

2019 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050010

參展科別 動物學

作品名稱 熱休克蛋白 Hspb7 基因表現調控之探討

得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

臺北市立中正高級中學

指導教師 顏裕庭、孫譽真

作者姓名 倪若瑜、高駿平

關鍵詞 肌肉發育、MEF2A、HSPB7

作者簡介



我是倪若瑜，目前就讀臺北市立第一女子高級中學三年級。

生物一直以來都是我最喜歡的科目，動手做實驗又是最讓我樂在其中的。非數理資優班的我，因為參加了中研院的培育計畫，才有幸能在高中進入實驗室。很感謝實驗室的教授跟學長姐們一直以來的教導和幫助，雖然路上充滿各種挑戰和挫折，但也讓我獲益匪淺！



我是高駿平，目前就讀於台北市中正高中。

很高興在高中就有機會踏入實驗室從事科研，在實驗中雖然時常有波折，但是動手做實驗的熱忱一直是我持續前進的動力，使我能夠克服實驗上遭遇的困難。期許未來的自己能夠不要忘記這份初衷，在生命科學領域中持續學習。

摘要

小分子熱休克蛋白 B7 (HSPB7, Heat shock protein B7), 又稱心血管熱休克蛋白 (cvHsp)。HSPB7 表現於心肌細胞當中也表現在骨骼肌當中。我們可以從再生的肌肉細胞中看到熱休克蛋白 B7 大量的表現, 可見其對於損傷的肌肉細胞至關重要。此外, *Mef2a* (Myocyte-specific enhancer factor 2A) 被發現對於 *Hspb7* 基因表現有所影響且、屬於 AP-1 (Activated Protein 1) 家族的 *c-Jun* (Jun proto-oncogene) 和 *Fra-2* (Fos-related antigen 2) 被發現影響了肌肉發育和參與了骨骼肌衛星細胞群的調控。

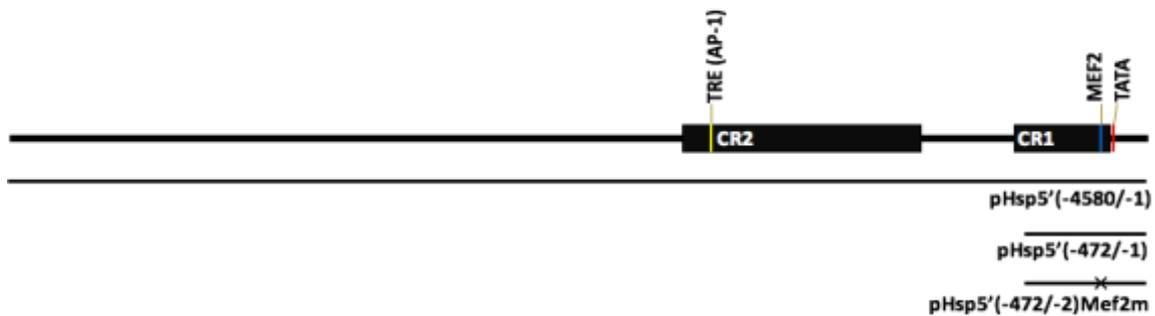
本實驗在 HEK-293T 細胞當中將克隆出的 *Mef2a*、*c-Jun*、*Fra-2* 與 *Hspb7* 上游不同長度且帶有螢火蟲螢光素基因之啟動子進行轉染實驗, 並藉由螢光素酶檢測法觀察彼此調控關係。本研究發現, *c-Jun*、*Fra-2* 對於 *Hspb7* 基因表現有抑制的成效而 *Mef2a* 有增加基因表現的成效。

Abstract

Heat shock protein B7 (HSPB7) belongs to the small heat shock family. This protein is expressed predominantly in striated muscles (skeletal muscles and cardiac muscles) and in muscles which suffer atrophy. The deficiency of *Hspb7* in adult mice heart causes heart arrhythmia and will lead mice to death. There may be different mechanisms between the striated muscle and cardiac muscles to regulate the performance of HSPB7. It has been known that the transcription factor MEF2A (Myocyte-specific enhancer factor 2A), *c-Jun* (Jun proto-oncogene), and *Fra-2* (Fos-related antigen 2) play vital roles in the regulation of *Hspb7* expression and the differentiation of myoblasts. Previous studies have indicated that the -472bp promoter at the upstream of *Hspb7* coding sequence has the ability to drive *Hspb7* expression in mouse muscle tissues. The aim of this study is to investigate how MEF2A, *c-Jun* and *Fra-2* regulate the expression of *Hspb7*. In this study, we cloned *Mef2a*, *c-Jun* and *Fra-2* cDNA to expression vectors and overexpressed these clones with different length of *Hspb7* promoter in HEK-293T cells. Then, we used Luciferase Assay and β -Galactosidase Enzyme Assay to examine the expression of *Hspb7* promoter under the control of these transcription factors. We also confirmed the expression of these clones by Western blot. Our results indicated that, in HEK-293T cells, *Mef2a* upregulated the expression of *Hspb7*, but *c-Jun* and *Fra-2* inhibited the *Mef2a*-induced *Hspb7* expression.

壹、研究動機

小分子熱休克蛋白 B7 (HSPB7)，又稱心血管熱休克蛋白 (cvHsp)。其基因表現始於胚胎心臟發育時期，在骨骼肌中也扮演著重要的角色。*HspB7* 基因剔除的小鼠在出生前 (胚胎 E10.5) 死亡 (Juo,2016)，若成鼠心肌缺乏 HSPB7 將導致心律不整 (Liao,2017)，而肌肉缺乏 HSPB7 會因橫隔膜發育缺陷導致呼吸困難 (Juo,2016)，因此我們可以知道 *Hspb7* 對於動物是不可或缺的基因且對於肌肉細胞至關重要。我們也可以從萎縮的肌肉細胞中看到熱休克蛋白 B7 大量的表現顯示了 *Hspb7* 對於肌肉病變有相關當大的關係 (Tobin,2016)。我們因此認為 *Hspb7* 在維持生理功能和預防病理學中隱藏著更複雜且至關重要的作用。從先前研究中已知肌細胞增強因子 2 (MEF2) 是骨骼肌和心肌重要的轉錄因子家族，而其中的 MEF2A 更被發現影響了 *Hspb7* 的基因表現。(陳錦德,2012) 在得知 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子足以誘發 HSPB7 表現時，我們對於其上游不同長度之啟動子如何調控 HSPB7 表現感到好奇，因此在實驗中使用不同的 *Hspb7* 啟動子進行實驗觀察其基因調控關係 (圖一)。



圖一、本實驗所使用之三種不同的 *Hspb7* 啟動子

此外，屬於 AP-1 (Activated Protein 1) 家族的 c-Jun (Jun proto-oncogene) 被發現影響了肌肉發育 (Bengal,1992)，AP-1 家族中的 Fra-2 (Fos-related antigen 2) 更被發現參與了骨骼肌衛星細胞群的調控。(Alli,2013) 雖然 MEF2 和 AP-1 已被發現參與 HSPB7 表現的調控，但是並未有討論其中 MEF2A、c-Jun、Fra-2 三者相互對於 HSPB7 更深入的調控關係，因此我們也對於三種轉錄因子其對於 HSPB7 表現的調控關係感到好奇。

貳、研究目的

- 一、探討 MEF2A 是否能夠促使 *Hspb7* 表現
- 二、探討 c-Jun、Fra-2 是否會降低 *Hspb7* 表現
- 三、探討 MEF2A、c-Jun 和 Fra-2 對於熱休克蛋白 *Hspb7* 基因表現之影響
- 四、探討 *Hspb7* 上游不同長度之啟動子對於 *Hspb7* 基因表現之影響

