

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

藉由綠色螢光蛋白報導基因研究斑馬魚 *Six1.1* 基因

啟動子之顱顏組織專一性表現

Functional Analysis of *Six1.1* Gene Enhancer Elements

During Craniofacial Development by Transgenic

Zebrafish with Green Fluorescent Protein (GFP)

Reporter Gene

呂智楷

Chih-Kai Lu

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

藉由綠色螢光蛋白報導基因研究斑馬魚 *Six1.1* 基因
啟動子之顱顏組織專一性表現

Functional Analysis of *Six1.1* Gene Enhancer Elements
During Craniofacial Development by Transgenic
Zebrafish with Green Fluorescent Protein (GFP)

Reporter Gene

本論文係呂智楷君 (R95450013) 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 育 恩	陳 士 成	姚 文 玲
----------------------------	-------------	-------------	-------------

誌謝

於台大口生所碩士班兩年的時間轉眼便匆匆地過去，能順利畢業的背後，是許多人的幫忙與支持，首先要感謝的是我的家人們，讓我沒有後顧之憂能努力向前，再來感謝一直陪伴著我的靖筑，有妳我才能更有勇氣的堅持走下去。謝謝我的指導教授張百恩老師，細心地指導許多實驗上的細節及提供許多論文修改上的建議，還有口試委員姚宗珍老師及中研院生醫所陳志成老師，在口試過程中提供許多寶貴的意見，使本篇論文整體的完整性能更加提高。

謝謝在實驗室一同努力作實驗的伙伴們：很可靠的旻男(MM)，不管有什麼問題，找你總能得到一個不錯的答案，真的很感謝你這兩年在實驗及辦活動等許多事情上都幫了我不少忙。有趣的文裕和老實的宣貿兩學弟，有你們的加入為實驗室帶來了不少活力，如果沒有你們的照顧，我的魚可能都掛掉了，感謝你們分擔許多實驗室的大小事務。CCY、嘉宏、麗芬學姐、志隆、勻娟、Steven 學長、雅文學姐，在我作實驗遇到瓶頸時，能陪我一起討論，並提供寶貴的意見解決問題，真的很感謝你們。當然還有口生所最讚的同學們，與你們作同學的這兩年，一同辦了迎新送舊等許多活動，很有趣也很多樣化，也許有笑有淚有生氣有無奈，但那些畫面我想我會一直記得很久很久。謝謝尤寶、頌和、佑文與鼎峰等許多好朋友們的陪伴，你們陪我紓解了不少壓力。感謝這兩年在碩士班遇到的所有人，你們豐富了我的碩士班生活，謝謝大家，最後我想說一句：You complete me.

中文摘要

Six 基因家族的第一個成員 *sine oculis (so)* 最早於果蠅(*Drosophila*)中被鑑定出來，且根據核苷酸序列同源性質(nucleotide sequence homology)，Six 基因家族已於斑馬魚、人類以及小鼠等許多物種中被鑑定出來。在脊椎動物中，Six 基因家族的成員會廣泛地在許多組織中表現，故可得知其對於調控胚胎正常的型態發育、器官發育及細胞的分化上扮演著重要的角色。

本篇實驗之主要目的在分析斑馬魚 *six1* 基因(其後稱為 *six1.1*)基因啟動子之活性及其可能位於 *six1.1* 基因上下游於物種間保守序列中的順式調控因子(cis-regulatory element)。首先將斑馬魚 *six1.1* 基因上游約 2.6 kb (+31/-2631)之 DNA 片段，和綠色螢光蛋白報導基因(EGFP, enhanced green fluorescent protein)鍵結形成結構體，並以顯微注射的方式送入斑馬魚之受精卵中。在過渡性轉殖實驗結果中，發現此結構體能驅使綠色螢光蛋白在受精後斑馬魚胚胎的體節(somite)、耳囊(otic vesicle)以及神經丘(neuromast)等位置有著組織專一性的表現。

接著將帶有斑馬魚 *six1.1* 上游 2.6 kb 啟動子片段之 F0 親代成魚，與野生型之成魚交配後便可得到 F1 子代，觀察其綠色螢光蛋白表現後可從中篩選到 1 個轉殖恆定品系(transgenic stable line)，且其胚胎在發育至 72 小時時期後，可明顯觀察到在耳囊腹部(ventral otic vesicle)及神經丘(neuromast)皆有綠色螢光蛋白之表現，此結果與先前報告之原位雜合反應偵測斑馬魚內生性 *six1.1* mRNA 表現的組織位置相符。以上這些結果顯示在斑馬魚 *six1.1* 上游 2.6 kb (+31/-2631)的區域內，應包含有能調控此基因在體節(somite)、耳囊(otic vesicle)及神經丘(neuromast)等組織專一性表現的順式調控因子。

之後，利用 Dot Matrix 軟體及 UCSC 網頁比對包含斑馬魚、人類、小鼠、大鼠、負鼠、雞、非洲爪蛙、青鱗魚、四齒鮪及河豚等十個物種 *Six1* 基因上下游相關序列，可發現在各物種 *Six1* 基因的上下游包含有五段高度保守的片段(conserved sequence)，分別命名為 UCR1 (upstream conserved region 1)、UCR2、UCR3、UCR4 以及 DCR (downstream conserved region)，其中 UCR1、UCR2、

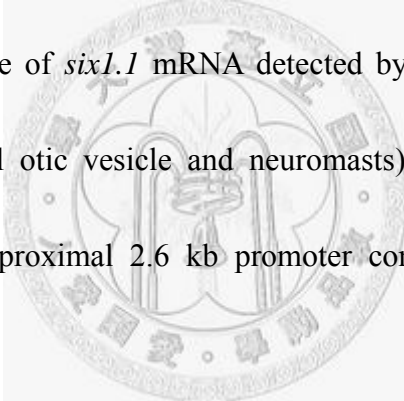
UCR3 以及 UCR4 位於 *six1.1* 上游及 *six4.1* 下游，意即位於 *six1.1* 及 *six4.1* 兩基因之間，而且其中 UCR1 及 UCR2 位於斑馬魚 *six1.1* 近端 2.6 kb 的範圍內。將各片段與斑馬魚 *six1.1* 基因近端 280 bp 啟動子(promoter)或是具有 HSV-thymidine kinase (TK)基礎啟動子之載體相互鍵結成結構體，同樣以顯微注射的方式送入斑馬魚之受精卵，在過渡性基因轉殖實驗中，可觀察到含有各片段之結構體在體節(somite)、耳囊(otic vesicle)、神經丘(neuromast)以及咽弓區域(branchial arch)等不同的組織器官中有綠色螢光蛋白的表現，顯示這些片段所含之促進子(enhancer)，可能具有重覆性(enhancer redundancy)。綜合上述，本篇實驗於斑馬魚 *six1.1* 基因的上下游相關序列，發現有五個保守片段含有各物種間的高度保留序列，且其彼此之間具有調控功能性重覆的現象(enhancer redundancy)，由於這些片段位於 *six1.1* 及 *six4.1* 兩基因間或其鄰近區域，我們推測這些片段具有能同時調控斑馬魚 *six1.1* 及 *six4.1* 於組織專一性表現的功能。

關鍵字：Six1、Six4、斑馬魚、保守序列、神經丘、體節、耳囊

英文摘要

The homeobox-containing Six genes, homologues to *Drosophila sine oculis* (*so*) gene, are widely expressed in many tissues during vertebrate embryogenesis. Identified in many species, Six family genes are hypothesized to play important roles in morphogenesis, organogenesis and cell differentiation.

To identify the *cis*-regulatory elements of zebrafish *six1.1*, we ligated the genomic DNA promoter region from +31 to -2631 to the *egfp* gene and injected this construct into zebrafish embryos. The resulting reporter-EGFP expression showed spatial restrictions similar to those of *six1.1* mRNA detected by *in situ* hybridization (i.e., mainly in somites, ventral otic vesicle and neuromasts). This transient transgenic assay suggested that the proximal 2.6 kb promoter contains some tissue-specific *cis*-regulatory elements.



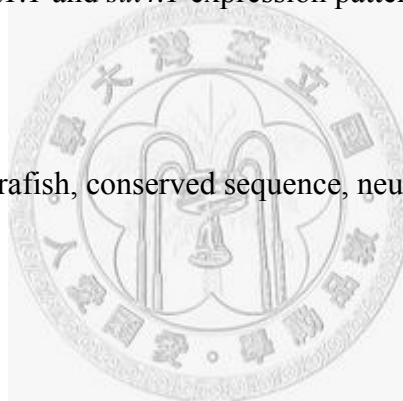
One stable transgenic line (F1 generation) injected with *six1.1* proximal 2.6 kb promoter was obtained and the EGFP reporter expression can be observed mainly in ventral otic vesicle and neuromasts.

Dot Matrix and UCSC-bioinformatics analyses of the *Six1* genes in many species revealed five conserved sequences, designated as UCR1 (upstream conserved region 1), UCR2, UCR3, UCR4 and DCR (downstream conserved region), in the vicinity of zebrafish *six1.1* and *six4.1* genes, that are candidate regulatory elements. These

fragments inserted upstream of the zebrafish *six1* proximal promoter or the *thymidine kinase* (TK) basal promoter with *egfp* reporter gene were analyzed in zebrafish embryos. The reporter EGFP expression was observed in somites, otic vesicle, neuromasts and branchial arch.

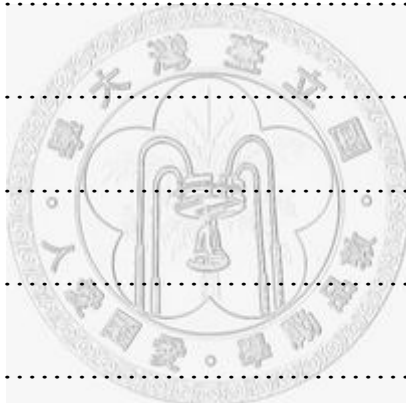
Taken together, these results suggested that 2.6 kb upstream region of zebrafish *six1.1* has regulatory function. And five conserved sequences harboring enhancer elements that may have enhancer redundancy and participate in the regulatory mechanism of zebrafish *six1.1* and *six4.1* expression patterns.

Keywords: Six1, Six4, zebrafish, conserved sequence, neuromast, somite, otic vesicle



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.....	36
參、實驗方法.....	43
肆、結果.....	55
伍、討論.....	65
陸、圖表.....	70
參考文獻.....	101



壹、前言

一、Six基因家族之介紹

1. Six基因家族介紹及其發現之過程

在1994年由Cheyette及Serikaku等人在果蠅(*Drosophila*)中鑑別出Six基因家族的第一個成員*sine oculis (so)*，並認為此基因與果蠅複眼(compound eye)的發育過程有關。而在接下來幾年在果蠅複眼發育的進一步研究中，發現到Six基因家族尚會和其他基因家族協同地調控複眼的形成，例如*eyeless* (Pax基因家族)、*eye absent* (Eya基因家族)以及*dachshund* (Dach基因家族)，而這些基因家族對於調控果蠅複眼的形成及分化過程皆扮演著重要的角色(Bessarab et al., 2004; Cheyette et al., 1994; Kawakami et al., 2000)。

到目前為止，根據果蠅*sine oculis (so)*基因的核苷酸序列同源性質(nucleotide sequence homology)，Six基因家族已在人類(Boucher et al., 1996; Boucher et al., 1995)、小鼠(Jean et al., 1999; Kawakami et al., 1996a; Kawakami et al., 1996b; Oliver et al., 1995a; Oliver et al., 1995b; Toy and Sundin, 1999)、雞(*Gallus gallus*)(Bovolenta et al., 1998; Esteve and Bovolenta, 1999; Lopez-Rios et al., 1999)、非洲爪蛙(*Xenopus tropicalis*)(Seo et al., 1999; Zuber et al., 1999)、河豚(*Takifugu rubripes*)、四齒魨(*Tetraodon nigroviridis*)以及青鱗魚(Medaka, *Oryzias latipes*)(Kobayashi et al., 1998; Loosli et al., 1998; Seo et al., 1999; Seo et al., 1998a; Seo et al., 1998b; Seo et al., 1998c)等許多物種中被鑑定出來(Kawakami et al., 2000)。

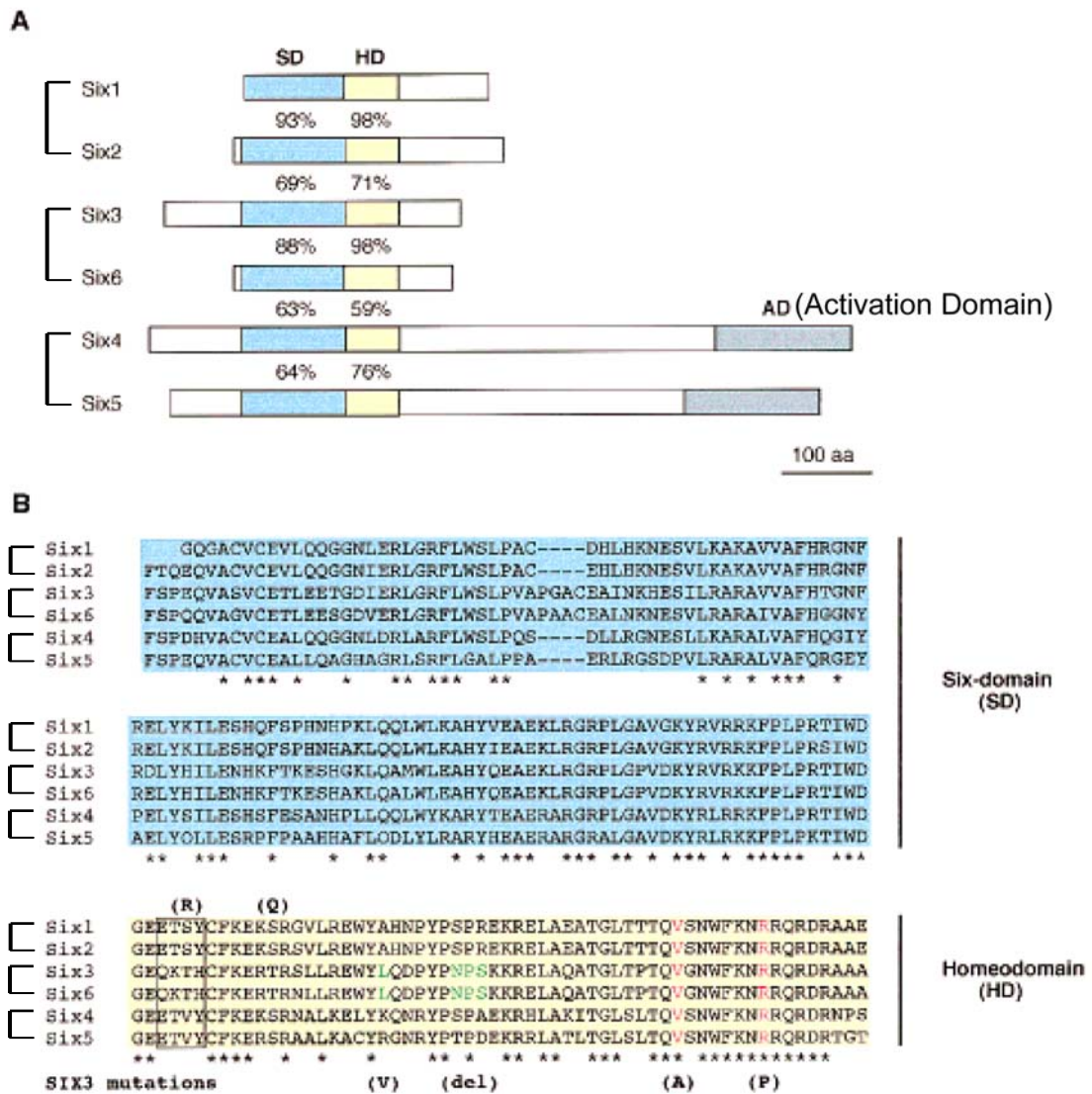
2. Six基因家族的蛋白質之基本結構

在各物種間的Six基因家族中，所有的Six蛋白皆包含有兩段高度保守的區域(highly conserved region)，分別為Six-type homeodomain (Six-type HD)及Six-domain (SD)，Six-type HD由60個胺基酸(amino acid)所組成，功能和Six蛋白

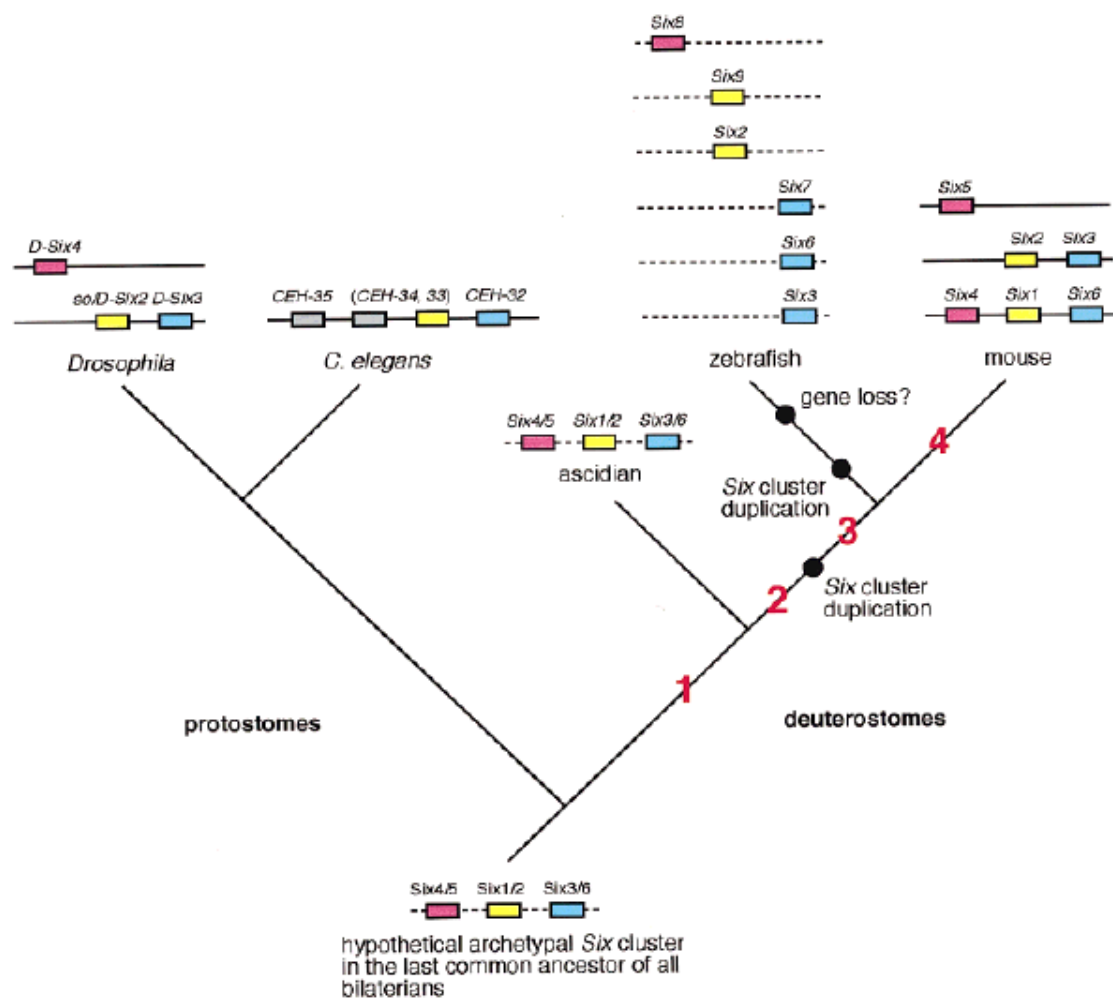
能否接合到特定DNA序列有關，而與其他大部分的homeodomains (HD)較為不一樣的是，Six-type HD在第5個位置缺少精胺酸(Arginine; R)及在第12個位置缺少麩胺酸(Glutamine; Q)(見附圖一)，這種獨特的情形也導致Six-type HD不會接合到一般homeodomains的結合位(HD binding site)，即具有TAAT核心序列(TAAT core)的DNA序列上；Six-domain (SD)則是由110個胺基酸所組成，功能主要是和其他輔助因子(例如Eya和Groucho)協同地提高Six蛋白接合到特定DNA序列之專一性(specificity)。關於Six-type HD與Six-domain (SD)在Six基因家族之間的胺基酸序列保守性見附圖一(Brugmann and Moody, 2005; Kawakami et al., 2000)。

在脊椎動物中，Six基因家族從Six1到Six6一共有六個成員，根據彼此胺基酸序列的相似性還可再區分成三個子群組：Six1/Six2、Six3/Six6以及Six4/Six5(見附圖一)，且在物種間漫長的演化上，Six基因家族中的子群組間在基因體上之排列順序仍會具有保守性(見附圖二)(Kawakami et al., 2000)。

Six基因家族中的每個成員在胚胎中的表現位置皆不盡相同(見附圖三)，因此可推測在調控胚胎組織的發育過程中各扮演著不同的角色。而目前研究已知Six基因家族主要在對於在調控顱顏組織(craniofacial)、眼睛、肌肉以及腎臟等組織器官的正常發育生成與細胞的分化過程中扮演著重要的角色(Brodbeck and Englert, 2004; Kawakami et al., 1996a; Kawakami et al., 2000)。

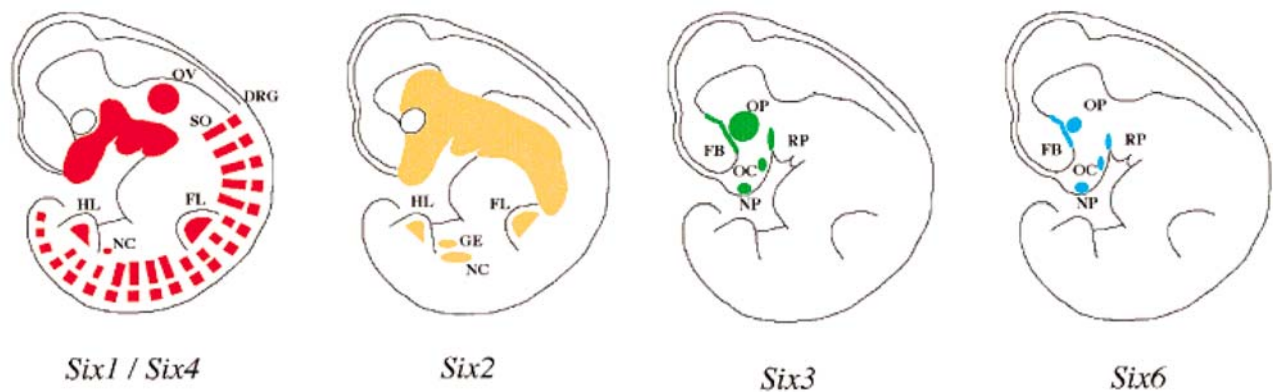


附圖一、Six-domain (SD)和Six-type homeodomain (Six-type HD)在Six基因家族之間胺基酸序列的保守性(adapted from Kawakami *et al.*, 2000)



附圖二、在物種的演化過程中，Six 基因家族中的子群組 Six4/5、Six1/2 及 Six3/6 在基因體上之排列順序仍會具有保守性

(adapted from Kawakami *et al.*, 2000)



附圖三、Six基因家族成員於小鼠胚胎中的表現位置

(DRG: dorsal root ganglia 背根神經節; FB: forebrain 前腦; FL: forelimb 前肢; HL: hindlimb 後肢; NC: nephrogenic cord 生腎索; NP: nasal placode 嗅板; OC: optic chiasm 視交叉; OP: optic vesicle 眼囊; GE: genital eminence 生殖堤; OV: otic vesicle 耳囊; RP: Rathke's pouch 拉特克囊; SO: somites 體節)

(adapted from Kawakami *et al.*, 2000)

二、Six 基因家族之成員介紹及其個別在發育過程中所扮演之角色

1. *Six1* 基因在小鼠胚胎中的表現型態及 *Six1* 基因剔除後對小鼠組織發育的影響

早先的研究在對於小鼠 *Six1* 基因所作的 *lacZ* knock-in heterozygote (異型合子) 實驗中，可觀察到 *Six1* 除了表現在體節(somites)、四肢的間葉細胞(limb mesenchyme)、背根神經節(dorsal root ganglia)、脊索(notochord)以及生腎索(nephrogenic cord)等組織外，還可發現 *Six1* 基因在顱顏組織中也有所表現，例如在耳板(otic placode)、嗅板(nasal placode)、咽弓(branchial arches)、副甲狀腺(parathyroid gland)、唾腺(salivary gland)以及之後會形成腦下垂體前葉的拉特克囊(Rathke's pouch)等位置(見附圖三、附圖四、附表一、附表二及附表三)(Brugmann and Moody, 2005; Kawakami *et al.*, 2000; Ohto *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 1995b; Ozaki *et al.*, 2004; Ozaki *et al.*, 2001)。

Table 1 | Tissues expressing Six1, Six2 and Six4 in different vertebrate animals

nd, not described.

Protein	Frog tissues	Fish tissues	Chick tissues	Mouse tissues	Human tissues
Six1	entire PPE	PPE	nd	anterior head mesoderm	limb buds ¹¹
	cranial placodes (excluding lens)	cranial placodes pituitary		pharyngeal pouches notochord	skeletal muscle ^{12,13} fetal eye ¹³
	muscle precursors	branchial arches		somites	tongue ¹³
	lateral line organs ^{1,2}	somites pectoral fin muscle precursors lateral line organs ³		otic vesicle nasal placodes Rathke's pouch kidney dorsal root ganglia limb bud genitalia ⁷	
Six2	otic and olfactory regions of PPE	nd	pituitary ⁵	head mesenchyme	skeletal muscle
	cranial placodes (including lens)			foregut	limb
	muscle precursors			branchial arches	heart
	pronephric kidney			neural crest	adrenal/kidney
	stomach mesoderm			kidney	liver
	eye ²			hindbrain	eye
				limb buds	brain/spinal cord
			gut mesoderm	middle ear	
			genitalia ^{7,8}	small intestine ¹⁴	
Six4	Six4.1 and Six 4.2: entire PPE	Six 4.1: involuting hypoblast; PPE; cranial placodes except lens; pituitary; cranial ganglia;	entire PPE cranial placodes (including lens)	otic placode nasal placode Rathke's pouch	nd
	otic placode	somites; fin buds; lateral line organs.	somites	branchial arches	
	olfactory placode		limb buds	cranial ganglia	
	lens placode	Six 4.2: paraxial mesoderm;	prechordal plate	dorsal root ganglia	
	muscle precursors	somites; otic vesicle; fin buds	notochord	somites	
	head mesenchyme	Six 4.3: ubiquitous at first;	spinal cord	limb buds	
	eye ²	midbrain, forebrain, eye, otic vesicle ⁴	dorsal root ganglia	kidney ^{8,9,10}	
			retina	brain/spinal cord ⁸	
			kidney ⁶	retina ⁹	

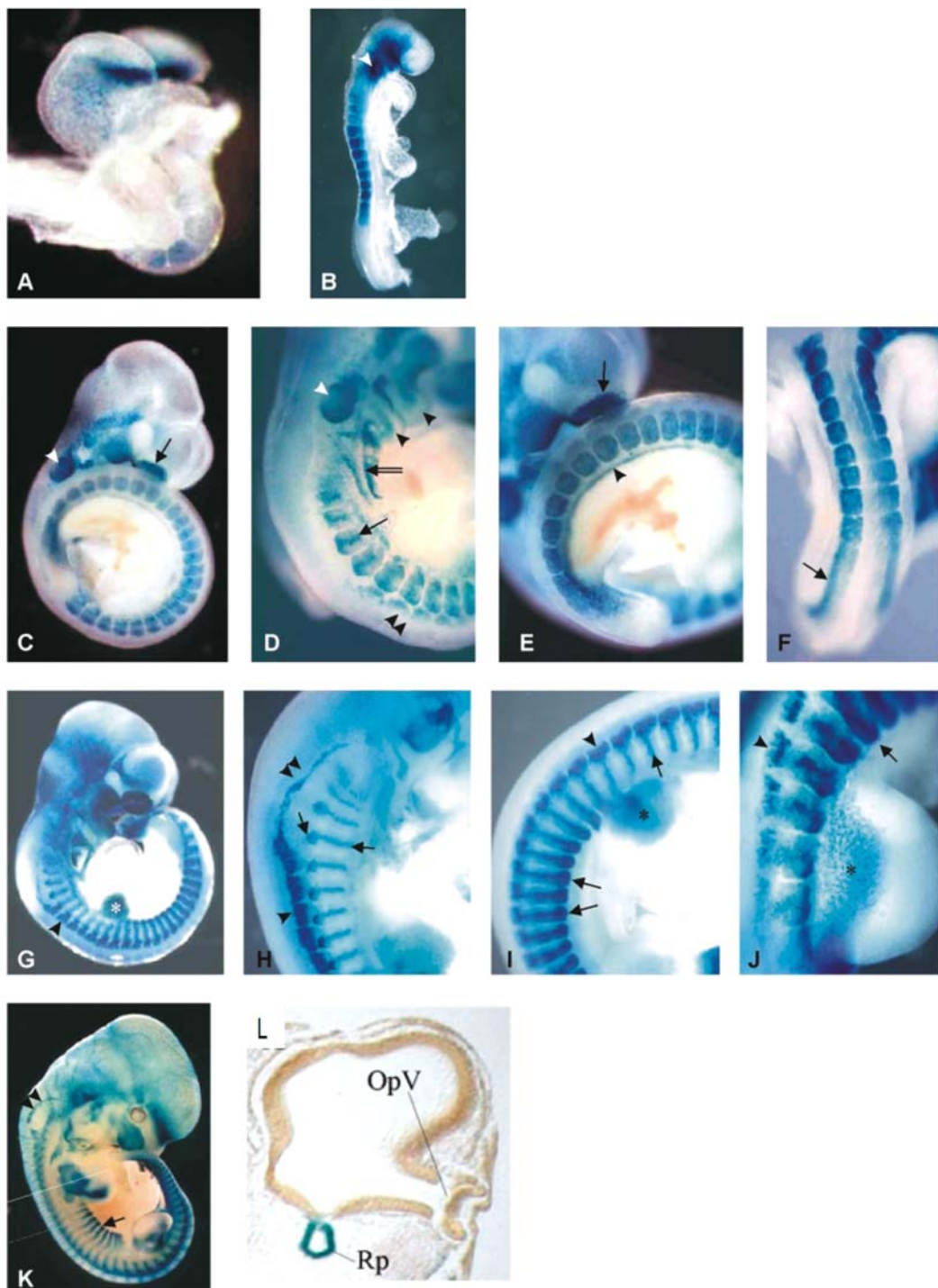
References: (1) Pandur and Moody, 2000; (2) Ghanbari et al., 2001; (3) Bessarab et al., 2004; (4) Kobayashi et al., 2000; (5) Gen Bank accession number BM491534; (6) Esteve and Bovolenta, 1999; (7) Oliver et al., 1995; (8) Ohto et al., 1998; (9) Niiya et al., 1998; (10) Ozaki et al., 2001; (11) Fougousse et al., 2002; (12) Boucher et al., 1996; (13) <http://expression.gnf.org/cgi-bin/>; (14) Boucher et al., 2000.

附表一、Six1、Six2 與 Six4 於非洲爪蛙、斑馬魚、雞、小鼠、人類等各物種中的表現型態(adapted from Brugmann and Moody, 2005)

	Mouse tissues	Zebrafish tissues	Frog tissues
Six1	Branchial arches Otic vesicle Nasal placode Rathke's pouch (Pituitary gland) Somites Nephrogenic cords Cranial mesenchyme Limb mesenchyme Dorsal root ganglia Connective tissue precursor cell Cranial proximal ganglia ⁵	Branchial arches (Pharyngeal pouches) Otic placode Olfactory placode Somites Adenohypophysis (Pituitary gland) Cranial placodes Head mesenchyme Pectoral fin Muscle precursors Pre-placodal ectoderm Lateral line organs (Neuromasts) ^{3,9}	Pre-placodal ectoderm Cranial placodes (excluding lens) Muscle precursors Lateral line organs (Neuromasts) ^{1,2}
Six4	Otic placode Nasal placode Rathke's pouch Branchial arches Cranial ganglia Dorsal root ganglia Somites Limb buds Kidney Parathyroid Salivary gland ^{6,7,8}	Cranial placodes (excluding lens) Adenohypophysis (Pituitary gland) Cranial ganglia Somites Fin buds Pre-placodal ectoderm Lateral line organs (Neuromasts) ^{4,9}	Otic placode Olfactory placode Lens placode Muscle precursors Head mesenchyme Eye Pre-placodal ectoderm ²

附表二、整理Six1及Six4基因於小鼠、斑馬魚、非洲爪蛙等物種間的表現型態，
可得知Six1及Six4基因於物種間的表現型態皆相當類似

References: (1) Pandur and Moody, 2000; (2) Ghanbari et al., 2001; (3) Bessarab et al., 2004; (4) Kobayashi et al., 2000; (5) Oliver et al., 1995; (6) Ohto et al., 1998; (7) Niiya et al., 1998; (8) Ozaki et al., 2001; (9) Thisse, B., Thisse, C. (2004). ZFIN Direct Data Submission (<http://zfin.org>).



