

中華民國第 53 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

第三名

040718

斑馬魚上的 CAG 重複序列疾病模式與研究

學校名稱：國立臺中第一高級中學

| | |
|---------------|--------------|
| 作者： 高二 蕭宇綸 | 指導老師： 張建鴻 |
|---------------|--------------|

關鍵詞：polyQ、CAG 重複序列、斑馬魚

摘要

為了調查 polyQ 在疾病中的病理機制與對發育的影響，本研究將擴增的 CAG 重複序列插入 EGFP 基因的編碼區內，以神經元專一性表達的 HuC 啟動子來驅動表達，建構含有 Tol2 轉位子元素的基因載體，再將此載體與轉位酶 cRNA 注射至受精卵中，製造出基因轉殖魚。目前已獲得不含重複序列(Q0，對照組) 及含有 110 次重複 (Q110，實驗組)的轉殖魚(F0)，正在篩選第一代轉殖魚(F1)以建立穩定傳代的品系。除了觀察胚胎綠螢光的呈現，我也使用 PCR、RT-PCR 等方式檢查 EGFP 基因的表現。在外觀上，Q110 並無明顯變異，但是會出現觸碰反應遲鈍及繞圈泳動等異常的運動行為。未來我將針對 Q110 轉殖魚子代進行更多病理分析，包括是否形成蛋白聚集和造成神經細胞凋亡等，以確定此轉殖魚模式可模擬人類 polyQ 疾病。

壹、研究動機

一、斑馬魚及疾病模式

斑馬魚是近年來興起的一種簡單的胚胎發育及遺傳研究模式動物，它的特點包括生長週期短、子代數目多、可以光週期誘發產卵、胚胎透明且易於觀察操作、基因體已解碼等，非常利於實驗研究的進行。目前已有報告指出在斑馬魚中具有許多與造成人類疾病相似的同源基因，加上斑馬魚的生理功能大部分與人類相似，因此多數疾病都能在斑馬魚上表現出與人類相近的病徵，相當適合用於品系與疾病模式的建立。由基因異常或基因體不安定性所引起的人類疾病，包括遺傳性疾病與癌症等，是生物醫學及遺傳研究中很重要的主題。另外，基因轉殖及基因剔除動物模式的建立都是重要的基因工程技術，對致病基因生理功能的探討，可提供直接有力之證據，因而對於疾病病理機制的闡釋及進一步開發疾病治療的方法，有非常重要的貢獻。一個基因轉殖魚品系能提供研究品質較為穩定的基因轉殖魚來源，也能在變因較少的情況下進行觀察研究，而基因轉殖魚疾病模式的建立則是研究疾病機轉、病徵、影響及治療方法的重要方式。另外，相關文獻也指出，根據過去各項斑馬魚的實驗和疾病模式，斑馬魚十分適合用作神經退化性疾病的模式動物(Sager, et al, 2010)。

二、神經退化性疾病及 CAG 重複序列疾病

神經退化性疾病是一類腦部及脊髓神經細胞失去功能的疾病統稱，因為神經元遭受的傷害無法回復且疾病本身難以治療，所以它們許久以來一直是人類醫療上的重大難題。現今雖然已有部分神經退化性疾病可以藉由治療達到減緩症狀的效果，卻仍未有能治癒這類疾病的方法。其中，部分神經退化性疾病的致病基因在編碼區內會出現過長的 CAG 三聯核酸重複序列，因 CAG 密碼會轉譯出麩醯胺酸(Glutamine, 胺基酸代號為 Q)，故這類神經退化性疾病被通稱為 polyQ diseases，常見的有亨丁頓氏舞蹈症(Huntington's Disease, HD)及脊髓小腦萎縮症(Spinocerebellar Ataxia, SCA)的 1~3,6,7 型等(Marsh, et al, 2000.)。CAG 重複序列出現在人類正常

基因座內的重複次數多在 30 次以下，而致病基因的重複序列常會異常擴增至 50 次以上。

目前相關研究已證實過長的 polyQ 會在多肽鏈層次造成蛋白質的構型改變，進而異常聚集堆積並影響正常代謝，導致神經細胞的死亡 (McLeod, et al, 2005; Warrick, et al, 1998; Marsh, et al, 2000)。雖然此領域的研究已發展許久，但 polyQ 造成細胞毒性的詳細機轉仍有很多值得探討的地方，例如此類疾病多為晚發型漸進式發展(病人多在青壯或中年發病，且病情隨年紀增長而加重)，可能與發育程序中的某些因素有關聯。研究也發現，當 CAG 重複序列位在非轉譯區時也會對細胞造成傷害(Hsu, et al, 2011)，而其細胞毒性可能也和其他蛋白質相關(Wang L.-C., et al, 2011)。目前此類疾病已有許多動物模式的研究，包括較低等的線蟲、果蠅和高等的小鼠等，前者雖可提供細胞毒理的機制但為無脊椎動物，難以反映高等生物的複雜生理變化；而後者哺乳動物雖然接近人類生理，但因發育時間較長且子代數目不多，不適合用來作為大規模藥物篩選的系統。近年來興起的斑馬魚具有各種模式動物的優點又為脊椎動物，且其基因轉殖技術也日趨成熟，非常適合作為人類疾病的模式。由於之前尚未有穩定表達 polyQ 序列的轉殖基因斑馬魚品系相關文獻報告，本研究擬嘗試建立此一模式。

貳、研究目的

本研究希望以斑馬魚為模式動物，建立穩定表現 CAG 重複序列的轉殖魚品系，並以綠螢光蛋白作為轉殖基因指標，藉以進行各項病理觀察及表型分析，如能成功建立類似神退化性疾病之模式，未來將可以應用於藥物篩選等治療方法的研究。本研究主要的具體目標為：

- 一、構築並選殖包含 CAG 重複序列的轉殖基因片段
- 二、顯微注射轉殖基因至斑馬魚胚胎
- 三、篩選並建立穩定表現轉殖基因的轉殖魚品系
- 四、觀察及分析轉殖魚的異常表型

