

# 臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學

作品名稱：小鼠骨骼肌細胞分化過程中 SMN 基因 mRNA  
剪接型之變化

學校 / 作者：臺北市立建國高級中學 劉易青

## 作者簡介



我是劉易青，目前就讀於台北市立建國高級中學二年級。國中時，開始對生命科學領域很感興趣，上高中後，有幸能參加中研院的生物培育計畫，因而透過管道接觸了實驗室的研究環境，開始這次的專題研究。經過將近一年的努力，希望在此次國際科展中展現自己投注許多心血的成果。

# 前言

## 一、研究動機

脊髓性肌肉萎縮症(spinal muscular atrophy, SMA)為常見之體染色體隱性遺傳疾病，在台灣罹病率約為萬分之一，罹病患者會造成幼兒期致死或因肌肉萎縮而導致殘障。大多數患者致病成因為SMN基因突變，使得脊髓前角運動神經元凋亡退化，導致上下肢肌肉發生漸進性萎縮，較嚴重者可能造成呼吸道肌肉萎縮，在幼年即因呼吸衰竭而死亡，輕者則可能四肢肌肉萎縮，無法站立、行走而必須使用輪椅。此種疾病目前尚無具體的治療方式，僅能以復健改善患者的症狀。

脊髓性肌肉萎縮症的致病基因為SMN基因(Survival Motor Neuron gene, SMN)。其全長產物為FL-SMN蛋白(Full Length SMN)，FL-SMN蛋白參與在細胞核小核糖體(small nuclear ribonucleoproteins)的生合成(biogenesis)，以及神經細胞內mRNA的運輸，其缺失可能使神經細胞功能喪失，最後導致運動神經元退化，但詳細的分子生理機轉仍有待研究。人類有兩個SMN基因(SMN1和SMN2)，除了第7外顯子內的第6個核苷酸有差異外，兩者的核苷酸序列幾乎相同。前人的研究已指出，在人類神經細胞中，SMN2基因在RNA選擇性剪接時會產生第7外顯子缺失之蛋白，該蛋白量少且不穩定，無法發揮正常功能。另外，最近的研究亦發現將第3內含子保留的一種SMN蛋白，該蛋白主要集中於軸突(axon)，並可能有促進軸突生長的功能，因此被命名為a-SMN(axonal-SMN)。

