

結果與討論

1. clone 視蛋白

1.1. 退化 PCR 主產物

本實驗設計的Rh1 group退化引子為：

dRh1F: CCAYCTGATYAGCCCVTAYTGGAA

dRh1R: CARATSGTRTTCAGBGGSGTCA

以此對引子進行PCR，所得的產物DNA電泳結果顯示退化PCR主產物長度約840bp，在300bp、500bp及840bp-1000bp亦看到副產物的band (Fig. 2)。所謂退化的核苷酸序列是指在一段核苷酸序列上有一個至多個位置上是由數個可能的核苷酸所組成；在參考目標基因群保留區域設計退化引子時，不同的蛋白在此區不一定有一致的核苷酸序列一樣，故設計者在不一致的位置會以模糊密碼 (ambiguity codes) 取代一般遺傳密碼 (附錄一)，這樣在進行PCR時，退化引子才有較大的機會黏上目標物種內屬於該群蛋白的保留區核苷酸序列 (Wei *et al.* 2003)，與之相合的核苷酸片段再經由退化PCR放大，但因退化引子容易亂黏，造成了退化PCR產物經DNA電泳後有較大的機會看見多條band，而目標基因片段可能只是其中的一條或是多條，故設計者需經由退化引子黏在該群基因的核苷酸序列位置來推估退化PCR主產物長度；本實驗預估目標基因PCR產物長約800bp，故長約840bp的退化PCR主產物 (dBDRh1) 應為目標基因。

直接使用 Rh1 group 退化引子定序退化 PCR 主產物 (dBDRh1) DNA 片段，得到長度小於 300bp 的兩段核苷酸序列；定序結果為 5' 端 DNA 片段命名為 5'dBDRh1 (177bp) (Fig. 3A)，3'端 DNA 片段命名為 3'dBDRh1 (294bp) (Fig. 4A)，定序結果較短的原因可能是退化引子的黏著力遠較專一引子差，或亂黏導致核苷酸序列訊號讀取紊亂 (Williams and Kane 1993)。

將 5'dBDRh1、3'dBDRh1 DNA 片段之核苷酸序列至 NCBI 資料庫比對後顯示與果蠅屬物種及紅頭麗蠅的 Rh1 有 80-87% 的一致性 (Table. 1、2)，5'dBDRh1 相對位置在果蠅 *ninaE* (GenBank accession number NM_079683) 的第 2 個 exon 294-470bp (Fig. 3B)、3'dBDRh1 相對位置在果蠅 *ninaE* 的第 4 個 exon 799-1092bp (Fig. 4B)，推測定序片段的位置接近 Rh1 基因的兩端，以此兩端核苷酸序列設計專一引子進行 PCR，以 clone 中間 DNA 片段。

1.2 專一 PCR 產物

Rh1 group 專一引子為：

BDRh1F: ATGGCGTGGTGATTTATATATTCT

BDRh1R: TCATTTTCTTGGCTTGTTTCG

以此對引子進行 PCR，得專一 PCR 產物 BDRh1 DNA 片段長約 550bp (Fig. 5)，DNA 定序後得到 501bp 序列，和前述 5'dBDRh1、3'dBDRh1 的核苷酸序列作連結，可見 5'dBDRh1 125-177 個核苷酸和

BDRh1 1-53個核苷酸重疊 (Fig. 6A) ; 3'dBDRh1 3-120個核苷酸和 BDRh1 385-501個核苷酸重疊 (Fig. 6B) ; 連結此3段序列後得到長 702bp之部分核苷酸序列BDRh1ps (BDRh1 partial sequence) (Fig. 7) 。

至 NCBI 資料庫比對，BDRh1ps DNA 片段之核苷酸序列和果蠅屬物種及紅頭麗蠅的 Rh1 核苷酸序列有 81-82%的一致性 (Table. 3) , 相對位置在果蠅 *ninaE* 核苷酸序列 321-1022bp (Fig. 8) 。後續再進行 5'-RACE、3'-RACE 以獲得完整基因 DNA 片段之核苷酸序列。

1.3 RACE

改良 Molecular cloning (Sambrook and Russell, 2001) 中 RACE 的實驗步驟，除了簡化 RACE 實驗操作過程外，將實驗步驟轉移到 cDNA 階層來進行，以減少實驗中 RNA degrade 的機會。

進行 RT 反應後，mRNA 的 5'端轉變成 cDNA 的 3'端；mRNA 的 3'端轉變成 cDNA 的 5'端。

5'-RACE 實驗利用 TdT 在 3' cDNA 外加 poly (A) tail，再由 oligo (dT)引子黏合，配合由 BDRh1ps DNA 片段核苷酸序列設計的專一引子即可經由 PCR 放大 mRNA 的 5'端 (Fig. 9A) 。