參、研究設備及器材

一、器材及藥品

(一)各實驗通用器材、耗材及藥品

微量吸管

離心機

Micro Centrifuge

Rack

電子天平

UV 照膠系統

-20°C 冰箱

飼養箱

水、光循環系統

PCR 機器

水浴槽

錐形瓶、量筒、製膠模型、滴管、計時器、玻棒等

Parafilm

洋菜膠粉

EtBr 溶液

75%及 100%酒精

EcoRI、Bam-HI、BsrGI

dNTPs、PCR primers、PCR buffer

(二)轉殖基因質體構築

37°C 培養箱

L 型玻棒

酒精燈

pDONR P4-P1R、pDONR 221、pDONR P2R-P3、destination vector

EGFP template、(CAG)_n template

BP clonaseII、BP buffer、DH5alpha 勝任細胞

S.O.C solution

Kanamycin、Ampicillin

Plasmid Miniprep Kit

LR clonaseII、LR buffer、Top10 勝任細胞

(三)顯微注射

27°C 培養箱

螢光顯微鏡

魚飼料

(四)基因轉殖魚的培養與篩選

解剖刀

照相機

大頭針

轉印器

振盪器

冷光照相儀

PVDF 膜

甲醇

NaOH 50mM

pH8 Tris buffer

chloroform、phenol-chloroform

isopropanal、NaOAc

DNase buffer、RQDNase

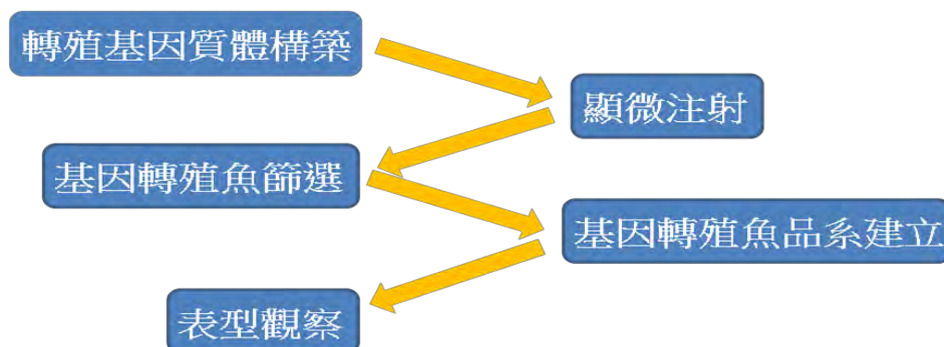
DEPC
oligo dT
First-strand buffer、DTT、Super Script II RT
running buffer、transfer buffer
TTBS
脫脂奶粉
一次抗體(anti-polyQ、anti-GFP、anti-actin)
二次抗體(rabbit、mouse、fish)
呈色液

二、實驗動物

斑馬魚(Zebrafish，學名：*Danio rerio*)是一種常見的實驗動物，因為它生長週期短、胚胎透明且易於觀察操作、基因體已解碼等利於實驗研究的特點，所以常被用作胚胎發育及遺傳研究的模式動物。本實驗所使用之斑馬魚為中山醫學大學生物醫學系潘惠錦教授實驗室自行繁殖之 AB strain，所飼養及繁殖的魚苗專供學術研究目的使用。飼養溫度約為 25~28°C，固定光暗週期，並使用循環供水系統。選用之胚胎皆為健全野生型斑馬魚交配產下之子代。

肆、研究過程與方法

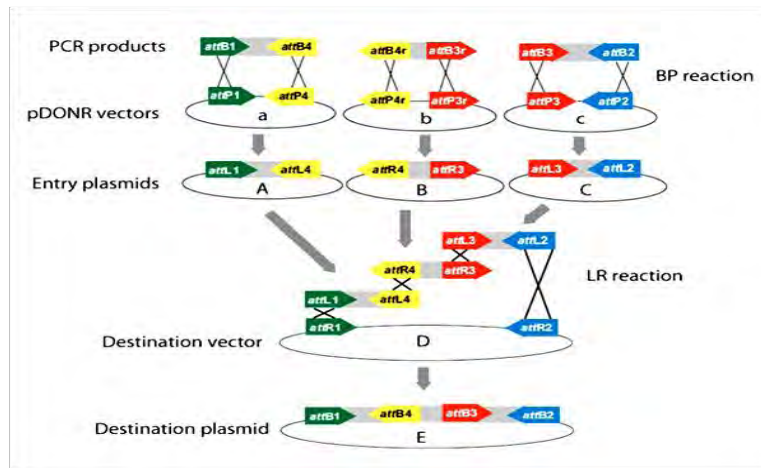
◎研究架構



一、轉殖基因質體的構築

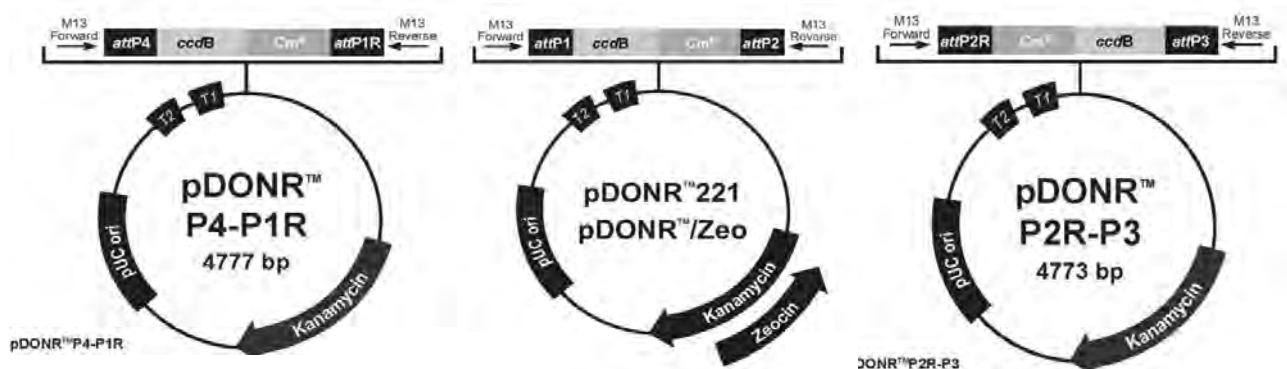
(一)介紹：

為了製造出含有適當長度 CAG 重複序列的基因轉殖魚，本研究使用 MultiSite Gateway 系統的基因重組技術(圖一)，製備出含有 Tol2 轉位子元素(transposon element)，的目標質體(destination plasmid)，在顯微注射入斑馬魚受精卵後能將目標基因插入胚胎的基因體中。



圖一、Gateway 基因重組系統示意圖。圖中所示之 a, b, c 為三個 pDONR 載體，A、B、C 質體分別為 p5E、pME 及 p3E。此圖僅為示意，圖上所標示之 att 序列與本研究實際所使用者不同。