附圖四、利用 *lacZ* knock-in 觀察 *Six1* 基因在小鼠胚胎中的表現型態

(A-B) 於小鼠胚胎發育早期，利用 X-gal 染色可觀察到 *Six1* 會表現在體節 (somite)、頭部間葉細胞(head mesenchyme)及耳板間葉細胞(mesenchymal cells of otic placode)

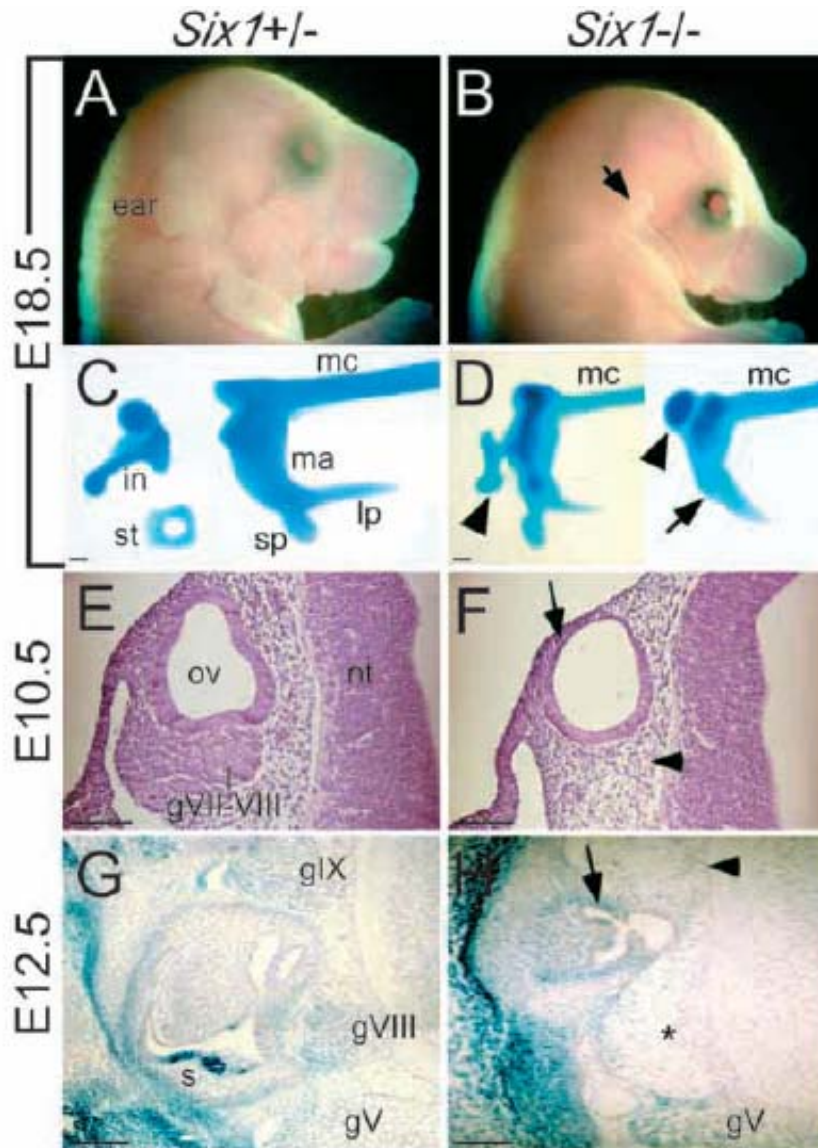
- (C) 小鼠胚胎發育第 9.5 天時，由 *lacZ* knock-in 的實驗中可見到 *Six1* 基因會表現體節、頭部間葉細胞、嗅板(nasal placode, 黑色箭號)以及耳板(otic placode, 白色箭頭)等位置
- (D) 除了耳板(白色箭頭)外，還可觀察到 *Six1* 基因會表現在咽弓(branchial arch, 黑色箭頭)、背根神經節(DRG, 雙黑色箭頭)、生肌節細胞(myotomal cells, 黑色箭號)以及舌下索(hypoglossal chord, 雙黑色箭號)等位置
- (E) 除了嗅板(黑色箭號)外，尚可觀察到 *Six1* 基因會表現在生腎索(nephrogenic chord, 黑色箭頭)等位置
- (F) 可見 *Six1* 會表現在準體節中胚層(presomitic mesoderm)的位置
- (G) 於小鼠胚胎發育第 10.5 天，利用 X-Gal 染色可見 *Six1* 基因會表現於頭部間葉細胞、耳板、嗅板、體節、背根神經節(黑色箭頭)以及四肢肢芽(星星處)等組織
- (H-J) 發育至 10.5 天的小鼠胚胎，*Six1* 基因於枕骨(H 圖)、前肢(I 圖)以及後肢處(J 圖)表現的放大圖，可見在顱顏部神經(雙箭頭)、背根神經節(箭頭)、四肢肢芽(星星處)、體節(箭號)
- (K) 發育至 12.5 天的小鼠胚胎，利用 X-Gal 染色可見 *Six1* 基因會表現於背根神經節及顱顏部神經(雙箭頭)以及四肢肢芽間的體節(interlimb somites, 箭號)
- (L) 小鼠胚胎發育第 10.5 天時，利用 X-Gal 染色可觀察到 *Six1* 基因在拉特克囊(Rp, Rathke's pouch)表現，但不表現在眼囊(OpV, optic vesicle)的位置

(adapted from Laclef *et al.*, 2003)

此外，由 Laclef 等人在 2003 年利用 *lacZ* knock-in 所作的 *Six1* 基因剔除(*Six1*^{-/-}) 的小鼠實驗中，可以觀察到 *Six1* 基因被剔除的小鼠們會於出生時死亡的現象，進一步地解剖後發現其肋骨有著嚴重的畸形(malformation)，包括肋骨間會有黏合(fusion)及截短(truncated)的情形，還可見到全身大部分的肌肉皆有著發育不全的缺失(muscle hypoplasia)(Laclef et al., 2003)，而將 *Six1* 基因剔除的小鼠胚胎和野生型(wild type)小鼠的組織器官作細部的比較，尚可觀察到許多發育不全的狀況，影響的組織器官及結果略述如下：

- (1). 對顱顏區域的骨頭(craniofacial skeleton)發育的影響：在胚胎發育第 18.5 天的 *Six1*^{-/-} 小鼠中，可發現在顴骨(zygomatic)、鱗狀骨(squamosal)、上頷骨(maxillary)以及下頷骨(mandibular)皆可觀察到有變短的情形，而從第一對咽弓(branchial arch)演變而來的梅克氏軟骨(Meckel's cartilage)也有發育不良的情形，由此可推知在小鼠胚胎中，*Six1* 在調控顱顏區域的骨頭正常發育過程中扮演著重要的角色。
- (2). 對耳部(otic)發育的影響：在小鼠胚胎發育的過程中，外耳和中耳是由第一對及第二對咽弓(branchial arch)所演變發育而來；耳板(otic placode)則會發育出耳囊(otic vesicle)，其後再發育出內耳的結構以及和平衡聽覺(statoacoustic)有關的神經(例如第五對的三叉神經及第八對的聽神經)。在胚胎發育 10.5 至 18.5 天的 *Six1*^{-/-} 小鼠中，可以觀察到整個聽力系統(包括外耳、中耳以及內耳等組織)皆有發育異常的現象，其中內耳有著嚴重程度的發育不全，包括沒有發育出半規管(semicircular ducts)，和 *Six1*^{+/-} 小鼠比較後，還可觀察到耳囊的範圍有縮小以及不正常的成形，並且在耳部的上皮細胞(otic epithelium)有細胞增生(proliferation)減少及細胞凋亡(apoptosis)的數目增加的情形，而這些細胞層面上的異常情形也連帶著影響內耳的正常發育過程。另外於發育 10.5 至 12.5 天的小鼠中，第八對的聽神經以及第九對的舌咽神經並沒有發育成形(見附圖五)(Zheng et al., 2003)。

- (3). 對鼻部(nasal)、唾液腺之腮腺(parotid gland)、淚腺(lacrimal gland)及唾液腺之顎下腺(sub-mandibular gland)發育的影響：在胚胎發育第 18.5 天的 *Six1*^{-/-} 小鼠和同時期的野生型小鼠作比較，可觀察到嗅腔(nasal cavity)沒有發育出正常的網狀結構，此外還會缺少腮腺的存在，淚腺及顎下腺的尺寸也顯得縮小許多。
- (4). 缺少胸腺(thymus)、副甲狀腺(parathyroid)及腎臟(kidney)：胸腺一般是由第三對咽囊(pharyngeal pouch)演變而來，由 Zou 等人在 2006 年所作的研究顯示，在 *Six1*^{-/-} 的小鼠胚胎中，從第三對咽囊(pharyngeal pouch)的內胚層細胞(endodermal cells)，演變成胸腺及副甲狀腺的這個過程有起始，但主要是由於這群內胚層細胞無法維持著演變到最後的過程且隨後自行進入細胞凋亡(apoptosis)，而導致最後胸腺及副甲狀腺無法正常發育生成的結果(Zou et al., 2006)；而腎臟器官會發育不全的原因，一般則認為是由於後腎胚芽細胞(metanephric blastema)缺乏 Six1 蛋白的表現所導致的。
- (5). 對腦下垂體(pituitary gland)以及背根神經節(dorsal root ganglia)等組織器官發育的影響：早期小鼠胚胎中的拉特克囊(Rathke's pouch)組織會漸漸發育成腦下垂體前葉(pituitary gland)，而不同於上述發育異常的情形，在 *Six1*^{-/-} 的小鼠胚胎發育早期的拉特克囊(Rathke's pouch)或是晚期的腦下垂體前葉及背根神經節等組織器官，並未觀察到任何發育不全的情形，其原因可能是 Six 基因家族其他成員扮演功能性互補的角色(gene redundancy)。
- (6). 對其他組織器官發育的影響：見附表三。



附圖五、*Six1*^{-/-}小鼠胚胎中的聽力系統發育異常之現象

(A,B) 於胚胎發育第 18.5 天，與 *Six1*^{+/-} 小鼠相比較，可見 *Six1*^{-/-} 小鼠胚胎的外耳有發育異常之現象(B 圖箭頭)

(C,D) 於胚胎發育第 18.5 天，可觀察到 *Six1*^{-/-} 小鼠胚胎於中耳內的小骨頭有相互黏合(fusion)的現象(D 圖箭頭)，以及骨頭變短或是沒有發育成形(D 圖箭號)

(E,F) 於胚胎發育第 10.5 天，可見到 *Six1*^{-/-} 小鼠中的耳囊(ov)組織發育較不正常(F 圖箭號)且沒有發育出第八對聽神經(F 圖箭頭)

(G,H) 於胚胎發育第 12.5 天，可觀察到 *Six1*^{-/-} 小鼠胚胎會發育出畸形的類半規管結構(H 圖箭號)，第八對聽神經以及第九對舌咽神經沒有發育成形(H 圖星星處及箭頭)

(adapted from Zheng *et al.*, 2003)

Table 1
Summary of the main *Six1*-expressing tissues in E18.5 dpc mouse fetuses, their origin and the corresponding histology in *Six1*^{-/-} mutants

Origin of stained structure	<i>Six1</i> expressing structure	Histology in <i>Six1</i> ^{-/-} newborn	<i>Six1</i> expression during organogenesis
Ecto-, meso-derm	Olfactory system	Altered	Nasal placode stained from E8.5 dpc
Ecto-, meso-derm	Statoacoustic system	Altered	Otic placode stained from E8.5 dpc
Ectoderm	Pituitary gland	Normal (nd)	Rathke's pouch stained from E9.5 dpc
Ectoderm	Lacrimal glands	Reduced (nd)	Inductive head mesenchyme stained from E8.5 dpc and tubular structures stained at E18.5
Ectoderm	Parotid glands	Absent	
Ectoderm	Submandibular glands	Reduced (nd)	
Mesoderm	Dorsal ganglia	Normal (nd)	DRG stained from E9.5 dpc
Ecto-, endo-derm	Thymus	Absent	Neural crest-derived mesenchyme of third branchial arches stained from E9.5 dpc
Mesoderm	Tendons and connective tissues	Normal (nd)	Lateral plate-derived migrating cells stained from E9.5 dpc
Mesoderm	Muscles		Head mesoderm and somites stained from E8.0 dpc
	•Head muscles	Normal	
	Tongue	Strongly reduced	
	•Body muscles		
	Epaxial muscles	Slightly reduced	
	Hypaxial muscles	Strongly reduced	
	Diaphragm	Absent	
Mesoderm	#	Absent kidney (normal gonads)	Nephrogenic chord transiently stained at E9.5–E10.5 dpc

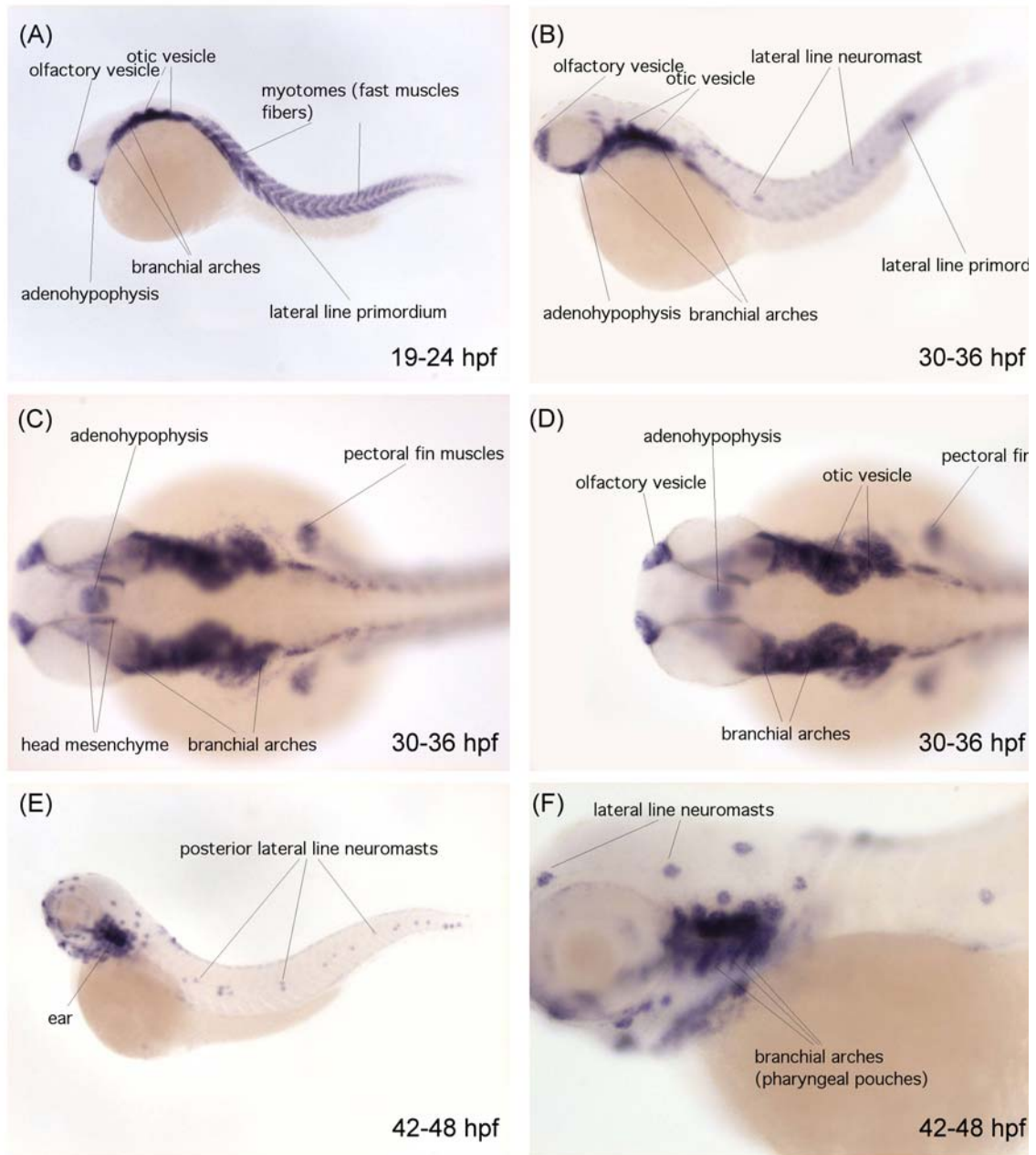
nd, Potential genetic alteration not determined experimentally. #, *Six1* expression not detected in this structure.

附表三、*Six1* 基因在小鼠中主要的表現位置及 *Six1* 基因剔除後影響小鼠發育缺失的位置(adapted from Laclef *et al.*, 2003)

2. *Six1* (*six1.1*; *six1.2*)基因於斑馬魚胚胎中的表現型態

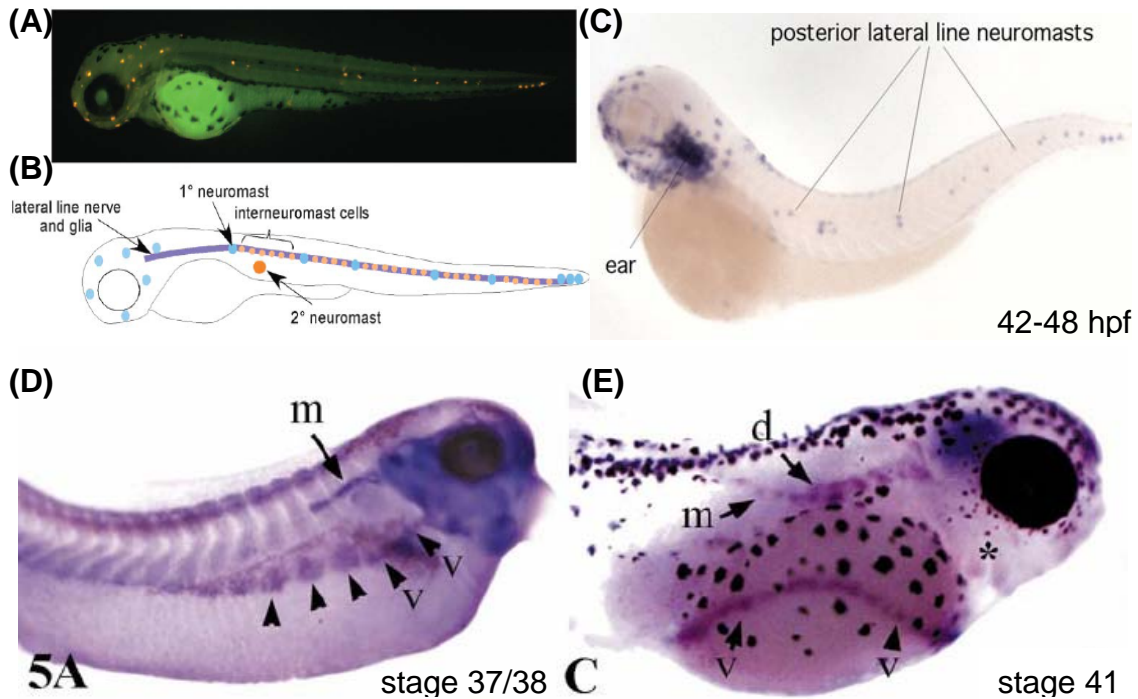
由 Thisse 等人在 2004 年對於斑馬魚 *six1* 基因(之後稱為 *six1.1*)所作的原位雜合反應實驗中,於胚胎受精後 19~48 小時(19~48 hpf)的時期內,皆可觀察到 *six1.1* 基因會表現在體節(somite)、咽弓(branchial arches)、側線系統中的神經丘(neuromast)、耳囊(otic vesicle)、嗅囊(olfactory vesicle)、腦下垂體前葉(adenohypophysis)、頭部間葉細胞(head mesenchyme)以及鰭條肌肉(fin muscle)等組織位置(見附圖六)(Thisse *et al.*, 2004; ZFIN; key word: *six1* or zgc:77345)。

由此我們可得知 *six1.1* 基因在斑馬魚胚胎中的表現,除了尚會表現在側線系統中的神經丘外,其餘的表現位置,特別是在耳囊腹部(ventral otic vesicle)(見附圖八)和在小鼠胚胎中的表現型態幾乎一樣(Bricaud and Collazo, 2006; Ozaki *et al.*, 2004)。而側線系統(lateral line system)為魚類與兩棲類(amphibians)所特有,神經丘(neuromast)即屬於此感覺系統之受器器官(receptor organ),主要由感覺細胞(sensory cells)組成,而感覺細胞向下則連接至神經。因此側線系統中的神經丘,其主要功能便為感受周遭水流的流動與壓力變化,並廣泛地分佈在魚類及兩棲類的頭部與兩側體表上(見附圖七)(Goodrich, 2005)。



附圖六、從受精後 19 到 48 小時內(19-48 hpf)，利用原位雜合反應觀察 *six1.1* 基因在斑馬魚胚胎中的表現位置

(A-F). 可觀察到 *six1.1* 基因會表現於體節(somite)、咽弓(branchial arches)、側線系統中的神經丘(neuromasts)、耳囊(otic vesicle)、嗅囊(olfactory vesicle)、腦下垂體前葉(adenohipophysis)、頭部間葉細胞(head mesenchyme)以及鰭條肌肉(fin muscle)等組織位置。各圖中斑馬魚胚胎的時期標示於圖右下角 (hpf: hour post-fertilization)(adapted from Thisse *et al.*, 2004; ZFIN)



附圖七、神經丘(neuromast)於斑馬魚及非洲爪蛙之分佈位置

(A) 在斑馬魚中利用染劑FM1-43，觀察神經丘(neuromast)於體表之分佈圖，可見其分佈多集中在頭部及體側的位置

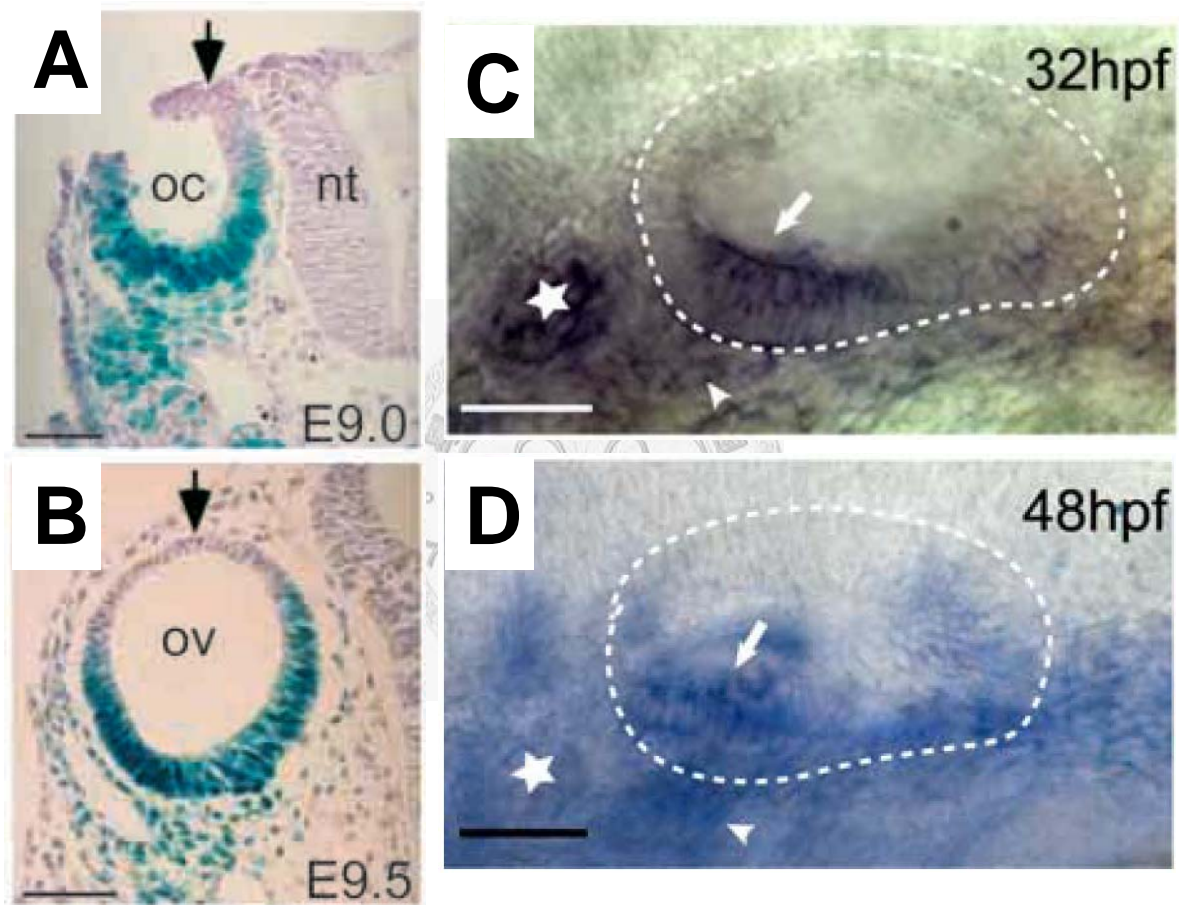
(B) 神經丘(neuromast)於斑馬魚體表分佈之卡通示意圖

(C) 利用原位雜合反應觀察*six1.1*基因於發育至42-48 hpf的斑馬魚胚胎中，會在頭部及體表之神經丘(neuromast)表現，和A圖中神經丘表現的分佈位置幾乎一致

(D,E) 利用原位雜合反應觀察非洲爪蛙*six1*基因於胚胎中的表現位置，發育至stage 37/38時期(D圖)，可觀察到*six1*基因會表現於體表之側線系統(medial trunk lateral line (m)及ventral trunk lateral line (v))；而於stage 41時期，仍可見*six1*基因於體表之側線系統表現(d: dorsal; m: medial; v: ventral trunk lateral line)

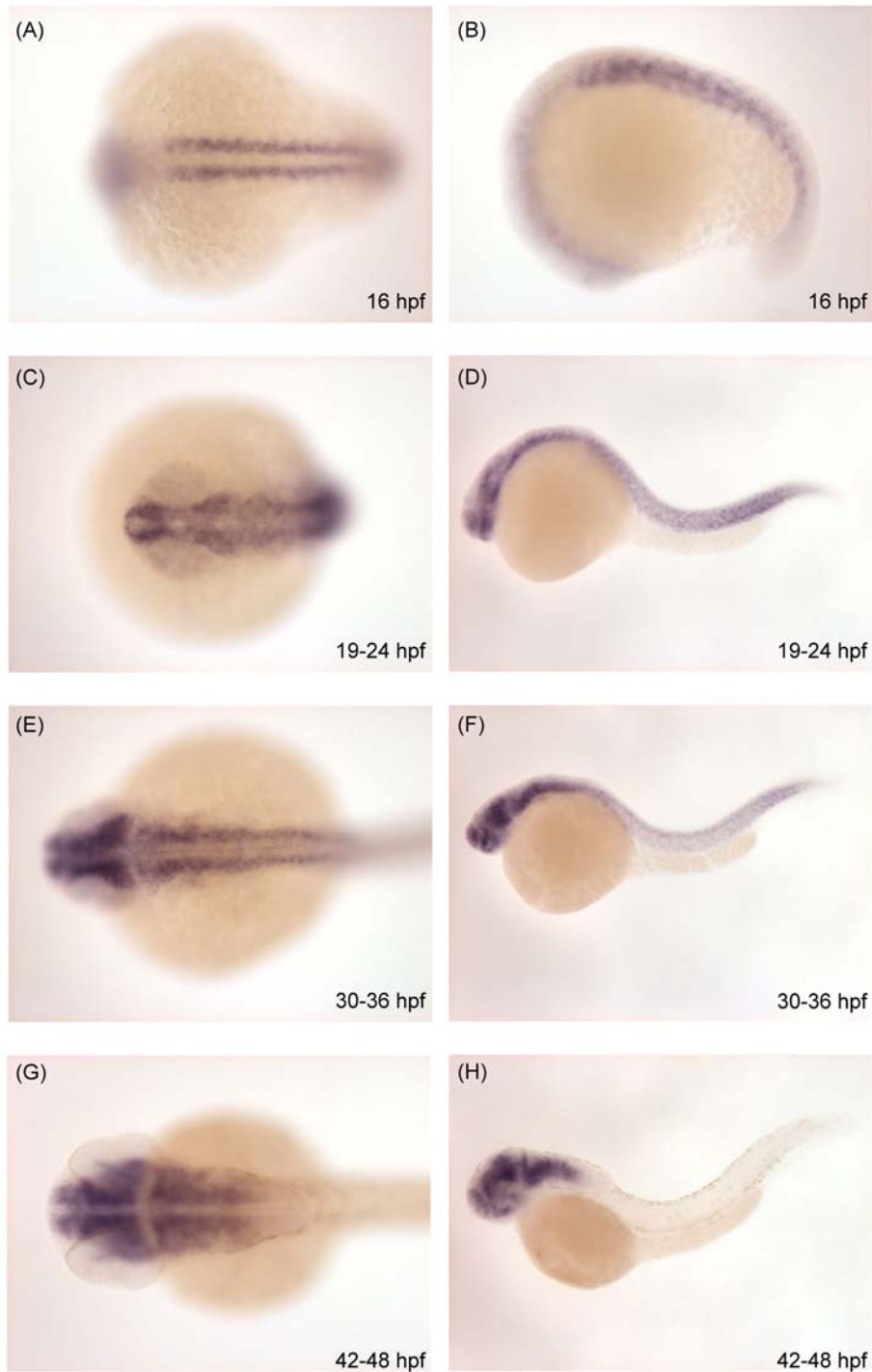
(A、B adapted from Goodrich, 2004; B adapted from Thisse *et al.*, 2004; D、E adapted from Pandur and Moody, 2000)

於斑馬魚基因體中尚可發現 $zgc:92332$ 基因(之後稱為 $six1.2$)與人類 $SIX1$ 基因之胺基酸序列相當類似，而由Thisse等人在2004年所作的斑馬魚 $six1.2$ 基因原位雜合反應實驗中，於胚胎發育16-48小時(16-48 hpf)的時期中，可觀察到 $six1.2$ 基因會表現在體節(somite)及中樞神經系統(central nervous system, CNS)等組織位置(見附圖九)，與斑馬魚 $six1.1$ 基因及其他物種Six1基因的表現型態較為不一樣。



附圖八、(圖 A、B)利用 $lacZ$ knock-in 觀察 $Six1$ 基因於小鼠胚胎發育早期的表現，可見其主要表現在耳囊腹部位位置(ventral otic vesicle)；(圖 C、D)利用原位雜合反應觀察斑馬魚 $six1.1$ 基因在胚胎發育 42-48 hpf 時期，同樣也會表現於耳囊腹部位位置(圖 C、D, 箭號)、耳囊腹部的上皮細胞(ventral otic epithelium)(箭頭)以及聽神經(otic ganglion)(星星處)等位置。

(A、B adapted from Ozaki et al., 2003; C、D adapted from Bricaud and Collazo, 2006)



附圖九、從受精16到48小時內，利用原位雜合反應觀察*six1.2* (*zgc:92332*)基因在斑馬魚胚胎中的表現位置

(A-H) 可觀察到*six1.2*基因會表現在體節(somite)及中樞神經系統(central nervous system, CNS)等組織位置。各圖中斑馬魚胚胎的發育時期標示於圖右下角(hpf: hour post-fertilization)(adapted from Thisse *et al.*, 2004; ZFIN)

3. 與 Six1 有關的疾病

Branchio-oto-renal (BOR) syndrome，為一種常見的體染色體顯性遺傳疾病，發生率約四萬分之一，根據許多的研究顯示出 BOR 的臨床症狀有相當多種，發生的機率也略有不同，主要病徵包括有聽力障礙(hearing loss, 70~93%)、耳朵的凹陷或瘻管(preauricular pits or fistulae, 82~83.6%)、耳廓變形(pinnae deformity, 36%)、腎臟的發育異常(renal anomalies, 38.2~67%)以及咽弓的發育異常(branchial arch anomalies, 49~68.5%)等其他症狀(見附表四及附圖十)(Chang et al., 2004; Chen et al., 1995; Kochhar et al., 2007)。

TABLE I. Phenotypic Features of BOR Syndrome

Major anomalies, occurring >20%	Minor anomalies, occurring <20%
Hearing loss	Preauricular tag
Preauricular pits	Lacrimal duct aplasia
Renal anomalies	Short palate
Branchial fistulae	Retrognathia
Pinnae deformities	Benign intracranial tumor
External auditory canal stenosis	Cleft palate
	Congenital hip dysplasia
	Euthyroid goiter
	Facial nerve paresis
	Gustatory lacrimation
	Non-rotation of the gastrointestinal tract
	Pancreatic duplication cyst
	Temporoparietal linear nevus

Reprinted from J Comm Disor, 31, RJH Smith and C Schwartz, Branchio-Oto-Renal Syndrome, p. 414, copyright 1998, with permission from Elsevier.

附表四、在 BOR syndrome 的病人中可能會出現的異常表徵
(adapted from Kochhar *et al.*, 2007)



附圖十、BOR syndrome 表徵之一，可見到在耳朵處呈現杯狀(cup-shaped)的發育畸形(adapted from Kochhar *et al.*, 2007)

從 1989~2003 年間對於 BOR syndrome 的病人所作的研究中，皆發現到 *EYAI* 基因的單套不足(haploinsufficiency)或是突變(mutation)與 BOR syndrome 的發生機率有著相當密切的關係，因此在早期便有 *EYAI* 基因的缺失是導致 BOR syndrome 唯一原因的想法，但由於仍有些 BOR syndrome 的病人的 *EYAI* 基因並沒有突變的現象，也因此對這樣的想法存有疑慮，直到在 2004 年由 Ruf 等人所作的研究，才發現到除了 *EYAI* 基因外，*SIX1* 基因的突變和 BOR syndrome 的發生機率也有著不小的相關性，且在 *Six1* 基因缺失或剔除的小鼠胚胎中，皆可觀察到類似 BOR syndrome 的徵狀，尤其在 *Six1*^{-/-} 的小鼠胚胎中尚可觀察到整個聽力系統(包括外耳、中耳及內耳)皆有發育畸形的現象(見附圖五)(Laclef *et al.*, 2003; Ruf *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2003)。

4. Six 基因家族中與 Six1 關係密切的成員：Six4

由 Ozaki 等人在 2001 年對於小鼠中 *Six4* 基因所作的 *lacZ* knock-in 實驗中，在異型合子小鼠(heterozygote)胚胎發育第 8.5 天到 13.5 天的時間內，可觀察到 *Six4* 會表現在體節(somites)、咽弓(branchial arches)、耳板(otic placode)、嗅板(nasal placode)、脊索(notochord)、副甲狀腺(parathyroid gland)、唾腺(salivary gland)、背根神經節(dorsal root ganglia)、中腎(mesonephros)以及之後會形成腦下垂體前葉的拉特克囊(Rathke's pouch)等位置(見附表五及附圖十二)(Brugmann and Moody, 2005; Ohto et al., 1998; Ozaki et al., 2001)。

關於 *Six4* 基因在其他脊椎動物的表現型態，除了在雞胚中的 *cSix4* 基因尚可發現會在眼板(optic placode)及脊髓中的運動神經元(motoneurons in the spinal cord)的位置有表現，其他和上述在小鼠中所提到的表現位置大致一樣(Estève and Bovolenta, 1999)。此外在斑馬魚中可以找到三個和哺乳動物的 *Six4* 同源的基因(homologous gene)，分別為 *six4.1*、*six4.2* 及 *six4.3*，這三個基因在斑馬魚胚胎中的表現位置以 *six4.1* 及 *six4.2* 基因與上述 *Six4* 基因在小鼠及雞的胚胎中表現位置較為一致(見附圖十二、十三以及十四)。由於斑馬魚 *six4.3* 與小鼠及人類 *Six4* 基因 C-terminal domain 胺基酸序列的相似度較低(見附圖十一)，並在斑馬魚胚胎中的表現型態也與其他物種較不一致(見附圖十五)，故一般認為 *six4.3* 基因是斑馬魚所演化出新的脊椎動物 *Six4* isoform，而 *six4.1* 及 *six4.2* 較可能為哺乳動物 *Six4* 的同源基因，並可能同樣來自單一原始基因(single ancestral gene)(Kobayashi et al., 2000)。綜合上述，可得知 *Six4* 於小鼠(*Six4*)、雞(*cSix4*)以及斑馬魚(*six4.1*、*six4.2*)胚胎中的表現型態皆相當相似，而這也同時顯示出在漫長的演化過程中，*Six4* 基因在物種間的胚胎中的表現位置會保守的(conserved)存在各物種間。

TABLE 2. Expression pattern of *Six4* determined by X-Gal staining of heterozygotes

Stage	Tissue ^a
Embryonic	
E8.5	Surface ectoderm outside the neural folds, somites, presomitic mesoderm
E9.5	Nasal and otic placodes, cranial ganglia, branchial arches, somites (dermamyotomes and sclerotomes), AER
E10.5–11.5	Nasal pits, otic vesicles, cranial ganglia (V, VII–XI), dorsal root ganglia, branchial arches, somites, myotomes, limb mesenchyme, AER, notochord, mesonephros
E12.5–E13.5	Skeletal muscles, mesenchyme in limbs and digits, nasal epithelium, inner ear
Adult	Skeletal muscle, nasal epithelium, cochlea, parathyroid, salivary gland

^a AER, apical ectodermal ridges.



