

東海大學生命科學系

碩士論文

指導教授：劉蕙雯 博士

Dr. Yi-Wen Liu

探討 Jagged、Notch 及 Rbpj 分子對於斑馬魚腎及腎間腺

發育所扮演的角色

Studying the role of Jagged, Notch and Rbpj molecules for

development of the kidney and the interrenal tissue in the

zebrafish

研究生：林潔怡

Jamie Lin

中華民國 105 年 7 月

東海大學生命科學系碩士論文

探討 Jagged、Notch 及 Rbpj 分子對於斑馬魚腎及腎間腺
發育所扮演的角色

Studying the role of Jagged, Notch and Rbpj molecules for
development of the kidney and the interrenal tissue in the
zebrafish

研究生：林潔怡

Jamie Lin

指導教授：劉蕙雯 博士

Dr. Yi-Wen Liu

中華民國 105 年 7 月

致謝

在研究所的日子裡，要感謝的人很多。首先我要對我的指導老師劉蕙雯老師獻上最大的謝意，感謝劉老師在我修習大學專題論文的時候願意給我機會加入實驗室學習，一直到後來收我為研究生。在這幾年裡，劉老師總是不厭其煩細心的親自教導我實驗的技術、實驗原理、及邏輯思考；在實驗遇到瓶頸的時候也給予我幫助。在專業領域的教導之外，劉老師也不吝嗇地給了我職涯規劃方面的建議，劉老師也更是跨領域學習的最佳模範。除此之外，很感謝其他單位的老師們，在每次研討會中對於我的研究提供的建議。也要謝謝系上的各個老師在實驗技術方面，及專題討論時提供的指教。另外，也很謝謝實驗室的學長姐和學弟妹對於實驗上的指教與協助，特別是周志薇學姐在本研究中初步結果的貢獻，讓我能接續此研究。最後，謝謝我的家人給予的關心，並全力支持我繼續讀書。謝謝對於本研究有貢獻的所有人，才能讓我順利的完成此論文。

目錄

中文摘要.....	iv
Abstract.....	v
前言.....	1
斑馬魚腎及腎間腺組織的早期發育.....	1
Notch 訊號傳遞途徑的機制.....	3
Notch 訊號傳遞在哺乳類腎臟發育中的角色.....	4
Notch 訊號傳遞在哺乳類腎上腺發育及疾病中的角色.....	4
Notch 訊號傳遞對於斑馬魚腎臟發育所扮演的角色.....	6
Notch 訊號傳遞對於斑馬魚腎間腺發育可能的功能.....	7
Jagged 分子在哺乳類中的功能.....	8
Jagged 分子在斑馬魚中的角色.....	9
材料與方法.....	11
一、 斑馬魚品系與培養.....	11
二、 Heat shock 及 genotyping.....	11
三、 反義核苷酸顯微注射技術.....	12
四、 3βHsd 組織染色法.....	12

五、	震盪切片	13
六、	免疫組織化學染色法	14
七、	全身性原位雜合技術 (<i>in situ</i> hybridization).....	14
八、	雷射共軛焦顯微鏡拍照技術及分析統計軟體.....	16
九、	CRISPR/Cas9 技術	17
十、	T7 Endonuclease 1 (T7E1) 標靶效能測試	18
	結果.....	19
一、	過度活化 Notch 訊號傳遞途徑對於斑馬魚胚胎腎及腎間 腺基因表達的影響.....	19
二、	Jagged 分子在斑馬魚胚胎中之腎間腺組織及腎的表達	20
三、	降低 Notch 訊號傳遞受體及配體 Jagged 分子之基因表 達對斑馬魚腎及腎間腺組織發育的影響	22
四、	利用 pCS2 ⁺ <i>jag1b</i> 補救 <i>jag1b</i> morphants 腎及腎間腺組 織無法正常分離的表型.....	25
五、	CRISPR/Cas9 <i>jag1b</i> 突變品系斑馬魚.....	27
	討論.....	30
	參考文獻.....	39

圖表目錄.....	46
個人資料.....	68

中文摘要

體外受精的斑馬魚是研究胚胎時期腎臟發育很好的脊椎動物模式物種。過去文獻中已發現在斑馬魚受精後 22 小時胚胎中表達 *ff1b* 的腎間腺組織先驅細胞，會從表達 *wt1* 的原腎原基特化而來，接著會在受精後 24 小時的時候聚集並且移行到原腎原基之外；但其中原腎原基及腎間腺原基細胞命運的決定機制尚未釐清。在實驗室先前研究 *rbpj morphant* 的結果發現，具有類固醇酵素活性的腎間腺組織及腎間腺表達的基因都受到影響，所以認為 Notch signaling 可能在其中扮演重要的角色。利用原位雜合染色發現 Notch signaling 中的兩個 ligand, *jagged1b (jag1b)* 及 *jag2b*, 表達在腎間腺組織中；而 Jag1b 蛋白質也會表達在腎臟。使用反義核苷酸抑制 *jag1b* 或 *jag2b* 基因表達之後，發現腎與腎間腺組織之間無法正常的分離。在 *jag1b morphant* 中，此腎及腎間腺無法正常分離的表型在使用含有 *jag1b* 序列的質體去補救時，能夠被恢復。綜合以上結果顯示 *jag1b* 可能對於腎及腎間腺細胞的平行發育扮演重要的角色。未來我們會使用將會特異表達 *jag2b* 於腎臟區域的 Tol2 質體補救 *jag1b morphant* 的缺失，以及利用斑馬魚突變品系以更進一步探討 *jag1b* 在腎和腎間腺發育中所扮演的角色。

Abstract

As their eggs are fertilized externally, the zebrafish is a useful model for studying the embryonic development of the kidney. It has been shown that in the zebrafish, *ff1b*-expressing precursors of interrenal tissue—the counterpart of the mammalian adrenal cortex, are specified from *wt1*-expressing kidney primordium, and are located within the kidney field at around 22 hours-post-fertilization (hpf). Subsequently, the *ff1b*-expressing cells converge and migrate out of the kidney at around 24 hpf. The mechanism of fate determination of interrenal precursors within the kidney field is unclear. Our lab has found that the size of steroidogenic interrenal tissue and the expression of interrenal-specific genes were affected in *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J (rbpj)* morphants, suggesting that Notch signaling played an important role for the interrenal development. The results of *in situ* hybridization have shown that *jagged1b (jag1b)* and *jag2b*, ligands of Notch signaling pathway, were expressed in the interrenal region. Furthermore, Jag1b was expressed in the kidney at the protein level. The segregation between kidney and interrenal tissue was affected by antisense morpholino knockdown of either *jag1b* or *jag2b*. Additionally, the defective kidney-interrenal segregation of *jag1b* morphant could be rescued by an expression plasmid containing *jag1b* coding sequence. The results suggested that *jag1b* might be involved in the parallel development of the head kidney. In the future study, we will use Tol2-based kidney-specific expression plasmid of *jag2b* to find out whether the parallel development of kidney and interrenal tissue in the

jag1b morphant could be rescued by the kidney-specific *jag2b* expression. Moreover, we will use ENU or CRISPR/Cas mutants of *jag1b* to confirm the role of Notch signaling in the development of head kidney in the zebrafish.

前言

斑馬魚腎及腎間腺組織的早期發育

不同物種中腎臟在胚胎時期的發育過程也有所不同。魚類及兩棲爬蟲類的腎臟發育是由胚胎時期的原腎 (Pronephros) 開始，接著發育成中腎 (Mesonephros) 作為功能成熟的腎臟；演化到哺乳類動物，腎臟則是從早期的原腎、中腎，最後發育成為後腎 (Metanephros) (Romagnani et al., 2013)。腎上腺 (Adrenal gland) 位於腎臟上方，為腎上腺皮質與腎上腺髓質兩部分所組成，分別分布於腎上腺的外側與內側 (Barwick et al., 2005)。在過去的研究中，已經了解斑馬魚的腎間腺 (Interrenal gland) 在功能上與哺乳類腎上腺相似。在斑馬魚中，腎間腺只有一個，並且包埋在斑馬魚頭腎的位置，分為腎間腺組織 (Interrenal tissue) 與嗜鉻性細胞 (Chromaffin cells)，分別相當於哺乳類動物的腎上腺皮質與腎上腺髓質。在功能上，斑馬魚的腎間腺組織及哺乳類動物的腎上腺皮質是分泌固醇類荷爾蒙；而斑馬魚的嗜鉻性細胞及哺乳類動物的腎上腺髓質則是分泌腎上腺素及正腎上腺素 (Chai et al., 2003; Hsu et al., 2003)。斑馬魚除了腎間腺與哺乳類動物的腎上腺在功能上高度相似，斑馬魚原腎與哺乳類動物後腎的腎絲球結構性蛋白質也有高度保留性 (Ichimura et al., 2013)。體外授精且胚胎

透明易觀察的斑馬魚具有方便研究早期器官發育的優勢，也是個比較容易同時研究多重器官發育的模式動物。

在斑馬魚胚胎中腎及腎間腺的早期發育是平行且同步的，分別由 *wt1* 及 *ff1b* 所調控 (Hsu et al., 2003)。Wilm's tumor 1 (*WT1*) 是個 tumor suppressor gene，在老鼠突變種研究中發現：缺失 *WT1* 會造成胚胎死亡及腎臟發育異常 (Hohenstein and Hastie, 2006)。在斑馬魚中相當於 *WT1* 的基因為 *wt1a* 及 *wt1b* (Bollig et al., 2006)，都有調控腎臟發育的功能 (Perner et al., 2007)。在老鼠的研究中也發現 *WT1* 會作用在 Steroidogenic Factor 1 (*SF1*) 的啟動子上，以調節早期性腺發育 (Wilhelm and Englert, 2002)。*SF1* 又稱為 Adrenal 4 Binding Protein (Ad4BP)，是個 nuclear hormone receptor 家族中的轉錄因子，表達在哺乳類動物的腎上腺皮質、下視丘、性腺等等，調節其發育，其中也包含類固醇荷爾蒙的生成 (Parker and Schimmer, 1997; Val et al., 2003)。在斑馬魚功能相當於 *SF1* 的是 *ff1b*，表達在腎間腺並調控類固醇的生成 (Chai et al., 2003)，當斑馬魚胚胎中的 *ff1b* 表達被抑制，腎間腺組織的發育也會被抑制 (Liu et al., 2003)。斑馬魚的原腎原基細胞會表達 *wt1a* 和 *wt1b*，在胚胎受精 22 hours post fertilization (hpf) 的時候，有一些原腎原基細胞會特化成表達 *ff1b* 的腎間腺原基細胞，接著到了 28 hpf 就會分化形成具有類固醇生成能力的腎間腺組織，

而其餘的原腎原基細胞則會表達 *podocin* 和 *nephrin* 等結構性蛋白質，並分化成原腎的足細胞 (podocytes) (Hsu et al., 2003; Liu et al., 2006)。原腎和腎間腺同樣都是由中胚層所衍生的組織，但腎間腺原基是如何從原腎原基細胞分離出來，以及這些未來會形成腎間腺組織的原基細胞是如何與原腎呈現平行的發育，其中的機制尚未清楚。

Notch 訊號傳遞途徑的機制

Notch 訊號傳遞途徑，是一種細胞與鄰近細胞之間的訊號傳遞途徑，調控著細胞增生與凋亡、細胞命運決定、及活化細胞分化 (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Kopan and Ilagan, 2009)。傳遞訊號的細胞提供配體 (ligand)，配體有 *delta (del)* 以及 *jagged (jag)* 兩種；接收訊號的細胞提供受體 (receptor)，稱為 *notch*。當傳遞訊號細胞的配體與另一鄰近接收訊號細胞的受體接上時，受體 *notch* 的細胞內結構域 (Notch intracellular domain, NICD) 會進入細胞核內，並與其他的共同活化子或是其他蛋白，例如 recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J (簡稱 RBPJ，別名為 CSL 及 Su(H)) 及 mastermind-like (MAML)，進行結合形成複合體 (De Strooper et al., 1999)，進而活化轉錄，使下游基因表達 (Kopan and Ilagan, 2009)(附圖一)。

Notch 訊號傳遞在哺乳類腎臟發育中的角色

Notch 訊號傳遞在許多器官發育中扮演重要的角色，其中對於哺乳類腎臟的研究也有許多。在小鼠腎臟發育中，Notch 訊號傳遞的受體 *Notch1*、*Notch2* 及配體 *Jag1*、*Dell* 會表達在 renal vesicle，並參與在腎元的分節過程中 (Kopan et al., 2014)。 *Notch2* 突變種小鼠胚胎中發現，一部分的小鼠出生之後 24 hpf 會死亡，而死亡小鼠的腎臟大小明顯較小，腎臟表面的血管有缺失； *Notch2* 突變的同型合子 (homozygous) 小鼠腎小球則無法正常的發育；當同時抑制 *Notch2* 及 *Jag1* 的基因表達也會造成腎小球無法正常形成 (McCright et al., 2001)。相似的結果也在抑制小鼠胚胎腎臟間葉組織的 *Notch2* 表達可以看到，腎臟無法發育出腎小球及近端腎管 (proximal tubule)，而遠端腎管雖可以發育但是腎管內卻無法正常發育足細胞 (Cheng et al., 2007)。此外，在腎臟基質間葉組織 (stromal mesenchyme) 中 *Rbpj* 基因表達被抑制的小鼠中可以發現，*Rbpj* 基因表達被抑制會導致小鼠在出生 48 hpf 時死亡，腎臟大小變小之外，腎小球內的結構被破壞並且只有極少的尿液，結果皆證實 Notch 訊號傳遞會調節腎小球細胞的發育 (Boyle et al., 2014)。

Notch 訊號傳遞在哺乳類腎上腺發育及疾病中的角色

Notch 訊號傳遞除了會參與在腎臟的發育中，其受體及配體也會在腎上腺及腎上腺癌中具有重要的功能。在小鼠腎上腺中發現，Notch 訊號傳遞受體 Notch1 蛋白質會表達在腎上腺皮質及髓質當中；Notch3 蛋白質則表達在腎上腺髓質中多於皮質；在使用藥物抑制 HPA-axis 時，腎上腺皮質的 Notch3 與 Notch1 蛋白質表達量皆會減少 (de Mendonca et al., 2014)。另外，也有研究腎上腺發育及癌症的專家團隊 Hammer 博士的實驗室研究發現，Notch 訊號傳遞配體 JAG1 在人類腎上腺癌細胞中的 mRNA 及蛋白質表達量，皆會比在正常細胞及腎上腺瘤細胞中來得多；*JAG1* mRNA 表達量在人類及小鼠腎上腺癌細胞中皆比其他 Notch 訊號傳遞的配體 *JAG2*、*DEL1/2/3* 顯著得多；在小鼠腎上腺癌細胞株中也發現抑制 *Jag1* 的表達或是使用 DN-MAML (dominant-negative MAML) 抑制 Notch 訊號傳遞時，結果皆會顯著地抑制細胞增生 (Simon et al., 2012)。他們有了這些發現之後也進一步想了解 Notch 訊號傳遞在正常的腎上腺組織中的功能，結果發現 Notch 訊號傳遞配體 *Jag1* 蛋白質會表達在腎上腺皮質；受體 Notch1、Notch2、配體 *Jag1*、*Dell4* 及訊號下游 *Hes1*、*Hes5* 蛋白質都會表達在腎上腺髓質中；但是當在腎上腺中以 DN-MAML 抑制 Notch 訊號傳遞時卻發現不論是在腎上腺皮質或髓質中的組織型態皆沒有受到影響 (Simon PhD thesis, 2012)。

Notch 訊號傳遞對於斑馬魚腎臟發育所扮演的角色

過去已知 Notch 訊號傳遞對於哺乳類腎臟具有發育上的功能，然而對於斑馬魚腎臟發育中的角色之研究則相對比較少。在斑馬魚中利用反義核苷酸 (antisense morpholino oligomers, MOs) 抑制 Notch 訊號傳遞中 *Rbpj* 的基因表達可以發現，胚胎在 15 體節大的時候表達 *wt1b* 的 podocytes 數量變少，胚胎在 24 hpf 時也有相同的結果；到了 36 hpf 時，腎臟結構性蛋白質 *nephrin* 及 *podocalyxin* 的 mRNA 雖然可以表達，但無法正常在中軸融合 (O'Brien et al., 2011)。

斑馬魚 Notch 訊號傳遞途徑的受體 *notch* 有四個 (*1a, 1b, c, d*)，而配體有兩大種，*del (A, B, C, D, like4)*、及 *jag (1a, 1b, 2a, 2b)*，總共九個。這些受體及配體當中，*notch1a*、*notch3*、*jag1b* 及 *jag2b* 會在 24 hpf 原腎原基細胞分化出不同命運的時候表達在原腎附近的區域。*notch1a* 和 *notch3* 分別在 19 個體節及 24 hpf 時表達在原腎管 (pronephric duct) 的區域 (Ma and Jiang, 2007)；*jag1b* 和 *jag2b* (先前命名為 *jag2a*) (Thisse et al., 2005) 在 24 hpf 的時候也會表達在原腎管 (Zecchin et al., 2005; Ma and Jiang, 2007)；而在斑馬魚胚胎中同時抑制 *jag1b* 及 *jag2b* 的基因表達會產生腎絲球變小的表型 (Lorent et al., 2004)。