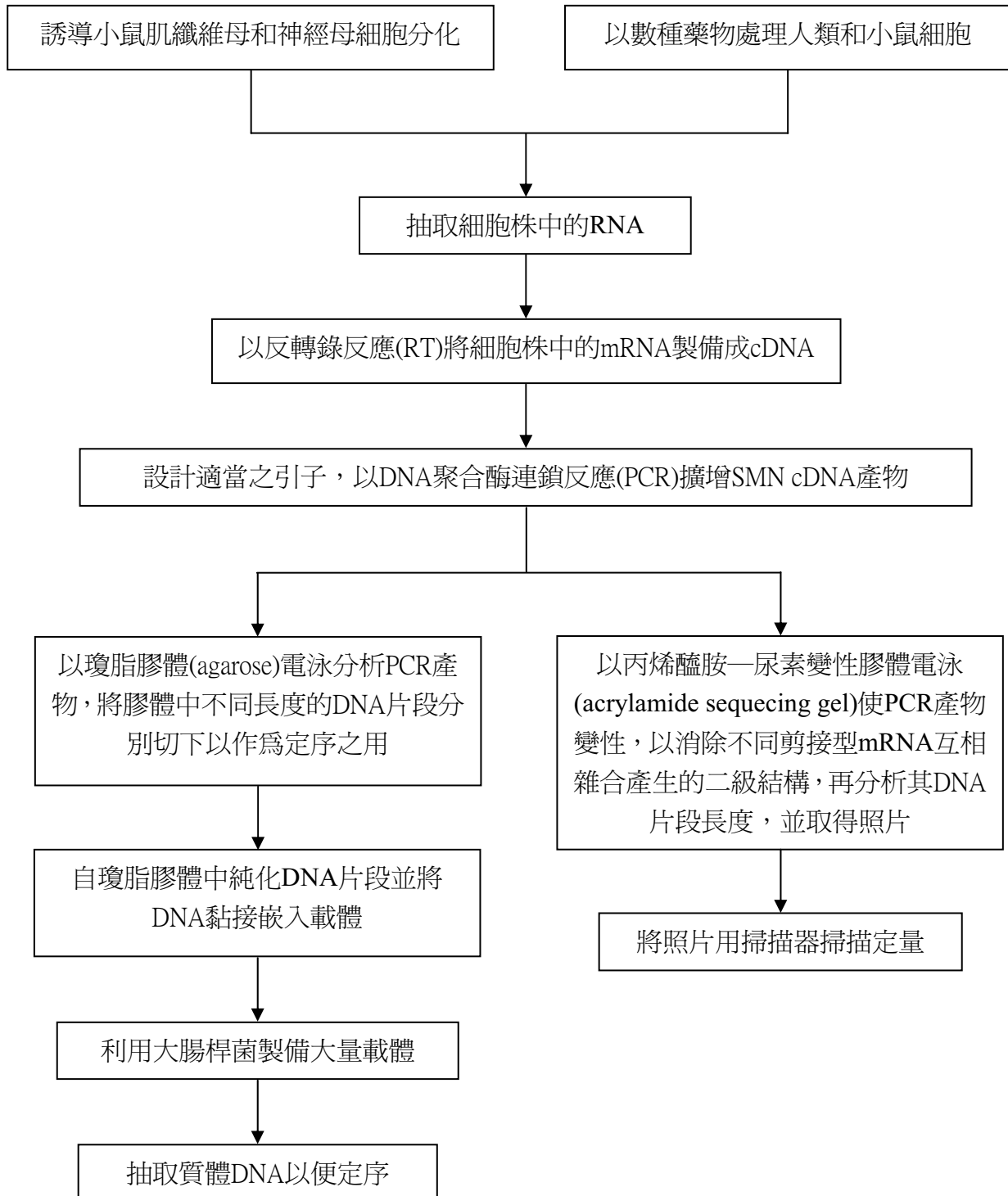
最近又有別的研究指出，在SMN基因缺損的果蠅中，其肌纖維(myofibers)無法正常生合成，因此SMN蛋白對於肌肉細胞之發育或功能也有重要之影響。在此研究中，我們希望探討在小鼠肌母細胞分化成骨骼肌時SMN基因表達與其mRNA剪接的變化，同時也比較SMN基因在神經細胞中之表達調控。希望藉此研究的結果讓我們能對SMN基因在哺乳類動物之神經和肌肉細胞中所扮演的角色，以及脊髓性肌肉萎縮症的發生成因及致病機轉有更多的瞭解。

## 二、研究目的

1. 觀察在小鼠的肌纖維母細胞、神經母細胞和成纖維細胞中 SMN 的剪接形式。
2. 用小鼠肌纖維母細胞為材料，觀察在其細胞分化的過程中，各種 SMN mRNA 的表達是否隨分化而有所變化。
3. 觀察以數種藥物處理過後對人類和小鼠細胞之 SMN mRNA 表達的影響。

## 貳、研究過程與方法

### 一、實驗流程



## 二、實驗方法

### 1. 誘導肌纖維母細胞株分化 (Induction of myoblast differentiation)

(1) 將小鼠肌纖維母細胞株自生長培養基中移至分化培養基中。

\*生長培養基成分：DMEM、2%牛胚胎血清

\*分化培養基成分：DMEM、10%馬血清，並加入 40  $\mu\text{g/ml}$  胰島素。

(2) 放入 37°C 培養箱使其分化。

### 2. 抽取細胞株 RNA (Total RNA preparation)

(1) 將細胞培養基倒除，加入 1 ml PBS 清洗細胞。

(2) 移除 PBS，加入 1 ml 含 phenol 的溶液 Trizol 使細胞懸浮，吸取懸浮液移至微離心管中，於室溫下靜置 5 分鐘。

(3) 加入 200  $\mu\text{l}$  Chloroform，用力搖晃微離心管 15 秒將細胞打破，於室溫下靜置 3 分鐘後，以 12,000 g 轉速於 4°C 下離心 15 分鐘。

(4) 吸取 450  $\mu\text{l}$  上層透明液體移至新的微離心管，加入 500  $\mu\text{l}$  isopropyl alcohol，均勻混合後於室溫下靜置 10 分鐘。