附表五、利用 *lacZ* knock-in 觀察 *Six4* 基因在小鼠胚胎中的表現位置

(adapted from Ozaki *et al.*, 2001)

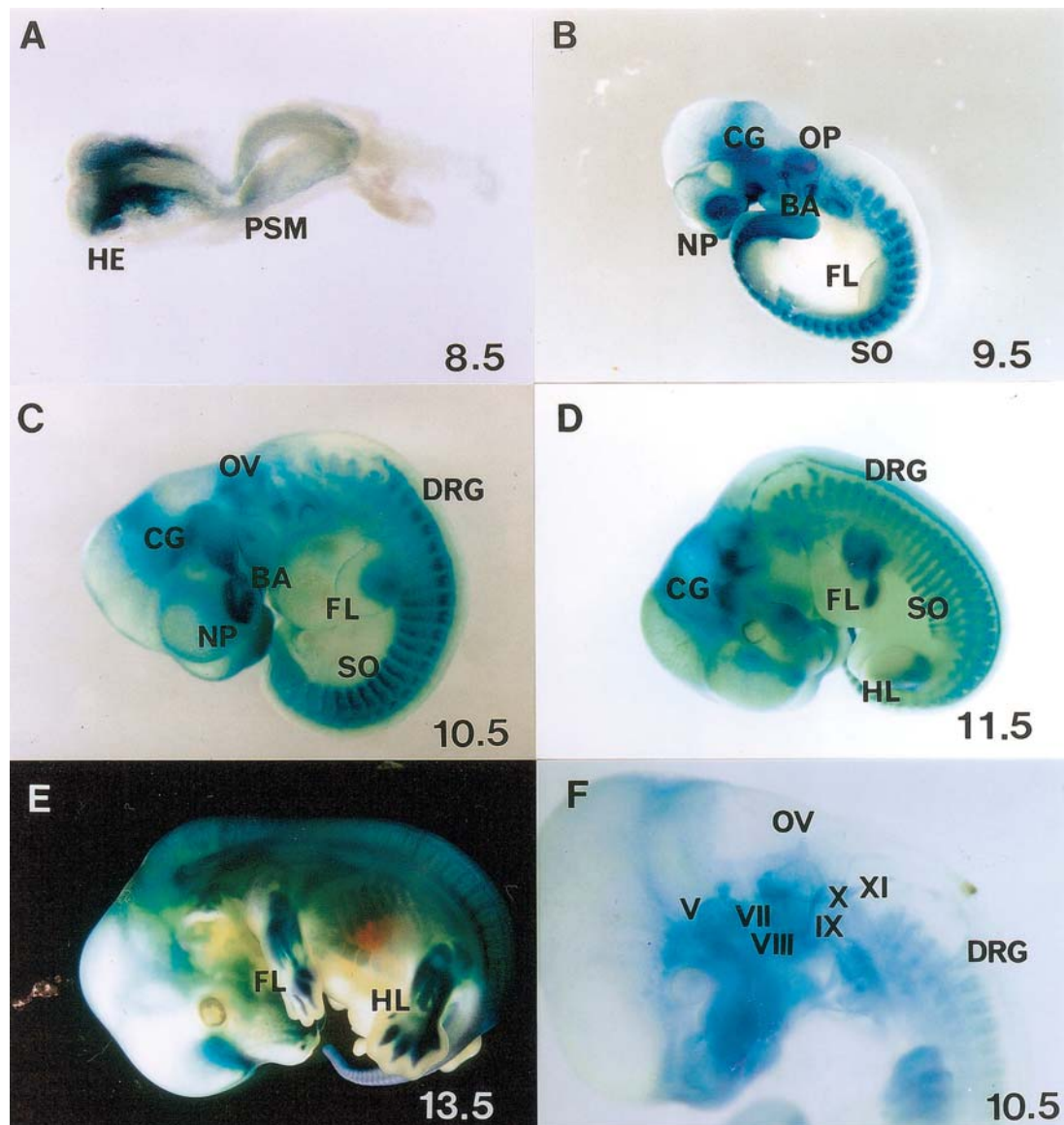
```

z4.1  GPVVRVVCGLD-MEGKELAKLQT-VQ--MDDDGSDL*
z4.2  AVSEGGKGEMEEEEKQLTKLKT-VH--LEEEMTDL*
z4.3  NSVSSNSNLDSQISTVHSLENQP-APPLIARNSQTL*
m4    GMVEAGCEDLG-TDKKELAKLQT-VQ--LDEDMQDL*
h4    GMVDTVCEDE-TDKKELAKLQT-VQ--LDEDMQDL*
    
```

附圖十一、比較斑馬魚 *six4.1* (z4.1)、*six4.2* (z4.2)與 *six4.3* (z4.3)基因與小鼠 *Six4*

(m4)與人類 *SIX4* (h4) C-terminal domain 胺基酸序列的相似性

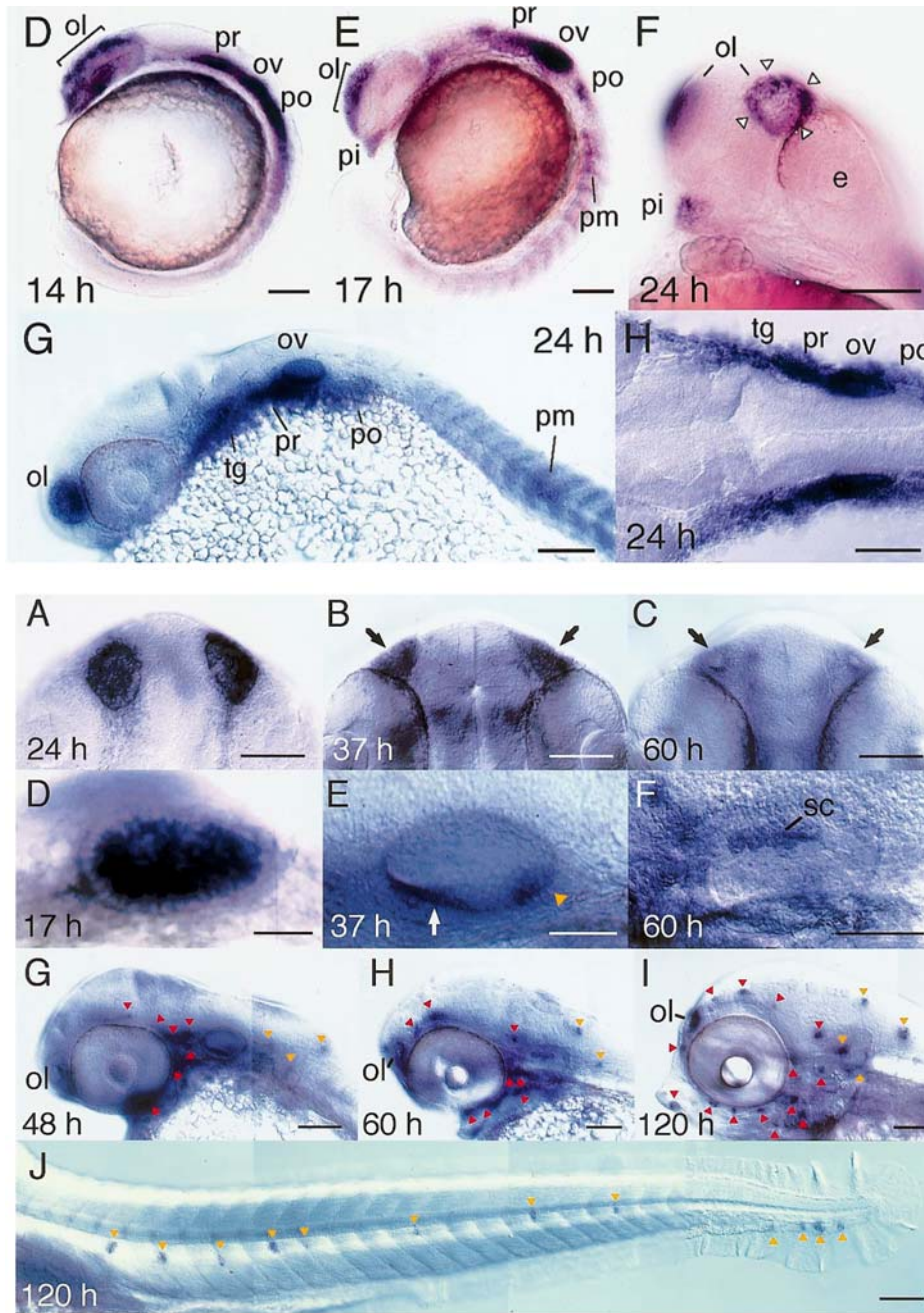
(adapted from Kobayashi *et al.*, 2000)



附圖十二、利用 *lacZ* knock-in 觀察 *Six4* 基因於小鼠胚胎中的表現位置

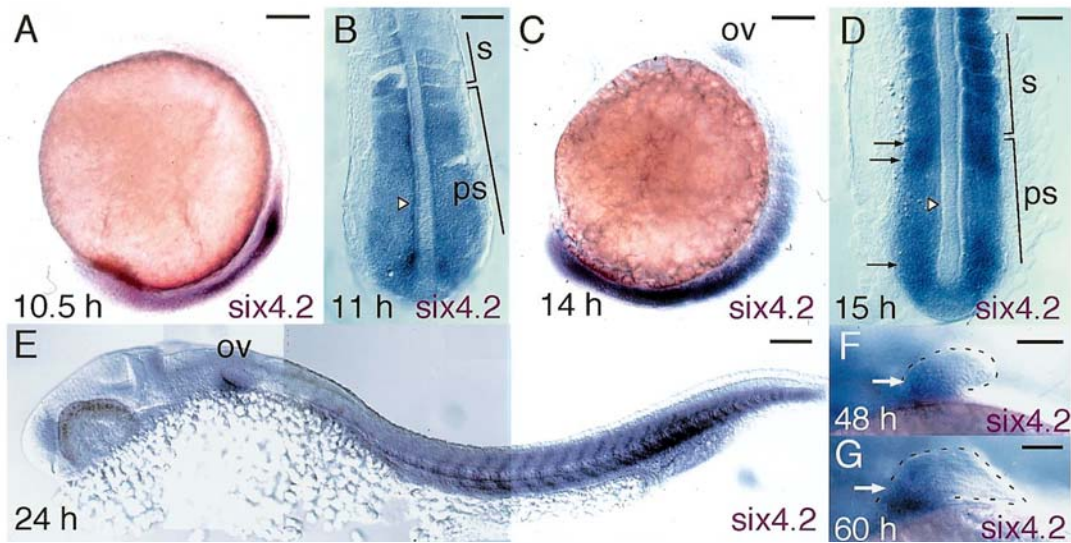
(BA: branchial arch 咽弓; OP: otic placode 耳板; OV: otic vesicle 耳囊; NP: nasal placode 嗅板; SO: somite 體節; CG: cranial ganglia 顱顏部神經(包括第五對(V)三叉神經及第七對到第十一對神經); DRG: dorsal root ganglia 背根神經節; FL: forelimb 前肢; HE: head region 頭部區域; PSM: presomitic mesoderm 準體節中胚層)

(adapted from Ozaki *et al.*, 2001)



附圖十三、利用原位雜合反應觀察斑馬魚 *six4.1* 基因於胚胎中的表現，由早期至晚期(14-120 hpf)的胚胎發育中，可觀察到 *six4.1* 基因會表現於體節、顱部及體表感覺器官(側線系統之神經丘)、嗅板(ol)、耳囊(ov)、鰭條、腦下垂體前葉(pi)、三叉神經(tg)以及半規管(sc)等組織位置(pr: preotic lateral line placode; po: postotic lateral line placode; pm: placode of midbody lateral line; sc: semicircular canals)

(adapted from Kobayashi *et al.*, 2000)



附圖十四、利用原位雜合反應觀察斑馬魚於胚胎發育 10.5 至 60 小時間 *six4.2* 基因的表現，可見其會於體節(s)、準體節中胚層(ps)、耳囊(ov)及胸鰭條(圖 F,G)等組織位置表現(ps: presomitic mesoderm)

(adapted from Kobayashi *et al.*, 2000)



附圖十五、利用原位雜合反應可觀察到斑馬魚 *six4.3* 基因會表現於中腦、前腦、眼睛(e)、耳囊(ov)等組織位置(mh: midbrain-hindbrain boundary; d: diencephalon 間腦; r: rhombencephalon 菱腦; tm: tegmentum; tc: tectum)

(adapted from Kobayashi *et al.*, 2000)

5. Six4 基因剔除後對小鼠胚胎組織發育的影響

不同於 *Six1*^{-/-} 的小鼠會於出生時死亡的情形，*lacZ* knock-in *Six4*^{-/-} 的小鼠於出生後能正常發育且具有繁殖的能力，也並沒有觀察到任何明顯的發育異狀。再和 *Six4*^{+/-} 的小鼠胚胎中 *lacZ* 的表現位置加以比較，發現 *Six4*^{-/-} 及 *Six4*^{+/-} 兩者在胚胎中的 *lacZ* 表現位置幾乎完全一樣，也並沒有發現組織有發育異常或是缺失的地方。再進一步將野生型、異型合子(heterozygous, *Six4*^{+/-})以及同型合子(homozygous, *Six4*^{-/-})此三株小鼠，以會表現於體節(somite)、肌肉(muscle)以及顱根及背根神經節(cranial and dorsal root ganglia)等各組織的標幟基因(gene marker)來檢驗有無任何異常的地方，結果這些標幟基因(如 *myogenin* 及 *neuroD3*)在此三株小鼠之間的表现位置及表現量，仍然並無發現有任何的不同之處，因此 *Six4*^{-/-} 小鼠的表現型態與野生型小鼠幾乎是完全一樣(Ozaki et al., 2001)。

6. Six1 和 Six4 基因之間的互補關係(gene redundancy)

由先前許多的研究結果中顯示，*Six1* 與 *Six4* 兩個基因之間在基因調控上面很可能有著密切的相關性，略述如下：

- (1) *Six1* 和 *Six4* 基因在小鼠胚胎中的表現位置有許多重覆的地方，例如在耳板(otic placode)、嗅板(olfactory placode)、拉特克囊(Rathke's pouch)、背根神經節(dorsal root ganglia, DRG)、皮肌節(dermamyotome)、肌節(myotome)以及四肢的間葉細胞(limb bud mesenchyme)等位置(Grifone et al., 2005)。
- (2) 在 *Six1*^{-/-} 的小鼠胚胎中，在腦下垂體(pituitary gland)以及拉特克囊(Rathke's pouch)等組織並沒有觀察到任何發育不全的狀況，而 *Six3*、*Six4* 及 *Six6* 皆會表現在腦下垂體及拉特克囊(Rathke's pouch)的位置，因此這也暗示著在小鼠胚胎中，當 *Six1* 基因缺失的狀況下，同是 *Six* 基因家族成員的 *Six3*、*Six4* 及 *Six6* 會扮演著補償(compensation)以及基因相互補足(gene redundancy)的角色(Laclef et al., 2003)。

- (3) 在人類中，如果在第 14 對染色體的 q22.1 到 q22.3 的基因位置有缺失或被刪除(deletion)的話，會導致 Branchio-oto-renal (BOR) syndrome 的病狀發生，而這段基因位置包括有 *SIX6*、*SIX1* 及 *SIX4* 等三個基因。由於 *SIX6* 基因主要表現在眼睛及腦下垂體方面，與 BOR syndrome 的表徵(phenotype)較無關係，故一般認為 *SIX1* 與 *SIX4* 基因的單套不足(haploinsufficiency)和人類 BOR syndrome 的發生機率，以及所導致的組織器官發育異常表徵有所相關(Laclef et al., 2003)。
- (4) *Six1* 和 *Six4* 這兩個基因在人類、小鼠、大鼠、雞、非洲爪蛙、河豚以及斑馬魚等各物種中都會在同一條染色體上，且彼此間相鄰的距離皆在 100 kb 以內(Grifone et al., 2005)。

因此綜合上述，都一再地暗示著 *Six1* 和 *Six4* 應是經由相似或相同的基因調控機制所調控，且在兩者基因彼此有缺失時，能互相地去作基因功能性的補償(compensation)或是相互補足(gene redundancy)，使得由基因缺失所引起的組織發育異常的傷害降到最低(Grifone et al., 2005; Laclef et al., 2003; Ozaki et al., 2001)。

7. *Six1* 與 *Six4* 基因皆被剔除時(*Six1*^{-/-}*Six4*^{-/-} double knock-out)的小鼠表徵

由於 *Six1* 與 *Six4* 基因之間很有可能存有功能性互補的關係，因此將小鼠胚胎中的 *Six1* 與 *Six4* 基因同時剔除後，觀察其發育異常的現象是否會變的更加嚴重，便可進一步的驗證此兩個基因存有功能性互補的想法。

由 Grifone 等人於 2005 年所作的研究中，*Six1*^{+/-}*Six4*^{+/-} 的小鼠胚胎並不會於出生時死亡，且仍具有獨立生存及繁殖後代的能力，這也指出單套(one allele)的 *Six1* 及 *Six4* 基因便可足以提供小鼠胚胎正常發育的能力。

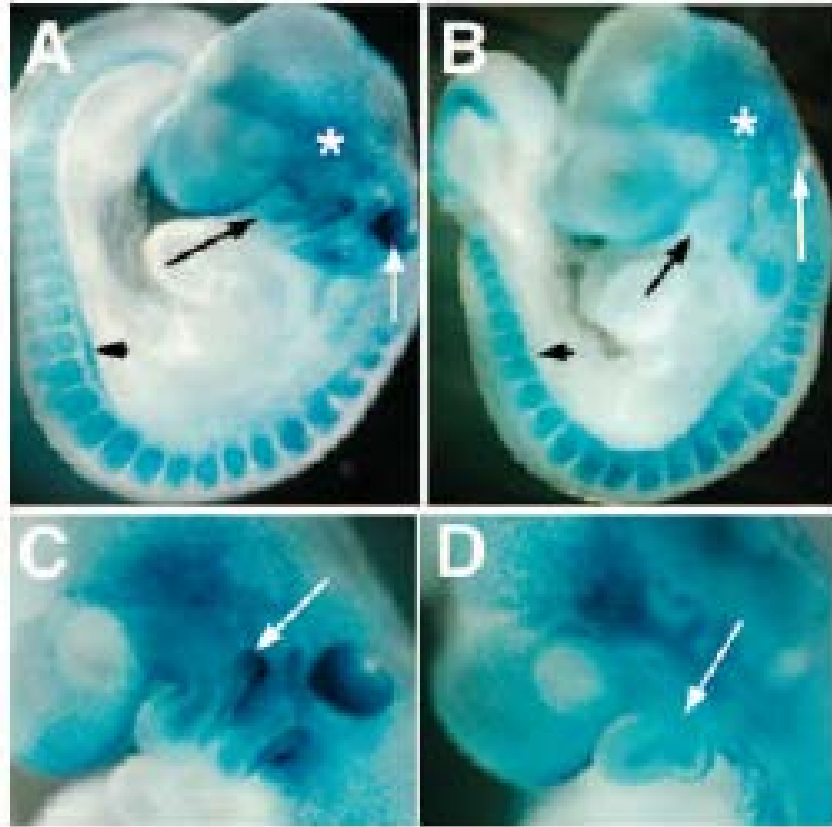
但當 *Six1* 與 *Six4* 基因同時被剔除時，*Six1*^{-/-}*Six4*^{-/-} 小鼠和 *Six1*^{-/-} 小鼠皆於出生時死亡，此外 *Six1*^{-/-}*Six4*^{-/-} 的小鼠也會有許多更明顯畸形的表徵，例如身形較小，有較大的腹部以及在顱顏部有著嚴重的發育畸形，也因此很容易和野生型的小鼠區分(見附圖十六)。



附圖十六、野生型小鼠(左)與 $Six1^{-/-}Six4^{-/-}$ 小鼠(右)於出生時的表徵

(adapted from Grifone *et al.*, 2005)

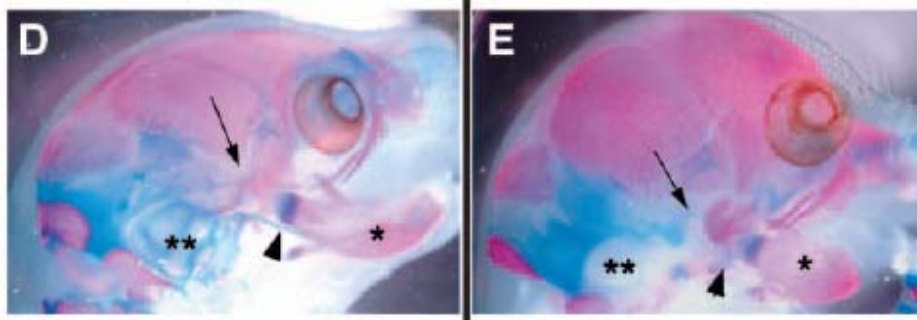
和 $Six1^{-/-}$ 的小鼠比較，可在 $Six1^{-/-}Six4^{-/-}$ 的小鼠胚胎中觀察到更嚴重的發育畸形現象，有些甚至是在 $Six1^{-/-}$ 的小鼠胚胎中所沒有觀察到的發育缺失，例如在第一對及第二對咽弓(branchial arches)有黏合(fusion)的現象、在上頷骨(maxillary)及下頷骨(mandible)的長度更為縮短、沒有耳朵(earless)、體節(somite)發育不正常、四肢不正常的彎曲(abnormally bent hindlimbs and forelimbs)以及梅克氏軟骨(Meckel's cartilage)和鼻骨(nasal bone)等骨頭沒有發育(見附圖十七及附圖十八)，且在一些和 Six1 及 Six4 表現位置有關的標幟基因(gene marker)，如 Myf5、myogenin、MyoD、Fgf4、Fgf6 與 Fgf8 等，在 $Six1^{-/-}Six4^{-/-}$ 的小鼠中的表現量也較 $Six1^{-/-}$ 小鼠中的表現量更為降低。因此經由上述情形可得知，在 Six1 與 Six4 的基因皆缺失的狀況下，所導致組織器官的發育不良情形，會較單一基因缺失時更為明顯且更加地嚴重，甚至會有不同於單一基因缺失時的發育不良情形出現(例如在第一對及第二對咽弓有黏合的現象)(見附圖十七)(Grifone *et al.*, 2005)。



附圖十七、利用 *lacZ* knock-in 觀察發育第 12.5 天(E12.5)的 *Six1*^{+/+}*Six4*^{+/+}(A,C 圖) 與 *Six1*^{-/-}*Six4*^{-/-}(B,D 圖)的小鼠胚胎

- (A) *Six1*^{+/+}*Six4*^{+/+}的小鼠胚胎(*Six1*為 *lacZ* knock-in allele; *Six4*為 eGFP knock-in allele)，可觀察到 *Six1* 之 *lacZ* 報導基因會表現在體節(somite)、咽弓(branchial arch，黑色箭號)、耳囊(otic vesicle，白色箭號)、頭部間葉組織(head mesenchyme，星星處)以及生腎索(nephrogenic chord，黑色箭頭)等組織位置
- (B) *Six1*^{-/-}*Six4*^{-/-}的小鼠胚胎，可觀察到 *Six1* 之 *lacZ* 報導基因在咽弓處及頭部的表現量大幅下降(黑色箭號及星星處)，在耳囊及生腎索也未觀察到 *Six1* 之 *lacZ* 報導基因基因的表現(白色箭號及黑色箭頭)，但仍然會在體節處有表現
- (C,D) *Six1* 基因原本可觀察到在咽裂處(pharyngeal clefts，C 圖白色箭號)有表現，但在 D 圖的小鼠胚胎中，不僅 *Six1* 的表現量大為降低，且可觀察到在第一對及第二對咽弓有黏合(fusion)的現象(D 圖白色箭號)

(adapted from Grifone *et al.*, 2005)



附圖十八、發育第 18.5 天(E18.5)的 $Six1^{+/+}Six4^{+/+}$ (左圖)與 $Six1^{-/-}Six4^{-/-}$ (右圖)的小鼠胚胎，兩圖相互比較後可觀察到 $Six1^{-/-}Six4^{-/-}$ 小鼠下頷骨(mandible)與鱗狀骨(squamosal bone)的長度更為縮短(星星處及黑色箭號)，缺乏梅克氏軟骨(Meckel's cartilage，黑色箭頭)以及耳朵沒有發育形成(雙星星處)。

(adapted from Grifone *et al.*, 2005)

8. Six 基因家族其他成員之介紹

8-1: Six2 及 Six5 之介紹

Six2 基因在小鼠中主要表現的組織有咽弓(branchial arches)、頭部間葉組織(head mesenchyme)、前腸區(foregut)、神經脊(neural crest)、腎臟(kidney)、後腦(hindbrain)、會發育成四肢的肢芽(limb buds)、腸道的中胚層(gut mesoderm)以及生殖器(genitalia)等位置，目前對於 *Six2* 基因的研究主要為著重其在腎臟及四肢的發育調控所扮演的角色(Brugmann and Moody, 2005; Ohto *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 1995b)。

在胚胎發育第 13.5 天到 15.5 天的小鼠，*Six5* 主要表現在眼睛(包括視網膜及角膜)、咽弓(branchial arches)、端腦(telencephalon)、四肢的肢芽(limb bud)、腦膜(meninges)、腎上腺(adrenal gland)、鞏節(sclerotome)、平滑肌(smooth muscle)、骨骼肌(skeletal muscle)以及一些軟骨組織(cartilagenous area)等位置，而 *Six5* 已被研究出與白內障的發病機制(cataractogenesis)及精子生成的過程(spermatogenesis)有關(Klesert *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2004)。

Myotonic dystrophy 1 (DM1)為一種被稱為「肌強直性營養不良」的疾病，會出現的症狀有肌肉無力(muscle weakness)及神經內分泌系統有些異常，此外 DM 還會伴隨著白內障(cataract)、心臟傳導不良(cardiac conduction defects)以及腦力的損害(mental impairment)等症狀。Six5 在一開始被稱為 *DMAHP* (DM associated homeodomain protein gene)，即為和 DM 有關的基因，而近年來的研究也一再顯示出 DM 和 Six5 之間有密切的關係(Boucher et al., 1995; Harris et al., 1996; Kawakami et al., 2000)。

8-2: Six3 及 Six6 之介紹

Six3 及 *Six6* 在小鼠中則是會表現在眼囊(optic vesicle)、視隱窩(optic recess)、視交叉(optic chiasma)、嗅板(nasal placode)以及後來會形成腦下垂體前葉的拉特克囊(Rathke's pouch)等位置，另外在最近的研究中顯示，*Six3* 及 *Six6* 與小鼠前腦的形成與眼睛的正常發育過程有所相關，而這也暗示著說，儘管果蠅和小鼠的眼睛在型態及發育上都有著很大的不同，但在 Six 基因調控眼睛發育的網絡上，在這兩個物種間仍然是具有一些保守性(Kawakami et al., 2000; Laclef et al., 2003; Oliver et al., 1995a)。

另外在基因缺失和疾病之間的相互關係上，*Six3* 基因的缺失被認為和全前腦發育不全症(holoprosencephaly, HPE)的發生有所相關，HPE 的病徵主要為大腦畸形(brain malformation)、小腦畸形(microcephaly)以及其他顱顏組織的發育不全；*Six6* 基因的缺失則被認為和雙側無眼畸形(bilateral anophthalmia)的發生有關，此疾病的病徵為缺少視神經及視交叉(optic chiasm)與腦下垂體(pituitary gland)的發育異常(Gallardo et al., 1999; Kawakami et al., 2000; Roessler and Muenke, 1998)。

三、Six 基因家族間的互補現象(compensation)

由於在 *Six4* 基因有缺失的小鼠，在外部的型態外觀及內部標幟基因的檢驗上，都沒有觀察到任何表現位置或表現量有異常的現象，作者 Ozaki 等人認為可能是和 Six 基因家族之間彼此的補償作用(compensation among Six genes)有關。在前面的文章有提到，Six 基因家族從 *Six1* 到 *Six6* 共有六個成員，其中 *Six3* 及 *Six6* 大多表現在前腦(forebrain)，在此位置 *Six4* 並不會表現，所以一般不認為 *Six3* 及 *Six6* 會在功能上補償 *Six4* 的缺失；而以其他的 Six 基因家族成員來看，在先前的研究發現到 *Six1*、*Six2* 及 *Six5* 蛋白和 *Six4* 蛋白接合到特定 DNA 的專一性相關(Ohto et al., 1999; Spitz et al., 1998)，且 *Six1* 和 *Six4* 在小鼠胚胎中的表現位置幾乎一樣，*Six5* 則和 *Six4* 在分子結構及胺基酸序列上頗為相似(見附圖一)(Kawakami et al., 2000)，再加上在 *Six4* 基因缺失的小鼠中，利用北方墨點法(Northern blot)可以發現到 *Six1*、*Six2* 及 *Six5* 的基因表現量和野生型的小鼠相差無幾，因此這也暗示著在 *Six4* 基因缺失的狀況下，很有可能是由同為 Six 基因家族的 *Six1*、*Six2* 及 *Six5* 等成員提供基因功能上的補償(Ozaki et al., 2001)。

同樣的，在 *Six5* 基因缺失的小鼠中，我們大多只能看到白內障(cataract)的情形產生，而其他原本 *Six5* 會表現的組織則無任何發育缺失的情況，再對照 *Six5* 與 *Six1*、*Six2* 及 *Six4* 同樣會在小鼠胚胎中有廣泛的表現位置，我們可以合理推測在 *Six5* 基因缺失的狀況下，應是 *Six1*、*Six2* 及 *Six4* 去對 *Six5* 原本會表現的組織(除了水晶體)作出功能性的補償，使這些組織不會在 *Six5* 基因缺失的狀況下，有任何發育不全的情形發生。

然而，在上述的文章有提到，*Six1*^{-/-}的小鼠會於出生時死亡，且能觀察到在耳部、鼻部、胸腺、腎臟、及骨骼肌等許多組織器官都有發育異常的狀況；*Six4*^{-/-}的小鼠則於出生後能正常的發育且有獨立生存及繁殖後代的能力，在發育上也並沒有觀察到任何明顯的異狀，這兩種在出生時截然不同的狀況，可解釋為當 *Six4* 基因缺失時，*Six1* 能對 *Six4* 的表現組織作出基因功能性的補償，並使其小鼠能在出生後擁有正常發育的能力；但當 *Six1* 基因缺失時，*Six4* 或是其他同為 Six

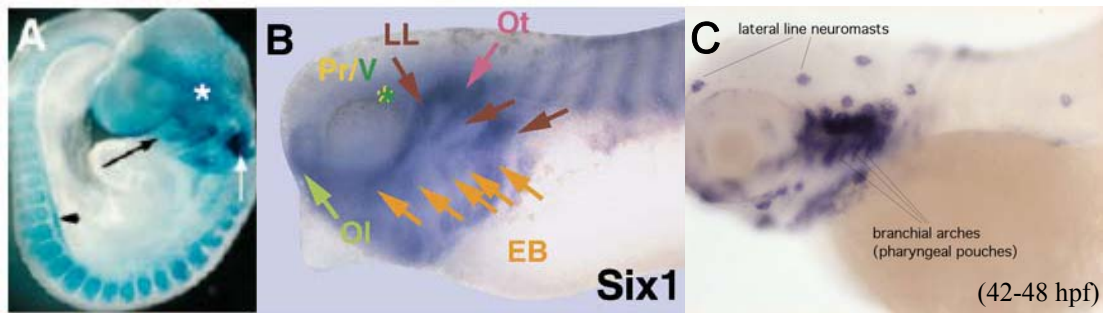
基因家族的成員卻無法完全去補足 Six1 的表現組織正常發育的功能，也導致 *Six1*^{-/-} 小鼠會於出生時死亡的情形。因此綜合以上所述的情況，暗示著在 *in vivo* 的狀況下，雖然 Six1 跟 Six4 基因彼此之間仍可觀察到在一些組織器官表現 (expression) 上有功能性彼此補償的情形，但兩者在基因調控的功能上 (DNA binding) 並非完全相同，仍然是有一些差異性存在。

在最近的研究中顯示，於 *sodium-potassium-chloride cotransporter 1 (Slc12a2)* 的啟動子 (promoter) 區域中，有三個 Six1 蛋白能專一性接合的位置 (Six1-specific binding site) 及一個 Six1 與 Six4 都能接合到的位置 (Six1/Six4 common binding site)，因此可驗證 Six1 與 Six4 具有共同去調控某些組織基因的功能，但也有個別地去調控某些組織基因的情形，故在 *Six1*^{-/-}*Six4*^{-/-} 的小鼠胚胎中，尚可觀察到許多在 *Six1* 及 *Six4* 基因缺失的小鼠胚胎中所觀察不到或是更嚴重的發育異常情形，例如在第一對及第二對的咽弓 (branchial arch) 有黏合 (fusion) 的情形、沒有耳朵 (earless) 以及鼻骨沒有發育等現象 (Ando et al., 2005; Grifone et al., 2005)。

四、研究動機

由上述的文章可知 Six 基因家族對於調控體節 (somite) 及顱顏區域的耳板 (otic placode)、嗅板 (olfactory placode) 以及咽弓 (branchial arch) 等組織的正常發育扮演著重要的角色，其中 Six1 基因在小鼠、非洲爪蛙 (*Xenopus*) 以及斑馬魚 (*Zebrafish*) 等各物種間都會表現在咽弓的位置 (見附圖十九)。雖然在 *Six1*^{-/-} 的小鼠胚胎中未能觀察到咽弓區域有發育不全的情形，但這有可能是由於同屬於是 Six 基因家族的 *Six4* 在咽弓位置扮演基因功能性補償的角色，相對的在 *Six4*^{-/-} 的小鼠胚胎中，咽弓可以正常的發育成形，這也很有可能是由於同是 Six 基因家族且在小鼠中的表現位置與 *Six4* 幾乎重覆的 *Six1* 扮演功能性補償的角色，使其咽弓能正常發育成形，這在 *Six1* 與 *Six4* 基因之間在咽弓區域存有功能性互補的想法，可以由 *Six1*^{-/-}*Six4*^{-/-} 的小鼠胚胎在第一對及第二對咽弓有觀察到有黏合 (fusion) 的現象來加以驗證 (Grifone et al., 2005; Laclef et al., 2003; Schlosser, 2006)。

值得注意的是，*Six1* 與 *Six4* 兩基因在各物種間皆位於同一條染色體上，基因位置皆相距不到 100 kb 的距離，且彼此在小鼠中會扮演基因功能性補足(gene redundancy)的角色，再加上在人類中如果 *SIX1* 到 *SIX4* 這段基因區間發生突變或刪除(deletion)的狀況，則會和 Branchio-oto-renal (BOR) syndrome 的發病有關連性，這些研究的結果都一再的指出 *Six1* 與 *Six4* 基因對於調控正常發育過程有著密切的關連性，但是直到目前為止，對於 *Six1* 與 *Six4* 基因的調控機制，還不是了解的相當清楚。



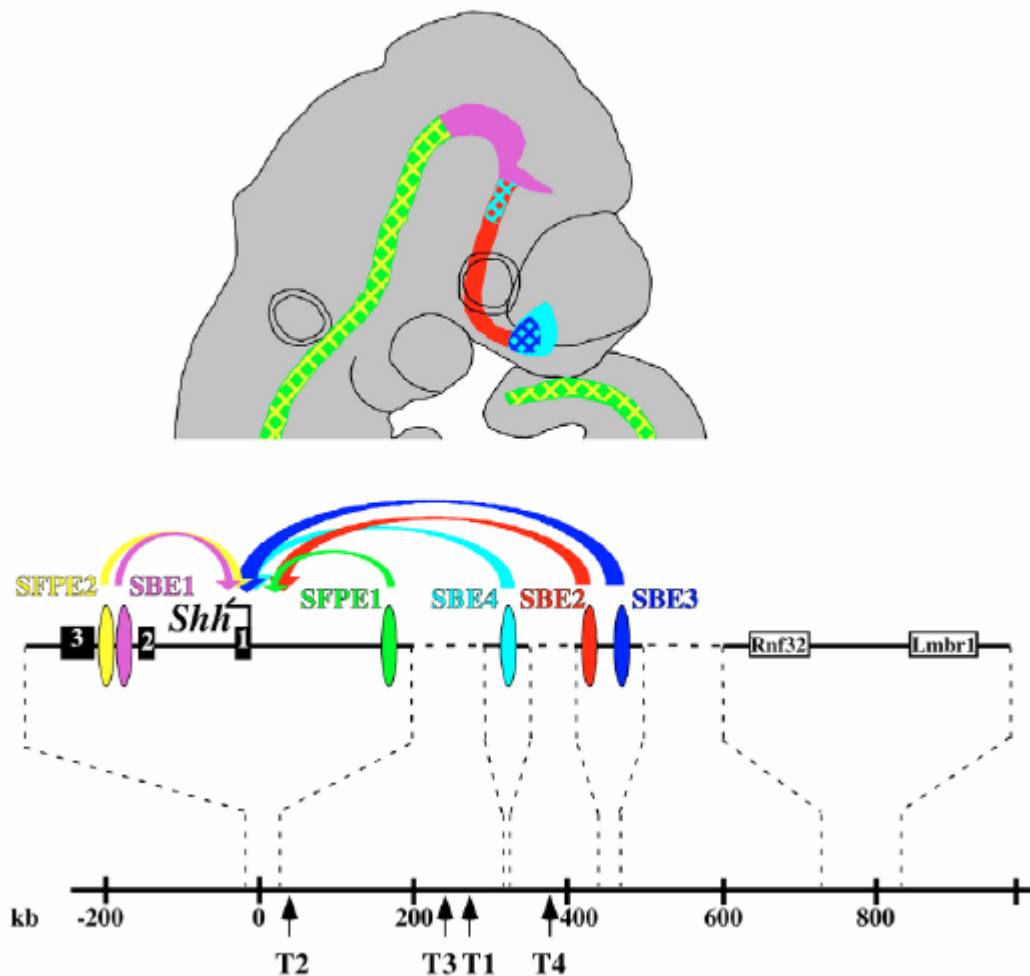
- 附圖十九、*Six1* 基因在小鼠、非洲爪蛙以及斑馬魚等物種間皆會表現在咽弓處
- (A) 在胚胎發育第 12.5 天(E12.5) 的小鼠胚胎中，利用 *lacZ* knock-in 可觀察到 *Six1* 會表現於上下顎及咽弓處(branchial arch)(黑色箭頭)
- (B) 在發育至尾芽期(tailbud stage, 10 hpf)的非洲爪蛙胚胎中，利用原位雜合反應可觀察到 *six1* 基因會廣泛地表現在顱顏部的基板位置(cranial placode)，其中包括咽弓(Epibranchial placode, EB)、耳板(Otic placode, Ot)以及嗅板(Olfactory placode, OI)等基板
- (C) 在受精後 42~48 小時後(42~48 hpf)的斑馬魚胚胎中，利用原位雜合反應的方法可觀察到 *six1.1* 基因會於咽弓等組織表現
- (A adapted from Grifone *et al.*, 2005; B adapted from Gerhard Schlosser, 2006; C adapted from Thisse *et al.*, 2004)