參、研究設備及器材

一、藥品試劑及細胞

HEK-293T (Human Embryonic Kidney cells 293T) 細胞株、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、FBS (Fetal bovine serum, 胎牛血清)、PBS (Phosphate buffered saline)、二次去離子水 (ddH₂O)、冰塊、Agarose、TAE (Tris-Acetate-EDTA) 緩衝液、5× Phusing HF buffer、2.5mM dNTPs、Phusion DNA Polymerase、引子 (primer)、loading dye、*E. coli* DH5α competent cell、Solution1 (RNaseA 100 μg/ml, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)、Solution 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS)、Solution 3 (5 M KAc, pH 4.8)、異丙醇 (isopropanol)、溴化乙錠 (EtBr)、載體 (vector)、乙酸鈉 (sodium acetate)、乙醇 (ethanol)、限制酶 (*EcoRI*、*XhoI*)、10× enzyme buffer (cut smart)、10× ligation Buffer、T4 DNA 連接酶、LB (Luria-Bertani medium) 培養基、Ampicillin、1× trypsin、Turbofect、1× lysis reagent、Luciferase Assay reagent、β-Galactosidase Assay 2× Buffer、碳酸鈉、Transfer Buffer (2.9 g glycine (39 mM), 5.8 g Tris base (48mM), 4 g SDS (0.4 %), 200 ml Methanol (20 %))、TBS-T (1M Tris PH8.0、5M NaCl、0.01 % Tween-20)、10%APS、SuperSignal West Femto Luminol/Enhancer Solution、SuperSignal West Femto Stable Peroxide Solution、抗體。

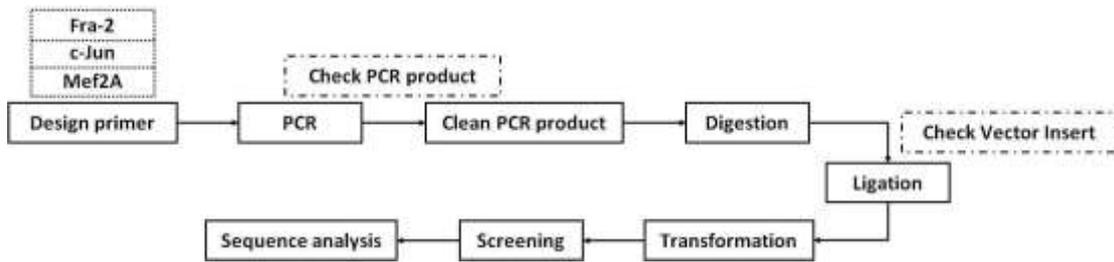
二、器材

移液吸管、鑄膠模、電泳槽、凝膠分析系統、PCR 管、核酸增值儀、微量離心管、試管震盪器、乾浴器、10cm 培養皿、冰盒、牙籤、玻璃滾珠、迴轉式震盪器、超微量分光光度計、細胞培養箱、離心管、10cm 培養皿、24well 培養皿、96well 培養皿、連續波長式微量盤分光光譜儀、連續波長式微量盤冷光光譜儀、無菌操作台、恆溫水浴槽、電動吸管 (pipette aid)、微量吸管分注器 (Pipette)、離心機、冷凍微量離心機、微量離心機、電子秤、秤紙、量筒、顯微鏡、電源供應器、垂直電泳槽、乾式離心管加熱器、海綿、Polyvinylidene Fluoride (PVDF)、冰劑、轉漬槽、離心管、冷光螢光影像處理系統。

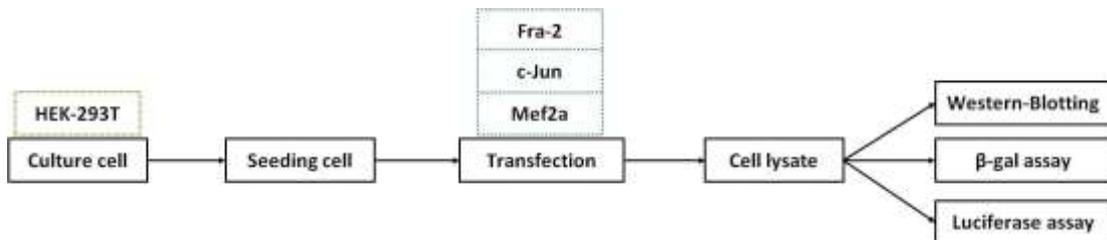
肆、研究過程或方法

一、研究過程

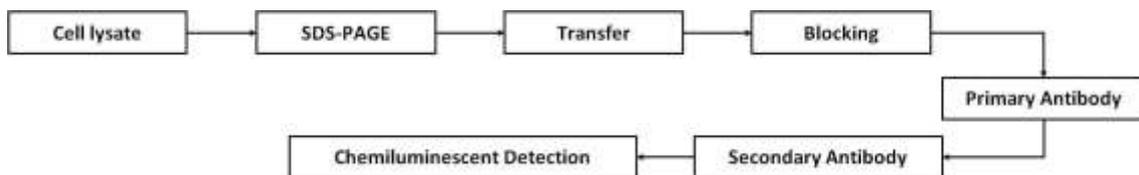
(一) clone DNA



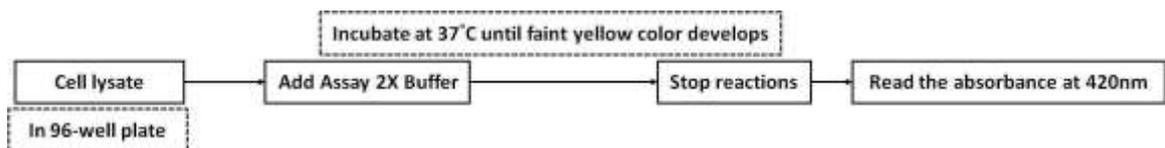
(二) 探討 MEF2A、c-Jun 和 Fra-2 對於熱休克蛋白 *Hspb7* 基因表現之影響



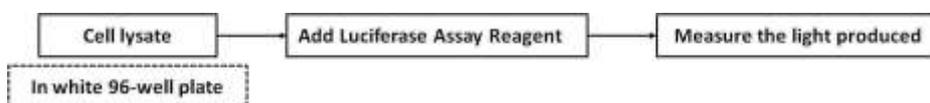
(三) 以西方墨點法探討蛋白質表現



(四) 以半乳糖苷酶檢測法觀察轉譯成效



(五) 以螢光報導基因觀察表現強度



二、研究方法

(一) 凝膠電泳

1. 製膠(0.8% Agarose Gel)

秤取 0.8g agarose 加入 100ml 1× TAE 緩衝液中。用微波爐加熱使其完全溶解後補水至原重。再將混合液倒至鑄膠模中，並插上齒梳。等膠體完全凝固後拔掉齒梳，即完成製膠。

2. 電泳

將製好的膠放置電泳槽中，並加入 1× TAE 緩衝液蓋過凝膠。將 DNA 與 Loading dye 混和後加至凝膠的 well 中。以 150V 進行電泳約 15 分鐘。

3. 分析

將跑完的凝膠放至 EtBr 染劑中浸泡約 5 分鐘。再將凝膠放凝膠分析系統中，以紫外線照光，並拍照紀錄。

(二) 克隆(clone)引子

1. 設計引子(primer)

在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)基因資料庫中找出我們所需要克隆的基因。以包含轉錄起始點(ATG) 以後 20 個核苷酸序列之互補股和終止密碼子 (Stop codon) 以前 20 個核苷酸序列之互補股並加上限制酶切位分別作為 5'和 3'端的引子。最後，將序列送至生技公司製造所設計的引子。

2. 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction , PCR)

將 ddH₂O 29.5μL 加入 PCR 管中，並加 10μL 5× Phusing HF buffer、4μL 2.5mM dNTPs、0.5μL Phusing DNA Polymerase、2.5μL Forward primer (10μM)、2.5μL Reverse primer (10μM)、1μL Template DNA(10 ng/λ)，總體積 50μL。接著放入核酸增值儀進行反應。首先加熱至 94°C 1 分鐘。接下來重複 94°C 10 秒、55°C 10 秒、72°C 1 分鐘 40 個循環，最後維持 72°C 5 分鐘。反應完成後取 3μL PCR 產物與 loading dye 混和後加到 0.8%凝膠的 well 中。以 150V 電泳約 15 分鐘。再將凝膠放入 EtBr 染劑中浸泡約 5 分鐘。再將凝膠放至凝膠分析系統中，以紫外線照光，並拍照紀錄。

