

作品名稱：脊索動物第一型肝細胞核因子之分子演化

— 由八目鰻及文昌魚 cDNA 序列選殖探討

高中組 生物科 第三名

縣市：台北市

作者：林志達

校名：國立臺灣師範大學附屬高級中學 指導教師：吳金洌、許偉傑

關鍵詞：HNF1、脊索動物、分子演化、八目鰻、文昌魚、cDNA



一、 研究動機：

第一型肝細胞核因子 (HNF1)是脊椎動物所特有之轉錄因子，分成 HNF1- α 及 HNF1- β 兩型。因為鮭魚是唯一於非四足類所發現之 HNF1，且其序列較接近於四足動物，所以產生了一假說：在所有輻鰭魚類都只有 HNF1- α ，在輻鰭魚類與肉鰭魚類分支之後，發生複製事件，產生 HNF1- β ，而這第二個基因的產生被認為是為了因應新的器官與生理功能 (如：肺的有氧呼吸)，然而不能排除在鮭魚的祖先中有 HNF1- α 與 HNF1- β 基因，只是在演化的過程中被喪失掉。

本實驗室於鯉科斑馬魚及慈鯛科吳郭魚均選殖到 HNF1- α 及 HNF1- β ，推翻了此假說，對於其複製事件發生時間及演化過程感到好奇，希望藉由低等脊索動物互補 DNA 序列之選殖，瞭解其演化。

二、 研究目的：

藉由選殖文昌魚及八目鰻之 HNF1 互補 DNA (cDNA)序列，以瞭解 HNF1 在低等脊索動物與哺乳類之差異，進而分析 HNF1 之分子演化。

三、 實驗器材

(一)生物材料：

1. cDNA 基因庫

文昌魚 5~24 小時胚胎 cDNA 基因庫 (Amphioxus cDNA library)

八目鰻胚胎早期 2~6 天 cDNA 基因庫 (early Lamprey cDNA library)

八目鰻胚胎晚期 6~10 天 cDNA 基因庫 (late Lamprey cDNA library)

上述基因庫由 Michigan Kalamazoo college 的 Jim Langeland 教授所提供。

2. 菌株

[*Escherichia coli*] XL1-Blue MRF' (Stratagene) XL1-Blue MRA (Stratagene)

XL1-Blue SOLR (Stratagene)

3. 質體

pBluescript SK(+/-)(Stratagene)

pCR-Blunt II -TOPO (Invitrogen)

(二)儀器和器材

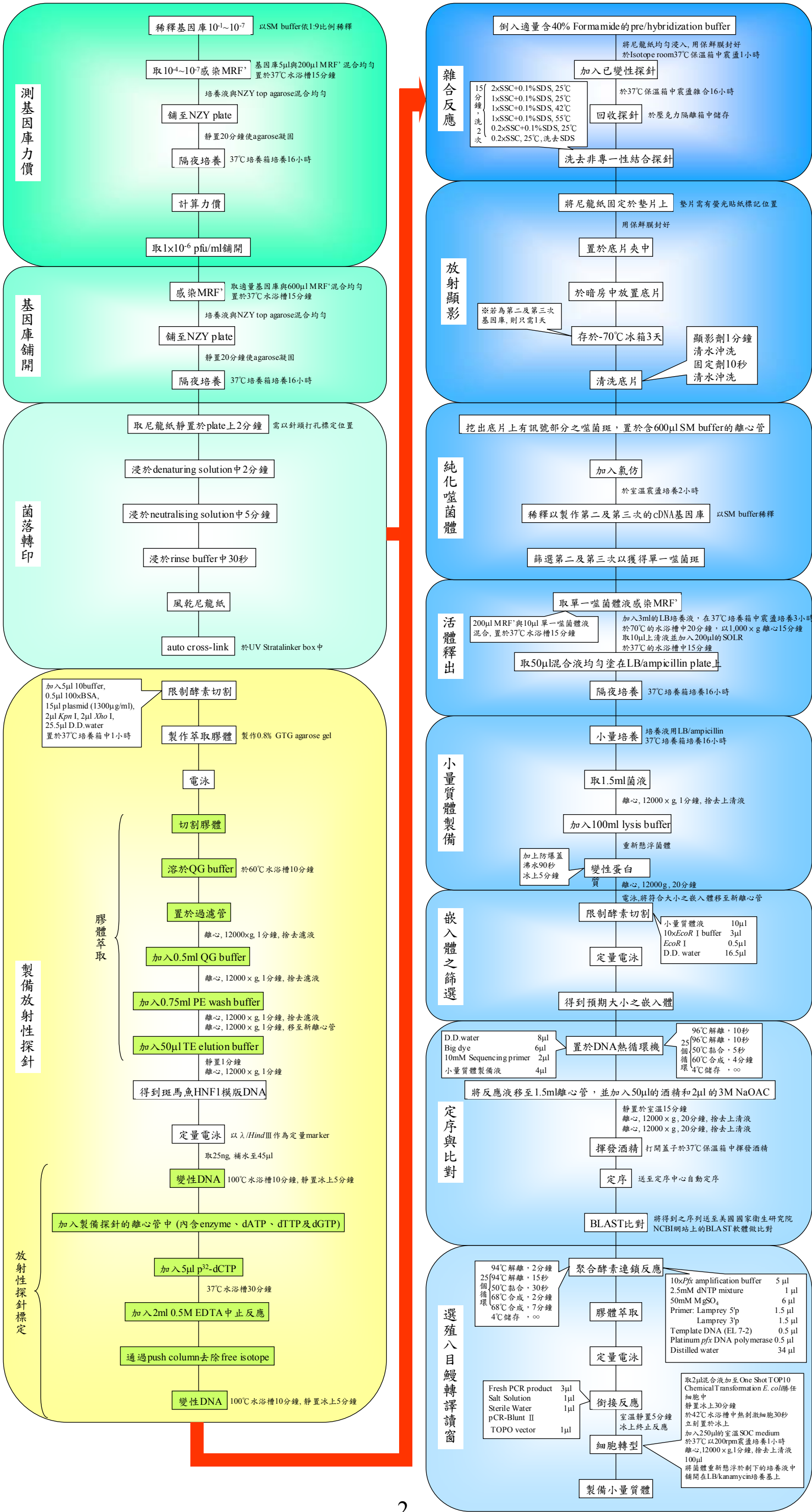
高速離心機、桌上型離心機、DNA Thermal cycler、電泳器材、UV stratalinker、Automatic SpeedVac (STRATAGENE)、Push column、沖壓片等器材 (KODAK)、

Nylon membrane(Amersham)、Polytron (KINEMATICA AG)、Speedlight documentation System

(三)反應試劑

細菌培養基、酵素、Molecular weight marker、生物反應試劑組 (kit)、化學藥品、反應溶液 (Reaction solution) 及緩衝溶液 (Buffer)

