

## 貳、研究材料與方法



### 一、研究材料來源

正常人族群及運動失調症、失智症、帕金森氏症及其他神經疾病患者的血液樣本由林口長庚紀念醫院神經內科吳逸如醫師、陳瓊美醫師、徐文俊醫師及林均澄醫師提供。SCA8 患者和正常人族群之淋巴細胞株分別由台北榮民總醫院周邊神經科宋秉文醫師、林口長庚紀念醫院神經內科吳逸如醫師、陳瓊美醫師提供。

### 二、淋巴細胞株的培養

正常人和SCA8 基因CTG重複擴增患者淋巴細胞株細胞培養於37°C、含5% CO<sub>2</sub>且溼度良好的培養箱中，培養液為含10%胎牛血清之RPMI 1640 (Gibco)。每隔2-3天加5或10ml 培養液至flask中，待培養液到一定體積後，離心1000 rpm 5分鐘，去上清液後換至新flask中，繼代培養。冰凍保存細胞時，將細胞以離心1000 rpm 5分鐘收集，棄上清液，加入1 ml含12.5% DMSO的培養液，置於冰上2小時、-20°C 2小時及-70°C 隔夜後，保存於液態氮中。

### 三、基因組 DNA (genomic DNA)的萃取

基因組DNA的萃取係採用STRATAGENE DNA Extraction Kit (Stratgene)，步驟如下：將 4 ~ 6 ml的全血或  $10^7$ 個淋巴細胞置於 15 ml 離心管中，加solution I至 15 ml，翻轉數次混合均勻；置於冰上 5 ~ 10 分鐘後，離心 2000 rpm 9 分鐘以沉澱細胞核；去上層液，加入 2 ml solution II，震盪使核沉澱懸浮，加入 10  $\mu$ l protease K，於 37°C 隔夜或作用數天；待proteinase K反應結束後，加入 0.8 ml solution III，冰浴 5 分鐘，離心 3400 rpm 5 分鐘；取上清液，加入 5  $\mu$ l RNase，37°C 水浴 15 分鐘，加入 2.5 ml isopropanol，搖晃使DNA析出；將析出的DNA轉移到微量離心管中，離心 14000 rpm 1 分鐘，沉澱DNA；去上清液後，加入 0.5 ml 75%酒精清洗，離心 14000 rpm 1 分鐘，風乾後溶於適量ddH<sub>2</sub>O中；以OD<sub>260</sub>吸光值測定DNA濃度，稀釋成 50 ng/ $\mu$ l 後，置於 4°C 冰箱備用。

### 四、RNA 的萃取

各淋巴細胞株分別取約  $10^7$ 個淋巴細胞，離心 1000 rpm 5 分鐘後，用PBS清洗兩次，加入 1 ml TRIzol並將細胞吸起換至 1.5 ml微離心管中，加入 200  $\mu$ l chloroform，輕搖至混勻，室溫靜置 3 分鐘，在

4°C 離心 12000g 15 分鐘，將上清液取至新微離心管中，加入等體積之isopropanol，-20°C 儲存隔夜，在 4°C 離心 12000g 15 分鐘，去上清液，用 75%酒精清洗沉澱，在 4°C 離心 2000g 3 分鐘，去上清液，風乾後，加入適量DEPC-H<sub>2</sub>O溶解。以OD<sub>260</sub>吸光值測定RNA濃度，即完成RNA的製備。

## 五、聚合酶連鎖反應(PCR)

取 100 ng的基因組DNA，置於 25 µl的PCR反應中，反應溶液中包含 50 ng的引子對、適當濃度MgCl<sub>2</sub>、200 µM dNTP以及 0.5 U熱穩定性DNA聚合酶素(Promega)；PCR反應以熱循環儀(OmniGene，HYBAID)進行，反應條件為 94°C 6 分鐘使DNA雙股裂解，接以循環式(45 個)的裂解溫度 94°C 30 秒、適當的煉合溫度 30 秒及延長溫度 72°C 30 秒，最後以 72°C作用 10 分鐘；PCR結束後以 1.8-2%洋菜膠體電泳檢查片段大小是否正確。

## 六、Reverse transcription (RT)反應

以SuperScript<sup>TM</sup> III reverse transcriptase (Invitrogen)合成cDNA，步驟如下：在 5 µl反應中加入 4 µl RNA、0.5 µl oligo dT和 0.5 µl dNTP，

65°C 反應 5 分鐘後移至冰上。冰浴 2 分鐘後，加入 10 X RT 緩衝液 1  $\mu$ l、25 mM  $Mg^{2+}$  2  $\mu$ l、0.1M DTT 1  $\mu$ l、RNase OUT 0.5  $\mu$ l、reverse transcriptase 0.5  $\mu$ l，於 53°C 反應 50 分鐘合成 cDNA，置於 85°C 5 分鐘以終止 RT 反應。冰浴後加入 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O，置於 -20°C 保存。

