

國立臺灣大學醫學院口腔生物科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Oral Biology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

斑馬魚 *Six6* 基因之選殖、表現及啟動子之顱顏組織

專一性調控之研究

Cloning, Expression, and the Functional Analyses of
Regulatory Elements of Zebrafish *Six6* Genes
During Craniofacial Development

蔡曼男

Min-Nan Tsai

指導教授：張百恩 博士

Advisor : Bei-En Chang, Ph.D.

中華民國九十七年七月

July 2008

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

斑馬魚 *Six6* 基因之選殖、表現及啟動子之顱顏組織

專一性調控之研究

Cloning, Expression, and the Functional Analyses of
Regulatory Elements of Zebrafish *Six6* Genes
During Craniofacial Development

本論文係蔡旻男君 (R95450011) 在國立臺灣大學口腔
生物科學研究所所完成之碩士學位論文，於民國 97 年 7 月
15 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明



考試委員簽章	張百國	陳志	林志
--------	-----	----	----

誌謝

回顧兩年多來在口生所求學的日子，轉眼間將要離去，內心百感交集。從一個茫然懵懂的大學畢業生，依自己興趣選擇踏進這個浩瀚的研究世界，到現在有了小小的收穫以及學識上的成長，內心感觸實在不是我可以用文字道盡的。

在求學的過程當中，有太多我一定要感謝的人了。最先要感謝我的家人，特別是每天接送我到車站的爸爸，在各方面對我的全力支持以及嘉鈴的陪伴和鼓勵，讓我無後顧之憂地專注學習；接著由衷的感謝指導教授 張百恩老師，不僅是在實驗與論文的耐心指導與糾正，在科學研究的方法和態度也讓我獲益良多，而且更要感謝老師不辭辛勞無私的付出，讓實驗可以順利進行也讓我有今日的成果。也感謝口試委員姚宗珍老師以及陳志成老師在口試時的寶貴建議和對本論文的審閱與指正，我內心充滿感激。同時也要在此感謝這兩年指導過我的老師。

同樣地，我也要感謝這些日子以來，給予我實驗上最大幫助的雅文學姊，細心的指導與經驗分享讓我實驗順利；一同奮鬥的智楷，給我勉勵與心得經驗和生活趣味的分享，這兩年來都不孤單；還有聰明、可愛又貼心的文裕和宣貿學弟，主動分擔實驗室的雜務，甚至讓我的實驗優先進行，而在我不甚熟悉電腦軟體也給予很大的協助；也感謝以娜和孟誼在實驗上的支援，志隆和韻芝的加油與打氣，以及實驗室畢業的學長姐麗芬、嵩歲、健英、俊宇和嘉宏的加油問候跟幫助；同樣也很感謝振昌學長的照顧與指導。再一次由衷感謝你們，謝謝你們的陪伴與鼓勵，讓這兩年的求學生活充實又愉快。

最後我要把這一份喜悅與驕傲，分享給我的家人與朋友，由於你們在背後不斷地支持與鼓勵，才有我今天的成果。謝謝你們。

僅以此文獻給師長、家人和協助與鼓勵過我的人。

旻男

民國九十七年七月

中文摘要

Six6 基因屬於 Six 基因家族的一員。Six 基因家族最早在 1995 年利用果蠅 *sine oculis (So)* 基因作同源篩選，找出老鼠相關的同源基因。已知 So 基因在果蠅視覺系統的發育扮演著相當重要的角色。雖然老鼠所有的 Six 基因家族成員都與 So 基因有同源性，可是卻只有 Six3 和 Six6 基因會表現在神經外胚層視覺原基(optic primordium)。並且有證據顯示 Six3 和 Six6 基因在功能上不是重複的。除了在視覺原基表現外，在早期腦部的組織也有表現，顯示該基因對胚胎頭部神經組織發育具有重要性。

本論文主要目的在尋找斑馬魚基因體中 Six6 基因的同源基因，並且分析這些基因啟動子之活性及其可能位於 Six6 基因上游的順式調控因子。我首先發現基因庫中包含人類、小鼠、大鼠和非洲爪蛙等四個物種 Six6 基因都和附近相鄰的基因包括 Six1 和 Six4 形成一個連鎖群(linkage)，然而在斑馬魚基因庫中卻沒有發現命名為 Six6 基因的同源基因，然而在 UCSC 生物資訊網頁，以人類 SIX6 基因作檢索，發現兩個未知名的斑馬魚同源基因(編號 zgc : 110344 和 zgc : 63871)。於是利用胺基酸的序列比對分析，確定了斑馬魚這兩個未知名的基因正是 Six6 基因的同源基因。藉由位於同一個連鎖群的 Six4 基因之平行演化同源基因(paralogues)位置(locus)，分別將透過胺基酸序列比對分析的未知名的基因命名為(Six6.1 基因和 Six6.2)。

利用原位雜合反應偵測內生性 mRNA 的表現位置。結果發現斑馬魚 Six6.1 和 Six6.2 基因的內生性 mRNA 都會表現在間腦腹側、下視丘與將來發育為腦下垂體前葉的區域，此外，斑馬魚 Six6.1 基因會表現在神經視網膜組織。值得注意的是斑馬魚 Six6.2 基因雖然如同 Six6.1 基因會表現在間腦腹側、下視丘與腦下垂體前葉的區域，可是表現量都比較弱，而且在神經視網膜並沒有發現 Six6.2 基因的表現。

接著我以 PCR 的方法從斑馬魚的基因體中分別複製出包含 Six6.2 基因轉錄

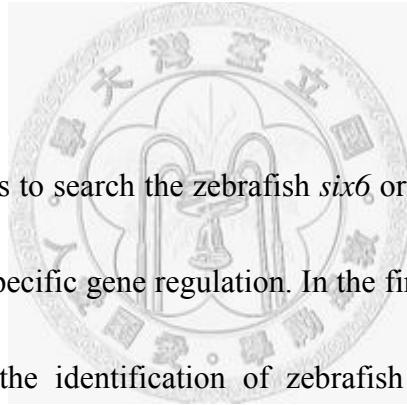
起點(-728/+165)的上游 DNA 片段和包含 Six6.1 基因轉錄起點(-1199/+204)的上游 DNA 片段，將其和綠色螢光蛋白報導基因(EGFP, enhanced green fluorescent protein)鍵結形成結構體，再將這兩個結構體以顯微注射的方式注入斑馬魚之受精卵中。結果在過渡性轉殖實驗中，發現 Six6.1 啟動子結構體能驅使綠色螢光蛋白報導基因在斑馬魚胚胎的頭部腦組織和眼睛神經視網膜有明顯的專一性表現；而 Six6.2 啟動子結構體則驅使綠色螢光蛋白報導基因在斑馬魚胚胎的頭部腦組織表現。

將內生性 mRNA 的表現位置和過渡性轉殖實驗中綠色螢光蛋白報導基因表現位置相互比較的結果位置大致上相符，顯示斑馬魚包含 Six6.1 基因轉錄起點(-1199/+204)的上游 DNA 片段和包含 Six6.2 基因轉錄起點(-728/+165)的上游 DNA 片段的區域內即包含有大部分調控該基因表現之順式調控因子。另一方面，利用 Dot-Matrix 方法分析，此兩基因上游皆含有兩段保守的 DNA 序列片段，我們推測此兩基因的組織專一性順式調控序列座落於這些保守片段中。

關鍵字：Six6，啟動子，斑馬魚，順勢調控因子，演化，連鎖群

英文摘要

Six6 gene belongs to the Six gene family, of which the members were identified in mouse and other vertebrates by homologous screening with *Drosophila sine oculis* (so) gene as a probe. It has been shown that *sine oculis* plays an import role during *Drosophila* eye development. In contrast, only vertebrate *six3* and *six6* are expressed in the optic primodium and are implicated in eye development. Besides, these two genes also participate in brain development, suggesting that they are crucial for neuronal differentiation.



The aim of this study is to search the zebrafish *six6* orthologue and to analyze the expression and its tissue-specific gene regulation. In the first attempt, NCBI data-base search did not result in the identification of zebrafish *six6* gene. However, two zebrafish *six6* homologues (zgc: 110344 and zgc: 63871) were presented in the UCSC bio-informatics web site using human *SIX6* gene as a reference. It has been well known that *six4*, *six1* and *six6* form a genetic linkage as *six4-six1-six6* arrangement. The two putative zebrafish *six6* homologues were designated as *six6.1* and *six6.2* according to the presence of the genetic linkage in genome and alignment of amino acid sequences.

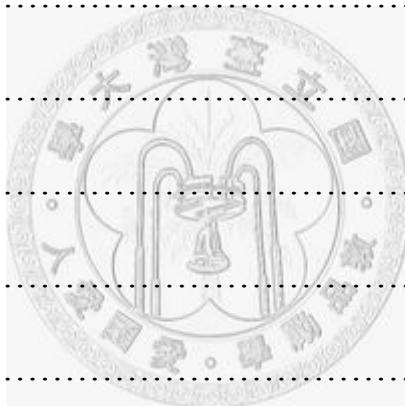
The 3'UTR cDNAs of the genes were isolated by PCR for anti-sense RNA probe preparation. In situ hybridization results revealed that zebrafish *six6.1* and *six6.2* transcripts are expressed in ventral diencephalon, hypothalamus and presumptive adenohypophysis. In addition, *six6.1* transcripts are located in the neural retina.

In regard to the gene regulation, the upstream promoter fragments of the two genes were cloned by PCR amplification and were analyzed in zebrafish embryo with GFP reporter gene by transgenic assay. The results showed that the reporter is expressed in similar patterns as those of endogenous mRNA, suggesting that the respective upstream promoter regions harbor the regulatory elements for *six6.1* and *six6.2*. In parallel, two conserved DNA regions are located in the upstream regions of the two genes by Dot-Matrix analyses. The transgenic assays suggested that the proper cis-regulatory elements for the two genes reside in these conserved locations.

Keywords: Six6, promoter, zebrafish, cis-regulatory element, evolution, genetic linkage

目錄

口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	v
壹、前言.....	1
貳、實驗材料.....	19
參、實驗方法.....	25
肆、結果.....	38
伍、討論.....	43
陸、圖表.....	45
參考文獻.....	62



壹、前言

一、Six 基因家族的介紹

1、Six 基因家族的發現

Six 基因家族的蛋白質是一類轉錄因子，經過演化過程這個基因家族在多細胞生物中被保留下來。第一個被確認的 Six 基因家族成員是 1994 年在果蠅 (*Drosophila*) 發現的 *sine oculis (so)* 基因，並且在整個視覺系統的發育是很重要的 (Cheyette et al., 1994; Serikaku and O'Tousa, 1994)。最早，利用同源性序列的分析找到三個 *so* 相關的老鼠基因 (*Six1*, *Six2* and *Six3*) (Oliver et al., 1995a; Oliver et al., 1995b)。Six 家族的成員也陸續在其他生物發現例如：人類、小鼠、雞 (*Galus gallus*)、非洲爪蛙 (*Xenopus tropicalis*)、魚類 (medaka; zebrafish)、海鞘 (acidian) 和 線蟲 (nematode) 等許多物種 (Kawakami et al., 2000; Seo et al., 1999)。

<i>Drosophila</i> gene	Mutant phenotype	Mammalian gene (human/mouse)	Mutant phenotype	References
<i>eyeless (ey)</i>	Loss of head structures; embryonic lethal; eye-specific alleles cause loss of eyes; essential for adult brain function.	<i>PAX6/Pax6</i>	In humans, dominant aniridia and Peters anomaly; recessive severe CNS defects. Similar phenotypes observed in <i>Pax6</i> knockout mice.	Callaerts et al., 2001; Czerny et al., 1999; Hanson et al., 1994; Kronhamn et al., 2002; Quiring et al., 1994
<i>twin of eyeless (toy)</i>	Loss of head structures; embryonic lethal.			
<i>eyes absent (eya)</i>	Embryonic lethal with anterior defects; hypomorphs can have loss of eye tissue, as well as male and female sterility.	<i>EYA1/Eya1</i> <i>EYA2/Eya2</i> <i>EYA3/Eya3</i> <i>EYA4/Eya4</i>	Mutations in <i>EYA1</i> linked to Branchio-oto-renal (BOR) syndrome, which is characterized by lung, kidney and ear defects; similar defects seen in <i>Eya1</i> knockout mice. Mutations in human <i>EYA4</i> linked to deafness.	Abdelhak et al., 1997; Bonini et al., 1993; Bonini et al., 1998; Wayne et al., 2001; Xu et al., 1999; Xu et al., 2002; Zimmerman et al., 1997
<i>sine oculis (so)</i>	Defects in eye, brain and gonad development; embryonic lethal; eye-specific alleles cause loss of eye tissue.	<i>SIX1/Six1</i> <i>SIX2/Six2</i>	Mutations in <i>SIX1</i> also associated with BOR syndrome. <i>Six1</i> mutant mice display defects in ear, kidney, thymus, skeletal muscle and nose.	Cheyette et al., 1994; Fabrizio et al., 2003; Laclef et al., 2003; Ozaki et al., 2004; Ruf et al., 2004; Xu et al., 2003; Zheng et al., 2003
<i>six4</i>	Defects in muscle and gonad development.	<i>SIX4/Six4</i> <i>SIX5/Six5</i>	<i>SIX5</i> mutations associated with myotonic dystrophy (DM1); <i>Six5</i> knockout mice develop cataracts similar to individuals with DM1. Mouse knockouts of <i>Six4</i> are viable and have no gross defects.	Kirby et al., 2001; Klesert et al., 2000; Ozaki et al., 2001; Wansink and Wieringa, 2003
<i>optix</i>	No reported mutants.	<i>SIX3/Six3</i> <i>SIX6/Six6</i>	<i>SIX3</i> mutations are associated with holoprosencephaly; loss of <i>SIX6</i> is associated with bilateral anophthalmia and pituitary defects. Similar to the human phenotype, <i>Six6</i> -null mice survive but have retinal and pituitary hypoplasia.	Carl et al., 2002; Gallardo et al., 1999; Li et al., 2002; Pasquier et al., 2000; Seimiya and Gehring, 2000; Wallis et al., 1999
<i>dachshund (dac)</i>	Lack eye tissue; leg defects; those that survive to adulthood die within days.	<i>DACH1/Dach1</i> <i>DACH2/Dach2</i>	<i>Dach1</i> knockout mice die soon after birth with no obvious defects; may reflect partial redundancy of <i>Dach1</i> and <i>Dach2</i> , which have overlapping expression.	Backman et al., 2003; Davis et al., 2001a; Davis et al., 2001b; Mardon et al., 1994

附表一、在哺乳類動物與果蠅的 RDGN 基因與其相關突變的外表型 (adapted from Silver and Rebay, 2005)

許多研究指出，由 Six、Pax (Eyeless)、Eya (Eyes absent) 與 Dac (Dachshund) 基因家族組成的一種協同性調節性的基因網路，決定發育過程中眼睛的特性。眼睛的發育在不同的物種有著明顯不一樣構造，可是他們發育的分子機制卻是相當的保守的。這些基因家族又被稱為視網膜決定基因網路 retinal determination gene network (RDGN)，最近的研究指出 RDGN 像是一種介面扮演整合許多種訊息途徑的角色，因此在許多組織的發育是相當重要，例如眼睛、生殖腺、腎臟、肌肉和耳朵(見附表一)(Silver and Rebay, 2005)。

2、Six 基因家族成員的結構與次家族

Six 基因家族蛋白質的特徵是擁有兩個高度保守區域，Six-domain (SD) 和 Six-type homeodomain (Six-type HD)。SD 由 110-115 個胺基酸組成的區域，負責蛋白質與蛋白質之間的交互作用例如：Groucho (GRO) 和 EYA 等輔助因子 (co-factor) 可以幫助提高 Six 蛋白質和 DNA 之間的專一性結合(Kawakami et al., 2000; Kenyon et al., 2005)。Six-type HD 則是 60 個胺基酸組成的區域負責和 DNA 結合。Six-type HD 與多數典型的 homeodomains (HD) 不同的是他們缺乏兩個高度保留的胺基酸殘基(amino acid residues)，Six-type HD 的第 5 個位置缺少精胺酸 (Arginine) 及在第 12 個位置缺少麩胺酸(Glutamine)，而被其他胺基酸所取代。因為第 5 個位置的精胺酸會接觸到 homeobox 結合核心序列(binding core sequence) 之 DNA 鹼基對 TAAT，所以 Six-type HD 胺基酸殘基置換可以說明為什麼他們會獨特地結合到不含有典型 TAAT 的 DNA 核心序列(Kawakami et al., 1996; Kawakami et al., 2000; Seimiya and Gehring, 2000)。

Six 基因家族在脊椎動物中主要有 Six1 到 Six6 六個成員，根據保守的 Six-type HDs 和 SDs 胺基酸序列進行分子系統演化分析(molecular phylogenetic analysis)，顯示 Six 基因家族可以細分成三個主要的次家族(subfamily)：Six1/Six2、Six4/Six5 和 Six3/ Six6 (Kawakami et al., 2000; Seo et al., 1999)。靠近 Six-type HDs 的 N 端每一個次家族擁有獨特的四個胺基酸序列(tetrapeptide)，其中又以 Six3

family 的四個胺基酸序列(QKTH)較 Six2 family 的(ETSY)或 Six4 family 的(ETVY)為特別。因為有同樣的胺基酸取代現象，相同次家族的成員與其他次家族成員彼此擁有更高度的序列保守性。儘管不同 Six 基因次家族的 Six-type HD 有明顯的差異，這些 Six-type HD 也有一些相同的特徵，例如：所有 Six-type HDs 在鄰近區別不同次家族四個胺基酸序列皆為(CFKE)。雖然 SD 的胺基酸序列比 Six-type HD 的序列更有差異，根據 SD 的序列相似度和胺基酸的取代現象仍然可以定義出三種不同的次家族特徵(見附圖一、附圖二)。

3、物種之間 Six6 同源基因的發現和同源性

透過果蠅 *sine oculis (so)*基因利用同源性序列的分析找到三個 *so* 相關脊椎動物的基因(Six1、Six2、Six3)。從這三個老鼠基因的表現位置分布來看，Six1，Six2 都沒有在老鼠眼睛發育的時候表現；只有 Six3 會專一性地在眼睛(optic primordium)表現，也因此被認為是 *sine oculis (so)*基因的同功基因(functional orthologue) (Oliver et al., 1995a)。可是從胺基酸序列的相似性比較結果發現，Six1，Six2 的 Six-type HD 分別有 93% 和 95% 與 *sine oculis (so)*基因相近似，Six 3 却只有 70% 相似，所以 *sine oculis (so)*基因歸屬於 Six1/Six2 次家族(Seo et al., 1999; Toy et al., 1998)。

利用雞的 Six3 找出了雞的 Optx2 (optic Six gene 2)基因 cDNA clone，胺基酸序列和老小鼠的 Optx2 相近。在這兩基因所預測的轉譯起始點前都沒有發現其他同源的胺基酸序列或不一樣的轉譯起始點，這點與小鼠的 Six3 的胺基酸序列明顯有差別(Toy et al., 1998)。Jean D.等人利用小鼠 Six3 相關的簡併寡核苷酸在 cDNA 核酸資料庫找出了一個新的基因。因為其胺基酸序列分析具有 SD 和 HD 明顯是個 Six 基因家族成員，又是第六個被發現的所以命名為 *six6*。序列分析發現它與先前 Toy J.所找到小鼠 Optx2 是相同的基因(Jean et al., 1999)。

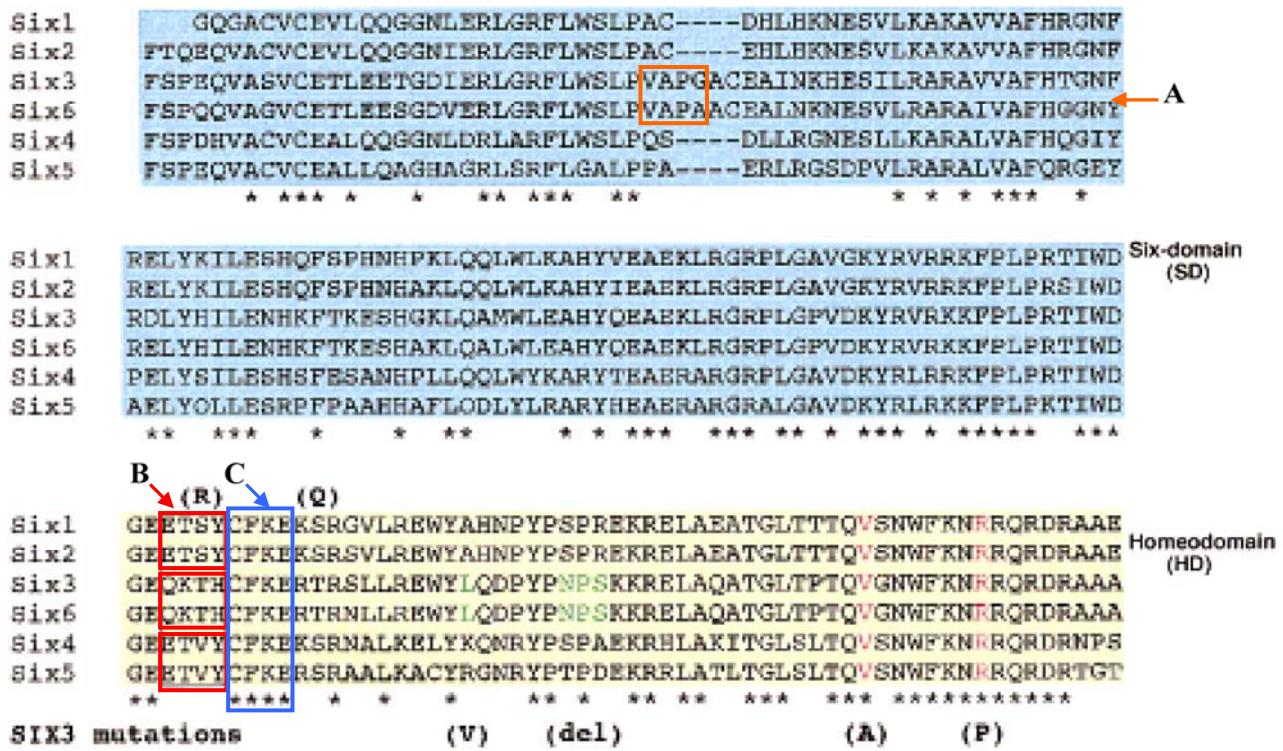
<i>optix</i> (D)	DGEQKTHCFKERTRSLLREWYLQDPYPNPTKKRELAKATGLNPTQVGNWFKNRRQRDRAA	
<i>Dsix3</i> (D)		100%
<i>Six3</i> (m)	S-----S-----Q-----T-----	95%
<i>Optx2/Six6</i> (m)	H-----S-----Q-----T-----	93%
<i>SIX3</i> (h)	S-----S-----Q-----T-----	95%
<i>cSix3</i> (c)	S-----S-----Q-----T-----	95%
<i>optx2</i> (c)	H-----S-----Q-----T-----	93%
<i>six3</i> (zf)	S-----S-----Q-----T-----	95%
<i>six6</i> (zf)	G-----S-----Q-----T-----	93%
<i>six7</i> (zf)	S-----SR-----H-----Q-----T-----	92%
<i>six3</i> (mf)	G-----G-----H-----T-----	93%
<i>ceh-32</i> (e)	K-----P-----K-----N-----TQM-----	88%
<i>so</i> (D)	ETSY-----KS-----V-----D-----SHN-----S-----RE-----D-----E-----TT-----S-----	68%
<i>Six1</i> (m)	ETSY-----KS-----GV-----AHN-----S-----RE-----E-----TT-----S-----	70%
<i>Six2</i> (m)	ETSY-----KS-----V-----AHN-----S-----RE-----E-----TT-----S-----	72%
<i>SIX1</i> (h)	ETSY-----KS-----GV-----AHN-----S-----RE-----E-----TT-----S-----	70%
<i>Six4</i> (m)	ETVY-----KS-----NA-----K-----L-----K-----NR-----S-----AE-----H-----I-----SL-----S-----NP-----	62%
<i>Six5</i> (m)	ETVY-----S-----AA-----KAC-----RGNR-----T-----DE-----R-----TL-----SL-----S-----TG-----	58%
<i>SIX5</i> (h)	ETVY-----AA-----KAC-----RGNR-----T-----DE-----R-----TL-----SL-----S-----TG-----	60%
<i>Dsix4</i> (D)	ETVY-----KS-----NA-----KDC-----TNR-----T-----DE-----KT-----K-----TL-----S-----TP-----	58%
<i>six8</i> (zf)	ETVY-----S-----NA-----KDM-----KRN-----S-----AE-----N-----M-----SL-----S-----NP-----	60%

附圖一、比較果蠅 *optix* 基因與 Six 基因家族成員 homeodomain 的胺基酸序列，
optix 被認為是 Six3 和 Optx2 的同源基因(adapted from Seimiya and Gehring, 2000)

