

## 參、材料與方法

### 1. 果蠅胚胎 RNA 原位雜合染色

#### *Him* RNA probe 製作

使用 *Him* exon 1 5' primer : CTACAAGATACYGAAGCAGCAACG , 3' primer : CCAGCTCCTCCTTATCCTTG 以 fly total genome DNA 做 PCR 反應，反應條件為：94°C 5 min ，94°C 30 sec 、50°C 30 sec 、72°C 30sec 進行 30cycle，夾出一段全長為 215 base pair，將其 PCR 產物使用 PCR II – TOPO vector (Invitrogen) 進行 TA cloning，PCR II – TOPO vector 上面有兩個 promoter T7、SP6，挑選一基因插入方向以 T7 方向讀起為正股的質體，使用限制酵素 Not I 將質體切為線型，以 SP6 為 promoter 使用 MAXIscript™ In vitro Transcription Kit (Ambion) 進行 In vitro Transcription ，由於 dNTP (dATP、dUTP、dCTP、dGTP) 中的 dUTP 帶有 labeled digoxigenin，產生的 RNA probe 即帶有 labeled digoxigenin，將所得產物加入 1μl DNAse 於 37°C 反應 15 分鐘，然後加入 30μl RNAse free water 將體積補到 50μl 加上 5μl 5M ammonium acetate 混合加入 150μl 100% EtOH，置入-20°C 30 min，15min 最高轉速離心，去掉上層液，加入 150μl 70% EtOH 離心 15 min 最高轉速，去掉上層液，乾燥加入 30μl RNAse free water，以光度計於 O.D. 260 測定濃度，並以 probe resuspension buffer (10ml

含 5ml formamide、0.5ml 10X TE pH7.4、4.4ml ddH<sub>2</sub>O、0.1ml 10% Tween)將濃度調為 25µg/ml，此為 50 倍的 stock。

### **胚胎收集及固定**

將適當果蠅品系置於籠子並以 3%含有果汁的洋菜膠體收集果蠅胚胎於適當的發育時間內(0~16 hours) 以 0.02% Triton X 洗三次，用 50% 漂白水脫膜五分鐘，再以 0.02% Triton X 清洗，1：1 體積的 heptane 及 4%formaldehyde/PBS 固定二十分鐘，去掉下層水層，加入等倍體積的 methanol，並劇烈搖晃一分鐘，去除 vitallinmembrane，將瓶中的溶液吸乾，留下瓶底已脫膜的胚胎，以 methanol 清洗三次，以 methanol 保存在 -20°C 待進一步染色使用。

### **果蠅胚胎的原位雜合染色(in situ hybridization)**

將保存的果蠅胚胎取出，去除 methanol，以體積 3：1(methanol：4%formaldehyde in PBS) rehydrate 2 分鐘，然後以體積 1：3(methanol：4%formaldehyde in PBS) rehydrate 5 分鐘，以 4%formaldehyde in PBS 固定 10 分鐘，然後 PBT 洗三次，加入 hybridization buffer 室溫 1 小時，去掉 hybridization buffer，加入 hybridization buffer with dextran sulfate 及稀釋為一倍的探針於 60°C 雜合過夜。

加入少許 wash buffer，使果蠅胚胎沉澱至底部後，去除 hybridization buffer，以體積比 1：1(wash buffer：PBT)於 60°C 清洗 30

分鐘，於室溫中以 PBT 洗三次，加入 TAE buffer 5 分鐘，置入電泳槽  
電泳 30min 100V，將果蠅胚胎取出以 PBT 洗三次，加入 2% BSA in  
PBT blocking 1 小時，1：2000 anti-digoxigenin-AP antibody 室溫作用  
兩小時，洗九次 PBT，以 AP buffer (5ml 含 100  $\mu$ l 5M NaCl 250  
 $\mu$ l 1M MgCl<sub>2</sub>、500  $\mu$ l 1M Tris pH 9.5、25  $\mu$ l 20% Tween、4.125 ml  
ddH<sub>2</sub>O) 潤濕兩次，以 AP buffer 洗 5 分鐘，加入 200 $\mu$ l AP buffer 含  
0.9 $\mu$ l Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 及 0.7 $\mu$ l  
Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphatase(BCIP)呈色，待呈色完成以 PBT 洗  
三次，置入 30% glycerol 保存照相。