四、實驗過程方法



四、實驗過程方法

(一)文昌魚胚胎、八目鰻胚胎 cDNA 基因庫之選殖

- 1.文昌魚胚胎、八目鰻胚胎 cDNA 基因庫 (cDNA library)力價 (titer)之測定：
稀釋基因庫 10^{-1} ~ 10^{-7} 倍→取 10^{-4} ~ 10^{-7} 感染 MRF' →鋪至 NZY plate→ 隔夜培養→ 計算力價→取 1×10^{-6} pfu/ml 鋪開
- 2.鋪開 Amphioxus、Early Lamprey、Late Lamprey cDNA 基因庫(pour plate)：
感染 MRF' →鋪至 NZY plate→隔夜培養
- 3.菌落轉印 (plaque lifts)：
取尼龍紙靜置於 plate 上 2 分鐘→浸於 denaturing solution 中 2 分鐘→浸於 neutralising solution 中 5 分鐘→浸於 rinse buffer 中 30 秒→風乾尼龍紙→auto cross-link
- 4.斑馬魚 HNF1- α 探針之製作 (Preparation of zebrafish HNF1- α probe)：
限制酵素切割→製作萃取膠體(製作 0.8% GTG agarose gel)→電泳→膠體萃取 (Gel elution)
【探針製作:切割膠體(溶於 QG buffer 於 60°C 水浴槽 10 分鐘→置於過濾管→加入 0.5ml QG buffer→加入 0.75ml PE wash buffer→加入 50 μ l TE elution buffer→得到斑馬魚 HNF1 模版 DNA→定量電泳)】→【放射性探針標定 (Radom Primer Labeling) (變性 DNA→加入製備探針的離心管中→加入 5 μ l p³²-dCTP→加入 2 μ l 0.5M EDTA 中止反應→通過 push column 去除 free isotope→變性 DNA)】→無放射性探針之去除 (Remorel of free isotope)
- 5.雜合反應 (Hybridization):
倒入適量含 40% Formamide 的 pre/hybridization buffer→加入已變性探針於 37°C 保溫箱中雜合→回收探針→洗去非專一性結合探針→將尼龍紙固定於墊片上→置於底片夾中→於暗房中放置底片→存於-70°C 冰箱 3 天→清洗底片
- 6.噬菌斑之挑選：
挖出底片上有訊號部分之噬菌斑，置於含 600 μ l SM buffer 的離心管→加入氣仿→稀釋以製作第二及第三次的 cDNA 基因庫→篩選第二及第三次以獲得單一噬菌斑
- 7.第二及第三次篩選 cDNA 基因庫
挑選出的噬菌斑重複實驗步驟篩選第二及第三次以獲得單一噬菌斑；取第三次所得到的單一噬菌斑進行活體內釋出。
- 8.活體內釋出 (In vivo excission)：
取單一噬菌體液感染 MRF'→取 50 μ l 混合液均勻塗在 LB/ampicillin plate 上→隔夜培養
- 9.小量培養：
培養液用 LB/ampicillin 37°C 培養箱培養 16 小時
- 10.小量質體的製備-煮沸法：
取 1.5ml 菌液→加入 100ml lysis buffer→變性蛋白質
- 11.嵌入體之篩選：
限制酵素切割(Restriction enzyme digesion)→定量電泳→得到預期大小嵌入體
- 12.定序反應及序列比對：
置於 DNA 熱循環機→將反應液移至 1.5ml 離心管，加入 50 μ l 的酒精和 2 μ l 的 3M NaOAC→揮發酒精→定序→BLAST 比對

(二)聚合酵素連鎖反應選殖八目鰻 HNF1 cDNA 轉譯讀窗

- 1.聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction；PCR)
- 2.膠體萃取 (Gel elution)
- 3.定量電泳 (Electrophoresis for Quantitation)
- 4.銜接反應 (Ligation reaction)
- 5.細胞轉型 (Transformation)
- 6.小量培養及小量質體的製備

五、 實驗結果：

(一)cDNA 基因庫的力價：

Amphioxus: 1×10^{11} pfu/ μ l

Early Lamprey: 7×10^9 pfu/ μ l

Late Lamprey: 4.3×10^9 pfu/ μ l

(二)基因庫的選殖：

以斑馬魚的 HNF1 (α 或 β) 作為探針，因為是跨物種的選殖，所以降低了選殖條件，在第一次清洗時只洗到 $1 \times \text{SSC} + 0.1\% \text{SDS}$ 55°C ，結果如下：

基因庫的選殖				
文昌魚 5~24 小時 胚胎 cDNA 基因庫	Am1-1	Am5-1	Am8-1	Am12-1
八目鰻胚胎晚期 6~10 天 cDNA 基因庫	LL1-1	LL4-1	LL5-1	LL6-1
	LL8-1	LL11-1	LL11-2	LL12-1
八目鰻胚胎早期 2~6 天 cDNA 基因庫	EL1-1	EL1-2,	EL1-3	EL2-1
	EL2-3	EL2-4	EL2-5	EL2-6
	EL2-7	EL3-1	EL3-2	EL3-3
	EL4-1	EL4-2	EL4-3	EL4-4
	EL4-5	EL4-6	EL4-7	EL4-8
	EL4-9	EL5-1	EL6-1	EL6-2
	EL6-3	EL6-4	EL6-5	EL6-6
	EL6-7	EL6-8	EL7-1	EL7-2
	EL7-3	EL7-4	EL7-5	EL8-1
	EL8-2	EL8-3	EL8-4	EL8-5
	EL8-6	EL8-7	EL8-8	EL9-1
	EL9-2	EL9-3	EL9-4	EL9-5
	EL9-6	EL9-7	EL9-8	EL9-9
	EL10-1	EL10-2	EL10-3	EL10-4
	EL10-5	EL10-6	EL10-7	EL11-1
	EL11-2	EL11-3	EL11-4	EL12-1
	EL12-2	EL12-3	EL12-4	EL12-5
	EL12-6	EL12-7	EL12-8	EL12-9
	EL12-10			

因數量過多所以先選 20 株選殖株進行定序：

文昌魚 5~24 小時 胚胎 cDNA 基因庫	Am1-1	Am5-1	Am8-1	Am12-1
八目鰻胚胎晚期 6~10 天 cDNA 基因庫	LL1-1	LL4-1	LL5-1	LL6-1
八目鰻胚胎早期 2~6 天 cDNA 基因庫	EL1-1	EL1-2	EL2-1	EL2-7
	EL3-2	EL5-1	EL6-2	EL7-1
	EL7-2	EL8-1	EL8-6	EL9-4

純化質體後，以 T3 及 T7 為定序引子，進行定序反應。分析其序列，而後送至 NCBI 網站上利用 BLAST 軟體進行比對，確定序列為 HNF1，而尚未定序的選殖株便以確定為 HNF1 的選殖株序列作為探針來選殖；因為此時已是同物種間的選殖，選殖條件便調高為 $0.2 \times \text{SSC} + 0.1\% \text{SDS}$ 25°C ，以免選殖出不是我們要的基因。通常，我們在選用選殖條件時，都是先用偵測器確認尼龍紙的強度，然後逐漸升高溫度或降低 SSC 的濃度，來提高選殖條件，直到偵測器顯示其強度於 2~5 計數/秒 (count per second) 之間。