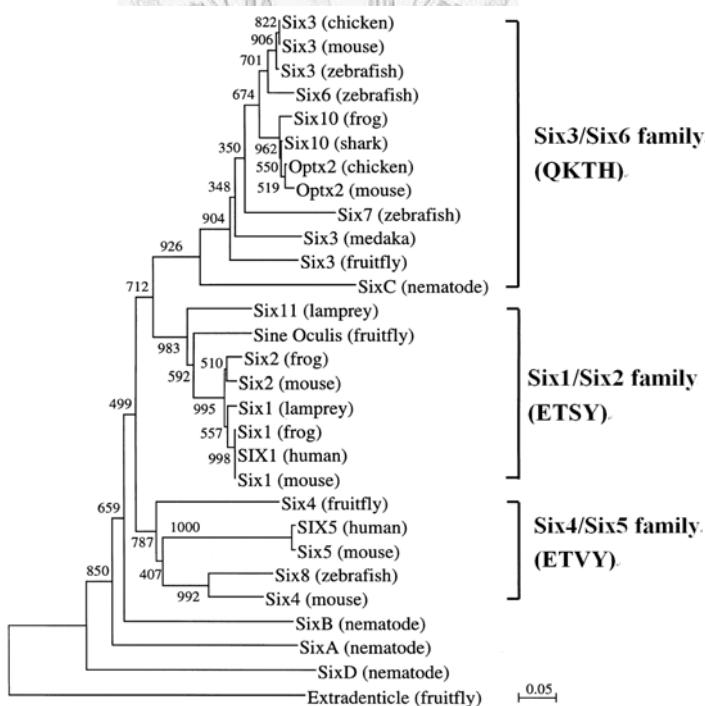


接著在果蠅又找到一個 Six 基因家族成員：*optix*，它的胺基酸序列與小鼠 Six3 和 Optx2 有高度的相似性。因此 *optix* 被認為是 Six3 和 Optx2 (Six6)的同源基因，屬於同一個 Six3/Six6 次家族，並且可能在果蠅眼睛發育扮演和其同源基因相同功能的角色(Oliver et al., 1995a; Oliver et al., 1995b; Seimiya and Gehring, 2000; Seo et al., 1999; Toy and Sundin, 1999; Toy et al., 1998)。

Six3 和 Six6 屬於相同的次家族，觀察人類這兩個基因發現最大的差別就是在 Six3 蛋白質 N 端的前七十八個胺基酸具有甘胺酸富含(Gly-rich)區域，而在 Six6 蛋白質 N 端則沒有發現。另外除了最後十五個重要胺基酸之外，在兩者的 C 端是完全不同的序列。Six6 的 SD 中有一段四個胺基酸序列(VAPA)等同於 Six3 的四個胺基酸序列 (VAPG)，這一段衍生或者插入的四個胺基酸序列做為區隔 Six3 次家族成員與其他 Six 基因家族成員的根據(Gallardo et al., 1999; Seo et al., 1999)(見附圖二)。



附圖二、小鼠 Six 基因家族成員兩種功能保守區胺基酸序列的比較。A: Six3/Six6 次家族有一四個胺基酸序列的插入片段，可與其他次家族做區別；B：次家族區別的一個指標；C：Six-type HD 共同特徵之一(adapted from Kawakami et al., 2000)。

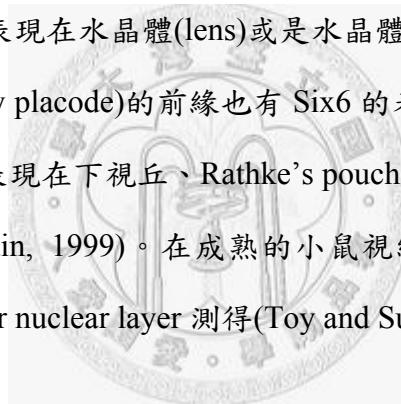


附圖三、Six 基因家族系統演化樹。Six 基因家族利用 Six-type HDs 的胺基酸序列，可以將家族成員細分成三個次家族(adapted from Seo et al., 1999)。

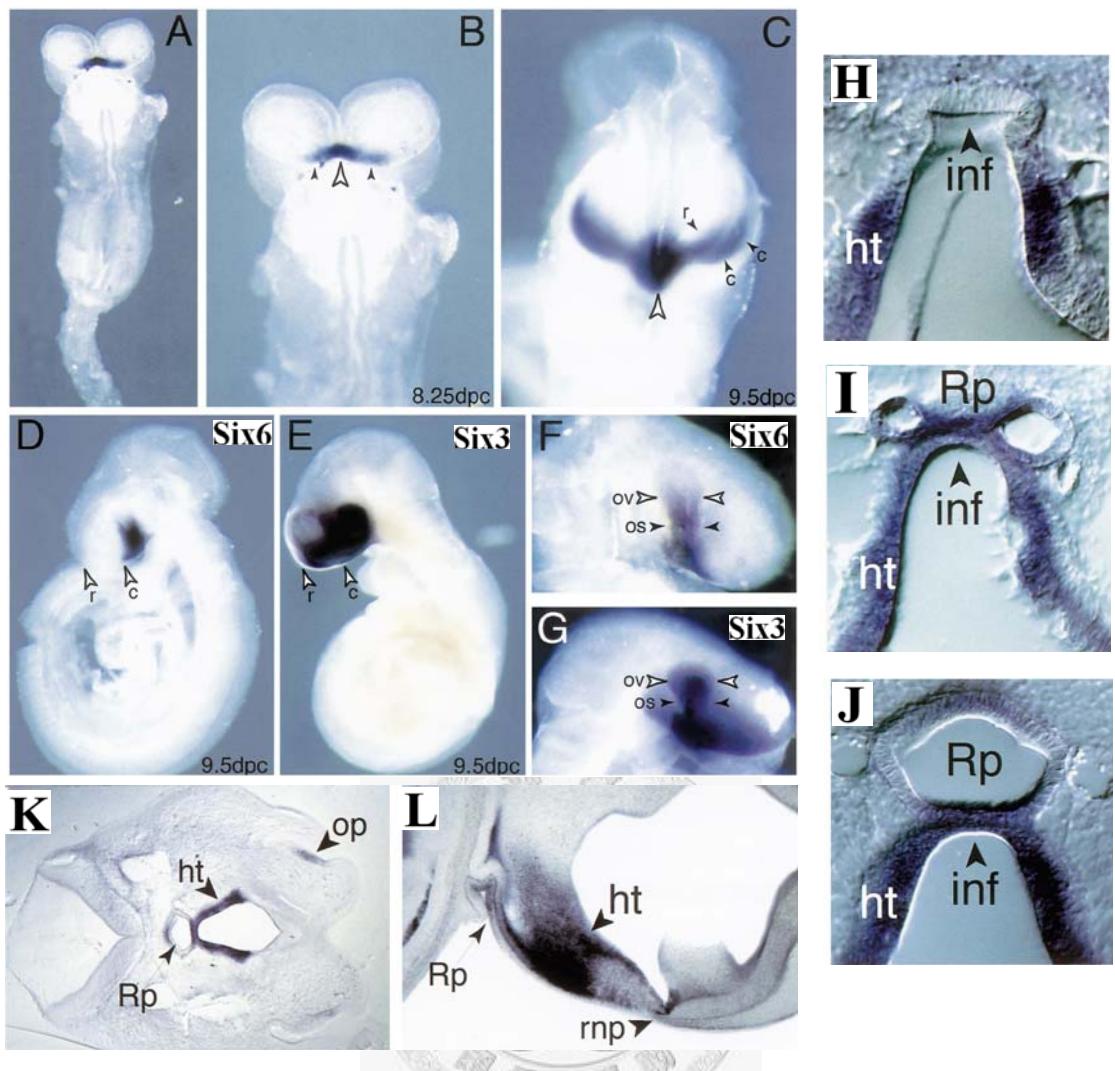
二、Six6 與 Six3 的表現型態與功能分析

1、Six6 (Optx2)基因的表現型態

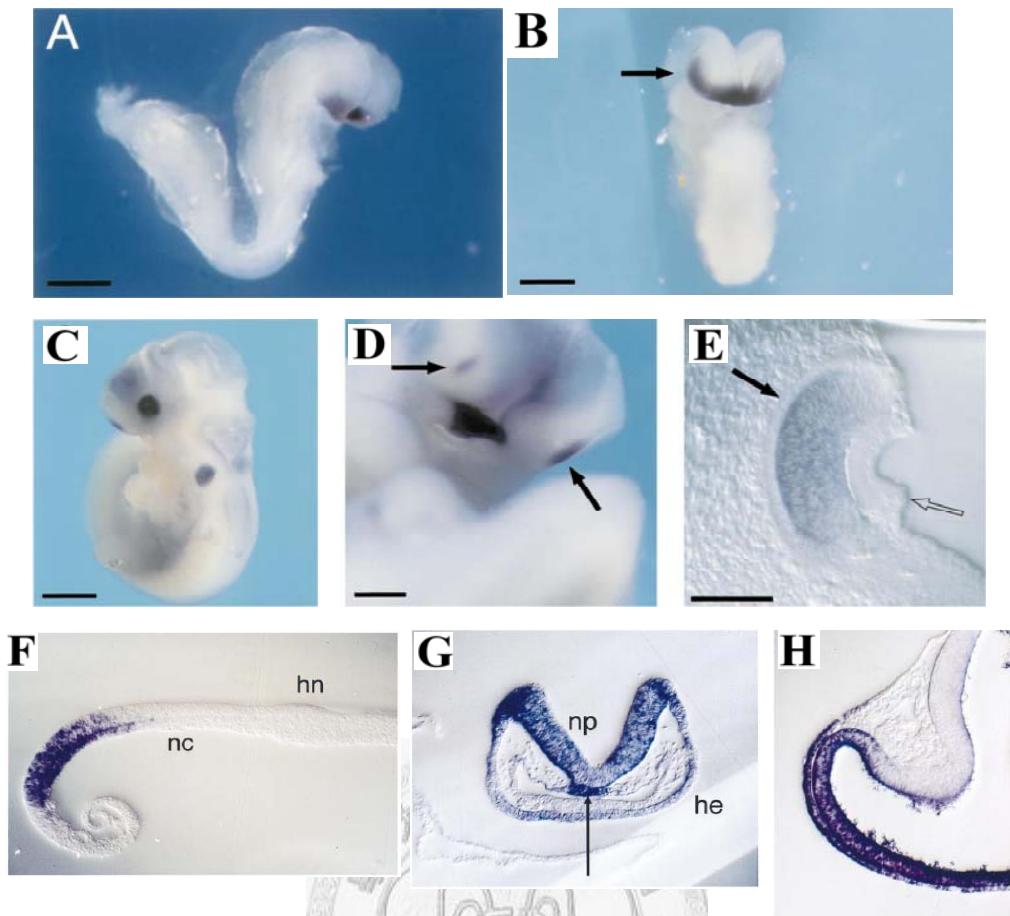
在小鼠早期發育第八天的胚胎(E8)，可觀察到 Six6 在神經板前端(neural plate)及間腦底層(floor of the diencephalon)表現，這個部位將來會形成腦下垂體神經部(neurohypophysis)和下視丘(hypothalamus)，此時在神經外胚層(neural ectoderm)和外胚層(surface ectoderm)都可以看到 Six6 的表現；E9.5 天會表現在腦下垂體與下視丘的軸線(presumptive pituitary/hypothalamic axis)以及視柄(optic stalk)和未來形成神經視網膜(neural retina)的腹側；E10.5 天在 Rathke's pouch、infundibular recess 及下視丘有表現(前兩者會形成腦下垂體，pituitary)；在發育中的眼睛，則會表現在神經視網膜、視神經(optic nerve)、視交叉(optic chiasma)和視柄(optic stalk)的部份，然而不會表現在水晶體(lens)或是水晶體基板(lens placode)，同樣這個時期在嗅板(olfactory placode)的前緣也有 Six6 的表現；E15.5 天當腦下垂體已經開始成熟，Six6 會表現在下視丘、Rathke's pouch 與腦下垂體神經部(Jean et al., 1999; Toy and Sundin, 1999)。在成熟的小鼠視網膜 Six6 mRNA 可以在 ganglion cell layer 和 inner nuclear layer 測得(Toy and Sundin, 1999) (見附圖四、附圖五、附圖六)。



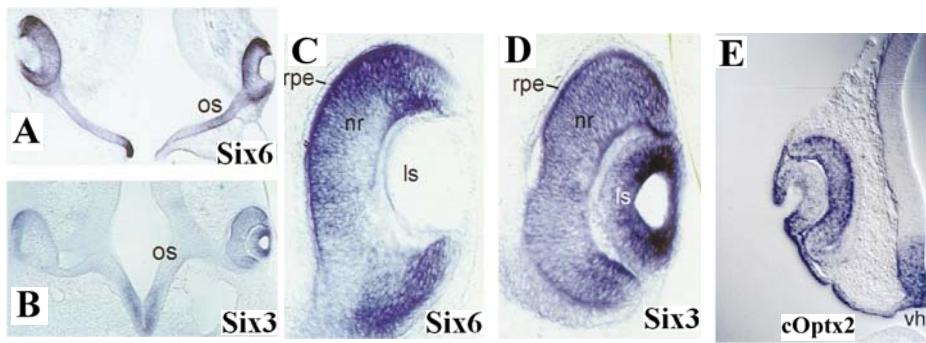
Six6 同源基因在不同物種的表現型態也相近似，雞的 Optx2 (Six6)基因可以於第四期原腸胚(stage 4 gastrulas)在前脊索的中胚層(prechordal mesoderm)發現；到第五期原腸胚表現在前脊索板的中胚層(prechordal plate mesoderm)和外胚層(epiblast)的卵形結構對應於將來變成眼部構造。神經板時期(neural plate stage) Optx2 基因會在頭部外胚層前腦和前脊索板的中胚層表現。當神經管閉鎖之後 Optx2 mRNA 會在視囊(optic vesicle)和前腦腹側觀察到。早期的水晶體基板(lens placode)有強烈的 Optx2 表現，之後中心的表現量會降低，這點與小鼠的表現很不同。而且雞的 Optx2 會在成熟神經視網膜每一層已分化的細胞和神經母細胞(neuroblast)表現(Toy and Sundin, 1999; Toy et al., 1998) (見附圖五、附圖六)。



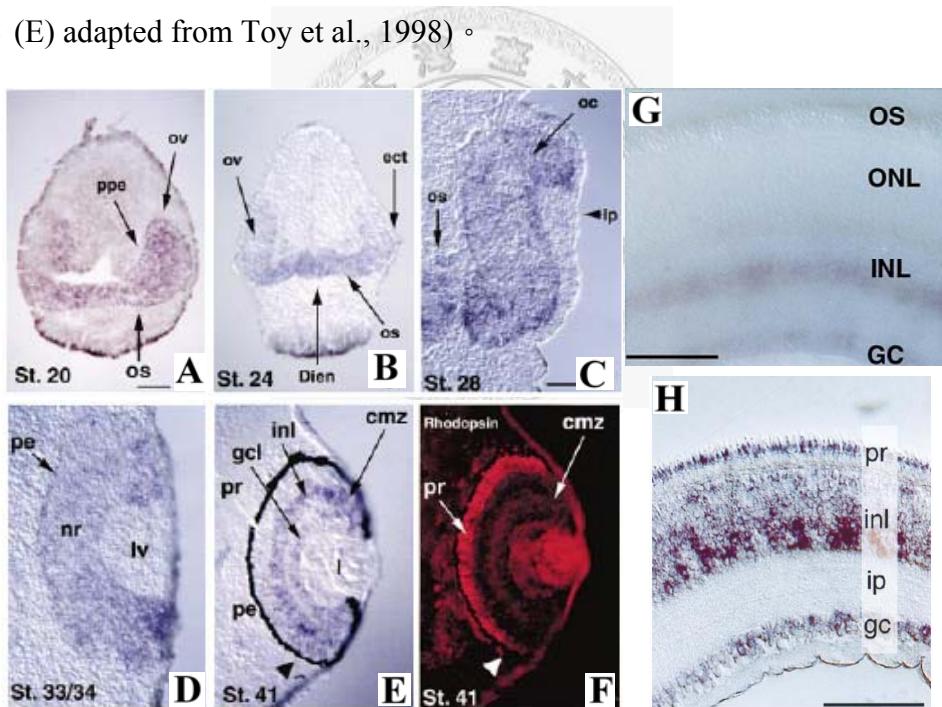
附圖四、小鼠 Six6 的表現位置(A)小鼠 Six6 表現在前腦腹側(五對體節時期，腹面觀)；(B)圖(A)的放大，顯示表現侷限在間腦底層(白色箭頭)及將來視柄的腹側；(C)~(G) E9.5 天；(C)表現在將來腦下垂體與下視丘的軸線(白色箭頭)及嘴側(r)和尾側(c)的視囊腹側(黑色箭頭)(正面觀)；(D)(F)Six6 表現只有在視柄(黑色箭頭)和視囊(白色箭頭)的腹側；(E)(G) Six3 表現比 Six6 在更延伸到前腦嘴側(端腦)還有整個視柄和視囊；(H)~(L)小鼠 Six6 表現在 pituitary/hypothalamic axis。(H)~(J) E10.5 天小鼠胚胎由前往後的連續切片。可以觀察到 Six6 表現在下視丘(hypothalamus, ht)、infundibular recess (inf) 和拉特克囊(Rathke's pouch)未來分別形成腦下垂體的 neural component(後葉)和 non-neural component(前葉)；(K)(L) E10.5 天小鼠胚胎橫切面與矢狀切面，發現會表現在嗅板(olfactory placode)與前腦部分且不會延伸超過 rostral neural pore (rnp) (adapted from Jean et al., 1999)。



附圖五、小鼠(A)~(E)，雞(F)~(H) Optx2/Six6 的表現位置。(A) E8.25 天(側面觀)，表現在神經板的前端與頭部外胚層；(B) E8.5 天(正面觀)，發現訊號在大腦腹側與視囊(optic visicle，箭號)；(C)~(E) E10.5 天；(C) (側面觀，頭部朝左)在眼睛與嗅板(nasal placodes)有表現，端腦(telencephalon)與聽囊(otic visicle)則是人為造成；(D) (腹面觀) 表現在嗅板(nasal placodes) (箭號)、buccal roof/optic chiasm 和 entrance to 拉特克囊(Rathke's pouch)；(E)眼睛的橫切面，只有在神經視網膜有得到訊號，色素上皮層(pigment epithelium，箭號)和水晶體板(lens placode，白色箭號)都沒有表現；(F)雞胚胎 HH5 (矢狀切面，頭部朝左)表現在 prechordal mesoderm 與覆蓋眼睛的外胚層；(G) HH5，(神經摺時期，橫切面)表現在神經板、頭部外胚層和 prechordal mesoderm(箭號)；(H) HH12(橫切面，中線在右) Optx2/Six6 表現在視囊末端與腹側和前腦腹側。視囊的神經外胚層與覆蓋眼睛表面的外胚層(即水晶體板，lens placode)在這個時期都會表現。((A)~(E)adapted from Toy and Sundin, 1999；(F)~(H) adapted from Toy et al., 1998)



附圖六、Six3 與 Six6/Optx2 基因在眼睛的表現。(A)~(D)E11.5 天小鼠胚胎，(冠狀切面)，Six6 會表現在神經視網膜(nr)和視柄(optic stalk, os)。可是不會表現在水晶體(le)與視網膜色素上皮細胞(rpe)；Six3 則是會表現在整個視覺系統。在此之前 Six3 不曾被證實會在 rpe 表現，可能是因為在這些細胞的表現量相對較低的關係；(E)雞胚胎 HH16 (橫切面)，水晶體板中心的表現量降低，另外表現在視網膜、下視丘腹側及覆蓋其上的外胚層。((A)~(D)adapted from Jean et al., 1999；(E) adapted from Toy et al., 1998)。

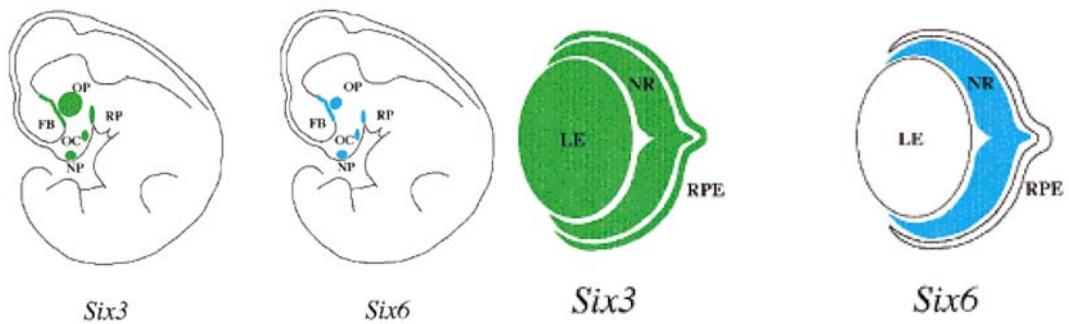


附圖七、(A)~(F)非洲爪蛙眼睛及胚胎時期 XOptx2 表現。(A)~(D)表現在前腦間腦的腹側(Dien)、視囊(ov)、視杯(oc)、神經視網膜(nr)、視柄(os)，可是不會表現在外胚層(ect)、水晶體基板(lp)和水晶體囊(lv)；(E) (F) XOptx2 會表現在(ganglion cell layer, gcl)和(inner nuclear layer, inl)，而且在視網膜腹側(箭頭部分)與(ciliary marginal zone, cmz)還未成熟的部份同樣會表現 XOptx2。(adapted from Zuber et al., 1999)

總而言之，雖然 *Six6* 基因的表現會在各個物種之間有些許差異，但是從這些報告可以看的出來，*Six6* 基因在神經板的時期就會開始表現，剛開始主要表現在間腦底層與神經板前端及頭部外胚層，然後會隨著眼睛和中樞神經系統的發育而在神經視網膜、視柄、嗅板、腦下垂體和下視丘表現。而根據目前報告的紀錄，在發育成熟的個體 *Six6* 基因至少會在神經視網膜的 *gcl* 與 *inl* 兩細胞層持續表現。

2、*Six3* 基因的表現型態

Six3 基因的表現型態與 *Six6* 基因相當的類似，可是在中樞神經系統和視覺系統的分佈普遍都比 *Six6* 基因還要更廣。相對於 E9.5 天小鼠 *Optx2* (*Six6*) 基因的表現，*Six3* 基因表現在整個視網膜板 (retinal plate)、視囊 (optic vesicle) 和未來要形成神經視網膜部位的腹側，並且延伸前腦的表現到喙部即端腦 (telencephalon) (Jean et al., 1999) (見附圖四)。在視覺系統的部份，E11.5 天的小鼠 *Six3* 基因會表現在整個視覺系統，包括神經視網膜、視柄與水晶體。而且視網膜色素上皮細胞也在 1999 年被 Jean 證實有 *Six3* 基因的表現 (見附圖六)。雞的 *Six3* 基因也和本身的 *Optx2* (*Six6*) 基因表現位置有些差別，在每一個原腸胚時期雞的 *Six3* 基因除了在早期神經板有少量的表現外並不會在其他地方有表現 (Toy et al., 1998) (見附圖五)。

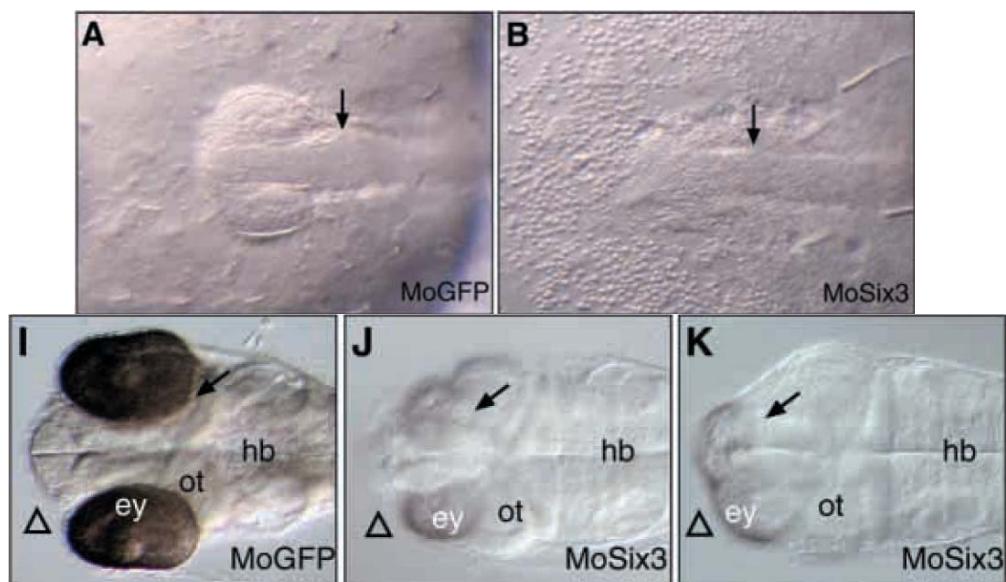


附圖八、*Six3* 基因與 *Six6* 基因的表現型態示意圖 (右側兩圖根據 E13.5 天的小鼠胚胎眼睛所繪)。兩者的表現型態很相似。FB, forebrain; NP, nasal placode; OC, optic chiasm; OP, optic vesicle; RP, Rathke's pouch; LE, lens; NR, neural retina; RPE, retinal pigmented epithelium. (adapted from Kawakami, K., 2000)