許多研究都指出在演化過程中，如果某段特定的序列在許多物種間都能被保留下來，則這段保守的序列(conserved sequence)在對於基因調控的機制上，常常是具有其功能性的。例如在 2005 年由 Jeong 等人所作的研究中，作者在人類 *SHH* 基因上游約 400 kb 的序列的位置，與包括小鼠、雞以及非洲爪蛙等物種的 *Shh* 基因上游序列作比對，發現到在物種間有許多的保守序列(conserved sequence)片段存在，進一步將這些保守序列分別複製出來及研究後，共可鑑別出 3 個調控 *Shh* 基因在前腦表現的加強子(enhancer)存在於這些保守序列之中，由這個例子可再一次地驗證調控基因在組織的專一性表現，並非單由一個加強子就能決定，須藉由許多加強子協同地調控，才能完全驅動基因啟動子並於胚胎中表現出完整的組織表現型態(見附圖二十)(Jeong et al., 2006)。

這 3 個加強子彼此間尚存有互補(redundancy)的現象，也就是說，當一個加強子失去功能時，其他的加強子會去補足其功能的完整性，使調控基因整體的表現功能不會受到太大的影響。另外值得一提的是，這些在物種間的保守序列中所找到的加強子，其基因調控功能在物種間也會被保留下來。例如將小鼠、雞以及非洲爪蛙本身的 *Shh* 基因在上游所比對到的保守序列，分別鍵結成結構體並打入胚胎後，仍可見其加強子調控基因表現於前腦的功能，這說明物種間的保守序列，不僅會在演化中被保留下來，其所具有的功能於各物種間仍能通用而保留原有作用(Jeong et al., 2006)。

另一個驗證出物種間的保守序列具有功能性的例子，是由 2006 年由 Islam 等人以斑馬魚為實驗動物，除了在 *gbx2* 基因的上下游序列共找到三個能直接調控斑馬魚 *gbx2* 基因在菱腦節(rhombomere)及背側丘腦(dorsal thalamus)表現的加強子(enhancer)外，接著在對 *gbx2* 基因在物種間的保守序列研究中，比對斑馬魚與小鼠 *gbx2* 基因的上下游序列，尚發現在上游及下游區間各存有一段保守序列，進一步研究後發現此兩段保守序列具有抑制子(suppressor)的功能(Islam et al., 2006)。

綜合上述，由於 Six1 與 Six4 基因於斑馬魚、小鼠及非洲爪蛙等物種間皆會表現於咽弓、嗅板、耳板以及體節等組織，且在斑馬魚 *six1.1* 基因上游的鄰近基因，即為與 *six1* 關係密切並被認為會與 *six1* 扮演基因功能性互補(gene redundancy)角色的 *six4.1*，下游則為同屬 Six 基因家族的 *six6.1* (見圖一)。故本篇實驗之主要目的便為探討在斑馬魚 *six1.1* 基因的上下游序列中，於各物種間是否存有保守序列(conserved sequence)，並探討其保守序列中是否有與 *six1.1* 及 *six4.1* 基因調控正常發育有關的順式調控因子(cis-regulatory element)存在。



附圖二十、*Shh* 分子於中樞神經系統(CNS)的表現會受到多個調節因子的調控，圖中可見有兩個調控 *Shh* 於樓板(floor plate)表現的加強子(*Shh* floor-plate enhancer)以及四個調控 *Shh* 於腦部表現的加強子(*Shh* brain enhancer)(adapted from Jeong, El-Jaick *et al.*, 2006)

貳、實驗材料

一、萃取斑馬魚 genomic DNA 所需溶液之製備

(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。

二、萃取斑馬魚 total RNA 所需溶液之製備

(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。



三、菌株

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

四、細菌培養液及培養基之製備

(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。

五、轉形勝任細菌之製備溶液

(1) TFB I

稱 1.21 g 的 RbCl₂、0.81 g 的 MnCl₂、0.29 g 的 potassium-acetate、1 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。

六、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。

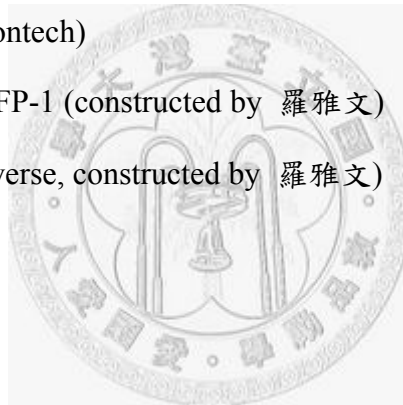
七、質體

(1) pGEM-T Easy vector (Promega)

(2) pEGFP-1 vector (Clontech)

(3) MCS-HSV TK-pEGFP-1 (constructed by 羅雅文)

(4) ISce-EGFP-ISce (reverse, constructed by 羅雅文)



八、引子

編號	命名	5'-序列-3'
(1)	複製斑馬魚 <i>six1.1</i> 基因(zgc:77345)上游啟動子片段使用之引子	
(1-A)	[ZF-Six1.1-2.6kb-SacII]	5'- CATCCGCGGGTGTAGCACATAGGCCT -3' (底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 <i>Sac</i> II site)
(1-B)	[ZF-Six1.1-0-XmaI]	5'- TTTCCCGGGTTGGAGATGTCCTCTG -3' (底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 <i>Xma</i> I site)
(2)	複製斑馬魚 <i>six1.1</i> 基因近端啟動子片段使用之引子	
(2-A)	[ZF-130bp-SacI]	5'- CAGAGCTCCTCTCGCACTGCTGCTG -3' (底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 <i>Sac</i> I site)
(2-B)	[ZF-130bp-HindIII]	5'- GTGAAGCTTTGGGTGATTGTTGGAG -3' (底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 <i>Hind</i> III site)
(3)	複製斑馬魚 <i>six1.1</i> 基因上游保守序列(upstream conserved region, UCR)與下游保守序列(downstream conserved region, DCR)使用之引子 (鍵結至 pEGFP-1 載體)	
(3-A)	[ZF-UCR3+4F-PstI]	5'- GTTGTCTGCAGCAGCCCGTGTGAGTC -3' (底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 <i>Pst</i> I site)
(3-B)	[ZF-UCR3+4R-PstI]	5'- AGGGGGTGTAGAACTGCAGGGTCTC -3' (底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 <i>Pst</i> I site)

(3-C) [ZF-DCR-SacI]

5'- CGCGAGCTCTGCTCAAAGAGAGAGTC -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Sac* I site)

(3-D) [ZF-DCR-HindIII]

5'- TTGAAGCTTAACCAGCTCTGCAATG -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Hind* III site)

(4) PCR 複製斑馬魚 *six1.1* 基因上游保守序列使用之引子(鍵結至具有 HSV TK 基礎啟動子的 pEGFP-1 載體)

(4-A) [ZF-UCR1-SacI]

5'- GAGGAGCTCCATTCTGGGTGAGTGAT -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Sac* I site)

(4-B) [ZF-UCR1-HindIII]

5'- CTCAAGCTTCCCTGTACAGTGAAATC -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Hind* III site)

(4-C) [ZF-UCR2-SacI]

5'- CCAGAGCTCGCCTTTAGGCCATAAA -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Sac* I site)

(4-D) [ZF-UCR2-HindIII]

5'- TGCAAGCTTTATTGAATTTAACGAC -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Hind* III site)

(4-E) [ZF-UCR3-SacI]

5'- AATGAGCTCTCCAGTTTCACGAAAAG -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Sac* I site)

(4-F) [ZF-UCR3-HindIII]

5'- CAAAAGCTTTATATTTAAGAGGGGGT -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Hind* III site)

(4-G) [ZF-UCR4-SacI]

5'- GATGAGCTCTATTGCACAAAGGAGGA -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Sac* I site)

(4-H) [ZF-UCR4-HindIII]

5'- CTCAAGCTTGCGCCCACCAGTTCTT -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Hind* III site)

(4-I) [ZF-DCR-SacI]

5'- CGCGAGCTCTGCTCAAAGAGAGAGTC -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Sac* I site)

(4-J) [ZF-DCR-HindIII]

5'- TTGAAGCTTAACCAGCTCTGCAATG -3'

(底部劃線處表示此 primer 所含有突變的 *Hind* III site)

九、實驗動物

斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)

十、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

十一、顯微注射裝置(microinjection)

顯微注射儀(Femtojet, Eppendorf)

十二、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)



參、實驗方法

一、構築重組質體之步驟

(1) 萃取斑馬魚 genomic DNA 之步驟

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) 萃取斑馬魚胚胎 Total RNA 之步驟

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，最後將沉澱物 (即是 RNA) 溶解於 DEPC-H₂O，定量後保存於 -20°C (Chomczynski and Sacchi, 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) 限制酶作切割反應

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 μg)，加入 100 ng 之引子(primer)，剩餘體積補去離子水至 7 μl ，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 μl 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 μl 的 lysozyme (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)，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 μl 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 μl 的 RNase (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 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 $\mu\text{g/ml}$ DNA)，公式為：DNA 濃度($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) = 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 *six1.1* 基因啟動子 2.6 kb 片段 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1 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 *six1.1* 基因啟動子區域的[ZF-Six1.1-2.6kb-SacII]和[ZF-Six1.1-0-XmaI]為引子，進行 PCR 反應，條件為：94°C 1 min、58°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，可得到斑馬魚 *six1.1* 基因啟動子 2.6 kb 的片段，之後將 DNA 的複製產物純化並萃取此 DNA 片段，同時取 pEGFP-1 vector，利用 Sac II 及 Xma I 切割 MCS，使其產生接點，片段經純化後，將 2.6 kb 之 *six1.1* 啟動子片段與 pEGFP-1 vector 進行接和反應，經轉型至 XL-1 blue 細胞後，再利用 PCR 方法、質體酵素切割法以及定序(以 pUC Ori 為定序引子)，經確認後得到保守片段序列正確的 pSix1.1-2.6kb-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 *Apa* L1 限制酵素將其線性化，即可經顯微注射的方法注射到斑馬魚的胚胎內，並觀察綠色螢光蛋白的表現。

(2) 斑馬魚 *six1.1* 基因 280 bp 近端啟動子 pSix1.1-280bp-EGFP-1 與上游保守序列 pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1、pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1 結構體構築

首先，以斑馬魚 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1 結構體為模板，由於距離 [ZF-Six1.1-0-XmaI]引子上游 280 bp 與 1.8 kb 的位置皆有限制酶 *Pst* I 的切位，加上 pEGFP-1 vector MCS 上尚有一個 *Pst* I 切位，因此利用限制酶 *Pst* I 便可將 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1 結構體切成三段，經洋菜膠電泳分析及 DNA 片段純化(gel elution)後可得到三段 DNA 片段，第一段為約 4 kb 的 DNA 片段，包含了斑馬魚 *six1.1* 基因近端啟動子 280 bp 及其後連接著的 pEGFP-1 vector，接著利用 *Pst*

I 切位使其發生自體接合(self-ligation)，便可得到 pSix1.1-280bp-EGFP-1 結構體；第二段約 1.5 kb，為包含 UCR1 保守序列的 DNA 片段；第三段約 850 bp，為包含 UCR2 保守序列的 DNA 片段，同時取之前作好的 pSix1.1-280bp-EGFP vector，用 *Pst* I 使其產生接點，並以 *Cip* 酵素處理過後，接著將包含 UCR1 及 UCR2 兩段保守序列的 DNA 片段，分別依 *Pst* I 切位進行接合反應，轉型至 XL-1 blue 細胞後，經 PCR 方法篩選、質體酵素切割法以及定序(以 pUC Ori 為定序引子)，經確認而得到保守片段序列正確的 pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1 及 pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1 之重組質體，最後將這三個質體 DNA 進行大量製備，顯微注射前再用 *Apa* L1 限制酵素將其線性化，即可經顯微注射到斑馬魚的胚胎內。

(3) 斑馬魚 *six1.1* 基因上游保留序列片段 pSix1.1-UCR3-280bp-EGFP-1、pSix1.1-UCR4-280bp-EGFP-1 結構體之構築

以斑馬魚 genomic DNA 當模板，[ZF-UCR3+4F-PstI]、[ZF-UCR3+4R-PstI] 為引子，夾出包含 UCR3 及 UCR4 保守序列的 860 bp DNA 片段，由於距離 [ZF-UCR3+4R-PstI] 引子上游約 170 bp 處剛好有一限制酶 *Pst* I 的切位，因此利用 *Pst* I 限制酶從中切開，分離出個別包含 UCR3 及 UCR4 的 DNA 片段，並進行 DNA 片段的純化(gel elution)，同時取之前作好的 pSix1.1-280bp-EGFP-1 vector，用 *Pst* I 使其產生接點，並以 *Cip* 酵素處理過後，再和分別包含 UCR3 與 UCR4 的片段依 *Pst* I 切位進行接合反應，轉型至 XL-1 blue 細胞後，經 PCR 方法篩選、質體酵素切割法以及定序(以 pUC Ori 為定序引子)，經確認而得到片段序列正確的 pSix1.1-UCR3-280bp-EGFP-1 及 pSix1.1-UCR4-280bp-EGFP-1 之重組質體，最後進行質體 DNA 的大量製備，顯微注射前再用 *Apa* L1 限制酵素將其線性化，即可經顯微注射到斑馬魚的胚胎內。

(4) 斑馬魚 *six1.1* 基因 130 bp 近端啟動子 pSix1.1-130bp-EGFP-1 結構體之構築

在斑馬魚 *six1.1* 基因近端啟動子 pSix1.1-280bp-EGFP-1 結構體中的 MCS 及距離 *Xma* I 切位上游約 130 bp 的位置皆有 *Sac* I 切位，因此先經 *Sac* I 限制酵素處理後再進行自體接合反應(self-ligation)，便可將 pSix1.1-280bp-EGFP-1 結構體修短為 pSix1.1-130bp-EGFP-1 結構體，最後進行質體 DNA 的大量製備，顯微注射前再用 *Apa* L1 限制酵素將其線性化，即可經顯微注射到斑馬魚的胚胎內。

(5) 斑馬魚 *six1.1* 基因上下游保守序列片段 pSix1.1-UCR1-TK-EGFP-1、pSix1.1-UCR2-TK-EGFP-1、pSix1.1-UCR3-TK-EGFP-1、pSix1.1-UCR4-TK-EGFP-1、pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1、pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1、pSix1.1-130bp-TK-EGFP-1 結構體之構築

用斑馬魚 genomic DNA 當模板，以[ZF-UCR1-*Sac*I]、[ZF-UCR1-*Hind*III]和[ZF-UCR2-*Sac*I]、[ZF-UCR2-*Hind*III]等六對引子進行 PCR 反應，反應條件為 94°C 1 min、58°C 1 min、72°C 1 min，重複 25 個循環數，經洋菜膠電泳分析，便可得到斑馬魚 *six1.1* 基因上下游在各物種間的六個保守片段，分別為近端 130 bp 啟動子、UCR1、UCR2、UCR3、UCR4 以及 DCR 等片段，將這些 DNA 複製產物純化後，利用酵素切割使 DNA 端點產生 *Sac* I 及 *Hind* III 的切位，同時取 MCS-HSV TK-pEGFP-1 vector，利用 *Sac* I 及 *Hind* III 切割 MCS，使其產生接點，將斑馬魚 *Six1.1* 基因上下游之六個保守片段與 MCS-HSV TK-pEGFP-1 vector 作接和反應，經 PCR 方法篩選後，便可得到 pSix1.1-UCR1-TK-EGFP-1、pSix1.1-UCR2-TK-EGFP-1、pSix1.1-UCR3-TK-EGFP-1、pSix1.1-UCR4-TK-EGFP-1、pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1 及 pSix1.1-130bp-TK-EGFP-1 重組質體；另外取 pSix1.1-280bp-EGFP-1 結構體，利用 *Sac* I 及 *Hind* III 切割 MCS，使其產生接點，將上述經 PCR 反應後並經酵素切割純化過的斑馬魚 *six1.1* 基因下游的保守片段 DCR，與 pSix1.1-280bp-EGFP-1

vector 作接和反應，經 PCR 方法篩選後，便可得到 pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1 重組質體，最後將上述的質體皆進行質體 DNA 的大量製備，顯微注射前再用 *Apa* L1 限制酵素將其線性化，即可經顯微注射到斑馬魚的胚胎內，經顯微注射到斑馬魚的胚胎後，可由綠色螢光蛋白表現確認斑馬魚 *six1.1* 基因上下游在物種間各個保守片段是否具有能專一調控 *six1.1* 基因在組織細胞中的表現。

綜合上述，我們總共得到 14 個結構體，分別是斑馬魚 *six1.1* 近端的啟動子及上下游六個保守片段接入 pEGFP-1 或是具有 HSV TK 基礎啟動子的載體，條列如下：

1. pSix1.1-2.6kb-EGFP-1
2. pSix1.1-130bp-EGFP-1
3. pSix1.1-280bp-EGFP-1
4. pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1
5. pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1
6. pSix1.1-UCR3-280bp-EGFP-1
7. pSix1.1-UCR4-280bp-EGFP-1
8. pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1
9. pSix1.1-130bp-TK-EGFP-1
10. pSix1.1-UCR1-TK-EGFP-1
11. pSix1.1-UCR2-TK-EGFP-1
12. pSix1.1-UCR3-TK-EGFP-1
13. pSix1.1-UCR4-TK-EGFP-1
14. pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1

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. pSix1.1-2.6kb-EGFP-1
2. pSix1.1-130bp-EGFP-1
3. pSix1.1-280bp-EGFP-1
4. pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1
5. pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1
6. pSix1.1-UCR3-280bp-EGFP-1
7. pSix1.1-UCR4-280bp-EGFP-1
8. pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1
9. pSix1.1-130bp-TK-EGFP-1
10. pSix1.1-UCR1-TK-EGFP-1

11. pSix1.1-UCR2-TK-EGFP-1

12. pSix1.1-UCR3-TK-EGFP-1

13. pSix1.1-UCR4-TK-EGFP-1

14. pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1

所有的結構體皆直接以 pEGFP-1 或 HSV TK-pEGFP-1 上的 *Apa* L1 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/ μ l 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 9mm 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 恆溫箱中發育，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、斑馬魚轉殖恆定品系的篩選

(1) F₀ 胚胎及魚苗之蓄養

將顯微注射注入 DNA 之胚胎蓄養於 28.5°C 恆溫箱中待其卵黃 (yolk) 吸收，至第五天開始游泳時，餵以人工微粒子懸浮飼料及豐年蝦，在水箱中蓄養約三個月至成魚(F₀)。

(2) 轉殖恆定品系之篩選

將蓄養至 3 個月之成魚與野生型的魚交配，觀察其子代(F₁) 在 1-2 dpf 是否表現綠色螢光標記，收集具有表現螢光標記之 F₁ 並蓄養之，可得恆定品系(transgenic stable line)。並可進一步將有表現螢光標記之 F₁ 相互交配，觀察綠色螢光標記表現強弱即可得同型合子(homozygous)知恆定品系子代(F₂)

六、基因轉殖斑馬魚的統計分析

(1) 恆定品系之 germline transmission efficiency

- a. 紀錄篩選得到的恆定品系數量佔總篩選魚隻的比例。
- b. 紀錄基因轉殖(F₀ 親魚)與野生型魚隻交配後，所得 F₁ 為恆定品系所佔的比例。

(2) 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。

(3) 轉殖基因恆定表現(transgenic stable line)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、各物種 *Six1* 基因上游序列於網路資料庫之收集及利用軟體與網頁進行比對

為了構築斑馬魚 *six1* 基因啟動子結構體，首先利用 NCBI 網頁 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 搜尋斑馬魚 *six1* cDNA 序列(key word: *six1*)，可找到一個位在斑馬魚第 20 對染色體的 *six1* 基因(zgc:77345)(其後稱為 *six1.1*)，其上游及下游鄰近基因分別為 *six4.1* 與 zgc:110344 (其後稱為 *six6.1*)(見圖一)，比對斑馬魚 *six6.1* 和人類 *SIX6* 基因的胺基酸序列後，得知兩者之間有著 90% 以上的相似度(見圖二)，且此基因群組的排列順序(*six6.1-six1.1-six4.1*)也和包括人類、小鼠以及非洲爪蛙等其他物種之 *Six1* 基因上下游鄰近基因(*Six6-Six1-Six4*)的排列順序一致(見圖一)。另外以斑馬魚 *six4.2* 基因於基因體內搜尋後，可發現其下游鄰近基因為 zgc:92332 (之後稱為 *six1.2*)及 zgc:63871(之後稱為 *six6.2*)(見圖一)，分別比對斑馬魚 *six1.2* 和人類 *SIX1* 及斑馬魚 *six6.2* 和人類 *SIX6* 的胺基酸序列後，發現皆具有 90% 以上的高相似度(見圖二)，故此位於斑馬魚第 13 對染色體上的基因群組(*six6.2-six1.2-six4.2*)也和物種間 *Six1* 基因上下游鄰近基因(*Six6-Six1-Six4*)在基因體上之排列順序一致(見圖一)。

由於在胺基酸序列的比對及基因群組間的排列順序上，斑馬魚 *six1.1* 及 *six1.2* 基因與人類 *SIX1* 基因皆無太大的差別。因此想得知 *six1.1* 及 *six1.2* 基因於斑馬魚胚胎中的表現型態是否與其他物種 *Six1* 基因的表現位置相似或一致，利用 ZFIN 網頁(<http://zfin.org/>)搜尋分別位於斑馬魚染色體第 20 對及第 13 對的 *six1.1* 與 *six1.2* 基因於斑馬魚胚胎中的表現型態。結果發現，相較於 *six1.2* 只會表現在斑馬魚胚胎中的體節(somite)及中樞神經系統(central nervous system, CNS)等位置(見本論文第 17 頁之附圖九)；*six1.1* 在斑馬魚胚胎中的表現型態與在小鼠、雞或非洲爪蛙等其他物種中的 *Six1* 基因表現型態顯得相似許多，皆會表現在體節(somite)、耳囊(otic vesicle)、咽弓(branchial arch)、嗅囊(olfactory vesicle)以及腦下垂體前葉(adenohypophysis)等位置(見本論文第 14 頁之附圖六)，此外還會在兩

棲類和魚類特有的神經丘(neuromast)表現，此點也和非洲爪蛙胚胎中的 *six1* 基因表現一致(見本論文第 15 頁之附圖七)，因此依據著胺基酸序列的相似度與 Six 基因群組於物種基因體中的順序性再加上物種間表現位置的一致性，可合理推測斑馬魚位於第 20 對染色體上的 *six1.1* (*zgc:77345*)基因與哺乳類 *Six1* 基因同源(orthologue)，而位在第 13 對染色體上的 *six1.2* (*zgc:92332*)是由於斑馬魚基因體複製(genome duplication)所產生之結果。

經由上述可得知斑馬魚*six1.1*基因與其他物種上下游鄰近基因於基因體上之排列順序一致(見圖一)，因此可推知於物種演化的過程中，Six6-Six1-Six4此基因群組並未有基因丟失的情況發生，而是完整地以群組的方式保留於各物種間，故在此群組中應存有許多於物種間的保守序列及基因調節因子被保留下來，且其調節功能之對象可能涵括Six1、Six4及Six6基因。

在前言有提及於各物種間的 Six 基因家族中，所有的 Six 蛋白皆包含有 SD 及 Six-type HD 兩段高度保守的區域，因此接著比對斑馬魚 *six1.1* 基因與各物種 Six1 基因中 SD 及 Six-type HD 的胺基酸序列進行再一次確認，其比對結果也顯示出斑馬魚 *six1.1* 基因與其他物種 *Six1* 基因胺基酸序列皆非常相似(見圖三)。

為了得知斑馬魚*six1.1*基因和其他物種Six1基因上下游到鄰近基因間是否有保守性序列(conserved sequence)存在，首先到Ensembl Genome Browser網頁(<http://www.ensembl.org/>)調出包括斑馬魚、人類、小鼠、大鼠、雞(*Gallus gallus*)、非洲爪蛙(*Xenopus tropicalis*)、河豚(*Takifugu rubripes*)、四齒純(*Tetraodon, Tetraodon nigroviridis*)、負鼠(Opossum)以及青鱗魚(Medaka, *Oryzias latipes*)等十個物種Six1基因的上游序列，接著利用Dot Matrix軟體對取得的各物種Six1基因的上下游序列資料相互加以比對(見圖四及圖五)，並以美國加州大學所構築的序列比對網頁UCSC (University of California, Santa Cruz, <http://genome.ucsc.edu/>)以及另一個提供調控片段(regulatory element)資訊瀏覽的網頁VISTA Enhancer Browser (<http://enhancer.lbl.gov/>)對所找到的保守序列(conserved sequences)進行再一次確認(見圖六及圖七)。藉由上述軟體及網頁的協助，可在斑馬魚*six1.1*基因上

下游序列間，發現到有三段保守序列在斑馬魚、人類、小鼠、大鼠、負鼠、雞、非洲爪蛙及河豚等物種間被保留下來(見圖四、圖六、圖七及圖八)，並依據與斑馬魚*six1.1*基因第一個表現子(Exon 1)距離的遠近分別命名為upstream conserved region 1 (UCR1, -987/-1175)、upstream conserved region 2 (UCR2, -1798/-2030)以及downstream conserved region (DCR)(見圖八)，也由於UCR1、UCR2及DCR於物種間皆具有保守性，因此可以合理猜想UCR1、UCR2與DCR可能具有調控各物種Six1或Six4甚至是Six6基因表現的功能。

二、斑馬魚*six1.1*基因上游2.6 kb啟動子pSix1.1-2.6kb-EGFP-1結構體之構築及顯微注射實驗

為了得知斑馬魚 *six1.1* 基因上游 2.6 kb 之啟動子片段(包含 UCR1 及 UCR2)，是否具有調控及驅動 *six1.1* 基因在斑馬魚胚胎中表現的功能，於是將 *six1.1* 基因上游 2.6 kb (+31/-2631) 的片段順向接入 pEGFP-1 載體中，並構築為 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1 結構體(見圖九)，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 3 至 8 天後觀察綠色螢光蛋白的表現。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體節(somite)及耳囊(otic vesicle)等組織，另外在咽弓區域(branchial arch)、神經丘(neuromast)以及脊索(notochord)等組織器官的位置，也可觀察到一些零星的綠色螢光蛋白表現(見圖十一、圖十二及表一)。

接著將經顯微注射的斑馬魚胚胎飼養至成魚(adulthood)，此為 F0 親代，再將公魚和母魚互相交配產生 F1 子代，然後觀察 F1 子代是否與 F0 親代在相同組織也有綠色螢光蛋白的表現，以便篩選斑馬魚 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1 結構體轉殖恆定品系(stable line)。目前為止已篩選 33 隻 F0 的親代，並且得到 1 個轉殖恆定品系(見表二)，依編號命名為 No.5，並將此恆定轉殖品系 F1 的公魚和母魚互相交配產生同型合子(homozygous)及異型合子(heterozygous)的 F2 子代。

觀察轉殖恆定品系 F2 子代受精後 3 天(3 dpf)的斑馬魚胚胎，可以觀察到綠

色螢光蛋白主要表現在耳囊腹部(ventral otic vesicle)與頭部及體表之神經丘(neuromast)組織位置(比較本論文第 16 頁之附圖八及圖十三),此結果和過渡性實驗中的 F0 親代所表現的位置略有不同,在過渡性實驗中的 F0 親代在體節位置表現綠色螢光蛋白具有相當高的表現效率(96.4%,見表一),但在此 No.5 轉殖恆定品系 F2 子代中,則完全沒有觀察到體節的位置有綠色螢光的表現。總括來說,在 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1 結構體的顯微注射實驗中,可觀察到綠色螢光蛋白會表現在體節、耳囊腹部及神經丘(neuromast)等組織位置,和由 Thisse 等人利用原位雜合反應觀察斑馬魚 *six1.1* 基因內生性 mRNA 的表現型態有許多相同之處(見本論文第 14 頁之附圖六),故可推測斑馬魚 *six1.1* 基因上游 2.6 kb 啟動子的範圍內,應存有能調控及驅動 *six1.1* 基因於體節、耳囊腹部及神經丘等組織表現之調控因子存在。

三、斑馬魚 *six1.1* 基因近端啟動子 pSix1.1-280bp-EGFP-1、pSix1.1-130bp-EGFP-1、pSix1.1-130bp-TK-EGFP-1 以及 HSV TK-EGFP-1 結構體之顯微注射實驗

將斑馬魚 *six1.1* 基因上游 280 bp 之近端啟動子構築為 pSix1.1-280bp-EGFP-1 結構體並送入斑馬魚胚胎的過渡性實驗中,於發育至 3 dpf 的斑馬魚胚胎可見到綠色螢光蛋白只表現於體節(somite)的位置,並有著 39%的轉殖效率(見圖十四及表一),由於此 *six1.1* 基因近端啟動子 280 bp 之結構體表現單一於體節位置,且於體節的表現效率相較於 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1 結構體(96.4%)顯得降低許多,故將此 pSix1.1-280bp-EGFP-1 結構體之表現型態和其於體節之表現機率視為控制組(control),並於之後構築斑馬魚 *six1.1* 基因上下游於物種間保守序列之結構體的過程中,其後皆接入斑馬魚 *six1.1* 近端啟動子 280 bp,藉以了解接入之保守序列是否具有能加強斑馬魚 *six1.1* 基因於體節表現之轉殖效率,或為調控斑馬魚 *six1.1* 基因於其他組織器官位置表現之功能。

另外,進一步將斑馬魚 *six1.1* 近端啟動子修短為 130 bp 後,構築為

pSix1.1-130bp-EGFP-1 結構體並經顯微注射送入斑馬魚胚胎中，於發育至 3 dpf 時期觀察，可見到綠色螢光蛋白同樣地只表現於體節(somite)的位置，但其表現效率稍降低為 24.6%(見圖十五及表一)。綜合此兩結構體過渡性實驗的結果，可得知在斑馬魚 *six1.1* 基因近端啟動子 280 bp 及 130 bp 的範圍內，應尚存有能驅動 *six1.1* 基因於體節表現的調控因子存在。

為了得知斑馬魚 *six1.1* 近端啟動子 280 bp 及 130 bp 的範圍內，是否具有能驅動 *six1.1* 於體節處表現之調節因子存在，因此接著用 UCSC 及 ClustalW 網頁 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) 去分析 *six1.1* 基因近端啟動子序列，發現到有四小段保守片段保守存在於斑馬魚、河豚、四齒鮪及非洲爪蛙等物種間(見圖八)。為了檢驗這些保守片段是否具有斑馬魚 *six1.1* 基因啟動子的調控因子存在，將斑馬魚 *six1.1* 基因近端啟動子 130 bp 的序列鍵結到具有 HSV TK 基礎啟動子的 pEGFP-1 載體內，並將構築好的結構體以顯微注射的方式送入斑馬魚的胚胎中，在發育 3 dpf 時期觀察綠色螢光蛋白的表現，在 pSix1.1-130bp-TK-EGFP-1 結構體的過渡性實驗中，可觀察到綠色螢光蛋白主要仍是表現在體節的位置，但其表現的效率降低到只有 14.6%，此外少部分的斑馬魚胚胎還可於脊索(notochord)的位置觀察到綠色螢光的表現(見圖十六及表一)。

另外為了確認本實驗所使用之具有 HSV TK 基礎啟動子是否會驅動綠色螢光蛋白於斑馬魚胚胎中表現，因此將未接入任何序列之空 HSV TK-EGFP-1 載體線性化後經顯微注射到斑馬魚胚胎中，於 3 dpf 可觀察到綠色螢光蛋白會表現於體節及脊索等組織位置，其表現機率分別為 25%及 3.1%(見圖十七及表一)。

四、斑馬魚 *six1.1* 基因上游保守序列 pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1 及 pSix1.1-UCR1-TK-EGFP-1 結構體之顯微注射實驗

為了得知斑馬魚 *six1.1* 上游兩段保守序列之一的 UCR1 是否具有能調控 *six1.1* 基因表現，甚至是調控其組織專一性表現的功能，將此保守序列分別鍵結到具有斑馬魚 *six1.1* 基因近端啟動子 280 bp 的 pSix1.1-280bp-EGFP-1 載體與具

有 HSV TK 基礎啟動子的 pEGFP-1 載體內，並將構築好的結構體以顯微注射方式送入斑馬魚的胚胎中，在 3-5 天後觀察綠色螢光蛋白表現，於 pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1 結構體的過渡性實驗中，觀察到綠色螢光蛋白主要表現在斑馬魚的胚胎中的體節及耳囊等位置，另外尚在神經丘(neuromast)、咽弓區域(branchial arch)、第五對三叉神經(V)以及鰭條等位置有零星的表現(見圖十八、圖十九及表一)。

而在 pSix1.1-UCR1-TK-EGFP-1 結構體的過渡性實驗中，在 3 dpf 的斑馬魚胚胎中可以觀察到綠色螢光蛋白主要表現在體節的位置(見圖二十)，其表現機率為 52.1%，且幾乎沒有見到在耳囊處表現綠色螢光蛋白(見表一)，另外少部分的斑馬魚胚胎還可以觀察到在脊索(notochord)與咽弓區域等位置有零星地表現綠色螢光蛋白(見圖二十及表一)。目前為止，pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1 及 pSix1.1-UCR1-TK-EGFP-1 兩結構體已各篩選 27 隻及 1 隻 F0 親代，但尚未得到恆定轉殖品系(stable transgenic line)(見表二)。

由此這兩個結構體在斑馬魚胚胎表現綠色螢光蛋白的結果，可以發現到 pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1 結構體於體節之綠色螢光表現效率為 98.9%，較 pSix1.1-280bp-EGFP-1 於體節 39% 的表現效率高出許多，且尚可見於耳囊有 32.8% 的機率表現綠色螢光蛋白，此點與 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1 結構體的實驗結果相符(見表一)，由此也可推測 UCR1 保守序列中應具有能調控加強斑馬魚 *six1.1* 於體節以及耳囊等位置表現的調控因子存在。

五、斑馬魚 *six1.1* 基因上游保守序列 pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1 及 pSix1.1-UCR2-TK-EGFP-1 結構體之顯微注射實驗

為了了解另一段保守序列 UCR2 中是否有能調控斑馬魚 *six1.1* 基因表現的調控因子存在，將 UCR2 鍵結到具有 *six1.1* 基因近端 280 bp 啟動子的 pSix1.1-280bp-EGFP-1 載體與具有 HSV TK 基礎啟動子的 pEGFP-1 載體內，並將構築好的結構體以顯微注射送入斑馬魚胚胎中，於 pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1

結構體的過渡性實驗中，在 3 dpf 時期可觀察到綠色螢光蛋白主要表現在斑馬魚胚胎中的體節(somite)位置，另可在頭部神經丘(neuromast)有零星地表現綠色螢光蛋白，而於 6 dpf 及 9 dpf 時期觀察時，則可見在咽弓區域有些許綠色螢光蛋白表現(見圖二十一及表一)；在 pSix1.1-UCR2-TK-EGFP-1 結構體的過渡性實驗中，於 3 dpf 時期同樣可觀察到綠色螢光蛋白表現在斑馬魚胚胎中的體節(somite)位置，少部分還可見到在脊索(notochord)位置也有表現綠色螢光(見圖二十一及表一)。目前為止，pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1 結構體已篩選 25 隻 F0 親代，但尚未得到恆定轉殖品系(見表二)。

由保守序列 UCR2 在此兩結構體的過渡性實驗結果中，可得知綠色螢光蛋白於體節 43.3%及 52.7%的表現效率和控制組 pSix1.1-280bp-EGFP-1 在體節 39%的表現效率及 HSV TK-EGFP-1 於體節 25%的表現效率相比，皆有稍微提高表現效率，但相較由 UCR1 所構築的結構體於體節 98.9%的綠色螢光表現效率便顯得降低不少(見表一)，因此在斑馬魚 *six1.1* 上游保守序列 UCR2 中，或許存有能調控斑馬魚 *six1.1* 於體節及神經丘等組織位置表現的調控因子，但其調控基因表現的能力應較為低弱。