(三)限制酵素切割：

挑選的 12 株選殖株，在經過 *EcoR* I 的切割後，主要 DNA 片段大小為：

Am1-1	3.5kb, 1.1kb	EL7-2	2.8kb, 2.6kb
Am5-1	2.2kb	EL8-1	2kb
Am8-1	2.8kb, 1.3kb	EL8-6	2kb, 1.6kb
Am12-1	2kb	LL1-1	2.2kb, 1.7kb
EL2-7	1.7kb	LL4-1	2.6kb, 2.2kb

詳細請見圖一和圖二

(四)定序：

在 *Amphioxus* 中，只發現一種互補 DNA 序列，已定序出最長的有 1997 個核苷酸，其中 1~1620bp 可轉譯出蛋白質，可惜仍缺少前面 5'端的部分。在 *Lamprey* 中，發現兩個基因，其中 EL7-2 含有轉譯區全長，而 3'UTR 為 no mini exon usage，另一個基因於轉譯區較 EL7-2 少了一個 Gly，而其 3'UTR 的 mRNA 經由選擇性切割產生

三種不同的表現序列而區分為三型，我們將其訂為 exon X、exon Y、exon Z，已定序出含有轉譯區全長的共有 2290 個核苷酸，其中 309~1848 可轉譯出蛋白質，推測其 3'UTR 達 3600 個核苷酸。

(五)Blast 比對：

我們將文昌魚 HNF1 的預測轉譯氨基酸序列利用 Blast 程式比對後顯示其與雞 HNF1- α 最為相似，Identities 達 51% (170/328)，Positives 達 56% (189/328)，Gaps 達 21% (70/328)。

而八目鰻 HNF1 的預測氨基酸序列則與大鼠 HNF1- β short form 最為相似，Identities 達 50% (263/526)，Positives 達 57% (304/526)，Gaps 達 18% (97/526)。

若是將八目鰻 HNF1 的 3'UTR 選擇性切割的四型：exon X、exon Y、exon Z 及 no mini exon usage 分別去比對，則最相似的為：

	Use exonX	Use exonY	Use exonZ	No mini exon usage
最相似的基因	人 HNF1- α	非洲牛蛙 HNF1- α	人 HNF1- α	非洲牛蛙 HNF1- α
Identities	45% (63/139)	48% (57/118)	44% (67/151)	47% (52/110)
Positives	55% (78/139)	56% (67/118)	54% (83/151)	57% (63/110)
Gaps	18% (26/139)	13% (16/118)	17% (26/151)	14% (16/110)

六、討論：

(一) 分析文昌魚的序列

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L
全部	40	2	9	27	6	29	28	10	15	36
活化區	24	0	6	13	2	12	22	5	2	24
	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
全部	16	26	39	89	28	48	38	37	3	13
活化區	13	15	30	74	10	35	33	25	0	7

在轉錄活化區發現其 192~260 中，69 個氨基酸中就有 39 個 Q，比例達 56.5%，而 261~539 中，P(24 個)、S(32 個)、T(31 個)、Q(35 個)四種加起來(122 個)，佔其(279 個)達 43.7%。

(二)分析八目鰻的序列

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L
全部	33	6	19	31	4	61	34	15	15	42
活化區	7	3	2	3	0	23	10	7	0	12
	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
全部	14	22	31	49	30	45	21	28	4	9
活化區	8	5	12	16	4	22	11	9	0	2

在轉錄活化區 P、S、T、Q 則分佈得十分均勻，而 P(12 個)、S(22 個)、T(11 個)、Q(16 個)四種加起來，佔轉錄活化區(156 個)達 45.5%。

(三)八目鰻表現序列(exon) 分析八目鰻表現序列氨基酸，發現有四種表現序列，命名為 exon X, exon Y, exon Z, 及 no mini exon usage, 推測是 3'UTR 進行選擇性切割所致，但無論選擇何者，只要在停止密碼之前多一個核苷酸，其所轉譯出的蛋白質序列便會與 HNF1- α 的前端近似，若在第 2149 個核苷酸之前又少一個核苷酸，其所轉譯出的蛋白質序列便會與 HNF1- α 的尾端近似。

(四)演化假說；根據以下結果：

1. HNF1 為脊椎動物特有之轉錄因子，於非脊椎動物中並沒有發現類似的分子
2. 文昌魚序列中，具有與其他物種高相似性的 POU 與 HOX, 及轉錄活化區與其他物種有相當之差異，而自成獨特的 Q-rich domain。
3. 八目鰻序列中，有兩個極其相似的基因(6 或 7 個 G, 及表現序列不同)於停止密碼(stop codon)像 HNF1- β ，而停止密碼後則像 HNF1- α 。

建立了新的演化假說：

頭索動物文昌魚 HNF1 為祖先型基因，演化至圓口類祖先 HNF1 時，HNF1 逐漸像 HNF1- β ，且其 3'UTR 逐漸像 HNF1- α ，演化至現生八目鰻之前發生了複製事件，產生兩個 HNF1 基因，在演化至現生硬骨魚類的過程中，其中一個基因發生突變使停止密碼消失，而使原本類似 HNF1- α 的 3'UTR 變為轉譯區，之後又發生突變，使這基因更類似 HNF1- α 。之後再經過演化，而成為今日各個物種的 HNF1。

(五)突破

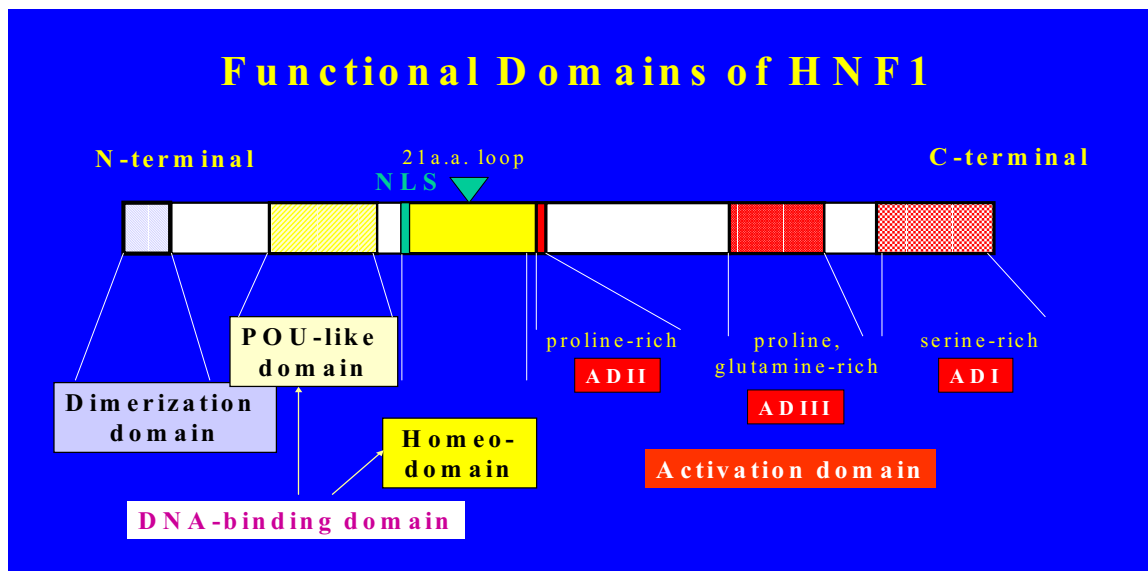
1. 將 HNF1 祖先由原先認為的鮭魚向前推至文昌魚。
2. 將複製事件由輻鰭魚類與肉鰭魚類演化分枝之後向前推至有頰類與無頰類演化分枝之前。
3. 證實是由 HNF1- β 演化出 HNF1- α ，而非由 HNF1- α 演化出 HNF1- β 。
4. 文昌魚序列中發現獨特的 Q-rich domain，是其他物種 HNF1 所沒有的。