## **2.果蠅胚胎免疫組織染色**

### **胚胎收集及固定**

將適當果蠅品系置於籠子並以 3%含有果汁的洋菜膠體收集果蠅胚胎  
於適當的發育時間內(0~16 hours) 以 0.02% Triton X 洗三次，用 50%  
漂白水脫膜五分鐘，再以 0.02% Triton X 清洗，1：1 體積的 heptane  
及 4% formaldehyde/PBS 固定二十分鐘，去掉下層水層，加入等倍體  
積的 methanol，並劇烈搖晃一分鐘，去除卵膜，將瓶中的溶液吸乾，  
留下瓶底已脫膜的胚胎，以 methanol 清洗三次，以 95% ethanol 保存  
至 -20°C 待進一步染色使用。

### **組織免疫染色**

用 70% 及 30% Ethanol (Ethanol/water) rehydrate，以 PBT 洗三次，2% BSA in PBT block 60 分鐘，加入用 2%BSA in PBT 稀釋的一級抗體於 4°C 反應過夜，用 PBT 洗六次每次 10 分鐘，加入用 2%BSA in PBT 稀釋的二級抗體 (HRP-conjugated) 於室溫下反應 1 小時，洗六次 PBT 及三次 0.12M Tris buffer(pH7.5)，加入 0.5ml DAB working buffer 十分鐘，再加入 0.5 ml Hydrogen Peroxide dilute 1 : 1000 in dd H<sub>2</sub>O 至完全呈色，用 100% Ethanol 洗三次，Xylene 潤濕兩次，用 Permount 固定於玻片，乾燥後置於顯微鏡觀察照相。

### **3.Mis-expression**

#### **GAL4-UAS system**

GAL4-UAS system 被使用來在特定時間空間表現適當的基因產物，含酵母菌的轉錄因子 *GAL4* 的基因被插入果蠅的 genome 中，此基因的活化受到插入點附近的 enhancer 或是置入特定組織專一性的 enhancer 所調控，而 UAS (upstream activatinmang sequence) 則是一段序列，會受到 *GAL4* 蛋白質所接合，並活化表現 UAS 的下由基因，故選擇不同的 *GAL4* 品系果蠅會表現 *GAL4* 蛋白質於特定組織或時空，再跟帶有不同 UAS 序列特定基因的果蠅品系交配得到的下一代，會於特定時空表現的 *GAL4* 則會驅動 UAS 下游基因，達到異位表現特定基因的效果(Brand and Perrimon, 1993)。

#### ***Him* cDNA pUAST vector construct**

使用 primer *Him* cDNA 5' :

GCCGCCACCATGGGCGTCATCTACAAGATA

primer *Him* cDNA 3' :

GCTCTAGACTACCAAGGTCGCCACA

以 *Him* cDNA 為模版做 PCR 夾出一段 935bp 的片段，將其 PCR 產物使用 PCR II – TOPO vector(Invitrogen) 進行 TA cloning，進行轉型作用，並用限制酵素 *XhoI*，檢查長度挑選一菌落其質體切出有一段為 460bp，使用 *KpnI*、*XbaI* 切割，將切出的片段約 950bp 接到也同時切割 *KpnI*、*XbaI* 的 PUASt 質體上。

此質體 UAS 序列後其為 *Him* 基因的 cDNA 序列，做顯微注射，得到基因轉殖果蠅株，跟帶有特定時空表現 GAL4 的果蠅株交配，即可讓此基因表現於特定時空。