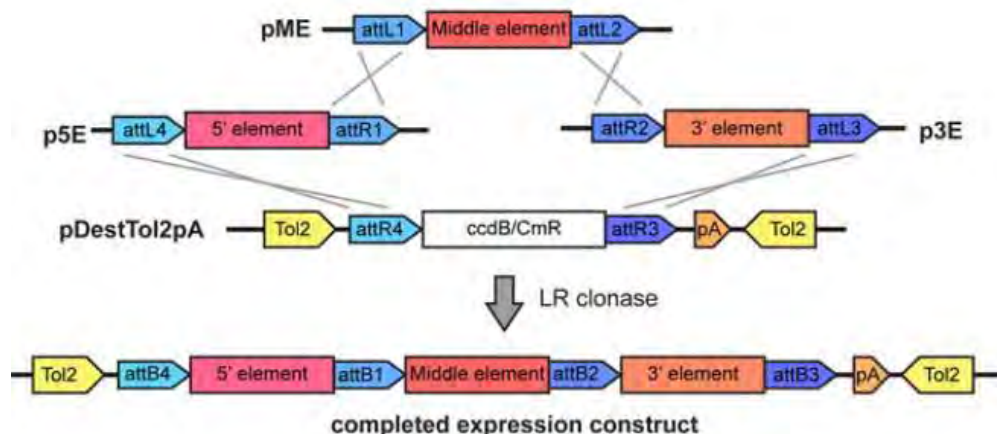
目標基因由三個片段重組而成，包括(A)5' 元素: HuC 啟動子(promoter)，長度約 3.1Kb，能讓基因專一表現於斑馬魚的神經系統中；(B)中間元素: 綠螢光蛋白(EGFP)基因，作為報導基因並用以攜帶 CAG 重複序列於其編碼區中；(C)3' 元素: polyA 序列。第一階段先將 ABC 三段序列分別先以含有 attB4/attB1r、attB1/attB2、attB2r/attB3 的引子 PCR 放大，三個 PCR 產物再分別與三個載體 pDONR P4-P1R(含 attP4/attP1r 序列)、pDONR 221(含 attP1/attP2 序列)及 pDONR P2R-P3(含 attP2r/attP3 序列)(見圖二)進行 BP 重組反應 ($attB \times attP \rightarrow attL + attR$)，得到三個 entry 質體 p5E、pME 及 p3E。第二階段將 p5E、pME 及 p3E 三個質體(含 attL 序列)與含有 Tol2 的目標載體 pDestTol2PA(含 attR4/attR3 序列)進行 LR 重組反應($attL \times attR \rightarrow attB + attP$)，最後得到將目標基因三段序列接在一起的目標質體 (圖三)。



圖二、本實驗所使用之 Gateway pDONR 質體的質體圖。

本實驗所使用之 EGFP、CAG 重複序列及已接入 HuC promoter 之 p5E 皆為中山醫大潘惠錦教授實驗室原有資產，已接入 polyA 序列之 p3E 及其他原始載體皆由台灣斑

馬魚核心設施-衛清分支提供。



圖三、LR reaction 示意圖，其中標示之 att 序列與本實驗所使用者相同。

(二)實驗步驟：

- 1.利用前端加上 attB1 的 5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3' 和後端加上 attB2 的 5'-CTTAGTGATCCTTAAG CGCC-3' 兩股 primer，與帶有 CAG 重複序列及不帶 CAG 的 EGFP 基因進行聚合酶鏈鎖反應(PCR)，將其放大。
- 2.以 PCR 產物 0.3 λ 、pDONR 221 0.7 λ 與 BP clonaseII 1 λ 進行 BP reaction，反應於 25°C 下進行 12 小時。其中，BP clonaseII 會將被 attP1 及 attP2 夾住的 ccdB 等序列剪下，並將兩端帶有 attB1 及 attB2 的 EGFP(CAG)_n 基因轉入，而 attB 和 attP 序列在剪接後則會被重組為 attL 序列。
- 3.取 BP reaction 產物 pME 3 λ 及 DH5alpha 勝任細胞 30 λ 小心混合，放置於冰上 20 分鐘，42°C 1 分鐘(heat shock)，再加入 250 λ S.O.C 放置於 37°C recover 1 小時。
- 4.將菌液以 2000rpm 離心 8 分鐘，取下層 100 λ 進行塗盤，放置於 37°C 培養。同時，利用培養基中之抗生素(Kanamycin)進行菌株篩選，而基因未重組成功的 pME 也會因 ccdB 之毒性而死亡。
- 5.培養 14~16 小時後，挑選 6 個菌株分別放入 3 ml S.O.C 中，將試管編號後於 37°C 液態培養過夜。
- 6.抽取約 2 ml 之菌液，於 12000rpm 離心 1 分鐘去除上清液後，進行質體的微量抽取(plasmid miniprep)，回溶 50 λ 。
- 7.將抽取出之質體進行酵素切割並以膠體電泳分析其序列，篩選選殖成功之菌株(圖七)，將 DNA 樣品送定序確認 CAG 重複序列的長度(圖八、圖九)。
- 8.記錄各成功樣品之 CAG 重複序列長度，並挑選適當長度者進行 LR reaction。
- 9.取 p5E 1.4 λ (26.5ng/ λ)、pME 1.7 λ (14ng/ λ) 及 p3E 2.4 λ (8ng/ λ)、destination vector 0.45 λ (230ng/ λ) 與 LR clonaseII 1 λ 進行 LR reaction，於 25°C 下反應約 24 小時。

- 10.將 LR reaction 產物 pDest 轉殖以步驟 3 之方法轉殖入 top10 勝任細胞並進行塗盤，於 37°C 培養，同時利用培養基中之抗生素(Ampicillin)及 ccdB 進行菌株篩選。
- 11.重複步驟 5~7 後，確認目標基因之序列及 CAG 重複序列長度並記錄之，將目標質體放置-20°C 保存備用。

二、顯微注射

(一)介紹：

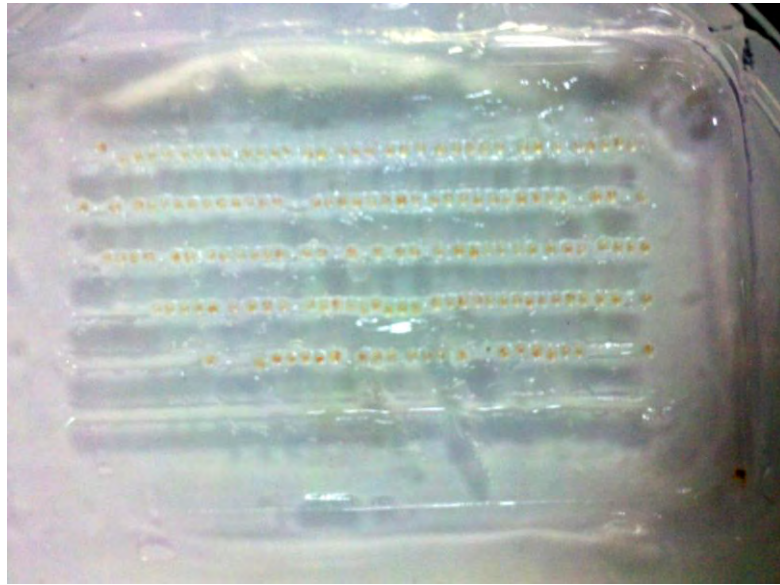
本研究所使用的目標載體在目標基因的兩側含有 Tol2 序列，在顯微注射時須同時加入經試管內轉錄產生的 transposase cRNA，使其能在斑馬魚胚胎細胞內轉譯出 transposase 蛋白，藉由重組 Tol2 序列將目標基因插入細胞 DNA 中，並利用 RNA 會自然降解的特性阻止過多的 transposase 再次將 DNA 中的目標基因轉出。