七、 結論：

實驗結果證明 HNF1 分子早在文昌魚就已出現；而且在八目鰻 HNF1 的 cDNA 序列上發現在停止密碼前的序列與哺乳類 HNF1- β 之同源性較高，在停止密碼之後的非轉譯區域之序列與哺乳類 HNF1- α 之同源性較高；具有在演化上形成 HNF1- α 和 HNF1- β 的潛能。

本實驗在八目鰻基因庫中選殖出兩種與哺乳類 HNF1- β 同源性較高的互補去氧核糖核酸序列，以其序列具有演化成 HNF1- α 與 HNF1- β 潛能的特殊性質，證實在演化上 HNF1- β 較 HNF1- α 早出現而推翻先前研究認為 HNF1- β 是由 HNF1- α 經基因複製演化而來的假說，同時

將基因複製事件由原本認為在輻鰭魚類與肉鰭魚類分枝之後向前推進至有領類與無領類演化分枝之前。另外在文昌魚基因庫中選殖出的互補去氧核糖核酸序列，其 POU-like domain 及 Homeo-domain 與哺乳類 HNF1 之同源性高，但 Activation domain 卻又有相當程度之差異，推測其為 HNF1 分子的祖先型基因，並將 HNF1 在演化上出現時期推前至文昌魚所屬的頭索動物亞門。



八、 參考文獻

David J.D. Sourdiv and Moshe Yaniv (1997), Chapter 10. The hepatic nuclear factor 1.

Transcription factors in eukaryotes. LANDES BIOSCIENCE Austin, Texas U.S.A.

Carl Zimmer, In search of vertebrate origins: beyond brain and bone. Science, 2000, Vol. 287, 1576-1579.

Francois Deryckere, Lucy Byrnes, Anne Wagner, Tara McMorro and Frank Gannon (1995), Salmon HNF1:cDNA sequence, evolution, tissue, specificity and binding to the salmon serum albumin promoter, J. Mol. Biol. 247, 1-10.

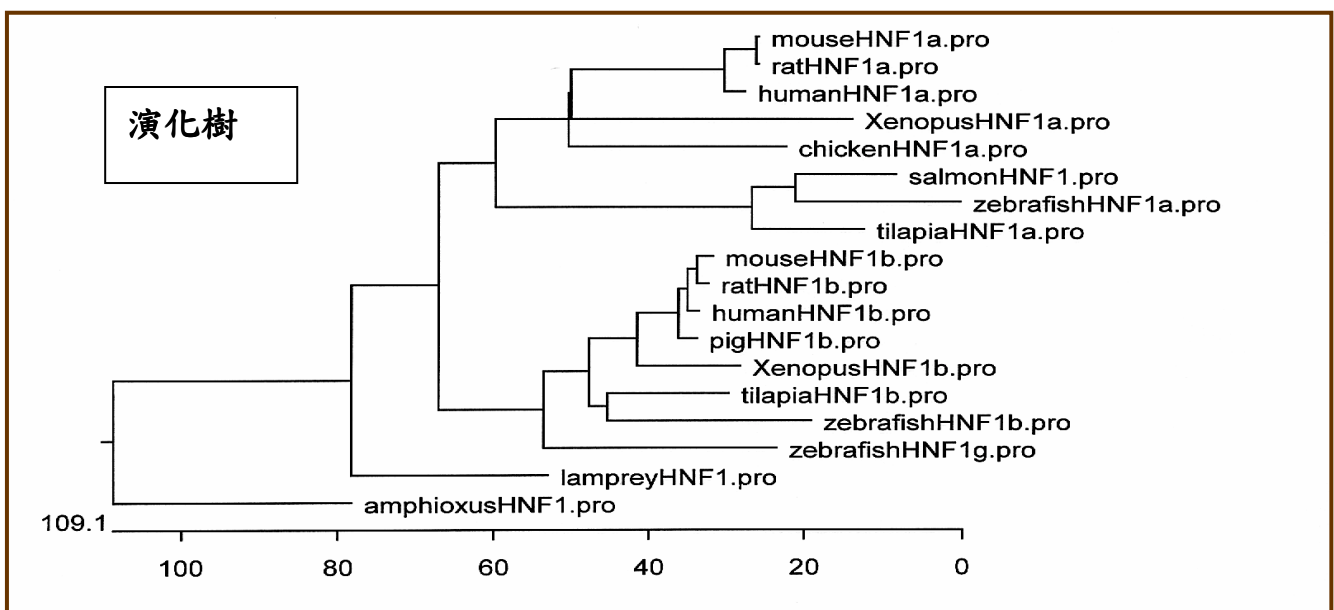
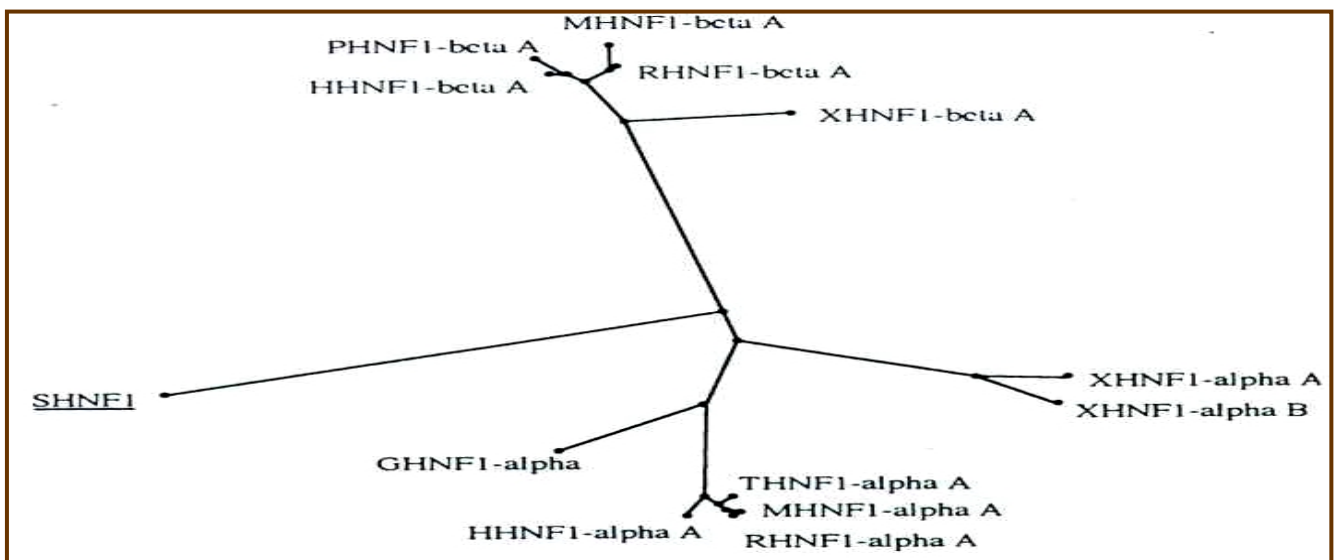
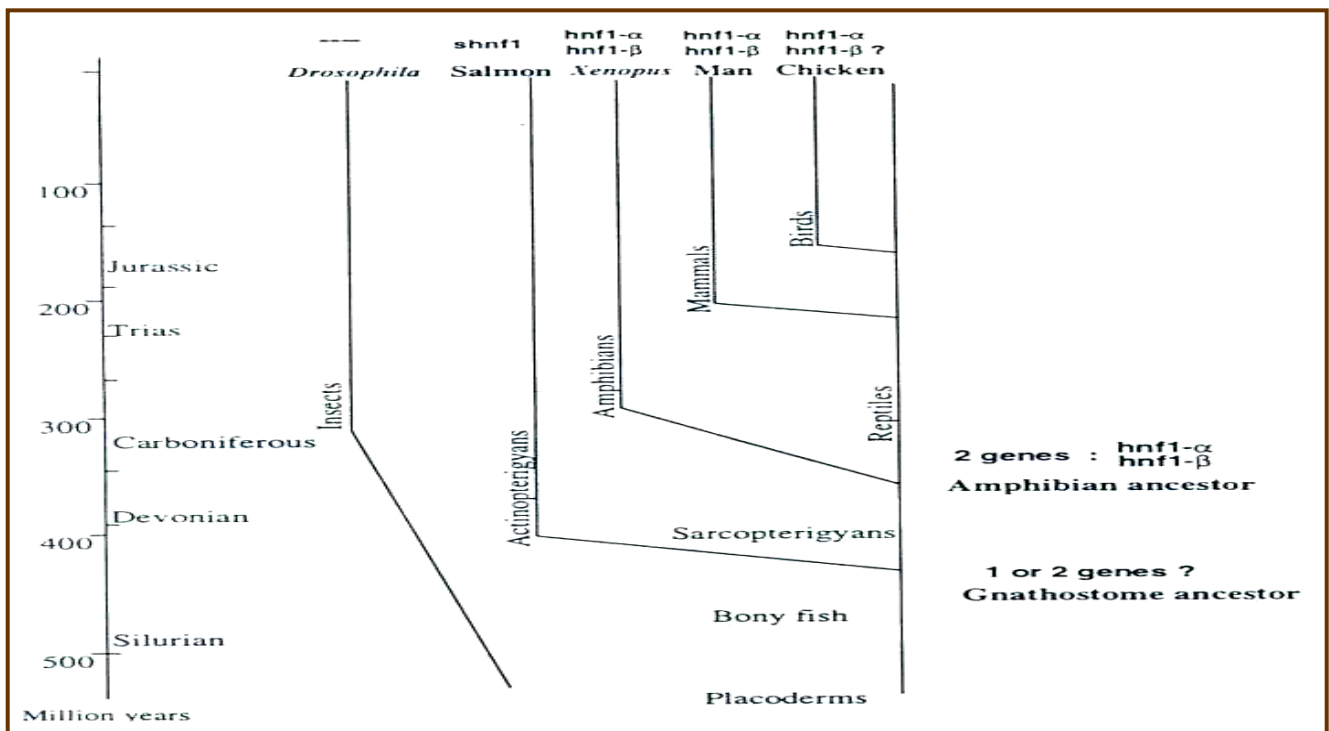
Shu Jin Chan, Qiu-Ping Cao, and Donald F. Steiner. Evolution of the insulin superfamily:cloning of a hybrid insulin/insulin-like growth factor cDNA from amphioxus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 87, 9319-9323.

