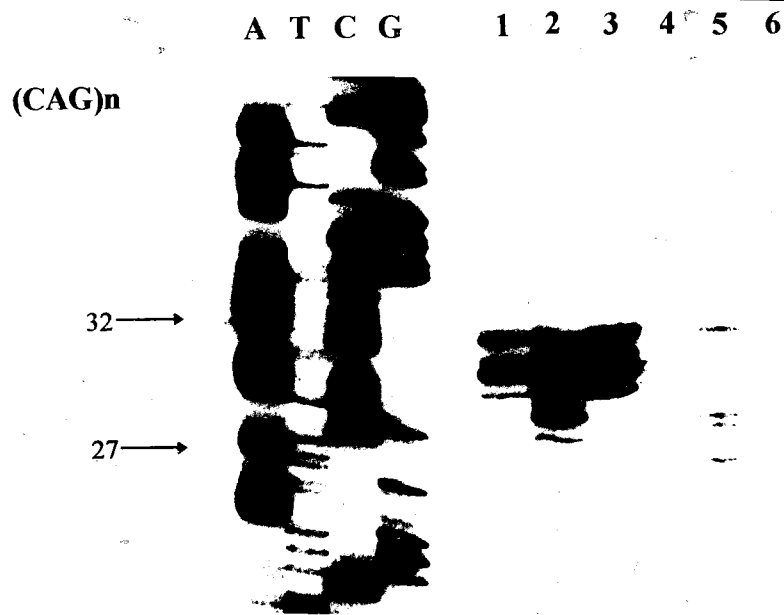


圖三、SCA1ΔQ 質體的選殖流程。

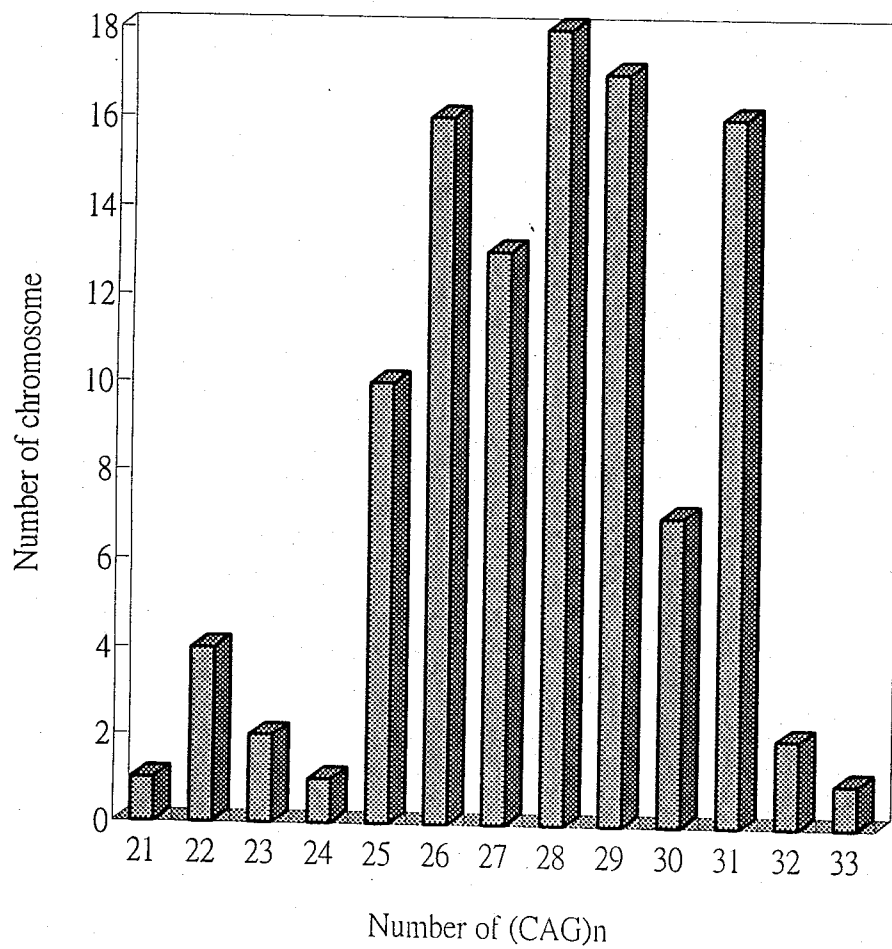


圖四、SCA1 基因中 CAG 重覆序列經由聚合酶連鎖反應分析結果。

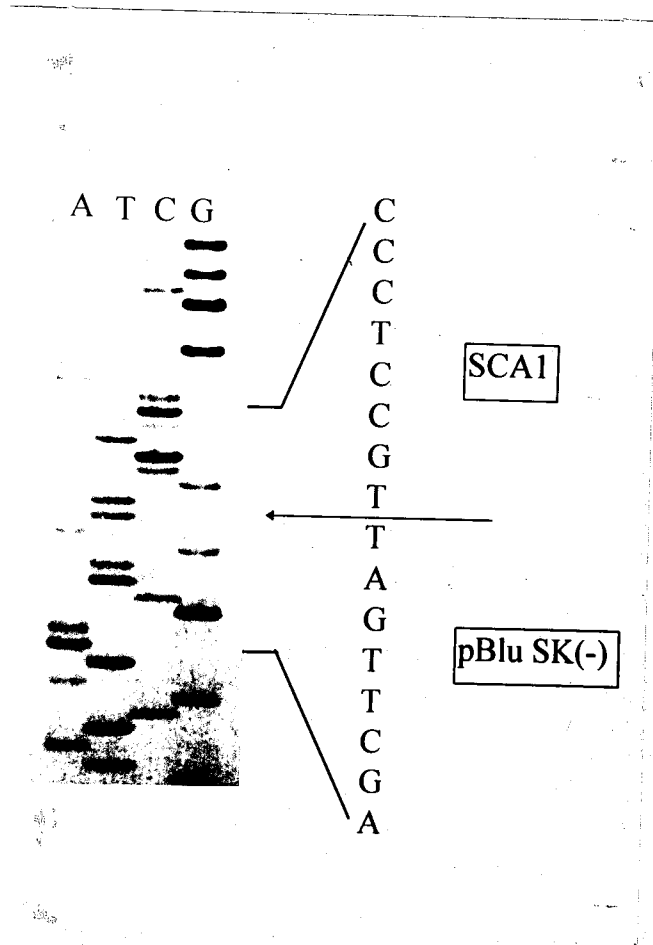
對照左方 DNA 定序標記，箭頭所指位置為經換算後 CAG 