3'-RACE 實驗利用 cDNA 的 5'端為 poly (T) tail，以 BDRh1ps DNA 片段核苷酸序列設計的專一引子配合 oligo dT 引子經由 PCR 即

可放大 mRNA 的 3'端 (Fig. 9B)。

將 5'-RACE、3'-RACE 產物轉到菌中，經 colony PCR、跑 DNA 電泳 (Fig. 10) 鑑定出含有目標基因 DNA 片段的菌落，定序後分析結果，將之與 BDRh1ps DNA 片段相連，得到”完整片段” BDRh1fs (BDRh1 full sequence)。

1.4 BDRh1 分析

BDRh1fs DNA 片段之核苷酸序列送至 NCBI 資料庫比對後顯示其和果蠅屬物種及紅頭麗蠅的 Rh1 核苷酸序列有 79-83% 的一致性 (Table. 4)，此結果和之前分析的退化引子產物及專一引子產物相同，支持 BDRh1fs 屬於 Rh1 視蛋白家族的一員。

將 BDRh1fs DNA 片段之核苷酸序列轉譯成胺基酸序列後得到 369 個胺基酸，啟動密碼在第 193-195 個核苷酸，終止密碼在第 1302-1304 個核苷酸 (Fig. 11A)，至 NCBI 資料庫將此胺基酸序列比對，conserved domain search (Marchler-Bauer *et al.* 2003) 發現它屬於 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) 的一員，blastp 列出了和 BDRh1fs 相合的不同物種蛋白質胺基酸序列，在與果蠅屬及紅頭麗蠅的 Rh1 視蛋白的一致性高達 89-94% (Table. 5)，故不論是在核苷酸或胺基酸階層，兩者皆支持 BDRh1fs 屬於 Rh1 視蛋白的一員。核苷酸階層的一致性較胺基酸階層為低顯示 BDRh1fs 在核苷酸階層變異

的幅度比胺基酸階層來的大；突變只要發生在不會使蛋白質原有功能喪失的地方就有機會保留下來，像是 silent mutation，故胺基酸序列的變化程度會較核苷酸序列的變化程度為低；目前視蛋白的研究普遍認為視蛋白的胺基酸序列會影響該視蛋白的感光偏好，所以 BDRh1fs 和果蠅 NinaE (GenBank accession number P06002) 及紅頭麗蠅 Rh1 視蛋白 (GenBank accession number P22269) 在胺基酸序列的些微差異，表示他們之間的感光偏好稍有不同，差距可能只是幾個 nm 波長，像是果蠅的 NinaE 感光偏好在 486nm (Salcedo *et al.* 1999)，而紅頭麗蠅的 Rh1 則在 488nm (Huber *et al.* 1990)，依 Wu (2003) 的胞內記錄結果推測 BDRh1fs 的感光偏好約 490nm。

使用”InterProScan” (Zdobnov and Apweiler 2001) 分析 BDRh1fs 蛋白質功能，結果顯示 BDRh1fs 屬於 7 transmembrane receptor (rhodopsin family) (Pfam accession number pfam00001) 的成員；再以”GeneQiz” (Iliopoulos *et al.* 2000) 分析，在”Functional information” 方面，判斷 BDRh1fs 可能為 Opsin Rh1 (Outer R1-R6 photoreceptor cells opsin)，且預測 BDRh1fs 胺基酸序列中存在著蛋白質功能相關的保留區 (Table. 6)，綜合以上分析結果可歸納出：BDRh1fs 為 Rh1 視蛋白的一員，並擁有和 Rh1 視蛋白功能相關的保留區。