(二)實驗步驟：

- 1.實驗前一天先將公魚母魚配對置於交配缸以隔板隔開，隔天早上再開缸並待其下蛋。
- 2.以目標質體 0.56 λ 、transposase cRNA 1 λ 及 phenol red 0.46 λ 配置共 4.6 λ 顯微注射溶液，並準備顯微鏡及架針(圖四)。
- 3.收集剛受精的蛋(單一細胞時期的胚胎)，沖洗後於排蛋器上排列整齊，進行顯微注射(圖五)。
- 4.確認注射狀況，將魚卵收至培養皿中培養。
- 5.隔天檢查胚胎，淘汰不正常或死掉的胚胎。



圖四、顯微注射使用之解剖顯微鏡及顯微注射器(右側)。



圖五、顯微注射後排在排蛋器上的魚卵。

三、基因轉殖魚的培養與篩選

(一)介紹：

完成顯微注射後，為確認目標基因有成功被插入轉殖基因魚的 DNA 中，在胚胎成長至第 24 及 48 小時的時候會以螢光顯微鏡對胚胎進行篩選，留下可觀察到綠螢光表現的胚胎，淘汰無螢光表現者，而通過篩選的斑馬魚會做為親代(F0)被培養長大。在卵被產下後的五天內須每天為之換水，在五天後則改為兩天換一次水，並開始餵食草履蟲。當基因轉殖魚成長至一個月大後，換至大缸養殖，改餵食豐年蝦，成長至三個月大後即達性成熟，可交配產生子代(F1)。另外，在 F0 基因轉殖魚成長至約 2 個月大時，會以剪尾鰭抽 DNA、PCR 及酵素切檢測對其進行二度篩選，以確保所培育之斑馬魚皆有被成功轉殖入目標基因，並以測得之基因量做為未來進行交配傳代時的參考。

為了確認轉殖魚子代(F1)確實有表現轉殖基因，會再利用反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR) 和西方點墨分析(Western blotting)檢查 EGFP 基因在 RNA 和蛋白質層次的表現，並以 GFP 和 polyQ 抗體檢測 Q110 轉殖魚確實有表現出含 polyQ 的 EGFP 蛋白質。

(二)實驗步驟：

1.二度篩選

- (1)自基因轉殖魚剪下一小片尾鰭並放入試管中編號之。
- (2)加入 50mM 之 NaOH 溶液 150 λ ，於 95°C 加熱五分鐘。
- (3)在加熱後溶液中加入 pH8 之 Tris buffer 15 λ 平衡 pH 值，並將之於 4°C 以 13000rpm 離心 5 分鐘。
- (4)抽取離心後之上清液，以 EGFP(CAG)n 的 primer 對 DNA 進行 PCR。
- (5)以 PCR 產物進行膠體電泳檢測，確認 EGFP 基因的有無及其表現量。

2. 抽取、純化 RNA 及 RT-PCR

- (1) 取部分轉殖魚組織，加入 200 λ tri-reagent，並以玻棒磨碎。
- (2) 再加入 500 λ tri-reagent、0.14ml 氯仿，搖晃 15 秒。
- (3) 在室溫下靜置約 5~10 分鐘待其分層，再於 4°C、12000rpm 離心 15 分鐘。
- (4) 取上清液，加入 350 λ isopropanal，搖晃後於室溫靜置 5~10 分鐘。
- (5) 於 4°C、12000rpm 離心 15 分鐘，倒掉上清液，加入 1ml 75%酒精，再於 4°C、13000rpm 離心 5 分鐘。
- (6) Air dry 3~5 分鐘後，加入 17 λ DEPC 水回溶。
- (7) 加入 2 λ DNase buffer、1 λ RQDNase，加熱至 37°C 30 分鐘。
- (8) 加入 DEPC 水 480 λ 及 pH4.0 之 phenol-chloroform 500 λ ，vortex 1 分鐘後靜置 10 分鐘。
- (9) 於 4°C、12000rpm 離心 5 分鐘後，取其上清液，並加入其 1/10 體積的 3M NaOAc 及 2 倍體積的 100%酒精。
- (10) 搖晃溶液後，於 4°C、12000rpm 離心 20 分鐘，去除其上清液，加入 1ml 75%酒精，再於 4°C、12000rpm 離心 20 分鐘。
- (11) 去除其上清液後，air dry 3~5 分鐘，並加入 30 λ DEPC 水回溶。
- (12) 取 5 λ RNA 溶液，加入 1 λ 之 500 μ g/ml oligo(dT)及 1 λ 之 10mM dNTP mix，並加 DEPC 水至 13 λ 。
- (13) 將溶液放置於 65°C 5 分鐘，再放冰上 3 分鐘後，加入 5x First-strand buffer 4 λ 及 0.1M DTT 2 λ ，放 42°C 2 分鐘。
- (14) 再加入 Super Script II RT 1 λ ，放 42°C 50 分鐘、70°C 15 分鐘。

3. 西方墨點法檢測

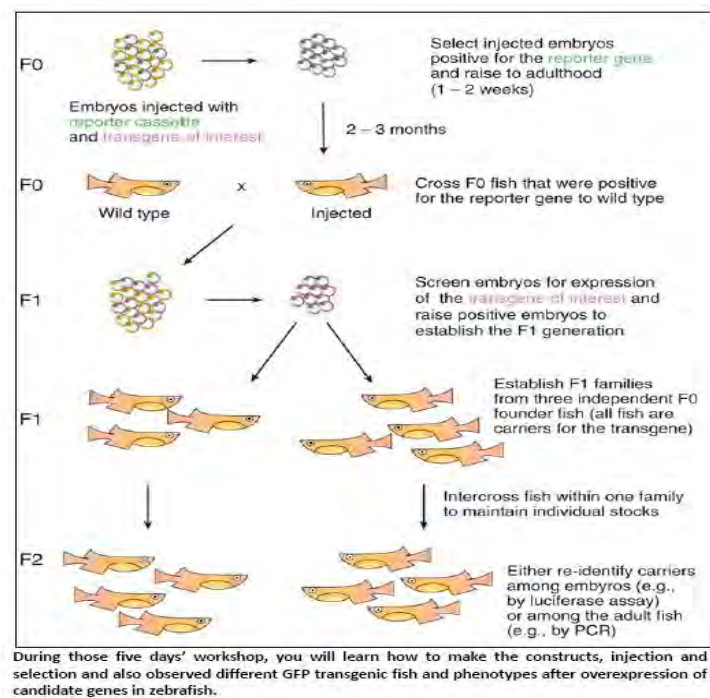
- (1) 將膠片放入電泳槽，倒入 running buffer，並將蛋白質 sample 及 marker 放入 well 中。
- (2) 接上電源，開始電泳，等待約 1.5hr。
- (3) 剪下適當大小的 PVDF 膜，浸入 100%甲醇活化，再將膠片取出，切掉多餘部分。
- (4) 將轉印器、濾棉、濾紙、PVDF 膜及膠片浸入 transfer buffer 中，並將 PVDF 膜及膠片疊在兩片濾紙中，覆上濾棉再將轉印器卡好。
- (5) 在電泳槽中倒入 transfer buffer 並放入轉印器，接上電源後放入冰桶中，等待 90 分鐘。
- (6) 取出 PVDF 膜，以 TTBS 振盪清洗 10 分鐘 3 次，再倒入含 7%脫脂奶粉之 TTBS 振盪 1 小時後，倒掉液體，以 TTBS 振盪清洗 5 分鐘 3 次。
- (7) 加入一次抗體溶液，於 4°C 振盪 16 小時。
- (8) 倒掉液體，重複步驟(6)。
- (9) 加入二次抗體溶液，於室溫下振盪 1 小時。