重覆次數，此實驗的所有 DNA 中 CAG 重覆次數，皆於正常範圍內。



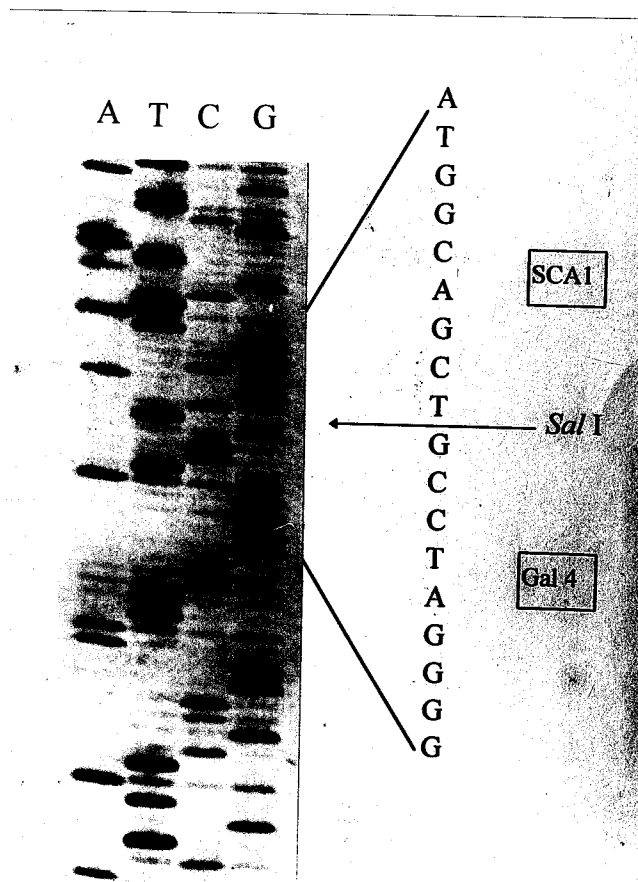
圖五、line 1-5 為絨毛細胞中取得 DNA，經由聚合酶連鎖反應分析 *SCA1* 基因中 CAG 重覆序列結果。對照左方 DNA 定序標記，箭頭所指位置為經換算後 CAG 重覆次數，得知 line 1~5 之 CAG 重覆次數，皆於正常範圍。line 6 為空白對照組。