## 七、SCA8 基因 3'UTR (CTG)<sub>n</sub> 重複的基因型分析 (genotyping)

以正向引子及螢光反向引子對各樣品進行 PCR 反應，反應煉合溫度為 49°C、 $MgCl_2$  濃度為 1.5 mM、10% 的 DMSO (表一)。放大包括 SCA8 基因 3'端 CTG 三核苷酸重複片段後，以水稀釋 PCR 產物 (1 : 8 比例)，取 2  $\mu$ l 稀釋產物以聚丙烯酰胺膠體於雷射螢光 DNA 自動定序儀進行基因型分析 (MegaBACE 500, Amersham Biosciences Ltd.) (國立台灣師範大學遺傳多樣性實驗室)；再以軟體 MegaBACE Genetic profile v.1.5 軟體分析其長度，推算出對偶基因座上的三核苷酸重複次數。

## 八、SCA8 CTG 重複擴增基因的選殖、定序

### (一) 自洋菜膠中純化擴增的 DNA 片段

由PCR所發現的較大SCA基因片段，經過含EtBr的 1.8%洋菜膠電泳分離後，在紫外光標示下切下所要的片段，置於 1.5 ml微離心管中，進行膠體純化(Gel extraction kit, Viogene)。純化步驟如下：加入 500  $\mu$ l GEX buffer後置於 60°C乾浴器中 10 分鐘，待膠體溶解，將溶液吸至純化用之管柱內，離心 14000 rpm 1 分鐘；去廢液，加入 500  $\mu$ l wash I buffer至管柱中，離心 14000 rpm 1 分鐘；去廢液，加入 700  $\mu$ l wash II buffer，離心 14000 rpm 1 分鐘；去廢液，再以 14000 rpm離心 1 分鐘後，將管柱移至另一 1.5 ml微離心管中，加入 20~30  $\mu$ l的 ddH<sub>2</sub>O，於室溫下靜置 10-30 分鐘，離心 14000 rpm 1 分鐘離下DNA，即完成純化。取 2  $\mu$ l純化後的DNA，以 1.8%洋菜膠體進行電泳檢查片段大小。

## (二)接合反應(Ligation)

在 5  $\mu$ l接合反應中，取 0.5  $\mu$ l (50 ng) pGEM-T Easy載體 (Promega)，加入適量上述純化的DNA片段、0.5  $\mu$ l (3U) T4 DNA ligase 及 0.5  $\mu$ l 10X buffer (300 mM Tris-HCl pH7.8 – 100 mM MgCl<sub>2</sub> – 100 mM DTT – 10 mM ATP)，混合均勻後置於 16°C作用隔夜，隔日置於熱循環儀中以 70°C作用 10 分鐘，終止T4 DNA ligase作用，並迅速置於冰上。

### (三)轉形勝任細胞(competent cell)之製備

接種大腸桿菌 TOP-10 F' (Invitrogen)菌落到 1 ml Luria Bertani (簡稱 LB)培養基中(10 g/l trypton - 5 g/l yeast extract - 10 g/l NaCl)，於 37°C、200 rpm 震盪培養。數小時後倒入 100 ml LB 中以 37°C、200 rpm 繼續震盪培養。隔夜後再倒入 1000 ml LB 中繼續培養約 3 ~ 4 小時 (OD600 = 0.5~0.7)。置於冰上 10 分鐘後，在 4°C 離心 4000 rpm 5 分鐘沉澱細胞，去上清液後再加入 250 ml 預冷之二次水懸浮細胞；在 4°C 離心 4500 rpm 5 分鐘沉澱細胞，去上清液後再加入 250 ml 預冷之二次水懸浮細胞；在 4°C 離心 5000 rpm 5 分鐘沉澱細胞，去上清液後再加入 250 ml 預冷之二次水懸浮細胞；在 4°C 離心 5000 rpm 5 分鐘沉澱細胞，去上清液。加入 1 ml 20% glycerol 懸浮細胞，即完成可用之轉形勝任細胞。分裝成每管 40  $\mu$ l 後，置於-70°C 保存備用。

### (四)細菌的轉形作用(transformation)

將轉形勝任細胞於冰上解凍，在 20  $\mu$ l 的細胞中加入 1 ~ 2  $\mu$ l 前述已完成接合反應的重組質體 DNA，均勻混合後，以 1.25 kV，25  $\mu$ F，200  $\Omega$  進行電穿孔(electroporation) (BIO-RAD，GENE PULSER II)，

