

熱休克對 *TG(HSP70:BMP4)* 基因轉殖斑馬魚 (*Danio rerio*) 之 *ntl* 基因在原腸期表現之影響

吳淑美¹ 林佳琪² 黃聲蘋^{2*}

¹國立嘉義大學水產生物學系

²中央研究院細胞與個體生物研究所

(收稿日期：2005.9.27，接受日期：2005.11.25)

摘要

過去的實驗所製備的 *TG(HSP70:BMP4)* 基因轉殖魚品系，可以利用熱緊迫蛋白質 (*HSP70*) 之啟動子來驅動 *BMP4* 基因 mRNA 的表現，來探討 *BMP4* 基因與頭部軟骨、心臟與消化道器官發育之間的關係。而由文獻中已知 *BMP4* 基因在早期胚胎發育背、腹軸形態形成扮演著重要的角色，因此本實驗的目的主要在測試是否經熱休克處理所產生過多的 *BMP4* 能影響基因轉殖斑馬魚早期胚胎背、腹軸組織的發育。本實驗以 *no tail (ntl)* 脊索標示基因為探針，利用全株原位雜交的方法，來比較不同發育時期的基因轉殖斑馬魚早期胚胎經過 37°C，2 小時之加熱處理後，對表現在脊索 *ntl* 基因的影響。結果顯示：32-64；64-128；128-256 細胞期胚胎經熱處理後可造成 100% bud 期胚胎其 *ntl* 基因在脊索表現不正常；在 256-512 細胞期則造成 19% bud 期胚胎 *ntl* 在脊索的表現有細化 (thinner) 以及 81% 有不連續的情形，而在未經熱處理之基因轉殖魚胚胎，與不論是否加熱之野生型斑馬魚胚胎 *ntl* 在脊索的表現皆是 100% 正常。因此本實驗結果顯示 *TG(HSP70:BMP4)* 基因轉殖魚早期胚胎經過熱處理後，的確可誘發 *BMP4* 基因的過度表現，造成 *ntl* 的不正常表現進而影響脊索的發育。

關鍵詞： 胚胎發育、斑馬魚、脊索、基因轉殖魚、*ntl* 基因

緒言

這一世紀以來直到目前，發生學的研究一直都是動物學研究的顯學。發生學家利用許多動物模式種來進行研究，從早期的老鼠、雞、蠐螬或青蛙到近年來被廣泛使用的斑馬魚。斑馬魚因為具有生殖週期短；可以光周期控制產卵；取卵方便；卵量大而透明，可以進行微管注射、基因轉殖以及製備突變種等特性，因此成為發生學研究的熱門模式種 (Anderson and Ingham, 2003)。現代發生學的研究拜分子生物學快速研究的成果所賜，對於許多與發生有關的基因紛紛被解碼，一般研究者利用基因轉殖送入標識基因，然後利用基因缺陷法製造突變株，最後利用原位雜交法或免疫化學法找出與發生有關之功能性基因。而本研究也是利用這些方法來探討 *TG(HSP70:BMP4)*

基因轉殖魚，受到熱休克之後，利用 *HSP70* 啟動子誘發 *BMP4* 的過度表現，以 *ntl* 基因當作標識基因，觀察是否影響斑馬魚早期胚胎脊索的發育。

BMP4 是屬於 BMP (bone morphogenetic protein) 基因家族之一員，它可拮抗 *Chordin* 之活性來調節脊椎動物早期背、腹中胚層之形成 (Hammerschmidt *et al.*, 1996; De Robertis *et al.*, 2000; Wagner and Mullins, 2002)。在斑馬魚遺傳學上的分析已經證實 *Chordin* 基因可抑制 *BMP* 基因的信號，使得其神經板與背部中胚層的發育能完整 (Schulte-Merker *et al.*, 1997)。另外，斑馬魚之 ZF4 細胞受到熱之誘導可促使 *HSP70* 的表現增加 (Airaksinen *et al.*, 2003)，而 *ntl* 基因的表現可在胚胎發育中的脊索 (notochord) 及尾 (tail) 部被觀察到，它在背部中線細胞命運的決定扮演重要的

*通訊作者：黃聲蘋 (Sheng-Ping L. Hwang)；FAX：886-2-27858059；E-mail：zoslh@gate.sinica.edu.tw

