

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 90-2320-B-002-146-

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：張百恩 助理教授 國立台灣大學醫學院口腔生物科學研究所

計畫參與人員：侯欣翰 研究生 國立台灣大學醫學院口腔生物科學研究所

一、中文摘要

本研究計畫之主要目的在選殖模式動物斑馬魚 crystallin- β B1 基因 cDNA，並探討其與先天性白內障生成之關係。利用 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 之方法配合退化引子 (degenerate primers) 獲致一段斑馬魚 crystallin- β B1 gene 之 cDNA 片段。以 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 方法獲致 cDNA 5' 及 3' 端 cDNA 序列，合併三片段得知 cDNA 之全長序列。其胺基酸之序列與其他物種之此基因序列非常接近，僅在蛋白質 N 端歧異度較大。以原位雜合反應 (whole mount *in situ* hybridization) 來了解此基因在斑馬魚胚胎發育初期之時空動態變化，得知此基因在斑馬魚胚胎 20 小時開始在水晶體表現。由北方墨點法，得知此基因在 48 小時胚胎有大量的表現，而且僅有一種 mRNA 表現。另一方面，從斑馬魚之 genomic DNA library 中，篩選 crystallin- β B1 gene，以了解其基因之結構 (Exon-Intron composition)，經細部分析其中一篩選的基因體基因片段，得知此基因含有 6 個表現序列 (Exon) 及 5 個插入序列 (Intron)。而上游啟動子 (promoter region) 亦被成功的選殖。以 PCR 方法構築缺失型態之 cDNA (truncated form cDNA)，再利用試管內合成部分缺失型態的 mRNA (truncated form mRNA)，將此有缺陷之 mRNA 直接以顯微注射 (microinjection) 方式注入正在發育的斑馬魚胚胎，並沒有明顯的白內障現象。

關鍵詞：晶體蛋白、水晶體、白內障、基因體

Abstract

The aim of the project was focused on the cloning of zebrafish crystallin- β B1 and the study of its implication in the congenital cataractogenesis. A fragment of zebrafish crystallin- β B1 cDNA was cloned by RT-PCR using degenerate primers. The 5' and 3' cDNA were obtained by 5'RACE and 3'RACE methods (Rapid Amplification of cDNA Ends). Compilation of the three fragments resulted in the full-length cDNA sequence. The zebrafish crystallin- β B1 sequence shows high homology in amino acid sequence when compared with those of other vertebrates with some varied residues in the N-terminal region. The spatial-temporal expression of the gene in the developing embryo was revealed by whole mount *in situ* hybridization. The results shows that this gene is initially expressed in the developing lens at about 20 hr stage. The transcripts of the gene are abundant in the embryos at 48 hr stage and a single kind of transcripts is expressed as revealed by Northern blot analysis. On the other hand, the genomic DNA fragment of the gene was isolated by screening its cognate genomic DNA library. After analyses by restriction enzyme mapping and subcloning, the structure of crystallin- β B1 gene was unraveled. This gene is composed of 6 exons and 5 introns. The upstream promoter region was also cloned. Concerning the relation between the cataractogenesis and the mutation of the gene, mutated form of cDNA was constructed by PCR. The mutant form of the transcripts was micro-injected, however, no evident cataract was formed in the embryo.

Keywords: cataract, cDNA, crystallin, genome, lens.

二、計畫緣由與目的

脊椎動物的眼球發育在胚胎早期之顱顏發育(craniofacial development)過程中扮演著相當重要的角色，眼球在胚胎早期，基本上大致可分為二個部分：一、水晶體(lens)，此為外胚層之表皮細胞(lens placode)向內凹陷而形成；二、視網膜(retina)，由神經外胚層內陷形成，將來發育出神經層與光線之接收及神經傳導有關。眼球內之水晶體(lens)扮演著視覺上聚光與透光之功能，如同相機之鏡頭。水晶體蛋白(crystallin)為構成脊椎動物水晶體之主要成份蛋白質，約佔其可溶性蛋白質之 90%，這些蛋白質在晶體內之排列及其本身之化學特性與其透明度息息相關。根據其蛋白質大小，電荷及免疫學上之特性，crystallin 大致上可分為三大類 α -crystallin、 β -crystallin 及 γ -crystallin。本研究計畫之主要目的在選殖模式動物斑馬魚 crystallin- β B1 之基因，並探討其與先天性白內障生成之關係。先以 RT-PCR 之方法配合退化引子(degenerate primer)獲致一段斑馬魚 crystallin- β B1 gene 之 cDNA 片段。再用 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 方法獲致 cDNA 之全長序列，再以原位雜合反應(whole mount *in situ* hybridization)來了解此基因在斑馬魚胚胎發育初期之時空動態變化。另一方面，從 genomic DNA library 中篩選 crystallin- β B1 gene，以了解其基因之結構(Exon-Intron composition)。在此基因與白內障生成之探討方面，先利 PCR 方法構築缺失型態之 cDNA (truncated form cDNA)，再利用試管內合成部分缺失型態的 mRNA (truncated form mRNA)，將此有缺陷之 mRNA 直接以顯微注射(microinjection)方式注入正在發育的斑馬魚胚胎之水晶體內或受精卵中，隨著其發育，胚體將合成有缺陷之 crystallin 蛋白質，由此觀察水晶體發育是否會受影響，而形成白內障之現象。