林致凡 (1999)，調節吳郭魚第一型類胰島素生長因子之兩種等型肝細胞核因子，國立台灣海洋大學水產生物技術研究所碩士學位論文

楊安峰等編著(1990)，脊椎動物學上冊，淑馨出版社，ISBN 957-531-040-3

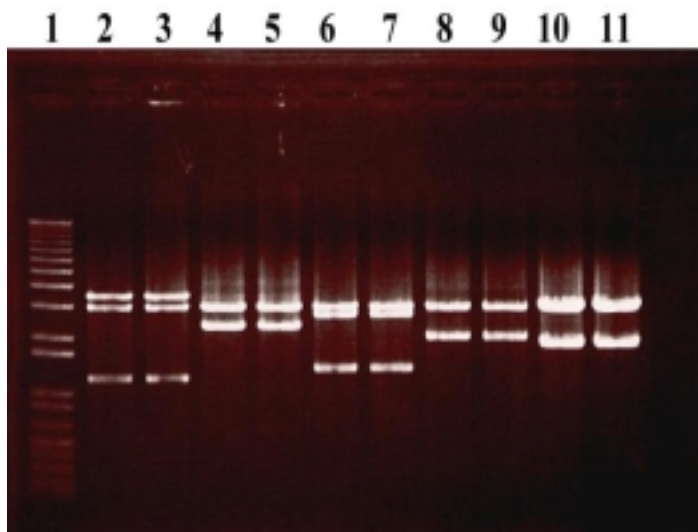
J. R. Whittaker, Chapter 18. Cephalochordates, the Lancelets.

原始演化樹

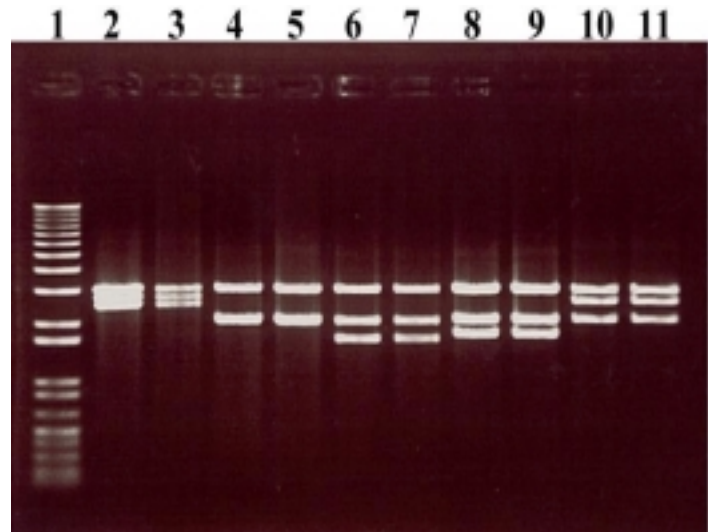


選殖序列圖表分析

電泳圖



圖一



圖二

圖一 Lane 1: 1kb marker
 Lane 2, 3: amphioxus1-1; band1: 3.5kb, band2: 3kb, band3: 1.1kb
 Lane 4, 5: amphioxus5-1; band1: 3kb, band2: 2.2kb
 Lane 6, 7: amphioxus8-1; band1: 3kb, band2: 2.8kb, band3: 1.3kb
 Lane 8, 9: amphioxus12-1; band1: 3kb, band2: 2kb
 Lane 10, 11: early lamprey2-7; band1: 3kb, band2: 1.7kb
 Lane 1: 3 μ l of 1kb marker + 2 μ l of dye + 6 μ l of H₂O
 Lane 2~11: 15 μ l of *Eco*RI digested plasmid + 2 μ l of dye
 Electrophoresis at 100V for about 25 minutes, then transfer the gel to the tank containing EtBr and stain for 15min. take the photography by documentation system.