六、搜尋斑馬魚 *six1.1* 基因上游 2.6 kb 範圍外的保守序列

由於在斑馬魚 *six1.1* 基因啟動子 2.6 kb 的範圍內，即 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1、pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1 與 pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1 結構體的過渡性實驗中的綠色螢光蛋白表現，與 Thisse 等人對斑馬魚 *six1.1* 基因內生性 mRNA 所作的原位雜合反應相比，並未明顯地觀察到斑馬魚胚胎的咽弓區域(branchial arch)、嗅囊(olfactory vesicle)以及腦下垂體前葉(adenohypophysis)等組織有表現綠色螢光蛋白(比較圖十一至圖十三、圖十八至圖二十一及本論文第 14 頁之附圖六)。於是在考慮到物種演化上由魚類→兩棲類→爬蟲類→鳥類→哺乳類的漫長過程中，會漸漸地丟失掉一些調節片段(regulatory element)的可能性，因此接著利用 Dot Matrix 序列比對軟體及 UCSC 網頁去比對和斑馬魚在演化程度上較為接

近並同屬魚類的河豚(*Takifugu rubripes*)、四齒魮(*Tetraodon nigroviridis*)以及青鱗魚(Medaka, *Oryzias latipes*)等物種 *six1* 基因上游序列，發現在斑馬魚與這些物種 *six1* 基因上游 2.6 kb 以外的區域尚存有兩段保守序列(見圖五及圖六)。同樣地依據與斑馬魚 *six1.1* 基因第一個表現子(Exon 1)距離的遠近分別命名為 UCR3 (-4185/-4400)及 UCR4 (-4833/-5089)(見圖六及圖八)，並將此兩段保守序列分別鍵結到具有斑馬魚 *six1.1* 基因近端啟動子之 pSix1.1-280bp-EGFP-1 載體與具有 HSV TK 基礎啟動子的 pEGFP-1 載體內，並將構築好的結構體以顯微注射的方式送入斑馬魚的胚胎中。

七、斑馬魚 *six1.1* 基因上游保守序列 pSix1.1-UCR3-280bp-EGFP-1 及 pSix1.1-UCR3-TK-EGFP-1 結構體之顯微注射實驗

將構築好的 pSix1.1-UCR3-280bp-EGFP-1 結構體經顯微注射至斑馬魚胚胎的過渡性實驗中，於發育 3 dpf 時期的斑馬魚胚胎中，可觀察到綠色螢光蛋白主要表現在體節(somite)位置(見圖二十二及表一)，另外尚可觀察到 1 隻斑馬魚胚胎於頭部間葉細胞表現綠色螢光蛋白。目前為止，pSix1.1-UCR3-280bp-EGFP-1 結構體已篩選 18 隻 F0 親代，但尚未得到恆定轉殖品系(見表二)。

在 pSix1.1-UCR3-TK-EGFP-1 結構體的過渡性實驗中，於發育 3-5 dpf 時期同樣可觀察到綠色螢光蛋白主要表現在體節(somite)的位置，另可見在頭部間葉細胞及脊索(notochord)的位置也有零星的綠色螢光蛋白表現(見圖二十三及表一)。目前為止，pSix1.1-UCR3-TK-EGFP-1 結構體已篩選 3 隻 F0 親代，但尚未得到恆定轉殖品系(見表二)。

於此兩結構體的過渡性實驗結果中，可得知綠色螢光蛋白於胚胎中體節位置的表現效率分別為 78.4%及 85.4%，相較 pSix1.1-280bp-EGFP-1 於體節 39%及 HSV TK-EGFP-1 於體節 25%的表現效率皆高出許多(見表一)，由此可合理推測於斑馬魚 *six1.1* 上游保守序列 UCR3 中，應有能加強 *six1.1* 基因於體節中表現的調節因子存在。

八、斑馬魚 *six1.1* 基因上游保守序列 pSix1.1-UCR4-280bp-EGFP-1 及 pSix1.1-UCR4-TK-EGFP-1 結構體之顯微注射實驗

在斑馬魚 *six1.1* 基因上游保守序列 pSix1.1-UCR4-280bp-EGFP-1 結構體顯微注射的過渡性實驗中，於 3-5 dpf 的斑馬魚胚胎中可觀察到綠色螢光蛋白主要表現在體節(somite)的位置，其表現效率為 57.3%，另外尚可見於咽弓、耳囊及脊索有些許綠色螢光蛋白的表現(見圖二十四及表一)。在 pSix1.1-UCR4-TK-EGFP-1 結構體的過渡性實驗中，於 3 dpf 時期同樣可觀察到綠色螢光蛋白於體節的位置，且其表現效率將近 80%，另外還可見於咽弓區域、神經丘以及脊索等組織有零星的表現綠色螢光蛋白(見圖二十五及表一)。目前為止，pSix1.1-UCR4-280bp-EGFP-1 及 pSix1.1-UCR4-TK-EGFP-1 結構體已各篩選 43 隻及 26 隻 F0 親代，但尚未得到恆定轉殖品系(見表二)。

相較於 pSix1.1-280bp-EGFP-1 於體節 39% 的表現效率及 HSV TK-EGFP-1 於體節 25% 的表現效率，由保守序列 UCR4 所構築之結構體的顯微注射過渡性實驗中，皆可見綠色螢光蛋白於體節的表現效率有所增加(見表一)，故可推測於斑馬魚 *six1.1* 基因上游保守序列 UCR4 中，應具有能調控加強斑馬魚 *six1.1* 基因於體節位置表現的調控因子存在。

九、斑馬魚 *six1.1* 基因下游保守序列之搜尋比對

由於在斑馬魚 *six1.1* 基因上游所找到的物種間保守序列，包括 UCR1、UCR2、UCR3 以及 UCR4 構築為結構體後經顯微注射於斑馬魚胚胎的過渡性實驗中，仍未明顯地觀察到斑馬魚胚胎中的咽弓區域(branchial arch)、嗅囊(olfactory vesicle)以及腦下垂體前葉(adenohypophysis)等組織有表現綠色螢光蛋白，因此轉向斑馬魚 *six1.1* 基因下游尋找有無物種間的保守序列存在，斑馬魚 *six1.1* 與下游鄰近之 *six6.1* 基因之間約有 30 kb 的距離，較與上游鄰近之 *six4.1* 基因的 7.7 kb 距離為長，故將於 Ensembl 調得之 *six1.1* 基因下游完整序列，以 10 kb 為一單位進行折解，並同樣地利用 Dot Matrix 軟體來進行序列比對，在於 UCSC 和 VISTA

Enhancer Browser 網頁的相互確認下，發現到在斑馬魚、人類、小鼠、大鼠、負鼠、非洲爪蛙以及雞等七個物種間，於斑馬魚 *six1.1* 基因下游約 16 kb 處存有一段保守序列，並命名為 downstream conserved region (DCR, +16671/+17000)(見圖七及圖八)。

十、斑馬魚 *six1.1* 基因下游保守序列 pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1 與 pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1 結構體之顯微注射實驗

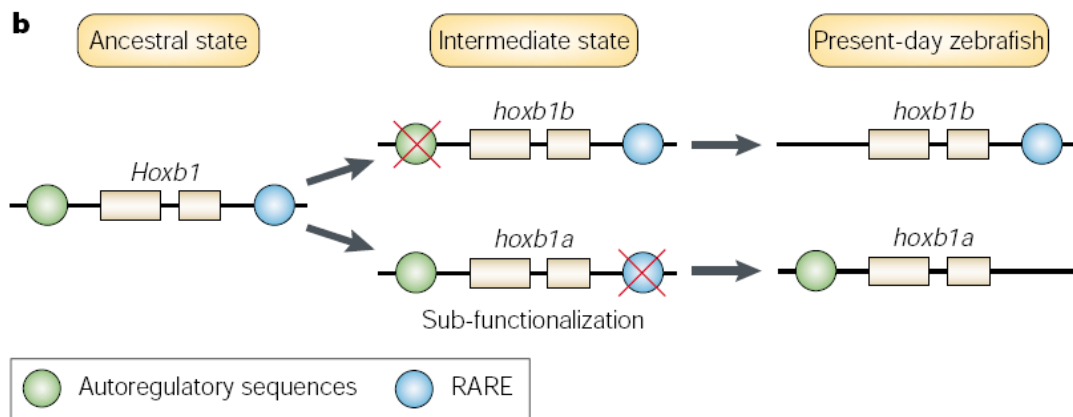
為能進一步了解 DCR 此保守序列是否具有能調控斑馬魚 *six1.1* 基因於胚胎中表現的功能，將此保守片段鍵結到 pSix1.1-280bp-EGFP-1 載體與具有 HSV TK 基礎啟動子的 pEGFP-1 載體內，並將構築好的結構體以顯微注射的方式送入斑馬魚胚胎中，於發育 3 天後觀察，在 pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1 結構體的過渡性實驗中，可觀察到綠色螢光蛋白主要表現在體節的位置，且其螢光表現效率為 100%，而於咽弓區域、頭部間葉細胞以及脊索等組織位置也可在少許轉殖的斑馬魚幼魚中觀察到綠色螢光蛋白表現(見圖二十六及表一)。於 pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1 結構體的過渡性實驗中，於 3 dpf 時期同樣可觀察到綠色螢光蛋白在體節有著高效率的表現(93.6%)，少部分斑馬魚胚胎則可見於咽弓區域、脊索以及頭部神經丘等組織器官有綠色螢光蛋白表現(見圖二十七及表一)。目前為止，pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1 及 pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1 兩結構體已各篩選 1 隻及 3 隻 F0 親代，但尚未得到恆定轉殖品系(見表二)。

由 pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1 與 pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1 兩結構體的過渡性實驗中，可得知於體節皆有 93% 以上的高表現效率，較 pSix1.1-280bp-EGFP-1 與 HSV TK-EGFP-1 於體節之表現效率高出許多(見表一)，故可推測於斑馬魚 *six1.1* 基因下游保守序列 DCR 中，應也具有能加強 *six1.1* 基因於體節表現之調控因子存在。

伍、討論

在比對分別位於斑馬魚第 20 對染色體的 *six1.1* 基因與第 13 對染色體的 *six1.2* 基因之上下游序列後，發現在 *six1.1* 基因下游+9958/+10056、+10199/+10300、+10763/+10838 以及+10983/+11070 等四段 DNA 序列，於 *six1.2* 基因下游也有同樣的重覆片段(圖未示，data not shown)，雖然尚未知道此四段重覆片段有無任何調控基因表現的功能，但可推測這些重覆片段應是由於在演化過程中，硬骨魚類較其他物種多出一次的基因體複製(genome duplication)所遺留下來的殘跡，因此魚類可能有部分基因比其他物種多出一套。舉本實驗的例子，*Six6-Six1-Six4* 此基因群組在人類、小鼠以及大鼠等物種基因體中皆只有一組，但在斑馬魚中則可發現有兩組基因，即位於斑馬魚第 20 對染色體的(*six6.1-six1.1-six4.1*)與第 13 對染色體的(*six6.2-six1.2-six4.2*)此兩組基因群組，其胺基酸序列及於基因體上之排列順序非常相似，因此可合理推測斑馬魚基因體中會有此兩組基因群組，應為硬骨魚類較其他物種多出一次的基因體複製(genome duplication)所造成的結果(Prince and Pickett, 2002)。

先前的研究認為，由於基因體複製所導致多一套的基因(duplicated gene)，其所具有的功能性有兩種可能，一為沒有功能(non-functionalization)，多出的那套基因可能因為長時間的演化過程造成序列上的差異，或是因為僅複製基因的片段卻未複製啟動子部分而退化成為偽基因(pseudogene)；二為具備新的功能(neo-functionalization)，但此情形的實際例子很少，故一般較能接受的說法為原基因與多出那套的基因彼此具有部分的功能(sub-functionalization)，於彼此基因功能缺失時，能顯示互相扮演功能性補償的角色，此即為 duplication-degeneration-complementation (DDC) model，在這種複製-退化-補償模式下，只有在兩套基因及其調節因子同時存在時，才能完整地表現其原始基因(ancestral gene)的功能(見附圖二十一)(Prince and Pickett, 2002)。



附圖二十一、DDC model 的實例之一。原始於脊椎動物(小鼠)中的 *Hoxb1* 基因，在演化上於斑馬魚基因體中複製後，可在斑馬魚基因體中找到兩套 *Hoxb1* 基因，分別為 *hoxb1a* 及 *hoxb1b*，且其原始有兩個能調控 *Hoxb1* 基因完整表現的調控因子(Auto-regulatory sequences 及 RARE)，也會分別散布於斑馬魚 *hoxb1a* 及 *hoxb1b* 基因周邊的區域，並個別地具有調控其基因表現的部分功能(sub-functionalization)，隨著演化進程，部分促進子(enhancer)可能丟失。故當此兩套基因及其調控因子存在時，才能完整地表現原始哺乳類 *Hoxb1* 基因之表現型態。RARE: 3' retinoic acid response element，能調控小鼠早期 *Hoxb1* 的表現(adapted from Prince and Pickett, 2002)

以本實驗斑馬魚 *six1.1*、*six1.2* 及小鼠 *Six1* 基因為例，斑馬魚 *six1.1* 內生性 mRNA 會表現於體節、耳囊、嗅囊、咽弓、腦下垂體前葉、頭部間葉組織、鰭條肌肉及側線系統中的神經丘等組織位置(見本論文第 14 頁之附圖六)，*six1.2* 則會表現於體節及中樞神經系統(見本論文第 17 頁之附圖九)。整合此兩個基因於斑馬魚胚胎中的表現型態，和小鼠 *Six1* 基因會於體節、耳囊、嗅囊、咽弓、腦下垂體前葉、頭部間葉組織、四肢肌肉、背根神經節(DRG)以及腎臟等組織器官的表現型態幾乎一樣(見本論文第 8 頁之附圖四)。另一方面，斑馬魚 *six4.1*、*six4.2* 之整合與小鼠 *Six4* 基因的表現型態也相當類似，斑馬魚 *six4.1* 會表現於體節、嗅

囊、腦下垂體前葉、鰭條肌肉、顱部神經(cranial ganglia)以及神經丘等組織位置(見本論文第 23 頁之附圖十三), *six4.2* 則會表現於耳囊、體節以及鰭條肌肉等位置(見本論文第 24 頁之附圖十四), 與小鼠 *Six4* 基因會表現在體節、嗅囊、耳囊、腦下垂體前葉、顱部神經、四肢肌肉、背根神經節、咽弓以及腎臟等位置比較也幾乎一樣(見本論文第 22 頁之附圖十二)。由此可得知 *Six1* 與 *Six4* 基因於斑馬魚及小鼠之間的關係, 應符合 DDC model 的實例之一, 也就是說分別總合斑馬魚中的 *six1.1*、*six1.2* 及 *six4.1*、*six4.2* 的表現型態, 可幾乎完整呈現小鼠中相對應的 *Six1* 與 *Six4* 原始基因(ancestral gene)的表現型態。

先前對小鼠 *Dlx* 基因上下游相關序列的研究中, 可在位於 *Dlx5* 及 *Dlx6* 基因之間的序列中(intergenic region), 發現到有能同時調控 *Dlx5* 及 *Dlx6* 基因於小鼠咽弓(branchial arch)處表現的加強子存在(intergenic enhancer)(Park et al., 2004)。由於 *Six1* 和 *Six4* 於小鼠及斑馬魚中皆為相鄰基因且表現型態皆相當類似, 因此可以合理推測此兩個基因可能是受到同一組基因調控因子所調控其於胚胎中的表現型態。故於本篇實驗在斑馬魚 *six1.1* 及 *six4.1* 之間的序列中, 可找到四個存在於物種間的保守序列中的調控因子(UCR1-4), 其調控對象可能不只有 *six1.1*, 可能尚包括鄰近之 *six4.1* (或 *six6.1*) 基因。

於本篇實驗對於斑馬魚 *six1.1* 基因上下游相關保守序列所作的結構體過渡性實驗中, 皆未明顯觀察到在咽弓區域、腦下垂體前葉、嗅囊、頭部間葉細胞以及鰭條肌肉等組織有綠色螢光蛋白的表現, 這可能是由於尚未找到能調控斑馬魚 *six1.1* 基因於這些組織表現的調控因子或是觀察的時間點有所偏差。經由上述可知於演化的過程中, 其調控因子可能會存在於另一套基因, 即為位於斑馬魚第 13 對染色體上的 *six1.2* 基因上下游之相關序列中, 或是位於斑馬魚 *six1.1* 與 *six1.2* 基因下游之重覆片段。

在物種間的保守片段中, 常具有許多轉錄因子結合位存在, 且其可能具有調控基因表現的協同作用存在。例如於前言有提及在斑馬魚 *gbx2* 基因上下游於物種間的保守序列研究中, 共可發現有三個加強子存在這些保守序列之中, 接著作

者更進一步發現於其中一個加強子中具有兩個 *Pax2* 與一個 *Otx2* 轉錄因子的結合位，且這幾個轉錄因子的結合位如果有突變的情形，此加強子便無法調控斑馬魚 *gbx2* 基因在菱腦節(rhombomere)的表現，故可得知此兩個 *Pax2* 及一個 *Otx2* 轉錄因子的結合位之間具有協同作用。

又如另一個例子為在小鼠 *Shh* 基因上下游於物種間的保守序列研究中，共可鑑別出 3 個調控 *Shh* 基因在前腦表現的加強子(enhancer)存在於這些保守序列之中，其中一個調控 *Shh* 於腦部表現的加強子(*Shh*-brain enhancer)中，具有 *Nkx2.1* 轉錄因子的結合位(transcription factor binding site)，且將此轉錄因子結合位進行突變後，可觀察到此加強子對於調控 *Shh* 於腦部表現的能力會有所缺失。由此兩個例子可得知物種間的保守序列中所含有的轉錄因子結合位，會影響保守序列具有的基因調控功能(Islam et al., 2006)。

利用 TRANFAC 軟體(<http://rvista.dcode.org/>)，可得知在斑馬魚 *six1.1* 基因上下游保守序列 UCR1-4 及 DCR 中含有許多轉錄因子的結合位置，包括 *Pax2*、*Pax5*、*Pax7*、*E2F* 以及 *MEF3* 等結合位，因此檢驗這些轉錄因子結合位對於斑馬魚 *six1.1* 基因上下游保守序列 UCR1-4 與 DCR 調控 *six1.1* 於胚胎中的表現有無任何的影響，也是個待釐清的問題之一。

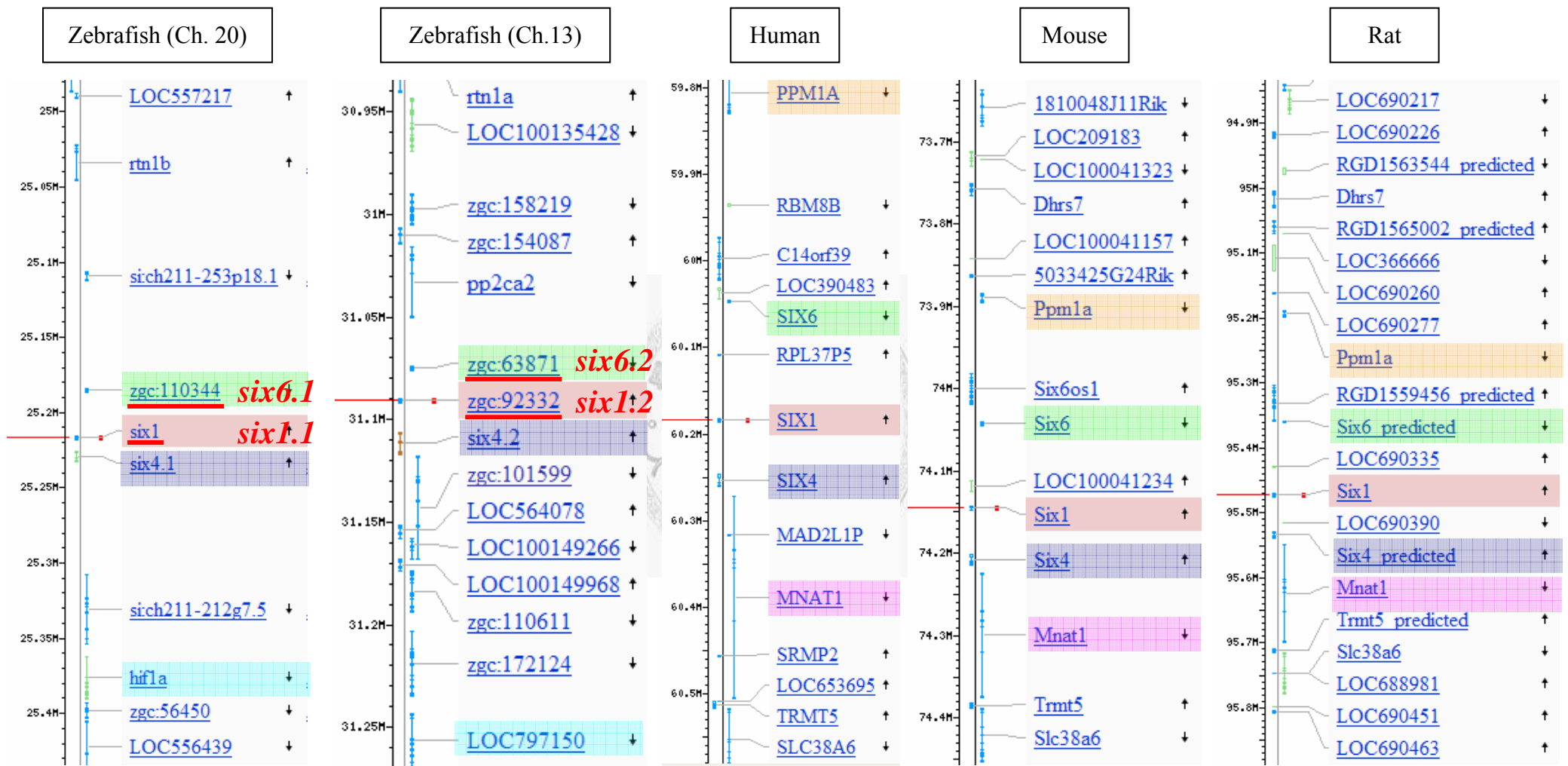
此外，調控同一基因於組織表現之促進子(enhancer)，可能具有重覆性(enhancer redundancy)。例如 *Shh* 分子於樓板(floor plate)的表現會受到兩個調控片段 SFPE1 及 SFPE2 的調控，另有四個調控片段能共同地調控 *Shh* 於腦部的表現(SBE1-4)(見本論文第 35 頁之附圖二十)(Jeong et al., 2006)，由此可知基因於組織專一性的表現，並不會只受到一個調控因子所調控，可能會受到數個以上的調節片段去協同地調控其表現的完整性，且當其中一個調控片段有缺失時，其他調控片段能互相扮演功能性補償(enhancer redundancy)的角色，使調控基因整體之表現不會受到影響。本篇實驗共找到六個能調控斑馬魚 *six1.1* 於體節表現之調控因子，存在斑馬魚 *six1.1* 基因上下游於物種間的保守序列中，分別為 UCR1-4、DCR 以及 *six1.1* 基因近端 130 bp 的範圍內，也由於這些調控片段皆能加強 *six1.1* 於體

節位置表現，故其彼此之間可能也具有功能互相補償(enhancer redundancy)的機制存在。

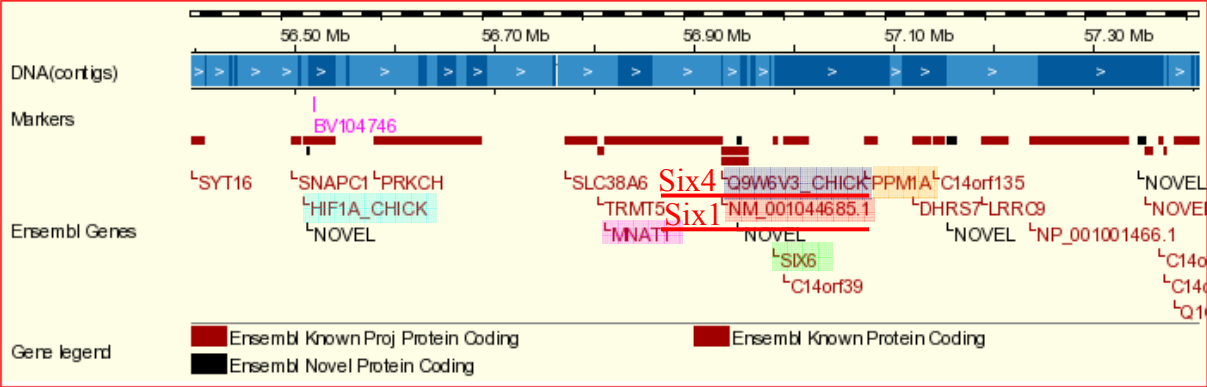
總結本篇實驗的結果可確定斑馬魚 *six1.1* 基因上游 2.6 kb 片段為具功能性之啟動子，其具備驅動斑馬魚 *six1.1* 基因於體節(somite)、耳囊(otic vesicle)以及神經丘(neuromast)等組織表現之功能，而 *six1.1* 基因上下游於物種間的保守序列 UCR1-4 及 DCR，是否具備調控 *six1.1*、*six4.1* (或是 *six6.1*) 基因於組織專一性表現之功能，則尚待進一步研究。如能順利挑選到這些結構體之恆定轉殖品系 (stable transgenic line)，加上過渡性轉殖實驗中的結果，應能幫助釐清其基因調控功能。而之後利用 EMSA 以及定位點突變(site-directed mutagenesis)等實驗方法，判斷保守序列中與特定轉錄因子結合的專一性和影響力，以及順式調控因子 (cis-regulatory element) 更詳細的序列組成，也能更了解斑馬魚 *six1.1* 基因的調控機制及其在各個表現組織正常發育上扮演之角色。



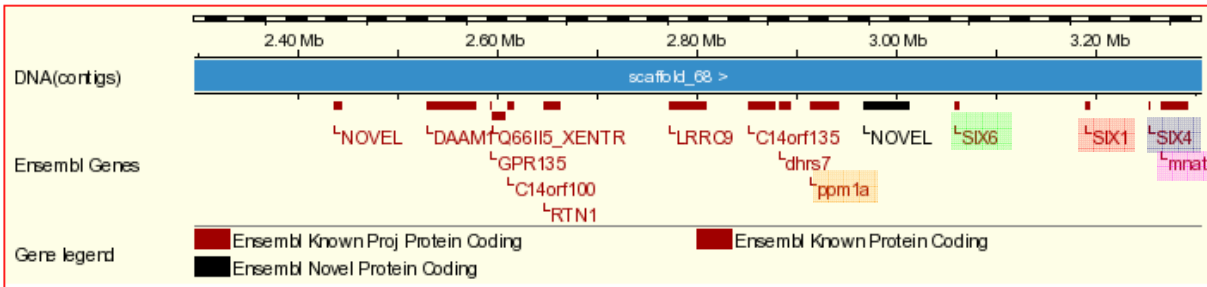
陸、圖表



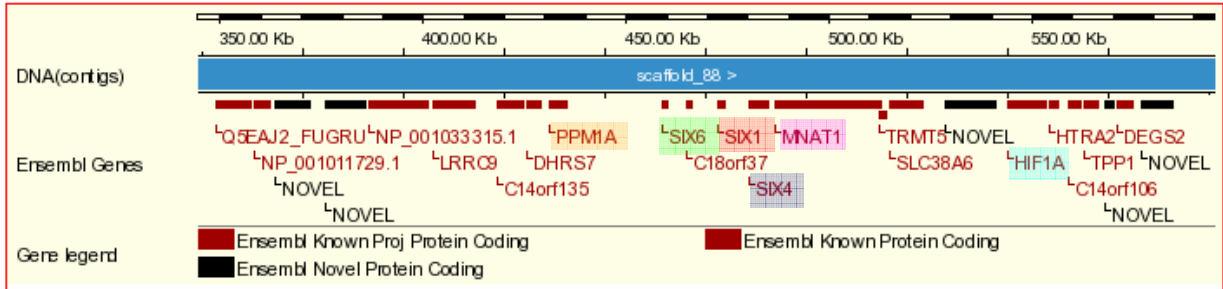
Chick



Xenopus



Fugu



圖一、由 NCBI 及 Ensembl Genome Browser 網頁取得 Six1 基因在斑馬魚、人類、小鼠、大鼠、雞、非洲爪蛙與河豚等各物種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。由圖中可看出各物種 Six1 上下游相鄰基因的相對位置皆非常相似。

A

```

ZFsix6.1      MFQLPILNFSPPQVAGVCETLEESGDIERLGRFLWSLPVAPAAACEVLNRNESVLRARAIV 60
ZFsix6.2      MFQLPILNFSPPQVAGVCETLEESGDVERLGRFLWSLPVAPSACDVLGKNESVLRARAVV 60
HomoSIX6      MFQLPILNFSPPQVAGVCETLEESGDVERLGRFLWSLPVAPAAACEALNKNESVLRARAIV 60
*****:*****:***:*. :*****:*

ZFsix6.1      AFHTGNFRELYHIENHKFTKESHAKLQALWLESHYQAEKLRGRPLGPVDKYRVRKKFP 120
ZFsix6.2      AFHAGNFRELYHIENHKFTKDSHAKLQALWLEAHYQAEKLRGRPLGPVDKYRVRKKFP 120
HomoSIX6      AFHGGNYRELYHIENHKFTKESHAKLQALWLEAHYQAEKLRGRPLGPVDKYRVRKKFP 120
*** **:*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

ZFsix6.1      LPKTIWDGEQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATGLTPTQVGNWFKNRR 180
ZFsix6.2      LPRTIWDGEQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATGLTPTQVGNWFKNRR 180
HomoSIX6      LPRTIWDGEQKTHCFKERTRHLLREWYLQDPYPNPSKKRELAQATGLTPTQVGNWFKNRR 180
**:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

ZFsix6.1      QRDRAAAANKRLQQQVLSNGSVRSLSGE-DGAVDRLGNASSPEASLSSKAAASAITSS 239
ZFsix6.2      QRDRAAAANKRLQQQVLSGGSVRSLSGDD-DTTVDRLGPASSPEVLSLSSKAATSAITSS 239
HomoSIX6      QRDRAAAANKRLQQQVLSQSGSRALRAEGDGTPEVLGVATSPAASLSSKAATSAITSS 240
***** ** *: : : * : * * .*****:*****

ZFsix6.1      DSECDI 245
ZFsix6.2      DSECDI 245
HomoSIX6      DSECDI 246
*****

```

B



```

HomoSix1      MSMLPSFGFTQEQQVACVCEVLQQGGNLERLGRFLWSLPACDHLHKNESVLKAKAVVAFHR 60
ZF20Six1      MSMLPSFGFTQEQQVACVCEVLQQGGNLERLGRFLWSLPACDHLHKNESVLKAKAVVAFHR 60
ZF13zgc92332 MSILPSFGFTQEQQVACVCEVLQQGGNLERLGRFLWSLPACDHLHKNESVLKAKAVVAFHR 60
**:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

HomoSix1      GNFRELYKILESHQFSPHNHPKLQQLWLKHAHYVEAEKLRGRPLGAVGKYRVRKRFPLPRT 120
ZF20Six1      GNFRELYKILESHQFSPHNHPKLQQLWLKHAHYIEAEKLRGRPLGAVGKYRVRKRFPLPRT 120
ZF13zgc92332 GNFRELYKILESYPFSTHNHPKMQQLWLKHAHYVEAEKLRGRPLGAVGKYRVRKRFPLPRT 120
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

HomoSix1      IWDGEETSYCFKEKSRGVLREWYAHNPYPSPREKRELAEATGLTTTQVSNWFKNRRQRDR 180
ZF20Six1      IWDGEETSYCFKEKSRGVLREWYTHNPYPSPREKRELAEATGLTTTQVSNWFKNRRQRDR 180
ZF13zgc92332 IWDGEETSYCFKEKSRVLEWYTHNPYPSPREKRELAEATGLTTTQVSNWFKNRRQRDR 180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

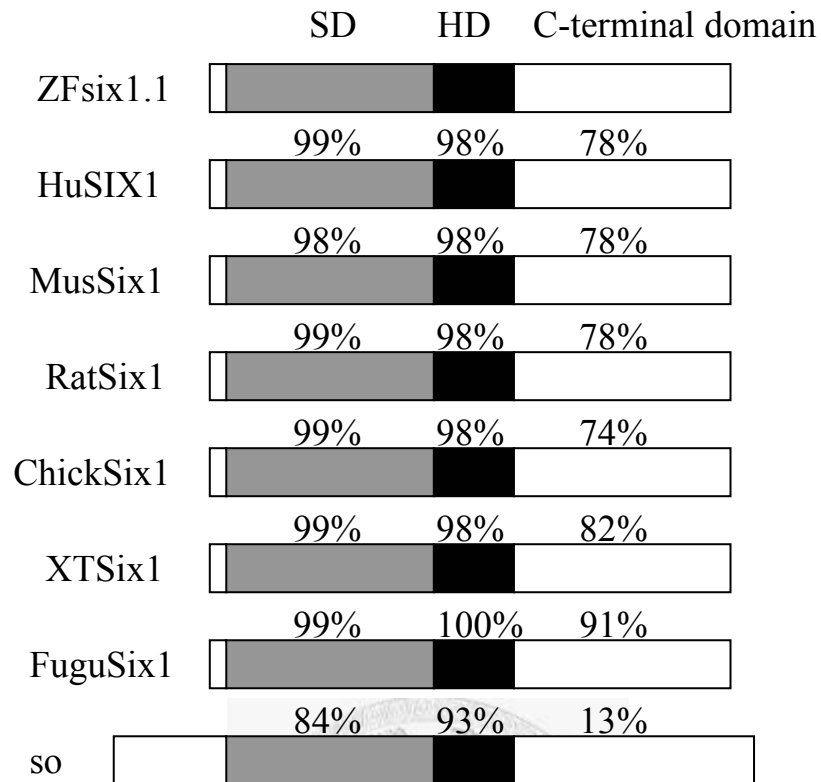
HomoSix1      AEAKEKRENTENNSSSNKQNQLSPLGGKPLMSSSEEEFSPQSPDQNSVLLQGNMNGH 240
ZF20Six1      AEAKEKRENTENNNTGANKQNQLSPLDGGKSLMSSSEDEFSPQSPDQNSVLLQGNMNSH 240
ZF13zgc92332 AEAKEKRENTENNNGVGG-KQSQRSPLDGVKSLMSSSEDEFSPQSPHSSVLLQGTMINN 239
***** ** . . *.* **:* *.*****:*****:..*****.*:

HomoSix1      ARSSNYSLPGLTASQPSHGLQTHQHLQDLSLLGPLTSSLVDLGS 284
ZF20Six1      PGASAYSMTGLGAAQSVHGMQGHPHQLQDLSLLGPLTSSLVDLGS 284
ZF13zgc92332 PGAPAYPMPGLGAPHPLHGMQGHPHQIQDLSLLGSLTSSLVDLGS 283
. . . *..** *.. **:* * **:******:*****:*****:*****

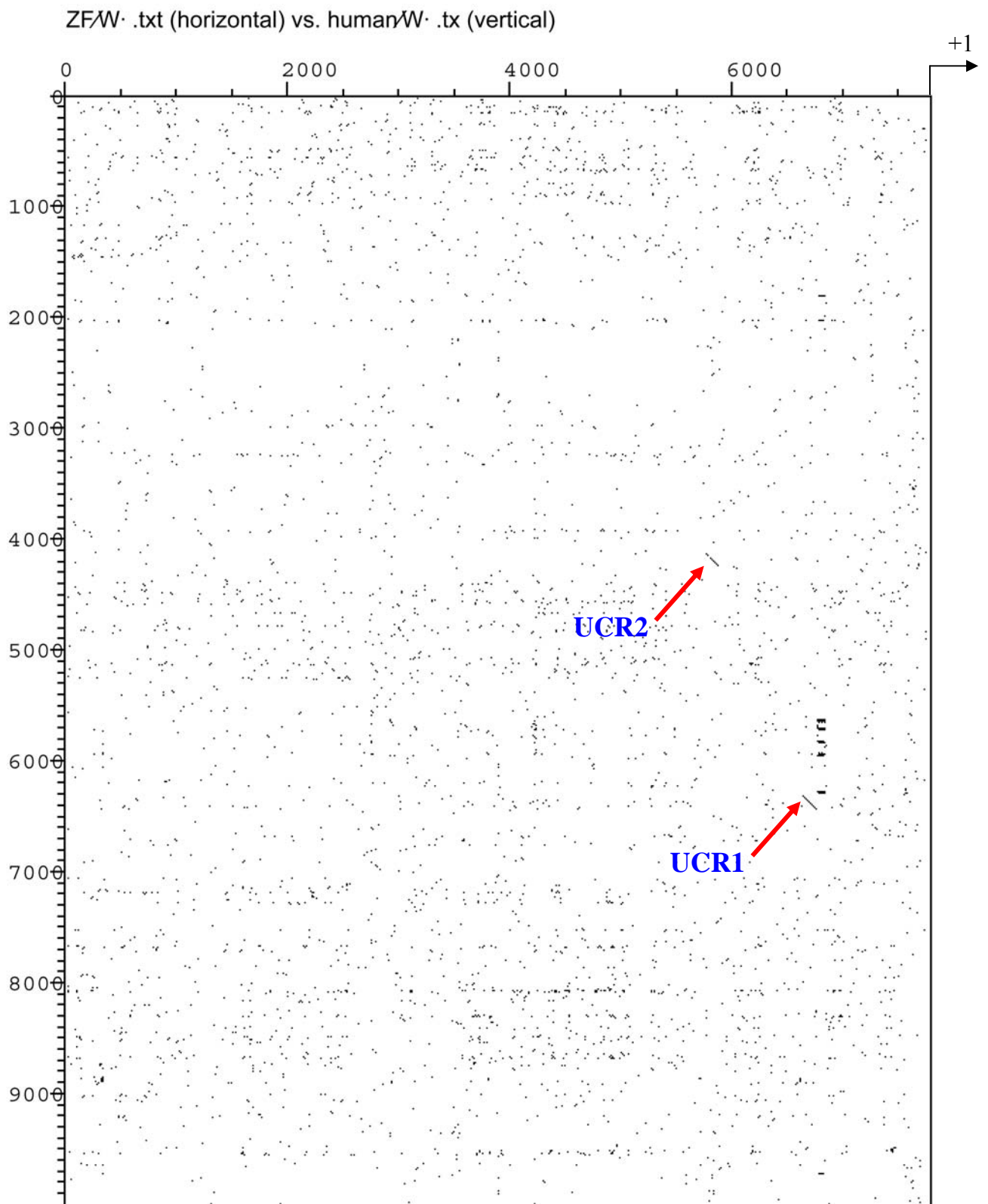
```