Notch 訊號傳遞對於斑馬魚腎間腺發育可能的功能

Notch 訊號傳遞雖已在斑馬魚腎臟功能上有一些研究，但是在斑馬魚腎間腺的功能則尚未清楚。在我們實驗室最近尚未發表的研究中發現，當使用反義核苷酸抑制 *rbpj* 的基因表達來阻斷 Notch 訊號傳遞時，進行類固醇酵素活性染色標定腎間腺組織，結果發現大小與控制組相比大許多，在統計上具有顯著差異；進一步使用雙色的原位雜合染色法 (*in situ hybridization*)，發現表達在腎臟區域的 *wt1a/b* 與表達在腎間腺組織的 *ff1b*，在 *rbpj* morphant 的胚胎中無法正常的分離，且 *ff1b* 表達量顯著地增加；利用腎臟綠螢光的 *Tg(wt1b:GFP)^{li1}* 胚胎中進行類固醇染色標定腎間腺組織的處理也有同樣的結果，發現部分胚胎腎臟細胞無法與腎間腺組織完全的分離。由反義核苷酸抑制 Notch 訊號傳遞的結果可以得知除了會調控腎間腺組織發育的大小之外，也會調控腎臟細胞與腎間腺細胞的分離，進而可以推測 Notch 訊號傳遞對於斑馬魚腎及腎間腺組織發育有某種重要的角色。

除了抑制基因或是訊號傳遞之外，過度表達或是活化也是常見用來研究基因功能的方法 (Prelich, 2012)，其中 GAL4-UAS 是個能夠控制特定基因表達在特定的時間點或位置的系統，此技術在斑馬魚中已成熟 (Scheer and Campos-Ortega, 1999)。在本實驗室先前尚未發表的研究中使用以 heat shock 來調控的 GAL4-UAS 系統，在腎間腺原

基細胞分化之前過度表達 Notch 訊號傳遞中的 Notch1a-ICD (NICD)，結果發現會嚴重的破壞類固醇生成活性的腎間腺組織，變得小且破碎。因此從本實驗室尚未發表的研究可以統整出，當 Notch 訊號傳遞被抑制時，腎臟細胞無法與腎間腺組織分離，且類固醇生成的腎間腺組織大小變大；而過度活化 Notch 訊號傳遞則是會抑制腎間腺組織分化及類固醇生成。

Jagged 分子在哺乳類中的功能

Notch 訊號傳遞的配體 Jagged 分子在哺乳類有兩個，Jag1 及 Jag2，其中人類 JAG1 基因突變會造成 Alagille syndrome，此疾病是一種人類體染色體顯性疾病 (Li et al., 1997)，病人會有多重不正常的器官，包含肝臟、心臟、眼睛、骨骼、腎臟、及明顯的臉部異常 (Alagille et al., 1987)。在小鼠 Jag1 的研究結果也大多與人類 Alagille syndrome 病患病徵相似，包含在 *Jag1* 缺失的同型合子小鼠出生後便會死亡 (Xue et al., 1999)，而 *Jag1* 及 *Notch2* 雙重的異型合子則不會死亡，但是胚胎心臟組織異常 (McCright et al., 2002)；小鼠胚胎水晶體發育的不同階段中 *Jag1* mRNA 及蛋白質皆會表達，且在水晶體發育階段抑制 *Jag1* 的表達會造成小鼠眼睛無晶狀體 (Le et al., 2009)；另外，Jag1 蛋白質也會表達在小鼠腎臟區域，並且調控腎絲

球的發育 (Jeong et al., 2009; McCright et al., 2001)。在小鼠 *Jag2* 的研究中除了發現抑制 *Jag2* 的基因表達會造成小鼠耳蝸中毛細胞增加 (Kiernan et al., 2005); *Jag2* mRNA 也會表達在小鼠牙齒中，且當 *Jag2* 基因表達被抑制時，牙齒的發育會不正常 (Mitsiadis et al., 2010); 也有研究發現 *Jag2* mRNA 會表達在成鼠的近端腎管及集尿管中 (Challen et al., 2006)。

Jagged 分子在斑馬魚中的角色

斑馬魚的 Jagged 分子分為 *Jag1a*、*1b*、*Jag2a* (先前命名為 *Jag2b*) (Naylor et al., 2013) 和 *Jag2b* (先前命名為 *Jag2a*) (Thisse et al., 2005)。斑馬魚 *jag1a* 及 *jag1b* 會調控甲狀腺發育，除了有 mRNA 表達於甲狀腺中之外，利用 MO 抑制其表達時，120 hpf 胚胎甲狀腺原基的分化會受到抑制，且功能成熟的濾泡數量也減少 (Porazzi et al., 2012)。 *jag1b* 不同突變品系斑馬魚的研究當中也發現耳囊、內耳、毛細胞、鰓蓋、軟骨等等的異常 (Ma et al., 2015; Obholzer et al., 2012; Zuniga et al., 2010; Schibler et al., 2007)。利用 *jag2b* MO 抑制基因表達會導致胚胎胸鰭硬骨及軟骨異常 (Pascoal et al., 2013)、脊髓神經元數量增加 (Yeo et al., 2007)、以及原腎纖毛增加 (Liu et al., 2007)。

Jagged 分子對斑馬魚腎臟發育也扮演重要的角色。其中 *jag1b*

及 *jag2b* 在 24 hpf 的時候會表達在斑馬魚的原腎管 (Zecchin et al., 2005; Ma and Jiang, 2007)；而在斑馬魚胚胎中同時抑制 *jag1b* 及 *jag2b* 的表達會產生腎絲球變小的表型 (Lorent et al., 2004)。

其中胺基酸序列與老鼠 Jag1 較相似的為 Jag1b，且依照表達位置來看，*jag1b* 比較接近腎間腺組織 (Zecchin et al., 2005)，因此我們推測或許是 Notch 訊號傳遞的配體 *jag1b* 在斑馬魚腎及腎間腺組織發育扮演重要的功能，將深入探討其在兩種組織之平行發育的機制，並將針對 *jag1b* 製作突變斑馬魚品系。

材料與方法

一、 斑馬魚品系與培養

本研究使用的模式動物為斑馬魚 (*Danio rerio*)，並依照標準準則飼養 (Westerfield, 2000)。為了使斑馬魚更加透明易於觀察，胚胎於受精後約 10 hpf 之後，添加 0.03% phenylthiourea (PTU, Sigma) 以抑制斑馬魚胚胎的黑色素形成。本研究中所使用的基因轉殖斑馬魚 $Tg(hsp70:gal4)^{kca4}$ 及 $Tg(UAS:myc-notch1a-intra)^{kca3}$ 由 Zebrafish International Resource Center (ZIRC, Eugene, OR) 提供； $Tg(wt1b:GFP)^{li1}$ 由德國 Christoph Englert 教授所提供 (Perner et al., 2007)。

二、 Heat shock 及 genotyping

斑馬魚胚胎恆溫培養於 28.5°C 至 18.5 hpf 時，將胚胎於 40°C 放置 30 分鐘進行 Heat shock 處理，再放回 28.5°C 培養至待觀察時期。Genotyping 實驗之進行，將 $Tg(hsp70:gal4)^{kca4}$ 及 $Tg(UAS:myc-notch1a-intra)^{kca3}$ 進行交配，產下的胚胎進行 Heat shock 處理並依據外觀判別是否具有 Notch 表型，胚胎在 4 days post fertilization (dpf) 時以單 1 胚胎 1 管抽取 genomic DNA，再利用聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 確認胚胎是否帶有轉殖基因，PCR

引子的設計和實驗結果分析依據 (Scheer et al., 2002)。

三、 反義核苷酸顯微注射技術

斑馬魚胚胎在 1 至 2 個細胞時期時，使用 Nanojet injector (Drummond) 以及內徑 0.58 毫米的玻璃毛細管 (Sutter Instrument) 進行顯微注射，每個胚胎注射約 2.3 nL。在本研究中所使用的反義核苷酸序列為：

rbpj MO: 5' – CAAACTTCCCTGTCACAACAGGCGC – 3'

notch1a MO: 5' – GTAGTGTTAAACTGTTACCTTGTGC – 3'

notch3 MO: 5' – ACATCCTTTAAGAAATGAATCGGCG – 3'

*jag1b-utr*MO: 5' – TCACGGCTCTAATGTACTCCCCGAT – 3'

*jag1b-sd*MO: 5' – ATCAAGACTCACCGTCGTCCGCAAG – 3'

*jag2b-utr*MO: 5' – ATGACCGGCGACAGGATCCTCCGTT – 3'

*jag2b-sd*MO: 5' – AATCAGAGCTCTCACCTTCGTCCAC – 3'

四、 3 β Hsd 組織染色法

參照 (Grassi Milano et al., 1997) 中的方法修改後，我們利用 3- β -Hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^{5-4} - isomerase (3 β Hsd) 酵素活性染色法染斑馬魚胚胎的腎間腺組織。首先將經過 PTU 處理過的斑馬魚胚胎，在解剖顯微鏡下去除卵殼後，使用 phosphate buffered saline (PBS) 清洗兩次，再以 2% Paraformaldehyde (PFA) 內含 0.1% Tween 20

(PFAT) 於 4°C 下固定 12 小時以上；之後用 PBST (PBS 內含 0.1% Tween 20) 進行清洗，每次清洗 10 分鐘共 4 次。接著進行 3 β Hsd 組織染色，染劑內含 0.1 mg/ml trans-Dehydroandrosterone (Sigma)，9 μ g/mL β -nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NAD, Sigma)，0.1 mg/ml Nicotiamide (Vitamine B3, Sigma)，0.1 mg/mL 4-Nitro blue tetrazolium (NBT, Promega)，以及 DMSO (Invitrogen)。反應過程皆避光，於室溫下作用約 8 到 12 小時，依染色情況停止反應，染色完成之後以 2% PFAT 進行室溫 2 小時再固定，最後以 PBST 清洗 4 次，並在 50% glycerol 中進行保存及後續之顯微攝影。

五、 震盪切片

本研究所使用的震盪切片方法主要為參照 (Trinh and Stainier, 2004) 中的方法加以修改。將斑馬魚胚胎去除卵殼後，用 2% PFAT 於 4°C 下固定 12 小時以上，接著包埋在 47°C 預熱的 4% low melting agarose (溶於 PBS buffer) 中並且調整角度，等待 agarose 凝固後，以快乾膠固定在 Leica VT1000M 震盪切片機底座上並將包埋樣本的 agarose 進行裁切。為了避免在切片過程中使胚胎樣本乾掉，在包埋樣本的 agarose 上滴上數滴 PBSTx (PBS 中內含 1% Triton X-100)，接著開始進行厚度為 100 μ m 的切片，並全程保持濕潤。將切片的

樣本收集到內含 PBSTx 溶液的 96 孔盤中，以便接下來挑選具有螢光的樣本，並進行後續的染色。

六、 免疫組織化學染色法

本研究使用的免疫組織化學染色方法參照 (Koshida et al., 2005; Trinh and Stainier, 2004) 加以修改。使用震盪切片機切完的樣本先以顯微鏡挑選完所需要的切片，以 PBSTx 洗 15 分鐘 5 次，接著用內含 10% Fetal Calf Serum (FCS) 加入 PBSTx 中的 Blocking solution，在室溫作用 2 小時。一級抗體使用濃度為 1:200 的 Rabbit-Anti-Zebrafish-Jag1b Polyclonal Antibody (Ana Spec) 加入 Blocking solution 中，在 4°C 作用 1.5 天；作用完之後以 Blocking solution 及 PBSTx 清洗數次，接著使用二級抗體 1:200 Goat-Anti-Rabbit Antibody (abcam) 混於 Blocking solution 中，在 4°C 作用 1.5 天；之後再使用 Blocking solution 及 PBSTx 清洗數次後，將樣本置換到 50% glycerol 中，在玻片上進行封片。最後使用雷射共軛焦顯微鏡進行觀察及拍照。

七、 全身性原位雜合技術 (*in situ* hybridization)

本研究所使用的原位雜合染色為參照 (Oxtoby and Jowett, 1993; Liu et al., 2003) 的方法加以修改，先以 4% PFAT 在 20°C 左右進行

組織固定，隔夜之後以甲醇循序地進行脫水，並保存在 -20°C 。雜合反應之前，反向循序地將甲醇復水成 PBST，再以 4% PFAT 再固定 20 分鐘，接著進行隔夜的預雜合反應 (pre-hybridization)。雜合反應使用新鮮的雜合反應溶液，內含以 digoxigenin (DIG) 和螢光素 (fluorescein, Flu) 標定的 RNA 探針，在 65°C 之下反應隔夜。雜合反應完成之後，以內含 2X SSCT (SSC 內含 0.1% Tween 20) 的 50% 甲醯胺 (formamide) 65°C 清洗 30 分鐘兩次；接著在 65°C 中循序地將溶液換成 2X SSCT；以 0.2X SSCT 65°C 清洗 30 分鐘兩次；150 mM Maleic Acid Buffer (內含 0.1% Tween 20, MABT) 在室溫中清洗兩次。加抗體之前，使用 5% Blocking solution (Roche) 進行室溫二至三小時的 blocking，探針使用 1:5000 anti-DIG-Alkaline phosphatase (Roche) 以及 1:1000 anti-fluorescein-Alkaline phosphatase (Roche) 抗體進行 4°C 反應隔夜。抗體反應後先以 PBST 清洗 20 分鐘 8 次，再以新鮮製備的 pH 9.5 或 8.2 緩衝溶液 (內含 pH 9.5 或 8.2 的 Tris-HCl, 0.1 M, 50 mM MgCl_2 , 0.1 M NaCl, 1 mM levamisole, 0.1% Tween 20) 清洗三次；再分別以 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium (NBT/BCIP, Promega) 及 Fast Red (Roche) 經 Alkaline phosphatase 反應成深紫色及紅色，反應時間依照呈色狀況進行調整，最後以 4% PFAT 再固定，PBST 清洗數次之

後置換至 50% 甘油中封片，以 BX51 microscope (Olympus) 拍攝 Nomarski 影像。

八、雷射共軛焦顯微鏡拍照技術及分析統計軟體

經過 3 β Hsd 組織染色法或是免疫組織化學染色的斑馬魚胚胎以 50% 甘油進行封片之後，使用 LSM 510 雷射共軛焦顯微鏡及 LSM 3.5 版本軟體 (Zeiss) 進行拍照；分別以白光掃描組織中 3 β Hsd 染色所標定的位置；488nm 雷射波長偵測綠色螢光；543nm 雷射波長偵測紅色螢光，再使用軟體內建單張掃描拍攝或是 z-stack 堆疊成 3D 疊圖。將 *Tg(wt1b:GFP)^{li1}* 綠螢光及紅螢光影像疊合，用以觀察腎臟區域免疫組織化學染色的結果；將腎間腺區域與綠螢光影像疊合，即可同時觀察腎間腺組織以及腎的發育型態。利用 LSM image examiner 的 Histo 功能，計算表達 3 β Hsd 組織區域內像素 (pixel) 中 *wt1b:GFP* 的螢光強度 (fluorescence intensity) 再除以區域內總像素術後計算得出 arbitrary units (AU) 數值，並進行 ANOVA 分析各組間有無顯著差異。為了判斷表達 3 β Hsd 之腎間腺組織與表達 *wt1b:GFP* 之腎臟組織是否正常分離，以表達 3 β Hsd 組織區域內無 *wt1b:GFP* 表達細胞的控制組樣本之 AU 值作為背景值，小於此值分類成正常分離 (Normal segregation)，表示表達 3 β Hsd 的組織可與

表達 *wt1b* 的細胞正常分離，大於此值則分類成無法正常分離 (Defective segregation)，表示表達 3β Hsd 組織與 *wt1b* 表達的細胞無法正常分離。再以 Microsoft Office Excel 進行樣本數與性狀的百分比統計。 3β Hsd 及原位雜合染色結果則以 Image Gauge Version 4.0 影像軟體來計算 densitometry，統計數據進行 ANOVA 分析。

九、 CRISPR/Cas9 技術

本研究中使用製作 *jag1b* 突變種斑馬魚的方法是 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) 技術。使用的 CRISPR/Cas9 Construction Kit (WeThink Bio) 中的質體 pZGB-RGN1 已包含 Cas9 蛋白質的序列。Cas 蛋白質作用的標靶位點是辨認一段 20 個鹼基的 guide RNA (gRNA)，用來設計 gRNA 標靶位點的是 Zifit Targeter Version 4.2 (http://zifit.partners.org/ZiFiT_Cas9) (Sander et al., 2007) 和 CHOPCHOP (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>) (Montague et al., 2014) 兩個網站，互相比較之後設計了兩個標靶位點分別在 *jag1b* 的外顯子 (exon) 2 和 5 上的 gRNA，並使用 HiScribe T7 in Vitro Transcription Kit (New England Biolabs) 合成 gRNA。我們先行嘗試顯微注射 exon (ex) 2 的 gRNA，以濃度 25 pg 和 50 pg 進行注射；Cas9 mRNA 則是注射 600 pg。