角色，如抑制 floor plate 的發育來促進脊索之發育(Halpern *et al.*, 1997)。若缺失 *ntl* 功能將擾亂斑馬魚在原腸發育期(gastrulation)間的中胚層(mesoderm)型態之完整性(Melby *et al.*, 1996)。因此在胚胎發育初期 *ntl* 基因是一個很理想的脊索標識基因(marker gene)，可被用來觀察 *BMP4* 過度表現的結果。

本研究的前景由於發現 37°C，2 小時之熱緊迫的確會誘發 *TG(HSP70:BMP4)* 基因轉殖斑馬魚胚胎的 *BMP4* mRNA 過度表現，而且從 45 分至 2 小時的熱處理有時間效應的相關性，因此提出假說認為基因轉殖斑馬魚的早期胚胎經過熱處理之後，其 *ntl* 基因可能會受到 *BMP4* 過度表現的影響，進而導致脊索發育的障礙。

材料與方法

斑馬魚胚胎

野生型與基因轉殖斑馬魚之種魚皆飼養在中研院細胞與個體生物研究所之養魚室中，實驗進行前一晚先挑出至少 8 對公母配對(野生型與基因轉殖魚各半)，每個孵化槽中置入 1 對，但是先給予隔離直到清晨由黑暗轉為亮光時，隨即解除隔離，大約 15-30 分鐘便有追尾現象出現，之後每隔 30 分鐘打開簾幕觀察孵化缸底部，一旦看到受精卵則等待 30 分鐘便中止他們的交配行為，取出受精卵在顯微鏡下判斷受精卵的發育時間，並利用螢光顯微鏡觀察受精卵，進一步確定野生型與基因轉殖魚之卵，並且以螢光表現程度判斷基因轉殖斑馬魚之受精卵是同型或是異型結合，之後記錄發育時間分別進行熱處理實驗。

全株原位雜交試驗(whole-mount in situ hybridization)

本研究所用的方法是依照(Shentu *et al.*, 2003)的方法，方法簡述如下：胚胎收集後固定於 4% paraformaldehyde, 4°C 儲存，隔夜以 PBS 洗三次每次 5 分鐘，然後以 25%，50%，75%，100% 梯度之甲醇與 PBS 混合液脫水各 5 分鐘，之後則以反梯度方式覆水，接下來利用 proteinase K 在室溫反應 20 分鐘將胚胎之細胞膜造成破洞。以含有 0.1% DEPC 的 PBT 洗 5 回，將胚胎置入 HyB^+ (50% formamide, 5x SSC, pH 5.0, 500 $\mu\text{g/ml}$

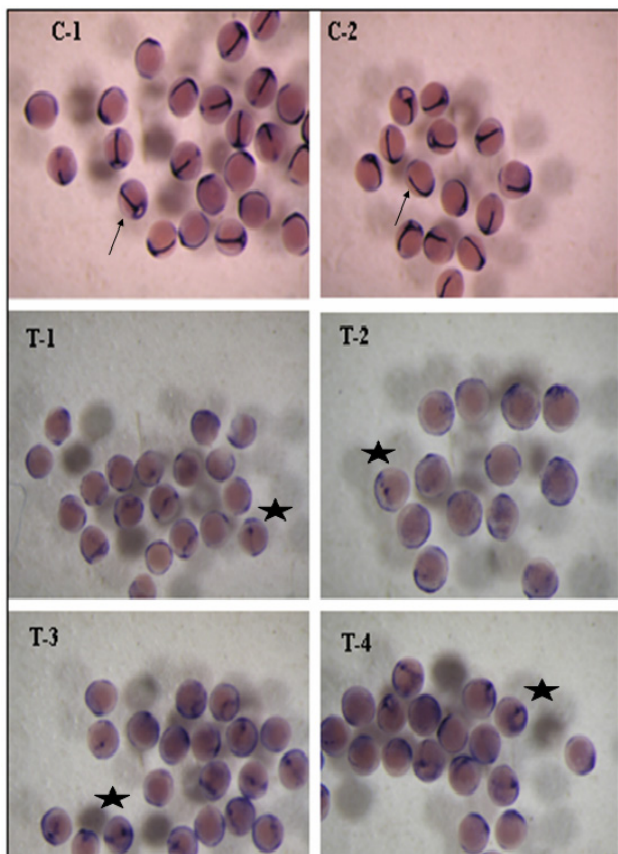
yeast tRNA, 50 $\mu\text{g/ml}$ heparin, 0.1% tween 20) 於 65°C 反應 5 min 進行雜交反應，放入 RNA probe 於 68°C 反應 5 分鐘，最後經過一連串之洗滌後，加入抗體(anti-DIG-alkaline phosphatase antibody)，最後以 NBT/BCIP 之混合液呈色，再利用顯微鏡觀察，整個步驟完成需三天的時間。

