

參、研究材料與方法



一、擴大建立 *PPP2R2B* 基因 5'端 CAG 重複片段的遺傳資料庫

(一)研究樣品

經診斷判斷無神經退化性疾病的正常人(222 位)及運動失調症(16 位)、失智症(146 位)、帕金森氏症(156 位)、原發性顫抖症(102 位)、舞蹈症及肌張力異常症(45 位)等患者的血液或DNA樣本由林口長庚紀念醫院神經內科吳逸如醫師、陳瓊美醫師提供，血液樣本的採集均由本人或家屬同意。

(二)基因組 DNA(genomic DNA)的萃取

利用DNA Extraction solution (Stratagene)，步驟如下：將 4 ~ 6 ml 的全血置於 15 ml 離心管中，加入solution I至 15 ml，翻轉數次使混合均勻；置於冰上 5 ~ 10 分鐘，以 2,000 rpm離心 5 分鐘沉澱細胞核；倒去上清液，加入 2 ml solution II，震盪使核沉澱懸浮，再加入 10 μ l proteinase K，於 37°C 水浴槽作用隔夜或數天；自水浴槽拿出後，加入 0.8 ml solution III，放置冰上 5 分鐘，以 3,400 rpm離心 5 分鐘；取

上清液，加入 5 μ l RNase，37°C 水浴 15 分鐘，再加進 2.5 ml isopropanal，輕晃使DNA析出，將析出的DNA轉到微量離心管，以 14,000 rpm離心 1 分鐘沉澱出DNA；去上清液，加入 0.5 ml 75% 酒精清洗，再以 14,000 rpm離心 1 分鐘，風乾後溶於適量ddH₂O中；以 OD₂₆₀吸光值測定DNA濃度，稀釋成 50 ng/ μ l濃度，置於 4°C 冰箱備用。

(三)聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction，簡稱 PCR)

取 100 ng的基因組DNA，置於 25 μ l的PCR反應中，反應溶液中包括 50 ng的引子對(5'-tamra-TGCTGGGAAAGAGTCGTGA、5'-GCCAGCGCACTCACCTC)、1.0 mM MgCl₂、200 μ M dNTPs、10% DMSO、0.5 U熱穩定性DNA聚合酵素(Promega)。PCR以熱循環儀(PC708, ASTEC)進行，反應條件為 94°C 6 分鐘使DNA雙股裂解，接著以循環式的裂解溫度 94°C 30 秒、煉合溫度 56°C 45 秒及延長溫度 72°C 45 秒作用 45 個循環，最後以 72°C作用 10 分鐘，來放大包含 *PPP2R2B*基因CAG三核苷重複的片段。反應完畢後以洋菜膠體電泳檢查片段大小。

(四)基因型分析 (genotyping)

取 1 μ l 的 PCR 產物，以 1 : 8 比例用水稀釋，再以聚丙烯醯胺膠體於雷射螢光 DNA 自動定序儀進行基因型分析(MegaBACE Analyzer，Molecular Dynamics, Division of Amersham Pharmacia Biotech)(國立台灣師範大學遺傳多樣性實驗室)，並利用 MegaBACE Genetic profile v.1.5 軟體分析比對基因型，推算出三核苷酸重複次數。此外也將片段選殖進入 pGEM-T Easy 質體中定序檢查，來確認多型性長度和 CAG 重複次數的相關性。

二、分析 *PPP2R2B* 啟動子多型性與阿茲海默氏症、原發性顫抖症感受性相關性

(一)研究樣品及基因組 DNA 的萃取

正常人(157 位)、阿茲海默氏症患者(220 位)及原發性顫抖症患者(96 位)血液樣本來源及基因組DNA的萃取如上述。正常人的年齡範圍、平均年齡、女性百分比分別為 48 ~ 85、 64.6 ± 9.0 、51.6%；阿茲海默氏症患者的年齡範圍、平均年齡、女性百分比分別為 38 ~ 104、 75.2 ± 8.8 、61.8%；原發性顫抖症患者的年齡範圍、平均年齡、女性百分比分別為 15 ~ 84、 59.2 ± 18.7 、45.8%。