圖二 Lane 1: 1kb marker
 Lane 2, 3: early lamprey7-2; band1: 3kb, band2: 2.8kb, band3: 2.6kb
 Lane 4, 5: early lamprey8-1; band1: 3kb, band2: 2kb
 Lane 6, 7: early lamprey8-6; band1: 3kb, band2: 2kb, band3: 1.6kb
 Lane 8, 9: late lamprey1-1; band1: 3kb, band2: 2.2kb, band3: 1.7kb
 Lane 10, 11: late lamprey4-1; band1: 3kb, band2: 2.6kb, band3: 2.2kb
 Lane 1: 3 μ l of 1kb marker + 2 μ l of dye + 6 μ l of H₂O
 Lane 2~11: 15 μ l of *Eco*RI digested plasmid + 2 μ l of dye
 Electrophoresis at 100V for about 25 minutes, then transfer the gel to the tank containing EtBr and stain for 15min. take the photography by documentation system.

Amphioxus HNF1

KLKVSVMQYH NIPQREVDDA TGLNQSHLSQ HLNKGTPMKN QKRAALYAWY POU- domain
 IRKQREIQRQ FSHGVVSGAP QGMVDDGLAG TAGGAGPGEE PPNKRSRRNR Homeo- domain
 FKWGPASQOI LRQAYERQKN PSKEEREALV EECNRAECIQ RGVSPSQASG Fig. Putative amino acid
 LGSNLVTEVR VYNWFANRRK EEAFRHKLAM DAYQQQIPQ QPQQQAPQP sequence of 5'-truncated
 QQQTQQQQLQ QQLQQSQVQQ QQQHOLPHQQ QQHVPASLK EAVYQANQS amphioxus HNF1 Cdna
 QQPPVPVMA SSAATPTHHT SVVMVPGTMP SSSLHRTQGT TTLANMDTGE obtained from 5-24h *B. floridae*
 LQTLPPVSSL TPIHHNSSPR HTQTPEPSSQ PSHSQNPQQH TPLPGVLSFA embryo cDNA library with
 QSLSTTPQGH VILQNVPTNQ LLHHGIYSQL AAHQQAALSG RRSPPPRTLT unique glutamine-rich
 RQEFMQAVAE LQNSMGYHQ KSDQTSNQQQ HMTLQQHLQQ TRVPYSAHVS transactivation domain
 MATVTENRDA NHLQTSRTNE SELLQQGATV RVQVPNNTGM VIYEHQGSQT distinct from HNF1- α and
 VAAEETVMST SEDPMSYNV AQEVHVSTSN M* HNF1- β .

Lamprey HNF1

CTCGTCCGCTCGCTCCGCATGTTGCCCGCTGTTGCCCACTGCCAAGTGGGAGATCTCGAC
CCTTATGGACGAGGCGAAGTGAATTTTACAGCGCGGCGAGGTGCGTGCCGTGCGACA
AGCGCTTTGCTTAGAGGGATCGAGGAACCTGTGCTCATAACCGAAGCACGTACCACGTAC
GAGAGACAGCAGCGTTACATCGGGAAGGAGTGGCGGTGGTGGTTCGTTGGTGGTGAACG
CGTACAGGTGGTTCGCGCAACCGCGCGCAAAGGGGGGGGGGGTGGTTCGCACGCACGAGA
ACGCGACAATGGTTTCCAAGTTGACCGACATCCAGAGGGGATTGCTCAACGATCTGCTGT

M V S K L T D I Q R G L L N D L L C

Dimerization domain

GCTCCGGGGTGAGCAAGACGGCTCTGATGGAGGCGCTACCGAACTCGAGCCAGCGCTGG
S G V S K T A L M E A L T E L E P A L G
GCGCTACGACGACCTTACAGTCGGTGGCGGTGGGCACGGCCAGCAAGACCTCCCTCCGG
A Y D D L H V G G G G H G Q Q D L P P A

CTCCTAACAACGCCACGAGGGTTCCTGCAGCAGCGGACGGGGTGGTGGTGGTGGTAGCA

6 or 7 Gly

P N N A T R V L Q H G D **G G G G G G S N**
ACCACGACCATCAAAGCCATCACACCTCTCAATGGGTGGCGGCGACGGCCAGCGGAGT
H D H Q S H H H L S M G G G D G P A E Y
ACATTAACCTCAGCAACGGGAACACCACCAACAGCATCATCAGCAGCATCAGCATCATC
I N L S N G Q H H Q Q H H Q Q H Q H H H
ATCAGCAGCAGCAGGTCGCGCGGCGGAATCACCTATCGGGCGACGAAACGTCGGAGG
Q Q Q H Q V A R R N H L S G D E T S E D
ATGGAGACGACTTGGAGCCGCTCCAATCTTGAAGGAGCTGGAGAGCTTGAGTCCCGAAG
G D D L E P P P I L K E L E S L S P E E
AAGCGGTGAGCAGCGAGGGGAAGTGGATCGACTCTTACGGGAAGACCCATGGCGTGTCT

POU-domain

A A E Q R G E V **D R L L R E D P W R V S**
CCAAGCTCGTCAAGAGTACATGCAGCAGCACAACATCCCGCAGCGGAGGTGGTGGACG

K L V K S Y M Q Q H N I P Q R E V V D A
CCACGGGCTCAACCAAGTTCGACCTGTTCGAGCAGCTCAACAAGGGCAGCCAATGAAGA

T G L N Q S H L S Q H L N K G T P M K N
ACCAGAAGCGCGCGCGCTGTACGCTGGTACATCCGCAAGCAGCGAGAGATCCAGAGAC

Q K R A A L Y A W Y I R K Q R E I Q R Q
AGTTTCAGCCACGGCGTGGTGGAGCGGTGCCCCCAGGGCATGGTGGACGACGGCTCGCCG

F S H G V V S G A P Q G M V D D G L A G
GCACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGAGGAGCCCCCAACAAACGCTCGCGCGCAACC

T A G G A G P G E E P P N **K R S R R N R**
GCTTCAAGTGGGGGCGCGCTCGCAGCAGATCCTGCGGCAGGCGTACGAGCGGCAGAAGA

NLS

F K **W G P A S Q Q I L R Q A Y E R Q K N**
ACCCAGCAAGGAGGAGCGGGAGGCCCTGGTGGAGGAGTGCAACAGGGCGGAGTGCATCC

P S K E E R E A L V E E C N R A E C I Q
AGCGCGGCTCTACCGTCCCAAGCCACGGGCAGGGCAGCAACCTGGTCACCGAGGTGC

InArgGlyValSerProSerGlnAlaHisGlyGlnGlyThrAsnLeuValThrGluValA
R G V S P S Q A H G Q G T N L V T E V R