(10)加入 TTBS 振盪清洗 10 分鐘 3 次，再加入呈色液，並以冷光照相儀器觀察結果及記錄。

四、建立基因轉殖魚品系

(一)介紹：

在 F0 基因轉殖魚達性成熟(約 3 個月大)後，就會將之與 wildtype 斑馬魚進行交配，產下子代 F1。接著對其進行篩選，留下數隻具有 polyQ 基因表現的 F1 基因轉殖魚，做為此品系的不同 line 的開始，將之培養為成魚並進行觀察研究，待性成熟後再予以交配產生子代 F2。自子代 F2 後，皆予以自交產生後代，即完成封閉品系之建立。



圖六、基因轉殖魚品系建立過程示意圖。

五、表型觀察

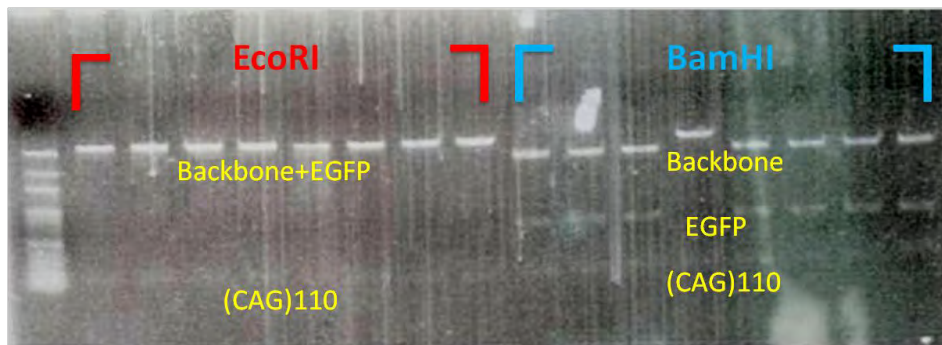
(一)介紹：

在培養 F0 基因轉殖魚的同時，也會對他們進行表現型的觀察，並將結果與無 CAG 重複序列的基因轉殖魚進行比較。表型觀察主要分為細胞組織和行為上的表現兩個部份，其中細胞組織相關的部份包含神經系統螢光表現、蛋白質聚集堆積情形及神經細胞凋亡情形等，但因為考慮到 F0 的螢光分佈並不均勻(會出現 mosaic 現象)且須留來作為傳代之用，所以將等到 F1 子代長大之後再進行觀察。而行為表現的部份，主要觀察項目為基因轉殖魚的外觀、體型及運動情形，如幼期的甩尾行為(24h)、泳動異常及觸覺反應等(48h)。

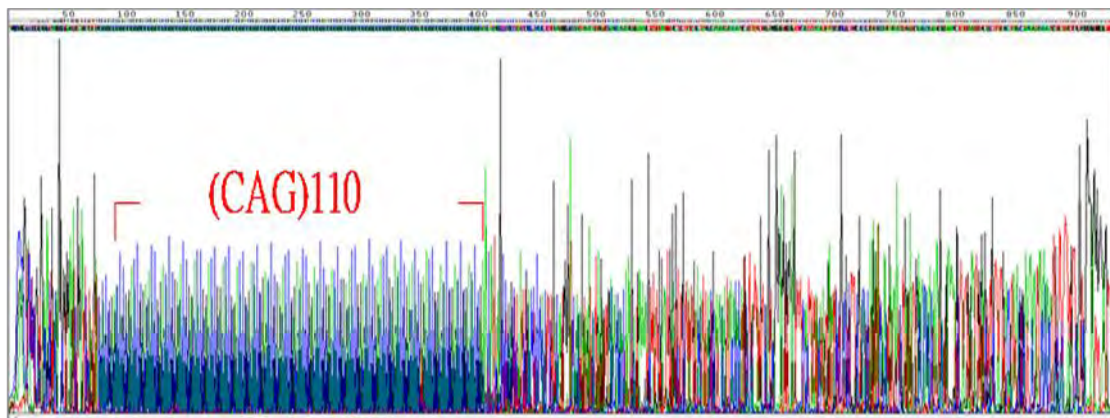
伍、研究結果

一、構築轉殖基因質體

在構築目標質體的部分，我所選用的是 HuC，一種神經專一性表達 promoter，CAG 重複序列前則接上 EGFP 綠螢光基因作為報導基因，同時也將只有 EGFP 而無 CAG 重複序列的基因作為本實驗的對照組。一開始在進行帶有 CAG 重複序列的 EGFP 的 PCR 時，有兩段 CAG 重複分別為 58 次及 183 次的 template DNA，而在 PCR 的過程中也發現了(CAG)183 的產物較容易發生複製長度不足導致重複次數下降的問題。在反應完 pME 的 BP reaction 後，我先後將成功之樣本(圖七)送定序，確認獲得了帶有 CAG 重複 43 次及 110 次的 pME，但考量到 43 次重複與正常值(約 30 次重複以下)相差不遠，可能無法產生較明顯的差異，因此決定使用含 EGFP(CAG)110 的 pME(圖八、圖九)。接著進行 LR reaction，經數次挑選、檢驗產物後，獲得最後所使用之目標質體(圖十、圖十一)。



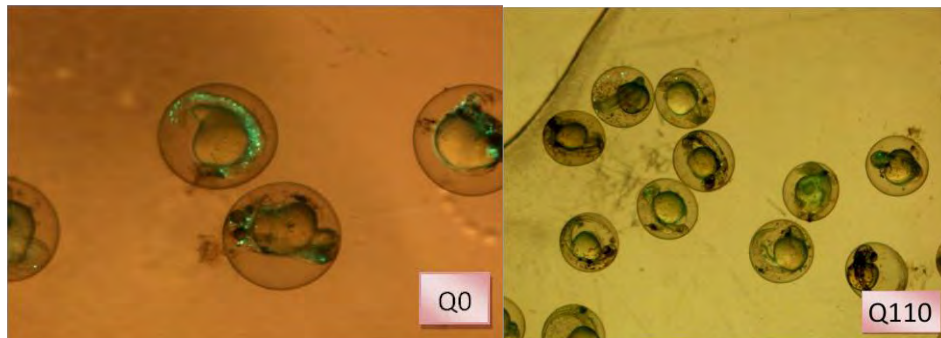
圖七、pME 質體的酵素切檢測結果。圖中第四管之 pME 質體出現錯誤，其餘皆正確。