BDRh1fs 和果蠅 ninaE 在 Rhodopsin-like GPCR superfamily 家族

(InterPro accession number IPR000276)、Opsin 家族 (InterPro accession number IPR001760)、Opsin RH1/RH2 家族 (InterPro accession number IPR001735) 的保留區域比對：與 Rhodopsin-like GPCR superfamily 家族的保留區域 (位於果蠅 NinaE 的 52-337aa) 比較後發現有 93% 的一致性、95% 的相似性。與 Opsin 家族的保留區域 (位於果蠅 NinaE 的 (1) 73-85aa、(2) 187-199aa、(3) 308-329aa) 比較後發現幾乎完全相同，只在第一區域 (1)，果蠅的第 76 個胺基酸為 A，BDRh1fs 為 S，但 A、S 同為 Tiny 類胺基酸，故可說兩者序列仍十分相似 (Table. 7)。與 Opsin RH1/RH2 家族的保留區域 (位於果蠅 NinaE 的 (1) 22-37aa、(2) 38-53aa、(3) 100-115aa、(4) 262-273aa、(5) 295-307aa、(6) 340-356aa、(7) 360-372aa) 比較後發現幾乎完全相同，只在第一、第七區域稍有不同 (Table. 8)。以果蠅的 NinaE 為模版，推測 BDRh1fs 的二級結構並進行比較分析，發現除在第一個胞外區域及第四個透膜區域有一致性較低 (73.5-75%) 的情形外，其餘區域都有 85.7-100% 的一致性 (Table. 9)。綜合上述結果證明在保留區域上，兩者的胺基酸序列幾乎完全相同，並推測差異程度稍大的區域可能就是造成感光偏好具些微差異的原因。

Fig. 12 是在比較 Opsin RH1/RH2 家族中不同物種的視蛋白核苷

酸序列及胺基酸序列後繪製的親緣關係樹，第一次分支有 100 的 bootstrap 值支持 Rh1 分支群、Rh2 分支群、Rh6 和 Megopsin1 三分支群分開，之後在 Rh1 分支群內有 100 的 bootstrap 值支持東方果實蠅和果蠅屬分支群在一起，而和紅頭麗蠅的 Rh1 分開；故本實驗 clone 得到的 BDRh1fs 屬於 Rh1 分支群，依照柑橘鳳蝶視蛋白的命名方式將 BDRh1fs 命名為 BdoRh1 (AY575956)，並假設其感光偏好在約 490nm 藍綠光區，定義 BdoRh1 為『藍綠光敏感的視蛋白』。

視蛋白上與功能相關的胺基酸序列均相當保守 (Huber *et al.* 1990、Gao *et al.* 2000、Shimizu *et al.* 2001 及 Vanhoutte *et al.* 2002)，故推測 BdoRh1 上與功能相關的胺基酸序列必定相當保守 (Fig. 11B)。所有已報導的視蛋白都保留位在第七透膜區的 Lys，因其可藉由 Schiff base 和色基相連以形成視紫質，而 BdoRh1 第七透膜區也有一個 Lys, K³¹⁵；所有已報導的無脊椎動物綠光和藍光偏好視蛋白與牛 (*Bos taurus*) 視蛋白 (GenBank accession number P02699) 比對，與牛視蛋白的 Gln¹¹² 相對齊的胺基酸均為 Tyr，而 BdoRh1 也有 Tyr, Y¹²²；位在 N 端的 Asn 是潛在的 N 端糖基化位點 (N-glycosylation sites)，此部分參與訊息傳導，而在 BdoRh1 N 端也有 Asn, N¹⁶，另外在第二個胞外環的 Asn, N¹⁹²、C 端的 Asn, N³⁶³ 也是潛在的糖基化位點；C 端的 Ser 和 Thr 為 arrestin-mediated opsin phosphorylation by

kinase 的目標胺基酸，所以在所有視蛋白該區也是保留的，BdoRh1 也保留該部分；視蛋白的第一與第二胞外環各有一個 Cys，可形成 disulphide bridge 讓視蛋白正確的疊合以維持視蛋白的穩定及維持其功能，而 BdoRh1 第一及第二胞外環也有 Cys, C¹¹⁹、Cys, C¹⁹⁶ 這兩個胺基酸；無脊椎動物視蛋白具有高度保留的第二胞內環 DRY motif 及第三胞內環 HEK、QAKKMNV motif，他們負責和 G-protein 相連，而 BdoRh1 也有保留位於上述位置的 motif；C 端一連串的 Cys 被認為會被棕櫚酸化（palmitoylate）進入細胞膜以形成第四胞內環（329-339aa），BdoRh1 在 C 端也有 C³⁴⁰PC³⁴²C³⁴³（Fig. 11B）；綜合上述比較結果，BdoRh1 在各個保留區域皆有保留，支持 BdoRh1 為藍光感光偏好視蛋白。

因為視蛋白家族具有專一的啟動子，使其只在果蠅的複眼及單眼表現，且又因視蛋白分佈主要在 RNA 階層調節（Cook and Desplan 2001）；欲證明 BdoRh1 是否真為藍光感光偏好視蛋白，我們必需測定 BdoRh1 在複眼視覺相關細胞及身體其他部分的 RNA 表現量是否有差異以支持上述論點。