(二) 聚合酶連鎖反應

取 100 ng 的基因組 DNA，置於 25 μ l 的 PCR 反應中，放大包含 *PPP2R2B* 基因啓動子 SNPs (-3170 C/T、-2923 A/G、-1905 T//A、-428 A/G) 的片段。PCR 反應的引子對及條件列於表一。反應完成後以 1.8% 洋菜膠體電泳檢查片段大小。

(三) 限制酶片段長度多型性分析 (restriction fragment length polymorphism，簡稱 RFLP)

取 2 μ l PCR 放大產物，加入表一所述的檢查各多型性點的限制酵素 (1 ~ 2 U)、1 μ l 10 \times 緩衝溶液，以 ddH₂O 補總體積至 10 μ l，均勻混合後置於適溫水浴槽中反應 2 小時或隔夜。之後以 1.8% ~ 2.2% 洋菜膠體電泳檢查片段大小，檢查各樣品的多型性基因型。

(四) 單股構象多型性分析 (single strand conformation polymorphism，簡稱 SSCP)

設計螢光正向引子 (5'-fam-GTTCTCAAGTTCAGGCGTCC)，以 PCR 增幅 -428 A/G 多型性。取 3 μ l 的 PCR 產物，加入 3.5 μ l 之 95 %

formamide 染液，混合後於 95°C 下處理 5 分鐘，迅速置於冰上。快速離心後吸取 5 μ l 至 GeneGel Excel 12.5/24 膠片(Pharmacia Biotech)，於 8°C 下的 Genephor 電泳槽，以 600 V、25 mA、15 W 進行電泳 1.5 小時。電泳結束後，以 Typhoon 9410 以波長 488nm 的藍色螢光擷取影像。

(五)統計分析

計算各樣品群多型性基因型數目，利用Chi-square test (χ^2)檢測正常人族群各多型性點是否符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)，並檢測多型性基因型分佈、等位基因頻率，在阿茲海默氏症族群或原發性顫抖症與正常人族群間，是否有顯著差異。另依據基因計算方法(Hill, 1974)，將各多型性基因型兩兩配對進行單套型分析，再以 χ^2 檢測觀察值與預期值間是否具有顯著性差異，以檢驗多型性點間的連鎖不平衡情形。

使用 SNPSpD 線上軟體 (<http://genepi.qimr.edu.au/general/daleN-/SNPSpD/>) (Nyholt, 2004)來校正多重SNP檢測。此方法的基礎是計算出各pairwise SNP之間連鎖不平衡(linkage disequilibrium，簡稱LD)關係，得到一個調整過的第一型統計誤差為 5%的顯著性閾值，做為判

別顯著性的 α 值(本研究中為 0.016)。利用LDMAX軟體的GOLD Command Line Tools package (Abecasis and Cookson, 2000)，計算各 pairwise SNP 間的 Lewontin's 標準化不平衡係數 D' (Lewontin's standardized disequilibrium coefficient)、squared pairwise correlations (Δ^2)及 eigenvalues (λ_s)。使用PHASE軟體(version 2.1) (Stephens *et al.*, 2001)，來預估多型性的單套型頻率，並用JMP 5.1 軟體計算出罹病的相對危險程度(Odds ratio)。

三、*PPP2R2B* 基因遠端啓動子片段的選殖與定序

(一)啓動子片段選殖及質體構築

選取一正常人的DNA樣品(包含 16 個CAG重複)，利用PCR以引子對 (5'-TTGATGATGGTGATGATGACGAAAGTA 、 5'-CCTGAAC-TTGAGAACAGCAAAGAGA)放大包含*PPP2R2B*基因啓動子-4070 ~ -476 的 3595 bp片段(56°C 煉合溫度、3 mM MgCl₂)，並選殖於pGEM-T Easy載體中，所選殖片段經DNA定序(源資國際生物科技)確定序列無誤。以限制酵素*EcoRI* (位於pGEM-T Easy質體的MCS)、*HindIII*，切出包含*PPP2R2B*基因啓動子-4070 ~ -615 的 3456 bp片段，與 pGL3-TK/*PPP2R2B*-(CAG)₁₆質體(侯，2005)上包含啓動子-614 ~ +23