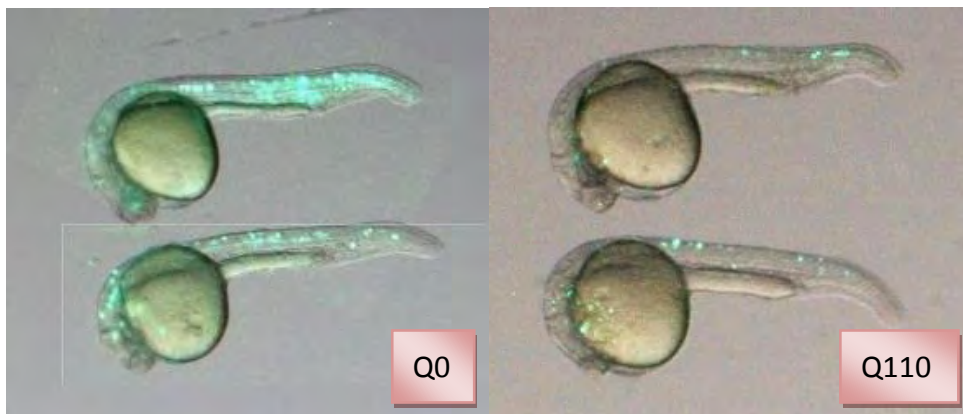
圖八、帶有(CAG)110 的 pME 的部分定序圖。

二、注射及篩選基因轉殖魚

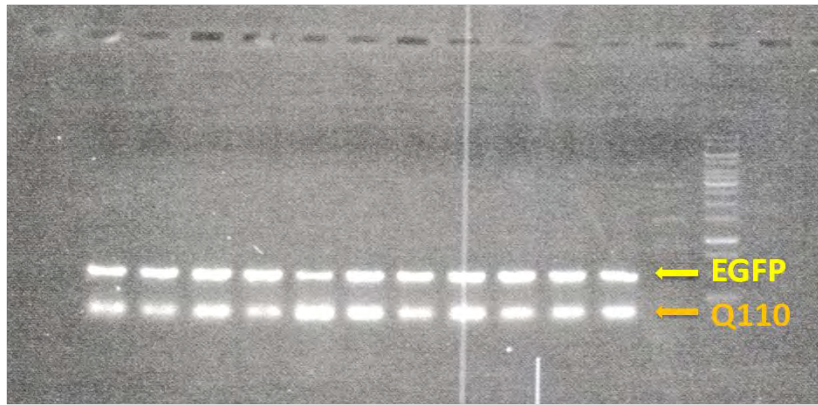
我在帶有 EGFP(CAG)110 基因的目標質體構築完成後，即挑選 wildtype 斑馬魚進行交配，取其受精卵執行顯微注射。本研究目前已注射了一批約 80 顆胚胎的 Q0 及兩批各約 70~90 顆胚胎的 Q110。待已注射目標質體之胚胎成長至 24 小時，先挑掉死亡或發育不全的胚胎，再利用螢光顯微鏡觀察其螢光表現(圖十二)，初步淘汰完全無螢光表現者。當胚胎成長至 48 小時，則進行第二次篩選，再次觀察其螢光表現(圖十三)並對無表現或螢光過弱者予以淘汰，共得到 20 隻 Q0 及 30 隻和 25 隻 Q110 的基因轉殖魚。由圖十二可見，在螢光表現上，無重複序列(Q0)基因轉殖魚的表現量都大於有重複序列(Q110)者，推測此現象應是因為過長的 CAG 重複序列會影響基因本身表現量，並加劇 mosaic 現象，抑或是蛋白質堆積所致。為確認這些 Q110 的 F0 基因轉殖魚確實帶有 EGFP(CAG)110 基因，我在他們兩個月大時，切取一小片各轉殖魚的尾鰭，抽取 DNA 後對 EGFP(CAG)n 序列進行 PCR、酵素切和膠體電泳，以觀察目標基因在細胞中的表現情形。由圖十四可見，Q110 基因轉殖魚確實都帶有 EGFP 基因及重複序列。



圖十二、基因轉殖斑馬魚胚胎 24 小時螢光視野及明視野疊合照片 (左圖為 Q0，右圖為 Q110)。



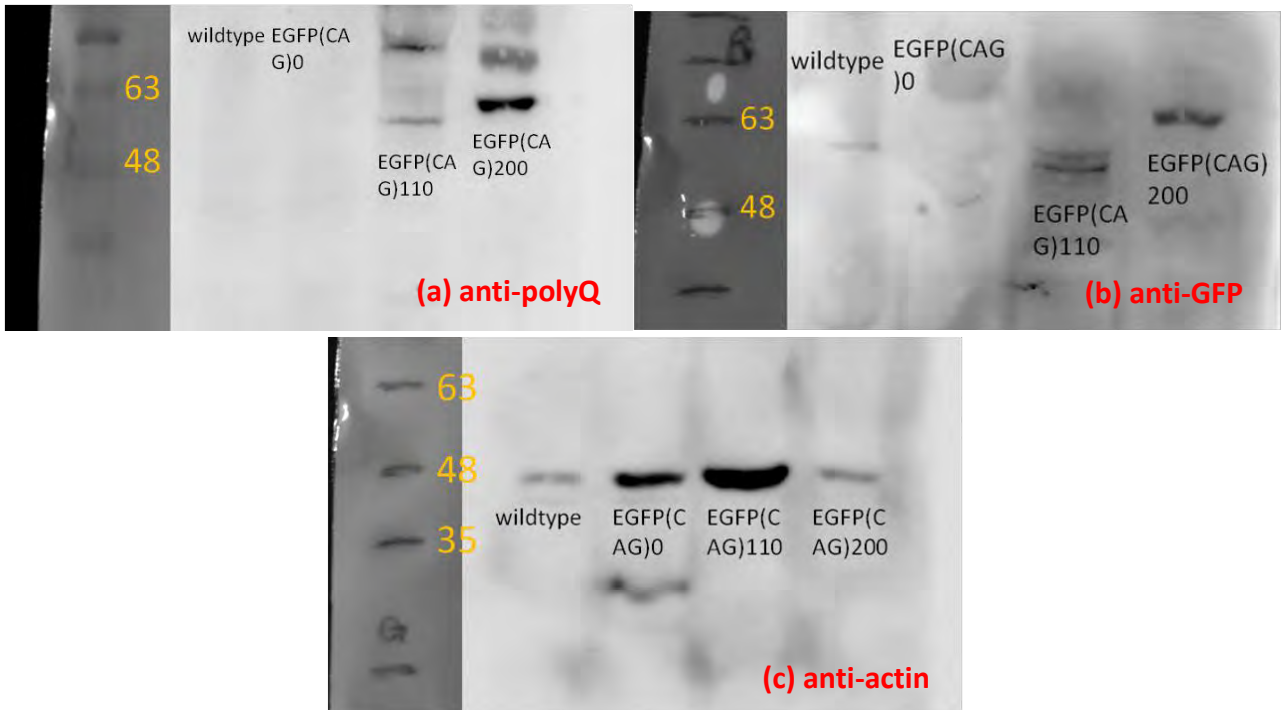
圖十三、基因轉殖斑馬魚胚胎 48 小時螢光視野及明視野疊合照片 (左圖為 Q0，右圖為 Q110)。



