

致謝

在此首先要謝謝我的指導老師蔡玉真老師，真的很感謝您，在我論文研究過程中如此用心的教導我，並在生活上給予許多的珍貴的建議。十分感謝親愛的師祖孫以瀚老師，謝謝您在我的論文研究過程中，給予許多珍貴的建議以及指正。此外要感謝范聖興老師、劉俊宏老師、謝明麗老師，對此論文提供了許多寶貴意見，以及系上老師們在學業上的教導，在此致上由衷的感謝。

在這碩士班兩年的生涯裡，身處其中總覺得度日如年，但回首卻又驚覺時間過的如此的飛快。感謝在這過程中與我共患難，一同爆肝拼實驗的同學：薰毅、靜怡、育菁；BS107 的伙伴們：小邱、俊銘、彭彭、詩涵。生科系幾位令人揪感心的學長姐：成翰、小坡、小好、小玉。還有許多在這環境一起奮鬥的好朋友們，感謝你（妳）們的陪伴，讓我在學習的過程中，獲得了繼續努力的力量，並給予我許多美好的回憶。

最後要感謝我的親愛的家人們，總是無條件支持我的父母親，總是鼓勵支持我的三位姊妹們。因為你們，我才能無後顧之憂的完成我的學業，由衷的感謝你們。

目錄

● 目錄	1
● 圖表目錄	3
● 中文摘要	4
● 英文摘要	6
● 前言	8
● 果蠅眼睛發育	8
● 果蠅眼睛發育調控機制	9
● Jak/STAT 訊息傳遞鏈	10
● Upd (Unpaired) /Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控果蠅眼睛發育	13
● Unpaired 3 可能參與之調控機制	14
● 實驗材料	17
● Fly stocks	17
● 化學藥品	21
● Primers	23
● 免疫抗體	25
● 實驗方法	26
● 篩選 <i>upd3</i> 基因突變果蠅株	26
● 果蠅 genomic DNA 萃取	27
● 轉型作用(Transformation)	27
● 小量 Plasmid 製備	28
● 中量 Plasmid 製備	29
● 聚合酶連鎖反應 (PCR)	30

• 免疫螢光染色法	30
• 掃瞄式電子顯微鏡(SEM)	31
• 原位雜交反應(<i>in situ hybridization</i>)	34
● 實驗結果	37
I. <i>upd3</i> 調控果蠅複眼發育	38
• 篩選 <i>upd3</i> 突變果蠅	38
• <i>upd3</i> 影響果蠅眼睛發育	40
II. <i>upd3</i> 是經由 Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控果蠅眼睛發育	42
• 大量表現 Jak/STAT 下游 <i>hop</i> 與 <i>upd3</i> 皆可使果蠅眼睛增大	42
• <i>upd3</i> 可活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈	43
• 大量表現 <i>Jak (hop)</i> 可補回 <i>upd3</i> 突變時所造成的小眼外表型	43
III. <i>upd3</i> 於果蠅眼睛發育時期表現時間點及位置	44
IV. <i>upd3</i> 可透過調控細胞增生影響眼睛大小而非使細胞凋亡	45
V. <i>upd3</i> 影響視神經分化的調控機制	47
• <i>upd3</i> 可活化影響眼睛發育正向因子 <i>dpp</i> 表現	48
• <i>upd3</i> 不影響眼睛發育負向調控因子 <i>wg</i> 及 <i>omb</i> 表現	48
● 討論	50
• <i>upd3</i> 與 <i>upd</i> 皆可透過 Jak/STAT 訊息影響果蠅眼睛發育	50
• <i>upd3</i> 與 <i>upd</i> 影響視神經分化機制的相同與相異之處	51
• 最早的 <i>upd-like</i> 基因突變 <i>os^s</i> 為 <i>upd3</i> 基因突變株	51
• Upd、Upd2 與 Upd3 蛋白質序列比較	53
● 參考文獻	54

圖表目錄

圖表

圖一：利用遺傳方法分析 <i>upd3</i> 基因突變株	60
圖二： <i>upd3</i> 突變株於 <i>upd3</i> 基因的缺失位置	62
圖三： <i>upd3</i> 透過 Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控果蠅眼睛發育	63
圖四： <i>upd3</i> 可活化果蠅眼碟 Jak/STAT 訊息傳遞鏈	64
圖五： <i>upd3</i> 在果蠅眼碟的表現的時間及位置	66
圖六： <i>upd3</i> 可透過調控細胞增生進而影響眼睛大小	67
圖七： <i>upd3</i> 並非藉由影響細胞凋亡影響眼睛大小	68
圖八： <i>upd3</i> 可能藉由誘導 <i>dpp</i> 表現影響 MF 生成	69
圖九： <i>upd3</i> 不影響眼睛發育負向調控因子 <i>wg</i> 及 <i>omb</i> 表現	70
圖十： <i>upd3</i> 與 <i>upd</i> 影響眼睛發育機制	71