3、Six 基因在發育過程中的功能性分析與相關疾病

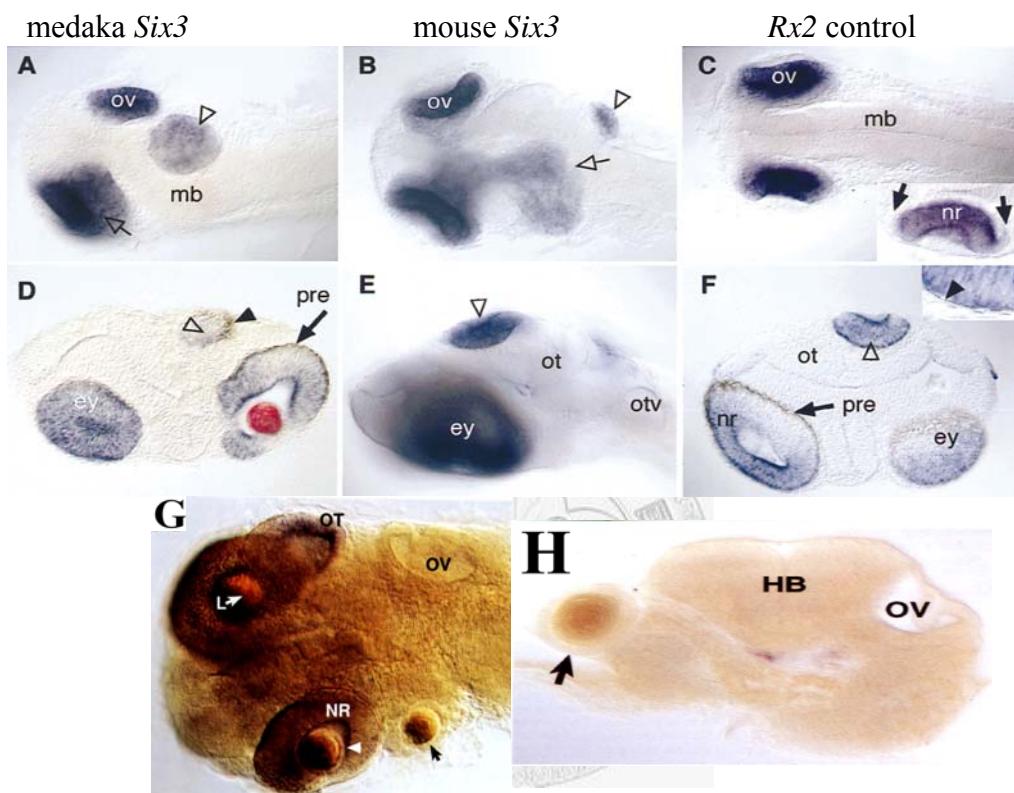
(1) *six3* 和 *six6* (*optx2*)相關的疾病

如果 Six3 基因產生突變則會導致人類的疾病全前腦發育不全症 (holoprosencephaly, HPE)，產生小腦畸形(microphthalmia)、大腦畸形或者其他顱顏發育不全的症狀(Wallis et al., 1999)。在 2002 年 Carl, M. 等人就利用 morpholino knock-down 的方式抑制 Six3 基因的功能，結果除了會導致一些與視網膜發育有關重要基因表現的抑制，還發現會導致喪失前腦和眼睛的組織。顯示 Six3 基因在前腦發育以及眼睛的形成扮演相當重要的角色(Carl et al., 2002)(見附圖九)。



附圖九、Six3 基因在視網膜與前腦的生成是不可或缺的。(A)(B)(六對體節時期，背面觀)相對於控制組 (A,MoGFP) 打入高劑量針對 Six3 基因的 morpholino 會導致頭部組織的喪失。(I)~(K)濃度不同的 morpholino 造成的結果有輕重之分。比較輕微的結果會形成比較小的眼睛(J)；而較為嚴重的則會出現 cyclopia 的外表型，還會失去前腦的結構。箭號指出視網膜組織失去的位置。三角形是代表喪失前腦的地方。ey, eye； hb, hindbrain； ot, optic tectum。(adapted from Carl et al., 2002)

將小鼠 Six3 基因的表現載體注射到青鰐魚，證明 Six3 基因有能力可以促使異位性視網膜與水晶體形成。顯示它對於視覺系統發育的重要性，以及這些發育相關的調控分子，即使經過長期的演化過程仍然在脊椎動物視覺系統的發育具有功能上保守性(Bernier et al., 2000; Loosli et al., 1999; Oliver et al., 1996) (見附圖十)。

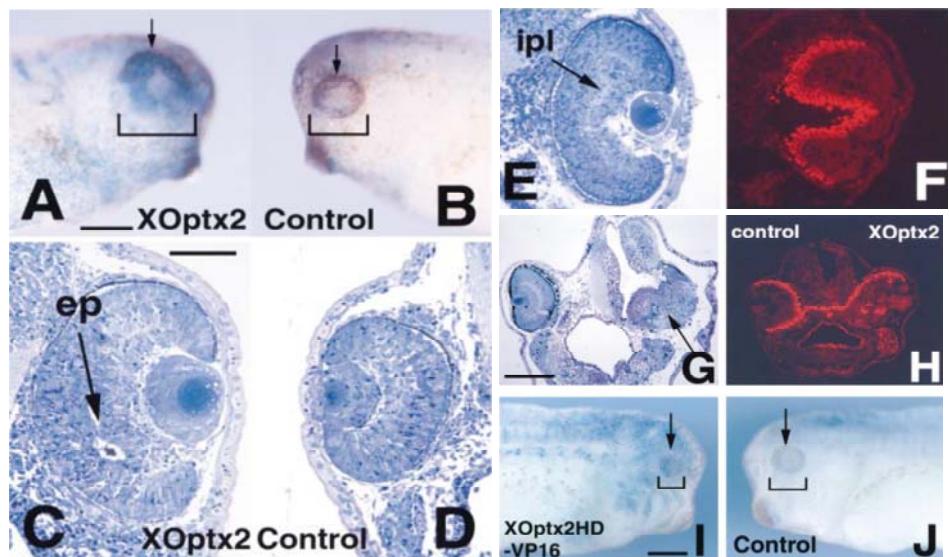


附圖十、((A)~(C)六對體節時期，背面觀)、相對於正常的胚胎，注射青鰐魚或小鼠 Six3 RNA 會造成 Rx2 的異位表現(Rx2 視網膜專一性表現基因，白色箭頭)或視網膜的過度生長(白色箭號)；(D)~(F)三十二對體節時期(D)(橫切面)白色箭頭指的是異位性視杯，黑色箭頭是異位性視網膜色素上皮細胞(pre)， α -A crystalline(紅色)標示正常眼睛水晶體的位置；(E)中腦背側出現類似視杯的構造(白色箭頭，側面觀)；(F)沿圖(E)白色箭頭位置的橫切面，異位性視杯(白色箭頭)；插圖：異位性視杯放大圖。(G) (H)可以觀察到異位性水晶體取代原本耳囊(ov)的位置(黑色箭頭)，whole mount in situ 顯示 tailless 表現在神經視網膜(NR)和 optic tectum(OT)，可是在異位性水晶體周圍沒有發現視網膜的形成。((A)~(F)adapted from Loosli et al., 1999；(G) (H)adapted from Oliver et al., 1996)

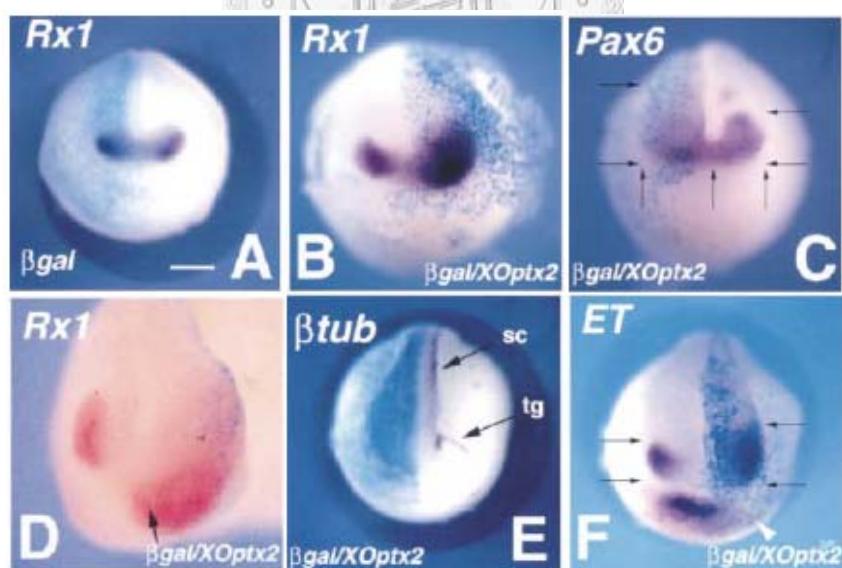
Zuber, M. E.等人將 XOptx2 RNA 注射到兩個細胞期分裂球 (blastomere) 的非洲爪蛙胚胎之中的一個細胞，結果發現經過處裡的一邊會形成較大眼睛，而且眼睛大小隨著劑量增加而變大。證據顯示這是因為視網膜細胞增生的結果，暗示 Optx2 在神經視網膜發育中所扮演的角色。再根據 XOptx2 可以使得早期視覺原基(eye primodium)的標示基因 Rx1 和 Pax6 的表現區域變大，或者誘導與眼睛形成和神經分化有相關轉錄因子 ET 的表現，可以說明在早期就已經影響眼睛的發育(Zuber et al., 1999)(見附圖十一、見附圖十二)。

之後，Bernier, G.等人又發現過度表現老鼠的 Six6 (Optx2)到非洲爪蛙胚胎可以使得神經板前端的組織轉型成為視網膜組織，而且會進一步長成類似眼睛的構造。同樣的結果在過度表現 Six3 與 XSix3 也有發現，似乎證明了 Six3 和 Six6 兩者之間有某些功能上的互補關係(Bernier et al., 2000) (見附圖十三、附圖十四)。另外實驗證實從七天大小鼠胚胎取出 retinal pigment epithelium (RPE)並且轉殖可以持續表現小鼠 Optx2 基因的載體培養兩天觀察，這些細胞表現神經視網膜和光受器(photoreceptor)專一性表現的標誌蛋白質 Chx10 和 visinin，並且表現出未分化神經上皮細胞的型態。可是 Six3、Pax6 以及 Eya2 並沒有上述的功能(Toy et al., 1998)。

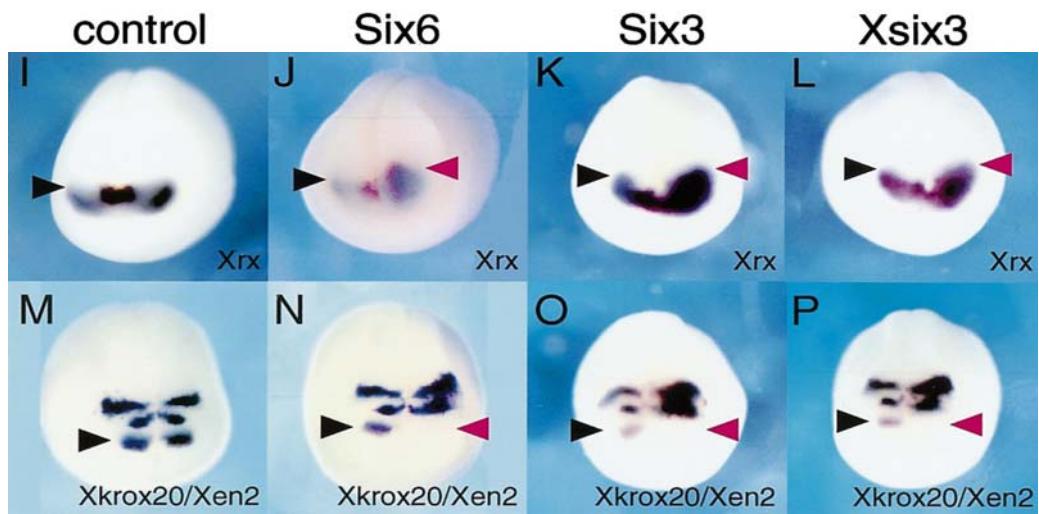
有報告指出，同型合子(homozygous)的 Six6 基因剔除(knockout)小鼠，發現會有腦下垂體發育不全(pituitary hypoplasia)、視網膜發育不全(retinal hypoplasia)和視神經與視交叉畸形等異常的外表型。可是這樣的症狀相較於先前 Gallardo M. E.等人所提出的，因為在人類第十四號染色體長臂 22.3 到 23 之間的缺失，造成 Six6 異型合子(即 Six6 haploinsufficiency，單套不全)就會產生雙側無眼畸形(bilateral anophthalmia)顯然輕微許多。再加上於 MAC (microphthalmia，anophthalmia 和 coloboma)病患身上發現的六種 Six6 基因多型性(其中三種還造成了胺基酸的改變)，在正常的個體也都可以發現。顯示會造成 MAC 痘兆可能還包含了其他基因的缺失，不應該只是因為 Six6 突變所致。(Aijaz et al., 2004; Gallardo et al., 1999; Kawakami et al., 2000)



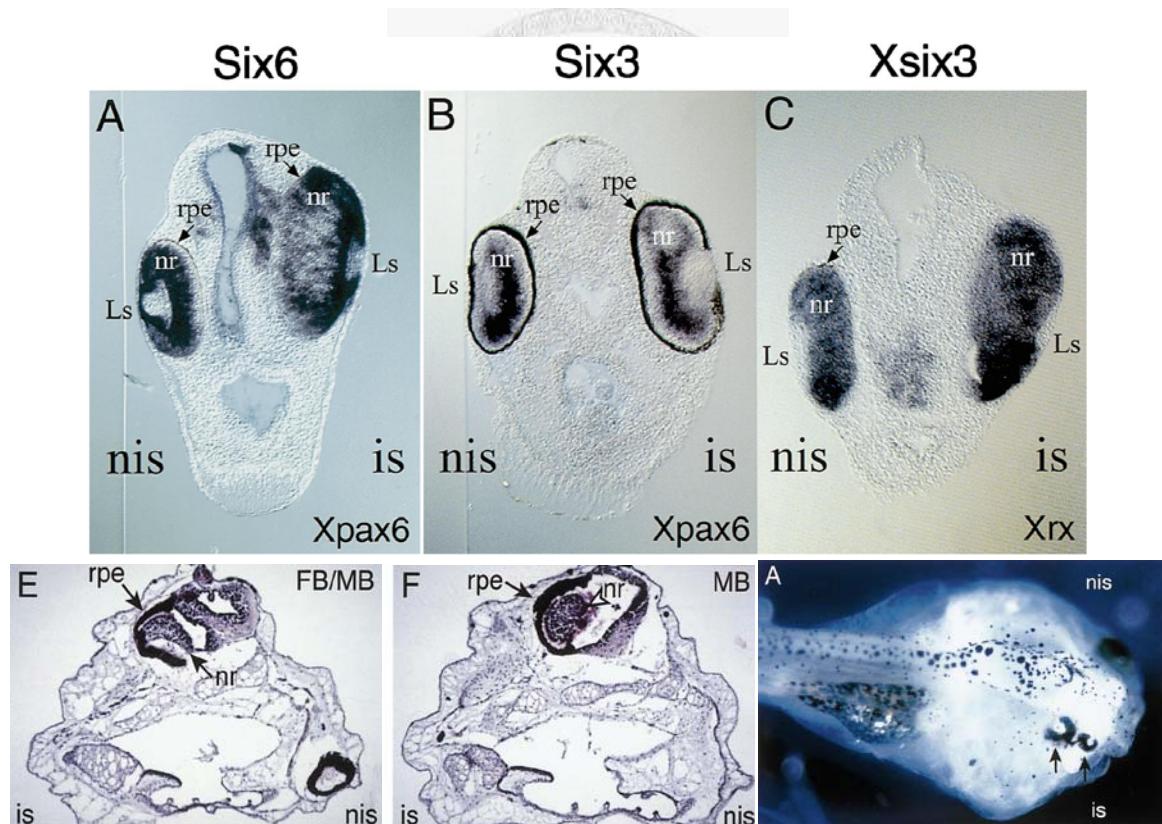
附圖十一、(A)~(D)XOptx2 注射過的胚胎，會形成比較大的眼睛；(E)~(H)XOptx2 引起視網膜的擴張與折曲，有些比較嚴重的會出現視網膜與前腦相鄰融合的現象；(I)~(J)改變 XOptx2 像是抑制蛋白的特性而融合一段活化蛋白的功能區，創造 XOptx2HD-VP16 融合蛋白。結果使得眼睛變得小。(F)(H) rhodopsin 免疫化學染色觀察光受器的分布情形。(adapted from Zuber et al., 1999)



附圖十二、相對於控制組(A)同時注入 XOptx2 的一側，會使得 *Rx1*、*Pax6* 和 β -*tub* (神經細胞的標示基因)的表現位置擴張(B)~(E)，還會誘導 *ET* 基因的表現(F)。(adapted from Zuber et al., 1999)

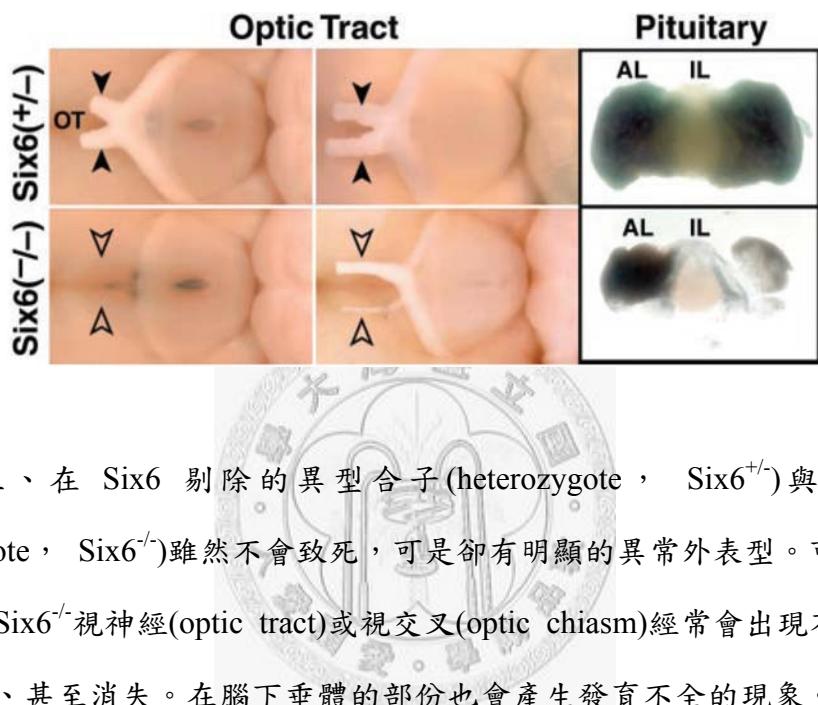


附圖十三、注射 Six6、Six3 和 Xsix3 會導致本來表現在前腦和眼睛的 Xrx (I)擴張到中腦的區域(J)~(L)；並且失去本來應該表現在中腦後腦交界的 Xen2 (M)~(P)。(adapted from Bernier et al., 2000)



附圖十四、(A)~(C)注射 Six6、Six3 和 Xsix3 會讓視網膜組織增大；(A)過度表現 Six6 誘發類似眼睛的構造發育；(E) (F)前腦中腦的部份發現異位性視網膜(nr)及視網膜色素上皮細胞的表現(rpe)。(adapted from Bernier et al., 2000)

一般認為在哺乳類動物器官形成的時候，會先讓一群多能性的前驅細胞增生，接著再進一步誘導分化成特定型態的細胞。可是調控這些前驅細胞增生的組織專一性分子機制仍然還沒有了解的很詳細。Li 等人發現到 Six6 似乎在早期發育階段扮演一種強力的組織專一性抑制者，可以調控視網膜生成與腦下垂體發育時前驅細胞的增生(Li et al., 2002)(見附圖十五)。



附圖十五、在 Six6 剔除的異型合子(heterozygote, $\text{Six6}^{+/+}$)與同型合子(homozygote, $\text{Six6}^{-/-}$)雖然不會致死，可是卻有明顯的異常外表型。可以發現在 $\text{Six6}^{+/+}$ 或 $\text{Six6}^{-/-}$ 視神經(optic tract)或視交叉(optic chiasm)經常會出現不同程度的發育不全、甚至消失。在腦下垂體的部份也會產生發育不全的現象。OT, optic tract ; AL, anterior lobe ; IL, intermedia lobe 。(adapted from Li et al., 2002)

(2) *so* 與 *optix* 的表現型態和兩者與果蠅眼睛發育的關係

在果蠅，Optix 基因於二齡幼蟲(L2)時期會表現在整個眼部，並且到三齡幼蟲(L3)時期會持續表現在前驅細胞，例如在形態形成溝(morphogenetic furrow，MF)之前的細胞(Kenyon et al., 2005; Seimiya and Gehring, 2000)。*optix* 表現侷限在 morphogenetic furrow 之前的細胞，而 *so* 則是在整的眼部都會表現，(Cheyette et al., 1994; Kenyon et al., 2005; Seimiya and Gehring, 2000; Seo et al., 1999)

果蠅共有三種 Six 基因家族成員：*so*、*optix/D-Six3* 和 *D-Six4*，雖然 *so* 沒有能力獨自在非視網膜組織引起眼睛的形成，可是單獨表現 *optix* 在 antennal disc 却足以引起視網膜的發育(Seimiya and Gehring, 2000; Weasner et al., 2007)。在此也暗示了這些基因在眼睛發育各有不同的角色，也可以從他們所表現的位置看出端倪。。*D-Six4* 不會表現在視網膜，因此認為他不會和眼睛發育有關，可是卻發現他在肌肉和生殖腺發育具有功能(Kirby et al., 2001)。

So 與 *optix* 雖然同樣是果蠅 Six 基因家族的成員，可是就其胺基酸序列的系統演化分析結果，顯示他們分屬於不同的次家族。兩者 Six-type HDs 與 DNA 結合的專一性還沒有詳細定義出來，卻可以根據他們個別次家族成員所結合的輔助因子判斷可能結合的序列特徵，So 與 *optix* 之結合序列特徵分別是 CG rich motif 和 ATTA-type motif。這也暗示了他們所調控的標的基因是不完全相同的(Kenyon et al., 2005)。

三、研究動機

綜合上述關於 Six6 基因文獻的論述，發現在演化過程被保留下來的 Six6 基因從低等生物海鞘直到人類都存在。Six6 會表現在許多地方，例如：小鼠胚胎時期的神經板前端與間腦底層，此時在外胚層及神經外胚層都有 Six6 的表現。在胚胎發育晚期下視丘、腦下垂體前葉及視覺系統，以至於到成體的神經視網膜都可以看到 Six6 的表現。雖然與同家族的成員 Six3 基因表現型態相近似，但是在先前功能性分析結果證實兩者在發育的角色是不太相同的。

我從 NCBI 網頁初步的資料蒐集無法找到斑馬魚基因體中 Six6 基因的同源基因，推測應該是在斑馬魚的資料庫中尚未被清楚定義出來。所以我們希望可以藉由完整的資料搜尋與比對，以便找到斑馬魚 Six6 的同源基因，並更進一步分析 Six6 基因的調控機制。

許多研究都指出在演化過程中，如果特定的序列對於基因調控的機制是具有其功能性的，就會在許多物種間被保留下來，形成保守的序列(conserved sequence)。例如在 2005 年由 Jeong 等人的研究中發現，如果將小鼠、雞以及非洲爪蛙等物種的 *Shh* 基因上游序列與人類 *SHH* 基因上游的序列的位置作比對，發現到在人類 *SHH* 基因上游 400 kb 的位置，在各物種間有保守序列(conserved sequence)片段。經過進一步的分析研究，發現在這些保守序列中可以區別出 3 個調控 *Shh* 基因在前腦表現的加強子(enhancer)。由這個例子可以發現演化上保守的序列片段可能具有控制基因在組織專一性表現之功能，並且透過不同或相似的加強子(enhancer)，能驅動基因在胚胎中表現出完整的組織表現型態(Jeong et al., 2006)。

因此，本論文之主要目的在基因體中尋找斑馬魚 Six6 基因的同源基因，並且在其上下游的 DNA 序列中，找尋是否具有在物種之間的保守序列(conserved sequence)DNA 片段，並且進一步探討其保守序列是否具有調控組織專一性表現的順式調控因子(cis-regulatory element)存在。

貳、實驗材料

一、菌株

(1) *E. coli* (XL-1 blue)

二、細菌培養液及培養基

(1) Luria Broth 粉末(LB)

稱 LB 粉末 25 g，補足去離子水至體積為 1 L，滅菌後備用。

(2) Ampicillin LB

稱 LB 粉末 25 g，補足去離子水至體積為 1 L，滅菌後待其冷卻至室溫後，再加入 1000X 的 Ampicillin (100 mg/ml) 1 ml。

(3) Ampicillin LB plate

稱 LB 粉末 25 g 及 agar 20 g，補足去離子水至體積為 1 L，滅菌後冷卻至 40°C，再加入 1000X 的 Ampicillin 1 ml，趁熱倒入塑膠培養皿備用。