2 複眼和身體其他部分的 BdoRh1 表現量比較

使用NCBI資料庫（09/24/03）尋找東方果實蠅housekeeping gene，比對後選擇葡萄糖六磷酸鹽脫氫酶（G6PD, Glucose 6-phosphate

dehydrogenase) 為內控制組；G6PD 為磷酸五碳醣路線 (pentose phosphate pathway) 中的酵素，可將葡萄糖六磷酸鹽 (glucose-6-phosphate) 轉換成 6-phosphogluconolactone 並生成 NADPH；其在 NCBI 資料庫有兩段部分序列，分別為東方果實蠅 Amami-oshima 品系的 G6PD (GenBank accession number ABO21909) 及東方果實蠅 Ogasawara 品系的 G6PD (GenBank accession number ABO21910)，而本次實驗選擇以東方果實蠅 Amami-oshima 品系的 G6PD 作模版設計專一引子，將 5' 端引子設計在 intron 和 exon 的交界處，3' 端引子設計在第二個 exon 內，此確保專一 PCR 產物確實來自 RNA 階層而非 DNA 階層；設計的專一引子為 G6PDF: ACATGAAGGTACAACCACACA、G6PDR: ATGCGATTACAATTGGAATG，以此進行內控制組 G6PD PCR，其專一 PCR 產物長度為 151bp。

因身體其他部分的 RT 反應產物濃度較複眼視覺相關細胞的 RT 反應產物濃度為高，故選用身體其他部分的 RT 反應產物來測定內控制組 G6PD PCR 適當的循環次數，得其值為 35 次循環 (Fig. 13A)；因 BdoRh1 預設為 Rh1 視蛋白，故其在複眼的 RNA 表現量應該遠較身體其他部位為多，故選用複眼視覺相關細胞的 RT 反應產物測定 Rh1 group 專一 PCR 適當的循環次數，得其值為 25 次循環 (Fig. 13B)。

分別3隻東方果實蠅雌蟲複眼視覺相關細胞及身體其他部分 total RNA 粹取液依照上述測得的 PCR 循環次數進行 PCR，結果顯示：BdoRh1 明顯的在複眼視覺相關細胞表現，且其表現量遠多於身體其他部分 (Fig. 14)，更可確定 BdoRh1 確實為 Rh1 視蛋白的一員。

雖然知道 BdoRh1 為 Rh1 視蛋白的一員，且主要在複眼視覺相關細胞表現，但是否跟其他 Rh1 視蛋白表現在外圍的 6 個光感受器細胞 (O'Tousa *et al.* 1985; Huber *et al.* 1990)；所以進一步以免疫細胞螢光染色法定出 BdoRh1 的表現位置。

3 細胞免疫化學染色

Arikawa 等人 (1990) 利用 phalloidin (一種自毒蕈粹取出來的物質) 具有連結 filamentous actin (F-actin) 的特性，證明果蠅光感受器的桿小體微絨毛內含有 F-actin，故本實驗以 phalloidin-FITC 定出東方果實蠅光感受器細胞桿小體微絨毛的位置 (Fig. 15A)，圖中從視細胞遠端開始向後延伸的綠色螢光條狀部分為桿小體微絨毛的位置；利用果蠅 Rh1 專一抗體-具 Rh1 專一抗原特性 (de Couet and Tanimura 1987) -定出潛在位置，在 Fig. 15B 發出紅色螢光 6 條桿小體微絨毛即 Rh1-like protein 的分佈位置；同時東方果實蠅胞內記錄測得感光偏好在 490nm 的光感受器被記錄到的次數最多 (Wu 2003)，這表示感光偏好在 490nm 的光感受器細胞數量是最多的；再加上比較果蠅、

麗蠅 Rh1 的表現位置 (O'Tousa *et al.* 1985; Huber *et al.* 1990) 後，更能提出 BdoRh1 應位在外圍 6 個光感受器細胞的桿小體微絨毛上。

雖然知道 BdoRh1 的表現位置，但是否和果蠅視蛋白一樣，只從蛹期末期才開始大量表現 (Cook and Desplan 2001)，則進一步進行測試。

4 不同發育時期 BdoRh1 表現情形

4.1 不同發育時期複眼的發生情形

觀察不同時期的東方果實蠅頭部發育情形，P3、P4 期頭部複眼形狀發育趨完整，仍未有色素產生；P5 期產生 screening pigment 使複眼呈黃色；P6 期除部分區域仍呈黃色外，因其他色素的生成而使複眼在某些區域呈橘黃色；P7 期頭部已可見兩個巨大橘紅色的複眼；P8、P9 期照光時如同成蟲 A1 期的複眼會散射光線，綠色反射光在照光的中央區域、其外圍一圈小眼構成藍色反射光區域，紅色反色光區域位在藍色反射光區域外 (Fig. 16)。