3. clean PCR 產物

取 PCR 產物至微量離心管中，並加入 1 倍體積的異丙醇及 1/10 倍體積的 3M 乙酸鈉。利用試管震盪器將其均勻混和後，在 4°C 下以 13000rpm 離心 15 分鐘。離心後將上清液倒掉，並加入 2 倍體積的 70%乙醇，在 4°C 下以 13000rpm 離心 5 分鐘。離心後將上清液倒掉，放至乾浴器中以 57°C 讓微量離心管中殘留水分蒸發，最後加 40μL ddH₂O 回溶。

4. 限制酶切割(restriction enzymes digestion)

將 2.5μL ddH₂O 加入微量離心管中，並加入 5.5μL vector (311ng/μL)、1μL 10×Buffer (cut smart)、0.5μL Enzyme *EcoRI*、0.5μL Enzyme *XhoI*，總體積共 10μL。再將 3μL ddH₂O 加入另一微量離心管中，並加入 5μL PCR 產物、1μL

10×Buffer (cut smart)、0.5μL Enzyme *EcoRI*、0.5μL Enzyme *XhoI*，總體積共 10μL。把 2 個加好試劑的微量離心管放到 37°C 恆溫箱中 1.5 小時以進行反應。結束後從 2 個微量離心管各取 1μL 及 vector 0.5μL，三者分別與 loading dye 混合後加到 0.8%凝膠的 well 中，並以 150V 電泳約 15 分鐘。再將凝膠放入 EtBr 染劑中浸泡約 5 分鐘。最後將凝膠放至凝膠分析系統中，以紫外線照光，並拍照紀錄。

5.接合反應 (ligation)

取經過限制酶切割後的載體 1μL、經過限制酶切割後的 PCR 產物 3μL、10× ligation Buffer 0.5μL、T4 DNA ligase 0.5μL，總體積 50μL 至微量離心管中，並置於室溫至翌日。

6.大腸桿菌轉型作用 (Transformation)

將製備好加有 Ampicillin 的 LB 培養基 (Ampicillin : LB=10ng : 100ml) 放到 37°C 恆溫箱中回溫。取 5μL *E. coli* DH5α competent cell 加上 1.5μL ligation 的混合物。均勻混合後將溶液置於冰上 5 分鐘。接著加入 100μL LB，最後將混合好的溶液均勻地塗到 LB 培養基上，並把培養基放在 37°C 恆溫箱中至翌日。

7.篩選 (Clone Screening)

從 LB 培養基中選菌落，用牙籤尖端輕碰後，把牙籤放進裝有 200μL LB 及 30ng Ampicillin 的微量離心管中攪拌，讓菌落掉進微量離心管中。將微量離心管以 150rpm 震盪培養在 37°C 至翌日。將微量離心管從迴轉式震盪器取下後，加入 100μL Solution 1 (RNaseA 100 μg/ml, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)，利用試管震盪混合器將其均勻混合。再加入 100μL Solution 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS)，並上下翻轉微量離心管讓其均勻混合。再加入 100μL Solution 3 (5 M KAc, pH 4.8)，並上下倒置微量離心管數次使其均勻混合後，以 12000rpm 離心 10 分鐘。離心後取上清液 300μL 到新的微量離心管，並加入 1 倍體積的異丙醇。均勻混合後，以 12000rpm 離心 5 分鐘。將上清液倒掉後，加入 1 倍體積的 70% 乙醇，以 12000rpm 離心 5 分鐘。離心後將上清液倒掉，並放至乾浴器中以 57°C 將微量離心管中剩餘水分蒸發。最後加 30μL ddH₂O 回溶。取回溶後的 DNA 加 3μL 到 0.8% 的凝膠中。以 150V 電泳約 15 分鐘。再將凝膠放入 EtBr 染劑中浸泡約 5 分鐘。再將凝膠放至凝膠分析系統中，以紫外線照光，並拍照紀錄。挑選其中數管可能正確 DNA 取 8μL 並加入 1μL 10×Buffer (cut smart)、Enzyme *EcoRI* 及 *XhoI* 各 0.2μL、0.6μL ddH₂O，總體積共 10μL。放 37°C 恆溫箱

反應 30 分鐘後，取 3 μ L 加到 0.8%的凝膠中。以 150V 電泳約 15 分鐘。再將凝膠放入 EtBr 染劑中浸泡約 5 分鐘。再將凝膠放至凝膠分析系統中，以紫外線照光，並拍照紀錄。挑出大小與相同的樣品。

8.定序

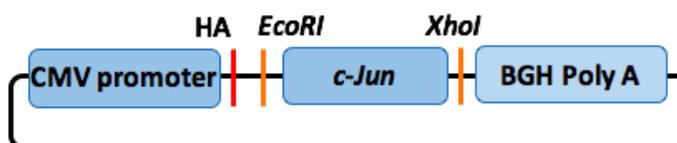
利用超微量分光光度計測 DNA 濃度，取 500~750ng DNA 加入 primer(1.6 μ M) 2 μ L 並補水至 12 μ L 後送定序，以確定克隆出的 DNA 是否正確。

Clones	pcDNA3.0-FlagB-Mef2a	pcDNA3.0-HA-C-Jun	pcDNA3.0-MycB-Fra-2
Primers	GCAG-GAATTC-ATGGGGCGAAAGAAGATACA CATG-CTCGAG-TTAGGTCACCCATGTGTCCA	GCTG-GAATTC-ATGACTGCAAAGATGGAAA CATG-CTCGAG-TCAAAATGTTGCAACTGCT	GCTG-GAATTC-ATGACTGCAAAGATGGAAA CATG-CTCGAG-TTACAGGGCTAGAAAGTGTGG
Template	Mouse E17.5 cDNA library	Mouse E17.5 cDNA library	Mouse E17.5 cDNA library
Enzyme	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>
Vector	pcDNA3.0-FlagB	pcDNA3.0-HA	pcDNA3.0-MycB
Number	NM_001033713.2	NM_010591.2	NM_008037.4

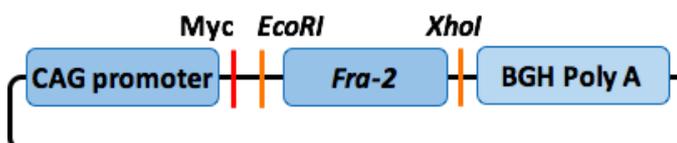
表一、實驗中所克隆之 DNA，以及相對應所使用之引子、模板、限制酶、載體、編號。為使在載體中插入的基因編碼區核苷酸序列能轉譯出正確蛋白質序列，故選用不同的載體



圖一、Mef2a 載體設計示意圖



圖二、c-Jun 載體設計示意圖



圖三、Fra-2 載體設計示意圖

(三)細胞培養

1.培養

所使用的人類胚胎腎臟細胞 HEK-293T 用含有 10%FBS 的 DMEM 10ml 培養於

10cm 的培養皿，並置於 5% 二氧化碳、飽和濕度 37°C 的細胞培養箱到翌日。

2.分盤

將培養皿中的培養液吸乾並加入 10 ml 的 PBS 沖洗。吸乾 PBS 後加入 1 ml 的 1× trypsin 並放入細胞培養箱靜置 5 分鐘。接著加入 10ml 含有 10%FBS 的 DMEM 停止 trypsin 反應，並將培養皿中所有溶液移至離心管中。以 1000rpm 離心 5 分鐘後，將離心管中的上清液移除。最後加入含有 10%FBS 的 DMEM 12ml，將其均勻混合後，在 24well 的培養皿中每 well 加入 0.5ml 細胞與培養液的混和液，並放回細胞培養箱(5% CO₂,37°C)，以準備進行細胞轉染實驗。

(四)轉染作用(Transfection)