(4) Kanamycin LB

稱 LB 粉末 25 g，補足去離子水至體積為 1 L，滅菌後待其冷卻至室溫後，再加入 1000X 的 Kanamycin (50 mg/ml) 1 ml。

(5) Kanamycin LB plate

稱 LB 粉末 25 g 及 agar 20 g，補足去離子水至體積為 1 L，滅菌後冷卻至 40°C，再加入 1000X 的 Kanamycin 1 ml，趁熱倒入塑膠培養皿備用。

三、轉形勝任細菌之製備溶液

(1) TFB I

稱 1.21 g 的 RbCl_2 、0.81 g 的 MnCl_2 、0.29 g 的 potassium-acetate、1 ml 的 1 M CaCl_2 及 15 ml 100%的甘油，補足去離子水至體積為 100 ml，再用 0.2 M 的 acetic acid 校正至 pH 5.8，過濾去菌後使用。

(2) TFB II

稱 1.21 g 的 RbCl₂、0.29 g 的 MOPS、7.5 ml 的 1 M CaCl₂ 及 15 ml 100% 的甘油，補足去離子水至體積為 100 ml，再校正為 pH 5.8，過濾去菌後使用。

四、大量或小量質體製備所需溶液

(1) Solution I (TEG)

取 glucose 9 g、25 ml Tris HCl (1 M pH 8.0) 及 EDTA 3.72 g，補足去離子水至體積為 1 L。

(2) Solution II (alkaline SDS)

取 10 N NaOH 20 ml 及 10% SDS 100 ml，補足去離子水至體積為 1 L。

(3) Solution III (high salt)

稱 KAc 176.64 g 溶於 360 ml 的去離子水中，再加入 acetic acid 69 ml 後，補足去離子水至體積為 600 ml。

(4) 1X TE

10X TE (1 M Tris pH 7.5 取 100 ml 加上 0.5 M EDTA 取 20 ml 補去離子水至 1 L) 稀釋 10 倍即可。

(5) 平衡重量用溶液

依每 3.4 ml 的 1X TE 加上 4.2 g 的 CsCl 之比例調配。

(6) STET

加入 0.1 M NaCl 20 ml、10 ml Tris (10 mM pH 8.0)、1 mM EDTA 2 ml 及 5% Triton (X100) 50 ml 後，再補足去離子水至 1 L。

五、製備斑馬魚 gemonic DNA 所需之溶液

(1) Tail buffer

取 100 ml milli Q water，分別加入 10 ml 5 M NaCl、25 ml pH 8.5 Tris、2.5 ml 0.5 M pH 8 EDTA 以及 5 ml 10% SDS，最後補足 milli Q water 至總體積為 250 ml。

六、製備斑馬魚 total RNA 所需之溶液

(1) Guanidium solution

取 200 g Guanidium、200 ml milli Q water、21.2 ml 的 1 M Tris (pH 7.6)、8.48 ml 的 0.5 M EDTA、42.4 ml 的 20% Sarcosyl、4.2 ml 的 β -mercaptoethanol，混勻後即可。

七、Whole-mount *in situ* hybridization 所需之溶液

(1) BT-Fix

取 1000 ml 血清瓶，先加入 300 ml 去離子水，再分別加入 40 g Sucrose、1 M 的 CaCl_2 120 μl 、0.2 M 的 NaH_2PO_4 115 ml、0.2 M 的 Na_2HPO_4 385 ml、40 g paraformaldehyde，再以去離子水補足總體積至 1000 ml，混勻後，可以 90°C 加熱 10 分鐘幫助溶解，儲存於-4°C 備用。

(2) 1X PBS

先配置 10X PBS，方法為：稱取 2 g KCl、2 g KH_2PO_4 、80 g NaCl、11.44 g Na_2HPO_4 ，再以去離子水溶解，補足總體積至 1000 ml，最後以 pH meter 調整溶液之 pH 值為 7.4。1X PBS 則取 10X PBS 並以 9 倍體積的去離子水稀釋即可。

(3) PTW

取 500 ml 之 1X PBS 加入 5 ml 10%的 Tween-20，混勻後即可。

(4) *In situ* hybridization buffer

取 100%的 Formamide 25 ml、12.5 ml 的 20X SSC、2.5 ml 的 yeast RNA(10 mg/ml)、50 μl 的 heparin (50 mg/ml)、0.5 ml 的 10% Tween-20、0.45 ml 的 1 M Citric acid，其餘以去離子水補足總體積至 50 ml，混勻後，儲存於-20°C 備用。

(5) Wash I buffer

取 200 ml formamide、20 ml 的 20X SSC、4 ml 的 10% Tween-20，
補足去離子水至總體積為 400 ml 即可。

(6) Wash II buffer

取 40 ml 的 20X SSC 和 4 ml 的 10% Tween-20，補足去離子水至總體積為
400 ml 即可。

(7) Wash III buffer

取 4 ml 的 20X SSC 和 4 ml 的 10% Tween-20，補足去離子水至總體積為
400 ml 即可。

(8) Blocking buffer

取 5 ml 的 10X PBS、0.5 ml 的 10% Tween-20、2.5 ml 的 Sheep Serum、1 ml
的 BSA (100 mg/ml)、0.5 ml 的 100% DMSO，其餘以去離子水補足總體積
至 50 ml，混勻後，儲存於-20°C 備用。

(9) Staining buffer

此溶液宜新鮮配置使用，方法為：取 5 ml 的 1M Tris (pH 9.5)、2.5 ml 的
1M MgCl₂、1 ml 的 5 M NaCl、0.5 ml 的 10% Tween-20，其餘以去離子水
補足總體積至 50 ml，混勻後，儲存於-20°C。

(10) Stop solution

取 50 ml 的 10X PBS、1 ml 的 0.5 M EDTA 和 5 ml 的 10% Tween-20，補
足去離子水至總體積為 500 ml 即可。

八、質體

(1) pGEM-T Easy vector (Promega)

(2) pEGFP1 vector (Clontech)

九、引子

編號	命名	5'-序列-3'
<hr/>		
(1)	PCR 複製斑馬魚 Six6.1 基因上游啟動子片段使用之引子。	
(1-A)	[Six6-44Eco] (-1199~-1173)	$5' \text{- } \underline{\text{GGGAATTCTATAATCGGAGCTACGGGC}} \text{ -3'}$ (底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 <i>Eco</i> R I site)
(1-B)	[Six6-44Bam] (+177~+204)	$5' \text{- } \underline{\text{CCGGATCCAGACAAAAAGGCAATTCCAG}} \text{ -3'}$ (底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 <i>Bam</i> H I site)
(2)	PCR 複製斑馬魚 Six6.2 基因上游近端啟動子片段使用之引子	
(2-A)	[Six6-71Eco] (-728~-701)	$5' \text{- } \underline{\text{TAGAATTCTGATTATCTTGCCCGAGAAG}} \text{ -3'}$ (底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 <i>Eco</i> R I site)
(2-B)	[Six6-71Bam] (+140~+165)	$5' \text{- } \underline{\text{TTGGATCCTCCTGTCTGGTGCTGTTCC}} \text{ -3'}$ (底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 <i>Bam</i> H I site)
(3)	PCR 複製斑馬魚 Six6.1 基因 3'UTR 片段使用之引子	
(3-A)	[Six6-44-3UTRN]	$5' \text{- } \text{TAACATCGCACCAACGAACCGCCCCG} \text{ -3'}$
(3-B)	[Six6-44-3UTRC]	$5' \text{- } \text{ACGGGACAAGATGACATCCAAACCG} \text{ -3'}$
(4)	PCR 複製斑馬魚 Six6.2 基因 3'UTR 片段使用之引子	
(4-A)	[Six6-71-3UTRN]	$5' \text{- } \text{TAACGTGACAGGCTTCAAAAGAGCA} \text{ -3'}$

(4-B) [Six6-71-3UTRC]

5'- CCCAGAAATTCA CGAC GCG CAGC AT -3'

十、實驗動物

斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)

十一、實驗動物用藥品

(1) PTU (N-Phenylthiourea)

(Sigma No. P7629)

stock solution 0.03%，0.3 公克溶於 1 公升去離子水中，成為 10X 之 stock solution。

作用：抑制黑色素(melanin)的合成

(2) MS-222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt)

(Sigma No. A5040)

stock solution 2%，取 1 公克溶於 50 毫升去離子水中，成為 1000X 之 stock solution。麻醉所需濃度：成魚(0.02%)，斑馬魚胚胎(0.006%)。

作用：麻醉實驗用斑馬魚(成魚：0.02%，幼魚：0.006%)

(3) Methyl cellulose

(Sigma No. M-0387)

取 4 公克溶於 200 毫升的冷水中，攪拌均勻，之後放置於 4 度 C 冰箱待其緩慢溶解，最後配製成 2% Methyl Cellulose。

作用：使斑馬魚處於活體狀態並防止拍照時的移動

十二、顯微注射裝置(microinjection)

顯微注射儀(Femtojet, Eppendorf)

十三、螢光顯微鏡照相系統

(1) 螢光顯微鏡(Fluorescence Microscope, SMZ 1500, Nikon)

(2) 螢光影像擷取系統(Pixera, Pro 150ES, Viewfinder3.01)

(3) 倒立螢光顯微鏡(Inverted Fluorescence Microscopy ,Olympus IX71)

參、實驗方法

一、重組質體構築之步驟

(1) 斑馬魚 genomic DNA 之萃取

收集斑馬魚 5 dpf 之幼魚約 200 隻，放入 1.5 ml tube，再加入 500 μ l Tail buffer 以及 30 μ l Protease K (10 mg/ml)，混合均勻後，水平放置並在 57°C 的恆溫箱搖晃 overnight。隔日後，離心 12000 rpm、10 mins，再以 Tip 將含有 genomic DNA 的黏稠上層液吸出至另一新的 tube，以 phenol chloroform、chloroform 萃取 2 次，之後加入 1 ml 100% EtOH 進行酒精沉澱，離心 12000 rpm、10 mins，去除上清液即得 pellet，將 pellet 乾燥後，最後加入 100 μ l 去離子水在 4°C 溶解 overnight。

(2) 斑馬魚胚胎 Total RNA 之萃取

收集足量斑馬魚 1 dpf、2 dpf、3 dpf 之胚胎，加入等體積之 Guanidium 溶液 (4 M Guanidium thiocyanate, 0.1% Sarcosyl, 0.1 M DTT) 以溶解斑馬魚胚胎，並保持在 4°C 狀態下研磨，每次研磨 5 sec 後需放置冰塊中再冰浴 30 sec，重複三次 (研磨後之總體積不可超過 8.7 ml，若不足者須補至 8.7 ml)，再離心 3000 rpm、10 mins (目的：使卵膜沉澱)；再將離心之研磨液加到已置入 3 ml 5.7 M CsCl 的離心管 (Centrifuge Tube，14 x 89 mm，Beckman) 中，將每管重量平衡後，以超高速離心 (Rotor: SW41，35k rpm，25°C，overnight)，使 RNA 通過底層 5.7 M CsCl 溶液，沈澱於離心管底層。隔天取出後，用剪刀將離心管 (從最底層算起約 3 公分處) 迅速剪斷並同時將液體倒出 (只留下最底層 RNA pellet，為透明圓形狀)，再以 200 μ l 去離子水溶解 RNA 2 次，使總體積為 400 μ l，繼而以 phenol/chloroform 萃取三次 (每次 200 μ l)，經離心取上層液，最後一次以 chloroform 萃取兩次 (每次 200 μ l) 後，再以 0.1 倍體積的 3 M NaAc 以及 2.5 倍體積的 100% 酒精於 -20°C 至少沈澱 30 分鐘，高速離心 (14000 rpm、

15 ~ 20 mins) 取得沈澱物後，再加入 100 μ l 80% 酒精，浸泡 30 秒、離心 (14000 rpm、1 min)，抽除上層酒精，最後將沈澱物 (即是 RNA) 溶解於 DEPC-H₂O，定量後保存於 -20°C (Chomczynski *et al.*, 1987)。

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

以 PCR 方法放大斑馬魚特定基因之 cDNA 或 genomic DNA 片段，兩者分別以斑馬魚 cDNA (1 dpf、2 dpf、3 dpf) 及 genomic DNA 為模版，加入所設計之引子對(各取 100 ng)，再添加 10 μ l 10X Taq DNA polymerase buffer、1 μ l 25 mM 的 dNTP mix (dATP、dTTP、dCTP、dGTP 混合液)及 1 μ l Taq DNA polymerase (Takara)，最後補足去離子水至體積為 100 μ l，混合均勻後，於 PCR 儀器進行下列反應：先 94°C 加熱 5 mins、再重複 denaturing (94°C、1 min)、annealing (55°C、1 min) 及 elongation (72°C、2 mins)，共 25 個循環數(視引子對的 T.M. 值及片段長度來更改作用溫度及循環數)。之後將 PCR 產物各取 5 μ l，經洋菜膠(agarose gel)電泳分析是否得到預期之片段。

(4) 限制酵素作切割反應

將 PCR 產物先經由洋菜凝膠電泳分析以評估其量，再分別以所需作用的目標限制酵素作切割，每 μ g 的 DNA 加入 5U 的限制酵素及 1 μ l 的 10X NEB buffer，再補足去離子水到體積為 10 μ l 止，在 37°C 下反應 3 小時後再經洋菜凝膠電泳分析及可得其相對的限制酵素圖譜。

(5) DNA 片段的純化(gel elution)

將上述 PCR 產物或經酵素切割後的 DNA 片段，利用洋菜膠電泳分離各片段 DNA，再將預期大小之片段切下，裝入含有 0.5X TBE 之透析膜內，將透析膜兩端封緊後，放入電泳槽中電泳 100V、30 分鐘，在紫外燈下檢查 DNA 是否完全泳出，之後再將透析膜內的片段 DNA 溶液吸出，完成 gel elution 的步驟。

(6) DNA 產物的萃取(DNA extraction)

取 PCR 產物、酵素切割或片段純化後的 DNA 溶液，加入 1/3 倍體積之 phenol-chloroform (1:1)，震盪均勻後，離心 12000 rpm、5 mins，吸取上清液至另一新的 1.5 ml tube，重複兩次後，再以 1/3 倍體積之 chloroform 萃取一次，最後，取上清液並加入 2.5 倍體積之 99% 酒精及 0.1 倍體積之 NaAc，冰浴 20 mins 進行酒精沈澱，再以 4°C 低溫離心 12000 rpm、10 mins，去除上清液即得 DNA 沈澱，乾燥後，加入適量的去離子水溶解之。

(7) 接合反應(ligation)

將 DNA 片段 cloning 至 pGEM-T Easy vector 或 pEGFP1 vector 內，方法為：取適量 insert 片段 DNA 溶液，加入適量 vector DNA 溶液(insert : vector = 3 : 1)，以及 1.2 μ l 10X ligase buffer、1 μ l dATP (10 mM)，其餘補水至總體積為 11 μ l，混和均勻後，乾浴 45°C、5mins，待其回復至室溫後，再加入 1 μ l ligase，靜置室溫下，反應 overnight。

(8) 勝任細菌(competent bacteria)之製備

將一株單一菌落的菌 (XL-1 blue) 以 20 ml 的 tetracyclin LB 養到隔夜(37°C, 280 rpm)，再將隔夜的 LB 抽 0.5 ml 養在 7 ml 的 LB 中(37°C, 280 rpm)，待其 O.D. 值 (波長為 600 nm) 達 0.3 時，再抽其中的 5 ml 到已在 37°C 下預熱 100 ml 的 LB 中培養 (37°C, 280 rpm)，當其 O.D. 值 (波長為 600 nm) 達 0.48 時將之放入冰中冷卻，在 4°C 下離心 5000 rpm 10 分鐘，去掉上清液後加入 30 ml 已預冷的 TFB I，在冰中使其反應 1 至 2 個小時，在 4°C 下離心 5000 rpm 10 分鐘，去掉上清液後加入 4 ml 已冰浴過的 TFB II，分裝在已預冷的 1.5 ml 離心管，每管裝 0.2 ml，用液態氮急速冷凍後放入-130°C 以備使用。

(9) 大腸桿菌之轉型(Transformation)

自 -130°C 冰箱中取出一管 XL-1 轉型勝任細胞(200 μ l)，放置冰上，待其解凍後，吸取此菌液至前述 DNA 接合反應後的產物中，混和均勻後靜置冰上 30 分鐘，再以 42°C、2 分鐘熱休克處理(heat shock)，放置冰上 5 分鐘。將混合液置入含 400 μ l LB 的養菌管中，在 37°C 中培養 30~45 分鐘 (搖動速度 280 rpm) ，培養後，再加入 400 μ l 含抗生素 LB。將菌液等量地倒入兩片含抗生素 LB 培養基中，左右搖動使菌液均勻地分布在培養基上，烘乾後置入 37°C 恆溫箱培養隔夜。

(10) 質體小量製備

利用 200 μ l tip 尖端沾抹轉型成功的菌落至另一片新的抗生素 plate 上，隔夜培養，次日後，再以 200 μ l tip 沾取部分菌落，連同 tip 投入裝有 3 ml 含抗生素 LB 的 10 ml 養菌管中，以 37°C、280 rpm 培養 15 小時，將菌液用 12000 rpm 離心 10 分鐘，去掉上清液，再加入 300 μ l 的 STET 及 2 μ l 的 lysozyme (100 μ g/ μ l) ，在 37°C 中反應 10 分鐘後，用 100°C 的沸水煮菌 1 分鐘整，再迅速地浸到冰水中冷卻，震盪均勻後，12000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液並加入 0.1 μ l 的 RNase (10 μ g/ μ l)，37°C 作用 10 分鐘以去除 RNA，最後進行 DNA 萃取之步驟，即得質體 DNA 沈澱，以適量去離子水(50 μ l)溶解之，可作為酵素切割確認或定序之用。

(11) 限制酵素檢驗質體 DNA 之正確性

從預期得到的重組質體圖譜中尋找適當的切位，取適量重組質體 DNA，加入選定之限制酵素，1 μ g DNA 配合 3U 之酵素，37°C 作用 3 小時，最後再以洋菜凝膠電泳分析 DNA 片段的大小，以確認重組質體 DNA 之正確性。

(12) 重組質體 DNA 之定序

取純化後之重組質體 DNA (1.0 μ g)，加入 100 ng 之引子，剩餘體積補去離子水至 7 μ l，填寫定序單之後，委託台大醫院第二共同研究室定序。

(13) 質體大量製備

大量製備(maximum preparation)經限制酵素或定序確認所得之正確的重組質體，方法為：以 1000 μ l tip 尖端沾取部分菌落，連同 tip 投入裝有 200 ml 含抗生素 LB 的錐形瓶中，37°C、280 rpm 培養 16~18 小時，以 5000 rpm 離心 10 分鐘，去上清液後加入 4 ml 的 solution I，劇烈震盪，使菌完全懸浮在溶液中，再加入 50 μ l 的 lysozyme (100 μ g/ μ l)，室溫下作用 10 分鐘後，加入 9 ml 的 solution II，混勻後靜置室溫作用 5 分鐘，加入 4.5 ml 的 solution III 混勻後靜置室溫作用 10 分鐘，再以 5000 rpm 離心 10 分鐘，以濾紙過濾上清液，所得之濾液裝入 50 ml Falcon tube，加入 2.5 倍體積的 99% 酒精，靜置冰上酒精沈澱 30 分鐘，最後以 3000 rpm 離心 8 分鐘去除上清液，即得沉澱物，再加入 3.4 ml 的 1X TE、4.2 g 的 CsCl 及 50 μ l 的 1000X EtBr，混合均勻後，以 3 ml 注射用針將上述的溶液移到超高速離心管 (13×51 mm、Beckman) 中，再以平衡液(3.4 ml 1X TE / 4.2 g CsCl)補充，使液面至離心管頸部，秤重平衡後，以封口機(Beckman)封口，用 59000 rpm、25°C 超高速離心到隔夜。次日，使用 3 ml 注射用針抽取位於離心管中間的紅色質體區域，將溶液裝入透析袋中隔水透析，以去除 CsCl，再將透析液取出並加入 0.25 倍體積的 phenol-chloroform (1:1) 激烈震盪，12000 rpm 離心 5 分鐘後，取上清液至另一新的 1.5 ml tube，重複 4 次以去除 EtBr 及 protein，之後取上清液加入 5 μ l 的 RNase (10 μ g/ μ l) 在 37°C 下作 20 分鐘，加入 0.25 倍體積的 chloroform 萃取二次，再加入 0.1 倍體積的 3 M NaAc (sodium-acetate) 及 2.5 倍體積的 99% 酒精，置入-20°C 冰箱酒精沈澱 30 分鐘，在 4°C 下以 12000 rpm 離心 10 分鐘後去掉上清液，加入適量的去離子水溶解之，最後，稀釋此 DNA 溶液，利用分光光度儀

(spectrophotometer) 測定波長為 260 nm 時的 O.D. 值，再根據 O.D. 值推算原管 DNA 的濃度 (1 O.D. = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA)，公式為：DNA 濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$) = O.D. 值 (波長為 260 nm) \times 稀釋倍數 \times 50($\mu\text{g}/\text{ml}$) \div 1000。

二、斑馬魚基因重組質體之構築

(1) 斑馬魚 *Six6.1* 啟動子片段 pSix6.1-1393 bp-EGFP-1(clone 1 以及 clone 2)結構體之構築

首先，以斑馬魚 genomic DNA 為模版，利用設計在斑馬魚 *Six6.1* 啟動子區域的 [Six6-44Eco] 和 [Six6-44Bam] 為引子，進行 PCR 反應，條件為：94°C 1 min、57°C 1 min、72°C 2 mins，重複 25 個循環數，為避免 PCR 反應過程中發生無法預期的核甘酸序列之變異，造成啟動子區域內轉錄因子結合位的增減，因此同時進行兩個獨立的 PCR 反應，兩 PCR 反應的產物經洋菜膠電泳分析，可得到 *Six6.1* 啟動子 1393 bp 的片段，之後此兩片段皆進行後述步驟，將 DNA 複製產物純化後，萃取此 DNA 片段並與 pGEM-T Easy vector 進行接合反應，經轉型至 XL-1 blue 細胞後，透過藍白篩選的方式，挑選乳白色菌落，製備小量質體，再利用質體酵素切割法、PCR 方法(以 M13F、M13R 為 PCR 反應引子)，經確認而得到保留片段序列正確的 pGEM- pSix6.1-1393 bp clone，接著利用 5' 以及 3' 端引子所設計的 *EcoRI* 和 *BamHI* 切位，進行限制酶切割反應，將 1393 bp *Six6.1* 啟動子片段從 pGEM- pSix6.1-1393 bp 質體內取下，同時取 pEGFP-1 vector，利用 *EcoRI* 和 *BamHI* 切割 MCS，使其產生接點，片段經純化後，將 1393 bp 之 *Six6.1* 啟動子片段與 pEGFP-1 vector 作接合反應，同樣的，轉型至 XL-1 blue 細胞後，經 PCR 方法篩選(以 pUC-Ori-F、Six6-44Bam 或 N170 為 PCR 反應引子)、質體酵素切割法、定序(以 pUC-Ori-F 為定序引子)，經確認而得到保留片段序列正確的 pSix6.1-1393 bp-EGFP-1 重組質體，最後進行質體 DNA 的大量製備，顯微注射前再用 *XhoI* 限制酵素將其線性化，由前述兩 PCR 反應產物至此得兩重組質體分別命名為 clone 1 和 clone 2，兩結構體經顯微注射到斑馬魚的

胚胎後，可由綠色螢光表現確認此兩 1393 bp 的 *Six6.1* 啟動子片段組織表現的專一性是相同的。

(2) 斑馬魚 *Six6.2* 啟動子片段 pSix6.2-883 bp-EGFP-1(clone 1 以及 clone 2)結構體之構築

首先，以斑馬魚 genomic DNA 為模版，利用設計在斑馬魚 *Six6.1* 啟動子區域的 [Six6-71Eco] 和 [Six6-71Bam] 為引子，進行 PCR 反應，條件為：94°C 1 min、57°C 1 min、72°C 2 mins，重複 25 個循環數，為避免 PCR 反應過程中發生無法預期的核甘酸序列之變異，造成啟動子區域內轉錄因子結合位的增減，因此同時進行兩個獨立的 PCR 反應，兩 PCR 反應的產物經洋菜膠電泳分析，可得到 *Six6.2* 啟動子 883 bp 的片段，之後此兩片段皆進行後述步驟，將 DNA 複製產物純化後，萃取此 DNA 片段並與 pGEM-T Easy vector 進行接合反應，經轉型至 XL-1 blue 細胞後，透過藍白篩選的方式，挑選乳白色菌落，製備小量質體，再利用 PCR 方法(以 M13F、M13R 為 PCR 反應引子)、質體酵素切割法，經確認而得到保留片段序列正確的 pGEM- pSix6.2-883 bp clone，接著利用 5' 以及 3' 端引子所設計的 *EcoR* I 和 *BamH* I 切位，進行限制酶切割反應，將 883 bp *Six6.2* 啟動子片段從 pGEM- pSix6.2-883 bp clone 1 質體內取下，同時取 pEGFP-1 vector，利用 *EcoR* I 和 *BamH* I 切割 MCS，使其產生接點，片段經純化後，將 883 bp 之 *Six6.2* 啟動子片段與 pEGFP-1 vector 作接合反應，同樣的，轉型至 XL-1 blue 細胞後，經 PCR 方法篩選(以 pUC-Ori-F、Six6-71Bam 或 N170 為 PCR 反應引子)、質體酵素切割法、定序(以 pUC-Ori-F 為定序引子)，經確認而得到保留片段序列正確的 pSix6.2-883 bb-EGFP-1 重組質體，最後進行質體 DNA 的大量製備，顯微注射前再用 *Xho* I 限制酵素將其線性化，結構體經顯微注射到斑馬魚的胚胎後，可由綠色螢光表現確認此 883 bp 的 *Six6.2* 啟動子片段組織表現的專一性。