實驗設計：不同發育時期之熱處理對 *ntl* 表現的影響

當胚胎發育至 32-64；64-128；128-256；256-512 個細胞期時，分別收集 20 個個體的基因轉殖魚與野生型胚胎，放置在 37°C 之試驗水中維持 2 小時，然後再將胚胎放到 28°C 之恆溫箱中，使胚胎繼續發育，當發育到第 9 小時 bud 期將胚胎收集，以 4% 之 paraformaldehyde 固定至隔夜，然後用 1x 之 PBST 洗三回再以 25% -75% 之甲醇進行脫水，最後將胚胎儲存在 -20°C 直到進行 *ntl* 全株原位雜交試驗，最後照像觀察。

結果與討論

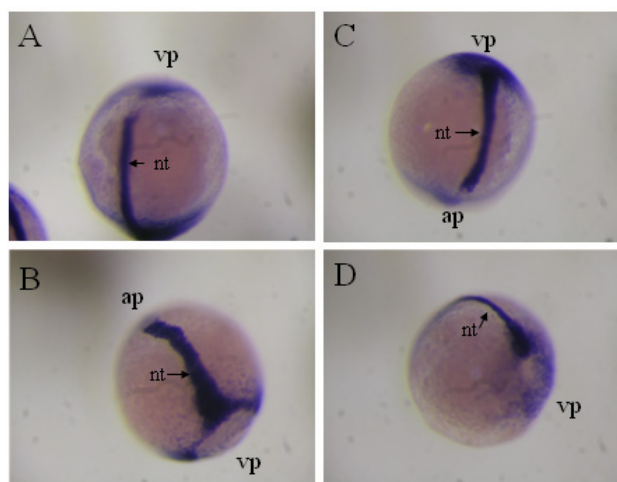
將不同發育期的 *TG(HSP70:BMP4)* 基因轉殖斑馬魚胚胎經過 37°C，2 小時之加熱處理後，並讓其發育到 bud 時期，再以 *ntl* 為脊索標示基因進行全株原位雜交試驗，顯示熱休克會影響 *ntl* 基因表現的情形，包括：在脊索頂端的表現不完全，在脊索的表現呈現不連續的情形，及在脊索的表現變得較細長(圖一)，如若胚胎發育到 256-512 細胞期時再給予熱休克，則造成 *ntl* 在脊索表現變細長的比例增加，但是呈現不連續的表現情形降低(圖二)，經過計算熱處理造成不同型式不正常 *ntl* 表現之比例，顯示：32-64；64-128；128-256 細胞期經熱處理後會造成 100% bud 胚胎其 *ntl* 在發育中的脊索表現不正常；256-512 細胞期經熱處理後則造成 19% bud 胚胎其 *ntl* 在脊索的表現變的較細長以及 81% bud 胚胎其 *ntl* 呈現不連續的表現情形，而未經熱處理之基因轉殖斑馬魚與不論是否加熱之野生型斑馬魚胚胎其 *ntl* 在脊索的表現皆是 100% 正常(表一)。過去的研究將 *BMP2* 合成的 RNA 注射入 1-cell 受精卵會降低 *ntl* 及表現在索前板(prechordal plate)的 *gsc* 基因的表現，因而阻斷脊索的發育。同時由於 *evel* 是表現在胚胎腹側面的標識基因，且 *BMP4* 及 *BMP2* 皆是調控腹側中胚層器官發育的基因，因



