

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 89-2311-B-002-051

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：蔡懷楨 教授 國立台灣大學漁業科學研究所

共同主持人：吳金冽 教授 中央研究院動物所

計畫參與人員：蔡懷楨 黃秋茹 國立台灣大學漁業科學研究所

一、中文摘要

命名為 *tski1* 和 *tski2* 的兩種吳郭魚 *c-ski* cDNA 分別可轉譯成 687 和 714 個氨基酸的蛋白質，*tski1* 基因 genomic DNA 至少 16 kb。第一個 exon 包含 1.5 kb of cDNA，與 exons 2 中間隔有大於 10 kb 的 intron。Exons 2 至 7 只在 tilapia genome 中佔 2 kb 大小。而轉譯停止信號位於 exon 7，並包含一段很長的 3' 非轉譯區。同樣的，*tski2* gene 約長 20 kb。Exon 1 約 1.3 kb，exons 1 和 2 隔有大於 2 kb 的 intron。Exons 2 through 7 在染色體中約佔 6 kb，一樣有一長 3' untranslated 區域在 exon 7。

關鍵詞：*ski* 基因，吳郭魚，轉錄起始位置。

Abstract

The *tski1* gene extends a minimum of 16 kb in the tilapia genome. Exon 1 comprising 1.5 kb of cDNA sequence have been mapped with screening tilapia genomic DNA library. Then exons 1 and 2 are separated by more than 10 kb of genomic sequence. Using SSP-PCR (single specific primer – polymerase chain reaction), PCR and templates of genomic DNA, it is clear that *tski1* cDNA is encoded a minimum of seven exons. Exons 2 through 7 are closely linked within 2 kb in the tilapia genome. A long 3' untranslated region is contiguous in the genome with the distal portion of the *tski1* open reading frame such that exon 7 is composed of both coding and noncoding sequence. In contrast, the *tski2* gene extends a minimum of 20 kb in the tilapia genome. Exon 1 comprising approximately

1.3 kb of cDNA sequence have been mapped. Then exons 1 and 2 are separated by more than 2 kb of genomic sequence. The *tski2* cDNA is encoded a minimum of seven exons. Exons 2 through 7 are closely linked within 6 kb in the tilapia genome. A long 3' untranslated region is contiguous in the genome with the distal portion of the *tski2* open reading frame such that exon 7 is composed of both coding and noncoding sequence.

Keywords: *ski*, genomic DNA, transcription start site, tilapia.

二、緣由與目的

Virus 若含有 chicken *c-ski* cDNA 能夠造成 chicken embryo fibroblast (CEF) 的形態變化，也能誘發 CEF cells 在 soft agar 上的增殖 (Stavneer *et al.*, 1981; Sutrave *et al.*, 1990a; Colmenares *et al.*, 1991)。同時，也讓 quail 的 embryo cells 進行分化 (Colmenares & Stavezer, 1989; Colmenares *et al.*, 1991)。大量的 express 外來轉殖 *c-ski* cDNA 的老鼠則造成基因轉殖鼠的骨骼肌大量增加 (Sutrave *et al.*, 1990b)；由 fast muscle 大量分化 (Leferovich *et al.* 1995) 特別是 type IIb fiber；同時 ATPase activity 增高很多，但骨骼比較薄 (Lana *et al.*, 1996)。c-*ski* 平時廣泛的表現分布在各組織，但在骨骼肌卻反而表現很微量 (Sutrave *et al.*, 1990a; Sleeman and Laskey, 1993; Huang *et al.*, 1999)。而 Namciu 等人 (1994) 發表 c-*ski* 在 12.5 天的老鼠胚胎骨骼肌有高程度的表現。knockout 老鼠顯示前神經管 (rostral neural tube and) 閉鎖不全和骨骼