(3) 斑馬魚 pGEM-Six6.1-3'UTR 結構體之構築(Six6.1-3'UTR 片段之選殖)

首先，以斑馬魚 genomic DNA 為模版，利用設計在斑馬魚 *Six6.1* 基因 3' 端和下游區域的 [Six6-44-3UTRN] 和 [Six6-44-3UTRC] 為引子，進行 PCR 反應，條件為：94°C 1 min、57°C 1 min、72°C 2 mins，重複 25 個循環數，PCR 反應的產物經洋菜膠電泳分析，可得到 *Six6.1* 基因 3' 端和下游區域 741bp 的片段，之後此片段皆進行後述步驟，將 DNA 複製產物純化後，萃取此 DNA 片段並與 pGEM-T Easy vector 進行接合反應，經轉型至 XL-1 blue 細胞後，透過藍白篩選的方式，挑選乳白色菌落，製備小量質體，再利用 PCR 方法(以 M13F、M13R 或 Six6-44-3UTRN 為 PCR 反應引子)、質體酵素切割法，定序(以 M13F 為定序引子)，經確認而得到保留片段序列正確的 pGEM-Six6.1-3UTR clone。

(4) 斑馬魚 pGEM-Six6.2-3'UTR 結構體之構築(Six6.2-3'UTR 片段之選殖)

首先，以斑馬魚 genomic DNA 為模版，利用設計在斑馬魚 *Six6.2* 基因 3' 端和下游區域的 [Six6-71-3UTRN] 和 [Six6-71-3UTRC] 為引子，進行 PCR 反應，條件為：94°C 1 min、55°C 1 min、72°C 2 mins，重複 25 個循環數，PCR 反應的產物經洋菜膠電泳分析，可得到 *Six6.2* 基因 3' 端和下游區域 415bp 的片段，之後此片段皆進行後述步驟，將 DNA 複製產物純化後，萃取此 DNA 片段並與 pGEM-T Easy vector 進行接合反應，經轉型至 XL-1 blue 細胞後，透過藍白篩選的方式，挑選乳白色菌落，製備小量質體，再利用 PCR 方法(以 M13F、M13R 或 Six6-71-3UTRN 為 PCR 反應引子)、質體酵素切割法，定序(以 M13F 為定序引子)，經確認而得到保留片段序列正確的 pGEM-Six6.2-3UTR clone。

綜合上述，我們總共得到 2 個斑馬魚 pGEM-Six6 啟動子結構體、2 個斑馬魚 *Six6* 啟動子-EGFP-1 結構體和 2 個斑馬魚 pGEM-Six6-3UTR 結構體，條列如下：

1. pGEM- pSix6.1-1393 bp clone (clone 1 以及 clone 2)
2. pSix6.1-1393 bp-EGFP-1 (clone 1 以及 clone 2)

3. pGEM- pSix6.2-883 bp clone (clone 1 以及 clone 2)
4. pSix6.2-883 bp-EGFP-1 (clone 1)
5. pGEM-Six6.1-3'UTR clone
6. pGEM-Six6.2-3'UTR clone

三、原位雜合反應偵測斑馬魚 Six6.1 及 Six6.2 基因的表現

為了探討內生性特定基因(Six6.1 和 Six6.2)在斑馬魚內表現的時空分佈，因此選擇利用原位雜合反應(whole-mount *in situ* hybridization)來偵測 mRNA 表現的時間與位置，方法如下：

(1) DNA 質體線性化處理

取 10 μ g 的 pGEM-Six6.1-3'UTR(定名為 Six6.1，zgc:110344) 741 bp cDNA 和 pGEM- Six6.2-3'UTR(定名為 Six6.2，zgc:63871) 415 bp cDNA 質體，以 *Sal* I 在其 5' 端單切而得到線性化的質體 DNA 。

(2) 試管內轉錄作用(*In vitro* transcription)

取上述經線性化處理的質體 DNA 2 μ g，由於上述 Six6.1 和 Six6.2 兩重組質體皆為反向進入 pGEM-T Easy vector，因此兩者皆選擇 T7 RNA polymerase 來進行 *In vitro* transcription 反應，製作 antisense RNA 探針。詳細做法為：取 2 μ g 線性化的 DNA，依序加入 5X transcription buffer (最終濃度為 1X)、10X DIG RNA labeling mixture (Roche) (最終濃度為 1X)、RNasin (RNase inhibitor, Promega, 最終濃度為 2 U/ μ l)，T7 RNA polymerase (最終濃度為 5 U/ μ l)，最後以 DEPC 處理過之滅菌水調整總體積至 20 μ l，並於 37°C 反應 1 小時。之後加入 2 μ l RNase free 之 DNase I 於 37°C 作用 30 分鐘以去除 DNA。處理完畢後，直接以 2.5 倍體積的 95% 酒精於 -20°C 沈澱 30 分鐘，高速離心取得沈澱物後，溶於 10 μ l DEPC 滅菌水中，溶解後，可取 1 μ l 之產物以 1% 的洋菜膠電泳分析，以便確定 antisense RNA 探針的品質，

最後再加入 40 μ l *In situ* hybridization buffer，放置 -20°C 保存，此部分所製備的探針(probe)長度分別為：Six6.1 (741 bp)、Six6.2 (415 bp)。

(3) 斑馬魚胚胎之固定(fixing)

收集野生型 12 hpf、16 hpf、18 hpf、1dpf、2dpf、3dpf、7dpf 之幼魚各 20 隻，以清水清洗數次後，將幼魚以 BT-Fix 固定液浸泡於 4°C 至少一天，次日後改以甲醇置換原來的 BT-Fix 溶液讓胚胎脫水(dehydrate)(使胚胎呈白色透明)，此置換過程依序以 30% 、50% 、70% 、100% 的甲醇各浸泡 10 mins，最後此幼魚樣本存放在 100% 甲醇內、-20°C，直到進行 *In situ* hybridization。

(4) 原位雜合反應(Whole-mount *in situ* hybridization)

a. 雜合反應前的樣本處理

首先，將 100% 甲醇處理過的幼魚重新進行水合(rehydrate)，方法為依序利用低濃度(70%、50%)的甲醇作置換。之後以 1X PBS 清洗一次、PTW 清洗 4 次，每次浸泡 5 分鐘，再以濃度為 10 μ g/ ml 的 Proteinase K 在室溫下處理，作用時間依胚胎時期而定(2 min ~ 30 min)，結束後，隨即將幼魚以 BT-Fix 溶液後固定處理 20 分鐘。

b. 原位雜合反應

將完成後固定的樣本以 PTW 浸泡 5 次、每次 5 分鐘，再以預熱後 (65°C) 的 *In situ* hybridization buffer 置換，讓樣本在 65°C 內 Prehybridization 至少 1 小時，最後以濃度為 1/450 的 DIG labeled RNA probe 在 65°C 進行雜合反應 overnight。

c. 清洗非專一性的雜合作用

經過雜合反應後的樣本，在 65°C 下依序以 Wash I (清洗 2 次、各 30 分鐘) 、 Wash II (清洗 1 次、15 分鐘) 、 Wash III (清洗 2 次、各 30 分鐘) 清洗非專一性的雜合作用，

d. anti-DIG-alkaline phosphatase antibody 的配置：

將斑馬魚於液態氮中迅速研磨，加入 4 倍體積的丙酮 (acetone)，30 分鐘後以 10,000 rpm 離心 10 分鐘，再以丙酮清洗一次沈澱物，吸乾 acetone 後，於 37°C 下烘乾，即得到乾燥的 fish extracted powder，可存放於室溫下。取體積約為米粒般大小的 extracted fish powder，加入 800 μl Blocking buffer 以及 2 μl 的 Anti-DIG-AP 抗體，混勻後於室溫下作用 30 分鐘，之後以 12000 rpm 離心 5 分鐘，抽取上清液至 15 ml 離心管中，最後加入 Blocking buffer 補足體積為 8 ml，使 Anti-DIG-AP 抗體作用濃度為 1/4000。

e. 浸泡 anti-DIG-alkaline phosphatase antibody

經過清洗過程的樣本，在室溫下先以 Blocking buffer 浸泡 1 次、5 分鐘，隨後讓樣本浸泡在 Blocking buffer 內兩小時，之後加入上述配置好的 Anti-DIG-AP 抗體稀釋液在 4°C 下作用 overnight。

f. 呈色

抗體浸泡之後，以 PTW 均勻浸泡胚胎 6 次、每次 20 分鐘，再浸泡 staining buffer 2 次、每次 5 分鐘，最後加入濃度皆為 50 μg /ml NBT (Promega) 6.75 μl 及 BCIP (Promega) 3.5 μl 於 1 ml staining buffer 中，在暗室中進行呈色反應，約 1 小時後即可取出在解剖顯微鏡下觀察。可視呈色訊號的強弱延長呈色時間，完成後，先以 PTW 清洗數次，去除 staining buffer，最後再以 BT-Fix 均勻浸泡隔夜。次日後以 1X PBS 清洗 2 次，再加入 PBS + Glycerol (1:1) 之溶液，進行拍照紀錄。

四、轉殖斑馬魚之研究方法

(1) 斑馬魚之飼養

斑馬魚之蓄養根據標準飼養條件 (Westerfield, 1999)，蓄養在 200 公升之水箱 (60cm × 75cm × 45cm)，水溫維持在 28.5°C，光照維持 14hr light /10 hr dark 之光週期，每日餵食 2~3 次。

(2) 受精卵之收集

在欲做顯微注射實驗的前一晚，在 3.5 公升的採集箱內倒入約 7 分滿乾淨已曝氣過的水，其期間放置隔板，將野生型的雌魚及雄魚分別置放於隔板兩側，將採集箱置入 28°C 恆溫箱中放到隔夜。在進行實驗前，將雄魚及雌魚一同置於網內，待其產卵後，收集受精卵後再用解剖顯微鏡觀察受精卵發育情形，若其發育無異狀後則可用於顯微注射實驗。

(3) 顯微注射實驗

a. 注射用 DNA 之製備

本研究用於顯微注射實驗的結構體(constructs)包括：

1. pSix6.1-1393 bp-EGFP-1 (clone 1 以及 clone 2)
2. pSix6.2-883 bp-EGFP-1 (clone 1 以及 clone 2)

所有的結構體皆直接利用 pEGFP-1 vector MCS 的 *Xho* I 單切使結構體成線性化(linearized)，切割之後的 DNA 片段經純化後，再與 KCl 溶液及 phenol red 染料溶液混合均勻(final concentration，200 ng DNA/μl in 60 mM KCl，0.1% phenol red，pH 7.4)，保存於-20°C 備用。

b. 拉針(pulling of injection needle)

將直徑 1mm 長 9cm 的玻璃毛細管(Glass Capillaries, NARISHIGE)利用微電極拉製器(NARISHIGE)拉成實驗所需的針形，並在顯微注射前利用昆蟲針在針端彈出一個極細的缺口。

c. 顯微注射(microinjection)

注射方式以顯微注射儀 (Femtojet, Eppendorf) 用氣壓推動毛細管微針內的 DNA 溶液使其注入 0~1 cell stage 之斑馬魚受精卵動物極(animal pole)內。

d. 受精卵的培養

注射完之胚胎置於清水中，在 28.5°C 恒溫箱中發育，並在第一天加入甲基藍(methylene blue)防止水黴生長。

e. 觀察螢光表現情形及胚胎外表特徵拍照

以螢光解剖顯微鏡觀察綠色螢光 GFP 在斑馬魚胚胎(1dpf、2 dpf、3 dpf、4 dpf、5dpf、7 dpf)之表現情形並拍照紀錄。

五、基因轉殖斑馬魚的統計分析

(1) 轉殖基因過渡性表現(transient assay)的統計分析

統計幼魚在各個發育時間點(1dpf、2dpf、3 dpf、4dpf、5 dpf、7 dpf)，表現綠色螢光標記所佔比例。



肆、結果

一、利用原位雜合反應(whole-mount *in situ* hybridization)偵測斑馬魚 Six6.1 和 Six6.2 內生性 mRNA 表現情形

利用 ZFIN 網頁搜尋斑馬魚基因表現的資料庫，尋找斑馬魚 Six6 基因的表現型態，結果並沒有得到斑馬魚 Six6 基因的資料，也尚未發現有文獻紀錄斑馬魚 Six6 基因的表現型態。而後透過序列資料比對分析的結果發現編碼為 zgc:110344 和 zgc:63871 的兩個基因，是斑馬魚的 *Six6* 同源基因(orthologue)，我們分別命名為 Six6.1 和 Six6.2 基因(見後詳)。接著我分別選殖 Six6.1 和 Six6.2 基因的 3'UTR 的 DNA 片段(741bp 和 415bp)，接合到 pGEMT-easy 的載體中(見圖十)，並且利用試管內轉錄作用做出可以和內生性 mRNA 互補的探針。利用原位雜合反應(*in situ* hybridization) 觀察斑馬魚 Six6.1 和 Six6.2 基因的內生性 mRNA 的表現情形(見圖一、圖二)。結果發現 Six6.1 基因會於從受精後 18 個小時(18hpf)的時候開始表現在間腦腹側(見圖一)。而且在受精後 1 天(1dpf)，會表現在口腔表皮組織以及神經外胚層(見圖二 E、二 F)，接著表現量會提高而且持續的表現一直到 2dpf，在間腦腹側，下視丘及將來會形成腦下垂體的相對位置仍然可以看到強烈的表現(見圖一 C、D)。而且在 1dpf 開始可以在斑馬魚視網膜的區域觀察到 Six6.1 基因的表現(見圖二 B、D)，並且在 2dpf 看到視網膜的區域有明顯的表現(見圖一 C、D)。另一方面，Six6.2 基因同樣在 18hpf 開始表現在間腦腹側，並且持續到 2dpf。所以斑馬魚 Six6.1 和 Six6.2 基因的內生性 mRNA 都會表現在間腦腹側、下視丘與腦下垂體前葉(adenohypophysis)；相當於哺乳類的 Rathke's pouch 附近的區域。值得注意的是斑馬魚 Six6.2 基因雖然如同 Six6.1 基因會表現在間腦腹側、下視丘與 adenohypophysis 的地方，可是表現量都比較弱，而且在神經視網膜並沒有發現 Six6.2 基因的表現。

二、Six6 啟動子相關序列網路資料庫之搜尋以及軟體之比對

為了構築斑馬魚 *Six6* 啟動子結構體，首先利用 NCBI 網頁 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜尋斑馬魚 *Six6* cDNA 序列(Nucleotide；key word: *Six6*)，結果並沒有發現已經定義為斑馬魚的 *Six6* cDNA 序列，不過卻有發現一個已經更名為 *Six3b* 的斑馬魚 cDNA 序列(NM_131363)，以及一個尚未被明確定義的 cDNA 序列(zgc:63871， NM_201105)(註：*Six6.2*)。於是再利用 ZFIN 網頁 (<http://zfin.org>) 搜尋斑馬魚的 *Six6* 基因的表現(Gene Expression；key word : *Six6*)，了解此資料庫是否有斑馬魚 *Six6* 基因表現型態之資訊，結果仍是得到 *Six3b* 的斑馬魚基因。最後利用美國加州大學所建構的序列分析網頁(UCSC Genome Browser website， <http://genome.ucsc.edu/>)，可以在各個物種之間比較具有相似性的序列。我們利用 Human Genome 的資料庫進行搜尋(key word : *Six6*)，從比對的結果讓我們可以在斑馬魚的資料庫裡找到了兩個可能與 *Six6* 相關的 cDNA 序列(zgc:63871 和 zgc:110344) (註：*Six6.1* 和 *Six6.2*)(見圖三)，分別是位在第十三號和第二十號的染色體上(Ch.13 和 Ch.20)，而且基因的結構與其他物種 *Six6* 基因的結構很相似，都具有兩個在物種之間擁有保留性序列的 Exon。

因此就針對這兩個可能與 *Six6* 相關的 cDNA 序列進行胺基酸序列的分析。除了與資料庫各物種之中已經明確定義為 *Six6* 基因的胺基酸序列相似。另一方面，也就許多報告所提到的 Six 基因家族分類法則做分析，同時將屬於相同次家族的 *Six3* 基因相關序列作比較。結果發現這兩個斑馬魚的 cDNA (zgc:63871 和 zgc:110344)其胺基酸序列確實與各物種 *Six6* 基因的胺基酸序列具有高度的相似性(見圖四)。而且根據 Six 基因家族分類法則，除了在 N 端的序列有明顯的差別之外，在 six domain N 端會有 *Six3/6* 次家族特有的四個胺基酸序列”VAPG/VAPA”的插入，同時這也是區別 *Six3* 與 *Six6* 方法之一(見圖五)。序列顯示 zgc:63871 和 zgc:110344 分別是插入了(VAPS)和(VAPA) (見圖五 A)。而且此兩分子在 Six type HD (Homeodomain) 的 N 端也具有 *Six3/6* 次家族特別擁有的四個胺基酸序列”QKTH”(見圖五 B)。因此我們可以明確判斷這兩個 cDNA 的確就是斑馬魚的

Six6 同源基因(orthologue)(見圖四、圖五)。

根據之前文獻報導，Six 基因家族的成員有些會呈現連鎖群的型態(linkage)，最顯明的例子就是 *Six6-Six1-Six4*。而且這樣的連鎖群排列不只在人類發現，小鼠及大鼠，甚至是非洲爪蛙和雞也都存在(見圖六)。我們懷疑從斑馬魚的資料庫中找到兩個 *Six6* 的同源基因，是否也具有同樣的連鎖群型態？於是從在 NCBI 網頁所提供的資訊可以得到他們染色體上的位置，可以發現確實有三個 Six 基因排列在一起(見圖六)。在斑馬魚第 20 號染色體的 zgc:110344 基因(*Six6.1*)的下游會有兩個同樣是 Six 基因家族的成員，依序是 *Six1*(*Six1.1*)與 *Six4.1*。因為從 ZFIN 及 NCBI 網頁發現到斑馬魚也擁有兩個 *Six4* 的同源基因(*Six4.1* 與 *Six4.2*)(見圖六)，所以我們把所發現的這個 zgc:110344 基因稱之為 *Six6.1*。同樣的方式，在斑馬魚第 13 對染色體中的 *Six6* 的同源基因 zgc:63871 基因(*Six6.2*)的下游有一個定義為 *Six4.2* 的基因，所以我們把所發現的這個 zgc:63871 基因稱之為 *Six6.2*。在這之中還夾著另一個基因 zgc:92332 基因(*Six1.2*)，也正如預期，他的胺基酸序列與其他物種的 *Six1* 有很高的相似度，所以一併將他稱為 *Six1.2*(見圖六)。

這些基因連同上下游的相鄰基因進行胺基酸比對。結果可以發現附近相鄰的基因也都在各物種間保留下來，由此可以推測這些基因以及相鄰的 DNA 序列，並沒有遭遇大規模的改變。因此推測調控 *Six6* 基因的啟動子及促進子序列可能在各物種間也保留下來。利用 UCSC 網頁進行搜尋斑馬魚 *Six6* 基因的同時，也同時發現到在各個物種之間的 *Six6* 基因上游序列位置，都具有一個高度保留性的序列存在(見圖三，A、B 兩區)。因此利用 Dot-Matrix 序列比對軟體進一步的分析斑馬魚 *Six6.1* 及 *Six6.2* 基因上游的區段，了解是否可能含有在物種間保留的促進子片段。結果確實發現到在演化上相距較遠的斑馬魚和人類，同樣具有高度保留性兩個區域的片段存在(見圖七、圖八)。

三、*Six6* 基因啟動子結構體之構築

為了檢測透過網路資料庫搜尋與軟體比對後發現的高度保留序列，能夠調節

Six6 基因表現。於是分別構築斑馬魚 Six6.1 基因上游片段 1393 bp 及 Six6.2 基因上游片段 883 bp。這些片段皆含括了上游兩區域保守片段(A、B 兩區)，用以驅動綠色螢光蛋白表現(見圖七、圖八、圖九、圖十)。

四、斑馬魚 pSix6.1-1393 bp-EGFP-1 (clone1 和 clone2)結構體之顯微注射實驗

為了得知斑馬魚 Six6 基因上游 1393 bp DNA 序列之啟動子片段，是否具有調控及驅動 Six6 基因在斑馬魚胚胎中專一表現的功能，於是將 Six6.1 基因上游 1393 bp DNA 序列之啟動子片段順向接合到 pEGFP-1 的載體內，構築成為 pSix6.1-1393 bp-EGFP-1 結構體 (見圖九、圖十)，之後利用顯微注射 (micro-injection)的方式送入斑馬魚的胚胎內，並於胚胎發育 2 和 5 天後觀察綠色螢光蛋白的表現(見圖十一、十二、十三)。在此結構體的過渡性(transient)實驗中，可以觀察到綠色螢光蛋白主要表現在間腦腹側、下視丘、將來發育成為腦下垂體前葉(adenohypophysis)的相對位置以及在神經視網膜等組織，可是發現在其他中樞神經系統的神經原細胞也有異位性的綠色螢光蛋白表現。故 Six6.1 基因上游 1393 bp DNA 序列之啟動子片段，可能具有調控及驅動 Six6.1 基因在斑馬魚胚胎間腦腹側、下視丘、將來形成腦下垂體前葉(adenohypophysis)的區域以及在神經視網膜等組織中的順式調控因子(cis-regulatory elements)。另一方面，同時紀錄螢光表現的百分比(見表一)。發現斑馬魚 pSix6.1-1393 bp-EGFP-1 clone1 結構體在視網膜的綠色螢光蛋白表現率達到 70.2%，但是中樞神經系統的異位表現也達到 75.7%。斑馬魚 pSix6.1-1393 bp-EGFP-1 clone2 結構體會表現綠色螢光蛋白佔總樣本數的 62.5%，其中，會在視網膜表現綠色螢光蛋白也佔總樣本數達 30.3%。可是中樞神經系統的異位表現也達到 53.6%。

五、斑馬魚 pSix6.2-883 bp-EGFP-1 (clone1)結構體之顯微注射實驗

為了檢測斑馬魚 Six6.2 基因上游 883 bp DNA 序列之啟動子片段，是否具有調控 Six6.2 基因在斑馬魚胚胎中表現的功能，於是將 Six6.2 基因上游 883 bp DNA

序列之啟動子片段順向接合到 pEGFP-1 的載體內，並構築 pSix6.2-883 bp-EGFP-1 結構體（見圖九、圖十）。之後利用顯微注射(micro-injection)的方式送入斑馬魚的胚胎內，並於胚胎發育 1、2 和 5 天後觀察綠色螢光蛋白的表現（見圖十四、圖十五）。在此結構體的過渡性(transient)實驗中，可以觀察到綠色螢光蛋白主要表現 在間腦腹側、下視丘以及在腦下垂體前葉(adenohypophysis)等組織相對位置，可是同樣在其他中樞神經系統的神經原細胞有異位性的綠色螢光蛋白表現。故 Six6.2 基因上游 883 bp DNA 序列之啟動子片段，可能具有調控 Six6.2 基因在斑馬魚胚胎間腦腹側、下視丘、以及在將來形成腦下垂體前葉(adenohypophysis)之區域等組織中的順式調控因子(cis-regulatory elements)。另一方面，同時紀錄螢光表現的百分比（見表二）。1dpf 時候，會在將來形成腦下垂體前葉的區域表現綠色螢光蛋白的胚胎達 57.5%，同時有 15% 的中樞神經系統異位表現發生。5dpf 時期，則是看到 2.7% 在視網膜表現，而有 52.7% 是在中樞神經系統異位表現。



伍、討論

一、斑馬魚的 *Six6.1* 和 *Six6.2* 基因與 *Six6* 同源基因的比較

透過網路資料的搜尋與胺基酸序列的比對，找出了斑馬魚的 *Six6* 同源基因 (*Six6.1* 和 *Six6.2*)。而且經過利用原位雜合反應，確定了這兩個基因都確實會在斑馬魚表現。並且與其他物種的 *Six6* 同源基因表現型態相比較，也都確實會在間腦腹側、下視丘及腦下垂體前葉相對位置表現。可是因為樣本蒐集的時間點並未含括整個斑馬魚的發育過程，例如早期神經板的發育以及視囊等整個視覺系統的發育，所以未能詳細的比較物種之間的表現差異。像是前言所提到的，在雞胚胎早期的水晶體基板會有強烈的 *Optx2* (*Six6*)表現，雖然隨著水晶體成熟在中心的表現量會降低，可是小鼠的水晶體卻是都沒有 *Six6* 的表現。而且在斑馬魚的 *Six6.1* 和 *Six6.2* 彼此就有強弱的差別，而 *Six6.2* 不會在視網膜表現。所以完整斑馬魚的 *Six6.1* 和 *Six6.2* 表現型態，還需要更進一步的釐清。