完成轉形作用。然後加入預冷的 500  $\mu$ l LB，於 37°C 水浴槽培養 30 分鐘，再加入 50  $\mu$ l 的 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-Gal，20 mg/ml in dimethylformamide) 及 50  $\mu$ l 的 isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG，200 mg/ml)，混合均勻，吸取適量菌液至每盤含 50  $\mu$ g/ml 青黴素(ampicillin)之 LB 培養基中，以滅過菌的玻棒均勻塗抹菌液，培養皿置於 37°C 培養箱中培養 16 小時。

### (五)質體(Plasmid) DNA 的小量製備

以牙籤挑選出上述轉形作用生長出的白色單一菌落，劃在含青黴素之培養基中保留菌種，同時並置於含青黴素的 1 ml 培養液的 1.5 ml 微離心管內，於 37°C、250 rpm 震盪培養 8 小時~隔夜後，離心 14000 rpm 1 分鐘，除去上清液。以鹼性溶菌法分解細菌，抽取質體之 DNA。步驟如下：加入 70  $\mu$ l solution I (50 mM glucose – 25 mM Tris-HCl pH8.0 – 10 mM EDTA pH8.0)，vortex 以懸浮菌液；再加入 140  $\mu$ l 現配的 solution II (0.2 N NaOH – 1% SDS)，翻轉離心管三十次之後，加入 105  $\mu$ l solution III (3M potassium acetate)，再翻轉離心管三十次後，離心 14000 rpm 5 分鐘，此時可見白色的核酸沉澱物。去上清液，以 70  $\mu$ l 70% 酒精洗去鹽類，離心 14000 rpm 1 分鐘後吸乾。風乾後，加入 40  $\mu$ l 含 10  $\mu$ g/ml RNase 的 ddH<sub>2</sub>O，37°C 水浴 10 分鐘。最後取 2  $\mu$ l 進行

0.8%洋菜膠體電泳分析。挑選出有插入DNA片段的質體後，進一步以限制酵素檢查其插入片段是否正確。

## (六)定序分析

上述經內切酶後確認後之質體 DNA，以雷射螢光 DNA 自動定序儀(MegaBACE Analyzer，Molecular Dynamics, Division of Amersham Pharmacia Biotech)進行定序分析(國立台灣師範大學遺傳多樣性實驗室)，以了解 CTA/CTG 重複情形及是否有插入單個或多個 CCG、CTA、CTC、CCA、CTT 等情形發生。

若擴增片段質體很難選殖，則將包括 *SCA8* 基因 3'UTR (CTG)<sub>n</sub> 重複之 PCR 片段直接定序，以雷射螢光 DNA 自動定序儀(3730 DNA Sequencer，ABI)進行定序分析(源資國際生物科技股份有限公司)。

## 九、RT-PCR 分析淋巴細胞中 *SCA8*、*KLHL1* 基因的表現

培養正常人和 *SCA8* 基因 CTG 重複擴增患者淋巴細胞株，萃取 RNA、製備 cDNA 後，分別設計互補於 *SCA8* 和 *KLHL1* cDNA 上非重疊外顯子(exon)的 PCR 引子(圖四，表一)，進行 PCR 反應。PCR



結束後以 1.8%洋菜膠體電泳檢查 PCR 產物，來分析 SCA8 基因和 *KLHL1* 基因在淋巴細胞的表現。

## 十、Methylation specific PCR (MSP)分析

### (一) Sodium bisulfate 處理

選取正常人及CTG重複擴增患者DNA樣品，以sodium bisulfate處理，其步驟如下：準備 500 ng DNA在 1.5 ml微離心管中，加水至總體積為 30  $\mu$ l，以 95 $^{\circ}$ C加熱 5 分鐘後，迅速放到冰上，加入 15  $\mu$ l的 0.6N NaOH，37 $^{\circ}$ C水浴 15 分鐘，加入 402.75  $\mu$ l sodium bisulfate (3.35 M)及 2.25  $\mu$ l hydroquinone (100 mM) 以 50 $^{\circ}$ C水浴 16 hr (或 overnight)。次日，將樣本轉換至 microcon-50，離心 13000 rpm 6 分鐘，加入ddH<sub>2</sub>O 300  $\mu$ l清洗一次，13000 rpm離心 6 分鐘，加入 300  $\mu$ l 0.3N NaOH 後靜置 10 min，13000 rpm離心 6 分鐘，加入ddH<sub>2</sub>O 300  $\mu$ l 清洗、離心三次，將 40  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O點在膜上，靜置 15 分鐘後，將 microcon-50 倒轉，離心 10000 rpm 10 分鐘，將DNA離下，保存於-20 $^{\circ}$ C 備用。