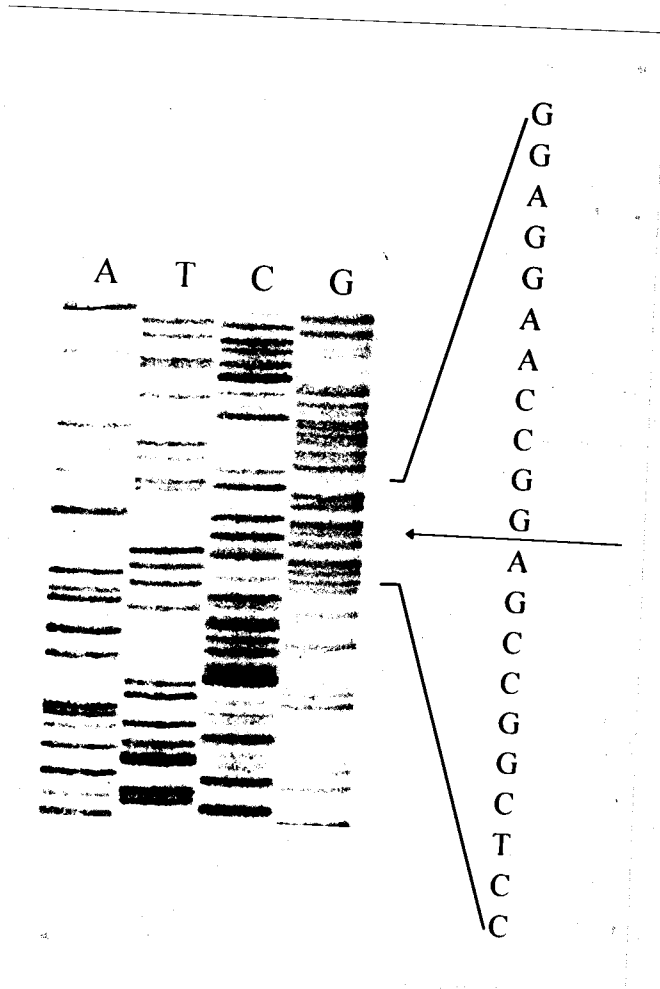
圖六、SCA1 基因中 CAG 重覆數目的正常分佈情形，分佈範圍從 21 至 33。此統計包括絨毛細胞與羊水細胞共 108 個染色體。



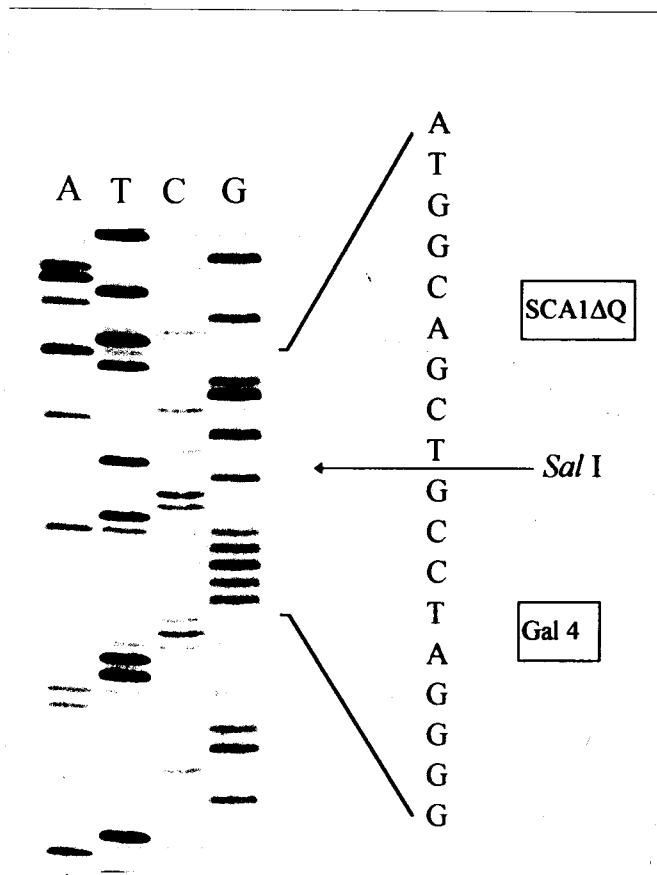
圖七、SCA1 Δ 5'UTR 質體的序列分析。箭頭所指位置為切除 SCA1 基因之 5'端非轉譯區後，自我連接(self-ligation)處。上方為 SCA1 基因之轉譯區序列，下方則為 pBlu SK(-)序列。