圖二、(圖 A)利用 ClustalW 網頁分析比對斑馬魚 *six1.1* 下游鄰近基因 *six6.1*

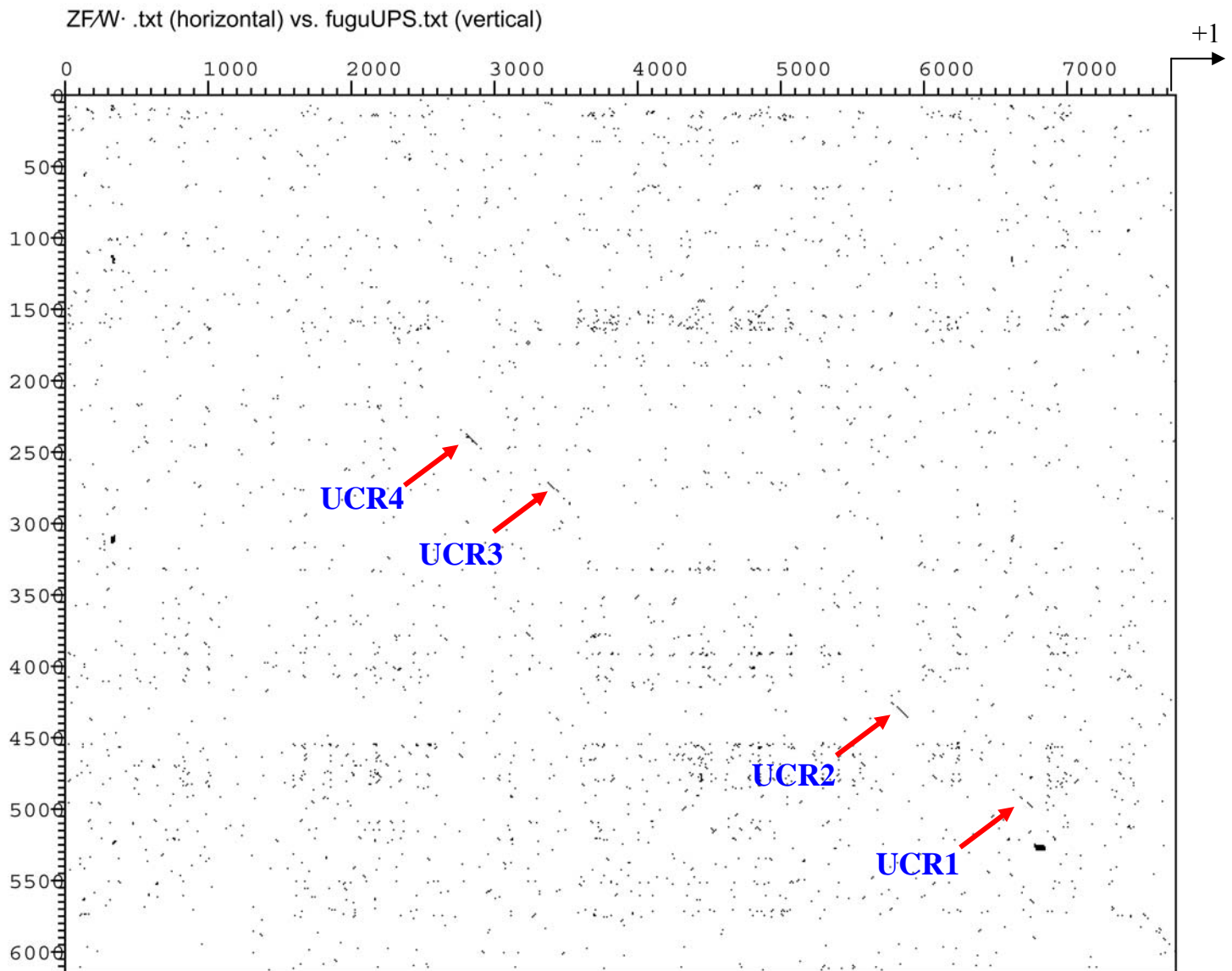
(ZFsix6.1)及斑馬魚 *six1.2* 下游鄰近基因 *six6.2* (ZFsix6.2)與人類 *SIX6* 基因胺基酸序列之比較，可得知其胺基酸序列之間具有很高的相似性。(圖 B) 斑馬魚 *six1.1* (ZF20Six1)、*six1.2* (ZF13zgc92332)與人類 *SIX1* 基因胺基酸序列之比較，可見到其胺基酸序列之間相當相似。



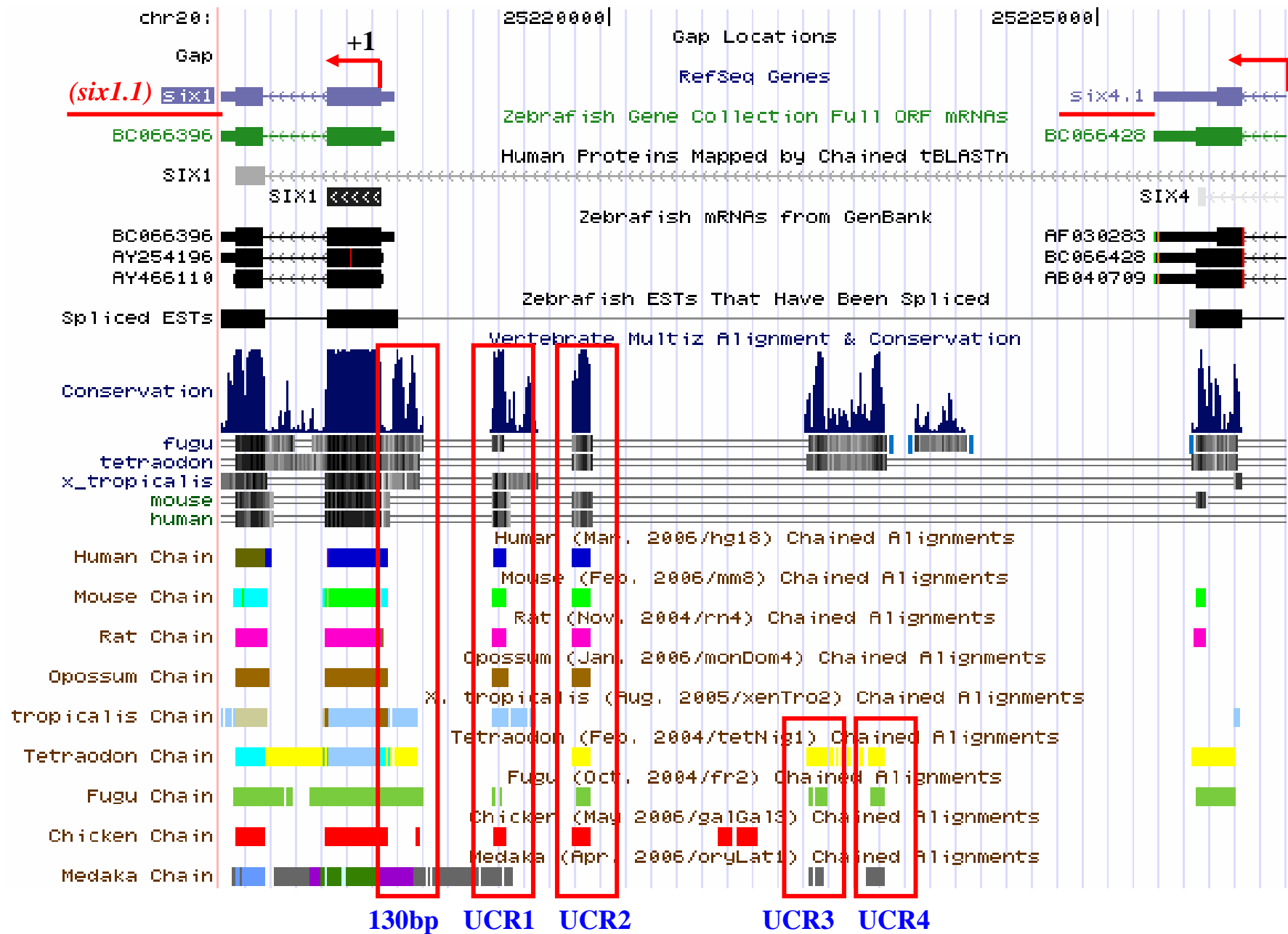
圖三、利用 ClustalW 序列比對網頁分析斑馬魚 *six1.1* 基因與人類(HuSIX1)、小鼠(MusSix1)、大鼠(RatSix1)、雞(ChickSix1)、非洲爪蛙(XTSix1)、河豚(FuguSix1)以及果蠅(so)等物種 Six1 基因胺基酸序列之保守性。與斑馬魚 *six1.1* 基因比較，可見其他物種 Six1 基因的 SD (灰色方塊)、HD (黑色方塊)以及 C-terminal domain 胺基酸序列的同源性(homologies，以百分比表示)與斑馬魚 *six1.1* 基因皆非常相似。



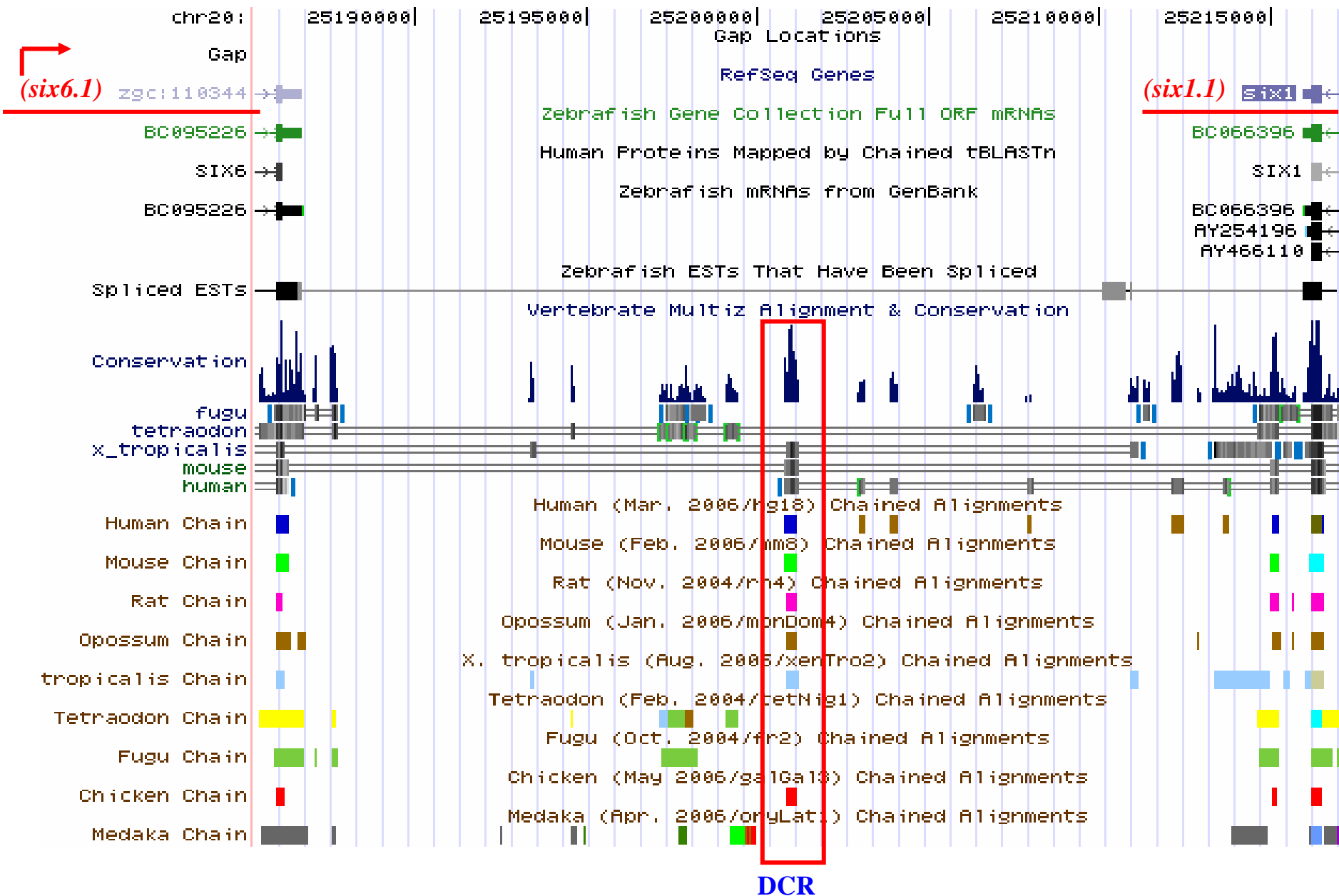
圖四、利用 Dot Matrix 軟體比對斑馬魚 *six1.1* 基因(橫軸)與人類 *SIX1* 基因(縱軸)上游序列，可找到兩段保守序列，分別為 UCR1 及 UCR2。



圖五、利用 Dot Matrix 軟體比對斑馬魚 *six1.1* 基因(橫軸)與河豚 *six1* 基因(縱軸)上游序列。可見到除了 UCR1 及 UCR2 外，尚可找到 UCR3 及 UCR4 兩段保守序列。



圖六、利用 UCSC 網頁比對各物種 *Six1* 基因及其上游基因體序列保守程度之結果。紅框標示出各物種 *Six1* 基因上游之保守區段。



圖七、利用 UCSC 網頁比對各物種 *Six1* 基因下游基因體序列保守程度之結果。紅框標示出各物種 *Six1* 基因下游之保守區段。

(C) UCR3

```
FuguUCR3          CCCGCTGACCTCTGACCTCTCATTAGTG--GGACGCAGAGCACTGGAGTACCCTGCTCCC 58
TetraodonUCR3    CGCGCTGACCTCTGCACTCTCATTAGTG--GGATGCAGAGCAGTGGCGTAGCAITGCTCCC 58
MedakaUCR3       CCCACTGACCCCTGCCCTCTCATTAGTG--GGACGTAGAGTGGTGGAGTACCATAGTCCT 58
ZFUCR3           CCTGTTGCCCTTGACCTCACATTAGCA--CAGTGTATAGTGTGTGGTGCAGTGGGCAC 58
                  *   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FuguUCR3          CA-GGTCAIGTTACATATGGCTTGCAGTCTGCTGCGCCGCATTAAATGTCA-GCTTTGAA 116
TetraodonUCR3    CA-GGTCAIGTTACATATGGCTTGCAGTCTGCTGCGCCCAITAAATGTCA-GCTTTGAA 116
MedakaUCR3       CA-GGTCAIGTTACATATGGCTTGCAGTCTGCTGCGCCTTATTAATGTCA-GCTCTGAA 116
ZFUCR3           AAGGGTCCGGTTACACGTACTTCACAGTCTGCTGTGCTTCACTAAATGTCACACTTTGAA 118
                  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
FuguUCR3          ACCATAAGAAAGA-TCAGAGGTCAGTG-TTTTTAATAAGGCCAGAGTTCGGGAGACTTC 174
TetraodonUCR3    ACCATAAGAAAGA-TCAGAGGTCAGTGTTTTTAATAAGGCCGGCGTTCGGGAGACATC 175
MedakaUCR3       ACCATTTGAAAAA-ACAGAGGTCAGTG-TTTTTAATAA----- 152
ZFUCR3           ACCTCCAGAAAAAGTCAGGGGTCAGTT-TCITTAATAAGCCCA--CTTCTGCAGGGTTC 175
                  ***   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

(D) UCR4

```
MedakaUCR4        TTG-TTCTGGG-CTCCAACAAGCTGTTTTACCCTCTTCAATATTACAGGAG---TTAC 55
TetraodonUCR4    TTG-TTCTGAG-CTCTAACAAAGCTGTTTTACCCTCTTTAATATTACAGGAGGAGTAC 58
FuguUCR4         TTG-TTCTGGG-CTCTAACAAAGCTGTTTTACCCTCTTCAATATTACAGGAGGAGTTAC 58
ZFUCR4           TTGCTTAAAGG-CCCAGACAATAGCGCTTTTCTACCCTACAGTATTCAGGAGGCGCCAT 59
                  *** **   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MedakaUCR4        CCGATACCTAACAAATCAGCTAATCCACTACCCATGGCGACGAGGTACCTGTGCTCAGGT 115
TetraodonUCR4    CCGATACCTAACAAATCAGCTAATCCACTGCCCATGGCGACGAGGTACCTATGCACAGGT 118
FuguUCR4         CCGATACCAACAATCAGCTAATCCACTGCCCATGGCGACGAGGTACCTATGCACAGGT 118
ZFUCR4           CTGATACCTG-CAATCAGCTAATCTGGTGCCCTAGGCGACAGGGTCACCTTTGGGCAGGT 118
                  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MedakaUCR4        AACTTTATCCAGGTTCCCTCTCCTTCTGCTAGTCCGTGCCATTTTCT 163
TetraodonUCR4    AA-----CTCTATCCCGGCAGCTCGCCTCTCCCTTCCTTT 153
FuguUCR4         AA-----CTTTATCCAGTAGCTTGCTTCTCCCTTCCTTT 153
ZFUCR4           AACATA----GATTCCTTACCAGTGTGCTTTTTTCTCTCCTTCCTTT 162
                  **   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

(E) DCR

```

HuDCR      -TCCGCTTTCCCTCCATC----AACTCCAAGCCGAATTCAATCCGAGAAGGCTCCTTTGA 55
MusDCR     TCCGCTTTCCCTCCATC----AACTCCAGGCCGAATTCAATCCGAGAGGGCTCCTTTGA 56
OpossumDCR CTCCGCTTTCCCTCCATCAACTAACTTCAGGCTGAATTCAATCCGAGAAGGCTCCTTTGA 60
XTDCR     CTCTAATTTCCCTCCATC----ATTTCTGGCCTGAATTAATCCGAGTTGGTTCCCTTTGA 56
ZFDCR     CTCACCTTTCCCTCCATC----ATCTGTTAGGTGAACAGTATCCGCCGGGGT----TGTGA 53
          * ***** * * *** ** * * *

HuDCR      GCTTTTGTGTTTGTCTGGG--GGAGATGTGGGCGCAGGAGGGATCGCGTTAC-AACTTTCA 112
MusDCR     GCTTTTGTGTTTGTCTGGG--GGAGATGTGGGCGCAGGACGGATCGCGTTAC-AACTTTCA 113
OpossumDCR GCTTTTGTGCTGGCCGGG--GGAGATGTGGGCGCAGGAGGGATCGCATTAC-AACTTTCA 117
XTDCR     GCCTTTGTGCTTACTGGG--GGAGATGTGGCGCAAAA--GGATCGCATTAC-AACTTTCA 112
ZFDCR     GCCTCTTTTGTCCCAGAGCAGGAGATGTTGGCGCAGCC--AGATCATGTTTCAAACITTTCA 112
          ** * * * * * * * * ***** ***** **** * * * *****

HuDCR      TTTCTGAAATGTTTGAGGGAACATCCAGGGTTTTTATC--CCCACATCAGGCCGGGCGA 170
MusDCR     TTTCTGAAATGTTTGAGGGAACATCCAGGGTTTTTATC--CCCACATCAGGCCCGGCGG 171
OpossumDCR TTTCTGAAATGTTTGAGGGAACATCCAGGGTTTTTATC--CCCTCATCAGACCGAGCGT 175
XTDCR     TTTCTGAAATGTTTGAGGGAACATCCAGGG-TTTTATC--CGCACATCAGGCCAAAGTTG 169
ZFDCR     TTTCTGAAATGTTTGAGGGAACATCCAGGG-TTTTATCAGTGCCTGTACTGAGCAA 171
          ***** * * * * *

HuDCR      TGGG-----CTCGAGTTTCAGGCCTTGTCTACTCAGCTGTCACC-A 209
MusDCR     TGGG-----CTCGTGTTCAGGCTTGTCTACTCAGCTGTCACC-A 210
OpossumDCR CGAG-----CTCAGGTTTCAGGCCTTGTCTACTCAGCTGTCACC-A 214
XTDCR     CGAG-----CTCAGGTTTCAGGCTTGTCTACTCAGCTGTCACCAA 209
ZFDCR     AGGGAGGGGAAGAGGGGAAGGATCTCGAGTTACCTGGCTAGTCACTTAGCCATCAAT-G 230
          * * *** ** * * * * * * * * * * * * *

HuDCR      AACAAACGAAGCTCTC----- 225
MusDCR     AACAAACGAGGCTCTC----- 226
OpossumDCR AACAAACGAACCTCT-----CAGAGCCCGGGAGG 243
XTDCR     AACAAATGAGCCTCTCAGAGA-TGGAG----- 235
ZFDCR     AACAAACGACTCTCTCTTTGAGCAGAGATCGCGGGG 266
          ***** * * ****

```

(F) 130bp

```

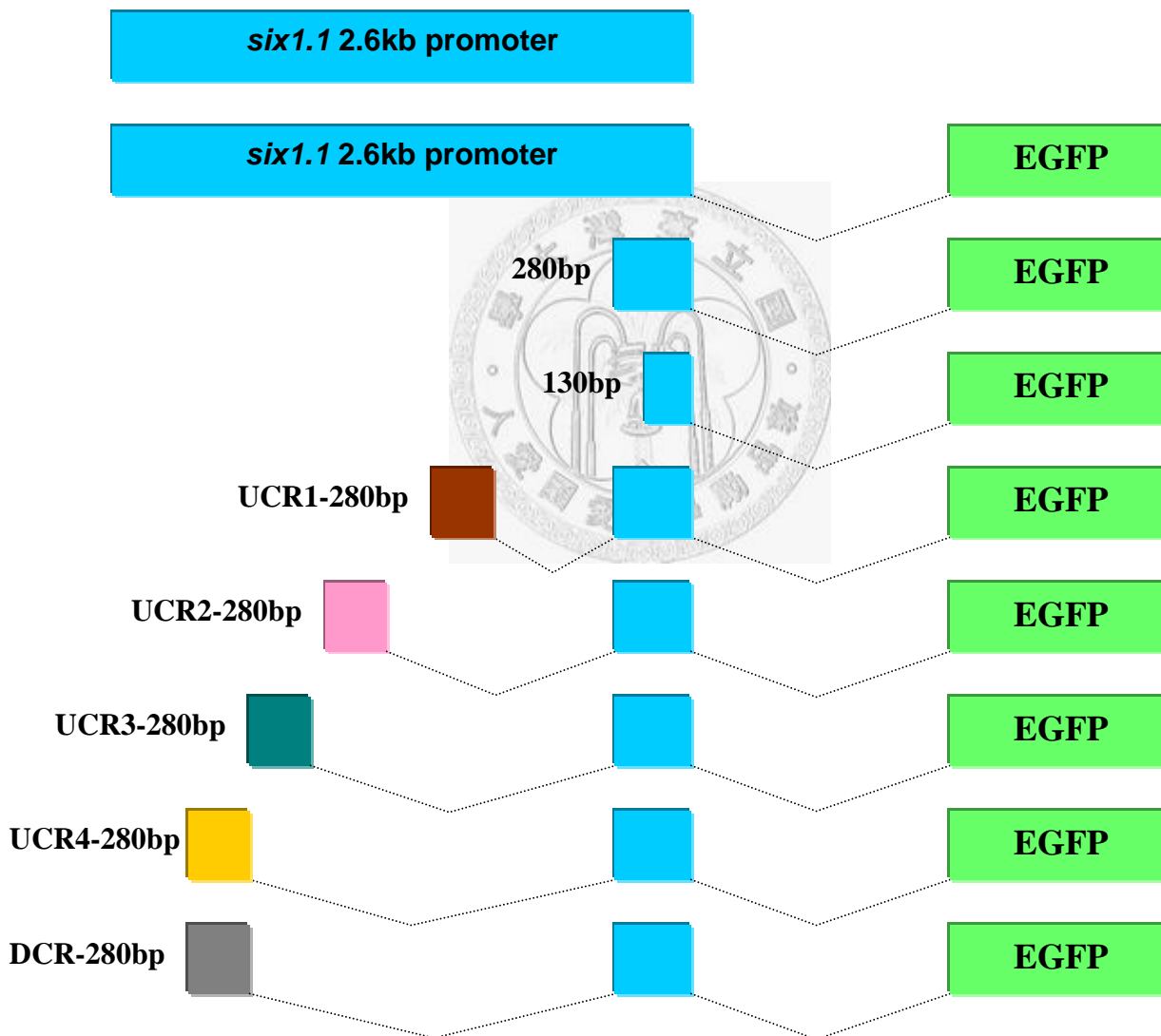
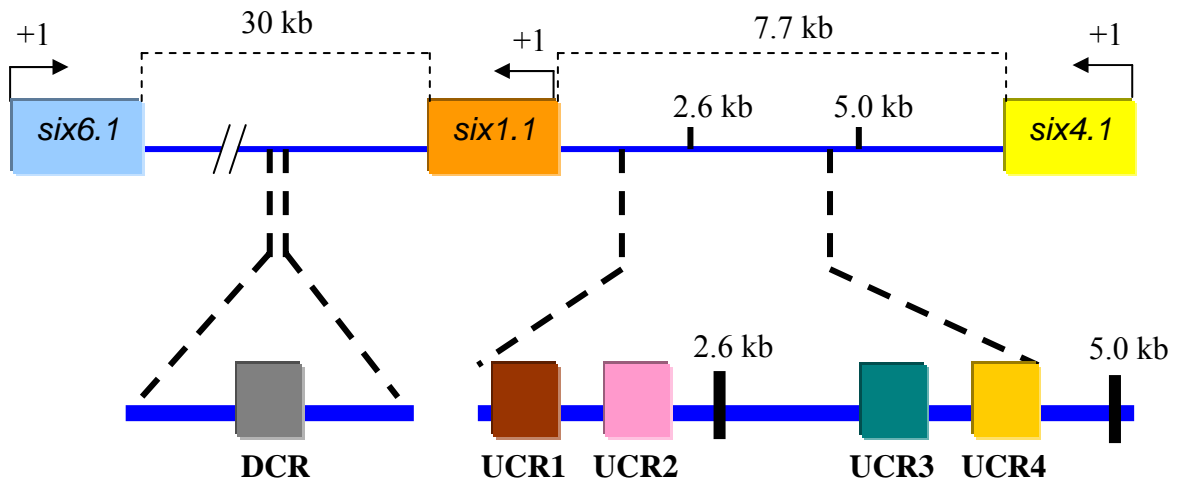
Fugu130bp  --AGTTTTGGGATGTTGATTGTTGG-GACAA-ITTTGTTT-CTGTTGGAGATA--TGTGAG 53
Tetraodon130bp --AGATTTGGGATGTTGATTGTTGG-GACAA-ITTTGTTT-CTGTTGCAGATA--TGTGAG 53
ZF130bp    GAAGTTTTGGG----TGATTGTTGGAGACAG-ITTTGTTT-CTGTTGCAGATA--TGTGAG 52
XT130bp    --AGCCCGGAG-----CTGG-AACAACITTTGTTT-CTCTCC-AGTTAGTGTGCTC 45
          ** * * *** ** * * * * * * * * * *

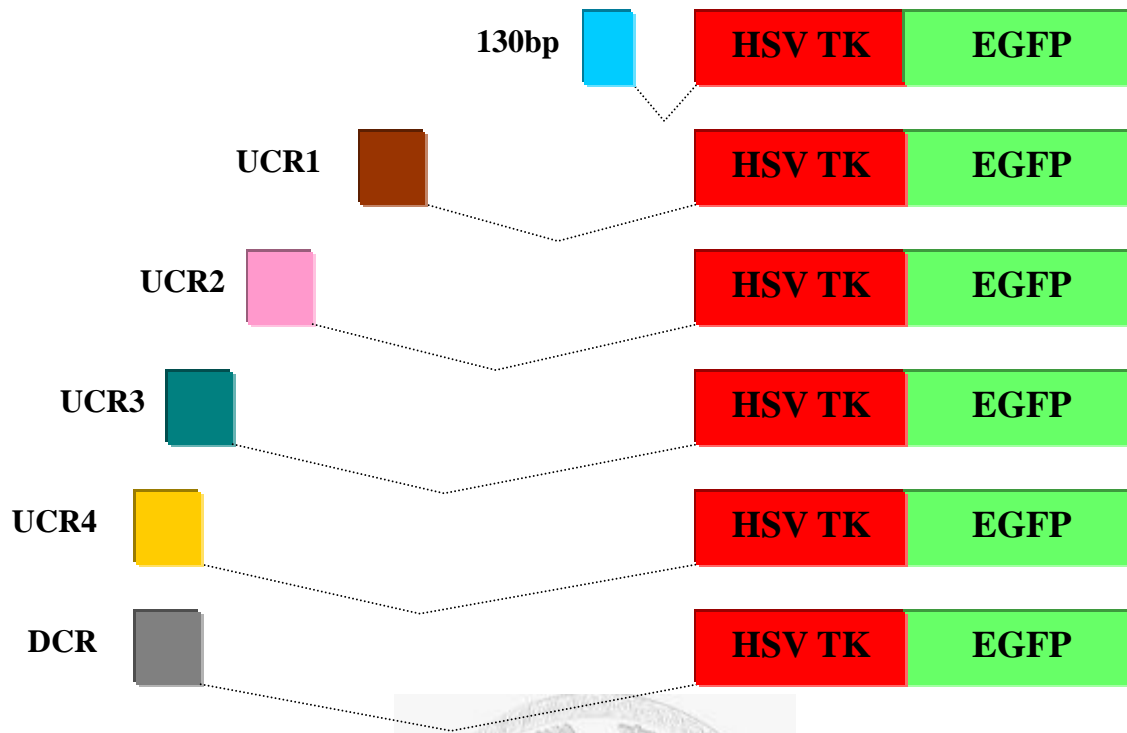
Fugu130bp  GCTTAAAGGGA-----GGCTGTGCGTTTCGGTGTGTTGGCTCTCCCT-----CTGCC 100
Tetraodon130bp GCTTAAAGGGA-----GGCTGTGCGCTCGGTGTGTTGGCTCTCCCT-----CTGCC 100
ZF130bp    GCTAAAAGAG-----TACTGCGGACT-GCTGATTGGCTCTCCAG-----TTGCC 97
XT130bp    -CTTAAAGCTCCCAITGGCTGCGGC---ACTGATTGGCTGCGCTGCGGGGGCTGGATA 101
          ** **** *** ** ***** * *

Fugu130bp  TGCACCGTG-----TAGAGGAGAGCAGGACTGAGTTTGCAG---CTCCGTTTCTC 148
Tetraodon130bp CGTCCGTG-----GACAGGAGAGCAGGACTGAGTTTGCAG---CTCCGTTTCTC 148
ZF130bp    TATCCCGAG-----CAGCAGTGCAGAGGAGCTCTGC-----TTCCATTTCTC 141
XT130bp    TGCACAGAGAGCTGCACAGGCTGGAGGGTGGGGAGGGCACAGGGGTGATGTGCTGCTC 161
          * * * * * * * *

```

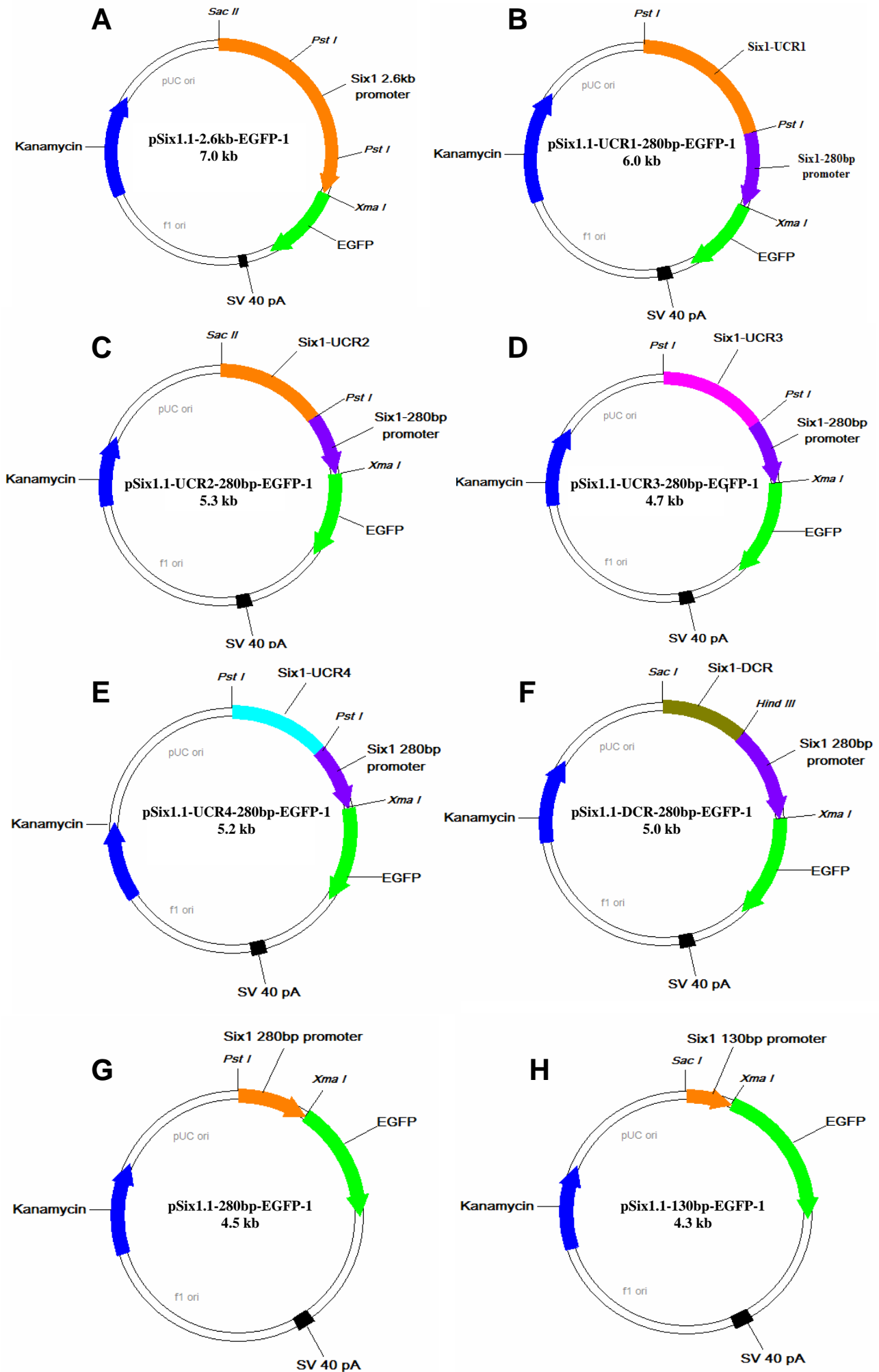
圖八、利用 ClustalW 網頁比對各物種 Six1 基因上下游相關保守序列。共包括上游保守序列 UCR1 (圖 A)、UCR2 (圖 B)、UCR3 (圖 C)以及 UCR4 (圖 D)，下游保守序列 DCR (圖 E)以及 Six1 基因近端 130 bp 之範圍(圖 F，為 complementary strand DNA)