二、斑馬魚 *Six6.1* 和 *Six6.2* 基因在發育過程中兩者的關聯性

當在利用序列比對分析軟體的時候，斑馬魚的 *Six6.1* 和 *Six6.2* 在上游近端都含有一個比較明顯的保留片段(B 區) (見圖七、圖八)，相對的在上游保守區域的較遠端的部份(A 區)，卻是不完整的保守序列。斑馬魚 *Six6.1* 和人類 *Six6* 比較時，大約可以發現有 200 bp 的範圍是具保守性的(見圖七、A 區)；可是在 *Six6.2* 和人類 *Six6* 比較時，卻只有大約可以發現有 50 bp 的範圍是據保守性的(見圖八，A 區)。

而將這樣的比對結果和斑馬魚 *Six6.1* 或 *Six6.2* 啟動子上游保守片段接合 EGFP-1 的結構體過渡性轉殖之結果做比較，在近端(B 區)斑馬魚的 *Six6.1* 或 *Six6.2* 對人類的保守序列，都是對應到同樣的一段人類的 DNA 片段。這樣的結果導致一個推測，同樣帶有相對於這段人類 DNA 片段斑馬魚的 *Six6.1* 或 *Six6.2* 保守性序列(即 B 區片段)，可能負責調控斑馬魚 *Six6.1* 及 *Six6.2* 都會表現的組

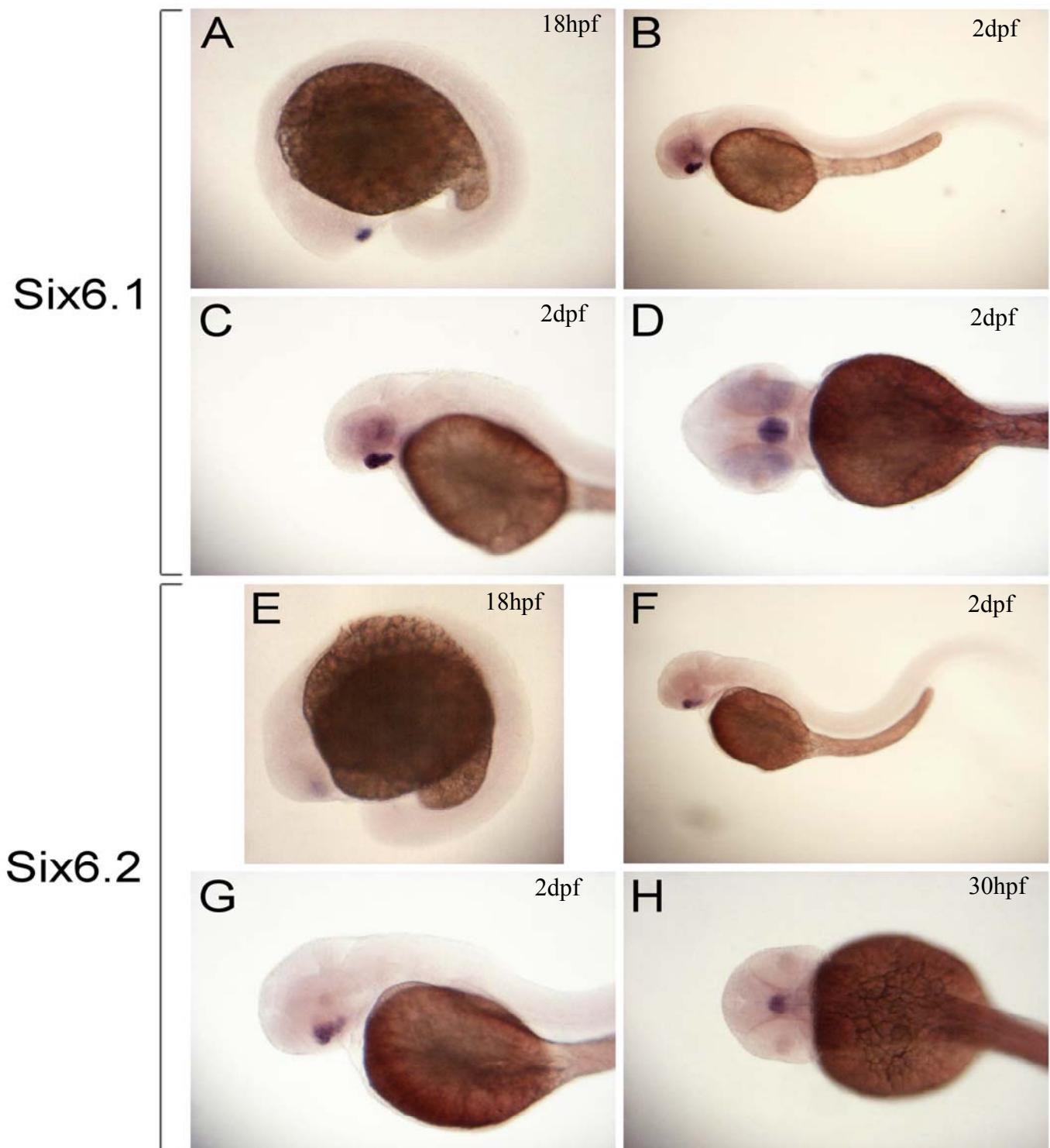
織，也就是間腦腹側、下視丘及腦下垂體前葉。而上游保守區域(A 區)之缺損，或許就是造成斑馬魚的 Six6.2 不會在神經視網膜表現的原因。此假設，有待實驗進一步驗證。

先前的 Prince and Pickett 在 2002 年的研究認為，由於基因體複製所導致多一套的基因(duplicated gene)，對於他們的功能性可能會造成兩種改變，一為沒有功能(non-functionalization)，其原因可能是因為經歷長時間的演化過程而產生序列上的變化，或是因為在基因複製的當下，並沒有將調控基因表現的啟動子片段一同複製，而成為無法正常表現的偽基因(pseudogene)；二為具備新的功能(neo-functionalization)。一般的說法是認為經過複製之後形成了兩套基因，而這兩個基因又分別分擔了原本基因的功能性，彼此具有部分的功能(sub-functionalization)，所以也使得於基因功能缺失的時候，能夠顯示出功能性補償的角色。又在長時間的演化過程，兩個基因的功能性可能不再彼此重覆，變得無法取代，唯只有在兩套基因及其調節因子同時存在時，才得以完整表現原始的功能。所以在本實驗中，斑馬魚 Six6.1 或 Six6.2 同時在腦下垂體表現，可能具有彼此補償之功能。而在神經視網膜方面，演化後的斑馬魚 Six6.2 其調控神經視網膜之表現之功能已喪失。

三、斑馬魚 Six6.1 和 Six6.2 基因表現的正、負調控因子

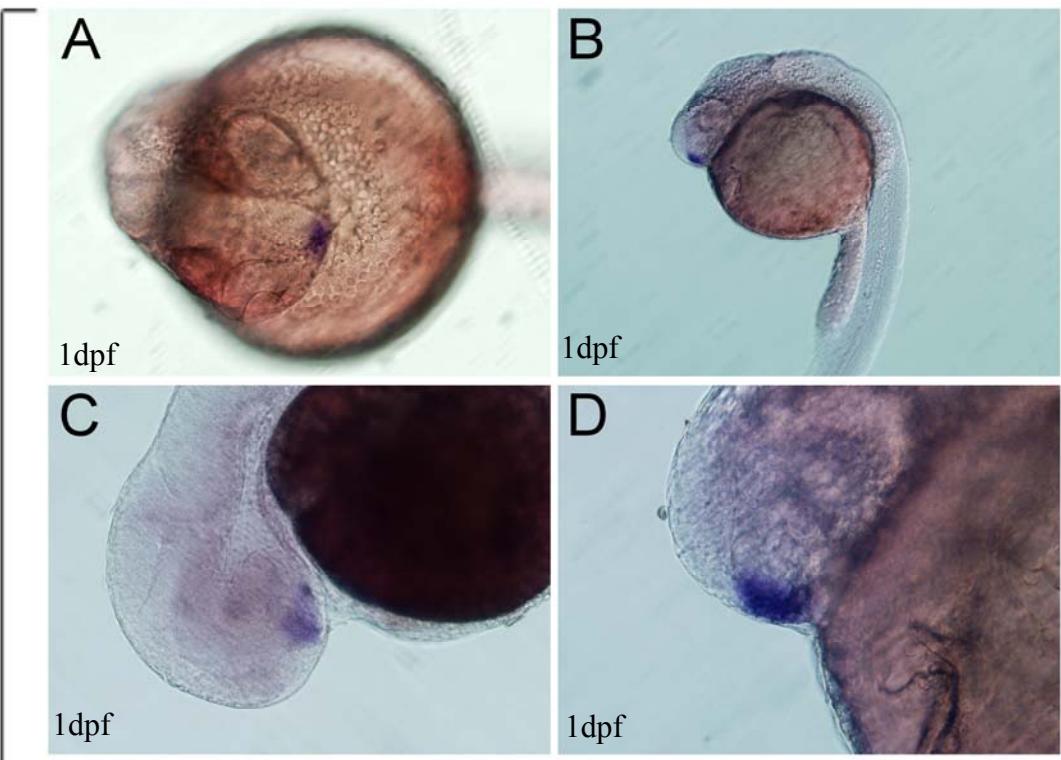
從 pSix6.1-1393 bp-EGFP-1 與 pSix6.2-883 bp-EGFP-1 兩個結構體在過渡性轉殖實驗的觀察結果，發現綠色螢光蛋白表現的區域大致上會和內生性 mRNA 的表現位置相符，顯示我們所選殖的 Six6.1 基因轉錄起點(-1199/+204)的上游 DNA 片段和 Six6.2 基因轉錄起點(-728/+165)的上游 DNA 片段的區域內即包含有大部分調控該基因表現之順式調控因子。以及利用 Dot-Matrix 分析序列的結果，此兩基因的上游皆含有兩段保守的 DNA 片段，因此推測組織專一性的順式調控序列應該包含於這些保守片段當中。可是同時我們又都在過渡性轉殖實驗的結果發現中樞神經系統有較高頻率的異位表現，推測可能還有其他的負調控因子因素使得斑馬魚 Six6.1 和 Six6.2 基因不會表現在中樞神經系統之中。

陸、圖表

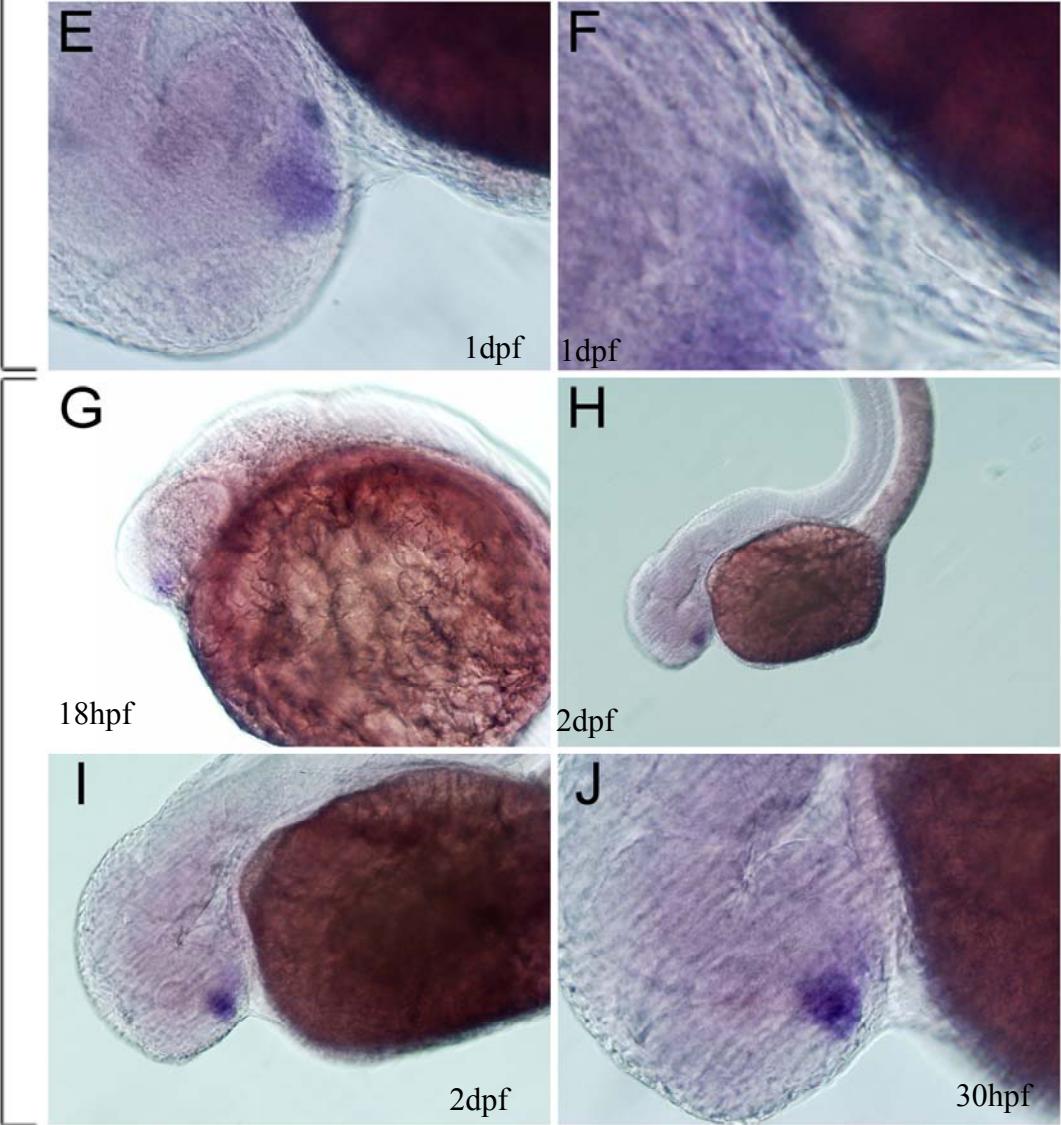


圖一、說明後詳

Six6.1



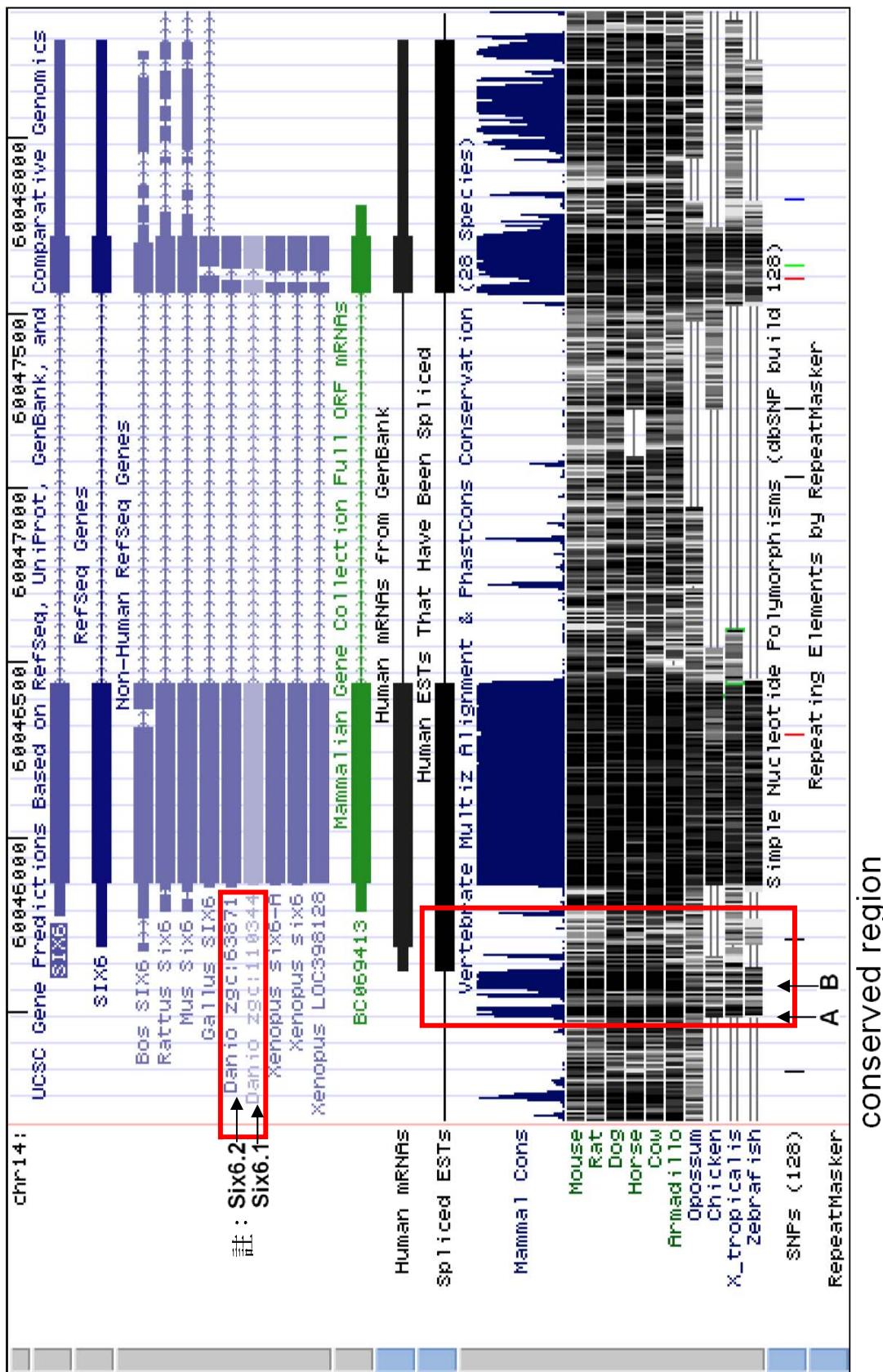
Six6.2



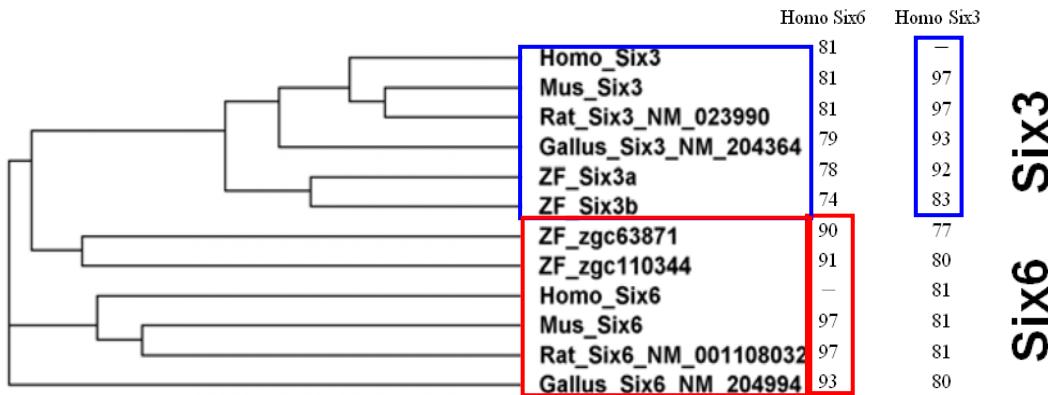
圖一、利用原位雜合反應觀察斑馬魚 Six6.1 和 Six6.2 的內生性 mRNA 表現的組織位置。圖(A)~(D)為 Six6.1 的表現位置，可以在間腦的腹側、下視丘與將來發育成腦下垂體前葉(adenohypophysis)之區域發現 Six6.1 的表現；圖(B)~(D) 在神經視網膜發現 Six6.1 也有表現；(E)~(H)為 Six6.2 的表現位置，也都會表現在間腦的腹側、下視丘與將來發育成腦下垂體前葉(adenohypophysis)的區域，可是和 Six6.1 相比較，Six6.2 的表現顯得較微弱，而且不會在神經視網膜表現。

圖二、利用 Olympus IX71 觀察原位雜合反應之斑馬魚 Six6.1 和 Six6.2 的內生性 mRNA 表現的組織位置。圖(A)~(F)為 Six6.1 的表現位置，皆可以在下視丘與將來發育成腦下垂體前葉(adenohypophysis)之區域發現 Six6.1 的表現。圖(F)為圖(E)之放大圖，可以發現在口腔表皮組織(外胚層來源)與神經外胚層都會表現 Six6.1；(G)~(J)為 Six6.2 的表現位置，也都會表現在下視丘與將來發育成腦下垂體前葉(adenohypophysis)之區域，可是和 Six6.1 相比較，Six6.2 將來發育成腦下垂體前葉(adenohypophysis)區域表現得較微弱；口腔表皮細胞無明顯的表現。

UCSC Genome Browser website

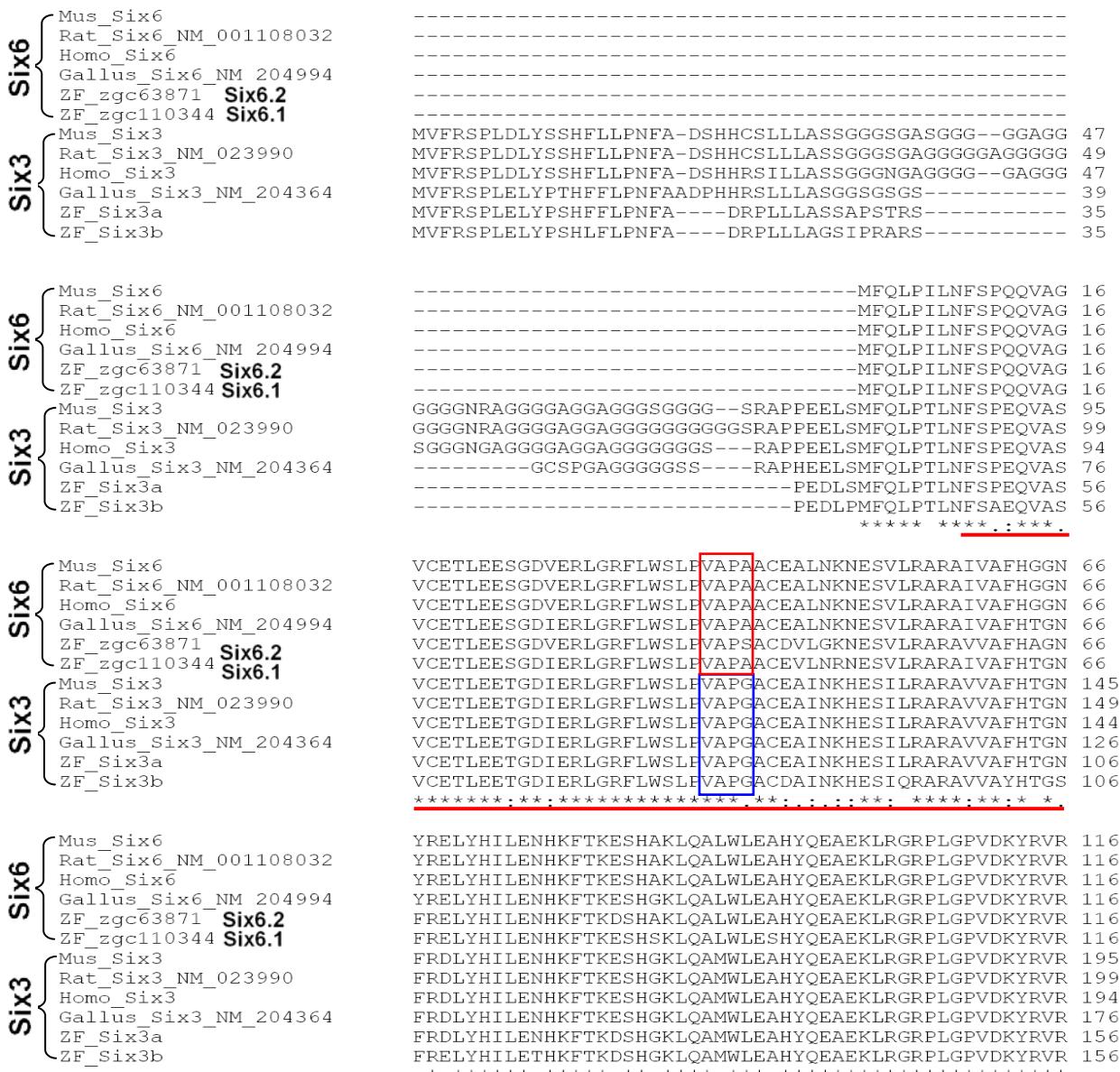


圖三、利用 UCSC 網頁從人類 Six6 基因比對各物種同源基因及其基因體序列保守性之結果。紅框標示出各物種 Six6 基因上游之保守區段(含 A,B 兩區)。