(5) 以 12,000 g 轉速於 4°C 下離心 10 分鐘，移除上清液。

(6) 加入 1 ml 75%酒精，使其均勻混合，以 7,500 g 轉速於 4°C 下離心 5 分鐘，移除酒精。

(7) 加入 30  $\mu\text{l}$  (視 RNA 沉澱量大小調整)二次蒸餾水(ddH<sub>2</sub>O)，以 65°C 水浴加熱 10 分鐘，使 RNA 溶解於水中。

(8) 將抽取完成的 RNA 儲存於-70°C。

### 3. 反轉錄反應 (Reverse Transcription, RT)

(1) 以分光光度儀精確獲得 RNA 樣本之濃度。

(2) 將各管 RNA 樣本以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋至 0.56  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

(3) 吸取 4.45  $\mu\text{l}$  RNA (2.5  $\mu\text{g}$ )移至新的微離心管，加入 0.5  $\mu\text{l}$  (0.25  $\mu\text{g}$ ) Oligo (dT)<sub>12-18</sub> primer 均勻混合後，置於 65°C 水浴槽水浴加熱 10 分鐘，將 oligo d(T)引子黏合到模版 RNA 上。

(4) 將微離心管從水浴槽取出並立刻放在冰上，隨後加入其他反應材料，使已和 oligo d(T)引子結合的 mRNA 在 10  $\mu\text{l}$  的反應混合液中進行反轉錄反應，混合液中含 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM dNTP, 5 mM DTT, 2.5  $\mu\text{g}$  of RNA, 0.25  $\mu\text{g}$  of oligo dT primer, 50 U of Superscript™ III Reverse Transcriptase 和 12 U of RNase inhibitor。反應液混合均勻後，將微離心管靜置於 42°C 水浴槽進行反轉錄反應 1 小時。

(5) 將 cDNA 儲存於-20°C

### 4. DNA 聚合酶連鎖反應 (DNA Polymerase Chain Reaction, PCR)

(1) 在 PCR 用的 200  $\mu\text{l}$  微離心管中將 cDNA 與 PCR 反應材料均勻混合成 25  $\mu\text{l}$  的反應混合液，混合液中含 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.01% (w/v) gelatin, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % Triton X-100, 25  $\mu\text{g}$  of BSA, 0.2 mM mouse SMN Ex3-Fw/Ex4-Rv primer 和 0.5  $\mu\text{l}$  cDNA。

(2) mouse SMN Ex3-Forward primer : 5'- TGCTGTTTGGTCAGAAGACG -3'  
mouse SMN Ex4-Reverse primer : 3'- TGGTGGAGGAAGAAATGAGG -5'

(3) PCR 設定如下：

步驟一：94°C，2分鐘；1次循環。步驟二：94°C，10秒；54°C，20秒；72°C，30秒；35次循環。步驟三：72°C，2分鐘；1次循環。

(4) 將 PCR 產物儲存於-20°C。

#### 5. 聚丙烯醯胺—尿素膠體電泳 (Denaturing Gel Electrophoresis)

PCR 產物中可能包含 SMN Exon 3-Exon 4 和 SMN Exon 3-Intron 3-Exon 4 兩段序列，此二序列有大部分相同的片段，我們認為其序列相同部份可能互相雜合而產生一具有二級結構的雙股片段，無法由膠體電泳分析長度亦無法定序。因此我們用含 7M urea 之 6% polyacrylamide gel 作為電泳膠體，使 DNA 樣本皆在變性的狀態下進行電泳，以避免出現該具有二級結構的 DNA 片段。

(1) 電泳緩衝液為 0.5X TBE buffer，buffer 成分含 20 mM Tris-Acetate 和 0.5 mM EDTA。

(2) 將 PCR 完成的 DNA 樣本混合等體積的 Formamide loading dye(含 0.4% BPB, 0.5 M EDTA)，以 92°C 加熱 5 分鐘後立刻移至冰上，使其變性而去除不同剪接型 mRNA 互相雜合形成的具二級結構的 DNA 雙股片段。