將 100μL DMEM 加入離心管中，並依比例加入 Turbofect (Turbofect : DNA = 1.5Ml : 1μg)。並將其利用震盪器均勻混合後放置於室溫 5 分鐘。接著加入 100μL DMEM 至另一為量心管中，並將各 DNA(表二)依量加入，並將其與 DMEM 均勻混合。接著將兩管溶液合，並將其利用震盪器均勻混合後放置於室溫 15 分鐘。接著將混和液加至養有 HEK-293T 細胞的 24well 培養皿中，每 well 中分別加入 50μL 的混和液。最後放置於 5% 二氧化碳、飽和濕度 37°C 的細胞培養箱到翌日。

promoter	pCMV-βgal
	pGL3-basic
	pHsp5'(-472/-1)luc
	pHsp5'(-4580/-1)luc
	pHsp5'(-472/-2)luc-Mef2m
Transcription factor	pcDNA3.0-Flag-Mef2a
	pcDNA3.0-HA-C-Jun
	pcDNA3.0-MycB-Fra-2
	pcDNA3.1

表二、轉染作用中使用的 DNA。

(五)細胞裂解 (cell lysate)

進行完 Transfection 後 24 小時，將培養皿中每個 well 的細胞培養液吸乾。並在每 well 中加入 1× lysis reagent 100 μL。放置於迴轉式震盪器上震盪 15 分鐘，且每 5 分鐘拿起來搖晃一下。震盪後將培養皿各 well 中的溶液移至微量離心管中。在 4°C 下以 10000rpm 離心 5 分鐘後，取上清液到新的微量離心管中。

(六)β-半乳糖苷酶檢測法 (β-Galactosidase Enzyme Assay)

- 1.將細胞裂解液加 20μL 至 96well 培養皿，並加入 30μL 1× lysis buffer 作為背景值。
- 2.每 well 加 50μL β-Galactosidase Assay 2× Buffer，並將培養皿放置 37°C 恆溫箱進行反應。
- 3.當 96well 培養皿內容液呈現黃色時，將培養皿從恆溫箱取出，並在每 well 加入 100μL 的 1M 碳酸鈉水溶液使其停止反應。
- 4.將 96well 培養皿送至連續波長式微量盤分光光譜儀以 420nm 波長測量轉譯成效。

(七)螢光素酶檢測法 (Luciferase Assay)

- 1.將細胞裂解液加 20μL 加到白色 96well 培養皿。並加入 20μL 1× lysis buffer 作為背景值。
- 2.每 well 加 50μL Luciferase Assay reagent。
- 3.利用連續波長式微量盤冷光光譜儀讀數值。

(八)統計分析

- 1.將螢光素酶檢測法平均讀值除以 β-半乳糖苷酶檢測法平均讀值，並刪除四次實驗讀值中一次與平均讀值偏差較大者。
- 2.將各組平均值之間的差異以 Student's t-test 之雙尾檢定(Two-Tailed Tests)計算出 P 值。兩組之間相比 P 值<0.001 定義為極度顯著差異、兩組相比 P 值<0.01 定義為高度顯著差異、兩組相比 P 值<0.05 定義為顯著差異。
- 3.將實驗讀值與平均值計算出正負標準差。

(九)西方墨點法 (Western blot)

1.蛋白質變性

取蛋白質萃取液 20μL 且加入 4μL 的 dye，然後放至滾水中加熱 5 分鐘。

2.SDS-PAGE 製備及電泳

將 12 % SDS-PAGE 放置在垂直電泳槽然後加滿電泳緩衝溶液後加入變性後的蛋白質至 well 中，先以 80V 的電壓進行 Stacking 30 分鐘，再以 100V 電壓進行蛋白質分離 60 分鐘。

3.轉漬

電泳分析結束後，將 Polyvinylidene Fluoride (PVDF membrane) 浸於 Transfer buffer (20 mM Tris-base、0.1 % SDS、10 % Methanol) 中再將 PVDF 放置 SDS-

PAGE 上，上下皆各加三張 3mm Filter paper，使形成三明治夾層狀。再將三明治夾層用兩塊海綿夾住放置於 Transfer buffer 中，以 100V 電壓進行 60 分鐘的轉漬。

4.Primary 和 secondary antibody

轉漬完成後將的 PVDF membrane 放置在含 5%脫脂奶粉的 Blocking buffer，Blocking buffer 溶於 TBS-T (1M Tris PH8.0、5M NaCl、0.01 % Tween-20)，後將 PVDF membrane 於迴旋是震盪儀上以 Washing buffer (TBS-T) 洗滌 3 次，每次 5 分鐘。後加入 1:3000 稀釋的 Primary antibody solution 及 TBS-T，均勻的覆蓋在 PVDF membrane 上作用 24 小時。再以 Washing buffer 洗滌 3 次，每次 5 分鐘。將 Secondary antibody 以 1:2000 稀釋於 TBS-T 中，並均勻覆蓋在 PVDF membrane 上作用 1 小時，再洗滌 3 次，每次 5 分鐘。最後加入 Enhanced chemiluminescence (ECL) detection buffer 作用 1 分鐘，最後利用冷光螢光影像處理系統觀察蛋白質表現。抗體的名稱、稀釋比例及廠牌如表三、四。

一級抗體		
名稱	稀釋比例	廠牌
rabbit anti-MEF2A	1 : 3000	GeneTex(GTX10163)
rabbit anti-FLAG	1 : 5000	abcam(ab137838)
rabbit anti-HA	1 : 5000	LTK
mouse anti-Myc	1 : 10000	Sigma(F7425)

表三、一級抗體的名稱、稀釋比例及廠牌

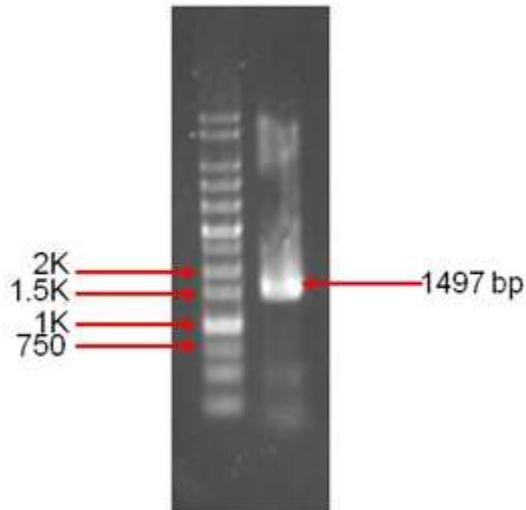
二級抗體		
名稱	稀釋比例	廠牌
HRP Gt α Ms	1 : 100000	Jacksonimmuno(115-035-003)
HRP Gt α Rb	1 : 100000	Jacksonimmuno(111-035-003)

表四、二級抗體的名稱、稀釋比例及廠牌

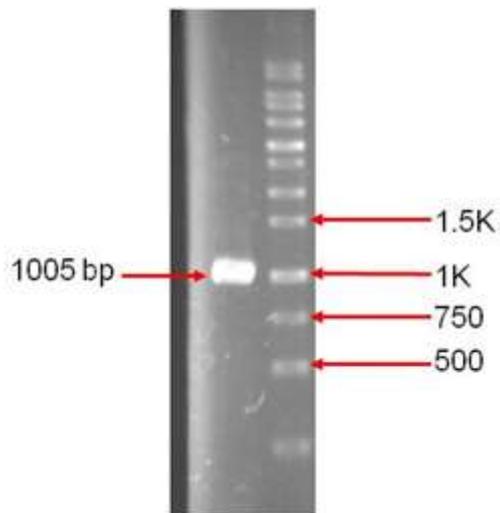
伍、研究結果

一、以凝膠電泳確認 PCR 結果

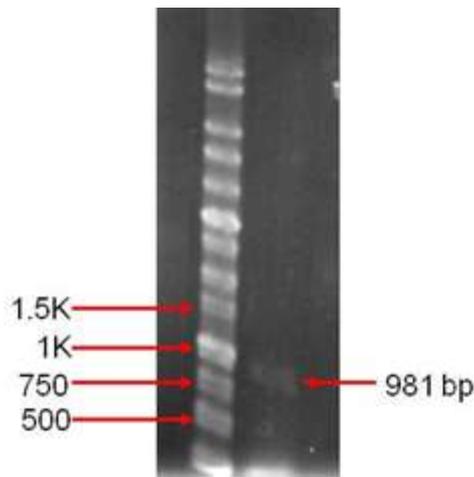
利用 PCR 的方式做出 *Mef2a*、*c-Jun* 及 *Fra-2* 三種 DNA 後，利用凝膠電泳確認 DNA 的相對大小。*Mef2a* 為 1497 bp (圖四)，*c-Jun* 為 1005 bp (圖五)，*Fra-2* 為 981 bp (圖六)。