(包含 16 個CAG重複，+1 為NM_004576 B β 1 mRNA的第一個鹼基)的 637 bp *Hind*III、*Eco*RI (位於pGEM-T Easy質體的MCS)片段，一起置入pGEM-T Easy載體的*Eco*RI位置，即可將*PPP2R2B*基因啓動子-4070 ~ +23 的 4093 bp 片段 (圖一A) 選殖於 pGEM-T Easy 載體 (pGEM-T-B β 1)。再將上述啓動子片段置入增添 *Eco*RI切位及 HSV-TK-*Renilla luciferase*的pGL3-TK質體(圖一B) (侯，2005)的firefly luciferase 基因前，來檢測其啓動子活性。所構築的重組質體 pGL3-TK-B β 1，包含作為內在對照組HSV-TK-*Renilla luciferase*基因。上述構築好的、pGL3-TK-B β 1、pGL3-TK/*PPP2R2B*-(CAG)₁₆ (侯，2005) 重組質體，經限制酵素*Eco*RI、*Hind*III切割確認之。

(二) (CAG)低重複啓動子片段選殖及質體構築

選取分別含有(CAG)₅、(CAG)₆的病人DNA 樣本，利用PCR以引子對(5'-ACCTAACGGAGAGGCTGCAA、5'-TCACCCCCTACGAT GAACCTG)放大包含*PPP2R2B*基因啓動子-870 ~ +23 的片段(54°C 煉合溫度、1 mM MgCl₂)，並選殖於pGEM-T Easy載體中，所選殖片段經DNA定序(源資國際生物科技)確定序列無誤。以限制酵素*Eco*RI (位於pGEM-T Easy質體的MCS)、*Nae*I，切出包含*PPP2R2B*基因啓動子

-870 ~ -50 的 821 bp 片段，置換 pGL3-TK/PPP2R2B 質體(侯，2005)上相對應的片段，即完成 pGL3-TK-PPP2R2B(CAG)₅、pGL3-TK-PPP2R2B(CAG)₆ 之質體製備，來檢測特別短之 CAG 重複片段與正常 CAG 重複片段的啓動子活性差異，上述構築好的重組質體，經限制酵素 *EcoRI*、*HindIII* 切割確認之。

(三)自洋菜膠中純化 DNA 片段

上述選殖用的 DNA 片段，以含有 EtBr (0.25 µg/ml) 的 1% 洋菜膠體電泳分離後，於紫外光下切下該片段，置於 1.5 ml 離心管中，加入 500 µl GEX buffer (Gel extraction kit, Viogene)，置於 65°C 乾浴器加熱 10 分鐘，使膠體溶解。將溶解後的膠體轉移到純化管柱中以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。去除離心後的液體，加入 500 µl wash I 緩衝液以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。去除離心後的液體，再加入 700 µl wash II 緩衝液，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。去除離心後的液體，再以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，瀝去多餘液體。將管柱移至另一 1.5 ml 離心管中，加入 20 ~ 40 µl ddH₂O，於室溫下靜置 10 ~ 15 分鐘，再以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，即完成純化。最後取 2 µl 純化後的 DNA，以洋菜膠體電泳檢查。

(四)接合反應 (Ligation)

總體積 5 μ l 接合反應中，取適量的 25 ng pGEM-T Easy 載體 (Promega)，加入適量經純化處理的 DNA 片段(載體與插入片段之分子數比約為 1:5)、0.5 μ l T4 DNA Ligase (1.5 U) 及 0.5 μ l 10X buffer (300 mM Tris - HCl pH7.8 - 100 mM MgCl₂ - 100 mM DTT - 10 mM ATP)，混合均勻後置於 16°C 隔夜。將作用完成的反應置於 65°C 乾浴器中作用 10 分鐘，終止 T4 DNA Ligase 作用，並迅速置於冰上。