圖一、利用全株原位雜交之方法進行試驗，比較不同發育期之基因轉殖斑馬魚進行熱休克處理後對 *ntl* 基因表現之影響。C-1 野生型斑馬魚在 256-512 細胞期進行熱休克處理，箭頭所指的胚胎其脊柱正常；C-2 基因轉殖斑馬魚在 256-512 細胞期未經熱休克處理，箭頭所指的胚胎其 *ntl* 基因在脊柱表現正常；T-1~T-4 分別是在不同發育期基因轉殖斑馬魚胚胎經過 37°C、2 小時熱處理：T-1, 32-64 細胞期，T-2, 64-128 細胞期，T-3, 128-256 細胞期，T-4, 256-512 細胞期之基因轉殖魚胚胎，星星標識為 *ntl* 基因表現在脊柱成斷裂或細化。

Figure 1. The effect of heat treatment at different developmental stages transgenic embryos on *ntl* gene expression by whole-mount *in situ* hybridization. C-1: heat shock treatment at 256-512 cells stage of wild type embryos (WT); C-2: no heat shock treatment at 256-512 cells stage of transgenic embryos, arrow pointed the normal *ntl* expression. (T); T-1: heat treatment at 32-64 cell stage transgenic embryos at 37 °C for 2 hr; T-2: heat treatment at 64-128 cells stage transgenic embryos; T-3: heat treatment at 128-256 cells stage of transgenic embryos; T-4: heat treatment at 256-512 cells stage of transgenic embryos, star marker showed the abnormal *ntl* expression.

此當過度表現 *BMP2* 時，亦讓只應表現在腹側中胚層的 *eve1* 基因擴張其表現到背側的區域 (Nikaido et al., 1997)。因此我們的實驗結果與他們的結果相類似，這些結果顯示熱休克處理基因轉殖斑馬魚早期胚胎，的確會誘發 *BMP4* 之過度



圖二、256-512 細胞期之基因轉殖斑馬魚或野生種胚胎經過 37°C 2 小時熱處理(T)或是未經熱處理(C：對照組)並讓其發育到 bud 時期，對 *ntl* 基因表現的影響。(A) 野生型之對照組 (B) 野生型；(C) 基因轉殖魚之對照組 (D) 經過熱處理之基因轉殖魚 *ntl* 表現有較細長的情形。Ap,動物極; nt, 脊索; vp,植物極。

Figure 2. Effect of either heat treatment at 37 C for 2 hrs or no heat treatment (control) for 256-512 cell stage transgenic or wildtype embryos on *ntl* gene expression. (A) Control of wild type ; (B) heat treated wild type; (C) control of transgenic fish; (D) *ntl* expression in heat treated transgenic fish embryos showing thinner distribution along the notochord (nt). Ap, animal pole; vp, vegetal pole.

表一、比較基因轉殖斑馬魚與野生型之斑馬魚的不同發育期胚胎，經過 37°C、2 小時之熱休克處理後，*ntl* 在 bud 期胚胎表現不正常所佔之比率。

Table 1. Comparison of the percentage of abnormal *ntl* expression in bud stage embryos from transgenic and wildtype zebrafish embryos receiving heat treatment at 37°C for 2 hours at various developmental stages.

Developmental stage	Treatment condition of embryos			
	Transgenic fish (T)	Wildtype (W)	No heat shock in W	No heat shock in T
32-64 cells	100% (20/20)*	0%	ND	0% (0/16)
64-128 cells	100% (14/14)	0%	ND	ND
128-256 cells	100% (21/21)	0%	ND	ND
256-512 cells	100% (discontinuous: 21/26; thinner: 5/26)	0%	0% (0/13)	0% (0/29)

*Left number within parenthesis represents the number of embryos showing abnormal *ntl* expression pattern, and right number represents the number of total samples; ND: not determined

*左邊的數字代表 *ntl* 基因表現不正常胚胎的數目，而右邊則是所有之樣本數，ND 代表未測定

表現，造成 *ntl* 基因的不正常表現進而影響早期胚胎脊索的發育。因此 *TG(HSP70:BMP4)* 基因轉殖斑馬魚提供我們另一個方法可在不同發育時間來誘發 *BMP4* 在胚胎內的過度表現，讓我們能進一步來探討 *BMP4* 對一些器官如頭部軟骨、心臟、及消化道發育的可能影響。