(3) 將 DNA 樣本置入膠體，以 300 伏特電壓執行電泳約 30 分鐘。

(4) 將膠體浸入 Ethidium Bromide 染劑中染色 5 分鐘後取出。

(5) 將膠體浸入清水中退染 10 分鐘後取出。

(6) 在紫外光下拍攝照片。

#### 6. 電泳照片掃描定量 (Photo Scanning & Quantitating)

以 Photoshop 和 ImageJ 軟體進行照片掃描和定量。

#### 7. 瓊脂膠體電泳 (Agarose Electrophoresis)

(1) 電泳膠片為含 TAE buffer 之 2%瓊脂膠體，所用之緩衝液為 0.5X TAE buffer，buffer 成分含 45 mM Tris-borate 和 1 mM EDTA。因預期產物長度皆小於 1 kbp，因此使用 2%之瓊脂膠體分析 PCR 產物。

(2) 將 DNA 樣品混合五分之一體積的 5X DNA loading dye 置入膠體，以 100 伏特電壓通電執行電泳約 30 分鐘。

(3) 將膠體浸入 EtBr 染劑中染色 5 分鐘後取出。

(4) 將膠體浸入清水中退染 10 分鐘後取出。

(5) 在紫外光下拍攝照片。

#### 8. 瓊脂膠體中 DNA 片段的純化 (Gel Extraction)

我們利用 DNA Clean/Extraction Kit (GeneMark™)所提供之試劑進行瓊脂膠體DNA片段純化。

(1) 在暗房中的紫外光下觀察欲取得 DNA 片段的所在位置，用刀片將其切下。

(2) 將含欲純化 DNA 片段的膠體置入微離心管，加入 450  $\mu$ l Binding Solution，以 60°C 水浴加熱 10 分鐘。

- (3) 將 Kit 中的 spin column 置於收集管上，將膠體溶液移至 spin column 中，以 14,000 g 轉速離心 1 分鐘，將下層濾液丟棄。
  - (4) 再加入 500  $\mu$ l 的 Binding Solution，以 14,000 g 轉速離心 1 分鐘，將下層濾液丟棄。
  - (5) 加入 700  $\mu$ l 的 Washing Solution，以 14,000 g 轉速離心 1 分鐘。並重複此步驟一次。
  - (6) 將下層濾液丟棄，以 14,000 g 轉速離心 5 分鐘。
  - (7) 將 spin column 移至微離心管上，加入 50  $\mu$ l Elution Solution，靜置 2 分鐘後，以 14,000 g 轉速離心 1 分鐘。
  - (8) 將微離心管中純化完成的 DNA 儲存於-20°C。
9. 以黏接反應將 DNA 片段嵌入載體 (Plasmid construction)
- (1) 於微離心管中將 DNA 片段與其他反應材料均勻混合成 10  $\mu$ l 的反應混合液，混合液中含 5 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ATP, 1 mM DTT, 400 U of T4 DNA Ligase, 50 ng of pGEM-T vector 和 7  $\mu$ l 的 DNA 片段。
  - (2) 均勻混合後，放入 16°C 冰箱進行黏接反應過夜至隔日。
10. 大腸桿菌之轉形作用 (E. coli Transformation)
- (1) 將 10  $\mu$ l 質體 DNA 加入 200 $\mu$ l 大腸桿菌細胞液中，使其均勻分布。
  - (2) 將細胞混合液置於冰上 30 分鐘。
  - (3) 42°C 水浴加熱 50 秒，使質體進入大腸桿菌細胞。
  - (4) 加入 1 ml LB 培養液(含 1% bacto-tryptone, 0.5 % bacto-yeast extract 和 1% NaCl)，於 37°C 培養箱中靜置 1 小時。
  - (5) 將細胞混合液以 3,000 rpm 離心 1 分鐘，移除多餘的上清液至留下約 200  $\mu$ l，再以微量吸管使沉澱的細胞懸浮。
  - (6) 將細胞混合液均勻塗至含 1% bacto-tryptone, 0.5 % bacto-yeast extract, 1% NaCl, 2% agar 和 0.01% ampicillin 之 LB 培養基上，放置於 37°C 培養箱中生長過夜至隔日。
11. 質體 DNA 的抽取 (Plasmid DNA purification)
- 我們利用 Miniprep Plasmid Purification Kit (GeneMark™) 所提供之試劑進行質體 DNA 抽取。
- (1) 從培養基上的菌落點菌做 screening PCR (方法同上「四、」)，篩選出選殖成功之菌落。
  - (2) 將選殖成功之菌落移至培養液中，使其於 37°C 培養箱生長隔夜。
  - (3) 將 1 ml 細胞液移入微離心管中，以 14,000 g 轉速離心 1 分鐘，移除上清液，留下底部沉澱之細胞。並重複此步驟兩次。
  - (4) 加入 200  $\mu$ l Solution I，使細胞在 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNase A, pH 8.0 之溶液環境中懸浮。
  - (5) 加入 200  $\mu$ l Solution II，翻轉微離心管 5 次使其均勻混合。
  - (6) 加入 200  $\mu$ l Solution III，翻轉微離心管 5 次使其均勻混合。