三、結果與討論

(1) cDNA 序列

以 RT-PCR 之方法配合退化引子(degenerate primer)獲致一段斑馬魚 crystallin gene 之 cDNA 片段，經序列的比對後，得知為 crystallin- β B1 片段。利用已獲得 cDNA 片段設計引子，用 RACE 方法獲致 cDNA 5' 及 3' 端 cDNA 序列，得知全長 cDNA 及 amino acid 序列(圖一)。

(2) 原位雜合反應 (*in situ* hybridization)

由 RT-PCR 獲得之 cDNA 片段(構築在 pGEM-T easy 載體中)，來合成 Dig-labeled antisense RNA，進行原位雜合反應，其結果如圖二所示，得知此基因在斑馬魚胚胎 20 小時開始在水晶體表現。

(3) 北方點墨法分析 (Northern blot)

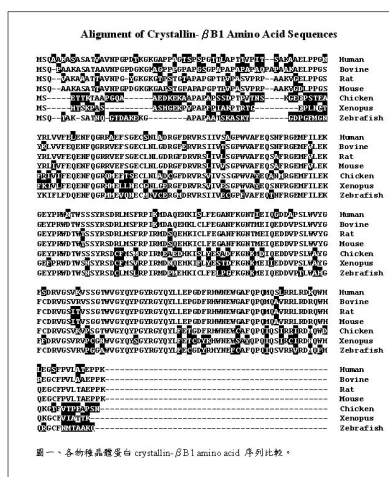
由北方點墨法得知在 48 小時有高量的表現(圖三，lane 5)，且僅有一種 mRNA 表現。

(4) 基因結構 (exon-intron organization)

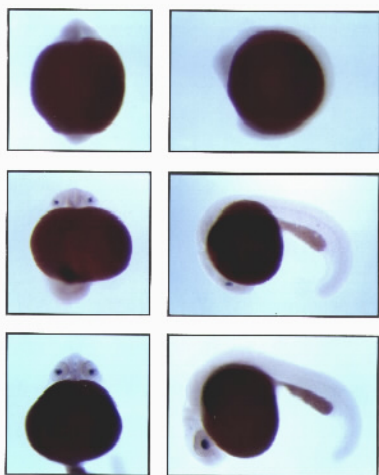
獲得之 cDNA 片段作為探針(probe)，來篩選此基因之 genomic DNA 片段，了解 crystallin- β B1 之基因結構(exon-intron organization)，得知此基因含有 6 個表現序列(Exon)及 5 個插入序列(intron)

(5) 此基因與白內障生成之探討

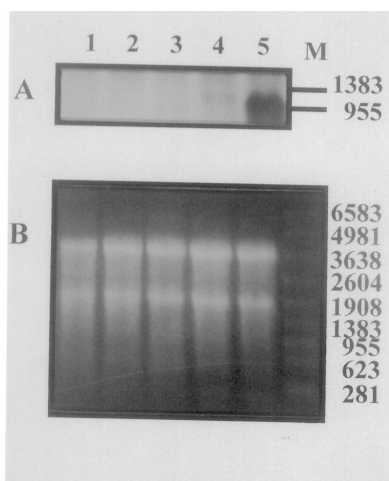
以 PCR 方法構築缺失型態之 cDNA (truncated form cDNA)，再利用試管內合成部分缺失型態的 mRNA (truncated form mRNA)，將此有缺陷之 mRNA 直接以顯微注射(microinjection)方式注入正在發育的斑馬魚胚胎之水晶體內或受精卵中，隨著其發育，胚體將合成有缺陷之 crystallin 蛋白質，由此觀察水晶體發育是否會受影響，而形成白內障之現象。實驗結果，觀察 48 小時胚胎，水晶體中並沒有明顯的白內障發生，探討其原因，可能為所注入的 mRNA 已稀釋擴散到胚胎各細胞中，而其蛋白質也可能零星分布，而沒有集中於水晶體內。其解決之方法，可利用此基因本身之啟動子與變異之 cDNA 鍵結，以基因轉殖之方法注入胚胎，將可使變異之蛋白質，集中且專一的表現在水晶體內，而導致白內障的形成。