圖四、*Mef2a* PCR 結果



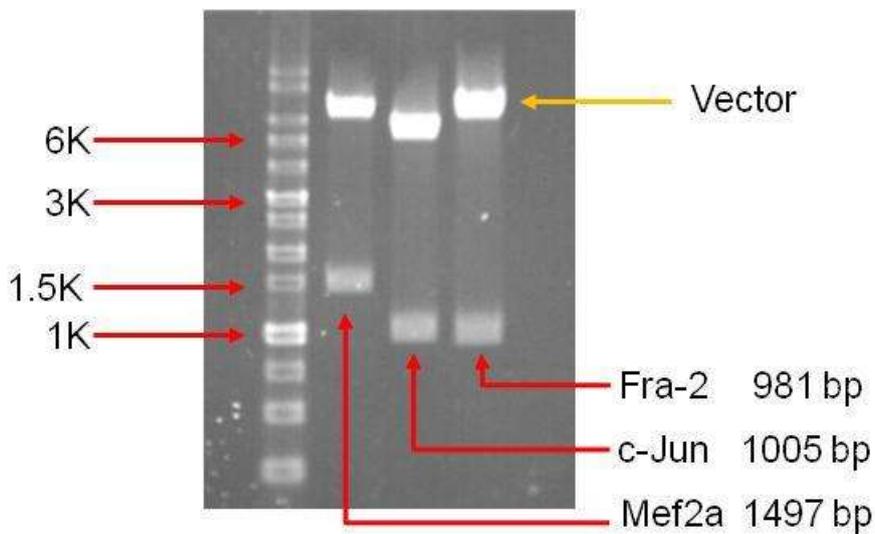
圖五、*c-Jun* PCR 結果



圖六、*Fra-2* PCR 結果

二、以凝膠電泳確認 DNA clone 結果

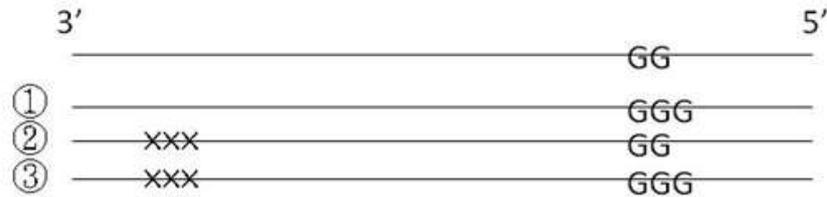
為確定有成功克隆出 *Mef2a*、*c-Jun* 及 *Fra-2*，將三種 DNA 分別利用限制酶 *EcoRI* 及 *XhoI* 進行反應後，利用凝膠電泳來確定 DNA 有克隆出來，以及相對大小是否正確，結果如圖七。三種 DNA 都有克隆出，且相對大小也正確。



圖七、將 clone 的 DNA 以 *EcoRI*、*XhoI* 兩種限制酶作用後，以凝膠電泳確認 DNA clone 結果。

在利用凝膠電泳確認 DNA 的相對大小後，送定序以確定 DNA 序列是否完全正確。*Mef2a* 及 *c-Jun* 序列皆正確，而在 *Fra-2* clone 的結果中，我們共做出 3 種不同的 DNA (圖八)，分別為靠近 5'端多一個鳥糞嘌呤 (圖八中的①)、靠近 3'端少一個胺基酸 (圖八中的②)、靠近 3'端少一個胺基酸且靠近 5'端多一個鳥糞嘌呤 (圖八中的③)。但

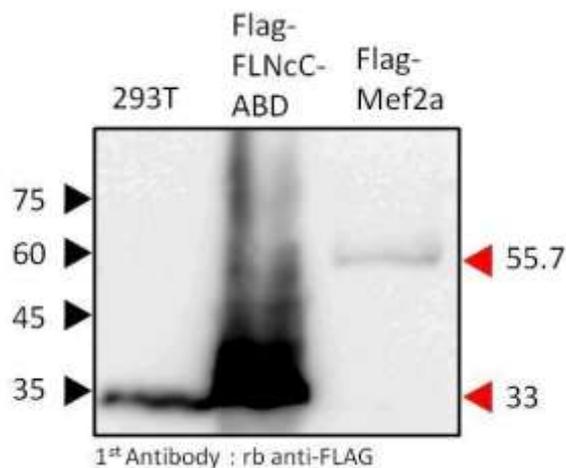
因為在 PCR 實驗中所用的模板 DNA 為老鼠胚胎第 17.5 天的 cDNA，在 NCBI 上所找到的是成鼠的 *Fra-2* cDNA 序列，所以也有可能我們所做出的 DNA 是在胚胎時才有的。最後我們選擇用圖八中的①來進行後續轉染實驗。



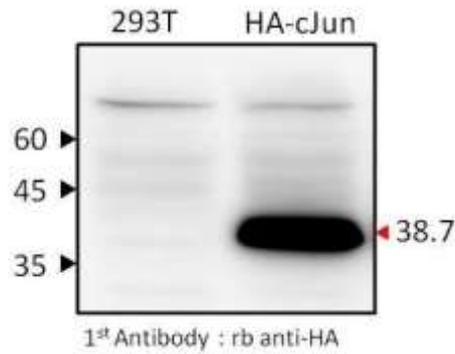
圖八、*Fra-2* PCR 產物示意圖

三、以西方墨點法確認細胞轉染之成效

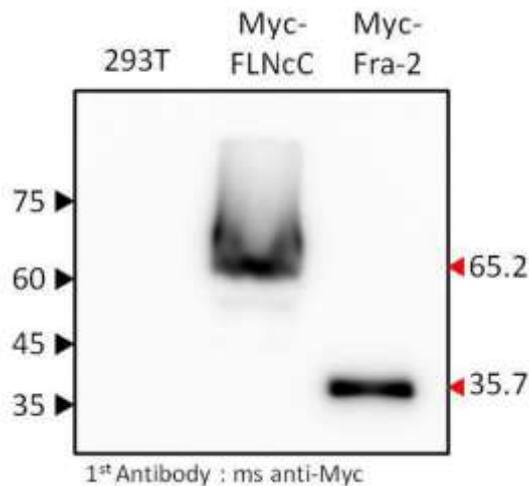
為確定 DNA 有轉染至 HEK-293T 細胞內並表現，利用帶有相同載體的 DNA 所做出的蛋白質產物作為對照組，觀察抗體是否確實有表現。圖中我們可以觀察到 MEF2A (圖五)、c-Jun (圖六) 及 *Fra-2* (圖七) 都有確實表現在至 HEK-293T 細胞中。



圖五、進行完轉染實驗後 HEK-293T 細胞內 MEF2A 表現量。MEF2A 加上載體(FlagB)後總大小約 55.7 KDa。(兩側數字代表蛋白質大小。單位：KDa。)