### (二) Methylation specific PCR (MSP)

選取數位正常人 DNA 樣品，以甲基化酵素 *SssI* 處理，將 DNA 模板上未甲基化的 CpG 島加上甲基，作為甲基化的正控制組。正控制組及上述待檢測的正常人、*SCA8* 基因 CTG 重複擴增患者 DNA 樣品，以 sodium bisulfate 處理，將 DNA 模板上未甲基化的 C 轉化為 U。針對 sodium bisulfate 修飾後的 DNA，設計沒有甲基化的 U 引子(圖二 A，表一)、甲基化的 M 引子(圖二 B，表一)，進行甲基化的 PCR 反應 (Methylation specific PCR assay ; MSP)，反應後以 1.8% 洋菜膠體電泳檢查產物生成與否，來檢測原本 DNA 上的甲基化情形。

## 十一、Restriction enzyme based-methylation assay (RE-PCR)

利用辨識相同序列( $C^{\downarrow}CGG$ )的限制酵素 *HpaII*、*MspI* 對 CpG 上有甲基化的切割能力是否受影響(*HpaII* 無法切割有甲基化的 CpG，*MspI* 無論有否甲基化都可切割)，將樣品之 DNA 分別用此兩種酵素及只用切割反應緩衝液處理，而後使用針對 *SCA8-U*、*SCA8-M* 引子外圍區域設計之引子對 *SCA8-UMO*(圖二 C，表一) 放大該區域。PCR 結束後以 1.8% 洋菜膠體電泳檢查 PCR 產物，比較相同樣品之三種 PCR 結果，推知該樣品在此區域的甲基化程度。

## 十二、淋巴細胞株的氧化壓力研究

### (一) WST-1 細胞增生檢測(cell proliferation assay)

選取三位正常人(1729、1908、2105)和三位SCA8 基因CTG重複擴增患者(4999、844、3183)淋巴細胞，培養  $10^5$  細胞於 96 孔盤中(每個well含 200  $\mu$ l 不含胎牛血清之RPMI 1640 培養液)，6 小時後加入 0  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M 濃度之 t-butyl hydroperoxide solution (TBH, Sigma-Aldrich)，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下培養 22 小時後，加入 WST-1 試劑(每個well，20  $\mu$ l)，處理 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) 2 小時後，測 OD<sub>450 nm</sub>，檢測細胞存活率(cell viability)。

### (二) Trypan blue 排除檢測(exclusion assay)

將上述處理 TBH 之淋巴細胞，在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下培養 24 小時後，混勻後每個well取 20  $\mu$ l 的細胞，和 20  $\mu$ l 0.4% Trypan blue (Gibco) 混合 1 小時，在光學顯微鏡下分別計算活細胞(亮)及死細胞(藍色)數量，每個well重複取三次細胞計數。

### (三) Superoxide dismutase assay

將上述淋巴細胞培養於flask中( $5 \times 10^6$ 細胞在 10 ml不含血清之 RPMI 1640 培養液)，6 小時後以  $0 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 濃度之TBH處理，在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 環境下培養 24 小時後，離心收集細胞，以PBS清洗兩次後，加入  $40 \mu\text{l}$  Pefabloc SC solution ( $2 \text{ mM}$ , Merck)，連續冷凍解凍六次打破細胞， $4^\circ\text{C}$  離心  $14000 \text{ rpm}$ 、 $30 \text{ min}$ 後，轉移細胞液(cell lysate)至新管備用。使用RANSOD Kit (SD125, RANDOX)偵測superoxide dismutase活性。在 96 孔盤中進行反應，取  $5 \mu\text{l}$  lysate和  $170 \mu\text{l}$  substrate solution [ $0.05 \text{ mM}$  xanthine、 $0.025 \text{ mM}$  2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.)]及  $25 \mu\text{l}$  xanthine oxidase ( $80 \text{ U/l}$ )混和，過程在冰上操作，以減低反應進行速率。在  $37^\circ\text{C}$  水浴 30 秒後以Microplate Autoreader EL311 (Bio-Tek Instruments Inc.) 偵測 $\text{OD}_{490}$  (紅色formazan dye生成量，以 $A_1$ 表示)，接著在  $37^\circ\text{C}$  水浴 3 分鐘後再測一次 $\text{OD}_{490}$  (以 $A_2$ 表示)。Kit 所附的standard (superoxide dismutase,  $4 \text{ U/ml}$ )經系列稀釋後亦同時進行上述反應。Xanthine 在 xanthine oxidase 作用下生成的superoxide radicals，與I.N.T.形成紅色 formazan dye。Superoxide dismutase可轉變superoxide radicals為 $\text{O}_2$ 及  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，而抑制紅色formazan dye生成。Superoxide dismutase活性以抑制百分比(% inhibition)表示，其計算方法如下：

$$(A_2 - A_1) / 3 = \Delta A / \text{min of standard or sample}$$

$$\% \text{ inhibition} = 100 - (\Delta A_{\text{sample/min}} / \Delta A_{\text{std/min}}) \times 100$$