- (7) 將溶液以 14,000 g 轉速離心 5 分鐘。
- (8) 將 spin column 置於收集管上，將上清液移至 column 中，以 14,000 g 轉速離心 1 分鐘。將底層濾液丟棄。
- (9) 加入 600  $\mu$ l Washing solution，以 14,000 g 轉速離心 1 分鐘，將底層濾液丟棄。並重複此步驟 1 次。
- (10) 以 14,000 g 轉速離心 10 分鐘，將 spin column 移至新的微離心管，加入 50  $\mu$ l Elution Solution 以洗滌 DNA，靜置 2 分鐘。
- (11) 以 14,000 g 轉速離心 1 分鐘，將微離心管中純化的質體 DNA 儲存於-20°C。

## 12. 送交 DNA 定序

將質體 DNA 以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋至 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l 並加入 sp6 引子，裝入 0.2 ml 微離心管送交 DNA 自動定序儀定序。



## 參、研究結果與討論

### 一、SMN 基因在小鼠不同細胞株中的剪接形式之比較

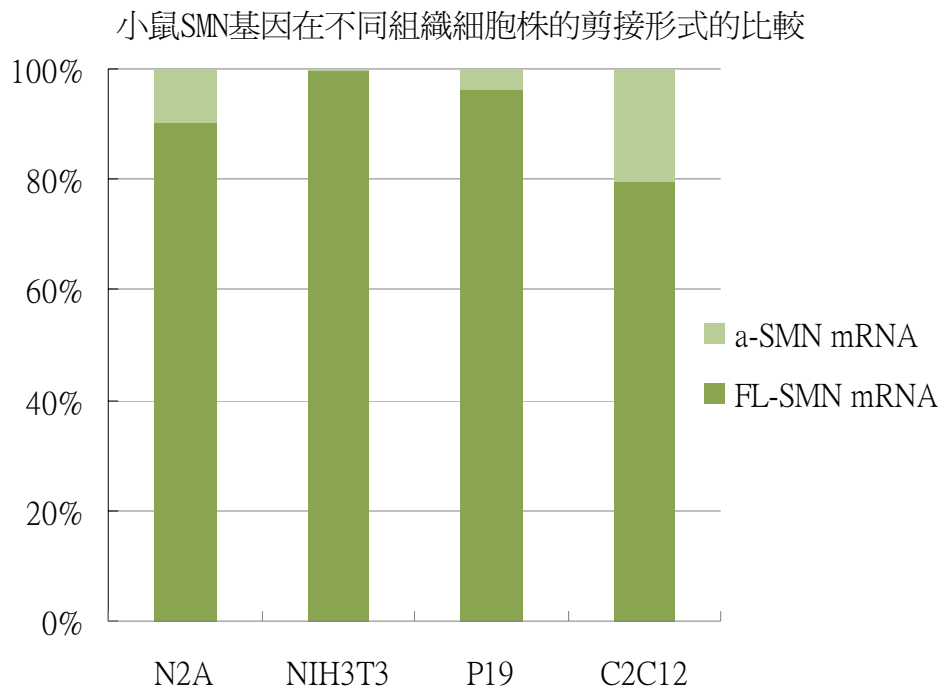
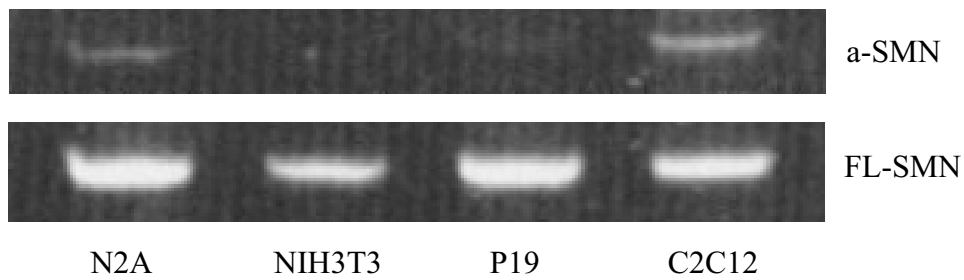
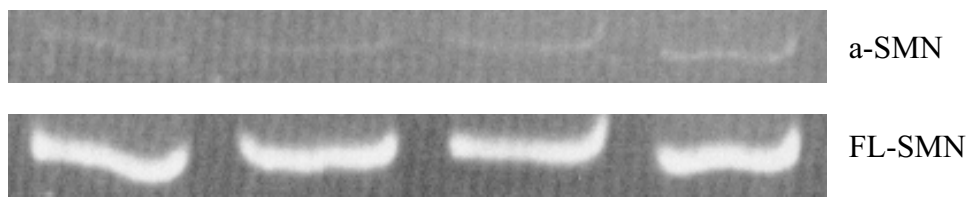