十、 T7 Endonuclease 1 (T7E1) 標靶效能測試

參照 New England Biolabs 所提供的方法。注射完 gRNA 及 Cas9 mRNA 的胚胎以 5 個 1 管抽取 genomic DNA；進行 PCR 放大 exon 2 總長約 500 base pair (bp) 的片段。使用純化完的 PCR 產物 2 μ L (約 200 ng) 混合於總體積 20 μ L 溶液，內含 1X NE Buffer 2 (New England Biolabs)，再以 95°C 變性之後緩慢回溫使 DNA 重新黏合成雙股。最後加入 1:100 T7E1 酵素 (New England Biolabs)，於 37°C 作用 15 分鐘，進行跑膠確認標靶效能。在本次實驗中所使用 PCR 放大目標片段的引子序列為：

jag1b ex2 T7E1 順向引子: 5' – ACGACGGTGAGTCTTGA – 3'

jag1b ex2 T7E1 反向引子: 5' – GCGTAGATCCAGTTCCG – 3'

結果

一、過度活化 Notch 訊號傳遞途徑對於斑馬魚胚胎腎及腎間腺基因表達的影響

本實驗室先前尚未發表的研究中利用 3 β Hsd 組織染色法，標定出過度活化 NICD 的斑馬魚胚胎中，具有類固醇酵素活性的腎間腺組織位置，結果發現過度活化 NICD 的胚胎 3 β Hsd 腎間腺組織變得小且破碎，利用統計計算大小也是顯著的變小。

表達 3 β Hsd 的腎間腺組織是已分化完全並具有生成類固醇功能的腎間腺組織，為了進一步得知過度活化 NICD 之後，腎間腺原基的特化及基因表達是否在也會受到影響，因此在此利用全身性原位雜合染色標定原腎及腎間腺原基。在斑馬魚胚胎 18.5 hpf 時過度活化 Notch1a-ICD，發育至 31 hpf 時將胚胎固定並進行原位雜合染色，以 *wt1a/b* 探針標定原腎原基、*ff1b* 探針標定腎間腺原基（圖一）。染色的結果發現過度活化 NICD 的胚胎中，表達深紫色的 *wt1a* 及 *wt1b* 腎臟細胞與控制組相比沒有明顯差別，而表達紅色的 *ff1b* 腎間腺原基也能夠表達（圖一）。其中 *ff1b* 的表達沒有受到抑制，並未如實驗室先前過度活化 NICD 之後進行 3 β Hsd 組織染色，結果腎間腺組織變得又小又破碎（尚未發表的研究成果）。在利用統計方法比較過度

活化 NICD 對於腎及腎間腺 mRNA 相對表達量的影響，結果顯示 *wt1a* 及 *wt1b* 的相對表達量與控制組相比皆無顯著差異，但是 *ff1b* mRNA 的相對表達量在過度活化 NICD 之後則有顯著地增加 (圖一，E)。

二、Jagged 分子在斑馬魚胚胎中之腎間腺組織及腎的表達

過去已知腎間腺原基細胞從原腎原基細胞分化而來，其發育是平行且同步的，並由 *wt1* 及 *ff1b* 所調控 (Hsu et al., 2003; Liu et al., 2006)。*ff1b* 表達在腎間腺原基細胞與腎間腺組織，並調控腎間腺發育 (Chai et al., 2003)，而當斑馬魚胚胎 *ff1b* 被抑制，腎間腺組織的發育也會被抑制 (Liu et al., 2003)。Notch 訊號傳遞配體 *jagged* 中的 *jag1b* 和 *jag2b* 在 24 hpf 的時候會表達在斑馬魚原腎管 (Zecchin et al., 2005; Ma and Jiang, 2007)，卻尚未清楚是否會表達在腎間腺的細胞，所以在此使用原位雜合染色以觀察 *jag1b* 及 *jag2b* 是否會表達在 *ff1b* 表達的腎間腺原基中。

在胚胎受精後 26 小時進行雙色的原位雜合技術，除了標定腎間腺 *ff1b* 之外也使用探針標定 *jag1b* 及 *jag2b* 以進一步得知 *jag1b/2b* 是否會表達在腎間腺的位置 (圖二)。使用深紫色成色 *jag1b* 和 *jag2b* 會發現表達的位置與紅色成色的 *ff1b* 標定的腎間腺重疊，

證實 *jag1b* 及 *jag2b* 會表達在腎間腺當中。而 *jag1b* 表達在腎間腺細胞的量 (圖二, A) 比 *jag2b* 表達在腎間腺細胞的量 (圖二, B) 來的明顯。

wt1 會調控腎臟的發育, 在斑馬魚中 *WT1* 的同源基因則有兩個, *wt1a* 及 *wt1b* (Bollig et al., 2006), 德國 Christoph Englert 博士的團隊研究發現兩種 *wt1* 都會調控斑馬魚腎臟的發育 (Perner et al., 2007)。為了能夠更方便研究腎臟發育, 他們在與哺乳類的 *WT1* 相似序列的 *wt1b* 五端 UTR 後面接上增強的綠螢光蛋白, 製作出會在腎絲球及部分的腎管、胰臟, 表達綠螢光蛋白的 *Tg(wt1b:GFP)^{lil}* 斑馬魚以標定腎臟所在的位置 (Perner et al., 2007)。先前研究探討 *jag1b* 及 *jag2b* 表達在原腎管的位置都是使用原位雜合技術以探針標定 mRNA 的表達位置 (Zecchin et al., 2005; Ma and Jiang, 2007), 並沒有探討在蛋白質層面是否會表達在腎臟。所以在此我們以綠螢光標定腎臟的 *Tg(wt1b:GFP)^{lil}* 的胚胎受精 24 小時之後進行切片, 收取腎絲球綠螢光的切片樣本, 進行免疫組織化學染色標定以紅螢光成色的 Rabbit-Anti-Zebrafish-Jag1b (Ana Spec) 蛋白質表達位置 (圖三)。將綠螢光標定的腎臟區域放大 (圖三, 中間圖) 並將 Jag1b 紅螢光套色成白色 (圖三, 右圖) 可以更清楚的看出黃色箭頭標示出點狀的 Jag1b 是有專一性地表達在綠色線圈出來的腎臟區域裡。

三、降低 Notch 訊號傳遞受體及配體 Jagged 分子之基因表達對斑馬魚腎及腎間腺組織發育的影響

本實驗室先前尚未發表之研究可以得知 Notch 訊號傳遞會調控腎及腎間腺組織之間的發育，但是 Notch 訊號傳遞中有許多的分子，當中哪些會參與在調控腎與腎間腺之間的平行發育則尚未清楚。其中受體 *notch1a*、*notch3*，及配體 *jag1b*、及 *jag2b* 會表達在斑馬魚原腎的位置 (Zecchin et al., 2005; Ma and Jiang, 2007)，而在本研究也發現 *jag1b* 及 *jag2b* mRNA 會與表達 *ff1b* 的腎間腺組織重疊 (圖二)。在此將探討 *notch1a*、*notch3*、*jag1b*、及 *jag2b* 對於腎及腎間腺組織間的平行發育之影響。

三之一、降低 Notch 訊號傳遞受體基因表達對斑馬魚腎及腎間腺組織發育的影響

為了得知會表達在腎及腎間腺組織區域的受體 *notch1a* 及 *notch3* 是否會參與在腎及腎間腺之間的平行發育，在此使用 *Tg(wt1b:GFP)^{lil}* 標示腎臟區域，以反義核苷酸抑制 *rbpj*、*notch1a* 及 *notch3*，使 Notch 訊號傳遞在不同層面被阻斷，在胚胎 34 hpf 時固定組織進行 3 β Hsd 染色，以標定類固醇腎間腺組織 (圖四、六)。從此結果可以發現，控制組中大多數胚胎中表達 3 β Hsd 的腎間腺細胞與表達 *wt1b:GFP* 的腎臟細胞之間會正常的分離成兩個不同的組織

(圖四, A)。在 Notch 訊號傳遞途徑被抑制的 *rbpj* morphants 中, 大約 10% 的胚胎其表達 3β Hsd 的腎間腺組織當中出現表達 *wt1b:GFP* 的腎臟細胞 (圖四, B、圖六, A); 計算胚胎表達 3β Hsd 組織中的 *wt1b:GFP* 螢光強度與控制組相比亦無顯著差異 (圖六, B)。*notch1a* 及 *notch3* morphants 中, 多數的胚胎腎與腎間腺組織的分離狀況與控制組相同 (圖四, C-D); 利用統計計算胚胎中表達 3β Hsd 之腎間腺組織當中的 *wt1b:GFP* 螢光強度與控制組相比也沒有顯著差異 (圖六, B)。但是在 *notch1a* 及 *notch3* 同時被抑制的胚胎中, 則是有超過 80% 的胚胎腎間腺組織當中會有表達 *wt1b:GFP* 的細胞出現, 顯示腎及腎間腺組織之間無法正常的分離 (圖四, E、圖六, A); 統計計算 *notch1a* 及 *notch3* 同時被抑制的胚胎其腎間腺組織當中的 *wt1b:GFP* 螢光強度與控制組相比亦有顯著的增加 (圖六, B)。

三之二、降低 Notch 訊號傳遞配體 *jagged* 分子基因表達對斑馬魚腎及腎間腺組織發育的影響

為了得知會表達在腎及腎間腺組織區域的配體 *jag1b* 及 *jag2b* 是否會調控腎及腎間腺之間的發育, 在此使用 *Tg(wt1b:GFP)^{lil}* 標示腎臟區域, 以反義核苷酸抑制 *jag1b* 及 *jag2b* 的基因表達, 在胚胎 34 hpf 時固定組織進行 3β Hsd 染色, 以標定類固醇腎間腺組織 (圖五、六)。配體 *jag1b* 及 *jag2b* 被抑制的處理組與控制組相比, 結果

皆顯示表達 3β Hsd 的腎間腺組織當中會有表達 *wt1b* 的腎臟細胞出現 (圖五)，不論是 *jag1b* 或 *jag2b* 被抑制轉譯的 morphant (圖五，B、D)，或是被抑制 splicing 的 morphant (圖五，C、E)，四種處理皆有超過 75% 胚胎的腎與腎間腺組織之間無法正常的分離 (圖六，A)；利用統計計算 *jag1b* 及 *jag2b* 中被抑制轉譯或 splicing 的胚胎，四種處理分別皆會使胚胎腎間腺組織當中的 *wt1b:GFP* 螢光強度與控制組相比顯著地增加 (圖六)。

三之三、降低 Notch 訊號傳遞受體及配體 *jagged* 分子之基因表達

對斑馬魚腎間腺組織發育大小的影響

從以上可以得知腎及腎間腺組織之間的平行發育會受到 Notch 訊號傳遞中 *notch1a/3*、*jag1b* 及 *jag2b* 的調控，為了得知分化完全的 3β Hsd 類固醇腎間腺組織發育情形是否也會受到影響，因此使用統計分析軟體，計算不同受體及配體被抑制後對於胚胎 3β Hsd 腎間腺組織染色的 densitometry 定量值的比較 (圖七)。結果發現在 Notch 訊號傳遞被抑制的 *rbpj* morphant 中，其 3β Hsd 組織染色的 densitometry 定量值與控制組相比顯著地增加。在受體 *notch1a*、*notch3* 及 *notch1a/3* 基因表達被抑制的胚胎中， 3β Hsd 組織染色的 densitometry 定量值與控制組相比則皆無顯著差異；但是抑制配體

jag1b 或 *jag2b* 的胚胎中其 3 β Hsd 腎間腺組織染色的 densitometry 定量值則是與控制組相比顯著地較小 (圖七)。

四、利用 pCS2⁺*jag1b* 補救 *jag1b* morphants 腎及腎間腺組織無法正常分離的表型

從以上的實驗結果可以得知, Notch 訊號傳遞的受體及配體當中, *jag1b* 會表達在腎及腎間腺組織 (圖二; 圖三), 而利用反義核苷酸抑制基因表達則可以得知 *jag1b* 會調控腎及腎間腺組織的平行發育 (圖五)。為了加以確認 *jag1b* 在腎及腎間腺組織發育中的功能, 在此欲知使用反義核苷酸抑制基因表達所造成腎及腎間腺組織無法正常分離的表型是否能在同時顯微注射含有 *jag1b* coding sequence 的 pCS2⁺ 質體的情形之下被補救。在腎臟綠螢光的 *Tg(wt1b:GFP)^{lil}* 胚胎 34 hpf 時固定組織並進行 3 β Hsd 染色, 以標定類固醇生成的腎間腺組織, 觀察腎及腎間腺組織之間的平行發育 (圖八、九)。

從結果發現, 當抑制 *jag1b* 轉譯時, 大多數胚胎表達 3 β Hsd 腎間腺組織中有表達 *wt1b:GFP* 的細胞, 其腎與腎間腺組織之間無法正常分離, 比例約為 85% (圖八, B、圖九, A); 計算胚胎中表達 3 β Hsd 組織中的 *wt1b:GFP* 螢光強度與控制組相比顯著地增加 (圖九, B)。在注射 MO 的同時以 pCS2⁺*jag1b* 共同注射進行補救, 結果發現胚

胎腎及腎間腺組織之間的分離能夠恢復正常的比例約為 55%，大約 45% 的胚胎仍維持 *jag1b-utr morphant* 的表型 (圖八，C-D、圖九，A)；計算胚胎表達 3βHsd 組織中的 *wt1b:GFP* 螢光強度與 *morphant* 相比顯著地降低，且與控制組無顯著差異 (圖九，B)。在注射 *jag1b-utrMO* 同時注射 *pCS2⁺jag1bICD*，因為沒有與受體連接的部分所以預期不會有 *jag1b* 與其受體織間的交互作用，結果發現胚胎大多數仍然維持 *morphant* 的表型，腎及腎間腺組織無法正常分離的比例超過 90% (圖八，E、圖九，A)；進一步計算胚胎 3βHsd 腎間腺組織當中的 *wt1b:GFP* 螢光強度與其他組別相比顯著的增加 (圖十)。

pCS2⁺ 的啟動子 SV40 是一個非專一性會到處表達並持續表達的啟動子，為了確認本研究非專一性過度表達 *pCS2⁺jag1b* 是否會造成其他副作用，在此於 *Tg(wt1b:GFP)^{lil}* 胚胎中給予 *pCS2⁺jag1b*，在胚胎 34 hpf 時固定組織並進行 3βHsd 染色，以觀察非專一性過度表達 *jag1b* 是否會對腎及腎間腺組織的發育造成副作用 (圖十、十一)。結果發現 *pCS2⁺jag1b* 的處理只有少於 10% 的胚胎表達 3βHsd 組織中有表達 *wt1b:GFP* 的細胞，腎與腎間腺組織無法正常分離 (圖十，B、圖十一，A)，其餘大多數的胚胎則是維持與控制組相同的表型，腎及腎間腺組織可以正常的分離 (圖十，C)。利用統計計算非專一性

過度表達 $pCS2^{+}jag1b$ 胚胎表達 $3\beta Hsd$ 腎間腺組織當中的 $wt1b:GFP$ 螢光強度與控制組相比無顯著差異，p 值為 0.74 (圖十一，B)。

五、 CRISPR/Cas9 *jag1b* 突變品系斑馬魚

利用原位雜合染色及免疫組織化學染色可以得知 *jag1b* mRNA 及蛋白質會表達在腎間腺及腎臟區域 (圖二；圖三)，使用反義核苷酸抑制其基因表達，腎及腎間腺組織之間無法正常的分離 (圖五)，此表型能被含有 *jag1b* coding sequence 的質體補救恢復正常表型 (圖九)，所以為了能加以確認 *jag1b* 的功能使研究更完整，並且與 morphant 的結果進行比較，本研究將針對 *jag1b* 製作突變品系斑馬魚。如今製作突變斑馬魚品系的技術都已成熟，如 ZFN (Doyon et al., 2008) 及 TALENs (Cade et al., 2012) 等等。本研究是使用近幾年相當熱門的 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) 技術 (Samson et al., 2013) 製作斑馬魚突變品系 (Hwang et al., 2013)，並針對 Notch 訊號傳遞的配體 *jag1b* 進行標靶位點設計。CRISPR/Cas 技術是利用小片段的 gRNA 作為標靶位點辨認，再以 Cas 蛋白質做剪切破壞雙股 DNA，被破壞之後的 DNA 在自行修補的過程中可能有增加或減少原先 DNA 序列的情況，進而就能改變基因，做出突變品系。首先，本實驗用來設計

jag1b 標靶位點的工具具有兩個，Zifit Targeter Version 4.2 (http://zifit.partners.org/ZiFiT_Cas9) (Sander et al., 2007)，CHOPCHOP (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>) (Montague et al., 2014)，互相比較之後設計了兩個標靶位點，分別位在 *jag1b* 的 exon 2 和 5 上的 gRNA，序列如表一。本研究所使用來進行 CRISPR/Cas 標靶效能確認的方法是 T7E1 酵素分析，此酵素會切開雙股間有異之處，所以在 Cas 蛋白質破壞雙股 DNA 之後，利用高溫將 PCR 產物雙股重新黏合，即可使用 T7E1 酵素確認 CRISPR/Cas 標靶效能。我們將 *jag1b* ex2 gRNA 顯微注射到 *Tg(wt1b:GFP)^{lil}* 胚胎中，收取 1 dpf 胚胎的基因體 DNA (genomic DNA)，進行 PCR 放大 *jag1b* ex2 片段，再以高溫到低溫重新黏合產物以使用 T7E1 酵素確認標靶效能 (圖十三)。