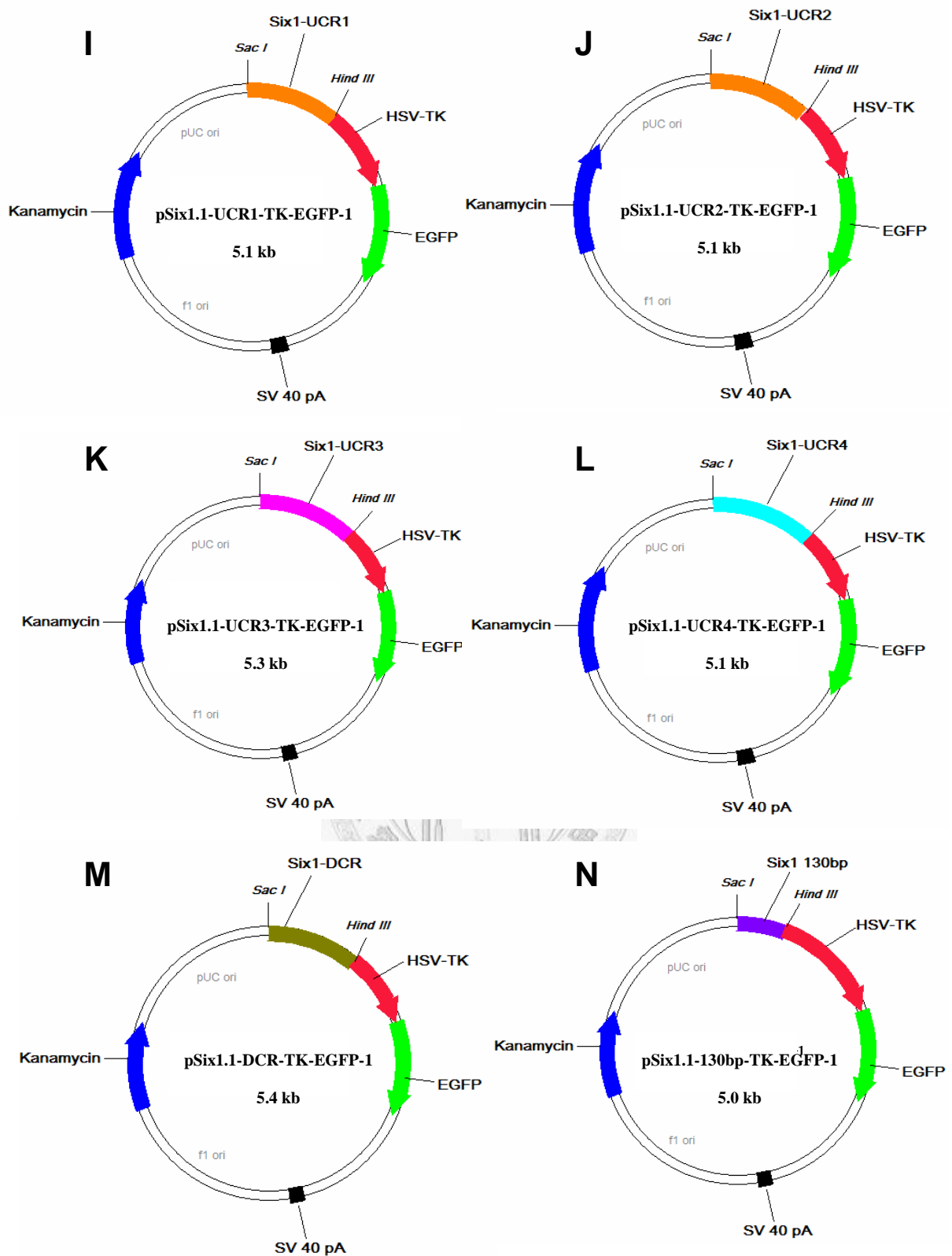




圖九、斑馬魚 *six1.1* 基因上下游於物種間保守序列及其構築成結構體之示意圖。

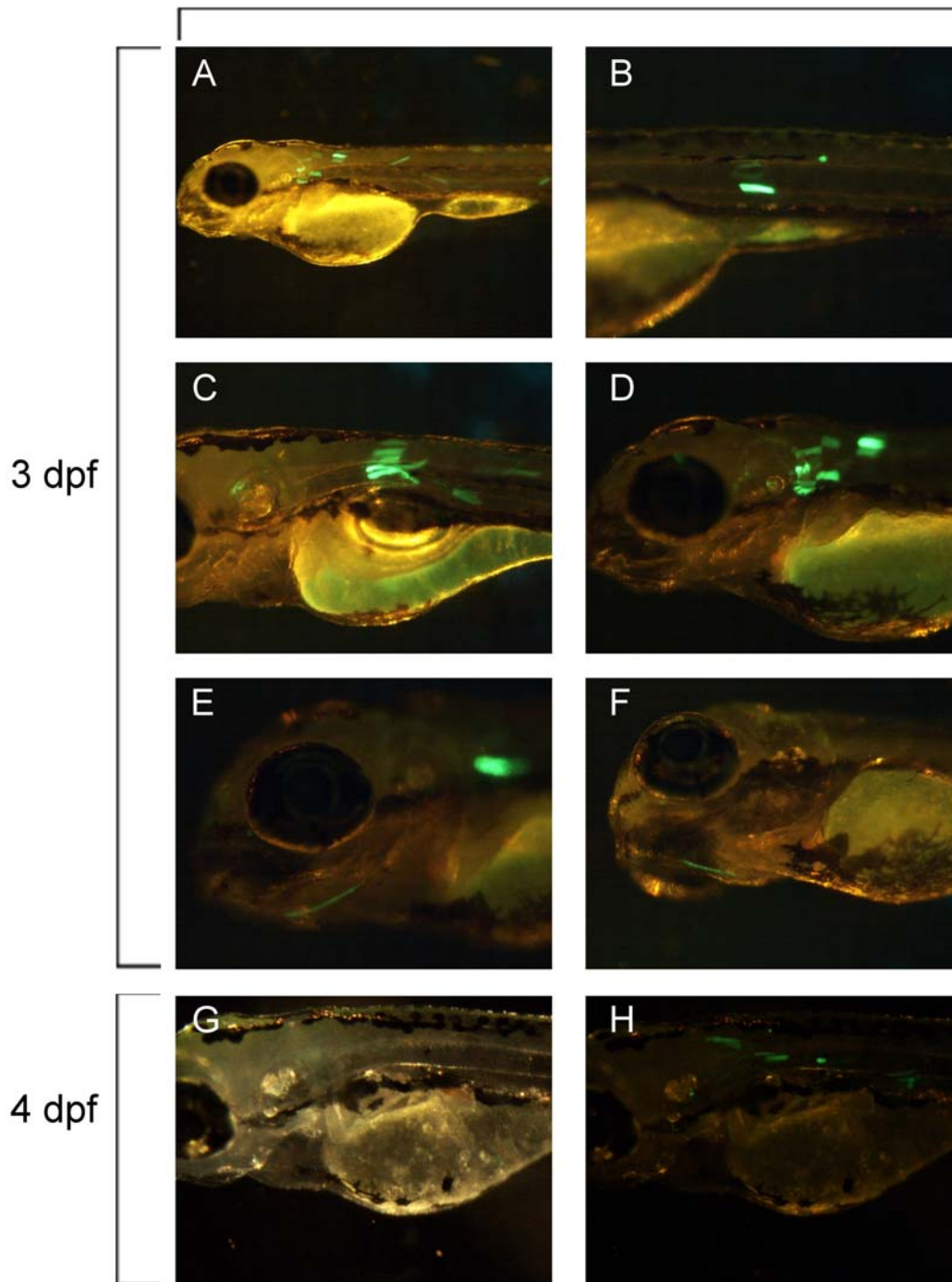






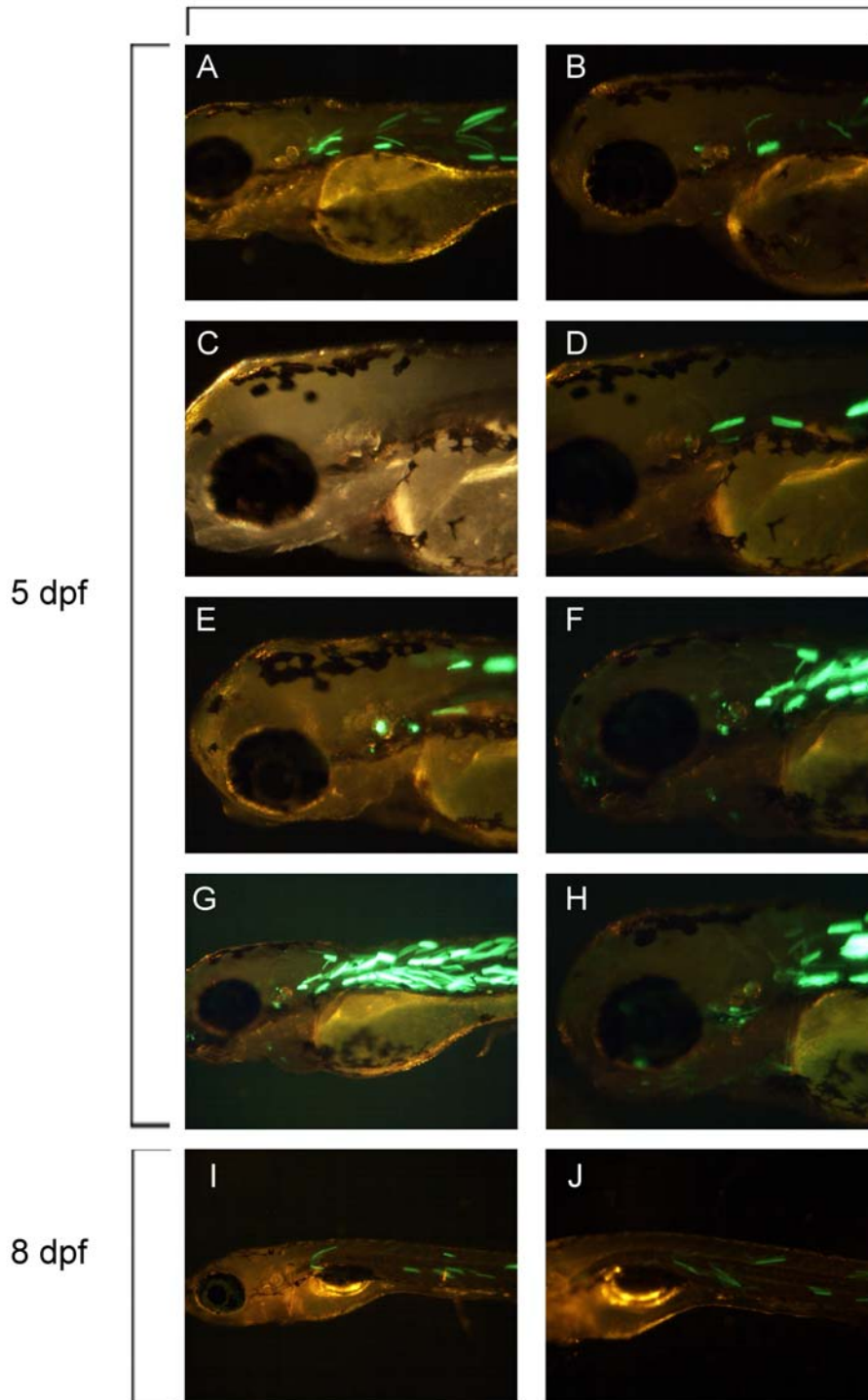
圖十、本篇實驗所構築之結構體，圖 A-H 分別將斑馬魚 *six1.1* 基因啟動子及上下游於物種間之保守序列鍵結至 pEGFP-1 載體。圖 I-N 則將斑馬魚 *six1.1* 基因上下游保守序列鍵結至具有 HSV TK 基礎啟動子之 pEGFP-1 載體。

pSix1.1-2.6kb-EGFP-1
transient zebrafish



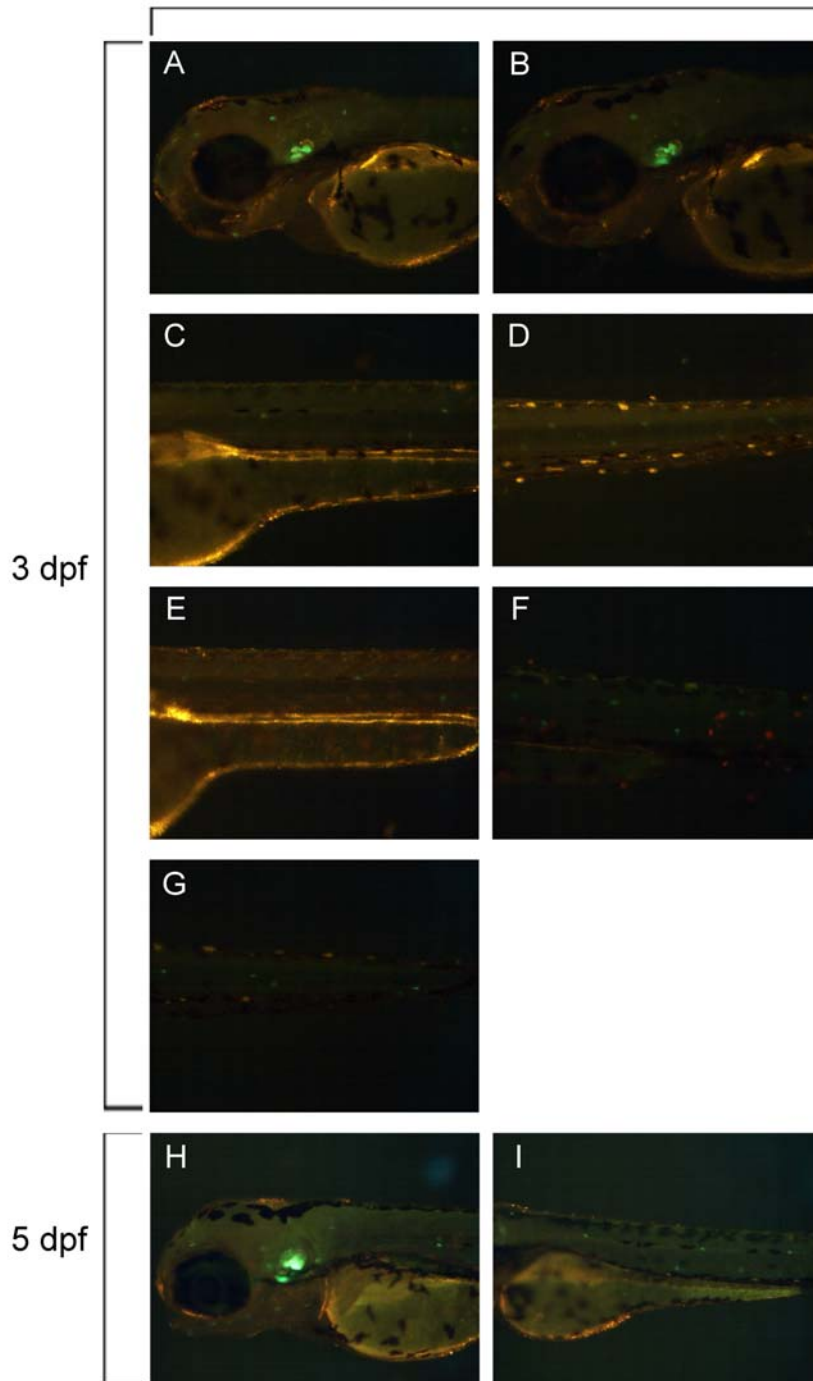
圖十一、斑馬魚 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。胚胎發育 3 天後，可見綠色螢光表現在體節(圖 A-D)、耳囊(圖 C、D)以及咽弓區域(圖 E、F)等組織位置。胚胎發育 4 天後，仍可見於體節處有綠色螢光蛋白表現(圖 G、H)。

pSix1.1-2.6kb-EGFP-1
transient zebrafish



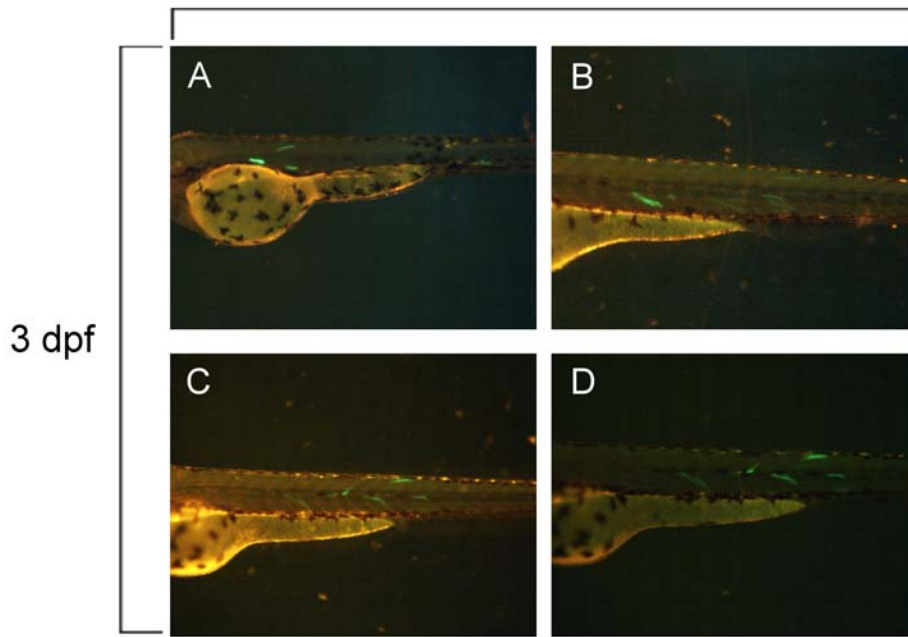
圖十二、斑馬魚 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。胚胎發育 5 天後，可見綠色螢光表現在體節(圖 A-D)、耳囊(圖 B 以及圖 D-H)、頭部神經丘(neuromast, 圖 F-H)以及咽弓區域(圖 H)等組織位置。胚胎發育 8 天後，仍可見於體節處有綠色螢光蛋白表現(圖 I、J)。

pSix1.1-2.6kb-EGFP-1
stable transgenic zebrafish line No.5



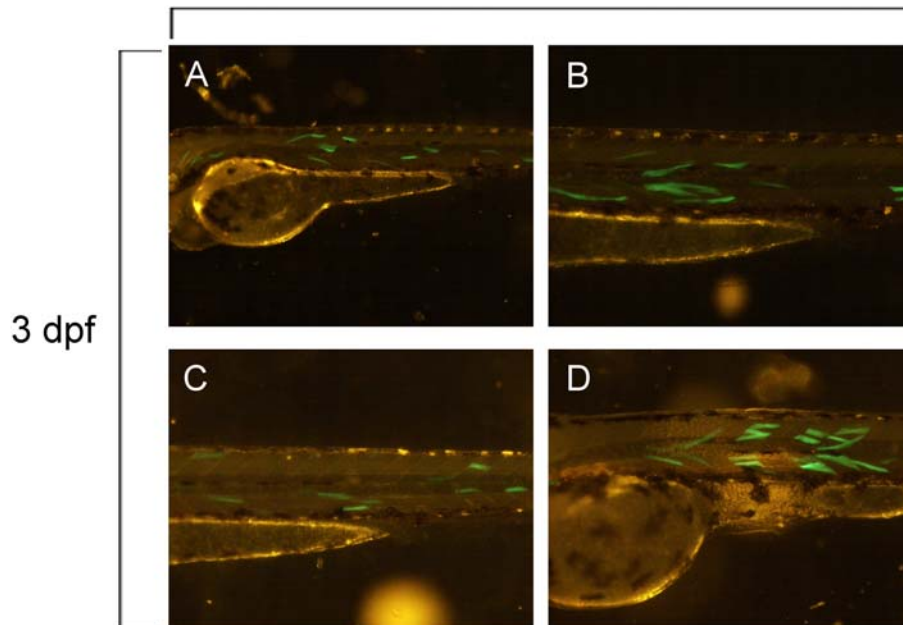
圖十三、斑馬魚 pSix1.1-2.6kb-EGFP-1 結構體轉殖恆定品系 No.5 F2 子代之綠色螢光蛋白表現情形。於發育 3 天後，可在耳囊腹部(ventral otic vesicle)(圖 A、B)與分佈於頭部神經丘(圖 A、B)及體表神經丘(圖 C-G)等組織位置觀察到綠色螢光表現。於發育 5 天後，同樣可在耳囊腹部與會分佈於頭部及體表之神經丘觀察到綠色螢光表現(圖 H、I)。

pSix1.1-280bp-EGFP-1
transient zebrafish



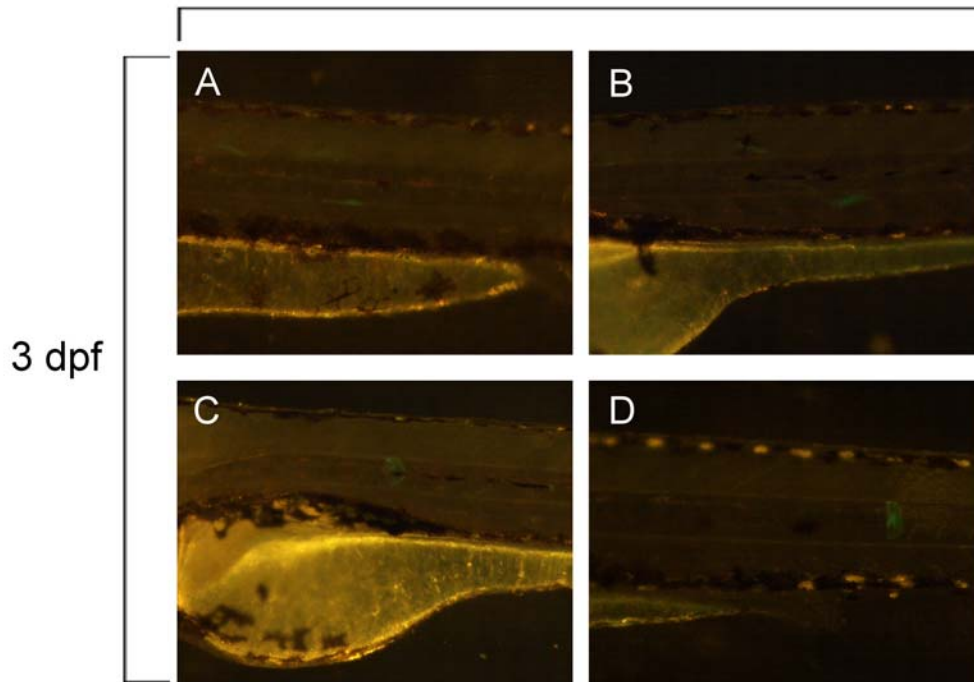
圖十四、斑馬魚 pSix1.1-280bp-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3 天後，可見到綠色螢光蛋白只表現在體節位置(圖 A-D)。

pSix1.1-130bp-EGFP-1
transient zebrafish



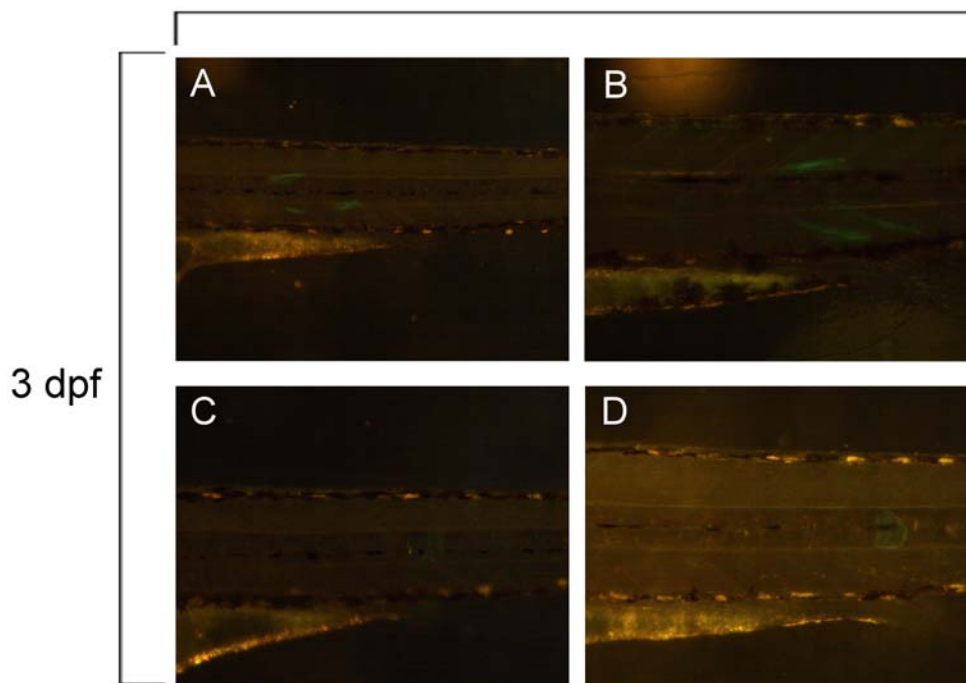
圖十五、斑馬魚 pSix1.1-130bp-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3 天後，可見到綠色螢光蛋白只表現在體節位置(圖 A-D)。

pSix1.1-130bp-TK-EGFP-1
transient zebrafish



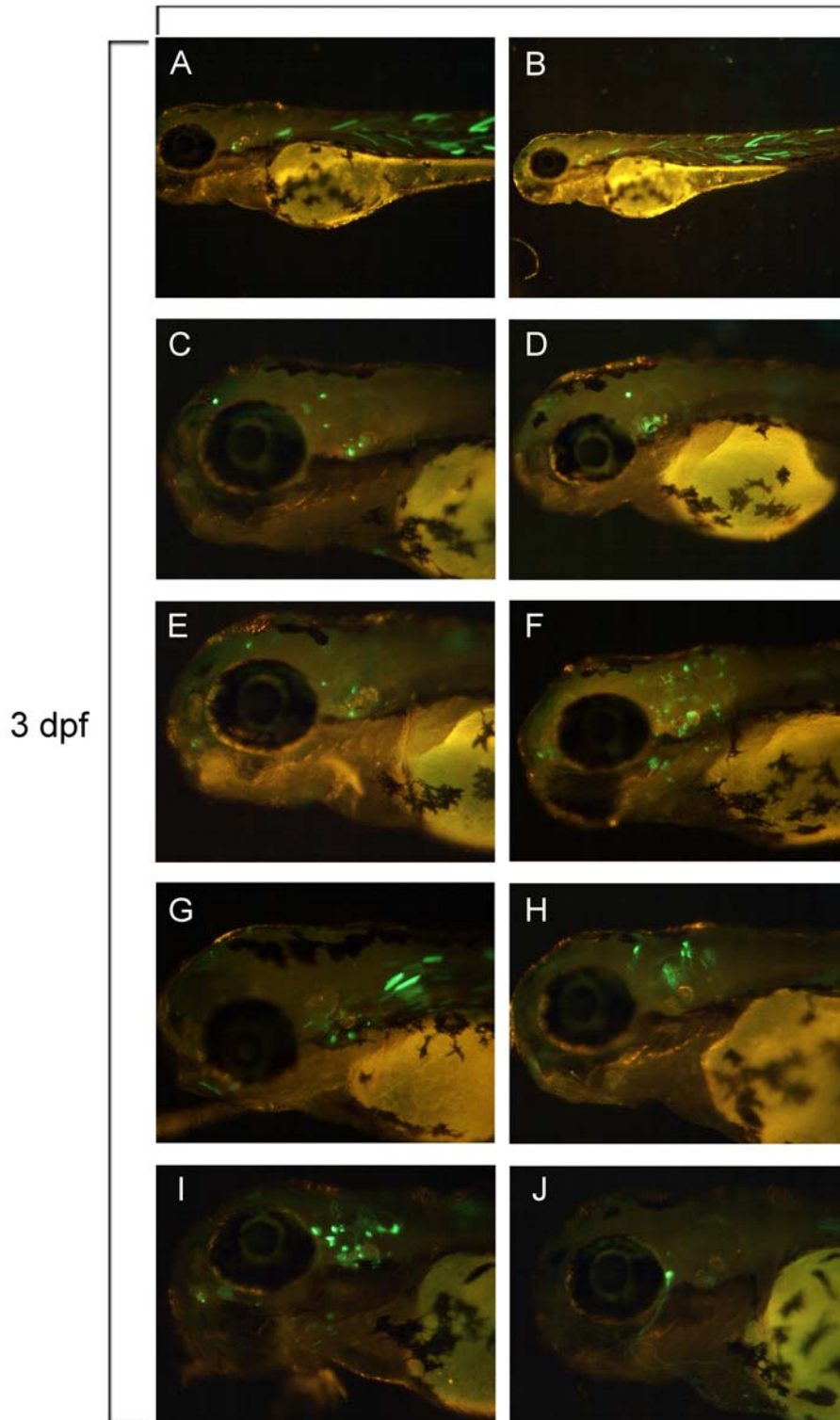
圖十六、斑馬魚 pSix1.1-130bp-TK-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 A、B)及脊索(圖 C、D)等組織位置。

HSV TK-EGFP-1
transient zebrafish



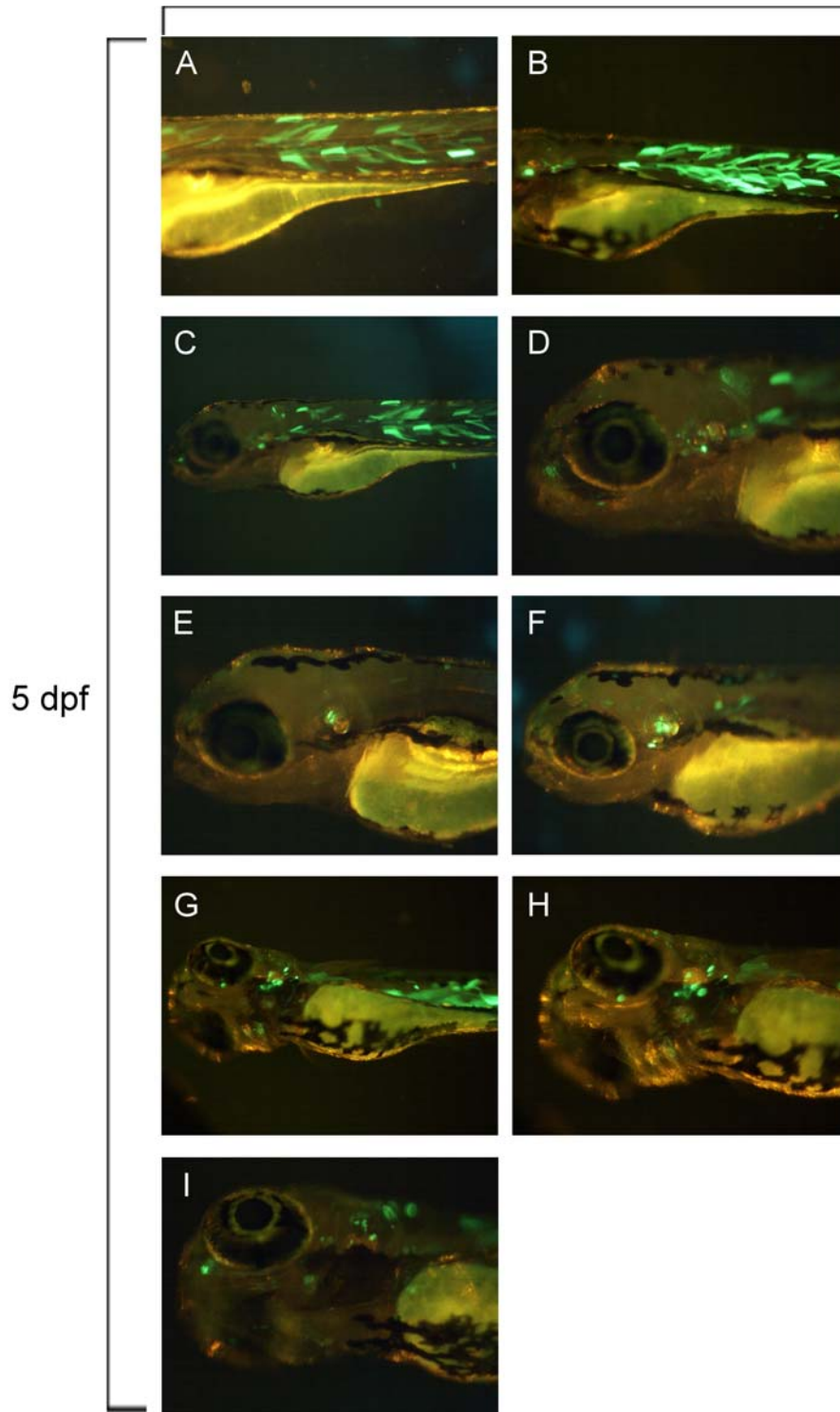
圖十七、斑馬魚 HSV TK-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 A、B)及脊索(圖 C、D)等組織位置。

pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1
transient zebrafish



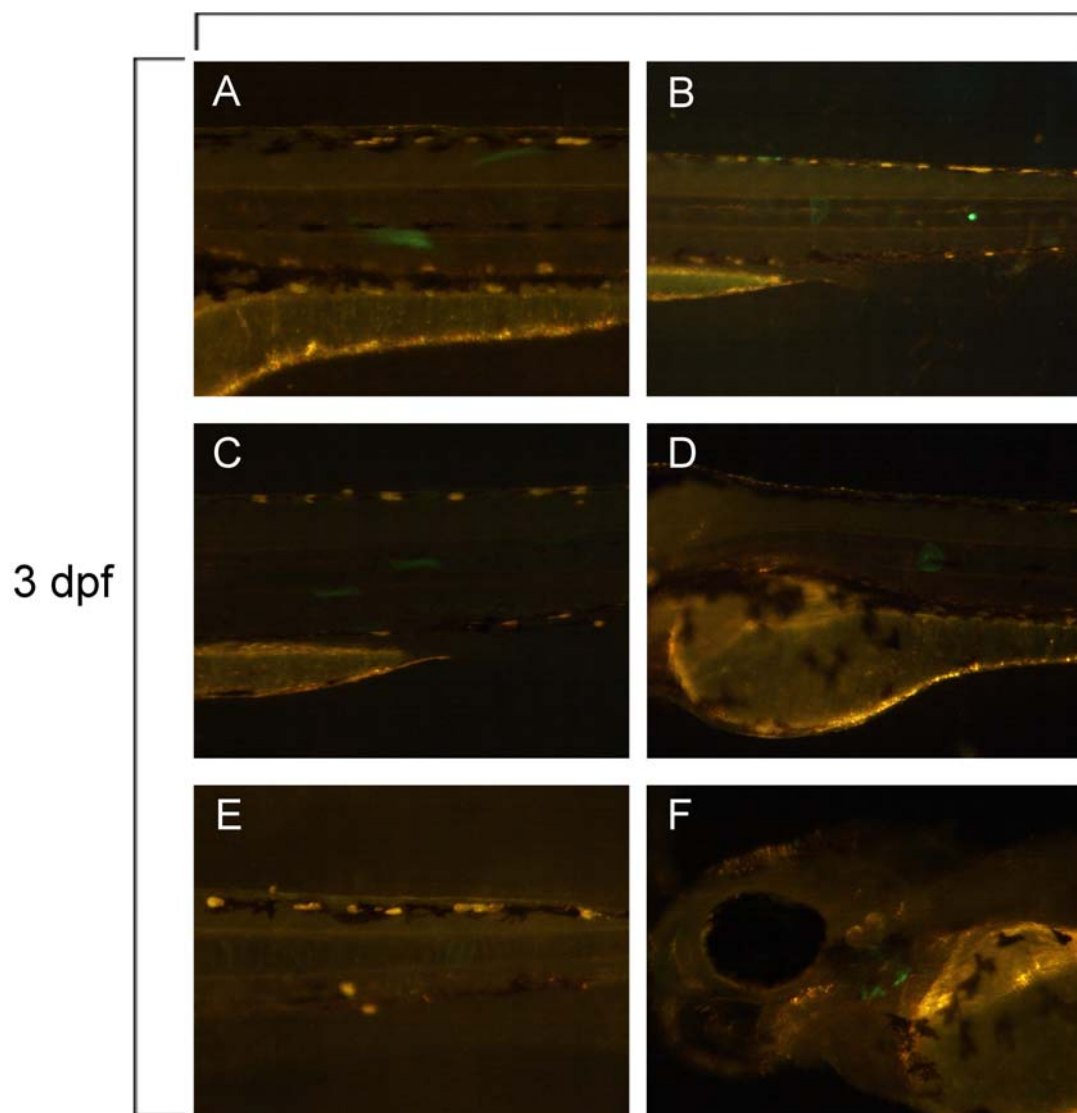
圖十八、斑馬魚 pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 A、B)、耳囊(圖 C-H)、頭部神經丘(圖 C-I)以及第五對三叉神經(V)(圖 J)等組織位置。

pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1
transient zebrafish



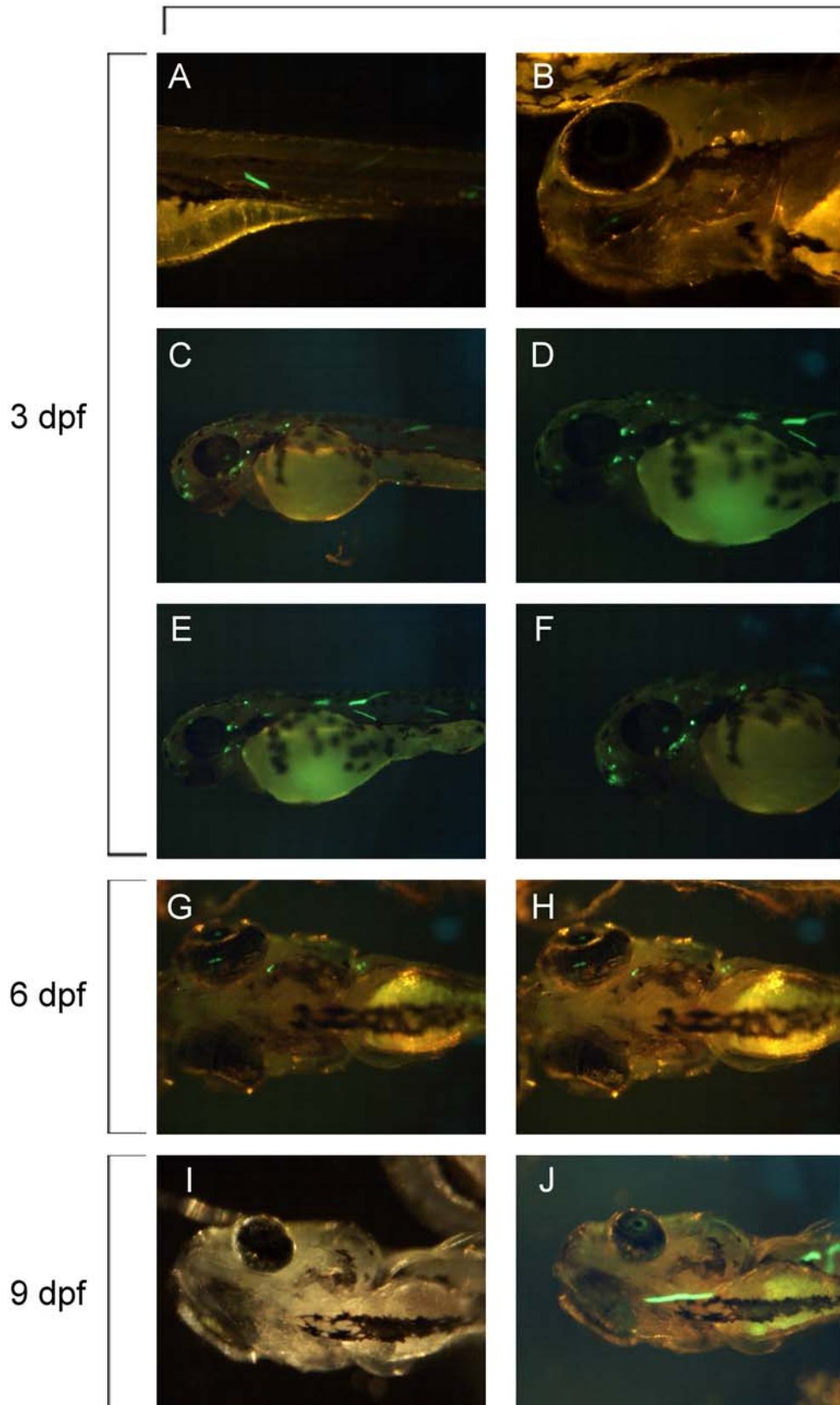
圖十九、斑馬魚 pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 5 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 A-C)、耳囊(圖 D-F)、頭部神經丘(圖 G-I)以及鰭條(圖 H、I)等組織位置。

pSix1.1-UCR1-TK-EGFP-1
transient zebrafish

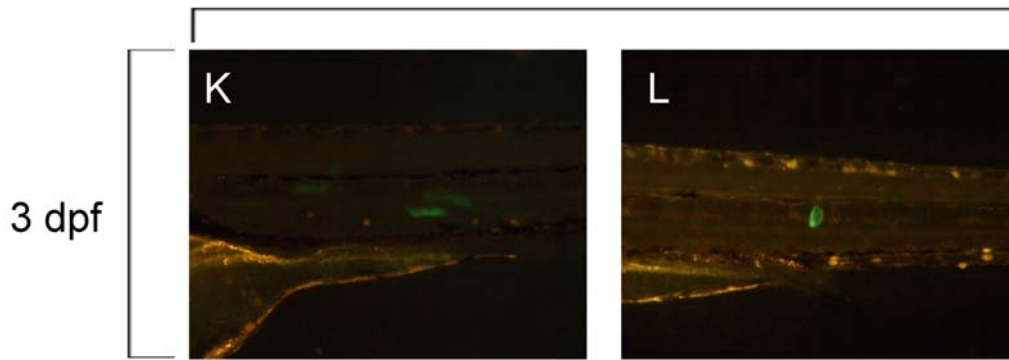


圖二十、斑馬魚 pSix1.1-UCR1-TK-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 A-C)、脊索(圖 D、E) 以及咽弓區域(圖 F)等組織位置。

pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1
transient zebrafish

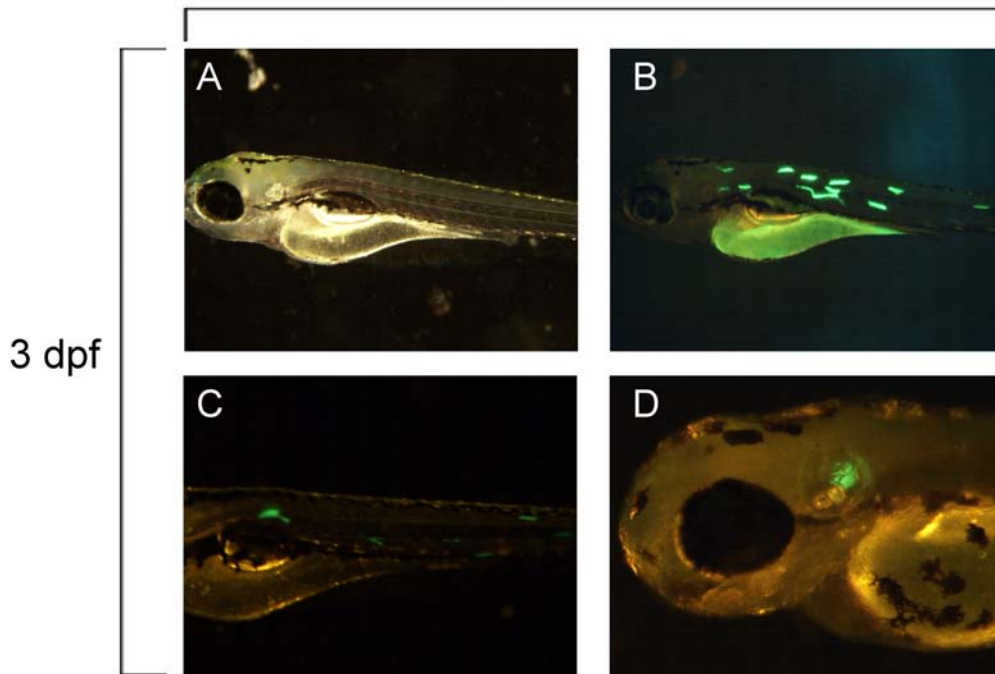


pSix1.1-UCR2-TK-EGFP-1
transient zebrafish



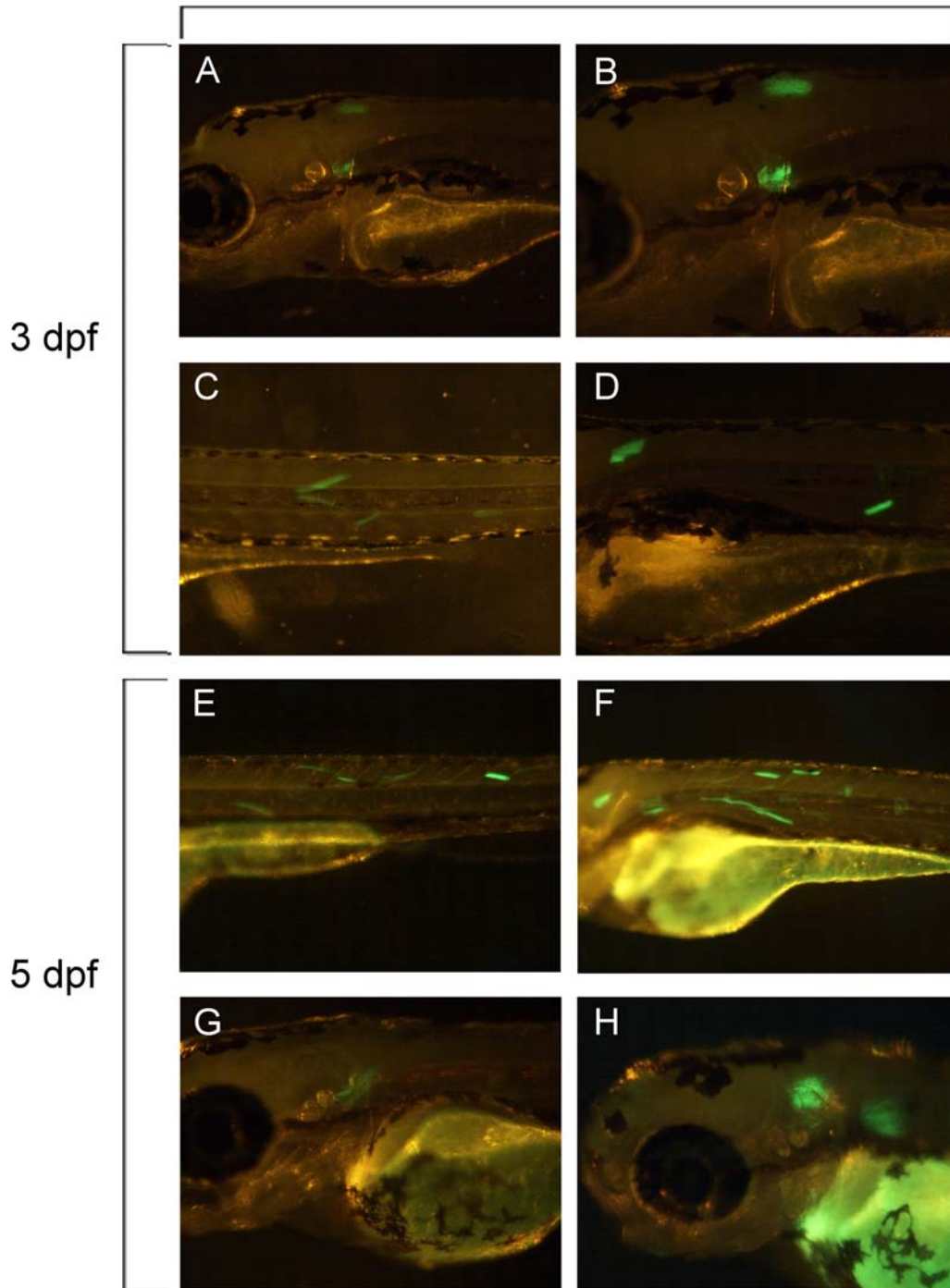
圖二十一、斑馬魚 pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1 (圖 A-J)與 pSix1.1-UCR2-TK-EGFP-1(圖 K-L)結構體過渡性轉殖之結果。於 pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1 過渡性轉殖 3 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 A)、咽弓(圖 B)以及頭部神經丘(圖 C-F)等組織位置。於胚胎發育 6 天(圖 G、H)及 9 天後(圖 I、J)，可觀察到綠色螢光蛋白於咽弓處表現。於 pSix1.1-UCR2-TK-EGFP-1 過渡性轉殖 3 天後，可觀察到綠色螢光蛋白會表現在體節(圖 K)及脊索(圖 L)等組織位置。

pSix1.1-UCR3-280bp-EGFP-1
transient zebrafish



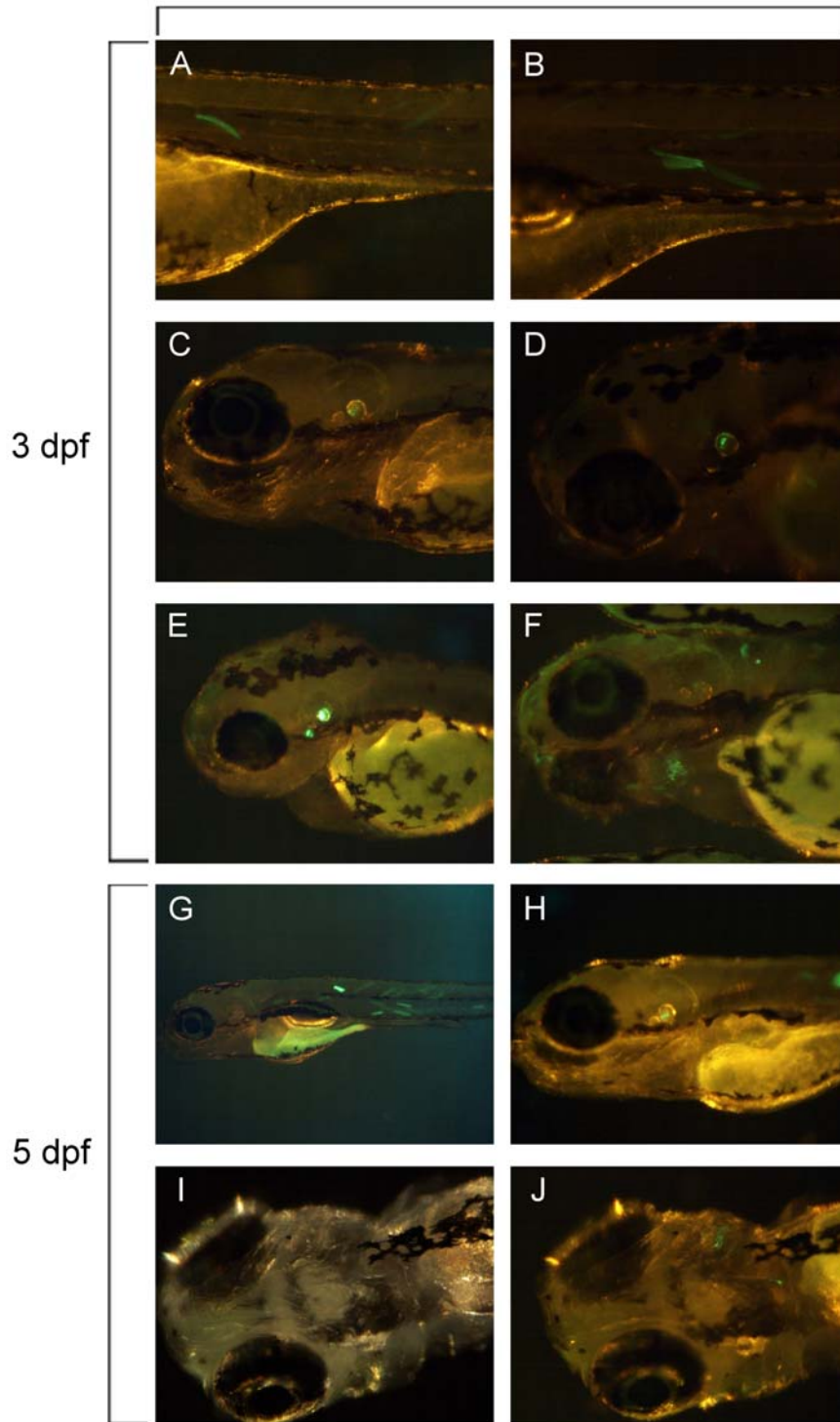
圖二十二、斑馬魚 pSix1.1-UCR3-280bp-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 B、C)以及頭部間葉細胞(圖 D)等組織位置。

pSix1.1-UCR3-TK-EGFP-1
transient zebrafish



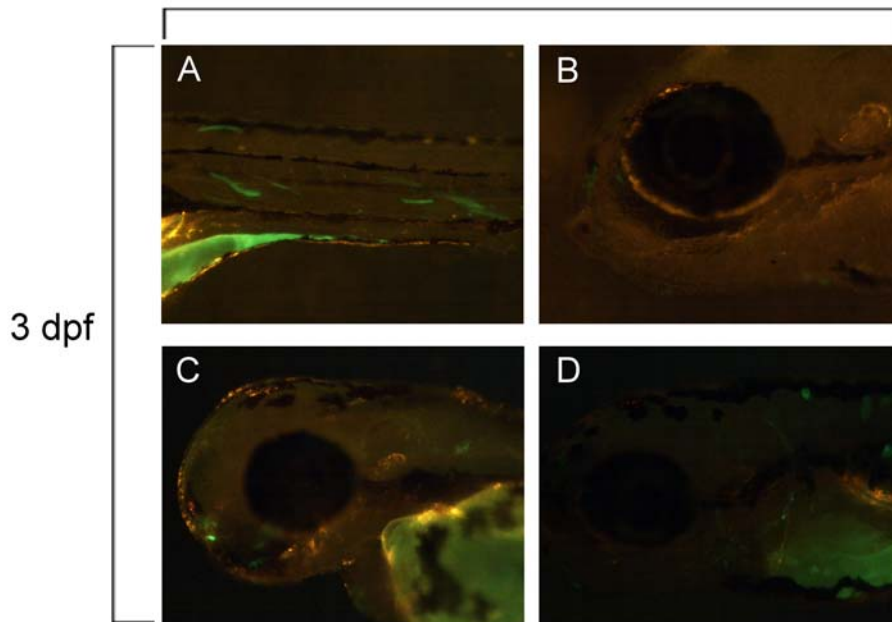
圖二十三、斑馬魚 pSix1.1-UCR3-TK-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3-5 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在頭部間葉組織(圖 A、B、G、H)、體節(圖 C-F)以及脊索(圖 F)等組織位置。

pSix1.1-UCR4-280bp-EGFP-1
transient zebrafish



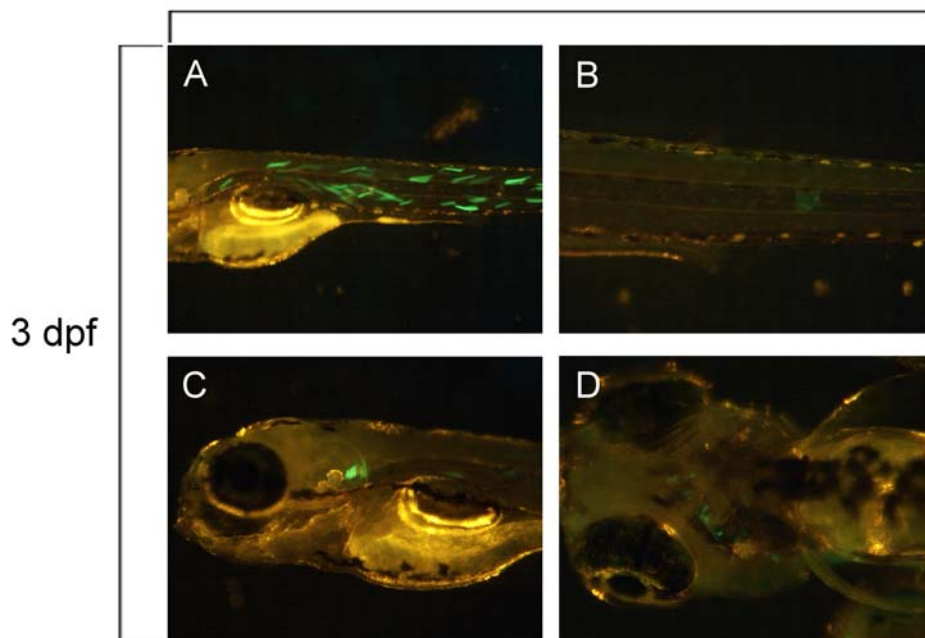
圖二十四、斑馬魚 pSix1.1-UCR4-280bp-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 A、B)、耳囊(圖 C-E)以及咽弓(圖 F)等組織位置。於胚胎發育 5 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 G)、耳囊(圖 H)以及咽弓(圖 J)等組織位置。

pSix1.1-UCR4-TK-EGFP-1
transient zebrafish



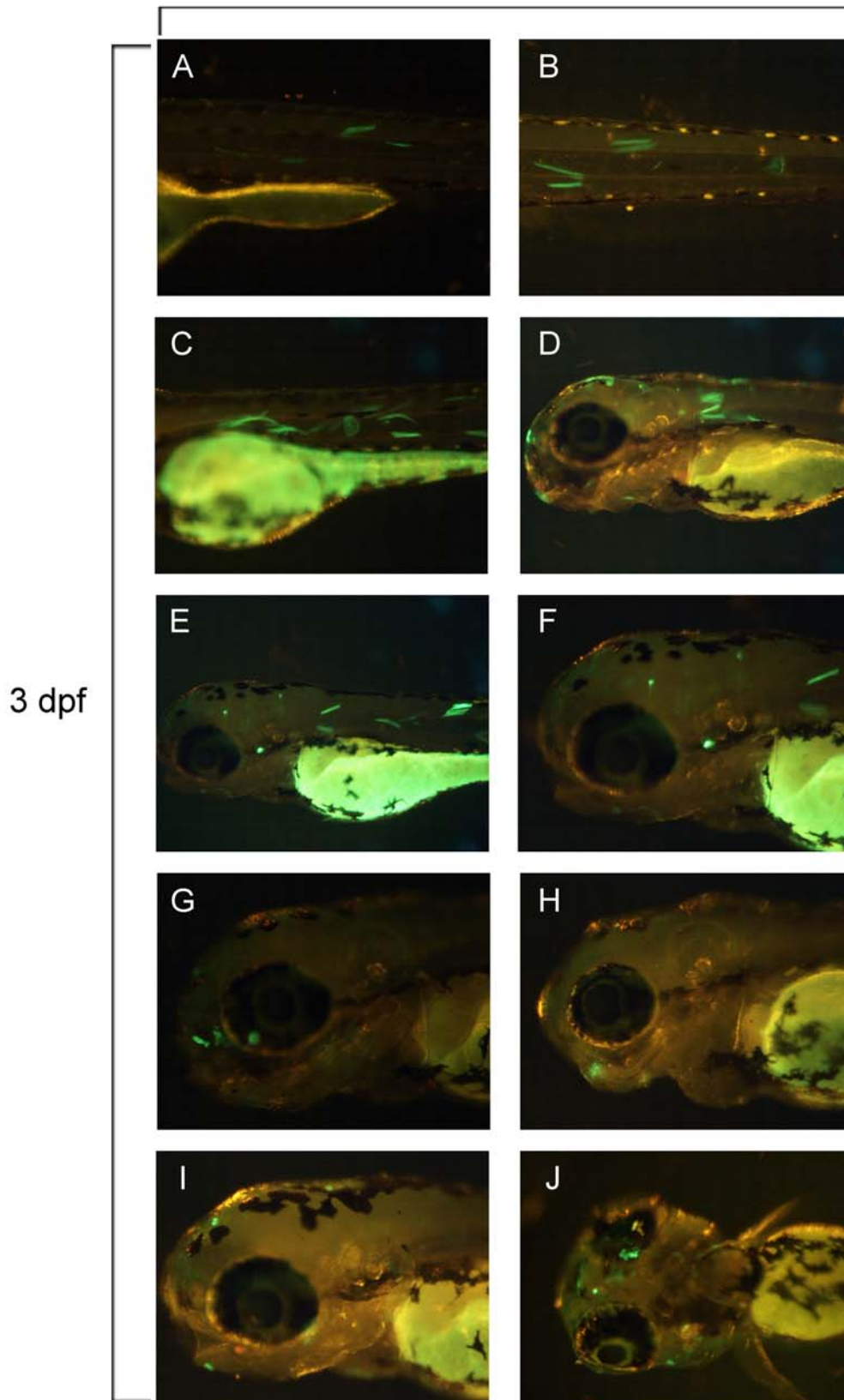
圖二十五、斑馬魚 pSix1.1-UCR4-TK-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 A)、上顎(圖 B)、頭部神經丘(圖 C)以及咽弓(圖 D)等組織位置。

pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1
transient zebrafish



圖二十六、斑馬魚 pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 A)、脊索(圖 B)、頭部間葉細胞(圖 C)以及咽弓(圖 D)等組織位置。

pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1
transient zebrafish



圖二十七、斑馬魚 pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1 結構體過渡性轉殖之結果。於胚胎發育 3 天後，可見到綠色螢光蛋白表現在體節(圖 A-F)、脊索(圖 B、C)、頭部神經丘(圖 D-G)以及咽弓(圖 H-J)等組織位置。

結構體	鏡檢的 斑馬魚 總隻數 (F0)	有表現 GFP 之斑 馬魚隻數/ 百分比	體節 表現 GFP 百分比	耳囊 表現 GFP 百分比	神經丘 表現 GFP 百分比	咽弓 表現 GFP 百分比	脊索 表現 GFP 百分比
pSix1.1-2.6kb-EGFP-1	169	163/96.4%	96.4%	20.7%	2.4%	1.8%	2.4%
pSix1.1-280bp-EGFP-1	100	39/39%	39%	0%	0%	0%	0%
pSix1.1-130bp-EGFP-1	207	51/24.6%	24.6%	0%	0%	0%	0%
pSix1.1-130bp-TK-EGFP-1	226	39/17.3%	14.6%	0%	0%	0%	2.7%
HSV TK-EGFP-1	64	14/25%	25%	0%	0%	0%	3.1%
pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1	183	183/100%	98.9%	32.8%	3.8%	1.6%	0%
pSix1.1-UCR1-TK-EGFP-1	117	65/55.6%	52.1%	1.7%	0%	1.7%	4.3%
pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1	224	97/43.3%	43.3%	0.4%	1.8%	1.3%	0%
pSix1.1-UCR2-TK-EGFP-1	112	59/52.7%	52.7%	0%	0%	0%	6.3%
pSix1.1-UCR3-280bp-EGFP-1	472	370/78.4%	78.4%	0.2%	0%	0%	0%
pSix1.1-UCR3-TK-EGFP-1	164	140/85.4%	82.9%	0%	0%	0%	9.1%
pSix1.1-UCR4-280bp-EGFP-1	445	255/57.3%	57.3%	1.3%	0%	2.6%	0.2%
pSix1.1-UCR4-TK-EGFP-1	158	136/86.1%	79.7%	0%	1.3%	1.3%	8.9%
pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1	117	117/100%	100%	0%	0%	1.7%	0%
pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1	78	75/96.2%	93.6%	1.3%	2.6%	7.7%	12.8%

表一、斑馬魚 *six1.1* 基因上下游保守序列相關結構體過渡性轉殖後 3 dpf F0 親代

於各組織器官表現綠色螢光蛋白之百分比。

結構體	已篩選的斑馬魚總隻數(F0)	F0 恆定基因轉殖的斑馬魚隻數	恆定基因轉殖斑馬魚百分比
pSix1.1-2.6kb-EGFP-1	33	1	3%
pSix1.1-280bp-EGFP-1	17	0	0%
pSix1.1-130bp-EGFP-1	4	0	0%
pSix1.1-130bp-TK-EGFP-1	4	0	0%
HSV TK-EGFP-1	0	0	0%
pSix1.1-UCR1-280bp-EGFP-1	27	0	0%
pSix1.1-UCR1-TK-EGFP-1	1	0	0%
pSix1.1-UCR2-280bp-EGFP-1	26	0	0%
pSix1.1-UCR2-TK-EGFP-1	0	0	0%
pSix1.1-UCR3-280bp-EGFP-1	19	0	0%
pSix1.1-UCR3-TK-EGFP-1	3	0	0%
pSix1.1-UCR4-280bp-EGFP-1	43	0	0%
pSix1.1-UCR4-TK-EGFP-1	28	0	0%
pSix1.1-DCR-280bp-EGFP-1	1	0	0%
pSix1.1-DCR-TK-EGFP-1	3	0	0%

表二、斑馬魚 *six1.1* 上下游保守序列相關結構體之恆定品系斑馬魚 F0 親代篩選隻數。

参考文献

- Ando, Z., et al., 2005. Slc12a2 is a direct target of two closely related homeobox proteins, Six1 and Six4. *FEBS J.* 272, 3026-41.
- Bessarab, D. A., et al., 2004. Expression of zebrafish six1 during sensory organ development and myogenesis. *Dev Dyn.* 230, 781-6.
- Boucher, C. A., et al., 1996. Cloning of the human SIX1 gene and its assignment to chromosome 14. *Genomics.* 33, 140-2.
- Boucher, C. A., et al., 1995. A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)n repeat. *Hum Mol Genet.* 4, 1919-25.
- Bovolenta, P., et al., 1998. Expression pattern of cSix3, a member of the Six/sine oculis family of transcription factors. *Mech Dev.* 70, 201-3.
- Bricaud, O., Collazo, A., 2006. The transcription factor six1 inhibits neuronal and promotes hair cell fate in the developing zebrafish (*Danio rerio*) inner ear. *J Neurosci.* 26, 10438-51.
- Brodbeck, S., Englert, C., 2004. Genetic determination of nephrogenesis: the Pax/Eya/Six gene network. *Pediatr Nephrol.* 19, 249-55.
- Brugmann, S. A., Moody, S. A., 2005. Induction and specification of the vertebrate ectodermal placodes: precursors of the cranial sensory organs. *Biol Cell.* 97, 303-19.
- Chang, E. H., et al., 2004. Branchio-oto-renal syndrome: the mutation spectrum in EYA1 and its phenotypic consequences. *Hum Mutat.* 23, 582-9.
- Chen, A., et al., 1995. Phenotypic manifestations of branchio-oto-renal syndrome. *Am J Med Genet.* 58, 365-70.
- 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.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-9.
- Esteve, P., Bovolenta, P., 1999. cSix4, a member of the six gene family of transcription factors, is expressed during placode and somite development. *Mech Dev.* 85, 161-5.
- 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 hemizygoty with bilateral anophthalmia and pituitary anomalies. *Genomics.* 61, 82-91.
- Goodrich, L. V., 2005. Hear, hear for the zebrafish. *Neuron.* 45, 3-5.
- Grifone, R., et al., 2005. Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf

- expression during myogenesis in the mouse embryo. *Development*. 132, 2235-49.
- Harris, S., et al., 1996. Myotonic dystrophy: will the real gene please step forward! *Hum Mol Genet*. 5 Spec No, 1417-23.
- Islam, M. E., et al., 2006. Three enhancer regions regulate *gbx2* gene expression in the isthmus region during zebrafish development. *Mech Dev*. 123, 907-24.
- 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., 1996a. Structure, function and expression of a murine homeobox protein AREC3, a homologue of *Drosophila sine oculis* gene product, and implication in development. *Nucleic Acids Res*. 24, 303-10.
- Kawakami, K., et al., 1996b. 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.
- Klesert, T. R., et al., 2000. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet*. 25, 105-9.
- Kobayashi, M., et al., 2000. Expression of three zebrafish Six4 genes in the cranial sensory placodes and the developing somites. *Mech Dev*. 98, 151-5.
- Kobayashi, M., et al., 1998. Overexpression of the forebrain-specific homeobox gene *six3* induces rostral forebrain enlargement in zebrafish. *Development*. 125, 2973-82.
- Kochhar, A., et al., 2007. Branchio-oto-renal syndrome. *Am J Med Genet A*. 143, 1671-8.
- Laclef, C., et al., 2003. Thymus, kidney and craniofacial abnormalities in Six 1 deficient mice. *Mech Dev*. 120, 669-79.
- Loosli, F., et al., 1998. Six3, a medaka homologue of the *Drosophila* homeobox gene *sine oculis* is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye. *Mech Dev*. 74, 159-64.
- Lopez-Rios, J., et al., 1999. Six9 (*Optx2*), a new member of the six gene family of transcription factors, is expressed at early stages of vertebrate ocular and pituitary development. *Mech Dev*. 83, 155-9.
- Ohto, H., et al., 1999. Cooperation of six and *eya* in activation of their target genes through nuclear translocation of *Eya*. *Mol Cell Biol*. 19, 6815-24.
- Ohto, H., et al., 1998. Tissue and developmental distribution of Six family gene products. *Int J Dev Biol*. 42, 141-8.

- 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.
- Ozaki, H., et al., 2004. Six1 controls patterning of the mouse otic vesicle. *Development*. 131, 551-62.
- Ozaki, H., et al., 2001. Six4, a putative myogenin gene regulator, is not essential for mouse embryonal development. *Mol Cell Biol*. 21, 3343-50.
- Park, B. K., et al., 2004. Intergenic enhancers with distinct activities regulate Dlx gene expression in the mesenchyme of the branchial arches. *Dev Biol*. 268, 532-45.
- Prince, V. E., Pickett, F. B., 2002. Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat Rev Genet*. 3, 827-37.
- Roessler, E., Muenke, M., 1998. Holoprosencephaly: a paradigm for the complex genetics of brain development. *J Inherit Metab Dis*. 21, 481-97.
- Ruf, R. G., et al., 2004. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 8090-5.
- Sarkar, P. S., et al., 2004. Six5 is required for spermatogenic cell survival and spermiogenesis. *Hum Mol Genet*. 13, 1421-31.
- Schlosser, G., 2006. Induction and specification of cranial placodes. *Dev Biol*. 294, 303-51.
- 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.
- Seo, H. C., et al., 1998a. Expression of two zebrafish homologues of the murine Six3 gene demarcates the initial eye primordia. *Mech Dev*. 73, 45-57.
- Seo, H. C., et al., 1998b. Transient expression of a novel Six3-related zebrafish gene during gastrulation and eye formation. *Gene*. 216, 39-46.
- Seo, H. C., et al., 1998c. A zebrafish Six4 homologue with early expression in head mesoderm. *Biochim Biophys Acta*. 1442, 427-31.
- Spitz, F., et al., 1998. Expression of myogenin during embryogenesis is controlled by Six/sine oculis homeoproteins through a conserved MEF3 binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 14220-5.
- Toy, J., Sundin, O. H., 1999. Expression of the optx2 homeobox gene during mouse development. *Mech Dev*. 83, 183-6.
- Xu, P. X., et al., 2003. Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney. *Development*. 130, 3085-94.
- Zheng, W., et al., 2003. The role of Six1 in mammalian auditory system development. *Development*. 130, 3989-4000.

- Zou, D., et al., 2006. Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1. *Dev Biol.* 293, 499-512.
- Zuber, M. E., et al., 1999. Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of XOptx2. *Cell.* 98, 341-52.