圖 1. 利用 RT-PCR 分析小鼠肌纖維母細胞(C2C12)、神經母細胞(P19, N2A)和成纖維細胞(NIH3T3)之 SMN 剪接型式。

我們利用適當的引子進行 PCR 反應以偵測全長(FL-SMN)及包含 intron 3 之 SMN(a-SMN)的量，並且比較兩種產物之相對量。我們在神經細胞母株 N2A 和肌纖維細胞株發現 a-SMN 有少量之表達。

上圖顯示 RT-PCR 之產物在變性聚丙烯醯胺膠片中的分析結果。下圖顯示量化後之數據。

## 二、小鼠肌纖維母細胞分化過程中 SMN mRNA 表達量的變化



SMN基因表達量在小鼠肌纖維細胞C2C12分化過程中的變化

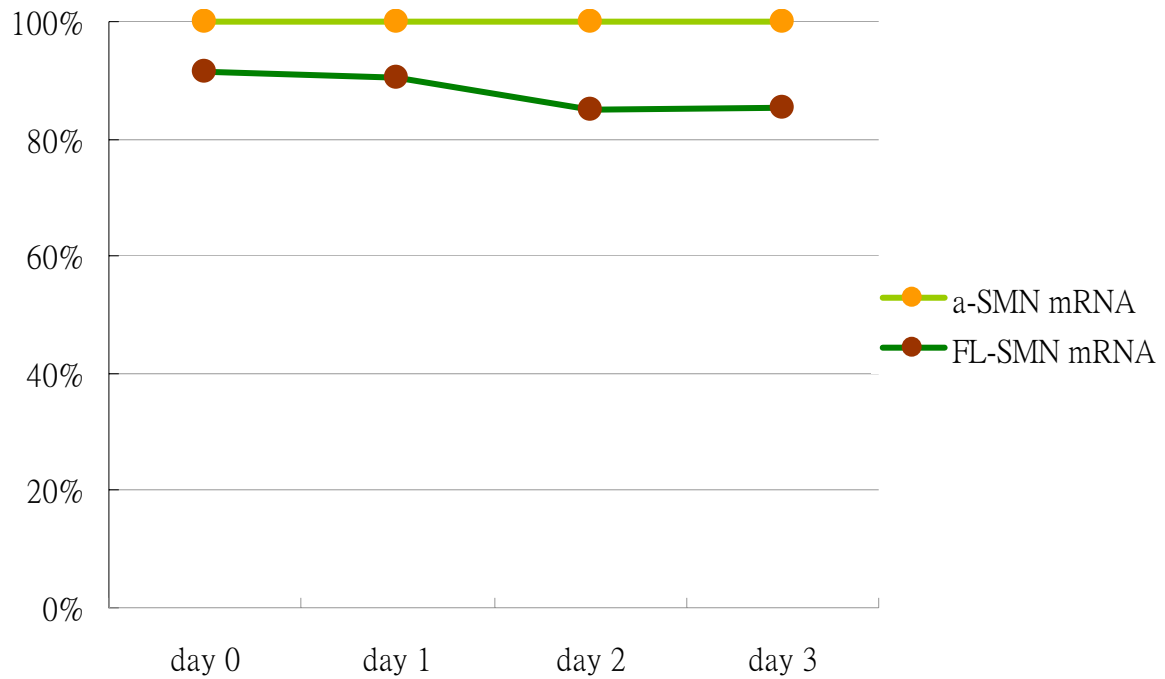
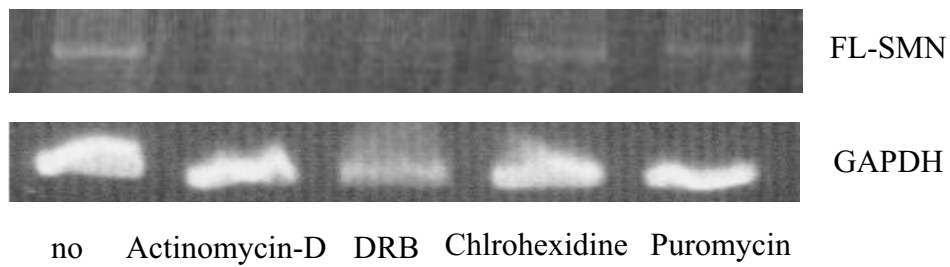