PCR 所使用的引子設計在 *jag1b* ex2 標靶位點的前約 400 bp、後約 100 bp 處 (圖十三，A)，進行總長約 500 bp 的片段進行 PCR 放大 (圖十三，B)。跑膠結果發現只有野生型斑馬魚胚胎的 *jag1b* ex2 在經由 PCR 放大之後有單一 500 bp 的片段 (圖十三，B，1 號欄)；其餘 *Tg(wt1b:GFP)^{lil}* 不論是控制組 (圖十三，B，2 號欄) 或是注射 *jag1b* ex2 gRNA 的處理 (圖十三，B，3、4 號欄)，除了 500 bp 的片段之外皆有多餘未預期的大分子量片段出現。注射 *jag1b* ex2 gRNA 25 pg 及 50 pg 兩種不同濃度的處理在 PCR 放大之後沒有明顯差

別 (圖十三, B, 3、4 號欄), 而後續的檢測是使用注射 *jag1b ex2 gRNA* 50 pg 的 genomic DNA。

PCR 放大該片段之後以高溫 95°C 變性雙股 DNA, 再緩慢降溫使雙股重新黏合 (圖十三, C)。跑膠結果發現 *Tg(wt1b:GFP)ⁱⁱⁱ* 的控制組及注射 *jag1b ex2 gRNA* 的處理組 (圖十三, C, 2、3 號欄) 其 PCR 產物多餘的大分量片段在經由重新黏合之後, 片段與未經過重新黏合的控制組 (圖十三, C, 1 號欄) 相比變淡。最後進行 T7E1 酵素測試標靶效能, 預期的跑膠結果是 PCR 產物的 500 bp 片段會有部分被酵素切開成 400 bp 及 100 bp 兩種片段。從實際跑膠結果可以發現, 未經過重新黏合與已重新黏合的兩種控制組, 和注射 *jag1b ex2 gRNA* 的處理組, T7E1 酵素作用結果皆相似 (圖十三, D)。不論是未經過重新黏合或是已重新黏合的控制組, 皆有小於 500 bp 的片段出現 (圖十三, D, 1、2 號欄), 且酵素切出來的片段大小與注射 *jag1b ex2 gRNA* 處理組相同, 無差異 (圖十三, D, 3 號欄), 皆有大小約 400 bp 及 250 bp 的片段出現, 也並非是預期的 400 bp 與 100 bp。

討論

在本實驗室先前未發表的研究中，無論是全面性抑制 Notch 訊號傳遞的 *rbpj* morphants 抑或過度活化 NICD，結果皆可證實會影響斑馬魚腎及腎間腺的發育，在此研究中則是更深入地探討其機制；以及是哪些分子參與此發育過程。綜合本實驗室先前未發表的結果，以及此研究的結果，Notch 訊號傳遞對於腎及腎間腺發育之影響呈現如(圖十三)。控制組胚胎中原腎發育到 22 hpf 會特化出表達 *fflb* 的腎間腺原基，腎間腺原基到了 28 hpf 則會分化成具有類固醇生成的 3β Hsd 腎間腺組織 (Hsu et al., 2003; Liu et al., 2006) (圖十四，A)。利用 *rbpj*MO 抑制 Notch 訊號傳遞的實驗中發現：表達 *wt1* 及 *fflb* 的細胞無法正常分離，但是目前尚未確定是同一細胞表達兩種基因，或是兩種細胞之間混雜在一起；而類固醇生成的腎間腺組織染色的 densitometry 定量值則是顯著的增加，並且無法正常地與表達 *wt1b* 的細胞分離 (圖四，B；圖十三，B)。Notch 訊號傳遞配體 *jag1b* 及 *jag2b* 被抑制時， 3β Hsd 的腎間腺組織顯著的變小，腎間腺組織中有表達 *wt1b* 的細胞，且螢光強度與控制組相比顯著地增加 (圖五、六；圖十三，C)；但是 *jag1b* morphant 的腎及腎間腺組織表型能在給予 pCS2⁺*jag1b* 的同時被補救 (圖八、九)。而在過度活化 NICD 的實驗

組中則是發現 *fflb* mRNA 表達顯著的增加，但是類固醇生成的腎間腺組織染色的 densitometry 定量值變小且形狀破碎（圖一；圖十三，D）。

Notch 及 Rbpj 分子對於斑馬魚腎及腎間腺發育的功能

本實驗室先前尚未發表的研究結果顯示，過度活化 NICD 的胚胎，其 3β Hsd 類固醇腎間腺組織發育受限制，形狀變得破碎且染色的 densitometry 定量值顯著的變小，但是在本研究使用原位雜合染色觀察腎間腺基因 *fflb* 的 mRNA 表達卻是沒有受到抑制（圖一，B、D），相對表達量甚至比控制組來的高（圖一，E）。綜合以上，Notch 訊號傳遞被過度活化時會使腎間腺基因 *fflb* 表達量增加，使腎間腺停留在原基的階段，卻無法正常地發育成具有類固醇生成功能的腎間腺組織。這個結果也相似於人類兒童的腎上腺癌，研究發現病患的腎上腺癌細胞中染色體上的 SF1 及其蛋白質表達量皆異常增加 (Figueiredo et al., 2004; Lalli, 2010)；而本研究則是發現過度活化 NICD 的斑馬魚胚胎會導致腎間腺區域 *fflb* 的基因表達量增加類似於人類兒童的腎上腺癌；在老鼠及人類腎上腺癌細胞中也發現 Notch 訊號傳遞受體 *Jag1* 表達量增加並促使細胞增生 (Simon et al., 2012)，所以或許可以推測人類兒童的腎上腺癌可能也是有 Notch 訊號傳遞被過度活化的情形。

本實驗室近期尚未發表的原位雜合染色實驗結果中發現：抑制胚胎中的 *rbpj* 基因表達會使表達 *wt1* 與 *ff1b* 的細胞混雜在一起，但是在本研究中計算 *rbpj* morphant 中腎間腺組織內的 *wt1b:GFP* 螢光強度，與控制組相比無顯著差異（圖六），推測由於 *rbpj* morphant 中腎臟及腎間腺細胞完全混雜在一起，且由於 3β Hsd 活性強導致組織染色信號非常強烈，使 *wt1b:GFP* 的螢光被遮蔽，因此結果與本實驗室先前使用 *wt1a* 與 *wt1b* 為探針的原位雜合染色結果不符，此實驗未來將再進一步確認。本研究發現在 *rbpj* morphant 中，類固醇腎間腺組織染色的 densitometry 定量值與其他處理相比顯著地較高（圖七），此結果與本實驗室近期尚未發表的原位雜合染色結果相符，亦即 *rbpj* morphant 中腎間腺組織的 *ff1b* 表達量顯著地增加；過去文獻中也有類似的發現：單獨抑制 *rbpj* 或同時抑制 *rbpj/wt1a* 基因表達都會使腎間腺基因表達上升 (O'Brien et al., 2011)。

已知 Notch 訊號傳遞的受體 *notch1a*、*notch3*，及配體 *jag1b*、及 *jag2b* 會表達在斑馬魚原腎的位置 (Zecchin et al., 2005; Ma and Jiang, 2007)，在利用反義核苷酸抑制基因表達之實驗中發現：*notch1a/3*、*jag1b* 及 *jag2b* 會限制 *wt1b* 表達的細胞長到腎間腺組織當中，藉此調控著腎及腎間腺組織之間的平行發育。其中當 *notch1a*、*notch3* 個別單獨被抑制表達的時候，腎及腎間腺組織無法正常分離的樣本數比

例皆無超過 20%；但是同時抑制 *notch1a/3* 的時候，胚胎有此表型的比例則超過 80% (圖六，A)；統計計算 *notch1a*、*notch3* 個別單獨被抑制的胚胎腎間腺組織中的 *wt1b:GFP* 螢光強度與控制組相比無顯著差異，但是同時抑制 *notch1a/3* 的時候胚胎腎間腺組織中的 *wt1b:GFP* 螢光強度與控制組相比則顯著地增加 (圖六，B)。在小鼠 *Notch3* 同型合子突變種能正常出生且發育也正常，不像 *Notch1* 及 *Notch2* 突變種小鼠胚胎即會死亡；加上小鼠胚胎表達 *Notch3* mRNA 的器官或組織也有 *Notch1* 或 *Notch2* 的表達，此研究結果推測 *Notch1* 或 *Notch2* 會補償小鼠同型合子 *Notch3* 突變種中的缺失 (Kitamoto et al., 2005)。另外，在小鼠腦神經幹細胞發育中 Notch 訊號傳遞下游基因 *Hes1*、*Hes3*、*Hes5*、*Hey1* 可能會互相補償彼此之間的缺失 (Imayoshi et al., 2010)。依先前研究推測，在本研究中發現抑制單一受體不會造成非常嚴重影響，原因可能是有其他的受體或分子補償缺失，但是在同時抑制 *notch1a/3* 的時候，或許造成的影響太大無法被補償。

Jag1b/2b 分子在斑馬魚腎及腎間腺平行發育中的功能

本研究在分別使用原位雜合染色及免疫組織化學染色發現 *jag1b* 及 *jag2b* mRNA 皆會在 26 hpf 表達在腎間腺區域，而其中 Jag1b 蛋

白質在 24 hpf 也會表達在腎臟區域 (圖三；圖四)，所以可以推測 *jag1b* 會在不同時間點位於不同的組織調控腎及腎間腺之間的平行發育。未來可以繼續觀察不同的時間點 *jag1b* 在不同組織的表達，來加以確認是如何調控此發育過程。

在 *jag1b* 及 *jag2b* morphant 中發現，類固醇腎間腺組織染色的 densitometry 定量值顯著地比控制組小 (圖七)，由於腎間腺原基是從原腎原基特化而來 (Hsu et al., 2003; Liu et al., 2006)，而在斑馬魚胚胎中分別抑制 *jag1b* 或 *jag2b* 基因表達會使表達 *wt1b* 的原腎組織變小 (O'Brien et al., 2011)，所以推測在 *jag1b* 及 *jag2b* morphant 中，由於腎臟變小所以特化出的腎間腺組織也相對變小。

本研究中所使用的 *jag2b* MO 由國家衛生研究院江運金博士提供，他們先前的研究中已證實此 MO 的專一性，且不會對原腎管造成副作用 (Ma and Jiang, 2007)，另外我們更多發現 *jag2b* morphant 會有腎間腺組織變小，以及無法與表達 *wt1b* 的細胞分離的表型。*jag1b-utr*MO 及 *sd*MO 也是由江老師所提供，雖然這兩個 MO 尚未發表於正式論文，但是 *jag1b* MO 導致的胚胎表型與 Notch 訊號傳遞的突變種 *mib* 胚胎的表型相符，外觀上皆有尾巴向上彎曲 curly-up 的表型 (Zhang et al., 2007)；此外胚胎在注射 *jag1b* MO 的同時注射 *pCS2⁺jag1b*，尾巴向上彎曲 curly-up 的表型能夠被補救恢復正常。因

此可以推測本研究中所使用的 *jag1b* MO 具有專一性，未來也可以進一步使用 RT-PCR 及免疫組織化學染色來加以證實。

在以 *pCS2⁺jag1b* 補救腎及腎間腺無法分離的實驗結果發現，給予 *pCS2⁺jag1b* 補救 *jag1b-utr morphant* 時，腎及腎間腺組織能夠恢復正常分離的胚胎約 55%；當使用只含 *jag1bICD* 的質體來進行補救，由於 Jag1b 蛋白沒有將訊號傳遞至另一細胞的細胞外區域結構，所以預期不會有 *jag1b* 與其受體之間的交互作用，在此處理中造成腎及腎間腺無法正常分離的胚胎超過 90%；利用統計計算同時注射 *jag1b-utrMO* 及 *pCS2⁺jag1bICD* 的胚胎，腎間腺當中的 *wt1b:GFP* 螢光強度與 *morphant* 相比亦顯著地增加 (圖九)。在人類胚胎腎臟細胞株的研究發現，過度表達 Jag1-ICD 會抑制 Notch1 的轉錄活性，阻斷受體 Notch1-ICD 與核內 RBPJ 及 MAML 形成複合物，使得下游基因如 *Hes1* 及 *Hes5* 的轉錄被阻斷 (Kim et al., 2011)；因此可以推測本研究在 *jag1b* 基因表達被抑制的同時過度表達 *jag1bICD*，可能會抑制 Notch1 的轉錄活性，導致訊號傳遞被阻斷，使得腎及腎間腺組織之間無法分離的比例超過 90%，且腎間腺組織當中的 *wt1b:GFP* 螢光強度也比 *morphant* 更高 (圖九)。實驗時為了確定非專一性的過度表達 *pCS2⁺jag1b* 是否會造成其他副作用，所以增加劑量單獨注射質體，但是結果發現腎及腎間腺組織無法正常分離的胚胎

比例未超過 5%，統計計算胚胎 3βHsd 腎間腺組織當中的 *wt1b:GFP* 螢光強度與控制組相比也沒有顯著差異，依此推測單獨過度表達非專一性的 *pCS2⁺jag1b* 不會造成腎及腎間腺組織無法分離。以上的結果皆能加以證實 *jag1b* 會調控斑馬魚腎及腎間腺組織的平行發育。

人類的 Alagille syndrome 是 JAG1 突變所造成一種人類體染色體顯性疾病 (Li et al., 1997)，病人會有多重不正常的器官，其中也包含腎臟 (Alagille et al., 1987)；在小鼠模式中的 Alagille syndrome 也發現 *Jag1* 的缺失會造成類似人類病患的器官異常，包含心臟、眼睛及腎臟 (McCright et al., 2002; Jeong et al., 2009; McCright et al., 2001)，本研究也證實斑馬魚 *jag1b* 會調控腎的發育。另外比較特別的發現是，斑馬魚 *jag1b* 也會調控腎間腺的發育，*Jag1* 雖已知在小鼠及人類腎上腺癌中有功能 (Simon et al., 2012)，但是對於小鼠正常的腎上腺發育中的角色則尚未清楚。我們發現 *jag1b* 除了會表達在腎間腺組織當中、調控腎及腎間腺組織之間的平行發育，也會調節腎間腺組織的大小，這些結果對目前尚未清楚小鼠腎上腺發育中 *Jag1* 的功能，以及人類或小鼠模式 Alagille syndrome 中尚未發現腎上腺相關的病徵，是新穎的發現。

jag1b 突變品系斑馬魚

利用 MO 抑制特定基因表達以探討其功能是使用斑馬魚為模式動物常用且方便操作的技術，但是研究也發現使用某些 MO 會造成非專一性副作用，如 p53 增加引發凋亡 (Ekker and Larson, 2001; Pickart et al., 2006; Robu et al., 2007)，加上後來發展出 ZFN (Doyon et al., 2008) 及 TALENs (Cade et al., 2012) 這些製作突變品系的技術，開始有研究發現在突變品系並未看到 morphants 的表型。有些研究認為 morphants 的表型是因為副作用 (Kok et al., 2015; Law and Sargent, 2014)；相反地，也有研究認為突變品系沒有 morphants 的表型是因為有其他的基因表達量上升所產生的補償機制 (Rossi et al., 2015)，所以突變品系的實驗結果除了可以讓研究更完整也可以比較 morphant 的結果。

本研究是使用近幾年相當熱門的 CRISPR/Cas 技術 (Samson et al., 2013) 以針對斑馬魚 *jag1b* 作為標靶位點製作突變品系。以濃度 25 pg 或 50 pg 的 *jag1b* ex2 gRNA 和 600 pg *Cas9* mRNA 注射到斑馬魚 *Tg(wt1b:GFP)^{lil}* 胚胎之後以 T7E1 測試標靶效能；用 PCR 放大 *jag1b* ex2 片段之後的跑膠結果發現注射濃度 25 pg 與 50 pg 的處理沒有明顯差異。PCR 產物經過純化與重新黏合，最後進行 T7E1 標靶效能測試，酵素作用完的跑膠結果與預期結果不符，控制組與注

射 *jag1b* ex2 gRNA 的處理組結果相似，皆有相同分子量的片段出現，而且片段的分子量大小也非如預期（圖十一）。

由於本研究是將 gRNA 及 *Cas9* mRNA 注射到 *Tg(wt1b:GFP)^{li1}*，而控制組的 PCR 產物也能被 T7E1 作用，因此推測可能在 *Tg(wt1b:GFP)^{li1}* 上 *jag1b* ex2 序列中本身雙股之間有異常之處，導致 T7E1 作用能切開控制組的 DNA。未來有幾個方向可以做改正：針對 *Tg(wt1b:GFP)^{li1}* 上 *jag1b* ex2 序列進行定序確認是否有 polymorphism；在 *Tg(wt1b:GFP)^{li1}* 的野生型中設計 *jag1b* ex2 引子避開 polymorphism；將 gRNA 及 *Cas9* mRNA 注射到 AB 斑馬魚中以避免這個情況發生；嘗試已經設計好的 ex 5 gRNA 或是再利用別的軟體設計另外的標靶位點。不過幸運的是我們也從 ZIRC 引進 *jag1b^{ij59}* 突變品系斑馬魚胚胎，如此一來也有另一個方法能夠進行突變品系斑馬魚的實驗。*jag1b^{ij59}* 突變位點是在斑馬魚 *jag1b* 的 exon 16 及 intron 16 交界處 splice donor site 胺基酸從 G 點突變為 A，導致 frameshift 的突變 (Obholzer et al., 2012)。此突變品系目前已知的表型有內耳、毛細胞、半規管、耳囊等等的異常 (Schibler et al., 2007; Obholzer et al., 2012)。近期我們也將對這株突變品系斑馬魚進行基因型分析，並以此株突變品系斑馬魚更深入探討 *jag1b* 對於腎及腎間腺組織發育之影響以及是否與 morphant 表型相符。

參考文獻

Alagille D, Estrada A, Hadchouel M, Gautier M, Odièvre M, Dommergues JP. Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia): review of 80 cases. *J Pediatr.* 1987;110:195-200.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999;284:770-776.