GGGTCTACAGCTGGTTCCGCAACCGGCGGAAGGAGGAGCGTTCCGGCACAAGGTGGCCC
V Y S W F A N R R K E E A F R H K V A Q

Transactivation domain

AGGACGCGTACGAGACGGGCGGCGAGGCGCAGCAGGCGGCATGCACGGCTCACCGTCCC
D A Y E T G G E A Q H G G M H G S P S P

HNF1-β-like

CAGGCCGCTCCATGGGATGCTCATTGCTGGCAGGTGGCCGTATGGCCAGCCAGGCTCAG
G R S M G C S L L A G G R Y G Q P G S G

GTGATGTGGTGTGCGCCTCGGGTCACCATGGCAACATCTCCATGGCGACGGGCCAGGTGG
D V V S P S G H H G N I S M A T G Q V V

TACTGCAGCAAGTTTCTCCACGATGGAGATCCAGACTTCTGGGGAACTTGCCACCCG
L Q Q V S P T M E I Q T S G G T L P P V

TGAGCACCTTGACGCACATCCACAACCTACACTCTCCACCATGTCCAGCAGCCTC
S T L T H I H N L H S P H H M S Q Q P H

ACCAGAACCTCATCATGACCCAGCTACCCGAGTCATGGCCATCGCACAGAGTCTGAGCG
Q N L I M T Q L P G V M A I A Q S L S G

GCGGCCAGGCGAGTCCATCCCGTCAACAGCGTGGGCGGCAGCCTCACAAACCTGC
G Q A Q S I P V I N S V G G S L T T L Q

AGCCCATGCAGCTCAGTCGAGCAACTGCACGGGTGCAGCAGCCGCTGA
P M Q L S R S N C T G C S S R *

Fig. (A) Full length cDNAs and putative amino acid sequence of lamprey HNF1 obtained from 2-10 day *P. marinus* embryo cDNA library with HNF1-β-like transactivation domain. Four kinds of lamprey HNF1 cDNAs with

Lamprey HNF1-3'UTR

TGCAGCACGCGCAGACCCACATGGGGCAGTCGCAATTCATGGCCACCGGGGCACAGCTGC
AGAGCCCTCACCCGCTTTACAGCCACAAAGCAGAGCCACCACAGTACCCTCACAACGGAC
GCTTTTCTCAAACCATGGGCATCACAGAAACCGGAAACCTACACAGCTCCAACAAGCAGA
GCCCCGCTCGCTGCACCTGCACGCTCAGGACAGCTCCATTAGCACATCCAGGGAGCCC
ACAGAGTACCCTCCAGCCAGGCTTGCCTTCAG----**alternative exon usage**
CATCCTCGGCAAGCCTGGTGATGTACAGACAAACCATGGCCAGACGGGCATGGACACTT
GCTCTCTCAGAACCATGCCAATATGGACAACCTTCTGAGCCAACAG**ATGGTCTCCACGGC**
CCAGTAGCTGGCCACGTGTGAGACCCAGCCTCCGCGGAGCCTCGAGG

alternative-splicing
(exon usage) in the
3'UTR are derived
from two genes.
(B) 3'UTR of lamprey
HNF1 bears the
potential coding for the
transactivation domain
of HNF1-α translated
with different reading

Alternative splicing (exon usage) in 3'-UTR of lamprey HNF1 mRNA:

frames 1 or 21. use exon X

Exon X CACAAGTTCACAGTACTGTACTGTTGAGTCTTGTCTGACTTCCCAAAGCCACATTTAC
TACATCATCATCATCAGCTATGATCGATCCACTGCTGGGTGAAGGCCTAAG

2. use exon Y

Exon Y GTCCGCAGGATTATTTTGGCAAGAAACATTTTGTCTCTAG

3. use exon Z

Exon Z GTCCGCAGGATTATTTTG

4. no mini-exon usage (full length lamprey HNF1 cDNA clone EL7-2)

3'-UTR reading frame 2 (one base insertion before stop codon)

1 AAHAAQSQQLH GLQOPLMOHA QSHMGQSQFM ATGAQLQSPH PLYSHKAEP
51 POYPHNGRFSQ TMGITETGNL HSSNKQSPAS LHLHAQDSSI QHIQGAHRV HNF1-α-like
101 PSSPGLPSASS ASLVMYRQTM AQTGMDTCSL RTMPIWTTTS*

3'-UTR reading frame 1 (one base deletion after AHRV of reading frame 2)

1 CSPCSSVAATA RAAAAADAAR AEPHGAIAH GHRGTAAEPS PALQPQSR
51 TTVPSQRTLFS NHGHRNRKP TQLQQAEPRL AAPARSGQLH SAHPGSPQS HNF1-α-like
101 TLQPLAFSIL GKPGDVQTNH GPDGHGILLS QNHANMDNFL SQQ**MVSTAQ***

Dimerization domain of HNF1

salmon HNF1-alpha	ME.GEERKGEAGPGRLSALQEQLIWALLGSGLSREVLVHALGE
zf HNF1-alpha	MDGESRRSE...GSGRLSALQEQLVWSLLGSGLSKELLIQAMGD
mouse HNF1-alpha	M.....VSKLSQLQTELLAALLESGLSKEALIQUALGE
rat HNF1-alpha	M.....VSKLSQLQTELLAALLESGLSKEALIQUALGE
human HNF1-alpha	M.....VSKLSQLQTELLAALLESGLSKEALIQUALGE
chicken HNF1-alpha	M.....VSKLSHLQVELLGALLESGLTKETLIKGLSE
Xenopus HNF1-alpha	M.....ASQLSYLQRELLQALLESGLVTKKALAD
human HNF1-beta	M.....VSKLTSLQELLALLSSGVTKEVLVQALEE
rat HNF1-beta	M.....VSKLTSLQELLALLSSGVTKEVLVQALEE
mouse HNF1-beta	M.....VSKLTSLQELLALLSSGVTKEVLVQALEE
pig HNF1-beta	M.....VSKLTSLQELLALLSSGVTKEVLVQALEE
Xenopus HNF1-beta	M.....VSKLPLQELLNALLNSGVTKEDLIQALDD
zf HNF1-beta	M.....FANMVSKLTSLQELLALLSSGVTKDVLVQALEE
zf HNF1-gamma	M MFTDMVSKLTSLQELLALLSSGVTKDVLVQALEE
Lamprey HNF1	M VSKLTDIQRGLLNDLLCSGVSKTALMEALTE