圖 2. 利用 RT-PCR 分析 SMN 基因在小鼠肌纖維母細胞分化一至三天時的變化情形。

我們亦利用 RT-PCR 偵測 SMN 基因的表達變化，我們發現在小鼠肌母細胞分化過程中，a-SMN 會隨分化之天數有逐漸增加之情形，而全長 SMN 減少但幅度較小。

上圖顯示 RT-PCR 之產物在變性聚丙烯醯胺膠片中的分析結果，下圖顯示量化後之數據。

三、藥物處理對小鼠神經母細胞之 SMN mRNA 表達量的影響。



藥物處理對小鼠N2A細胞之SMN mRNA表達量的影響

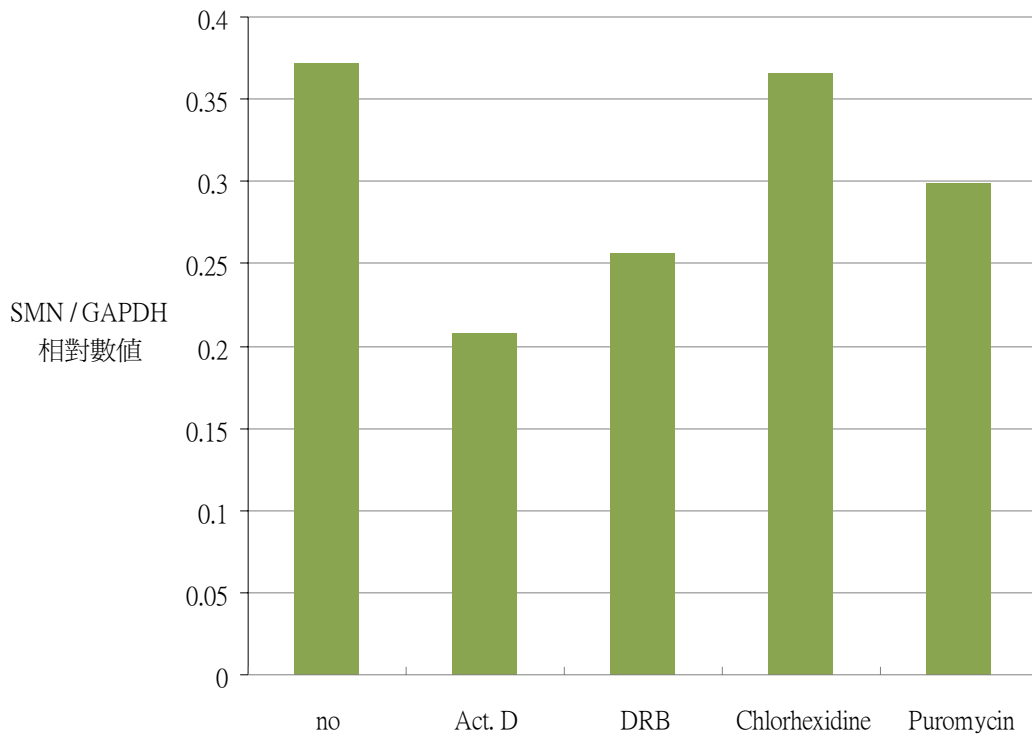


圖 3.利用 RT-PCR 分析藥物處理小鼠 N2A 神經母細胞後對 SMN 基因 mRNA 表達的影響

我們以 Arsenite, Act.D, DRB, Chlorhexidine, Puromycin 等藥物處理小鼠的 N2A 神經母細胞，再以 RT-PCR 偵測 SMN 表達量的變化。我們發現經數種藥物處理後 N2A 細胞的 SMN 皆會降低。