Barwick TD, Malhotra A, Webb JA, Savage MO, Reznick RH. Embryology of the adrenal glands and its relevance to diagnostic imaging. *Clin Radiol.* 2005;60:953-959.

Bollig F, Mehringer R, Perner B, Hartung C, Schäfer M, Scharl M, Volff JN, Winkler C, Englert C. Identification and comparative expression analysis of a second wt1 gene in zebrafish. *Dev Dyn.* 2006;235:554-561.

Boyle SC, Liu Z, Kopan R. Notch signaling is required for the formation of mesangial cells from a stromal mesenchyme precursor during kidney development. *Development.* 2014;141:346-354.

Cade L, Reyon D, Hwang WY, Tsai SQ, Patel S, Khayter C, Joung JK, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR. Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:8001-8010.

Chai C, Liu YW, Chan WK. Ff1b is required for the development of steroidogenic component of the zebrafish interrenal organ. *Dev Biol.* 2003;260:226-244.

Challen GA, Bertoncello I, Deane JA, Ricardo SD, Little MH. Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1896-1912.

Cheng HT, Kim M, Valerius MT, Surendran K, Schuster-Gossler K, Gossler A, McMahon AP, Kopan R. Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development.* 2007;134:801-811.

de Mendonca PO, Costa IC, Lotfi CF. The involvement of Nek2 and Notch

in the proliferation of rat adrenal cortex triggered by POMC-derived peptides. *PLoS One*. 2014;9:e108657.

De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 1999;398:518-522.

Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, Katibah GE, Amora R, Hocking TD, Zhang L, Rebar EJ, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 2008;26:702-708.

Ekker SC, Larson JD. Morphant technology in model developmental systems. *Genesis*. 2001;30:89-93.

Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, Zambetti G, DeLacerda L, Rodrigues GA, Haddad BR. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:615-619.

Grassi Milano E, Basari F, Chimenti C. Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology, and immunohistochemistry. *Gen Comp Endocrinol*. 1997;108:483-496.

Hohenstein P and Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet*. 2006;15:196-201.

Hsu HJ, Lin G, Chung BC. Parallel early development of zebrafish interrenal glands and pronephros: differential control by wt1 and ff1b. *Development*. 2003;130:2107-2116.

Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 2013;31:227-229.

Ichimura K, Fukuyo Y, Nakamura T, Powell R, Sakai T, Janknecht R, Obara T. Developmental localization of nephrin in zebrafish and medaka pronephric glomerulus. *J Histochem Cytochem*. 2013;61:313-324.

Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R. Essential

roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci.* 2010;30:3489-3498.

Jeong HW, Jeon US, Koo BK, Kim WY, Im SK, Shin J, Cho Y, Kim J, Kong YY. Inactivation of Notch signaling in the renal collecting duct causes nephrogenic diabetes insipidus in mice. *J Clin Invest.* 2009;119:3290-3300.

Kiernan AE, Cordes R, Kopan R, Gossler A, Gridley T. The Notch ligands DLL1 and JAG2 act synergistically to regulate hair cell development in the mammalian inner ear. *Development.* 2005;132:4353-4362.

Kim MY, Jung J, Mo JS, Ann EJ, Ahn JS, Yoon JH, Park HS. The intracellular domain of Jagged-1 interacts with Notch1 intracellular domain and promotes its degradation through Fbw7 E3 ligase. *Exp Cell Res.* 2011;317:2438-46.

Kitamoto T, Takahashi K, Takimoto H, Tomizuka K, Hayasaka M, Tabira T, Hanaoka K. Functional redundancy of the Notch gene family during mouse embryogenesis: analysis of Notch gene expression in Notch3-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:1154-1162.

Kok FO, Shin M, Ni CW, Gupta A, Grosse AS, van Impel A, Kirchmaier BC, Peterson-Maduro J, Kourkoulis G, Male I, et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev Cell.* 2015;32:97-108.

Kopan R, Chen S, Liu Z, Alagille, Notch, and robustness: why duplicating systems does not ensure redundancy. *Pediatr Nephrol.* 2014;29:651-657.

Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009;137:216-233.

Koshida S, Kishimoto Y, Ustumi H, Shimizu T, Furutani-Seiki M, Kondoh H, Takada S. Integrin α 5-dependent fibronectin accumulation for maintenance of somite boundaries in zebrafish embryos. *Dev Cell.* 2005;8:587-598.

Lalli E. Adrenocortical development and cancer: focus on SF-1. *J Mol Endocrinol.* 2010;44:301-307.

Law SH, Sargent TD. The serine-threonine protein kinase PAK4 is

dispensable in zebrafish: identification of a morpholino-generated pseudophenotype. *PLoS One*. 2014;9:e100268.

Le TT, Conley KW, Brown NL. Jagged 1 is necessary for normal mouse lens formation. *Dev Biol*. 2009;328:118-126.

Li L, Krantz ID, Deng Y, et al. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet*. 1997;16:243-251.

Liu Y, Pathak N, Kramer-Zucker A, Drummond IA. Notch signaling controls the differentiation of transporting epithelia and multiciliated cells in the zebrafish pronephros. *Development*. 2007;134:1111-1122.

Liu YW, Gao W, Teh HL, Tan JH, Chan WK. Prox1 is a novel coregulator of Ff1b and is involved in the embryonic development of the zebra fish interrenal primordium. *Mol Cell Biol*. 2003;23:7243-7255.

Liu YW, Guo L. Endothelium is required for the promotion of interrenal morphogenetic movement during early zebrafish development. *Dev Biol*. 2006;297:44-58.

Lorent K, Yeo SY, Oda T, Chandrasekharappa S, Chitnis A, Matthews RP, Pack M. Inhibition of Jagged-mediated Notch signaling disrupts zebrafish biliary development and generates multi-organ defects compatible with an Alagille syndrome phenocopy. *Development*. 2004;131:5753-5766.

Ma M, Jiang YJ. Jagged2a-Notch Signaling Mediates Cell Fate Choice in the Zebrafish Pronephric Duct. *PLoS Genet*. 2007;3:e18.

Ma WR, Zhang J. Jag1b is essential for patterning inner ear sensory cristae by regulating anterior morphogenetic tissue separation and preventing posterior cell death. *Development*. 2015;142:763-773.

Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:W401-407.

McCright B, Gao X, Shen L, Lozier J, Lan Y, Maguire M, Herzlinger D, Weinmaster G, Jiang R, Gridley T. Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development*. 2001;128:491-502.

McCright B, Lozier J, Gridley T. A mouse model of Alagille syndrome: Notch2 as a genetic modifier of Jag1 haploinsufficiency. *Development*. 2002;129:1075-1082.

Mitsiadis TA1, Graf D, Luder H, Gridley T, Bluteau G. BMPs and FGFs target Notch signalling via jagged 2 to regulate tooth morphogenesis and cytodifferentiation. *Development*. 2010;137:3025-3035.

Naylor RW, Przepiorski A, Ren Q, Yu J, Davidson AJ. HNF1 β is essential for nephron segmentation during nephrogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24:77-87.

O'Brien LL, Grimaldi M, Kostun Z, Wingert RA, Selleck R, Davidson AJ. Wt1a, Foxc1a, and the Notch mediator Rbpj physically interact and regulate the formation of podocytes in zebrafish. *Dev Biol*. 2011;358:318-330.

Obholzer N, Swinburne IA, Schwab E, Nechiporuk AV, Nicolson T, Megason SG. Rapid positional cloning of zebrafish mutations by linkage and homozygosity mapping using whole-genome sequencing. *Development*. 2012;139:4280-4290.

Oxtoby E, Jowett T. Cloning of the zebrafish krox-20 gene (krx-20) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res*. 1993;21:1087-1095.

Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev*. 1997;18:361-377.

Pascoal S, Esteves de Lima J, Leslie JD, Hughes SM, Saúde L. Notch signalling is required for the formation of structurally stable muscle fibres in zebrafish. *PLoS One*. 2013;8:e68021.

Perner B, Englert C, Bollig F. The Wilms tumor genes wt1a and wt1b control different steps during formation of the zebrafish pronephros. *Dev Biol*. 2007; 309:87-96.

Pickart MA, Klee EW, Nielsen AL, Sivasubbu S, Mendenhall EM, Bill BR, Chen E, Eckfeldt CE, Knowlton M, Robu ME, et al. Genome-wide reverse genetics framework to identify novel functions of the vertebrate secretome. *PLoS One*. 2006 Dec 20;1:e104.

Porazzi P, Marelli F, Benato F, de Filippis T, Calebiro D, Argenton F, Tiso N, Persani L. Disruptions of global and JAGGED1-mediated notch signaling affect thyroid morphogenesis in the zebrafish. *Endocrinology*. 2012;153:5645-5658.

Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*. 2012;190:841-854.

Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA, Ekker SC. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet*. 2007 May 25;3:e78.

Romagnani P, Lasagni L, Remuzzi G. Renal progenitors: an evolutionary conserved strategy for kidney regeneration. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9:137-146.

Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, Stainier DY. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*. 2015;524:230-233.

Samson JE, Magadán AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: defeating bacterial defenses. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:675-687.

Sander JD, Zaback P, Joung JK, Voytas DF, Dobbs D. Zinc Finger Targeter (ZiFiT): an engineered zinc finger/target site design tool. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:W599-605.

Scheer N, Campos-Ortega JA. Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech Dev*. 1999;80:153-158.

Scheer N, Riedl I, Warren JT, Kuwada JY, Campos-Ortega JA. A quantitative analysis of the kinetics of Gal4 activator and effector gene expression in the zebrafish. *Mech Dev*. 2002;112:9-14.

Schibler A, Malicki J. A screen for genetic defects of the zebrafish ear. *Mech Dev*. 2007;124:592-604.

Simon DP. Contrasting functions of Notch signaling in normal and pathogenic adrenal biology. (Unpublished doctoral dissertation). 2012; University of Michigan

Simon DP, Giordano TJ, Hammer GD. Upregulated JAG1 enhances cell

proliferation in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18:2452-2464.

Thisse, C., and Thisse, B. High Throughput Expression Analysis of ZF-Models Consortium Clones. ZFIN Direct Data Submission. 2005

Trinh LA, Stainier DY. Fibronectin regulates epithelial organization during myocardial migration in zebrafish. *Dev Cell.* 2004;6:371-382.

Val P, Lefrançois-Martinez AM, Veyssi re G, Martinez A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept.* 2003;1:8.

Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.

Wilhelm D, Englert C. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev.* 2002;16:1839-1851.

Xue Y, Gao X, Lindsell CE, Norton CR, Chang B, Hicks C, Gendron-Maguire M, Rand EB, Weinmaster G, Gridley T. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet.* 1999;8:723-730.

Yeo SY, Chitnis AB. Jagged-mediated Notch signaling maintains proliferating neural progenitors and regulates cell diversity in the ventral spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:5913-5918.

Zecchin E, Conigliaro A, Tiso N, Argenton F, Bortolussi M. Expression analysis of jagged genes in zebrafish embryos. *Dev Dyn.* 2005;233:638-645.

Zhang C, Li Q, Lim CH, Qiu X, Jiang YJ. The characterization of zebrafish antimorphic mib alleles reveals that Mib and Mind bomb-2 (Mib2) function redundantly. *Dev Biol.* 2007;305:14-27.

Zuniga E, Stellabotte F, Crump JG. Jagged-Notch signaling ensures dorsal skeletal identity in the vertebrate face. *Development.* 2010;137:1843-1852.

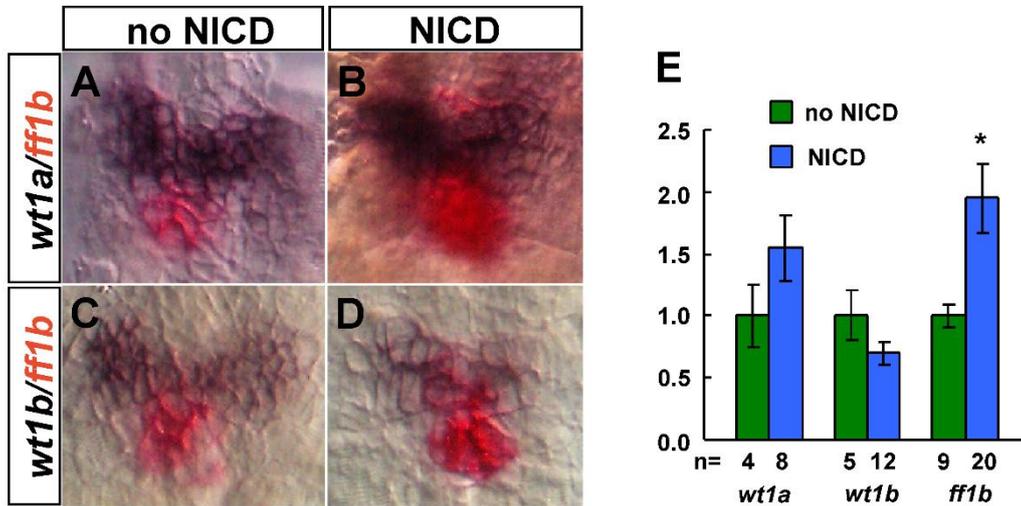
圖表目錄

表一、設計 CRISPR/Cas 技術 <i>jag1b</i> gRNA 的標靶位點序列.....	48
圖一、過度活化 Notch 訊號傳遞途徑致使 <i>ff1b</i> 表達增加.....	49
圖二、腎間腺組織中 <i>jag1b</i> 及 <i>jag2b</i> 的 mRNA 表達.....	50
圖三、腎臟區域的 Jag1b 蛋白質表達.....	51
圖四、 <i>notch1a</i> 及 <i>notch3</i> 表達共同被抑制會導致 <i>wt1b</i> 表達在已分化的腎間腺組織中.....	52
圖五、 <i>jag1b</i> 或 <i>jag2b</i> 被抑制時會導致 <i>wt1b</i> 表達在已分化的腎間腺組織中.....	53
圖六、抑制不同 Notch 訊號傳遞分子對於 3 β Hsd 腎間腺組織當中的 <i>wt1b</i> 表達之定量比較與發育型態比例統計.....	54
圖七、不同 Notch 訊號傳遞分子被抑制後對於表達 3 β Hsd 的腎間腺組織發育影響的相對定量統計與比較.....	56
圖八、pCS2 ⁺ <i>jag1b</i> 可以補救 <i>jag1b-utr</i> MO 腎臟及腎間腺組織不正常發育表型.....	57
圖九、pCS2 ⁺ <i>jag1b</i> 補救 <i>jag1b-utr</i> morphant 表達 3 β Hsd 腎間腺組織當中的 <i>wt1b</i> 表達之定量比較與發育型態比例統計.....	59
圖十、非專一性之過度表達 pCS2 ⁺ <i>jag1b</i> 不會造成腎臟及腎間腺不正	

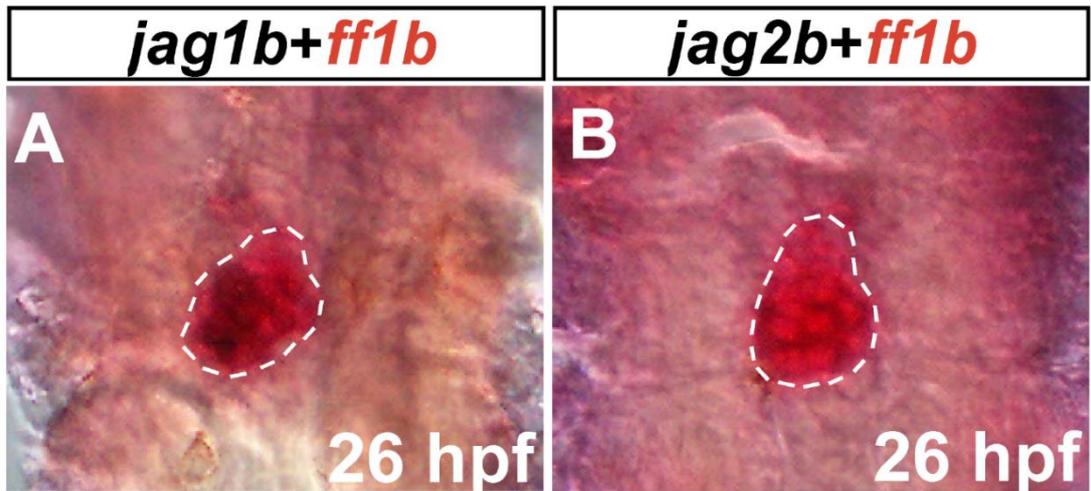
常發育表型.....	60
圖十一、非專一性過度表達 pCS2 ⁺ <i>jag1b</i> 對於胚胎表達 3βHsd 腎間 腺組織當中的 <i>wt1b</i> 表達之定量比較與發育型態比例統計.....	61
圖十二、T7E1 測試 CRISPR/Cas9 標靶效能.....	62
圖十三、Notch 訊號傳遞對於腎及腎間腺發育影響的示意圖.....	64
附圖一、Notch 訊號傳遞途徑示意圖.....	65