圖一、各物種晶體蛋白 crystallin-βB1 amino acid 序列比較。



圖二、斑馬魚晶體蛋白 crystallin-βB1 原位雜合反應。



圖三、北方點墨法分析斑馬魚晶體蛋白 crystallin-βB1 表現。

四、計畫成果自評

本研究已如期完成計劃之 cDNA 選

殖，並以原位雜合反應及北方點墨法了解了此基因之表現之時空變化，並已從基因庫中篩選到此基因之 genomic DNA，及分析其基因基本結構。這些結果將有助於後續之啟動子 (promoter) 之分析，以了解此基因之調控機制。另一方面，利用此基因本身之啟動子與變異之晶體蛋白 cDNA 鍵結，以基因轉殖方法，將有助於白內障模式動物之建立。

五、參考文獻

- Chang, B.-E., Lin, C.-Y., and Kuo, C.-M. (1999). Molecular cloning of a cold-shock domain protein, zfY1, in zebrafish embryo. *Biochim. Biophys. Acta*, 1433, 343-349.
- Chang, B.-E., Hsieh, S.-L. and Kuo, C.-M. (2001). Molecular cloning of full-length cDNA encoding Δ^9 -desaturase through PCR strategies and its genomic organization and expression in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 245-254.
- Chow, R. L., Altmann, C. R., Lang, R. A. and Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126, 4213-4222.
- Clark, J. I., Matsushima, H., David, L. L. and Clark, J. M. (1999). Lens cytoskeleton and transparency: a model. *Eye* 13, 417-424.
- Coop, A., Goode, D., Sumner, I. and Crabbe, M. J. C. (1998). Effects of controlled mutations on the N- and C-terminal extensions of chicklens β B1 crystallin. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 236, 146-150.
- Cvekl, A. and Piatigorsky, J. (1996). Lens development and crystallin gene expression: Many roles for Pax-6. *Bioessays* 18, 621-630.
- Duncan, M. K., Roth, H. J., Thompson, M. Kantorow, M. and Piatigorsky, J. (1995) Chicken β B1 crystallin: gene sequence and evidence for functional conservation of promoter activity between chicken and mouse. *Biochim. Biophys. Acta* 1261, 68-76.
- Duncan, M. K., Li, X., Ogino, H., Yasuda, K. and Piatigorsky, J. (1996).

- Developmental regulation of the chicken β B1-crystallin promoter in transgenic mice. *Mech. Dev.* 57, 79-89.
- Francis, P. J. and Moore, A. T. (1999). The lens. *Eye* 13, 393-394.
- Francis, P. J., Berry, V., Moore, A. T. and Bhattacharya, S. S. (1999). Lens biology: development and human cataractogenesis. *Trends Genet.* 15, 191-196.
- Graw, J. (1997). The crystallins: genes, proteins and diseases. *Biol. Chem.* 378, 1331-1348.
- Graw, J. (1999). Mouse models of congenital cataract. *Eye* 13, 438-444.
- Graw, J. (1999). Cataract mutations and lens development. *Prog. Retin. Eye Res.* 18, 235-267.
- Hejtmancik, J. F., Thompson, M. A., Wistow, G. and Piatigorsky, J. (1986). cDNA and deduced protein sequence for the β B1-crystallin polypeptide of the chicken lens. *J. Biol. Chem.* 261, 982-987.
- He, W. and Li, S. (2000). Congenital cataracts: gene mapping. *Hum. Genet.* 106, 1-13.
- Jean, D., Ewan, K. and Gruss, P. (1998). Molecular regulators involved in vertebrate eye development. *Mech. Dev.* 76, 3-18.
- McAvoy, J. W., Chamberlain, C. G., de Jongh, R. U., Hales, A. M. and Lovicu, F. J. (1999). Lens development. *Eye* 13, 425-437.
- Meng, A., Tang, H., Ong, B. A., Farrell, M. J. and Lin, S. (1997). Promoter analysis in living zebrafish embryos identifies a cis-acting motif required for neuronal expression of GATA-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 6267-6272.
- Meng, A., Tang, H., Ong, B. A., Farrell, M. J. and Lin, S. (1997). Promoter analysis in living zebrafish embryos identifies a cis-acting motif required for neuronal expression of GATA-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 6267-6272.
- Slingsby, C. and Clout, N. J. (1999). Structure of the crystallins. *Eye* 13, 395-402.

[illegible]

執行期間：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫參與人員：侯欣翰 研究生

☐赴國外出差或研習心得報告一份

☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份

☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

中 華 民 國 91 年 10 月 25 日