附圖

附圖一：果蠅眼睛發育	72
附圖二：果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈	73
附圖三：果蠅與哺乳類之 Jak/STAT 訊息傳遞鏈	74
附圖四：以 P-element 跳離實驗篩選出 8 個 <i>upd3</i> 基因可能的突變株	75
附圖五：引子(Primers)位於 <i>upd3</i> 基因之相對位置	77
附圖六：原位雜交使用之質體	78
附圖七： <i>os^s</i> 為 <i>upd3</i> 基因突變株	79
附圖八：Upd、Upd2 與 Upd3 蛋白質序列比較	81
附圖九：以 EMS mutagenesis 實驗篩選出 11 個 <i>upd3</i> 基因可能的突變株	83
個人資料表	84

摘 要

unpaired3 (*upd3*) 目前被推測為 Janus Kinase (Jak) / Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 訊息傳遞鏈配體。JAK/STAT 訊息傳遞鏈在發育過程中扮演著極為重要的角色，且在演化上哺乳類及果蠅具有相當高度保留性。果蠅的基因組中有 3 個可能的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈配體：Upd、Upd2 及 Upd3。當中以 *upd* 調控眼睛發育的研究較為清楚。已知 *upd* 可藉由調控 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，進而影響眼睛的大小。*upd* 在早期眼碟發育過程，具有促進細胞增生的功能。在果蠅眼睛發育過程中，Upd 會從眼碟上的凹溝 (morphogenetic furrow, MF) 起始位置分泌，促進果蠅視覺神經開始分化。*upd* 會透過抑制 MF 分化的負向因子 *wingless* (*wg*)，且促進正向調控因子 *decapentaplegic* (*dpp*) 的表現，來影響眼睛發育。而 *upd2*、*upd3* 在果蠅眼睛發育過程中，所扮演的角色仍不清楚。*upd2* 完全喪失功能的果蠅，眼睛大小幾近為正常。然而 *upd3* 在果蠅眼睛發育的過程中，所扮演的角色及其調控機制仍不清楚。我的實驗結果發現，*upd3* 大量表達或失去功能時，會影響眼睛的大小。若在 *upd3* 突變果蠅中，在眼睛表達 *upd3* cDNA，則可使眼睛大小恢復。此外，我利用 RNA 原位雜交方式 (RNA *in situ* hybridization) 檢測 *upd3* 在果蠅眼碟的表現的時間

及位置。結果顯示，*upd3* 在早期果蠅眼睛發育時期的確有表現。更進一步檢測 *upd3* 是否透過 JAK/STAT 訊息傳遞鏈調控眼睛發育，結果發現 *upd3* 可活化 JAK/STAT 訊息傳遞鏈。在 *upd3* 失去功能的情況下，大量表達 *Jak* (*hop^{Tum-1}*) 則可使眼睛大小恢復。綜合以上結果推測，*upd3* 會藉由 Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控眼睛大小。研究 *upd3* 影響眼睛發育的調控機制，結果發現 *upd3* 會透過促使細胞增生而非影響細胞凋亡，進而影響眼睛大小。另一方面 *upd3* 會經由活化眼睛正向調控因子 *dpp*，但並不影響負向因子 *wg* 在眼碟的表達。綜合以上結果，顯示 *upd3* 確實為 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體，且在果蠅眼睛發育過程中影響細胞增生，並參與視覺神經分化的調控，影響果蠅眼睛的發育。

Abstract

unpaired3 (*upd3*) encodes an Unpaired (Upd)-like protein which is a putative ligand of the Janus kinase (Jak) / signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway. The JAK/STAT pathway is highly conserved in mammals and *Drosophila*. It plays multiple distinct roles during developmental processes. There are three *unpaired-like* genes, *upd*, *upd2* and *upd3* in the fly genome. *upd* is well studied during eye development. It has been shown that *upd* controls the eye size through the Jak/STAT pathway. Upd is effective for cell proliferation in early eye development. Upd is a secreted protein expressed at the middle of posterior margin of eye disc where differentiation of the photoreceptor neurons starts. It has been shown that *upd* antagonizes the negative eye regulators *wingless* (*wg*) and induces the positive eye regulators *decapentaplegic* (*dpp*) expression during eye development. However, the roles of *upd2* and *upd3* in *Drosophila* eye development are still unclear. In the *upd2* null mutant, the adult eye size is nearly normal. We are interested in whether *upd3* is involved in *Drosophila* eye development. I generated *upd3* mutants by P element-mediated excision. The *upd3* null mutant is viable and fertile. It showed small eye phenotype. Overexpression of *upd3* cDNA induced eye enlargement. These suggest *upd3* can control eye size. *upd3* expression