表一、設計 CRISPR/Cas 技術 *jag1b* gRNA 的標靶位點序列

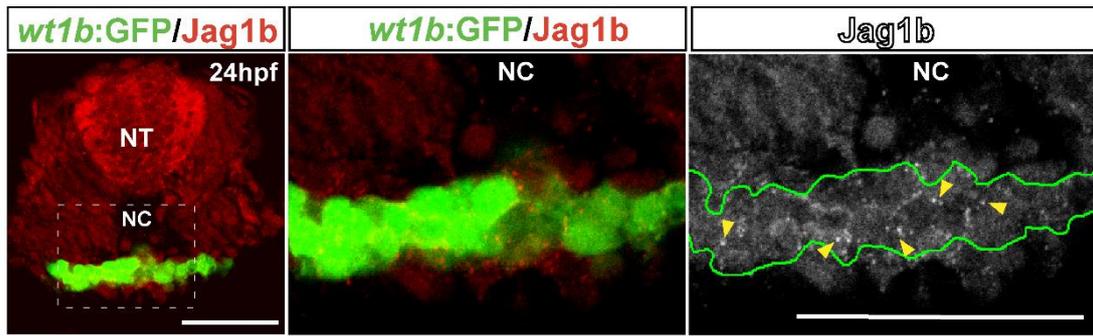
<i>jag1b</i>	CRISPR/Cas gRNA 標靶位點序列
Exon2	5' – GGATCGCAAATGCACGC – 3'
Exon5	5' – GGATCATGCAAGCAACC – 3'



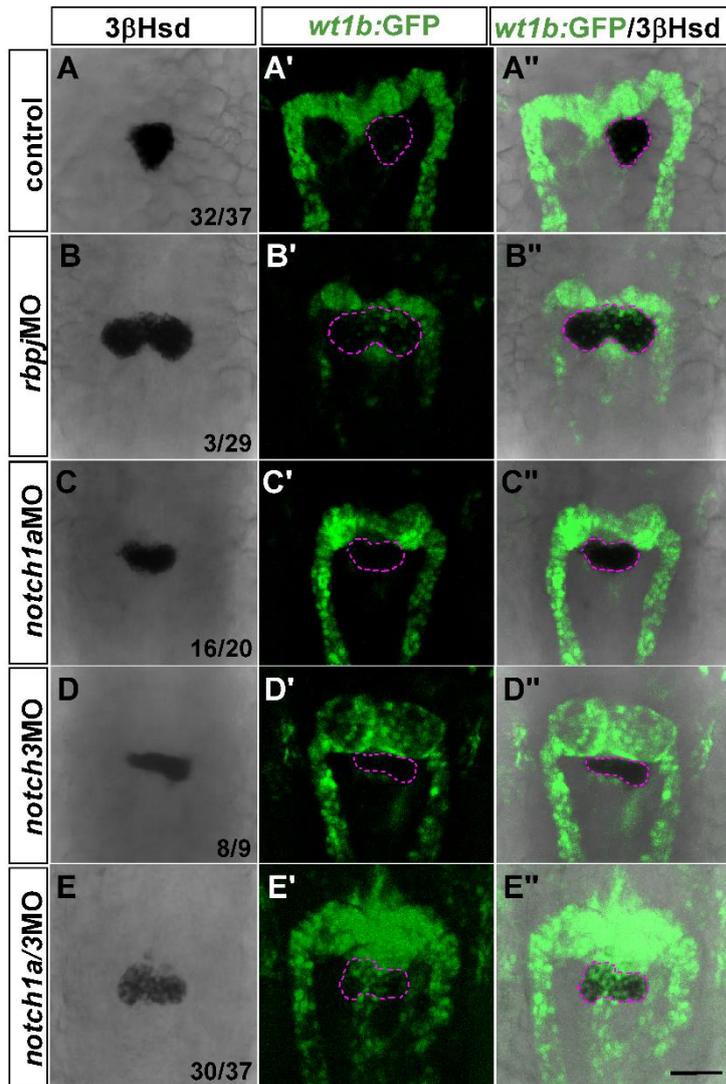
圖一、過度活化 Notch 訊號傳遞途徑致使 *ff1b* 表達增加。A-D，控制組野生型 (A, C) 及過度表達 NICD 之胚胎 (B, D) 的腎及腎間腺區域腹側視野。在胚胎發育 18.5 hpf 的時候過度活化 Notch1a-ICD 的表達，在 31 hpf 將胚胎固定再進行雙色的原位雜合染色；深紫色為 *wt1a* (A, B)、*wt1b* (C, D) 之訊號以標定原腎位置，紅色為 *ff1b* (A-D) 之訊號以標定腎間腺原基的位置。E，過度活化 NICD 對腎及腎間腺基因 mRNA 表達影響之相對定量分析。過度活化 NICD 對於腎臟基因 *wt1a/b* 的 mRNA 表達量沒有顯著的差異，但是腎間腺基因 *ff1b* 的 mRNA 表達量在過度活化 NICD 之後有顯著的增加。



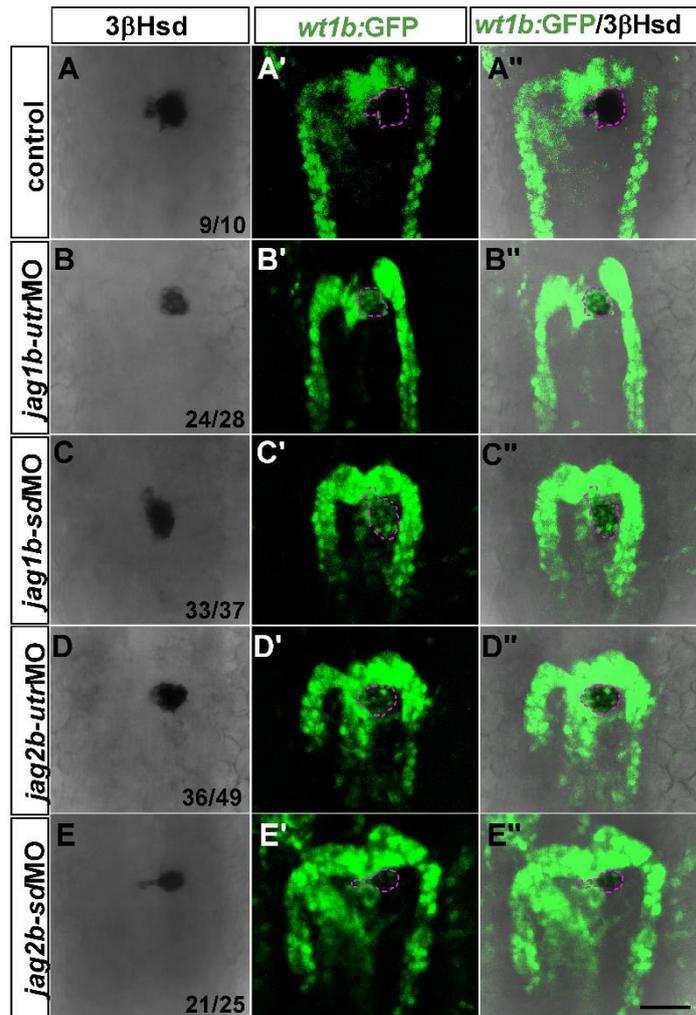
圖二、腎間腺組織中 *jag1b* 及 *jag2b* 的 mRNA 表達。以原位雜合染色在野生型斑馬魚 26 hpf 胚胎中偵測 *jag1b* 及 *jag2b* 在腎間腺組織的表達，深紫色為 *jag1b* (A) 及 *jag2b* (B) 表達的訊號，紅色為 *ff1b* (A-B，白色虛線圈出的範圍) 表達的訊號以標定腎間腺原基。去除卵黃的胚胎以腹側視野進行顯微攝影。



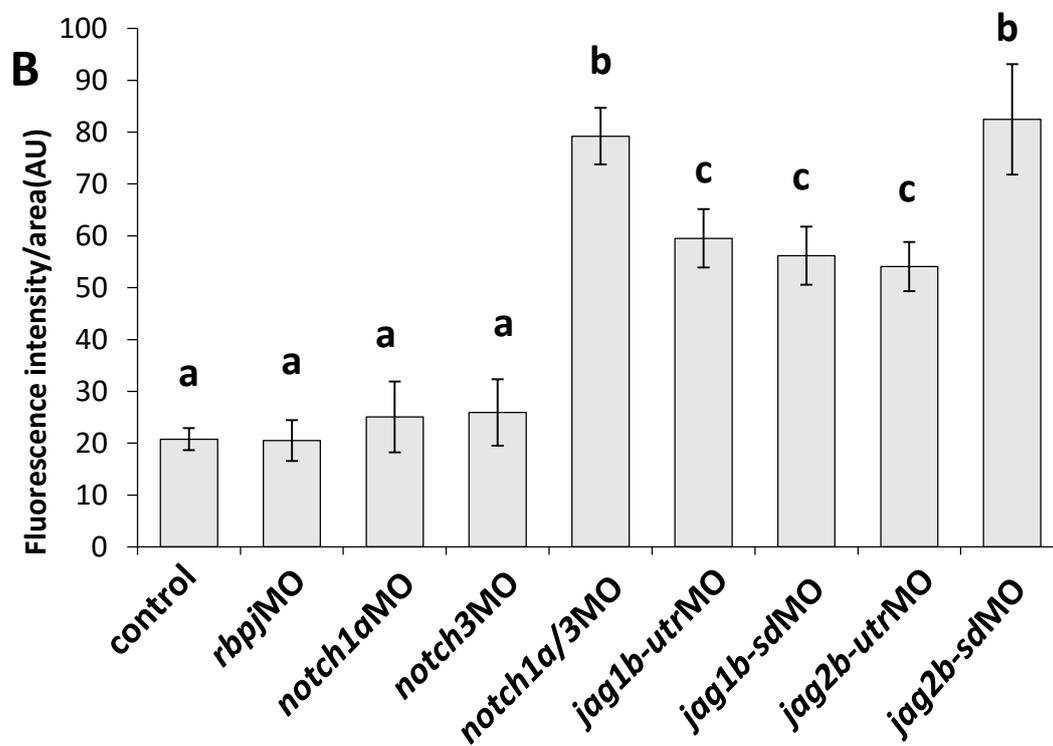
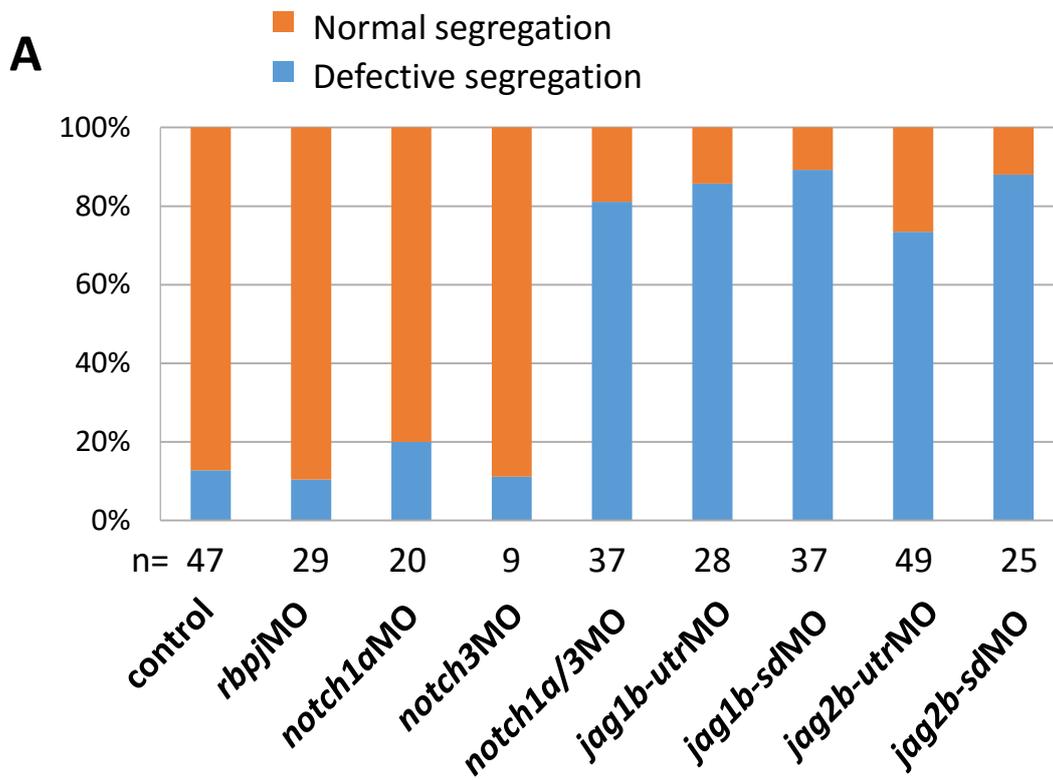
圖三、腎臟區域的 *Jag1b* 蛋白質表達。將 24 hpf *Tg(wt1b:GFP)^{li1}* 胚胎以 100 μm 的厚度切片，並以免疫組織化學染色偵測 *Jag1b* 蛋白質的表達。左圖綠色表示 *wt1b:GFP*，紅色是 *Jag1b* 表達的位置，白色虛線方框放大即為中間圖。右圖則是將中間圖 *Jag1b* 染色的紅色套色為白色呈現，*wt1b* 表達的綠色區域以綠線框出，黃色箭頭表示 *Jag1b* 的專一性表達處。NT，neural tube。NC，notochord。比例尺，50 μm 。



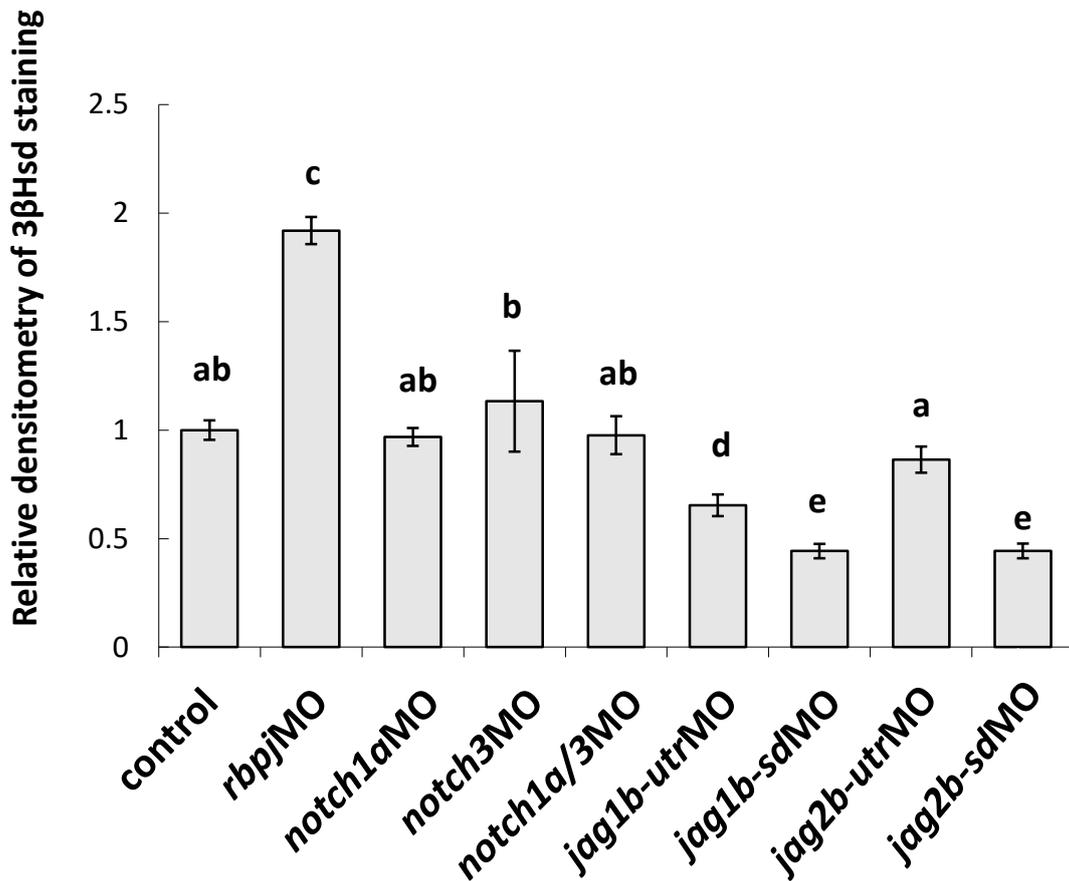
圖四、*notch1a* 及 *notch3* 表達共同被抑制會導致 *wt1b* 表達在已分化的腎間腺組織中。A-E, $Tg(wt1b:GFP)^{iil}$ 胚胎經由不同反義核苷酸注射之後發育至 34 hpf 固定組織，並以 3βHsd 染色標定腎間腺組織，以頭朝上的背側視野呈現。腎間腺組織以 3βHsd 染色標定 (A-E)，腎絲球及腎管以綠螢光標定 (A'-E')，右列是兩者的重疊 (A''-E'')，紫色虛線標示 3βHsd 的位置 (A'-E', A''-E'')。在控制組 (A-A'')，表達 *wt1b* 的細胞與表達 3βHsd 的腎間腺組織分離成不同的兩個組織；但是在 *notch1a/notch3* 同時被抑制 (E-E'') 可以發現胚胎表達 3βHsd 的腎間腺組織當中有表達 *wt1b* 的細胞，兩組組織之間無法正常的分離。比例尺，50 μm。