4.2 不同發育時期 BdoRh1 表現情形

Fig. 17 顯示不同發育時期 BdoRh1 表現的情形，L5、LJ、P3-P7 期都沒有表現，從 P8 期才開始大量的表現，故 BdoRh1 和果蠅視蛋白一樣，只從蛹期末期才開始大量表現 (Cook and Desplan 2001)。

5 總結

Clone 出的 BdoRh1 為感光偏好約 490nm 的 Rh1 視蛋白，從發育末期（複眼發育幾近完成時）開始表現，其蛋白質位於小眼外圍 6 個光感受器細胞的桿小體微絨毛上。

6 後續檢討

6.1 退化引子設計的問題

本實驗曾同時以不同的退化 PCR 嘗試 clone Rh2-Rh6、UV 類、lateral eye 類的視蛋白，但只有 Rh1 group 退化引子成功，其他對的退化引子均失敗，分析其原因可能為：（1）退化引子設計不良。由於提供分析的序列不夠保留（不論是核苷酸序列或是胺基酸序列），導致軟體（像是 *Genefisher*）運算後所得到的退化引子使用在東方果實蠅上並未達預期效果，或因計算退化引子的 Tm 值的方式不適當，與實際 Tm 值差距過大，而造成 PCR 放大不易的問題。（2）東方果實蠅和果蠅的小眼在感光偏好上略有不同。Harris 等人（1976）記錄果蠅 R7 視細胞的感光偏好在紫外光-370nm，Salcedo 等人（1999）證明表現的視蛋白 Rh3、Rh4 吸光偏好在 331 及 355nm，而東方果實蠅感受紫外光的小眼其敏感的波峰在 350、370 及 380nm（Wu 2003），如這些些微的感光差距可能是在於東方果實蠅負責該感光偏好的視蛋白和果蠅的 Rh3、Rh4 視蛋白在胺基酸序列上有些不同，而設計的

退化引子又剛好黏在該位置上，造成退化 PCR 產物跑 DNA 電泳後的 band pattern 不理想。(3) 設計方向錯誤。由於實驗一開始時設想：『所有視蛋白序列在果蠅和東方果實蠅是相似的』，但經過此次實驗發現有問題，故改為『不論物種，找出感光偏好相似的對應視蛋白』來設計 primer 可能較適當些。

6.2 使用果蠅 Rh1 專一抗體的理由

視覺研究從過去到現在，一直都有使用非研究物種的視蛋白或其他視覺相關基因的抗體或探針試探該物種是否具有該視蛋白或其他視覺相關基因，以探究其視覺能力，像是使用抗牛視紫質之抗體觀察雞的視網膜中表現該類視蛋白的細胞；使用輻射標定的對牛視蛋白之 RNA 探針尋找火焰蠓螈 (*Notophthalmus viridescens*) 在視網膜表現視蛋白的區域；使用抗牛視蛋白之多株抗體研究纖毛蟲 (*Fabrea salina*) 感光反應的視蛋白；使用抗哺乳類藍光錐狀細胞視蛋白之單株抗體、抗兩生類到哺乳類紅光、綠光錐狀細胞視蛋白之單株抗體、抗雞感光受器膜之單株抗體、抗牛視蛋白之單株及多株抗體及抗雞松果體視蛋白之抗體研究這些視覺色素在洞螈 (*Proteus anguinus*) 已退化的眼及其松果體的位置；使用 calmodulin 抗體看鱈 (*Limulus polyphemus*) 的 calmodulin 在光感受器的分佈位置；使用抗牛視蛋白之抗體找出爪蟾 (*Xenopus*) 蝌蚪尾鰭的感光視蛋白 (Araki et al. 1984;

Bugra *et al.* 1992; Podesta *et al.* 1994; Kos *et al.* 2001; Battelle *et al.* 2001; Miyashita *et al.* 2001) ，而本次實驗則是先得到 BdoRh1 再利用 Rh1 專一抗體的特性以定出 BdoRh1 的位置，此雖與前述實驗的進程不同，但結果是一致的。

7 未來工作

將轉殖 BdoRh1 核苷酸序列至果蠅 *ninaE* 突變株，使其性狀轉變後再利用電生理方式測量此轉殖果蠅之 R1-R6 視細胞表現的 BdoRh1 感光偏好，以確認 BdoRh1 在東方果實蠅所扮演的生理角色。另外擬建立東方果實蠅的 cDNA 基因庫 (cDNA library) ，再以 BdoRh1 核苷酸序列中 Opsin 家族的保留區域部分設計的專一引子來鈎取其他視基因，並進一步研究其和東方果實蠅視覺的關連。