肌減少，並於出生後及死亡 (Berk *et al.*, 1997)。最近 Nicol and Stavnezer (1998) 發現 c-Ski 以抑制子的形式作用而非活動子，並且根據不同的細胞環境可作用於 GTCTAGAC 位置。c-Ski 能活化一調控肌肉分化的肌特異性輔助子 (Engert *et al.*, 1995)。Ichikawa 等人 (1997) 也發表 c-Ski 的功能是 myogenic gene 的 suppressor 於肌原母細胞增生時，potentiator 於肌管分裂後期。實驗顯示 c-Ski 可能是會被其他轉錄因子調控的轉錄因子 (Tarapore *et al.*, 1997)。所以，這些證據說明 *ski* 基因能刺激活化肌肉特有的基因；並促進 myoblast 融合成多核的 myotubes，造成肌原細胞的增殖及分化；可以說 *ski* 基因在 myogenesis 擔任重要任務。

這個計劃進行以來，完成的初步結果：篩選到吳郭魚特有的促進肌肉成長及分化的兩型 *c-ski* cDNA (Huang, *et al.*, 1999)。現在進一步對其 genomic DNA 進行探討；為了瞭解這兩種型的調控差異、生理功能、組織特異性以及轉殖各型 Ski protein 在轉殖魚類之肌肉發育上的影響和功用，我們續研究這題材。因為這些基礎資料十分有於我們瞭解 Ski protein 在進成長的機制及角色；同時因為我們已清楚 *ski* 基因的分子結構，可進一步地藉著基因工程，取得大量 recombinant Ski protein 作為基礎及應用方的研究。同樣地也可以用基因轉殖的方式取得基因轉殖魚類，進而瞭解促進成長的機制及應用。

三、結果與討論

On screening 10^5 phages of tilapia genomic DNA library with the 300 bp probe of exon 1 of *tski2*, one positive clone was obtained. Sequence analysis revealed that the clone, contains the exon 1 sequence of *tski1*, was named tlg4-1 (Fig. 1). Another screening 10^5 phages of tilapia genomic DNA library with the 800 bp probe of exon 1 of *tski2*, one positive clone was obtained. Sequence analysis revealed that the clone, contains the

exon 1 sequence of *tski2*, was named t2gB1 (Fig. 1).

The tlgPE1 primer extended a 130 b signal. Sequencing Marker analysis revealed the transcription start site is ATTTTTTTTCC... (Fig. 2) in tig4-1 clone sequence 3121 (Fig. 1a).

The genomic sequences between exons of *tski1* and *tski2* except exon 1 and 2 were amplified. Consensus splice donor and acceptor sequence were indicated at the 5' and 3' ends of the intervening sequence, respectively in Fig. 1.

四、計畫成果自評

實驗進行符合進度。

五、參考文獻

- Berk, *et al.*, (1997) *Genes Dev.* 11: 2029-2039.
- Colmanres and Stavnezer (1989) *Cell* 59: 293-303.
- Colmanres, *et al.*, (1991) *J. Virol.* 65: 4929-4935.
- Enger, *et al.*, (1995) *Nucleic Acid Res.* 23: 2988-2994.
- Huang, *et al.*, (1999) *Mol. Reprod. Dev.* 54: 223-231
- Ichikawa, *et al.*, (1997) *Biochem. J.* 328: 607-613.
- Lana, *et al.*, (1996) *Dev. Dynamics* 205: 13-23.
- Leferovich, *et al.*, (1995) *J. Neurosci.* 15: 596-603.
- Ludolph, *et al.*, (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1260: 102-104.
- Namciu, *et al.*, (1994) *Oncogene* 9: 1407-1416.
- Nicol and Stavnezer (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 3588-3597.

- Sleeman and Laskey (1993) *Oncogene* 8: 67-77.
- Stavnezer, *et al.*, (1981) *J. Virol.* 39: 920-934.
- Stavnezer, *et al.*, (1986) *J. Virol.* 57: 1073-1083.
- Sutcliffe and Hughes (1989) *Mol. Cell Biol.* 9: 4049-4051.
- Sutcliffe, *et al.*, (1990a) *Mol. Cell Biol.* 10: 3137-3144.
- Sutcliffe, *et al.*, (1990b) *Gene Dev.* 4: 1462-1473.
- Tarapore, *et al.*, (1997) *Nucleic Acid Res.* 25: 3895-3903.