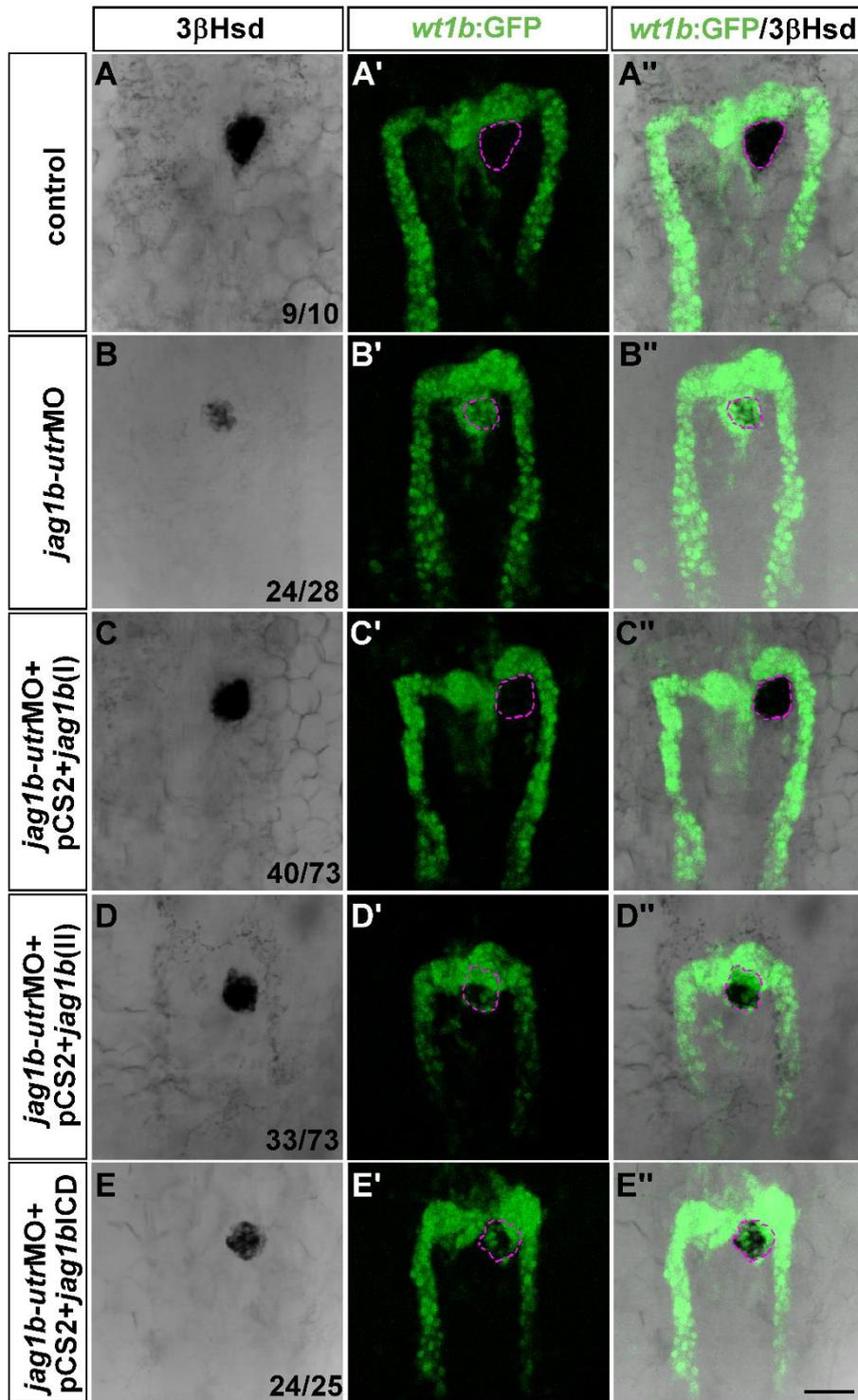
圖五、*jag1b* 或 *jag2b* 被抑制時會導致 *wt1b* 表達在已分化的腎間腺組織中。A-E, *Tg(wt1b:GFP)^{li1}* 胚胎經由不同反義核苷酸注射之後發育至 34 hpf 固定組織並標定腎間腺組織，以頭朝上的背側視野呈現。腎間腺組織以 3βHsd 染色標定 (A-E)，腎絲球及腎管以綠螢光標定 (A'-E')，右列是兩者的重疊 (A''-E'')，紫色虛線標示 3βHsd 的位置 (A'-E', A''-E'')。在控制組中 (A-A'')，表達 *wt1b* 的細胞與表達 3βHsd 的腎間腺組織會分離成不同的兩個組織，但是不論是 *jag1b* 被抑制其轉譯 (B-B'')、或被抑制其 splicing (C-C'')、或是 *jag2b* 被抑制其轉譯 (D-D'')、或抑制其 splicing (E-E'') 的各種處理，可以發現胚胎中表達 3βHsd 的腎間腺組織當中有表達 *wt1b* 的腎臟細胞，兩個組織之間無法正常的分離。比例尺，50 um。



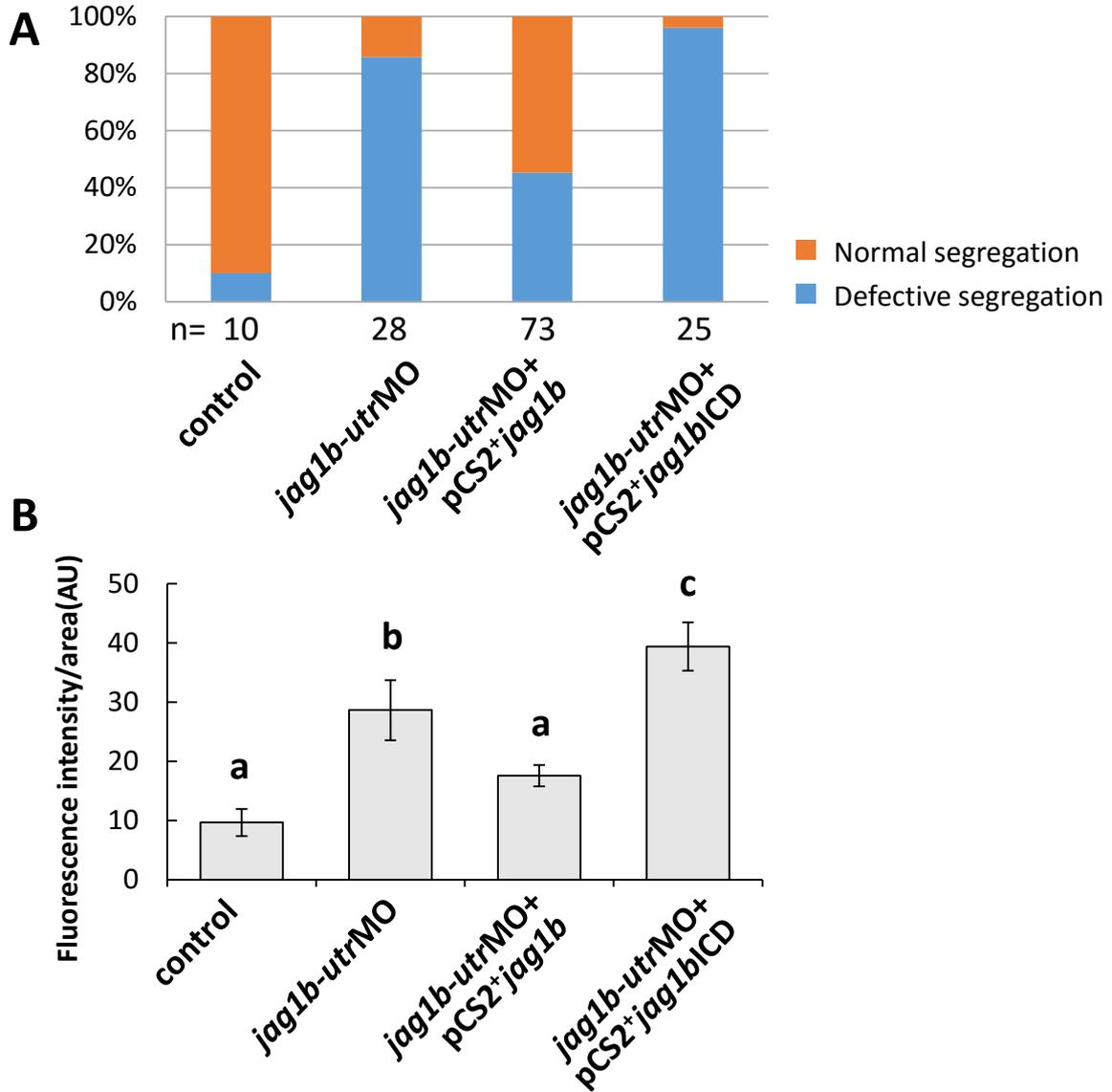
圖六、抑制不同 Notch 訊號傳遞分子對於 3 β Hsd 腎間腺組織當中的 *wtlb* 表達之定量比較與發育型態比例統計。A，抑制不同 Notch 訊號傳遞分子對於表達 3 β Hsd 及 *wtlb* 的組織之間是否正常分離的百分比統計。B，抑制不同 Notch 訊號傳遞分子對於 3 β Hsd 組織中的 *wtlb:GFP* 螢光強度定量與比較。*notch1a/3MO*、*jag1b-utrMO*、*jag1b-sdMO*、*jag2b-utrMO*、及 *jag2b-sdMO* 被注射胚胎其表達 3 β Hsd 及 *wtlb* 的組織無法正常分離的比例皆高於 75% (A)，而 3 β Hsd 組織當中的 *wtlb:GFP* 螢光強度與控制組相比皆顯著地增加，其餘處理組則與控制組無顯著差異 (B)。



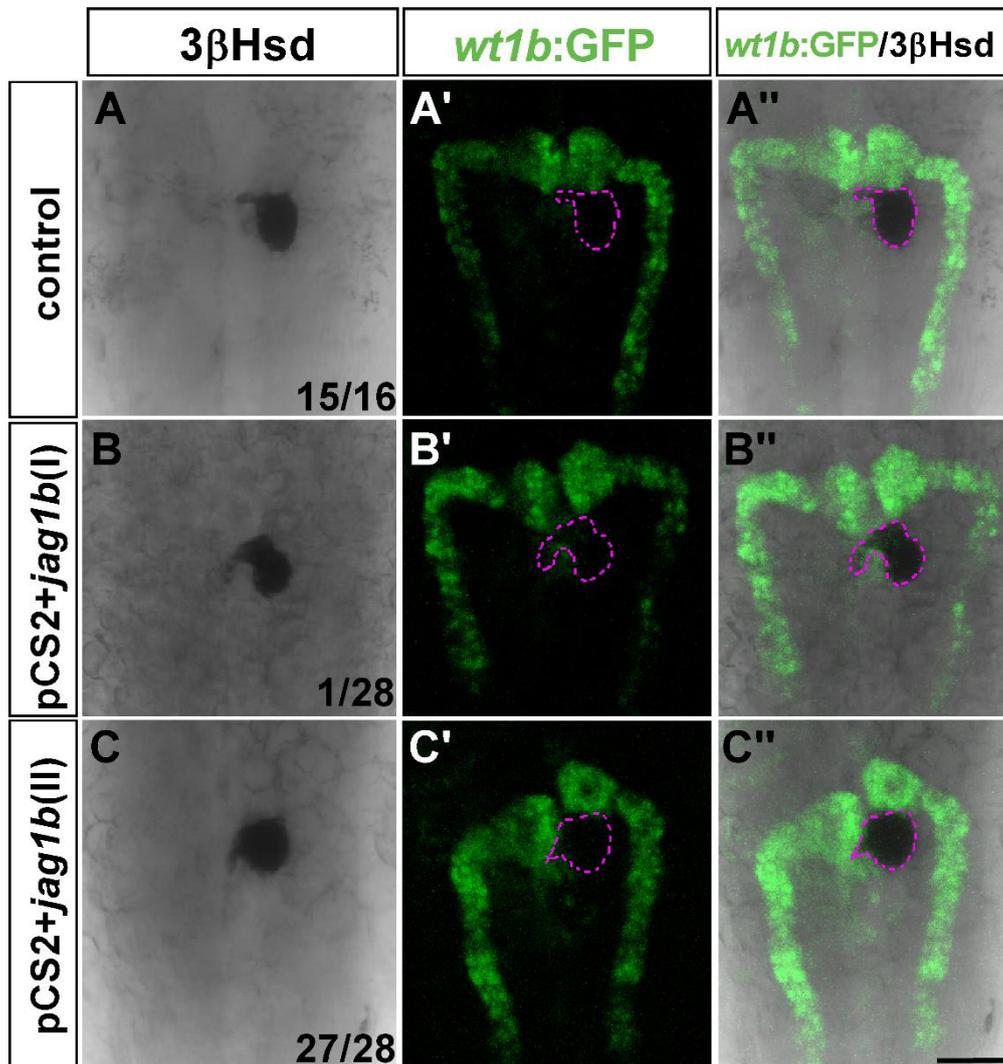
圖七、不同 Notch 訊號傳遞分子被抑制後對於表達 3βHsd 的腎間腺組織發育影響的相對定量統計與比較。rbpjMO 之被注射胚胎的腎間腺組織染色的 densitometry 定量值與控制組相比顯著地增加，而 jag1b-utr、sdMO 及 jag2b-sdMO 被注射胚胎中腎間腺組織染色的 densitometry 定量值與控制組相比皆顯著地變小。其餘組則與控制組沒有顯著差異。



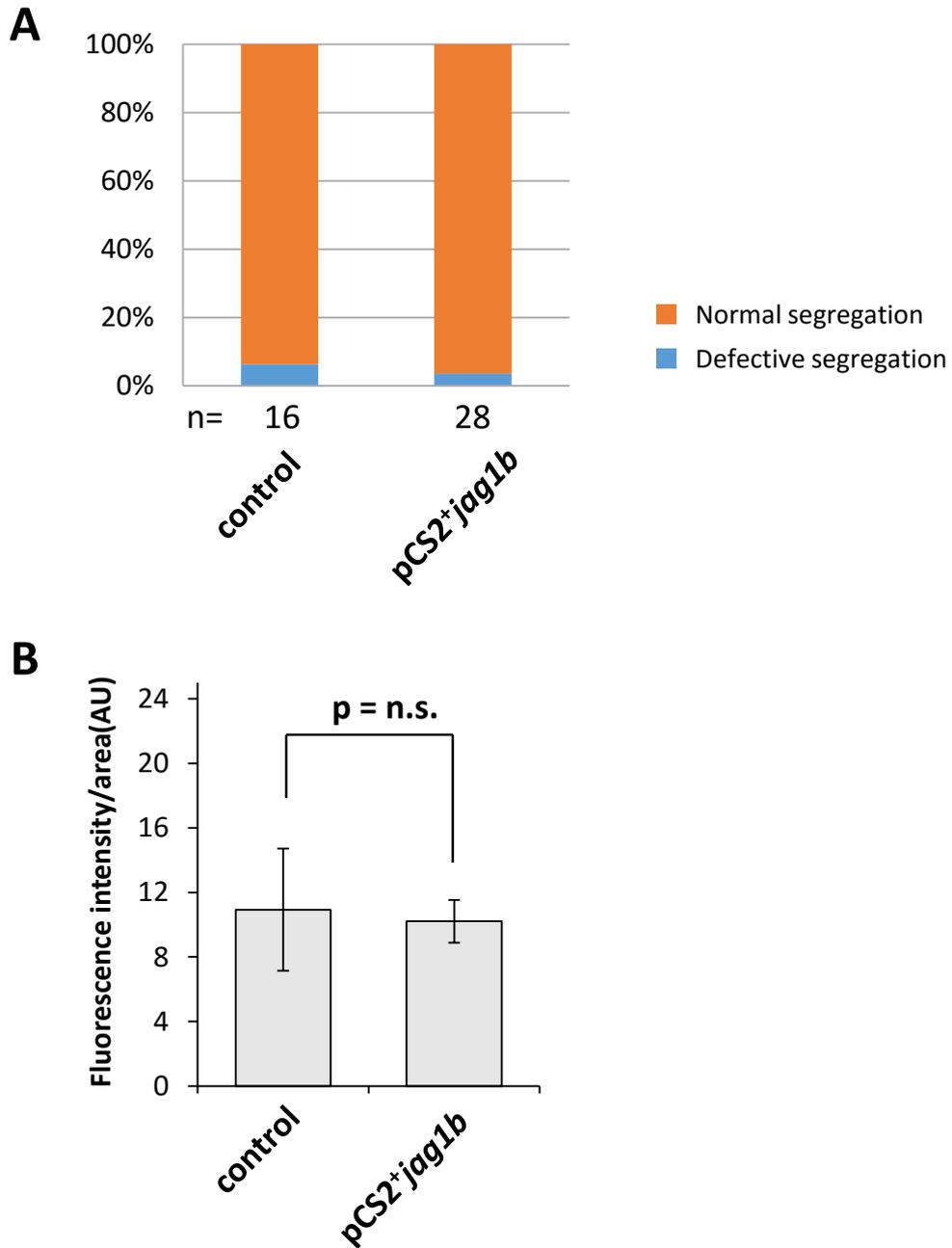
圖八、pCS2⁺*jag1b* 可以補救 *jag1b-utr*MO 腎臟及腎間腺組織不正常發育表型。A-E, *Tg(wt1b:GFP)^{lil}* 背側視野，在胚胎 34hpf 時固定組織並進行 3βHsd 染色。腎間腺組織以 3βHsd 染色標定 (A-E)，腎絲球及腎管以綠螢光標定 (A'-E')，最後列是兩者的重疊 (A''-E'')，紫色虛線標示 3βHsd 的位置 (A'-E', A''-E'')。在控制組中 (A-A'')，表達 *wt1b* 的細胞與表達 3βHsd 的腎間腺組織會分離成不同的兩個組織，但是 *jag1b-sd* morphants (B-B'') 中的腎間腺組織裏會有表達 *wt1b* 的腎臟細胞，兩種組織無法正常的分離。使用表達 *jag1b* 的 pCS2⁺ 質體去補救 *jag1b-utr* morphants，大多數的胚胎 (C-C'') 被補救成控制組的表型，少數的胚胎 (D-D'') 則無法被補救，維持 morphants 的表型。使用只表達 *jag1b*ICD 質體補救 morphants (E-E'')，胚胎無法被補救，維持 morphants 的表型。比例尺，50 um。以 1.2 pmole 的 *jag1b-utr*MO 及 25 pg 的質體注射胚胎。