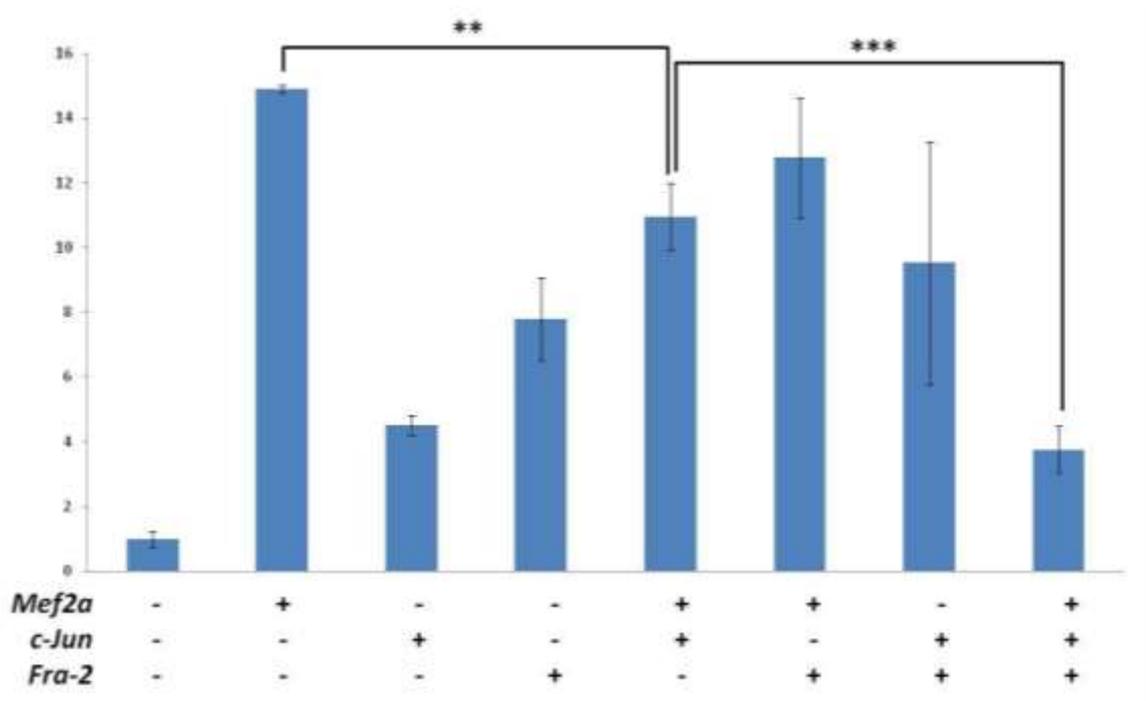
圖六、進行完轉染實驗後 HEK-293T 細胞內 c-Jun 表現量。c-Jun 原加上載體(HA)後總大小約 38.7 KDa(兩側數字代表蛋白質大小。單位：KDa。)



圖七、進行完轉染實驗後 HEK-293T 細胞內 Fra-2 表現量。Fra-2 加上載體(MycB)後總大小約 35.7 KDa(兩側數字代表蛋白質大小。單位：KDa。)

四、探討 *Mef2a*, *c-Jun*, *Fra-2* 在 *Hspb7* 上游 4.58kb 之啟動子中對 HSPB7 表現的差異

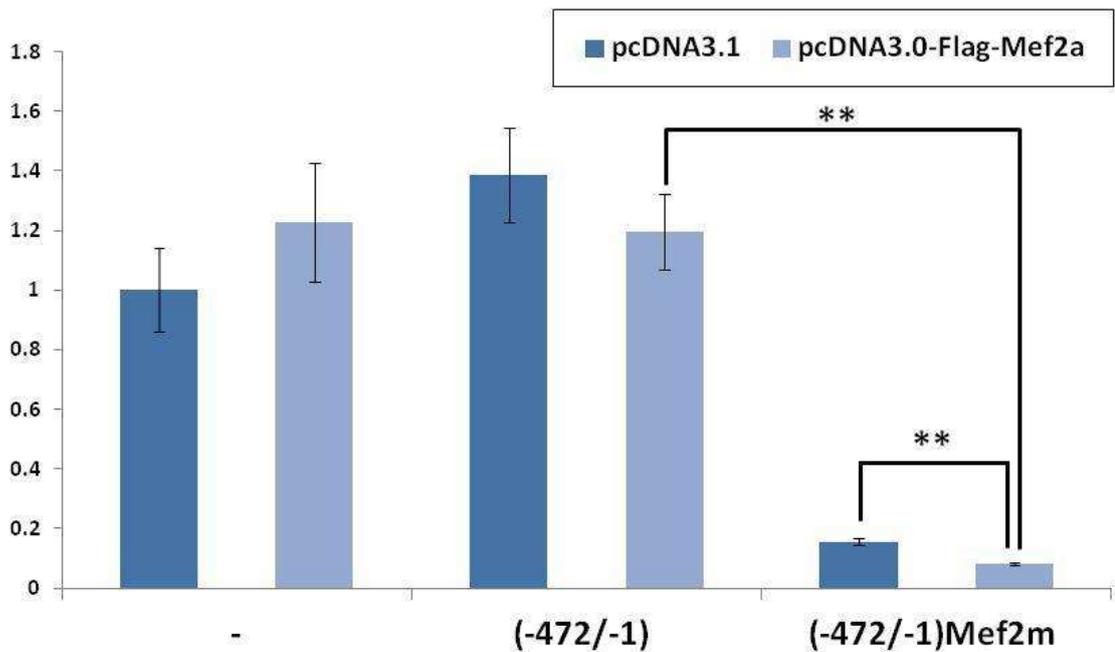
將 *Mef2a*, *c-Jun*, *Fra-2* 三種 DNA 以不同組合以及 *Hspb7* 上游 4.58kb 之啟動子轉染至 HEK-293T 細胞中 24 小時後，將細胞打破並進行 Luciferase Assay 及 β -Gal Assay 以觀察細胞中 HSPB7 表現量，結果如圖八。加入 *Mef2a* 後，HSPB7 表現量增加，可知此時 *Mef2a* 對 HSPB7 表現有正向的調控。而在同時加入 *Mef2a*, *c-Jun*, *Fra-2* 時，HSPB7 的表現則有下降的趨勢。



圖八、以 Luciferase Assay 觀察 *Mef2a*, *c-Jun*, *Fra-2* 在 *Hspb7* 上游 4.58kb 之啟動子中對 HSPB7 表現的差異。(將 Luciferase Assay 及 β -Gal Assay 數據相除後，設未加入 *Mef2a*, *c-Jun*, *Fra-2* 的組別為 1，把各組換為倍數關係。縱軸為倍數。***：兩組相比 P 值<0.001，**：兩組相比 P 值<0.01，*：兩組相比 P 值<0.05。)

五、探討 *Mef2a* 在不同啟動子中對 HSPB7 表現的差異

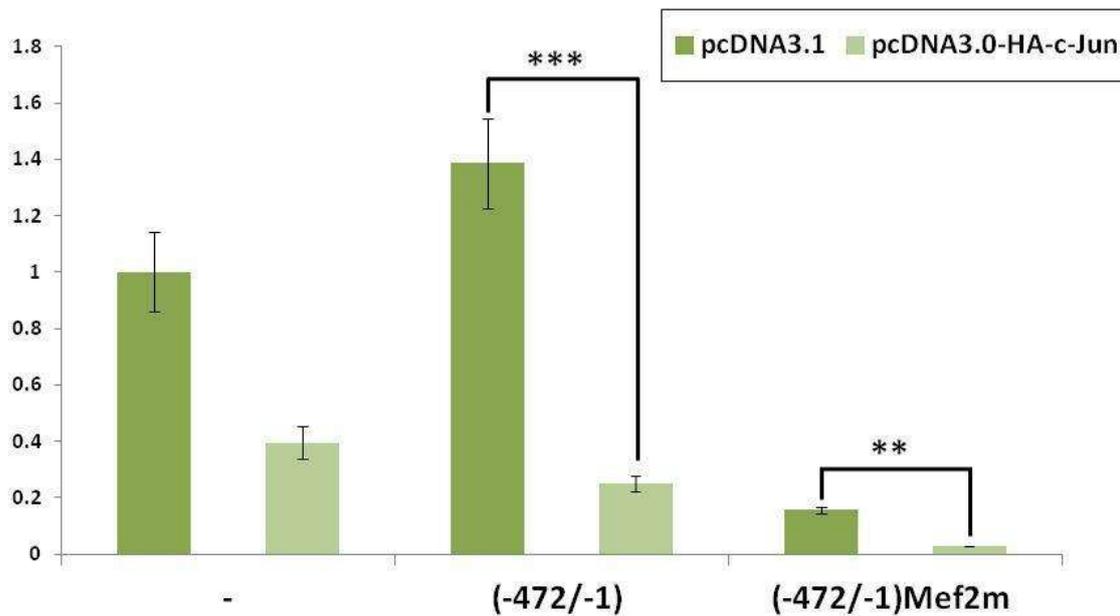
將 *Mef2a* 搭配 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子及 MEF2A 結合點位突變的 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子轉染至 HEK-293T 細胞中 24 小時後，將細胞打破並進行 Luciferase Assay 及 β -Gal Assay 以觀察細胞中 HSPB7 表現量，結果如圖九。在使用 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子之下加入 *Mef2a* 不會使 HSPB7 表現量增加。但在使用 MEF2A 結合點位突變的啟動子的組別，HSPB7 的表現量大幅下降，由此可知 HSPB7 需在有 MEF2A 的調控下，才能維持細胞基本的表現量。