### ***Him* gene misexpression in mesoderm**

使用前述所得之 PUASt construct 的基因轉殖果蠅，收集處女蠅與在中胚層表現 *GAL4* 之基因轉殖果蠅：P{w[+mC]=GAL4-twi.G}108.4, w[1]，及 24B-twi-GAL4 之雄性果蠅交配，收集其所生之胚胎於 25°C，四小時至十七小時 (stage 7~ stage 16) 脫膜固定並做 anti-Dmef2 抗體免疫染色。

### ***Tinman*、*pannier* gene domain negative form expression in mesoderm**

此方法為將 *tinman* 及 *pannier* 的 N 端的 DNA binding domain 其後接上

*engrailed* 基因的repressor domain並接進PUAST的質體(Klinedinst and Bodmer, 2003)，若將所得的基因轉殖果蠅與中胚層表現GAL4之基因轉殖果蠅：P{w[+mC]=GAL4-twi.G}108.4, w[1]，及24B-twi-GAL4，將此經過改造過*tinman*、*pannier*於中胚層大量表現，與原本正常表現於此的*tinman*、*pannier*競爭，造成domain negative的效果，反而造成中胚層此兩種基因的作用功能下降，藉此收集其胚胎於25°C，四小時至十七小時（stage 7~ stage 16）然後固定並做*Him* gene的in situ hybridization，看在*tinman*、*pnr*這兩種基因於中胚層的功能降低的情況下，*Him* gene的表現是否會有影響。

#### Tinman、Pannier co-misexpression in mesoderm

使用twi-24B-Gal4 × UAS-tinman；UAS-pnr將Tinman及Pannier同時表現於中胚層中，目前已知Tinman及Pannier共同參與著許多控制調節果蠅心臟的發生的基因的作用(Gajewski et al., 2001; Klinedinst and Bodmer, 2003)。藉此收集其胚胎於25°C，四小時至十七小時（stage 7~ stage 16）然後固定並做*Him* gene的in situ hybridization，藉由加強兩者在中胚層的表現，看是否影響著在中胚層中*Him*基因的表現。

#### ***Him* RNAi transgene fly**

此亦是利用 mixexpression 原理，表現某基因的基因片段，所不同的是所表現的基因產物（mRNA），會形成 dsRNA 進而產生 RNA

interference，間接造成內生性的基因產物被破壞，造成此基因表現量下降，用此方式的可以在採用適當的 *GAL4* fly strain，可在特定時空減低基因的表現量，觀察此基因的缺失對於某特定組織器官是否有影響。

### 使用 pWIZ vector

此質體為一 PUASt 改造的 vector，其 MCS(Multiple cloning site)有兩個中間隔著約 74bp 的 white gene intron 2 只要將要降低表現量的基因給反向的分別插入此基因兩端(Lee and Carthew, 2003)，如之前所述，已經將 *Him* gene exon 1 放到 PCR II – TOPO vector (Invitrogen)質體上，利用此質體上的切點 *XbaI*、*SpeI*，將 *Him* exon 切出約 200bp，並用 *AvrII* 切 pWIZ vector 一刀，藉此將 *Him* exon 1 片段插入 pWIZ vector *AvrII* 的切點，進行接合反應，再將成功插入 *Him* exon 1 片段於 pWIZ *AvrII* 切點的質體，再以 *NheI* 酵素切一刀，也同樣的以 *XbaI*、*SpeI* 將 *Him* exon 1 片段從 PCR II – TOPO vector 切下，然後與 *NheI* 酵素切一刀的 pWIZ 進行接合，然後成功接合的質體再以 *SacI* 確定方向，若能切出為 500bp 或是 100bp 左右的片段即為成功插入反向 *Him* exon 1 的質體，再將此質體以顯微注射的方式得到轉殖果蠅株。