圖十四、Q110 F0 轉殖魚剪尾鰭抽 DNA、PCR 後以 EcoRI 酵素切之檢測結果。

三、基因轉殖魚的品系建立

通過前兩次篩選的基因轉殖魚即會做為 F0 被培養長大，並在成長過程中持續接受各種觀察及研究。由幼魚長大至成魚過程中，常會有環境因素造成魚苗死亡。目前本研究之 F0 成魚已開始與 wildtype 斑馬魚進行交配，產下許多 F1 子代，Q0 轉殖魚已挑到可傳代的 F0，但在 Q110 的子代中有綠螢光出現的胚胎數目很少。為確認這些子代確實帶有 EGFP 基因，我再以 RT-PCR 和西方點墨法分析 EGFP 基因在這些子代轉殖魚中的表現情況。目前初步結果顯示無螢光的子代仍有表現 EGFP 的 RNA 和蛋白質(圖十五)，可能是蛋白質表現量不高或形成聚集過於嚴重，造成螢光不顯著。不管原因是前述何者，這些轉殖魚仍會保留下來進一步分析。



圖十五、西方墨點法檢測 F1 基因轉殖魚蛋白質表現結果。

四、表型觀察

因為考慮到基因轉殖魚 F0 會出現螢光分佈並不均勻及 mosaic 現象，且聚集尚不明顯，可能會影響實驗結果的正確性，故在 F0 部分只針對其行為表現觀察。目前觀察的項目有：胚胎體型、24 小時期的甩尾情形、各項泳動異常及觸覺反應等。

(一) 胚胎外觀體型

依據其他實驗及疾病模式顯示，帶有擴張重複序列的斑馬魚易出現發育不良的情形，體型會比正常斑馬魚小，也可能出現身體型態異常的情況，如體軸彎曲等。但目前本研究所觀察到的 Q110 基因轉殖魚並未出現明顯外觀異常的情形，未來將持續進行關注。

(二) 胚胎時期的甩尾情形

根據過去相關疾病的斑馬魚研究發現，神經退化性疾病可能會導致神經肌肉的傳導異常，使斑馬魚在胚胎時期出現異常的甩尾情形。正常的斑馬魚胚胎在尾部成長較為成熟後會有規律性的左右甩動尾部，而異常的斑馬魚胚胎則是不規則的朝同一方向擺動尾部。不過目前這個部分在本實驗的基因轉殖魚胚胎上並沒有觀察到明顯的現象。

(二) 各項泳動異常

神經退化性疾病最明顯的特徵就是會造成患者的行動不便、肌肉失調等現象，因此在斑馬魚上應會有相對應的病徵。在觀察後，我發現帶有 polyQ 的基因轉殖魚較不帶 polyQ 者出現明顯的繞圈泳動情形。出現此病徵的基因轉殖魚會以快慢不定的方式不斷朝同方向轉彎，使泳動路徑呈繞圈狀，持續時間不一定，出現頻率也不固定。因此我在各批基因轉殖魚出生後的第三、五、七、九及十一天對其進行觀察統計，紀錄母群體中出現繞圈泳動行為的轉殖魚數量及其所占比例(表一)。由紀錄中可發現：在出生一週內，帶 polyQ 之基因轉殖魚皆有半數以上出現繞圈泳動之行為，但無 polyQ 之基因轉殖魚則無此特徵，而就比例上而言，在出生一週後，繞圈泳動的情形就會大量減少。

| | Day3 | Day5 | Day7 | Day9 | Day11 |
|--------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Q110-1 | 13/20(0.65) | 11/19(0.58) | 9/16(0.56) | 5/14(0.36) | 2/13(0.15) |
| Q110-2 | 22/30(0.73) | 20/28(0.71) | 15/24(0.63) | 8/22(0.36) | 5/20(0.25) |
| Q0 | 0/25(0.00) | 0/23(0.00) | 0/20(0.00) | 0/18(0.00) | 0/17(0.00) |

表一、各批基因轉殖魚繞圈泳動情形的觀察結果。表中記錄方式為：有繞圈泳動情形數量/母群體數量(出現繞圈泳動行為之比例)。

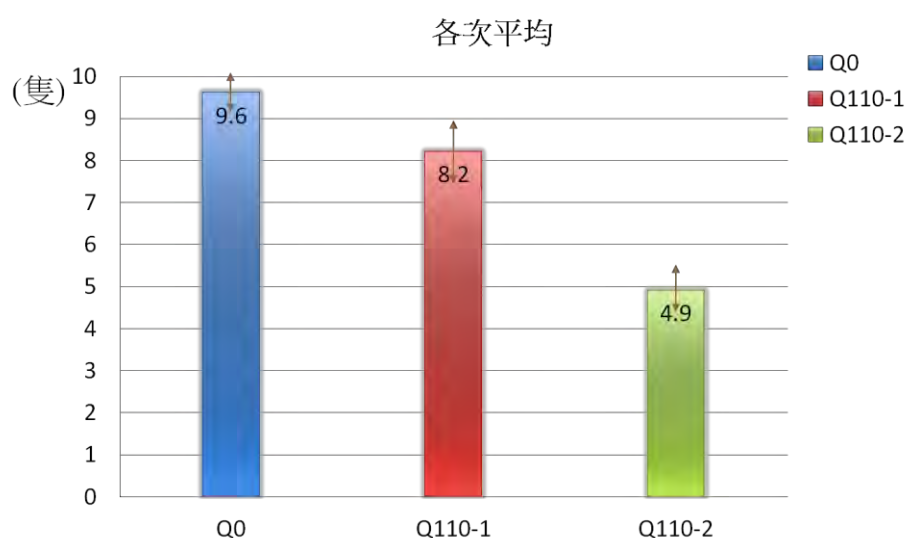
(三) 觸覺反應

另外一個有無 polyQ 的明顯差異就是斑馬魚的觸覺反應。wildtype 斑馬魚當被細小物體觸碰時會瞬間加速離開，直至遠離異物、達到安全範圍為止，此現象被稱為觸覺反應(touch response)。為比較有無 polyQ 的基因轉殖魚之間的觸覺反應差異，我先觀察