圖四、利用 ClustalW2 網頁比較胺基酸序列的結果檢測這兩個與人類 Six6 基因

相似的斑馬魚 cDNA 序列(zgc:63871(Six6.2)和 zgc:110344(Six6.1))為斑馬
魚 Six6 同源基因。

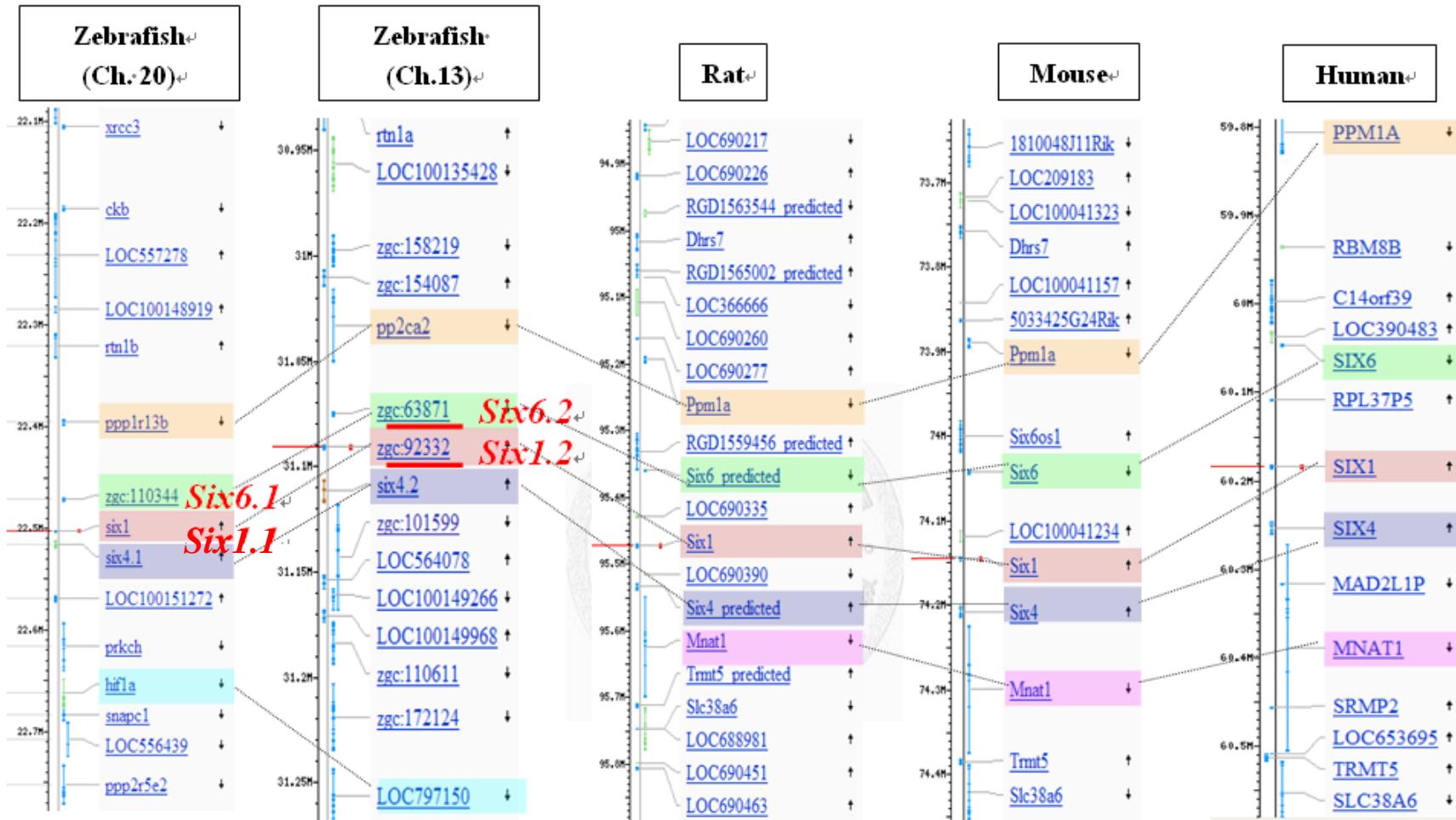


圖五、(A)

Six6	Mus_Six6	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 166
	Rat_Six6_NM_001108032	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 166
Six3	Homo_Six6	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRNLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 166
	Gallus_Six6_NM_204994	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 166
Six6.2	ZF_zgc63871	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 166
	ZF_zgc110344	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 166
Six3	Mus_Six3	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 166
	Rat_Six3_NM_023990	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRSLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 245
Six3	Homo_Six3	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRSLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 249
	Gallus_Six3_NM_204364	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRSLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 226
Six6	ZF_Six3a	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRGLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 206
	ZF_Six3b	KKFPLPRTIWDGEQKTHCFKERTRGLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATG 206
<hr/>		
Six6	Mus_Six6	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQQQVLSQGPGRVLRSEG---EGTP 213
	Rat_Six6_NM_001108032	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQQQVLSQGPGRVLRSEG---EGTP 213
Six3	Homo_Six6	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQQQVLSQGSGRALRAEG---DGTP 213
	Gallus_Six6_NM_204994	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQQQVLAQGSGRSLQAAE---ESGG 213
Six6.2	ZF_zgc63871	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQQQVLSGGSVRSLGDD---DTTV 212
	ZF_zgc110344	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQQQVLSNGSVRSLSGE---DGAV 212
Six3	Mus_Six3	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQQQVLAQGSGRSLAEPGCPHTGSA 295
	Rat_Six3_NM_023990	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQHQQAIGPSGMRSLAEPGCPHTGSA 299
Six3	Homo_Six3	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQHQQAIGPSGMRSLAEPGCPHTGSA 294
	Gallus_Six3_NM_204364	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQHQQAIGQNGMRSLSESGCAPRSSA 276
Six6	ZF_Six3a	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQHQQAIGQNGMRSLSESGCAPRSSA 256
	ZF_Six3b	LTPTQVGNWFKNRRQRDRAAAAKNRLQHQGLQSSLRMSMSESGCPTHSSA 256
<hr/>		
Six6	Mus_Six6	EVLGVASSPAASLSSK---AATSAISITSSDSECDI 246
	Rat_Six6_NM_001108032	EVLGVASSPAASLSSK---AATSAISITSSDSECDI 246
Six3	Homo_Six6	EVLGVATSPAASLSSK---AATSAISITSSDSECDI 246
	Gallus_Six6_NM_204994	EAGGAASSPAVSLSSK---AATSAISITSSDSECDI 246
Six6.2	ZF_zgc63871	DRLGPASSPEVSLSSK---AATSAISITSSDSECDI 245
	ZF_zgc110344	DRLGNASSPEASLSSK---AAASAISITSSDSECDI 245
Six3	Mus_Six3	ESPSTAASPTTSVSSLTERADTGTISILSVTSSDSECDV 333
	Rat_Six3_NM_023990	ESPSTAASPTTSVSSLTERADTGTISILSVTSSDSECDV 337
Six3	Homo_Six3	ESPSTAASPTTSVSSLTERADTGTISILSVTSSDSECDV 332
	Gallus_Six3_NM_204364	ESPSTAASPTTSVSSLTERADTGTISILSVTSSDSECDV 314
Six6	ZF_Six3a	ESPSTAASPTTSVSSMTERVDTGTISILSVTSSDSECDV 294
	ZF_Six3b	ESPCAAASPTTSVSSMNERGDGGT---ILSVTDSDFDV 293
<hr/>		

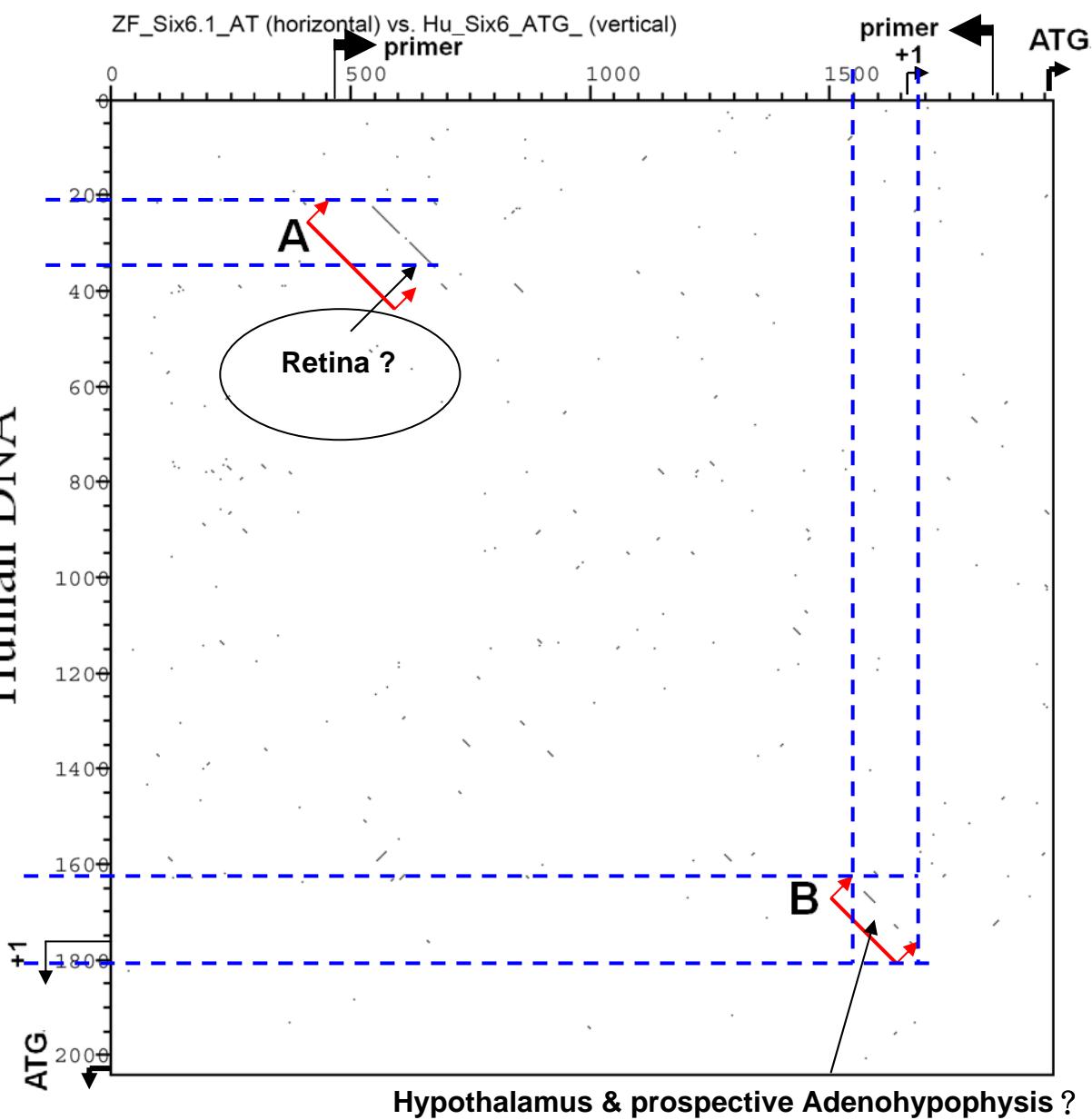
圖五、(B)

圖五(A),(B)、兩個斑馬魚 Six6 相關 cDNA 序列(zgc:63871 和 zgc:110344)與物種間 Six3/6 基因次家族成員的胺基酸序列比對。圖五-(A)的紅色底線的部份為這些基因的 Six domain，紅色框線的四個胺基酸序列”VAPA”為 Six6 的特徵可以和藍色框線的四個胺基酸序列”VAPG”作區別(Six3 特徵)。其中 zgc:63871 則是採用”VAPS”。圖五-(B) 綠色底線的部份為這些基因的 Six type Homeodomain，這些 Six3/6 基因次家族成員都具有相同的特徵四個胺基酸序列”QKTH”可以和其他次家族作為區別。

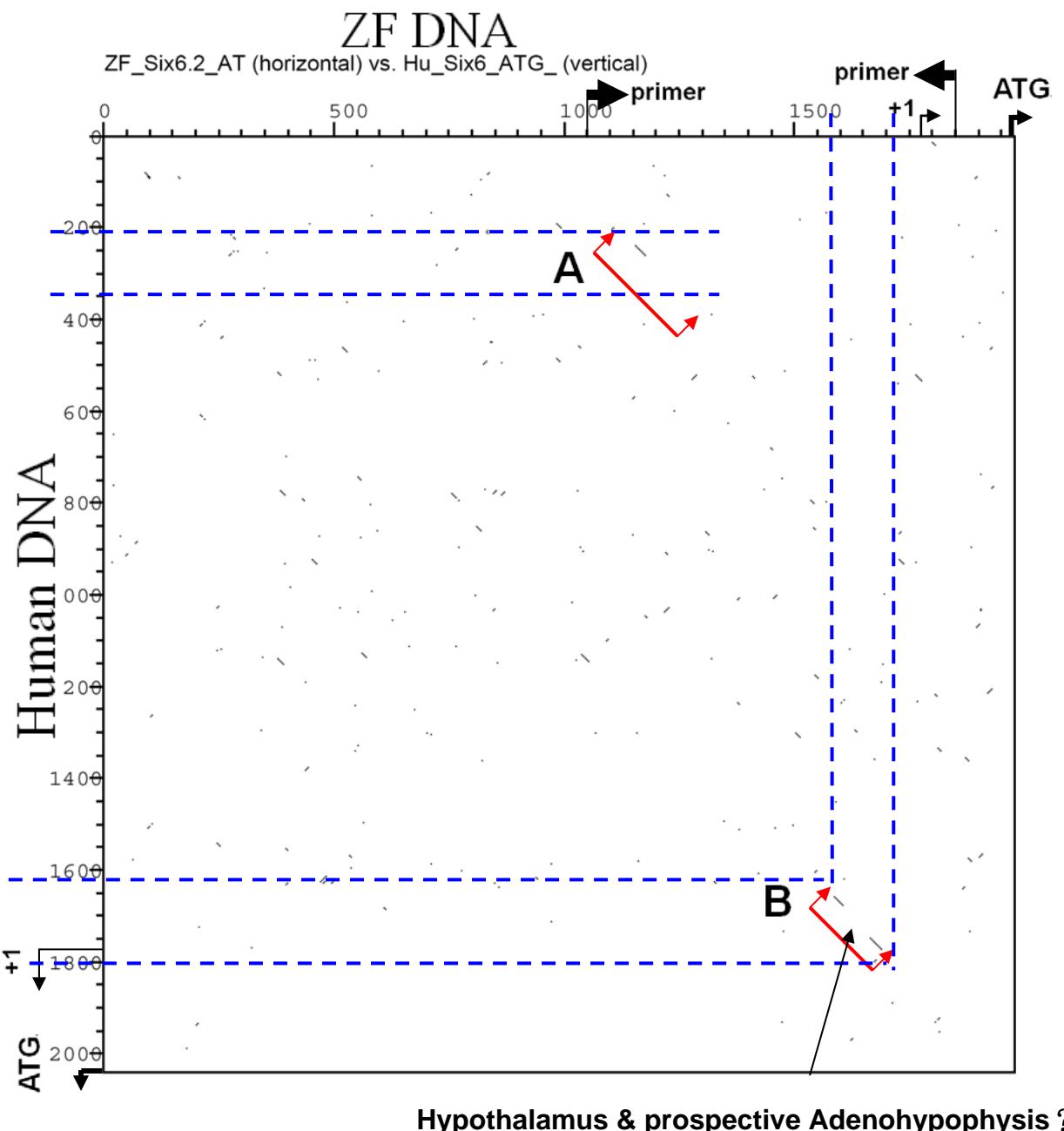


圖六、由 NCBI 網頁取得斑馬魚 Six6.1 及 Six6.2 基因(編號 zgc : 110344 及 zgc : 63871)在斑馬魚以及人類、小鼠、大鼠等各物種 Six6 基因在基因體中的相對位置。物種間的同源基因(homologous gene)分別用不同顏色方塊標示。由圖中可看出在各物種中與 Six6 相鄰的基因其相對位置排列皆非常相似。

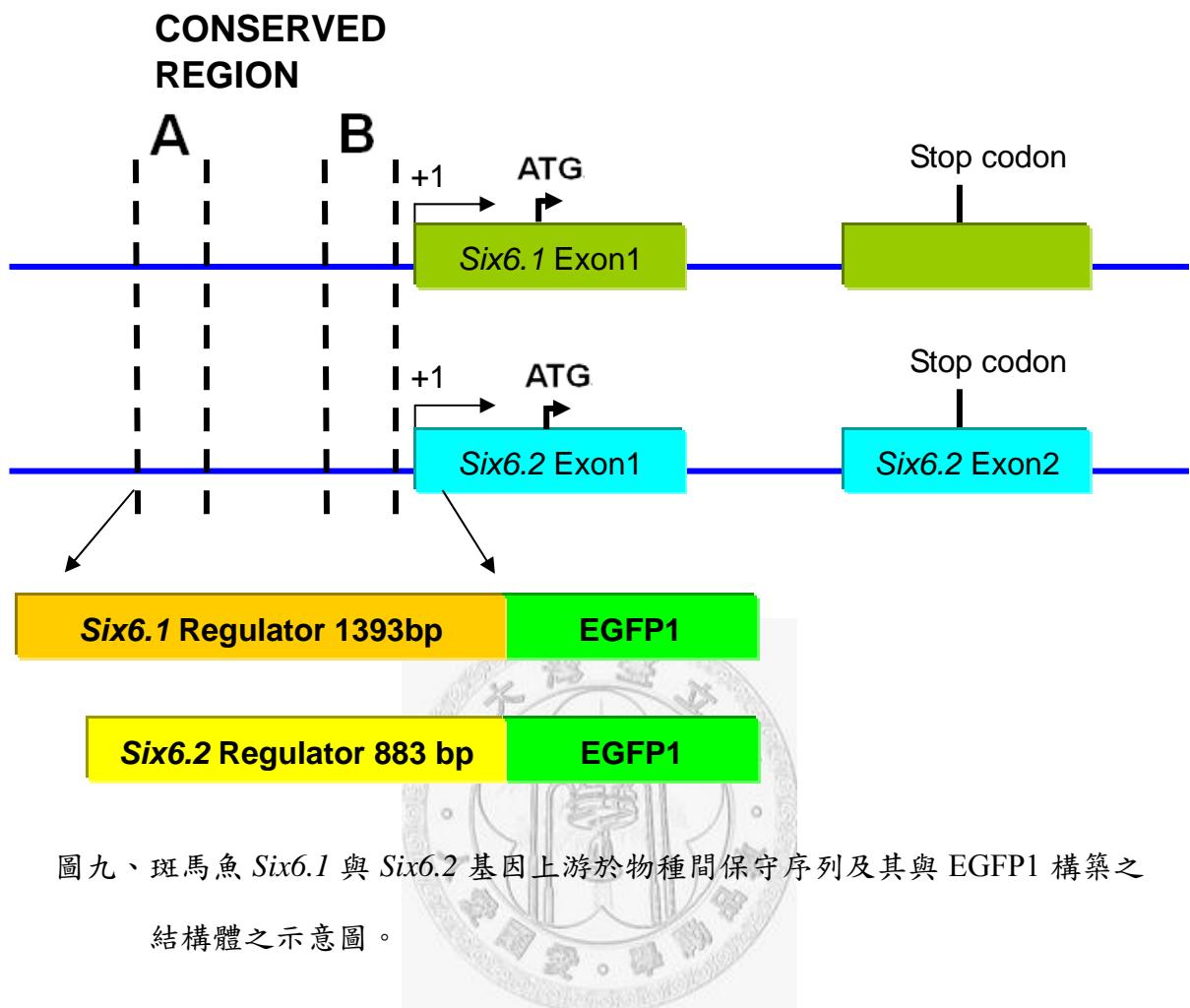
Human DNA



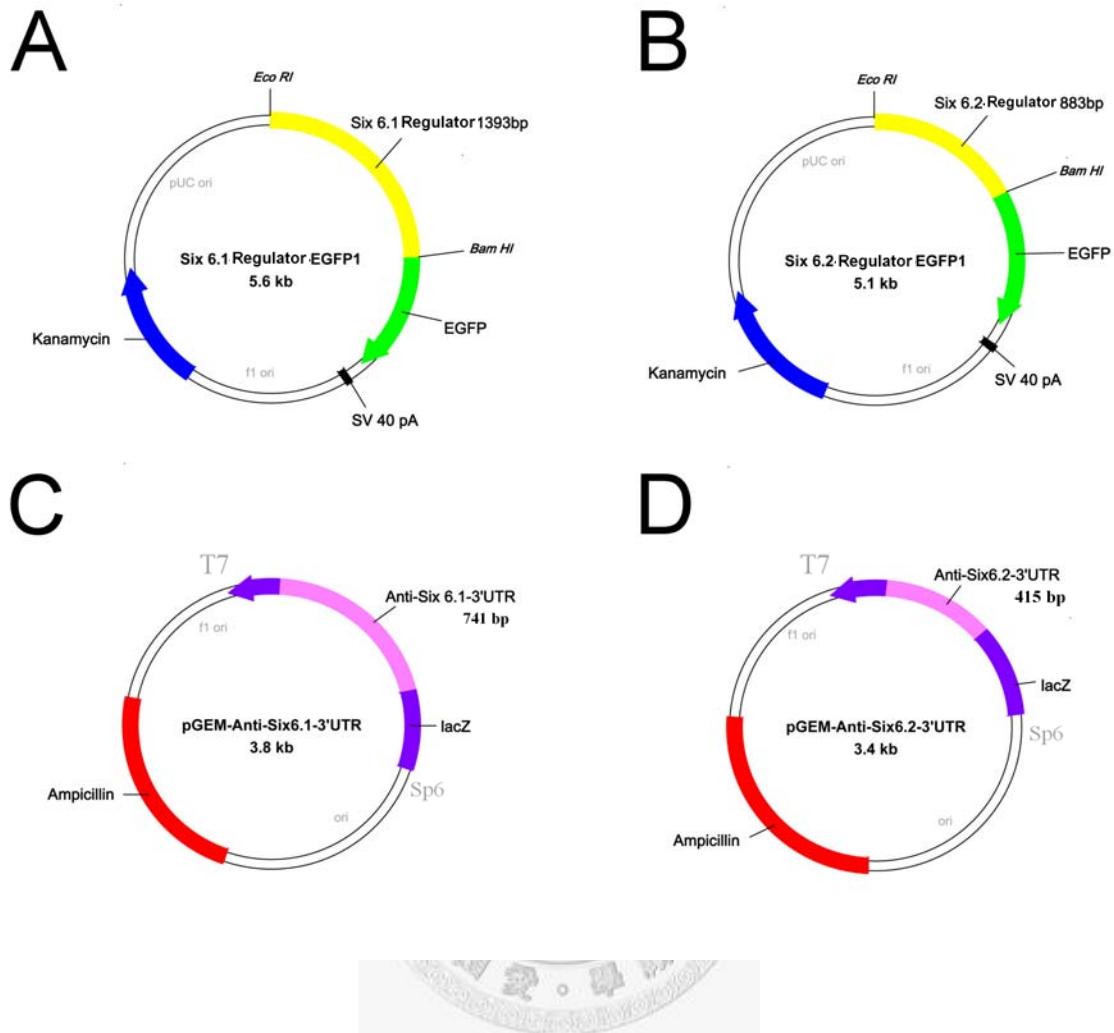
圖七、利用 Dot Matrix 軟體比對斑馬魚 Six6.1 基因(橫軸)與人類 SIX6 基因(縱軸)從 ATG(轉譯起始點)往基因上游方向(2000bp)的序列。結果可以發現兩段保守序列 DNA 片段(A、B 兩區)。本實驗構築結構體所用之引子與 Six 基因的轉錄起始點相對位置標示於圖上。