pattern was detected by RNA *in situ* hybridization, the result showed *upd3* is expressed during *Drosophila* eye development. To examine whether *upd3* controls the eye size through the Jak/STAT pathway, the *10xSTAT92E-GFP* reporter was used to detect the Jak/STAT activity. My result showed that *upd3* can activate the Jak/STAT activity *in vivo*. Expression of the constitutive active *Jak* (*hop^{Tum-1}*) can rescue *upd3*⁻ small eye phenotype. These results indicated that *upd3* acts through the Jak/STAT pathway to control the eye size. To further verify how *upd3* regulates eye size, I found *upd3* promotes cell proliferation but does not affect apoptosis during eye development. *upd3* can induce *dpp*, the positive eye regulator, but does not affect the *wg*, the negative eye regulators. These results suggest that *upd3* is a true ligand for the Jak/STAT pathway, promotes cell proliferate and neuron cell differentiation during *Drosophila* eye development.

前 言

我的研究主要是利用果蠅作為實驗平台，探討 Janus Kinase (Jak) / Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 訊息傳遞鏈的配體 *unpaired3* (*upd3*)，在果蠅眼睛發育的過程中所扮演的角色。並探討 *upd3* 與其他訊息間的交互作用機制，藉此瞭解 *upd3* 影響果蠅複眼的生長發育的調控過程。

果蠅眼睛發育

果蠅成蟲視覺器官由一對複眼與三個單眼所構成，正常的複眼由 750~800 個小眼 (ommatidium) 規律排列所組成。每個小眼包含 8 個視覺細胞 (photoreceptor)、4 個圓錐細胞 (cone cell)、6 個色素細胞 (pigment cell) 以及剛毛 (bristle) 等 19 個細胞 (Ready *et al.*, 1976)。成年的果蠅眼睛是由一盤狀構造稱之眼碟 (eye imaginal discs) 發育而成 (附圖一)。胚胎至二齡幼蟲時期，眼碟上的細胞則不斷的增生至一定細胞數量。到三齡幼蟲時期，眼碟上的細胞會壓縮成一個凹溝稱之為 morphogenetic furrow (MF)，並自眼碟後端移動到前端，而在 MF 上的細胞則會停留在 G1 週期，並開始分化成為神經細胞 (Ready *et al.*, 1976)。三齡幼蟲的眼碟有兩波細胞會同時進行分裂及增生，稱為

mitotic wave。第一波的 mitotic wave 位於 MF 前面並製造一群尚未分化的細胞，未來會生成 R2, R3, R4, R5 及 R8 的視覺前驅細胞。第二波的 mitotic wave 則位於 MF 之後，製造 R1, R6, R7 的視覺細胞、圓錐細胞及色素細胞，而此時被選出的 R cell 會分化成視神經細胞，並在蛹期進一步分化成複眼（Ready *et al.*, 1976 ; Bate and Martinez-Arias, 1993）。

果蠅眼睛發育調控機制

在眼睛發育的過程中，已知有許多訊息傳遞途徑，藉由調控視神經分化過程以及影響細胞數量進而參與眼睛發育。果蠅眼睛發育至三齡幼蟲時期，眼碟上的凹溝（morphogenetic furrow, MF）自眼碟後端移動到前端，位於 MF 後的部分細胞則受到調控，進一步分化成為視神經細胞（附圖一）。MF 的起始決定視覺神經細胞分化的開始。在眼睛發育早期，即早期三齡幼蟲眼碟，*hedgehog* (*hh*) 及 *decapentaplegic* (*dpp*) 表現於眼碟後端，正向調控 MF 的啟動。*dpp* 為一類 TGF β -like 蛋白，MF 啟動後 *hh* 會進一步活化 *dpp*，促進 MF 自眼碟後端往前端移動（Zecca *et al.*, 1996）。*wingless* (*wg*) 為 Wnt 基因家族的一員，已知 *wg* 表現在眼碟背腹邊緣兩側（Baker, 1988），為 MF 啟動的負向調控因子（Ma and Moses, 1995 ; Treisman and Rubin, 1995）。目前已知 *wg* 和 *dpp* 會互相抑制彼此表現，使得 MF 能固定自眼碟後端平行移動