了 wildtype 斑馬魚的觸覺反應情形，再依據斑馬魚被碰觸後的反應、游開速度、游開距離等，將之分為有明顯觸覺反應及觸覺反應不明顯兩類。我分別對三批基因轉殖魚進行了 10 次的觀察紀錄，每次都自母群體中隨機抽出十隻轉殖魚，並測試其觸覺反應的靈敏度(表二、圖十六)。由結果可見，兩批帶有 polyQ 的基因轉殖魚都有觸覺反應變遲鈍的趨勢，而無 polyQ 基因轉殖魚雖有些許反應遲鈍的情形，但整體而言此趨勢並不明顯。在帶有 polyQ 的基因轉殖魚的部分，雖然有觸覺反應變遲鈍的趨勢，但有明顯觸覺反應者還是佔有至少約一半以上，可能是因為 polyQ disease 為晚發型疾病，故症狀會較晚出現所致。

| | No.1 | No.2 | No.3 | No.4 | No.5 | No.6 | No.7 | No.8 | No.9 | No.10 |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Q0 | 10 | 10 | 9 | 10 | 9 | 10 | 10 | 9 | 9 | 10 |
| Q110-1 | 9 | 9 | 8 | 9 | 9 | 8 | 8 | 7 | 8 | 7 |
| Q110-2 | 5 | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 |

表二、各批基因轉殖魚的觸覺反應隨機抽樣測試結果。表中標示的數量為有明顯觸覺反應的基因轉殖魚數量。



圖十六、各批基因轉殖魚的觸覺反應隨機抽樣測試結果平均值及標準差。圖中標示的數量為有明顯觸覺反應的基因轉殖魚數量。

陸、討論

由於斑馬魚擁許多利於研究觀察的特性，因此本實驗選擇將其作為模式動物，以建構一個 CAG 重複序列疾病模式，並觀察斑馬魚的各項病徵，藉以進一步研究其致病機轉，以期能提供相關領域一個研究或藥物篩選的平台。

目前僅針對已觀察到的基因轉殖魚行為異常情形進行討論：

一、胚胎時期的甩尾情形

本實驗到目前為止並沒有觀察到明顯的胚胎甩尾情形，推斷是由於 F0 基因轉殖魚的轉殖基因出現 mosaic 的情形，造成表現影響較不明顯。

二、繞圈泳動行為

在繞圈泳動的部分，帶有 polyQ 序列的斑馬魚在出生一週內有超過半數會出現繞圈泳動的情形，一週後數量則開始迅速下降。推測是因為一週後神經及肌肉組織已成長較為健全，所以 polyQ 的影響就被抵銷了。另外，我也針對各組數據間的關係做了 T 檢測(表三)，由表中可知 Q0 轉殖魚和兩批 Q110 轉殖魚間比較的結果皆呈顯著差異(P 值<0.01)。

| 統計 | P 值 |
|-----------------------|---------|
| t-test (Q0 VS Q110-1) | 0.00357 |
| t-test (Q0 VS Q110-2) | 0.00265 |

表三、有、無重複序列基因轉殖魚繞圈泳動情形的數據間的 Student's t-test 結果。

三、觸覺反應遲緩

相較於正常的斑馬魚，帶病的基因轉殖魚會有觸覺反應較遲緩的現象，但還是有半數以上的帶病斑馬魚能表現正常的觸覺反應。推測這有可能同為 mosaic 現象或轉殖基因表現量不足所造成，因此將在 F1 再次進行測試，比較其差異，同時也不排除是另有影響因素。另外，我也針對各組數據間的關係做了 T 檢測(表四)，由表中可知 Q0 轉殖魚和兩批 Q110 轉殖魚間比較的結果皆呈顯著差異(P 值<0.01)。

| 統計 | P 值 |
|-----------------------|-----------------------|
| t-test (Q0 VS Q110-1) | 0.000264 |
| t-test (Q0 VS Q110-2) | 1.94×10^{-9} |

表四、有、無重複序列基因轉殖魚的觸覺反應隨機抽樣測試數據間的 Student's t-test 結果。

柒、結論

本實驗目前已成功製備出帶有 Q0 及 Q110 的 F0 基因轉殖斑馬魚，並初步觀察到 Q110 斑馬魚泳動行為的異常，包括繞圈泳動及觸覺反應遲緩等。雖目前觀察到的病徵尚並不明顯，但我未來將持續進行轉殖魚的繁殖作業，產生子代 F1，以獲得更明確可靠的數據及觀察對象，也將繼續進行相關之研究。

除了基礎研究之外，由於斑馬魚是一脊椎動物，此動物模式亦可用於進行藥物篩選，提供一個高效率且較可信的縮小可能有效藥物範圍的方式。另外，此基因轉殖魚品系未來也可提供研究社群做為一個品質穩定的實驗動物來源。

捌、參考資料

陳倫魁 (2007)。神經細胞專一性表達 CAG 三聯核酸重複序列基因轉殖鼠的表型分析。中山醫學大學生醫所碩士論文。

梁善居 (2003)。人類疾病之動物模式。後基因體時代之生物技術 (黃木秋編輯)，第九章。醫藥基因生物技術教學資源中心。

張志玲 (2007)。新的斑馬魚研究模式。科學發展：411 期，79 頁。

Catherine J. McLeod, Louise V. O' Keefe and Robert I. Richards (2005). The pathogenic agent in *Drosophila* models of 'polyglutamine' diseases. *Human Molecular Genetics*, 14: 1041 - 1048。

Hsu R-J, Hsiao K-M, Lin M-J, Li C-Y, Wang L-C, Chen L-K, and Pan H (2011). Long tract of untranslated CAG repeats is deleterious in transgenic mice. *PloS ONE*. 6 (1): e16417.

John M. Warrick, Henry L. Paulson, Gladys L. Gray-Board, et al. (1998). Expanded Polyglutamine Protein Forms Nuclear Inclusions and Causes Neural Degeneration in *Drosophila*. *Cell*, 93: 939-949。

J. Lawrence Marsh, Heli Walker, Heidi Theisen, et al. (2000). Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically cytotoxic and cause neurodegeneration in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics*, 9: 13 - 25。

Sager JJ, Bai Q, Burton EA (2010). Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Brain structure & function*, 214 : 285-302 .

Wang L.-C., Chen K.-Y., Pan H., Wu C.-C., Chen P.-H., Liao Y.-T., Li C., Huang M.-L., and Hsiao K.-M. (2011). Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:1255-1267.

【評語】 040718

以 polyQ(CAG 110 次重覆)核酸序列在斑馬魚神經元表現，以專一性的 HuC 啓動子表達成功，並且造成斑馬魚運動反應受損，在脊椎動物可具神經疾病之動物模式。後續研究應加入 polyQ 蛋白質之作用對象蛋白質，以闡明神經退化性疾病如 Alzheimer、Huntington、Parkinson 等之模式，有機會進一步研究，會具重要創新性。