POU-like domain of HNF1

salmon HNF1-alpha	DQLLQEDP WRVAKLVKSY MQQHNLPORE VVESIGLNQS HLSQHLNKGTPMKNQKRAAL YSWYVRKQ
zf HNF1-alpha	DQLLQEDP WHVAKMVKSY MQQHNLPORE VVESTGLNQS HLSQHLNKGTPMKNQKRAAL YSWYTKKQ
mouse HNF1-alpha	ESLLQEDP WRVAKMVKSY LQQHNIPORE VVDITGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVRKQ
rat HNF1-alpha	ESLLQEDP WRVAKMVKSY LQQHNIPORE VVDITGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVRKQ
human HNF1-alpha	ETLLQEDP WRVAKMVKSY LQQHNIPORE VVDITGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVRKQ
chicken HNF1-alpha	ERLLQEDP WRVAKMVKSY LQQHNIPORE VVDITGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVRKQ
Xenopus HNF1-alpha	ERLLQEDS WHVAKLVKSY LQQHNIPORE VVETGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVQKQ
human HNF1-beta	DRMLSEDP WRAAKMIKGY MQQHNIPORE VVDVTGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVRKQ
rat HNF1-beta	DRMLSEDP WRAAKMIKGY MQQHNIPORE VVDVTGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVRKQ
mouse HNF1-beta	DRMLSEDP WRAAKMIKGY MQQHNIPORE VVDVTGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVRKQ
pig HNF1-beta	DRMLSEDP WRAAKMIKGY MQQHNIPORE VVDVTGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVRKQ
Xenopus HNF1-beta	DRMLSEDP WRAAKMIKGY MQQHNIPORE VVDITGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVRKQ
zf HNF1-beta	ERMLAEDP WRAARMIKGY MQQHNIPORE VVDVTGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVRKQ
zf HNF1-gamma	DRMLSEDP WRVARTIKGY MQQHNIPORE VVDVTGLNQS HLSQHLNKGTPMKTKRAAL YTWYVQKQ
Lamprey HNF1	DRLLREDP WRVSKLVKSY MQQHNIPORE VVDATGLNQS HLSQHLNKGTPMKNQKRAAL YAWYIRKQ
Amphioxus HNF1	~~~~~ KLKSY MQYHNIPQRE VVDATGLNQS HLSQHLNKGTPMKNQKRAAL YAWYIRKQ

Atypical Homeodomain of HNF1

salmon HNF1-alpha GRRNRFKWGPA **SQ**IL**F**HAYE RQKNPSKEER **EGL**VEECNRA **ECL**QRGVSPS
 zf HNF1-alpha GRRNRFKWGPA **SL**QIL**FQ**AYE RQKNPSKEER **EGL**VEECNRA **ECL**QRGVSPS
 mouse HNF1-alpha GRRNRFKWGPA **SQ**IL**FQ**AYE RQKNPSKEER **ETL**VEECNRA **ECI**QRGVSPS
 rat HNF1-alpha GRRNRFKWGPA **SQ**IL**FQ**AYE RQKNPSKEER **ETL**VEECNRA **ECI**QRGVSPS
 human HNF1-alpha GRRNRFKWGPA **SQ**IL**FQ**AYE RQKNPSKEER **ETL**VEECNRA **ECI**QRGVSPS
 chicken HNF1-alpha GRRNRFKWGPA **SQ**IL**FQ**AYE RQKNPSKEER **EAL**VEECNRA **ECI**QRGVSPS
 Xenopus HNF1-alpha **MRR**NRFKWGPA **SQ**IL**FQ**AYE RQKNPSKEER **EAL**VEECNRA **ECL**QRGVSPS
 human HNF1-beta **MRR**NRFKWGPA **SQ**IL**YQ**AYD RQKNPSKEER **EAL**VEECNRA **ECL**QRGVSPS
 rat HNF1-beta **MRR**NRFKWGPA **SQ**IL**YQ**AYD RQKNPSKEER **EAL**VEECNRA **ECL**QRGVSPS
 mouse HNF1-beta **MRR**NRFKWGPA **SQ**IL**YQ**AYD RQKNPSKEER **EAL**VEECNRA **ECL**QRGVSPS
 pig HNF1-beta **MRR**NRFKWGPA **SQ**IL**YQ**AYD RQKNPSKEER **EAL**VEECNRA **ECL**QRGVSPS
 Xenopus HNF1-beta **MRR**NRFKWGPA **SH**IL**YQ**AYE RQKNPSKEER **EAL**VEECNRA **ECI**QRGVSPS
 zf HNF1-beta **LRR**NRFKWGPA **SQ**IL**YQ**AYE RQKNPSKEER **EAL**VEECNRA **ECL**QRGVSPS
 zf HNF1-gamma **MRR**NRFKWGPA **SQ****E**IL**YQ**AYE RQKNPSKEER **EAL**VEECNRA **ECV**QRGVSPS
 Lamprey HNF1 **SRR**NRFKWGPA **SQ**IL**RQ**AYE RQKNPSKEER **EAL**VEECNRA **ECI**QRGVSPS
 Amphioxus HNF1 **SRR**NRFKWGPA **SQ**IL**RQ**AYE RQKNPSKEER **EAL**VEECNRA **ECI**QRGVSPS

salmon HNF1-alpha **Q****L**AGLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**H**
 zf HNF1-alpha **Q****L**AGLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**H**
 mouse HNF1-alpha **Q****AQ**GLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**H**
 rat HNF1-alpha **Q****AQ**GLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**H**
 human HNF1-alpha **Q****AQ**GLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**H**
 chicken HNF1-alpha **Q****AQ**GLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**H**
 Xenopus HNF1-alpha **Q****AQ**GLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**H**
 human HNF1-beta **K**AHGLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**Q**
 rat HNF1-beta **K**AHGLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**Q**
 mouse HNF1-beta **K**AHGLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**Q**
 pig HNF1-beta **K**AHGLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK**E**EA**F**R**Q**
 Xenopus HNF1-beta **K**AHGLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**Q**
 zf HNF1-beta **K**AHGLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**Q**
 zf HNF1-gamma **K**AHGLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**Q**
 Lamprey HNF1 **Q**A**HG****Q****T**NLV TEVRVY**S**WFA NRRK.**E**EA**F**R**H**
 Amphioxus HNF1 **Q**A**S**GLGSNLV TEVRVY**N**WFA NRRK.**E**EA**F**R**H**

評語：

此研究以文昌魚及八目鰻 HNF1 基因 cDNA 序列之分析，建立新的假說，認為 HNF1- α 是由 HNF1 β 演化出來，同時認為文昌魚是 HNF 存在較早之祖先，其研究內容之層次很高。

該生對此研究的了解相當清楚，然部分實驗未能親自操作，同時實驗動機之自主性有待加強，在考慮該生在分子生物學及生物發生學之知識豐富，同時對所有實驗內容，程序均十分了解，因此予以推薦。

作者簡介

作者：林志達 就讀學校：師大附中 指導人員：吳金洌教授 許偉傑老師

我是林志達，成長在一個平凡溫馨的家庭，高中期間，承蒙國科會舉辦生物資賦優異學生輔導計劃，使我對從事生物科學研究奠定了基礎外，並讓我有機會能以甄試保送大學。很高興首次參加科展就能有如此佳績，有人說：科學之路是孤獨的，但幸運的我，有親切的吳金洌教授及龔紘毅、林致凡兩位學長的指導，未來的我將繼續從事科學研究，相信仍舊不會孤獨，因為在科展中認識了許多志同道合的朋友，甚至還與外國朋友交流獲益良多，希望大家都有機會分享這難得的經驗。