(五) 轉型勝任細胞(competent cell)製備

將大腸桿菌 TOP-10F' (Invitrogen) 菌落接種到 1 ml Luria Bertani (簡稱 LB) 培養基中(10 g/l tryptone - 5 g/l yeast extract - 10 g/l NaCl)，於 37°C、200 rpm 震盪培養。隔夜後倒入 50 ml LB 中繼續培養約 3~4 小時後倒入 100 ml 含四環素的 LB 中繼續培養。隔夜將 100 ml 菌液分裝 25 ml 至四個錐形瓶中，每瓶已裝 225 ml LB(內含四環素)，繼續培養約 4~5 小時(OD₆₀₀ = 0.7)。置冰上 10 分鐘，以 4°C、4,000 rpm 離心 5 分鐘以沉澱細胞，去除上清液後加入 250 ml 預冷之二次水以懸浮細胞。再以 4°C、4,500 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後再加入 250 ml 預冷之二次水以懸浮細胞。接著以 4°C、5,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後加入 250 ml 預冷之二次水以懸浮細胞。最後以 4°C、5,500

rpm離心 5 分鐘，棄去上清液後加入 1 ml 20 % glycerol以懸浮細胞，即完成可用之轉形勝任細胞製備。分裝成每管 40 μ l後，測定其轉形效率達 1×10^7 菌落/ μ g pGEM4 DNA以上，即置於-80 $^{\circ}$ C 保存備用。

(六)細菌的轉型作用 (Transformation)

將保存於-80 $^{\circ}$ C的轉形勝任細胞於冰上解凍，在 20 μ l 的細菌中加入適量已完成接合反應的重組質體 DNA，均勻混合後，以 1.25 kV、25 μ F、200 Ω 進行電穿孔(electroporation)的轉型作用(BIO-RAD, GENE PULSER II)，並儘快加入預冷的 500 μ l LB，再移至 37 $^{\circ}$ C 水浴槽培養 10 ~ 30 分鐘。水浴完後混合均勻，吸取 100 μ l、150 μ l、250 μ l 至每盤含 50 μ g/ml 青黴素(ampicilin)之 LB 培養基中，最後以滅過菌的玻璃棒將菌液均勻塗抹，並將培養皿置於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中培養 16 ~ 18 小時。若選殖 PCR 片段，須再加入 50 μ l 的 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside，20 mg/ml in dimethylformamide)及 50 μ l 的 IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside，200 mg/ml)，PCR 片段置入的菌落呈白色，反之呈藍色。

(七)質體 DNA 的小量製備與 DNA 定序

以牙籤挑選出前述轉型作用生長出的菌落，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 培養液中，於 37°C、250 rpm 震盪培養。培養 6 至 8 小時之後以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液。以鹼性溶菌法分解細菌，抽取質體之 DNA。其步驟如下：加入 70 μ l solution I (50 mM glucose - 25 mM Tris-HCl pH 8.0 - 10 mM EDTA pH 8.0)，劇烈震盪以懸浮菌液；再加入 140 μ l 新鮮配製的 solution II (0.2 N NaOH - 1 % SDS)，溫和翻轉離心管數十次之後，加入 105 μ l solution III (3 M potassium acetate)，再溫和翻轉小管數十次至看到白色絲狀物，以 14,000 rpm 離心 10 分鐘沈澱細胞碎片。取含有核酸的上清液，加入 0.8 倍體積的異丙醇(2-propanol)，溫和混合後，以 14,000 rpm 離心 1 分鐘，即可看到白色的核酸沉澱物。去除上清液，以 70 % 的酒精清洗多餘的鹽類。風乾後，將沈澱物溶於 40 μ l 含 10 μ g/ml RNase 的 ddH₂O 中，37°C 水浴 10 分鐘幫助核酸溶解並去除 RNA，之後取 2 μ l 進行 0.8 % 洋菜膠體電泳分析。挑選出有插入片段或正確大小的質體，以限制酶檢查其插入片段或結構的正確性，再送 DNA 定序分析(源資生物科技公司)，以確定 CAG 重複次數及序列的正確性，即完成 *PPP2R2B* 基因啓動子片段的選殖及定序。