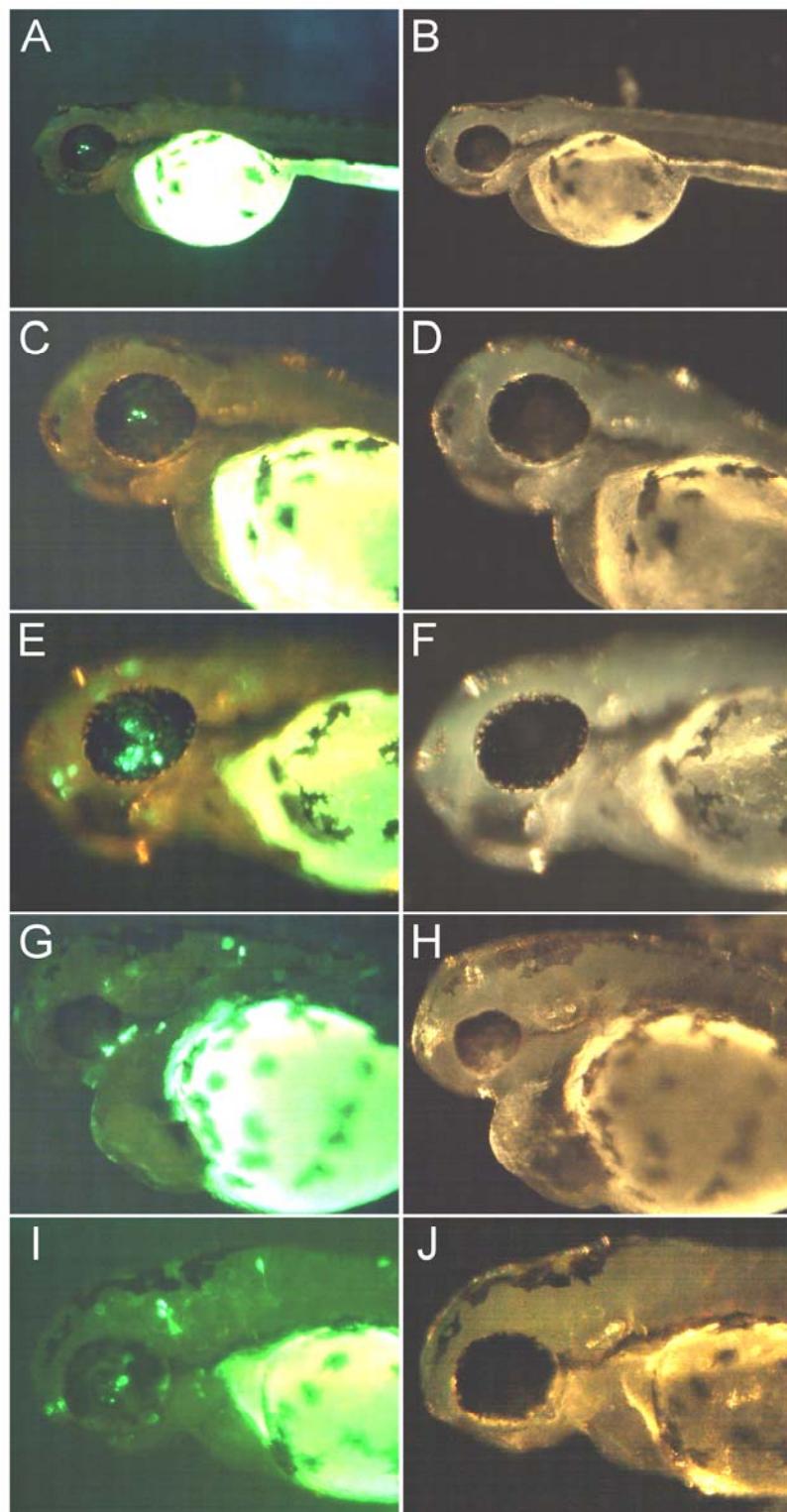
圖八、利用 Dot Matrix 軟體比對斑馬魚 Six6.2 基因(橫軸)與人類 SIX6 基因(縱軸)從 ATG(轉譯起始點)往基因上游方向(2000bp)的序列。結果可以發現兩段保守序列 DNA 片段(A、B 兩區)。本實驗構築結構體所用之引子與 Six 基因的轉錄起始點相對位置標示於圖上。



圖九、斑馬魚 *Six6.1* 與 *Six6.2* 基因上游於物種間保守序列及其與 EGFP1 構築之結構體之示意圖。

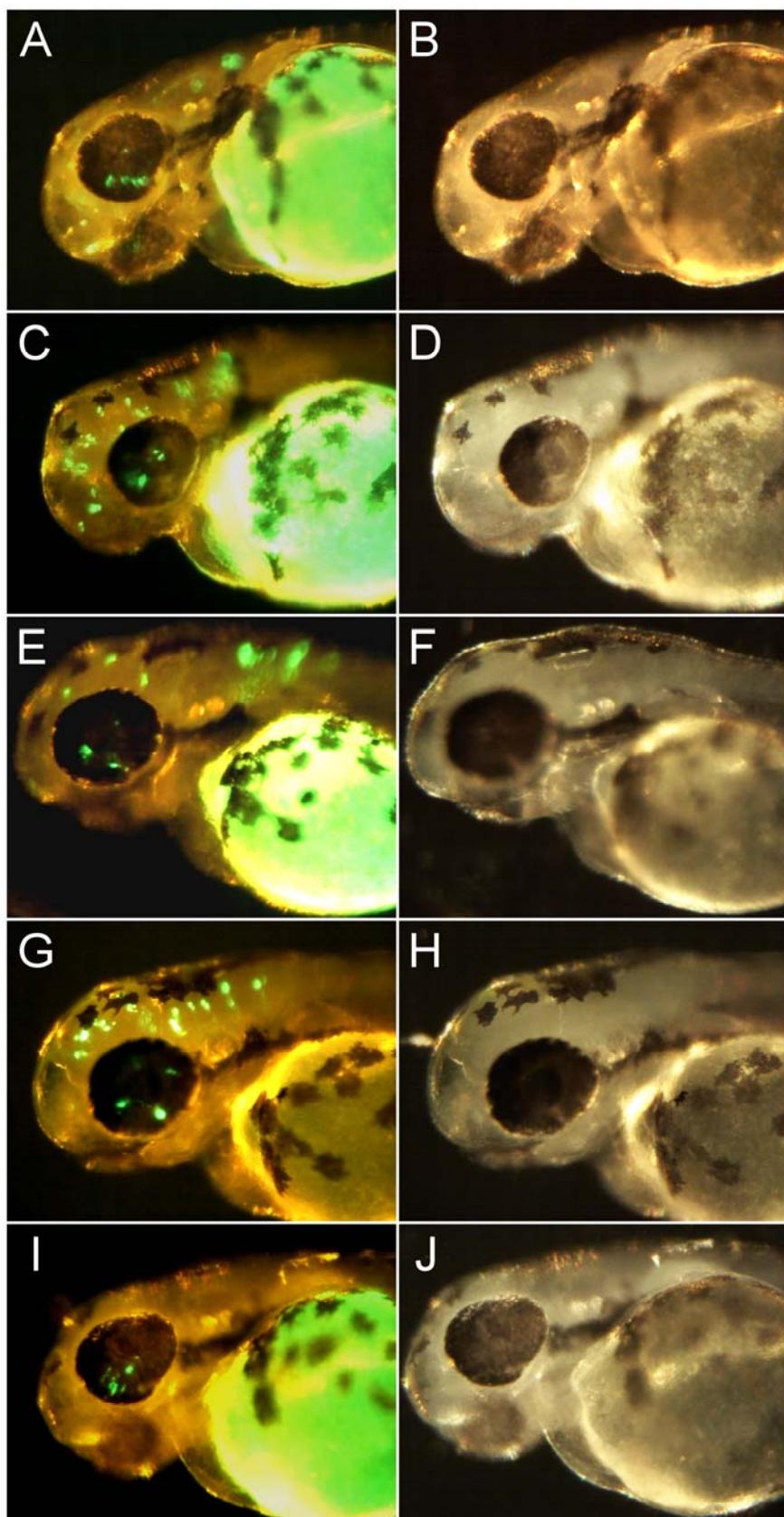


圖十、本篇實驗使用之結構體，圖(A) (B)分別為斑馬魚 *six6.1* 基因與 *Six6.2* 基因上游含有保守序列之 DNA 片段鍵結至 pEGFP-1 載體。圖(C) (D)則是 *Six6.1* 及 *Six6.2* 之 3'UTR 片段反向接至 pEGFP-T easy，用以製作斑馬魚 *six6.1* 基因與 *Six6.2* 基因互補性探針。

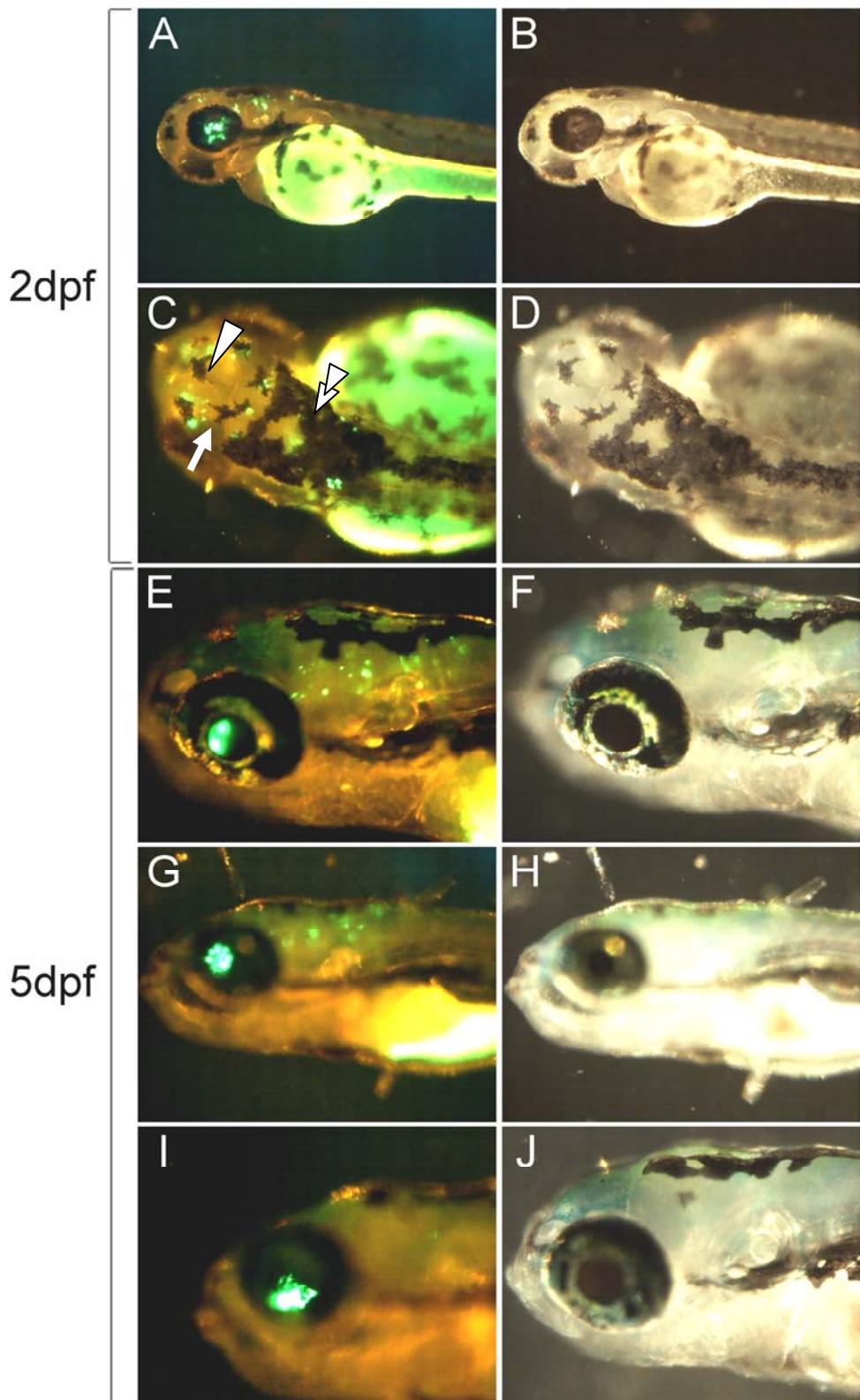


圖十一、斑馬魚 pSix6.1-1393bp-EGFP-1 (clone1)結構體過渡性轉殖之 F0 幼魚 2dpf

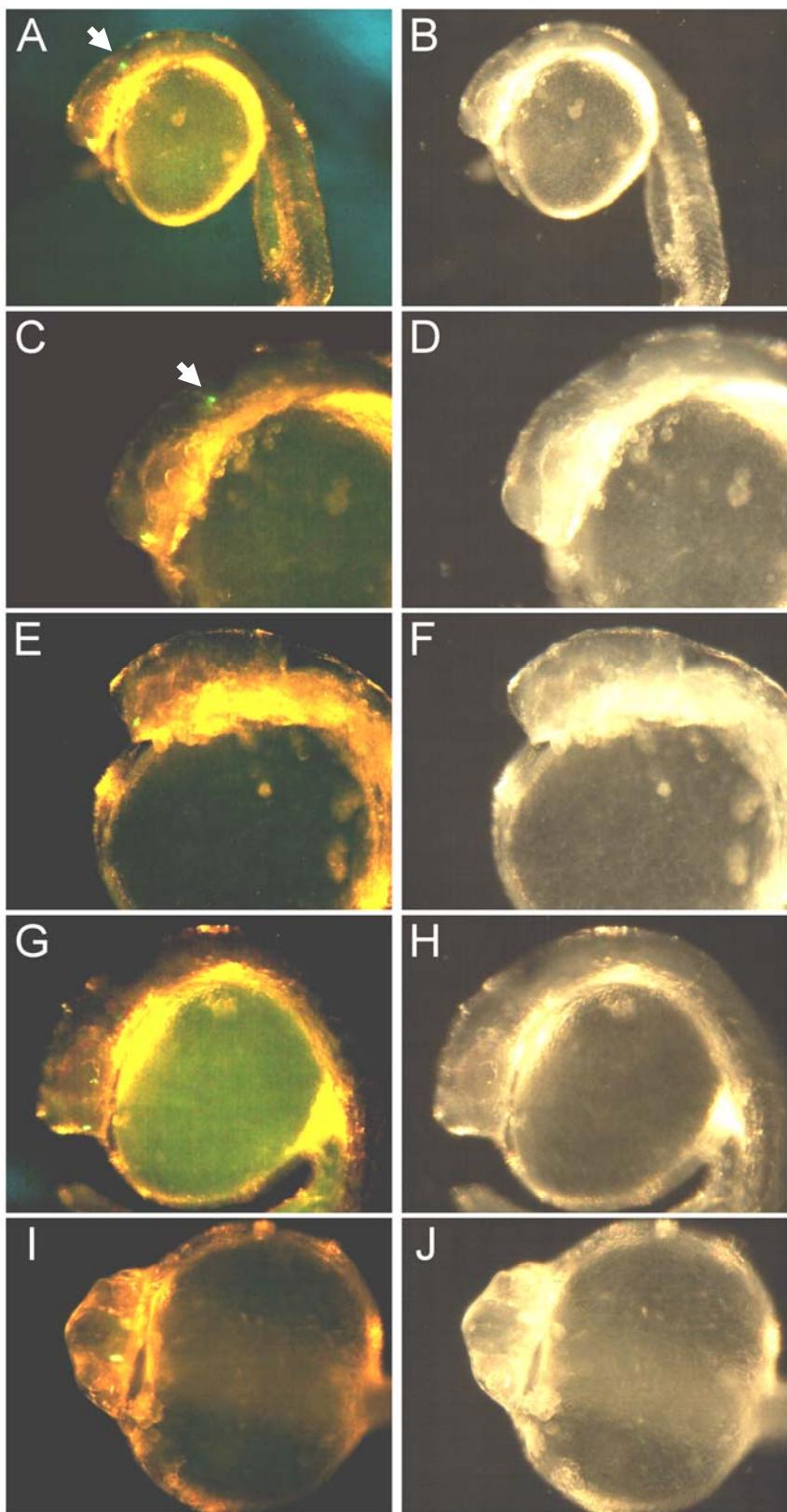
綠色螢光表現情形。圖(A)(C)(E)(I)可以明顯看出結構體轉殖的斑馬魚的視網膜有綠色螢光蛋白的表現。圖(E)(G)則是表現在下視丘及將來形成腦下垂體的位置。圖(E) (G) (I)則是在前腦和中腦的地方有神經元細胞產生綠色螢光蛋白的異位表現；而且異位表現僅會出現在中樞神經系統之中。



圖十二、斑馬魚 pSix6.1-1393 bp-EGFP-1 (clone2)結構體過渡性轉殖之 F0 幼魚 2dpf 綠色螢光表現情形。圖中都可以看出結構體轉殖的斑馬魚的視網膜有綠色但是除了圖(I)之外，其餘都伴隨有中樞神經系統神經原的異位表現。

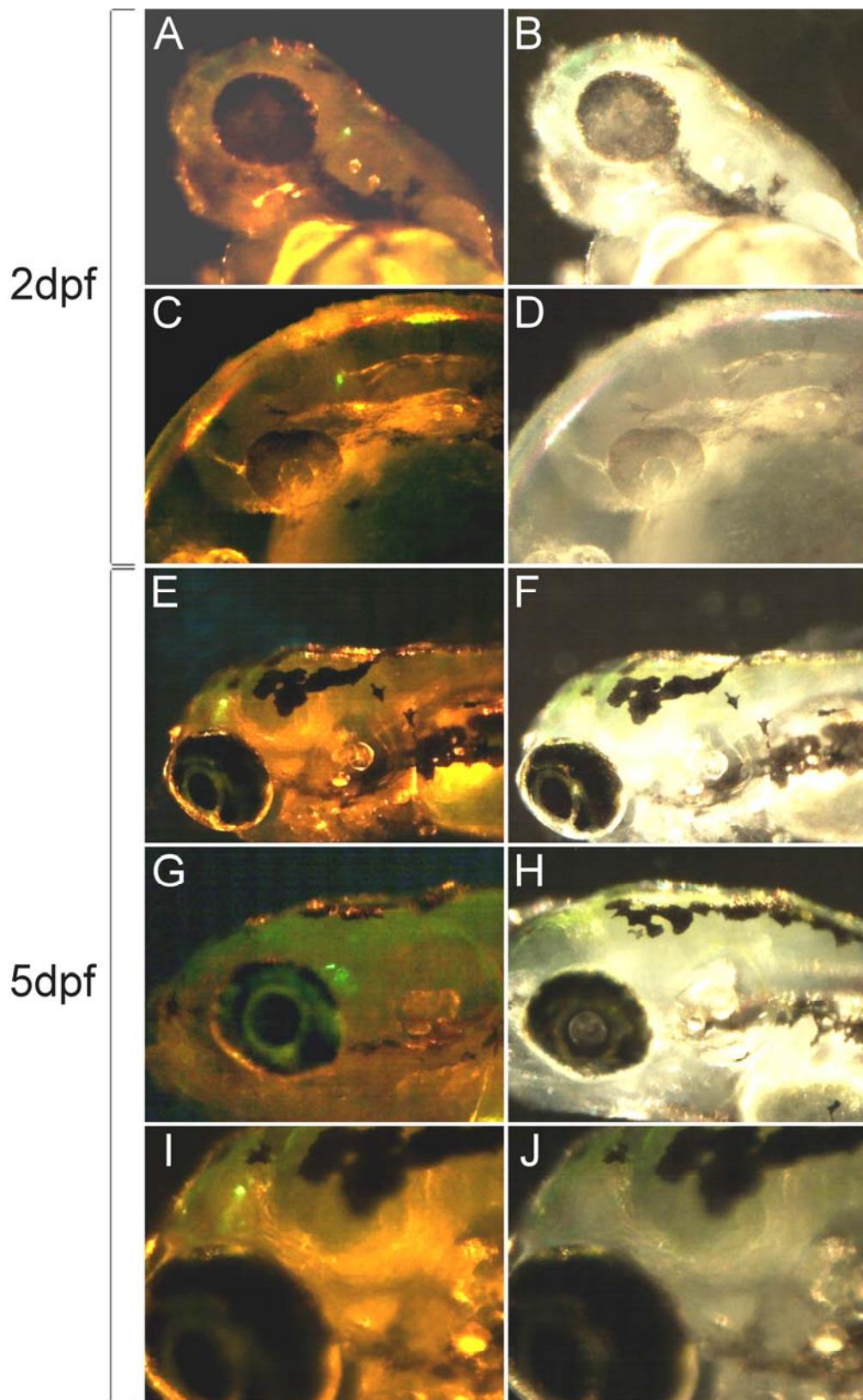


圖十三、斑馬魚 pSix6.1-1393 bp-EGFP-1 (clone2)結構體過渡性轉殖之 F0 幼魚 2&5dpf 綠色螢光表現情形。圖中可以看出結構體轉殖的斑馬魚視網膜的地方持續到 5dpf 都還有綠色螢光蛋白表現；圖(C)為圖(A)背面觀，可以看出在中樞神經系統包含 midbrain(白色箭頭)與 hindbrain(雙白色箭頭)都有產生異位表現。中/後腦交界(白色箭號)。



圖十四、斑馬魚 pSix6.2-883 bp-EGFP-1 (clone1)結構體過渡性轉殖之 F0 幼魚 1dpf

綠色螢光表現情形。圖(A)~(I)可以看出結構體轉殖的斑馬魚下視丘與將來形成腦下垂體的相對位置有綠色螢光蛋白表現；圖(A)(C)在後腦的部位有發現異位表現的情形(白色箭頭)。



圖十五、斑馬魚 pSix6.2-883 bp-EGFP-1 (clone1)結構體過渡性轉殖之 F0 幼魚
 2&5dpf 綠色螢光表現情形。早期下視丘與將來形成腦下垂體的相對位置
 的綠色螢光蛋白表現已經不容易觀察到(5dpf)，只有看到中腦與後腦會有
 部分的異位表現。

結構體	已鏡檢的斑馬魚總隻數(F0)	有表現 GFP 的斑馬魚(隻數/百分比)	視網膜有表現 GFP 的斑馬魚(隻數/百分比)	中樞神經系統有表現 GFP 的斑馬魚(隻數/百分比)
pSix6.1-1393bp-EGFP-1 (clone1)	37	35/ 95%	26/ 70.2%	28/ 75.7%
pSix6.1-1393bp-EGFP-1 (clone2)	56	35/ 62.5%	17/ 30.3%	30/ 53.6%

表一、斑馬魚 Six6.1 基因上游 1393 bp 序列接合到 EGFP1 之 N 端結構體，過渡性轉殖後 3dpf 親代(F0)表現綠色螢光蛋白之百分比。

結構體	已鏡檢的斑馬魚總隻數(F0)	有表現 GFP 的斑馬魚(隻數/百分比)	視網膜有表現 GFP 的斑馬魚(隻數/百分比)	將形成腦下垂體前葉之區域表現 GFP 的斑馬魚(隻數/百分比)	CNS*有表現 GFP 的斑馬魚(隻數/百分比)
pSix6.2-883bp-EGFP-1 (clone1) / 1dpf	40	29/ 72.5%	0 %	23/ 57.5%	6/ 15%
pSix6.2-883bp-EGFP-1 (clone1) / 5dpf	74	43/ 58.1%	2/ 2.7%	0 %	39/ 52.7%

(*)CNS , Central Nervous System

表一、斑馬魚 Six6.2 基因上游 883bp 序列接合到 EGFP1 之 N 端結構體，過渡性轉殖後 1&5dpf 親代(F0)表現綠色螢光蛋白之百分比。

参考文献

- Aijaz, S., et al., 2004. Absence of SIX6 mutations in microphthalmia, anophthalmia, and coloboma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45, 3871-6.
- Bernier, G., et al., 2000. Expanded retina territory by midbrain transformation upon overexpression of Six6 (Optx2) in *Xenopus* embryos. *Mech Dev.* 93, 59-69.
- Carl, M., et al., 2002. Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye. *Development.* 129, 4057-63.
- Cheyette, B. N., et al., 1994. The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron.* 12, 977-96.
- Gallardo, M. E., et al., 1999. Genomic cloning and characterization of the human homeobox gene SIX6 reveals a cluster of SIX genes in chromosome 14 and associates SIX6 hemizygosity with bilateral anophthalmia and pituitary anomalies. *Genomics.* 61, 82-91.
- Jean, D., et al., 1999. Six6 (Optx2) is a novel murine Six3-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk. *Mech Dev.* 84, 31-40.
- Jeong, Y., et al., 2006. A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers. *Development.* 133, 761-72.
- Kawakami, K., et al., 1996. Identification and expression of six family genes in mouse retina. *FEBS Lett.* 393, 259-63.
- Kawakami, K., et al., 2000. Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays.* 22, 616-26.
- Kenyon, K. L., et al., 2005. Fly SIX-type homeodomain proteins Sine oculis and Optix partner with different cofactors during eye development. *Dev Dyn.* 234, 497-504.
- Kirby, R. J., et al., 2001. *Drosophila* homolog of the myotonic dystrophy-associated gene, SIX5, is required for muscle and gonad development. *Curr Biol.* 11, 1044-9.
- Li, X., et al., 2002. Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science.* 297, 1180-3.
- Loosli, F., et al., 1999. Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* 13, 649-54.
- Oliver, G., et al., 1996. Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene Six3. *Mech Dev.* 60, 233-9.
- Oliver, G., et al., 1995a. Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates

- the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development*. 121, 4045-55.
- Oliver, G., et al., 1995b. Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development*. 121, 693-705.
- Seimiya, M., Gehring, W. J., 2000. The *Drosophila* homeobox gene *optix* is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism. *Development*. 127, 1879-86.
- Seo, H. C., et al., 1999. Six class homeobox genes in *drosophila* belong to three distinct families and are involved in head development. *Mech Dev.* 83, 127-39.
- Serikaku, M. A., O'Tousa, J. E., 1994. *sine oculis* is a homeobox gene required for *Drosophila* visual system development. *Genetics*. 138, 1137-50.
- Silver, S. J., Rebay, I., 2005. Signaling circuitries in development: insights from the retinal determination gene network. *Development*. 132, 3-13.
- Toy, J., Sundin, O. H., 1999. Expression of the *optx2* homeobox gene during mouse development. *Mech Dev.* 83, 183-6.
- Toy, J., et al., 1998. The *optx2* homeobox gene is expressed in early precursors of the eye and activates retina-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 10643-8.
- Wallis, D. E., et al., 1999. Mutations in the homeodomain of the human *SIX3* gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet.* 22, 196-8.
- Weasner, B., et al., 2007. *Sine oculis*, a member of the *SIX* family of transcription factors, directs eye formation. *Dev Biol.* 303, 756-71.
- Zuber, M. E., et al., 1999. Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of *XOptx2*. *Cell.* 98, 341-52.