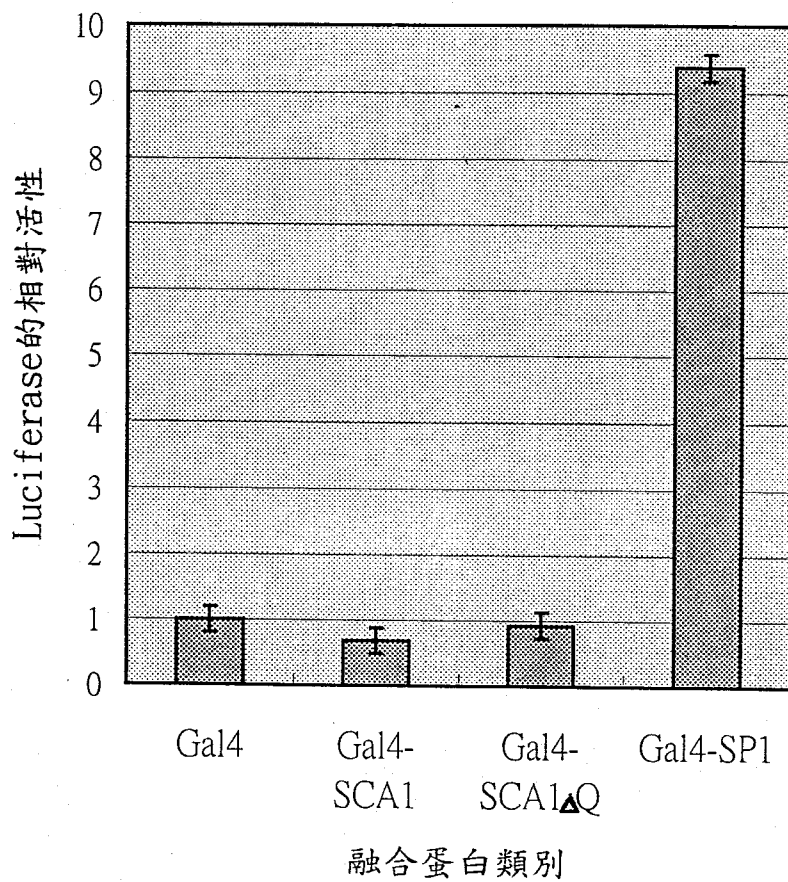
圖八、Gal 4-SCA1 質體的序列分析。箭頭位置為載體與插入片段利用限制酶 *Sal* I 切點之連接處，上方為 SCA1，下方則為 Gal 4。



圖九、SCA1 Δ Q 質體的序列分析。箭頭所指位置為 CAG 重覆序列切除後之連接點。



圖十、Gal 4-SCA1 Δ Q 質體的序列分析。箭頭所指位置為載體與插入片段連接處，上方為 SCA1 Δ Q，下方則為 Gal 4。



圖十一、Gal4-SCA1、Gal4-SCA1 Δ Q及控制組Gal4-SP1、Gal4轉型作用後，對轉錄調節的影響。以Gal4 alone所偵測到的Luciferase活性為基準，各組間Luciferase活性的相對比值。

附錄一、儀器設備：

儀器名稱	廠牌
DNA Thermal Cycler	Perkin-Elmer cetus Inc., Eicomp
Laminar Flow Hood	Bellco Glass Inc.
Sepetrophotometer Du-640	Beckman
Microfuge	Eppendorf
Centrifuge	Kobo ta
Microfuge with refrigerator	Hitachi
Water bath	Toyo
Power Supply	Pharmacia KLB Inc.
Vertical Gel Electrophoresis TanK	BRL
-70 °C Refrigerator	Revco Scientific Inc.
-20 °C Refrigerator	Shacklock
pH meter	Backman
Vortex	Scientific Industries/Vortex Geniz 2
CO ₂ incubator	Nuaire

附錄二、試藥

藥劑名稱	廠牌
Heparin sodium	B. Braun Melsungen A. G.
Potassium Chloride	Merck
Glacial acetic acid	Merck
Methanol	Merck
K_2HPO_4	Merck
KH_2PO_4	Merck
Tris	Merck
EDTA	Merck
NaCl	Merck
$MgCl_2$	Merck
Sodium acetate	Merck
Sodium Chloride	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Sodium Dodecyl Sulfate	sigma
Sodium Citrate	Merck
2-Propanol	Merck
Ethanol Absolute	Merck
Nonidet P-40	Sigma
Agarose(ultra pure)	BRL
TEMED	Sigma
Ampicillin	Sigma