(八)質體 DNA 的大量製備及純化

經定序分析或限制酶切割確認序列及結構的正確性後，將挑選初質體之菌落培養於含ampicilin的 1 ml培養液中，37°C、250 rpm震盪培養 2 小時以上，倒入 65 ml含ampicilin的培養液，繼續培養 16 ~ 18 小時。之後利用 Viogene Ultrapure Plasmid Midiprep System (Midiprep-V100)進行質體DNA的大量製備及純化。方法為：將 65 ml 的菌液，以 8,000 rpm離心 5 分鐘後，去除上清液，加入 4 ml的buffer VP1 並以劇烈震盪懸浮細菌，加入 4 ml的buffer VP2，溫和的翻轉離心管數十次，再加入 4 ml的buffer VP3，翻轉離心管數十次至看到白色絲狀物。之後利用 15,000 rpm離心 15 分鐘。之後將上清液倒入 Midiprep-V100 column中(預先用 5 ml的buffer VP4 平衡過)，經重力作用讓菌液通過管柱後去除濾液。以 12 ml的buffer VP5 清洗管柱後，加入 5 ml的buffer VP6，利用重力讓溶液通過管柱將DNA沖洗出，即得到含有質體DNA的沖洗液。再加入 3.75 ml的異丙醇溫和的混合後，以 12,000 rpm離心 10 分鐘。去除上清液後加入 400 μ l的ddH₂O溶解DNA，並加入 20 μ l的 5 M NaCl及 1 ml 100%酒精，混合後以 14,000 rpm離心 10 分鐘以沉澱質體DNA，再以 70%酒精清洗鹽類。風乾後將DNA溶於 200 ~ 400 μ l的ddH₂O中，以OD₂₆₀吸光值測定DNA濃度，即完成質體DNA的大量製備。

四、*PPP2R2B* 基因啓動子的轉錄活性分析

(一)細胞株培養

培養HEK-293 (human embryonic kidney cell line)、IMR-32 及 SK-N-SH (human neuroblastoma cell line)於 37°C 含 5%CO₂且溼度良好的培養箱中。HEK-293 及IMR-32 使用Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO), SK-N-SH使用MEM, 培養液中皆含有 10% 胎牛血清(fetal bovine serum)、100 U/ml青黴素(penicillin)與 100 U/ml 鏈黴素(streptomycin)。每隔 3-4 天作繼代培養一次。

(二)質體 DNA 轉移 (Transfection)

上述各細胞在 10 cm培養盤中長到 7~8 分滿時，用trypsin將細胞打起，在 24-well培養盤種入 3×10^5 個細胞(0.5 ml培養液)，接著進行轉移實驗。用 2 μ l lipofectAMINE2000 轉移 1.0 μ g pGL3-TK-B β 1、pGL3-TK/PPP2R2B-(CAG)₁₆以及pGL 3-TK質體DNA進入細胞中。其作法是將溶液A (1 μ g DNA in 50 μ l OPTI-DMEM)及溶液B (2 μ l lipofectamine in 50 μ l OPTI-DMEM)均勻混合後，置於室溫下 20 分鐘。待Liposome的形成，加入培養液中，以 300 rpm離心 5 分鐘，於

37°C 培養 48 小時。

(三) Luciferase 活性測定

將構築好的、pGL3-TK-B β 1、pGL3-TK/PPP2R2B-(CAG)₁₆質體轉移 HEK-293、IMR-32、SK-N-SH 細胞 48 小時後，將培養液吸起，離心後再用 PBS 清洗細胞一次。加入 50 μ l Dual-Luciferase® Reporter Assay System 的 Passive Lysis Buffer (PLB) 試劑，混合均勻後以液態氮冰凍、解凍細胞二次以打破細胞，再以 14000 rpm 離心 1 分鐘沈澱細胞碎片。取上清液 10 μ l，分別加入 firefly luciferase 的受質 (LAR II) 50 μ l 和 *Renilla* luciferase 的受質 (Stop&Glo) 50 μ l 作用後，以 TD-20/20 Luminometer 冷光測定儀 (Promega) 於不同波長測定 firefly 及 *Renilla* 的冷光強度。所測得的 *Renilla* 冷光強度可作為轉移效率的內在控制組，以比較啓動子的活性。將所得的近端啓動子 pGL3-TK/PPP2R2B-(CAG)₁₆ (-870 ~ +23) 的 firefly luciferase/*Renilla* luciferase 活性比值設為 1，計算遠端啓動子 (-4043 ~ +23) 之相對活性比值。經實驗重複三次、每次六重複後，得到平均值及標準差，並利用 t-test 分析兩啓動子重組質體間相對活性的差異。