至前端 (Theisen *et al.*, 1996) (附圖一)。在眼碟中異位性表達 *wg* 的實驗得知, *wg* 可透過短距離正向調控方式影響轉錄因子 *optomotor-blind* (*omb*) 表現, 進而影響眼睛發育 (Zecca *et al.*, 1996)。*omb* 屬於果蠅 T-Box 基因家族的一員, 表現於三齡幼蟲時期的眼碟邊緣兩側與神經膠質細胞 (glial cell)。目前研究已知 *omb* 突變株具大眼外表型, 並推測其可能透過影響 MF 啟動, 調控眼睛發育 (Yu-Chen Tsai, unpublished data)。

Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體 *unpaired* (*upd*), 在果蠅早期發育時期即有表達。且在眼碟後端中央位置即 MF 起始位置表現 (Tsai and Sun, 2004), 參與眼睛發育過程。進一步研究發現 *upd* 缺失或大量表現時, 果蠅眼睛大小則受到影響 (Tsai and Sun, 2004)。目前得知 *upd* 影響眼睛發育的機制, 是透過抑制眼碟凹溝分化的負向因子 *wingless* (*wg*), 且促進正向調控因子 *decapentaplegic* (*dpp*) 的表現, 進而調控眼睛發育 (Ekas *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2007)。

Jak/STAT 訊息傳遞鏈

Jak/STAT 訊息傳遞鏈主要由 Janus Kinases (JAKs) 與 Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) 組成。雖然成員簡單, 但在發育過程中扮演著極為重要的角色。Jak/STAT 訊息傳遞鏈

調控著生物胚胎體節生成、性別決定、脂肪新生、免疫反應、血球生成等過程，此外也參與決定幹細胞命運（reviewed by Igaz *et al.*, 2001; Rawlings *et al.*, 2004）。在細胞層次 Jak/STAT 訊息傳遞鏈和細胞增生、分化、移動以及凋亡調控相關（reviewed by Rawlings *et al.*, 2004）。此外在 Jak/STAT 訊息傳遞鏈異常活化情況下，則與異常的免疫反應和腫瘤生成有關（reviewed by Arbouzova and Zeidler, 2006 ; Rawlings *et al.*, 2004）。

哺乳類動物中，Jak/STAT 訊息傳遞鏈包含了 4 個 *Jak* (*Jak1*, *Jak2*, *Jak3* 及 *Tyk2*) 和 7 個 *STAT* 基因(*STAT 1*, *2*, *3*, *4*, *5a*, *5b* 及 *6*) (Kisseleva *et al.*, 2002) 受到如細胞白介素 (interleukin)、干擾素 (interferon) 及細胞激素 (cytokines) 活化 (Langer *et al.*, 2004 ; Subramaniam *et al.*, 2001)。相較於哺乳類動物，果蠅中的 Jak 及 STAT 組成較簡單，已知其包括三個配體 (Unpaired : Upd、Upd2 與 Upd3) (Agaisse *et al.*, 2003; Castelli-Gair Hombría *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2005; Harrison *et al.*, 1998)、兩種細胞膜上的受器 *Domeless* (*Dome* 亦稱 *master of marelle*, *mom*) (Brown *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002) 及 *CG14225* (亦稱 *domelike* 或 *latran*) (Hombría and Brown, 2002)、一個 JAK (*hopscotch*, *hop*) 與一個 STAT (*STAT92E*) (Hou *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996) (附圖二)。

演化上而言，哺乳類及果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，皆可找到相對應的 Jak/STAT 訊息因子，具有相當高度保留性 (Evolutional conserved)。當中以果蠅的 *hop* 以及 *STAT92E*，則和哺乳類 Jak2 與 STAT5 最為相似 (Arbouzova and Zeidler, 2006)。此外 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的配體，在哺乳類當中細胞激素 Leptin 則和果蠅配體 Upd 序列上相近 (Arbouzova and Zeidler, 2006; Langer et al., 2004)。而果蠅接受體 Dome 則類似哺乳類介白素-6 接受體 (interleukin-6 receptor) (Brown et al., 2001)。由於果蠅中的 Jak 及 STAT 組成僅有單一 Jak 及 STAT，在功能上較不重複 (Non-redundant)。因此利用果蠅作為研究工具探討 Jak/STAT 訊息傳遞鏈作用機制的，具有相當的優勢 (附圖二)。