Ammonium persulfate	Sigma
Glycerol	Sigma
Urea	Sigma
Sodium Bicarbonate	Sigma
RPMI	GIBCO BRL
DMEM	GIBCO BRL
PBS	GIBCO BRL
PSN	GIBCO BRL
Chloroform	Merck
Formaldehyde solution	Merck
Diethyl Pyrocarbonate(DEPC)	USB
Hydrogen Peroxide	和光純藥工業
Tryptone	DIFCO
Yeast Extract	DIFCO
iso-Amyl alcohol alcool iso-amylique iso-Amylalkohol(IAA)	BDH
Phenol	Amresco

附錄三、試劑及緩衝液之配法：

1. 10% ammonium persulfate: To 1g of ammonium persulfate, add d_2H_2O to 10ml.
2. 0.5M EDTA(PH 8.0): add 186.1g of disodium ethylenediaminetetraacetate. H_2O to 800ml of d_2H_2O . Stir vigorously on a magnetic stirrer. Adjust the pH to 8.0 with NaOH(~20g of NaOH pellets). Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.
3. 5M NaCl: Dissolve 292.2g of NaCl in 800ml of H_2O . Adjust the volume to 1 liter with d_2H_2O . Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.
4. 10% Sodium dodecyl sulfate(SDS): Dissolve 100g of SDS in 900ml d_2H_2O . Heat to $68^\circ C$ to assist dissolution. Adjust the pH to 7.2 by adding a few drops of concentrated HCl. Adjust the volume to 1 liter with d_2H_2O . Dispense into aliquots. Sterilize by autoclaving.
5. 50X TAE: Dissolve 242g of Tris base in 800ml of d_2H_2O . Add 57.1ml of glacial acetic acid and 100ml of 0.5M EDTA. Adjust volume to 1 liter with d_2H_2O .
6. 10X TBE: Dissolve 108g of Tris base and 55g of boric acid in 800ml of d_2H_2O . Add 40ml of 0.5M EDTA. Adjust volume to 1 liter with d_2H_2O .
7. 10X DNA loading dye: 50% glycerol, 12.5ml Tris-Cl pH 8.0, 60mM EDTA pH 8.0, 0.01% bromophenol blue, 0.01% xylene cyanol FF.
8. 1M $MgCl_2$: Dissolve 203.2g of $MgCl_2$ in 800ml of d_2H_2O . Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.
9. 1M Tris: Dissolve 121.1g of Tris base in 800ml of d_2H_2O . Adjust

the pH to the desired value by adding concentrated HCl.

pH	7.4	7.6	8.0
HCl	70ml	60ml	42ml

Allow the solution to cool to room temperature before making final adjustments to the pH. Adjust the volume of the solution to 1 liter with d_2H_2O . Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.

10. DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium): To prepare 1 liter of DMEM, dissolve one package of DMEM powder from GIBCOBRL. Add of $NaHCO_3$ 3.7g per liter of medium. Adjust pH to 7.4 with HCl and sterilized by filtration through a $0.2\mu m$ filter.
11. Complete DMEM: 10ml Fetal Bovine Serum(FBS) and 1ml Penicillin-Streptomycin-Neomycin(PSN) antibiotic mixture are mixed and brought to 100ml final volume with DMEM.
12. RPMI Medium 1640: To prepare 1 liter of RPMI, dissolve one package of RPMI powder from GIBCOBRL. Add of $NaHCO_3$ 2.2g per liter of medium. Adjust pH to 7.2 with HCl and sterilized by filtration through a $0.2\mu m$ filter.
13. Complete RPMI: 10ml Fetal Bovine Serum(FBS) and 1ml Penicillin-Streptomycin-Neomycin(PSN) antibiotic mixture are mixed and brought to 100ml final volume with RPMI.
14. TE buffer: 10mM Tris-Cl pH 7.4 and 1mM EDTA pH 8.0.
15. LB medium: Dissolve 5g NaCl , 5g bacto-yeast and 10g bacto-tryptone in d_2H_2O . Adjust the volume of the solution to 1 liter with d_2H_2O . Sterilize by autoclaving.