所得的果蠅株 UAS-*Him*-pWIZ 將其以中胚層的 Gal4 品系：

*twi-24B-gal4* 及在果蠅全身表現的 *tubulin-gal4/TM3* 作交配收集果蠅

胚胎固定作抗體染色。

#### 4. *Him* 基因在果蠅心臟表現 enhancer 研究

主要找尋 *Him* 基因於心臟表現的 enhancer，已知調控果蠅心臟發育的特殊轉錄因子 *tinman*、*pannier*、*Dmef2*、*twist* 的 consensus binding sequence，使用 Gene palette 軟體，此軟體由 UCSD 的 Posakony 實驗室所發展，可經由此軟體連接至資料庫，將某基因的 genomic sequence 下載下來，並使用從文獻中所搜尋的 consensus sequence 建立心臟特殊轉錄因子的資料庫，將此基因可能的轉錄因子接合序列以圖示標明出來。

Berkeley Drosophila Genome Project 已經將果蠅種 *Drosophila melanogaster* 此種果蠅也就是目前常被使用為模式動物的種類，而近來也已被定序完成，相關的基因序列的 biological annotations 也已經完成，第二種果蠅 *Drosophila pseudoobscura* 的序列已經被 Human genome sequence center of Baylor College of Medicine 所完成，藉由 VISTA 這個資料庫介面，可以比較這兩種果蠅的基因組序列，此包括真正的基因序列及此基因的上下游序列，藉此可以得到 *Him* 基因在這兩個物種間的相似序列，在與 Genepalette 軟體所得與心臟相關的轉錄因子的 consensus sequence 比對，若轉錄因子的 consensus sequence 在此兩種果蠅種的基因組序列比對是保守的，並藉此設計相

關引子。

將設計引子 (Table.1) 以果蠅的 genomic DNA 當模版，用 PCR 將之夾出來，所得到產物大小分別為：Him enhancer-1 1518 bp、Him enhancer-2 619 bp、Him enhancer-3 1705 bp、Him enhancer-1-1 824 bp、Him enhancer-1-2 827 bp，所夾出的 PCR 產物以 PCR II – TOPO vector (Invitrogen) 進行 TA cloning，轉型作用至菌株 Top10，TOPO vecto 有一 selection gene *LacZ*，以 100 $\mu$ l 40 mg/ml X-gal，40 $\mu$ l 100mM IPTG 與轉型菌液混合塗到含 Kanamycin LB plate 做藍白篩選，挑選適當菌落培養抽取質體，並做定序比對。

挑選適當限制酵素切點，將接在 PCR II – TOPO vector 的 enhancer 片段切下，接到以適當酵素處理的 pH-stinmanger vector 上，不同片段的 enhancer 接點如下：

Him enhancer-1 : *KpnI*、*BamHI* into pH-stinmanger vector : *KpnI*、*BamHI*

Him enhancer-2 : *KpnI*、*BamHI* into pH-stinmanger vector : *KpnI*、*BamHI*

Him enhancer-3 : *XbaI*、*KpnI* into pH-stinmanger vector : *SpeI*、*KpnI*

Him enhancer-1-1 : *KpnI*、*BamHI* into pH-stinmanger vector : *KpnI*、*BamHI*

Him enhancer-1-2 : *KpnI*、*BamHI* into pH-stinmanger vector : *KpnI*、

## *BamHI*

pH-stinmanger vector 為一果蠅 transgene 的質體，其所採用的 reporter gene 為 eGFP，eGFP 為核蛋白其表現較 GFP 能區分細胞邊界，將所要研究可能帶有 enhancer 活性的序列接在 reporter gene 前，若此段序列具有組織特異性的 enhancer 活性，reporter gene 就會表現在特定發育的時空下，此外此載體還有一特性，其在 enhancer 及 reporter gene 外圍左右各加入 insulator sequence，此 insulator 上面有 12 個 binding site for *suppressor-of-Hairy-wing* protein 可以幫助減少 chromatinman effect 影響 reporter 的表現，且減少插入鄰近的 enhancer 及 silencer 影響。