圖九、*pCS2*+*jag1b* 補救 *jag1b-utr* morphant 表達 3 β Hsd 腎間腺組織當中的 *wt1b* 表達之定量比較與發育型態比例統計。A, *pCS2*+*jag1b* 補救 *jag1b-utr* morphant 其表達 3 β Hsd 及 *wt1b* 組織之間是否正常分離的百分比統計。B, *pCS2*+*jag1b* 補救 *jag1b-utr* morphant 其 3 β Hsd 組織中的 *wt1b*:GFP 螢光強度定量與比較。注射 *jag1b-utrMO* 胚胎表達 3 β Hsd 及 *wt1b* 組織無法正常分離的比例超過 85% (A), *wt1b*:GFP 螢光強度與控制組相比顯著地增加 (B)。注射 MO 的同時以 *pCS2*+*jag1b* 進行補救, 胚胎 3 β Hsd 及 *wt1b* 組織無法正常分離的比例降低成約 45% (A), *wt1b*:GFP 螢光強度也顯著地降低, 與控制組相比沒有差異 (B)。注射 MO 的同時注射 *pCS2*+*jag1bICD*, 胚胎 3 β Hsd 及 *wt1b* 組織無法正常分離的比例約 90% (A), *wt1b*:GFP 螢光強度與其他組相比顯著地增加 (B)。 *jag1b-utrMO* 注射濃度為 1.2 pmole, 質體為 25 pg。



圖十、非專一性之過度表達 pCS2+*jag1b* 不會造成腎臟及腎間腺不正常發育表型。A-C, *Tg(wt1b:GFP)^{li1}* 背側視野，在胚胎 34 hpf 時固定組織並進行 3βHsd 的染色。在控制組中 (A-A'')，表達 *wt1b* 的細胞與表達 3βHsd 的腎間腺組織會分離成不同的兩個組織。非專一性過度表達 pCS2+*jag1b* 只有少數的胚胎 (B-B'') 會有表達 *wt1b* 的腎臟細胞在表達 3βHsd 的腎間腺組織中，其餘大多數的胚胎 (C-C'') 都維持與控制組相同的表型。pCS2+*jag1b* 質體為 100 pg。比例尺，50 um。

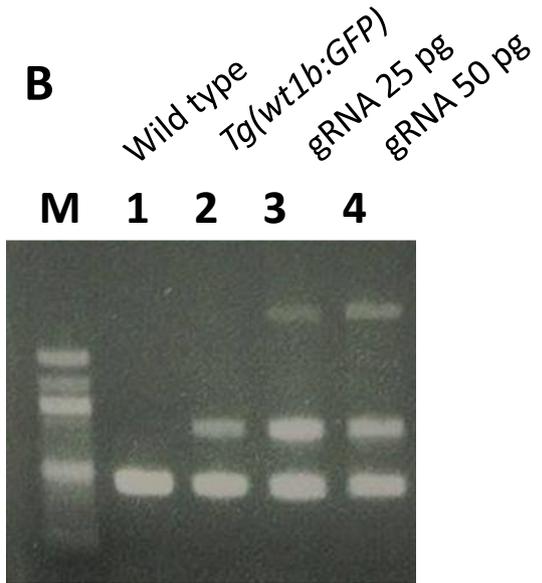


圖十一、非專一性過度表達 pCS2+jag1b 對於胚胎表達 3βHsd 腎間腺組織當中的 *wt1b* 表達之定量比較與發育型態比例統計。A，注射 pCS2+jag1b 胚胎其表達 3βHsd 及 *wt1b* 組織之間是否正常分離的百分比統計。B，注射 pCS2+jag1b 胚胎其 3βHsd 組織中的 *wt1b:GFP* 螢光強度定量與比較。注射 pCS2+jag1b 胚胎 3βHsd 及 *wt1b* 組織間無法正常分離的比例小於 10% (A)，且 *wt1b:GFP* 螢光強度與控制組相比沒有顯著差異， $p > 0.05$ (B)。質體注射濃度為 100 pg。n.s.，no significance。

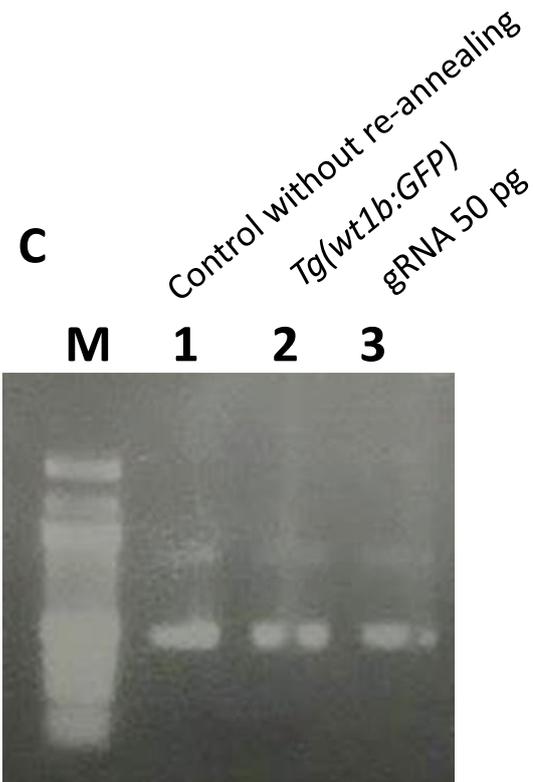
A



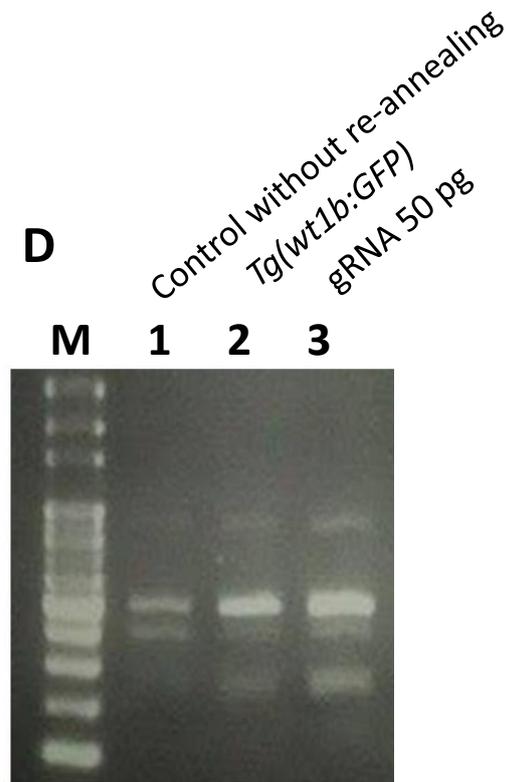
B



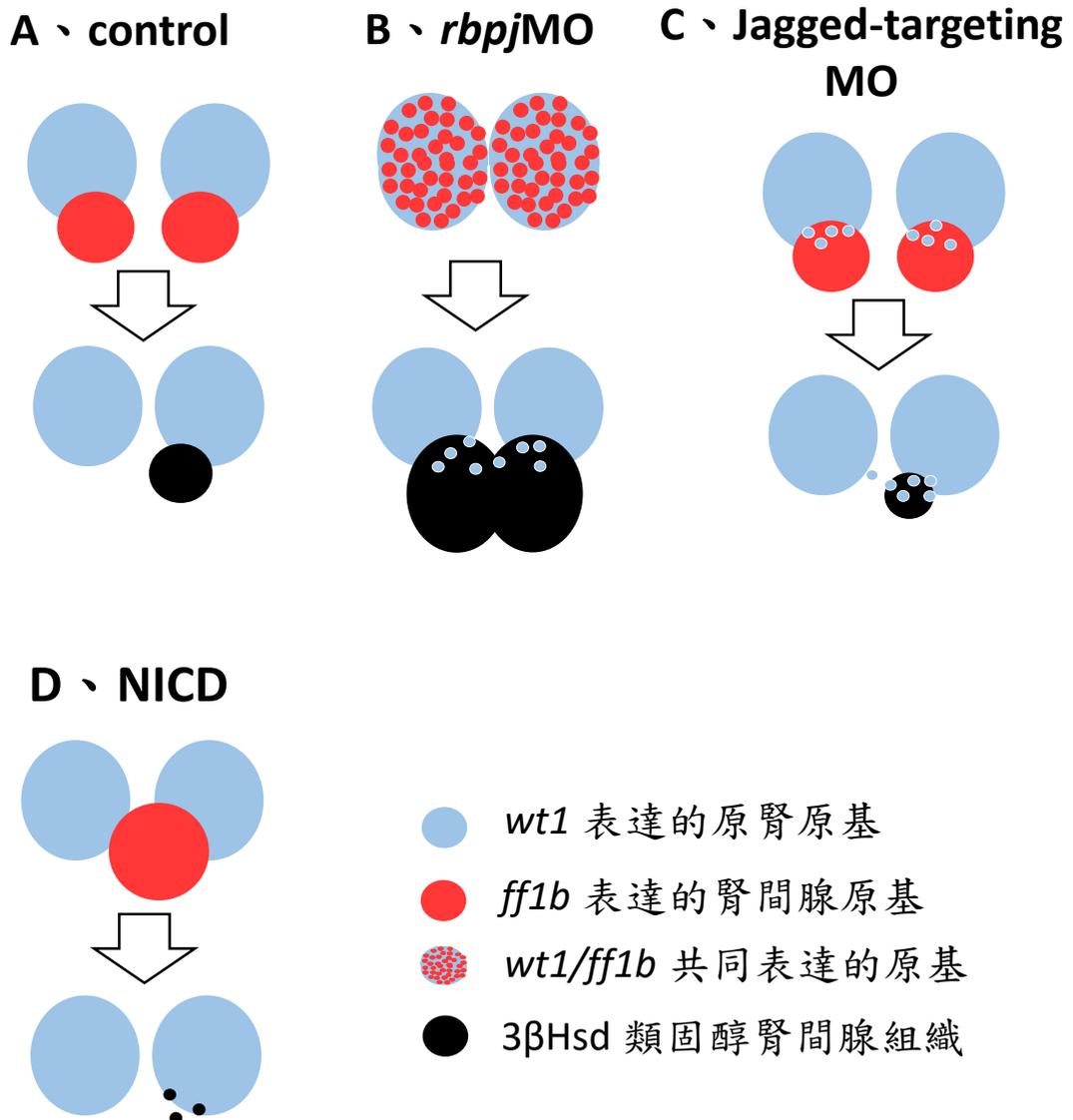
C



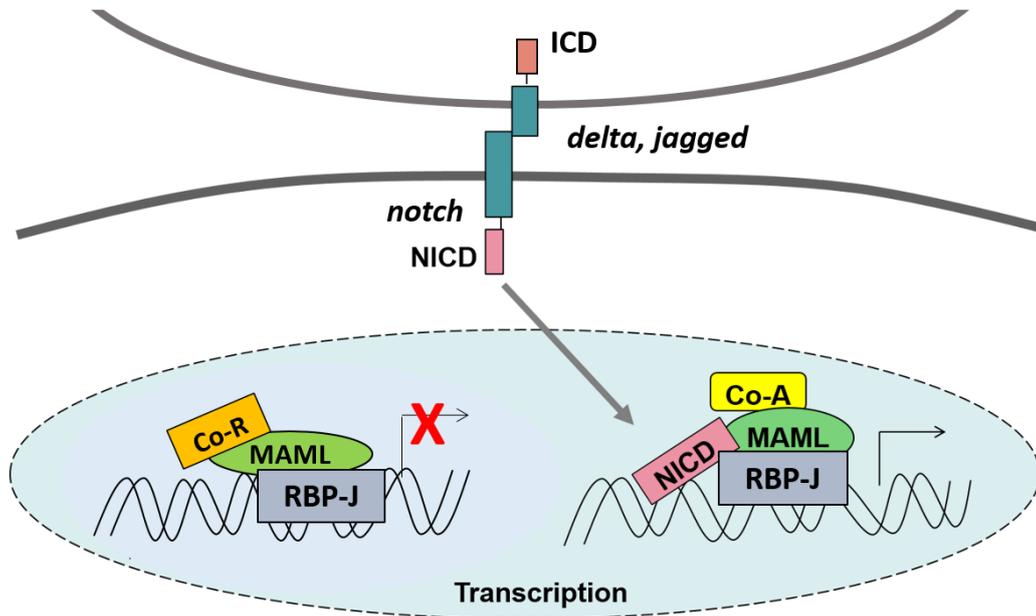
D



圖十二、T7E1 測試 CRISPR/Cas9 標靶效能。A, *jag1b* ex2 上, gRNA 標靶位點 (紅色方框處), 與雙向 PCR 引子 (黃色箭頭) 相對位置示意圖。B-D, 將樣本進行 PCR 放大之後, 從高溫到低溫使產物重新黏合, 最後進行 T7E1 測試標靶效能, 跑膠使用 100 bp marker。B, 利用 PCR 放大野生型 (1 號欄)、控制組 *Tg(wt1b:GFP)^{li1}* (2 號欄)、處理組 *jag1b* ex2 gRNA 25pg (3 號欄)、及 50pg (4號欄)。結果發現除了野生型之外, 其他兩種都有多餘的片段出現, 且注射 gRNA 25pg 與 50pg 無明顯差異。C, 控制組 *Tg(wt1b:GFP)^{li1}* (2 號欄)、及處理組 *jag1b* ex2 gRNA 50pg (3 號欄) 在以高溫到低溫重新黏合 PCR 產物之後發現多餘片段的濃度與未重新黏合的控制組 (1 號欄) 相比變淡。D, 經由 T7E1 酵素測試標靶效能的結果發現兩種控制組, 未經重新黏合 (1 號欄) 和已重新黏合 (2 號欄) 的控制組, 與處理組 *jag1b* ex2 gRNA 50pg (3 號欄) 結果相似。



圖十三、Notch 訊號傳遞對於腎及腎間腺發育影響的示意圖。A-D，控制組、*rbpj*MO、Jagged-targeting MO、及 NICD 處理之下，原腎原基與腎間腺原基發育示意圖，箭號上方藍色表示原腎原基、紅色表示腎間腺原基，箭號下方黑色表示分化完成的類固醇腎間腺組織。



附圖一、Notch 訊號傳遞途徑示意圖。傳遞訊號的細胞提供配體，配體有 *delta* 以及 *jagged* 兩種；接收訊號的細胞提供受體，稱為 *notch*。當傳遞訊號細胞的配體與另一鄰近接收訊號細胞的受體接上時，受體的細胞內結構域 (ICD) 會進入細胞核內，並與其他的共同活化子或是其他蛋白，例如 RBP-J、MAML 進行結合，進而活化下游基因轉錄。當受體的細胞內結構域沒有進入細胞核內，則無法與其他轉錄因子做結合，亦無法活化下游基因轉錄。 ICD: intracellular domain, NICD: Notch intracellular domain, Co-A: Co-activator, Co-R: Co-repressor, MAML: mastermind-like, RBP-J: recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J。

縮寫對照表

3 β Hsd	3- β -Hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^{5-4} - isomerase
AU	arbitrary units
bp	base pair
Co-A	co-activator
Co-R	co-repressor
CRISPR/Cas	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated
Del	Delta
dpf	days post fertilization
DN-MAML	dominant-negative MAML
ex	exon
FCS	Fetal Calf Serum
Flu	fluorescein
GFP	Green florescent protein
gRNA	guide RNA
hpf	hours post fertilization
Jag	Jagged
M	marker
MAB	Maleic Acid Buffer
MAML	Maleic Acid Buffer
MOs	antisense morpholino oligomers
NAD	β -nicotinamide adenine dinucleotide hydrate
NBT	Nitro blue tetrazolium
NBT/BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium
NC	notochord
NICD	Notch intracellular domain
NT	neural tube
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde

PTU	phenylthiourea
Rbpj	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J
sd	spice donor
Sf1	Steroidogenic factor 1
T7E1	T7 Endonuclease 1
Wt1	Wilm's tumor 1