圖九、以 Luciferase Assay 觀察 *Mef2a* 在不同啟動子中對 HSPB7 表現的差異。(將 Luciferase Assay 及 β -Gal Assay 數據相除後，設加入 pcDNA3.1 及 pGL3-basic 的組別為 1，把各組換為倍數關係。縱軸為倍數。***：兩組相比 P 值<0.001，**：兩組相比 P 值<0.01，*：兩組相比 P 值<0.05。)

六、探討 *c-Jun* 在不同啟動子中對 HSPB7 表現的差異

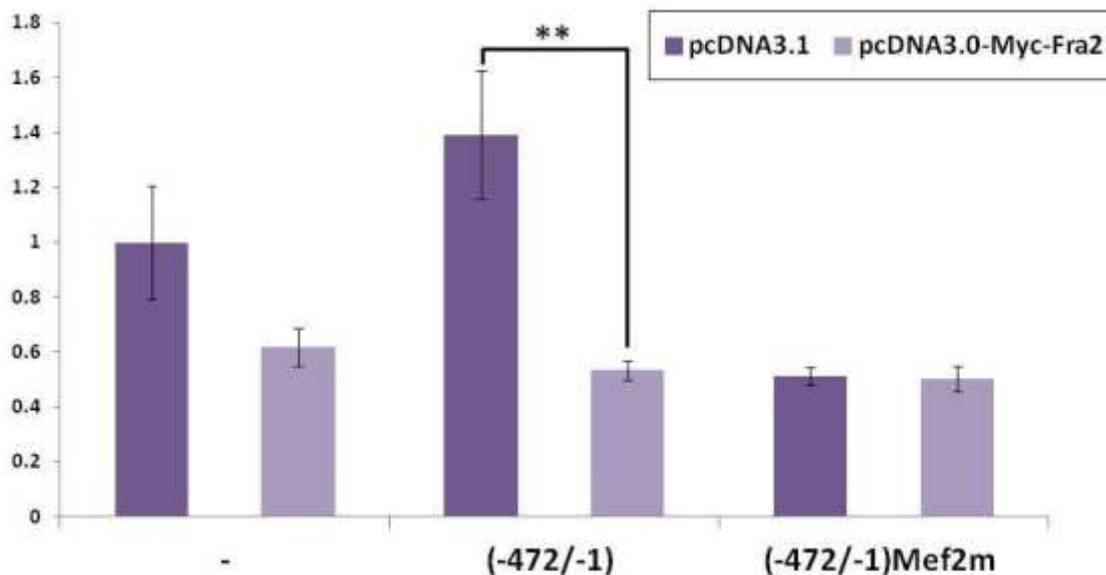
將 *c-Jun* 搭配 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子及 MEF2A 結合點位突變的 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子轉染至 HEK-293T 細胞中 24 小時後，將細胞打破並進行 Luciferase Assay 及 β -Gal Assay 以觀察細胞中 HSPB7 表現量，結果如圖十。在 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子上未確定有 AP-1 的結合點位，但加入 *c-Jun* 仍可將 HSPB7 的表現量降低，而若是用 MEF2A 結合點位突變的 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子，HSPB7 的表現量又會降低許多，可知 MEF2A 的結合點位與 *c-Jun* 調控 *hspb* 基因表現的機制有所關係。



圖十、以 Luciferase Assay 觀察 *c-Jun* 在不同啟動子中對 HSPB7 表現的差異。(將 Luciferase Assay 及 β -Gal Assay 數據相除後，設加入 pcDNA3.1 及 pGL3-basic 的組別為 1，把各組換為倍數關係。縱軸為倍數。***：兩組相比 P 值<0.001，**：兩組相比 P 值<0.01，*：兩組相比 P 值<0.05。)

七、探討 *Fra-2* 在不同啟動子中對 HSPB7 表現的差異

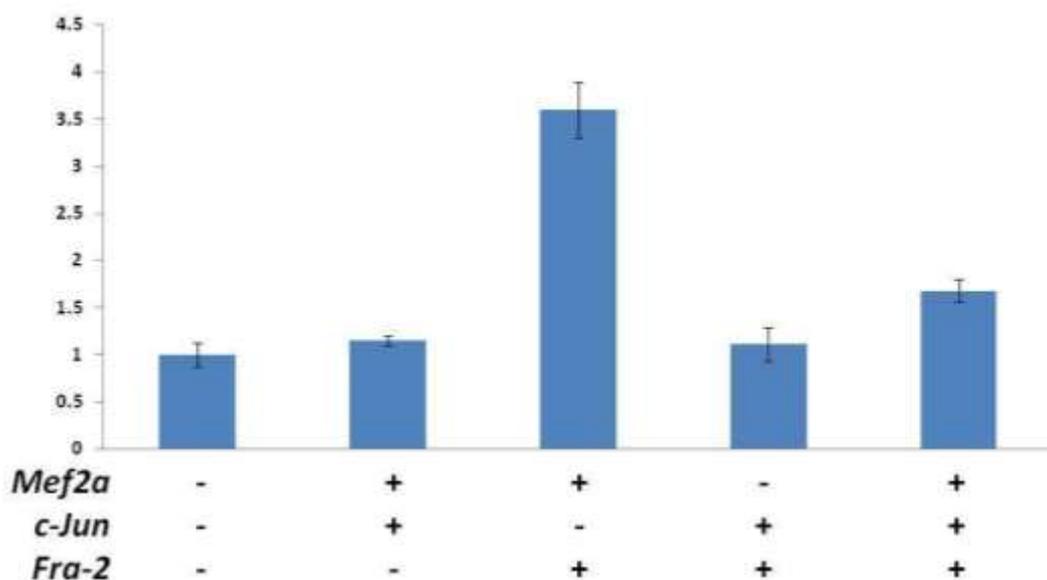
將 *Fra-2* 搭配 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子及 MEF2A 結合點位突變的 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子轉染至 HEK-293T 細胞中 24 小時後，將細胞打破並進行 Luciferase Assay 及 β -Gal Assay 以觀察細胞中 HSPB7 表現量，結果如圖十一。在 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子上未確定有 AP-1 的結合點位，但加入 *Fra-2* 仍可將 HSPB7 的表現量降低，但與 *c-Jun* 的結果相比，降低的幅度較小。



圖十一、以 Luciferase Assay 觀察 *Fra-2* 在不同啟動子中對 HSPB7 表現的差異。(將 Luciferase Assay 及 β -Gal Assay 數據相除後，設加入 pcDNA3.1 及 pGL3-basic 的組別為 1，把各組換為倍數關係。縱軸為倍數。***：兩組相比 P 值 <0.001，**：兩組相比 P 值 <0.01，*：兩組相比 P 值 <0.05。)

八、探討 *Mef2a*, *c-Jun*, *Fra-2* 在 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子中對 HSPB7 表現的差異