上圖顯示 RT-PCR 之產物在變性聚丙烯醯胺膠片中的分析結果，下圖顯示量化後之數據。

## 肆、討論

### 一、小鼠不同細胞中 SMN 剪接形式的比較

1. 在小鼠的神經母細胞和肌母細胞中皆可發現 a-SMN 剪接型的 mRNA，顯示 a-SMN 不只存在於神經細胞中，在肌肉細胞中也會表達。因此除了促進神經細胞的軸突表現之外，a-SMN 可能在肌肉細胞發育過程中扮演特定的功能。
2. 在多次實驗中，小鼠神經細胞表達的 SMN 總量和 FL-SMN 之量均高於肌母細胞和成纖維細胞，可能是因 SMN 蛋白在神經細胞中負責特定的生理功能(如參與 mRNA 的運輸)所致，顯示全長 SMN 蛋白對神經細胞之重要性。

### 二、小鼠肌母細胞分化過程中 SMN mRNA 表達之變化

1. 小鼠肌母細胞分化過程中，a-mRNA 表達量隨分化逐漸增加，顯示 a-SMN 應和肌細胞的發育有關。此發現可能和他人果蠅研究中發現 SMN 蛋白在肌細胞的重要性有類似的結果。
2. 分化過程中 a-SMN 剪接型 mRNA 的表達逐漸增加，其功能尚需後續研究探討。

## 伍、結論

- 一、SMN 基因包含 Intron 3 剪接型(a-SMN)的 mRNA 不只存在於神經細胞中，在肌肉細胞中也會表現。
- 二、小鼠神經細胞中 FL-SMN 的表達量相對高於肌肉細胞和成纖維細胞，顯示全長 SMN 蛋白對於神經細胞之功能十分重要。
- 三、小鼠肌纖維母細胞分化過程中，全長剪接型(FL-SMN)的 mRNA 表達量隨分化而逐漸小幅減少，a-SMN 剪接型的 mRNA 則小幅增加。
- 四、小鼠神經母細胞經 Actinomycin-D 和 DRB(轉錄及磷酸酶抑制劑)處理後，SMN i 表達量會明顯下降，顯示小鼠神經母細胞中的 SMN 產量對於轉錄抑制劑 iActinomycin-D 和 DRB 較敏感。

## 陸、參考文獻

### 一、中文文獻

1. 楊志超 臺大醫院神經部 脊髓肌肉萎縮症  
[med.mc.ntu.edu.tw/~neuro/4\\_educate\\_68.htm](http://med.mc.ntu.edu.tw/~neuro/4_educate_68.htm)
2. 蔡力凱 臺大醫院神經部 脊髓肌肉萎縮症之基因層面  
[med.mc.ntu.edu.tw/~neuro/4\\_educate\\_117.htm](http://med.mc.ntu.edu.tw/~neuro/4_educate_117.htm)
3. 黃建豪 脊髓性肌肉萎縮症簡介  
<http://www.genephile.com.tw/articles/SMA%20Introduction.htm>

## 二、英文文獻

1. Veronica Setola, Mineko Terao, Denise Locatelli, Stefania Bassanini, Enrico Garattini, and Giorgio Battaglia. (2007) Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 1959-1964.
2. T.K. Rajendra, Graydon B. Gonsalvez, Michael P. Walker, Karl B. Shpargel, Helen K. Salz, and A. Gregory Matera. (2007) A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J Cell Biol.* **176**, 831-841.
3. Pearn, J. (1978) Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J. Med. Genet.*, **15**, 409-413.
4. Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M. *et al.* (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, **80**, 155-165.
5. Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J. and Wirth, B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 6307-6311.

## 評語

本研究構思不錯，但

- 1) 海報所呈現之內容不足。
- 2) 作者尤應注意一些”基本”的問題。
- 3) 所有縮寫應在內文中(首次出現時)註明。