## 5. 果蠅胚胎的顯微注射

收集果蠅品系為  $yw: \frac{\Delta 2-3, Ubx}{TM3, Sb}$  的胚胎於塗有 yeast 的 agar plate 上，於 pre-cellular blastoderm 時期前，約 18°C，1 個小時內，使用 50% 漂白水，脫膜一分鐘，準備一雙面膠黏附在載玻片上，並將脫膜完成的胚胎以排列方式黏附雙面膠上，並乾燥 2~3 分鐘後，以 Halocarbon oil 蓋上，將抽取純化好 transgenic vector 用 injection buffer (5 mM KCl ; 0.1mM PO<sub>4</sub> pH7.8) 稀釋 vector 為 0.3μg/μl~ 1μg/μl，以 1cc/MI syringe(以酒精燈燒烤並拉出包細管狀的尖頭)取用 DNA，並注入製備好的毛細管針後端，並將毛細管針裝置於顯微注射器上，以後端注射

方式，注射於胚胎後端（將來 germ cell 發生移動之處）待 18°C 於兩天，收集孵化出的幼蟲、培養至成蟲分開雌雄並分別與異性的 yw 果蠅株交配，等到下一代若有紅眼果蠅孵化此即為轉殖成功果蠅株。

將所得的 enhancer 轉殖株果蠅與 UAS-tinmanEnR、UAS-pnrEnR 及 Df(2R)X1,Mef2 [ X1 ] / Cyo,Adh [ nB ] 作遺傳雜交實驗其方法如下：

1.

♀Him en-1 × ♂sp/Cyo ; MKRS/TM3

取 +/Cyo ; Him en-1/TM3(self-cross)

取 +/Cyo ; Him en-1/Him en-1

2.

♀UAS-tinmanENR × ♂sp/Cyo ; MKRS/TM3

取 UAS-tinmanEnR/cyo ; +/TM3(self-cross)

取 UAS-tinmanEnR/UAS-tinmanEnR ; +/TM3

3.

♀UAS-pnrENR × ♂sp/Cyo ; MKRS/TM3

取 UAS-pnrEnR/Cyo ; +/TM3(self-cross)

取 UAS-pnrEnR/UAS-pnrEnR ; +/TM3

4.♀Df(2R)X1,Mef2 [ X1 ] /Cyo,Adh [ nB ] ×♂sp/cyo ; MKRS/TM3

取 Df(2R)X1,Mef2 [ X1 ] /Cyo ; +/TM3

5.♂UAS-tinmanEnR/UAS-tinmanEnR ; +/TM3 × ♀ +/Cyo ; Him en-1/Him en-1

取 UAS-tinmanEnR/Cyo ; Him en-1/TM3(self-cross)

取 UAS-tinmanEnR/UAS-tinmanEnR ; Him en-1/Him en-1

6. ♂Df(2R)X1,Mef2 [ X1 ] /Cyo ; +/TM3×♀ +/Cyo ; Him en-1/Him en-1

取 Df(2R)X1,Mef2 [ X1 ] /Cyo ; Him en-1/TM3(self-cross)

取 Df(2R)X1,Mef2 [ X1 ] /Cyo ; Him en-1/Him en-1(self-cross)

收集果蠅胚胎於 25°C 四小時到十六小時 (stage 9~stage16) 脫殼蓋

上玻片於共軛焦顯微鏡上觀察其 eGFP 表現。

7.♂UAS-tinmanEnR/UAS-tinmanEnR ; Him en-1/Him en-1×♀twi-24B-gal4

收集果蠅胚胎於 25°C 四小時到十六小時 (stage 9~stage16) 脫殼蓋

上玻片於共軛焦顯微鏡上觀察其 eGFP 表現。

8.♂UAS-pnrEnR/UAS-pnrEnR ; Him en-1/Him en-1×♀twi-24B-gal4

收集果蠅胚胎於 25°C 四小時到十六小時 (stage 9~stage16) 脫殼蓋

上玻片於共軛焦顯微鏡上觀察其 eGFP 表現。