誌 謝

本報告之完成要感謝中研院提供經費，使國內其他研究教學單位之研究人員得以有短期訪問研究的機會赴中研院學習。

參考文獻

- Airaksinen S, Jokilehto T, Rabergh CMI and Nikinmaa M. 2003. Heat- and cold-inducible regulation of HSP70 expression in zebrafish ZF4 cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 136B: 275-282.
- Anderson KV and Ingham PW. 2003. The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics. *Nat. Genet.* Suppl. 33: 285-293.
- De Robertis EM, Larrain J, Oelgeschlager M and Wessely O. 2000. The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat. Rev. Genet.* 1: 171-181.
- Halpern ME, Hatta K, Amacher SL and Talbot WS. 1997. Genetic Interactions in zebrafish midline development. *Dev. Biol.* 187: 154-170.
- Hammerschmidt M, Serbedzija G N and McMahon AP. 1996. Genetic analysis of dorsoventral pattern formation in the zebrafish: requirement of a BMP-like ventralizing activity and its dorsal repressor. *Genes & Dev.* 10: 2452-2461.
- Melby AE, Warga RM and Kimmel CB. 1996. Specification of cell fates at the dorsal margin of the zebrafish gastrula. *Dev.* 122: 2225-2237.
- Nikaido M, Tada M, Saji T and Ueno N. 1997. Conservation of BMP signaling in zebrafish mesoderm patterning. *Mech. Dev.* 61: 75-88.
- Schulte-Merker S, Lee KJ, McMahon AP and Hammerschmidt M. 1997. The zebrafish organizer requires chordino. *Nature* 387: 862-863.
- Shentu H, Wen HJ, Her GM, Huang CJ, Wu JL and Hwang SPL. 2003. Proximal upstream region of zebrafish bone morphogenetic protein 4 promoter directs heart expression of green fluorescent protein. *Genesis* 37: 103-112.
- Wagner DS and Mullins MC. 2002. Modulation of BMP activity in dorsal-ventral pattern formation by the chordin and ogon antagonists. *Dev. Biol.* 245: 109-123.

Effects of Heat Shock on *ntl* Gene Expression in Gastrula Embryos of *TG(Hsp70: BMP4)* Transgenic Zebrafish (*Danio rerio*)

Su-Mei Wu¹, Chia-Chi Lin², Sheng-Ping L. Hwang^{2*}

¹Department of Aquatic Biosciences, National Chiayi University
Chiayi, Taiwan

²Institute of Cellular and Organismic Biology, Academia Sinica
Taipei, Taiwan

(Received: 27 September 2005, accepted: 25 November 2005)

ABSTRACT

A *TG(HSP70:BMP4)* transgenic fish line was generated previously. One can conditionally activate *BMP4* expression by heat shock treatment to study the relationship between *BMP4* and the development of pharyngeal arch, heart, and digestive tract. Previous studies have shown that *BMP4* plays important role in dorsal-ventral patterning during gastrulation. The aim of this report is to investigate whether *BMP4* expression can be induced by heat treatment and subsequently affects dorsal-ventral patterning of early transgenic fish embryos. Whole-mount *in situ* hybridization using *ntl* notochord marker gene as a probe was conducted to compare the effect on *ntl* expression pattern after heat treatment of early transgenic embryos from different developmental stages at 37°C for 2 h. Our results demonstrated that respective heat treatment of 32-64 cells, 64-128 cells, and 128-256 cells caused 100% bud embryos showing abnormal *ntl* expression pattern in the notochord. Heat treatment of 256-512 cells caused 19% bud embryos showing thinner *ntl* distribution and 81% embryos showing discontinuous *ntl* expression in the notochord. However, heat treatment of different stages embryos from either transgenic lines or wild type zebrafish does not affect *ntl* expression in the notochord. Overall our results indicate that heat treatment of early *TG(HSP70:BMP4)* transgenic fish embryos can induce *BMP4* over expression to have an effect on *ntl* expression and following notochord development.

Key words: Embryonic development, zebrafish, notochord, transgenic fish, *ntl* gene

*Corresponding author: Sheng-Ping L. Hwang; Fax: 886-2-27858059; E-mail: zoslh@gate.sinica.edu.tw