將 *Mef2a*, *c-Jun*, *Fra-2* 三種 DNA 以不同組合以及 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子轉染至 HEK-293T 細胞中 24 小時後，將細胞打破並進行 Luciferase Assay 及 β -Gal Assay 以觀察細胞中 HSPB7 表現量，結果如圖十二。加入 *Mef2a*, *Fra-2* 的組別，HSPB7 表現量比加入 *Mef2a*, *c-Jun* 的組別高出許多。而同時加入 *c-Jun* 和 *Fra-2*，HSPB7 的表現量將會降低。

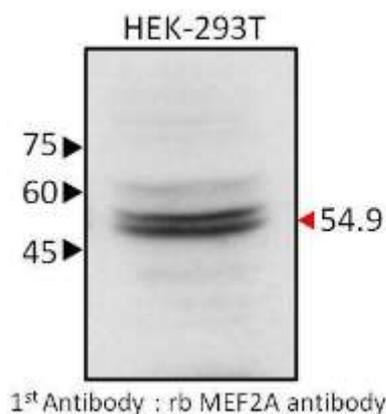


圖十二、以 Luciferase Assay 觀察 *Mef2a*, *c-Jun*, *Fra-2* 在 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子中對 HSPB7 表現的差異。(將 Luciferase Assay 及 β -Gal Assay 數據相除後，設未加入 *Mef2a*, *c-Jun*, *Fra-2* 的組別為 1，把各組換為倍數關係。縱軸為倍數。)

九、以西方墨點法測量 HEK-293T 細胞中是否含有 MEF2A

在實驗中將 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子和 pcDNA3.1 轉染至 HEK-293T 細胞中 24 小時後，將細胞打破並進行 Luciferase Assay 及 β -Gal Assay 觀察細胞中 HSPB7 表現量，其量比預期之高，故我們推測 HEK-293T 細胞中原先就含有 MEF2A。在利用西方

墨點法分析未轉染任何 DNA 的 HEK-293T 細胞後，可知 HEK-293T 細胞中本來就含有 MEF2A(圖十三)。



圖十三、HEK-293T 細胞 MEF2A 表現量。MEF2A 約 54.9 KDa (兩側數字代表蛋白質大小。單位：KDa。)

陸、討論

- 一、從轉染實驗中的結果看出 *c-Jun*、*Fra-2* 對於 *Hspb7* 基因表現有抑制的成效而 *Mef2a* 有增加基因表現的成效，但從實驗結果無法進一步得知其在細胞中是否真有彼此結合或確實結合於結合點之上。未來可藉由 CHIP-sequencing 實驗觀察分析蛋白質與 DNA 的交互作用
- 二、實驗結果可以推出可能 AP-1 在 *Hspb7* 上游 472bp 之中有其他可以結合的點位，與先前研究發現相同。未來可使用更短之啟動子進行實驗或是將啟動子上其他結合點位進行點突變再進行實驗，實驗結果會更加精確。
- 三、*MEF2A*、*c-Jun*、*Fra2* 確實會影響 HSPB7 的表現，但應該還有其他轉錄因子共同調控。
- 四、本實驗中在 PCR 實驗中所用的模板 DNA 為老鼠胚胎第 17.5 天的 cDNA，而克隆出的 *Fra-2* 與常見的 *Fra-2* 在蛋白質的 C 端有所差異，可能是該 DNA 為胚胎時才有。但此 DNA 在 *Hspb7* 基因表現的調控功能上同樣具有抑制 HSPB7 的功能。所以可能 *Fra-2* 在 *hspb7* 基因表現的調控上，是與其蛋白質之 N 端結構有關，故在 C 端不盡相同的情況下，還是能有相同功能。

柒、結論

- 一、HEK-293T 細胞中原先就含有 *Mef2a*，因此於細胞當中加入 *Hspb7* 上游 472bp 啟動子和 pcDNA3.1 的組別，HSPB7 的表現會比預期之高。
- 二、在使用 *Hspb7* 上游 472bp 啟動子之下加入 *Mef2a* 不會使 HSPB7 表現量增加，但如果是使用將 MEF2A 的結合點位突變的啟動子的話，將會使 HSPB7 的表現量大幅下降。由此可知 HSPB7 表現量需在有 MEF2A 的調控下，才能維持細胞中的基本表現量。
- 三、在啟動子只有 *Hspb7* 上游 472bp 的情況下，AP-1 並無已知的結合點位，但在有額外增加 *Mef2a* 的情況下，*c-Jun* 的加入可使 HSPB7 的表現降低。同時加入 *c-Jun* 和 *Fra-2* 也用同樣的效果，但若只加入 *Fra2*，HSPB7 的表現量就無法降低至和增加 *Mef2a* 和 *c-Jun* 的情況下一樣。
- 四、在啟動子只有 *Hspb7* 上游 472bp 的情況下，*c-Jun* 並無結合點位，但仍可將 HSPB7 的表現量降低。而若是用 *Hspb7* 上游 472bp 將 MEF2A 的結合點位基因剔除的啟動子的話，HSPB7 的表現量又會降低許多，可知 MEF2A 的結合點位與 *c-Jun* 調控 *hspb7* 基因表現的機制有所關係。
- 五、在使用含有 *Hspb7* 上游 4.58kb 之啟動子時，可觀察到增加 *Mef2a* 確實如同預期增加了 HSPB7 的表現，而增加 *c-Jun*、*Fra-2* 表現雖有使 HSPB7 的表現增加，但相對來講數值偏低。
- 六、在使用將 MEF2A 的結合點位基因剔除的啟動子時，因其中含有 AP-1 的結合點位因此可以看到同時增加 *Mef2a*、*c-Jun*、*Fra-2* 時，HSPB7 表現量有降低的趨勢。
- 七、在使用 *Hspb7* 上游 4.58kb 和 *Hspb7* 上游 472bp 之啟動子時將 *Mef2a*、*c-Jun*、*Fra-2* 同時轉染至細胞時，可以看見將 HSPB7 之表現降低許多，可見其在抑制上有加乘之作用。

捌、參考文獻

- 一、陳錦德(2012)。熱休克蛋白 B7 基因在小鼠肌肉組織表現之調控(碩士論文)。國立陽明大學生化暨分子生物研究所，台北市。
- 二、Alli, N. C., Yang, E. C., Miyake, T., Aziz, A., Collins-Hooper, H., Patel, K., & McDermott, J. C. (2013). Signal-dependent fra-2 regulation in skeletal muscle reserve and satellite cells. *Cell Death Dis.* 4, e692.
- 三、Bengal, E., Ransone, L., Scharfmann, R., Dwarki, V. J., Tapscott, S. J., Weintraub, H., & Verma, I. M. (1992). Functional Antagonism between C-Jun and MyoD Proteins: a Direct Physical Association. *Cell* 68, 507-519.

- 四、Juo, L. Y., Liao, W. C., Shih, Y. L., Yang, B. Y., Liu, A. B., & Yan, Y. T. (2016). HSPB7 interacts with dimerized FLNC and its absence results in progressive myopathy in skeletal muscles. *Journal of Cell Science*, 129(8), 1661–1670.
- 五、Liao, W. C., Juo, L. Y., Shih, Y. L., Chen, Y. H., & Yan, Y. T. (2017). HSPB7 prevents cardiac conduction system defect through maintaining intercalated disc integrity. *PLOS Genetics*, 13(8), e1006984.
- 六、Tobin, S.W., Yang, D., Girgis, J., Farahzad, A., Blais, A., & McDermott, J. C.(2016) The Company of Biologists Ltd. Regulation of Hspb7 by MEF2 and AP-1: implications for Hspb7 in muscle atrophy. *Journal of Cell Science*. 129 ,4076-4090.

【評語】 050010

此作品探討熱休克蛋白 Hspb7 基因的表現與 Mef2a、c-Jun、Fra-2 之間的調控關係。研究發現，c-Jun、Fra-2 對於 Hspb7 基因表現有抑制的成效而 Mef2a 有增加基因表現的成效。此作品的成果仍侷限在基因間的調控關係，但並未有功能性的討論。建議最後討論可用一關係圖表示彼此調控間的關係。