在果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈配體：Upd1、Upd2 及 Upd3。位於 X 染色體 17A5-8 的位置，且彼此相鄰 (Agaisse et al., 2003; Castelli-Gair Hombria et al., 2005; Harrison et al., 1998)。此三個配體的蛋白質序列平均長度為 395 個氨基酸，蛋白質序列之相同度與相似度分別僅為 7.3% 與 24% (附圖八)。

果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈中的 JAK (Hopscotch, Hop)，為一類非受體型酪胺酸激酶 (non-receptor tyrosine kinase)。當外面訊息傳入細胞後，Hop 會進一步的磷酸化接受體 Dome 產生停靠點。此時 STAT

(STAT92E) 的 SH2 區域 (domain) 與接受體靠近，並進一步的使 STAT92E 被磷酸化，進而形成雙聚體。STAT92E 為一類轉錄調控因子，在細胞內被磷酸化 STAT92E 則轉變為活化態，隨後以雙聚體的方式進入細胞核內，調控下游基因如 SOCS (suppressor of cytokine signaling)、PTP61F (homologue of human phospho-Tyr phosphatase B1) 的轉錄。此外目前已發現果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，亦受到其下游基因及其他負向因子的調控。當中包含下游因子 SOCS、PTP61F，以及其他因子如同 PIAS (protein inhibitor of activated STAT)、 Δ N STAT92E 及 KEN 等基因 (for review, Arbouzova and Zeidler, 2006)。

Upd (Unpaired) /Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控果蠅眼睛發育

在果蠅的基因組中，有 3 個 Jak/STAT 訊息傳遞鏈可能的配體：Upd、Upd2 及 Upd3 (Agaisse *et al.*, 2003; Castelli-Gair Hombría *et al.*, 2005; Harrison *et al.*, 1998)。目前以 Upd 的研究較為清楚。Upd 為一類分泌性糖蛋白，可分泌到細胞外，經 Dome 活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈 (Harrison *et al.*, 1998)。此外從過去文獻中得知，*upd* 缺失的情況下會導致果蠅氣管及胚胎體節發育的缺失 (Brown *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 1998)。在果蠅眼睛發育過程中，Upd 可分泌到細胞外，並透過遠距離的活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，影響大於 20 個細胞之遠 (Tsai and

Sun, 2004)。此外已知 Upd 藉由調控 MF 前面尚未分化的細胞增生，進而影響眼睛的大小 (Tsai and Sun, 2004)。在二齡、早期三齡果蠅幼蟲，*upd* 表現於眼碟後端邊緣的中間位置，可透過活化影響 MF 分化的正向因子 *dpp* 表現，並抑制 MF 分化的負向因子 *wg* 表現，調控 MF 的起始。當 *upd* 失去功能時會使得果蠅的眼睛變小，反之 *upd* 大量表現時則使眼睛變大 (Bach *et al.*, 2003; Ekas *et al.*, 2006; Tsai and Sun, 2004; Tsai *et al.*, 2007)。

Jak/STAT 訊息的下游因子 Jak (*hop*) 失去功能的情況下，則使果蠅小眼數目減少，嚴重者則導致眼睛完全無法生成 (Luo *et al.*, 1999)。*STAT92E^{ts}* 突變株果蠅在室溫為小眼外表型，此時使 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性下降，果蠅的眼睛發育則完全受到抑制 (Tsai *et al.*, 2007)。從以上結果得知，Jak/STAT 訊息傳遞鏈對於果蠅眼睛發育的調控極為重要，且不可或缺。

Unpaired 3 可能參與之調控機制

比較 Jak/STAT 訊息傳遞鏈配體 (*upd*) 與 Jak (*hop*) 缺失時，影響眼睛大小的嚴重程度中發現。*upd* 缺失時眼睛變小 (Tsai and Sun, 2004)，但 Jak (*hop*) 失去功能的情況下，不僅使小眼數目減少，嚴重者眼睛的生成則完全受到抑制 (Luo *et al.*, 1999)。由此觀察中發現，

Jak/STAT 訊息的下游因子缺失時對於眼睛發育的影響，比上游配體 *upd* 缺失時更為顯著。因此推測 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的另外兩個配體，*upd2* 以及 *upd3* 可能參與眼睛發育的調控 (Tsai and Sun, 2004)。

先前本實驗室的研究中發現，在 *upd2* 完全失去功能的果蠅，其對於果蠅眼睛大小影響僅輕微的變小 (worked by Po-How Chen and Yu-Ting Chiu)。而 *upd3* 在發育過程中所扮演的角色仍不清楚。過去文獻中指出，果蠅受傷且受到細菌性感染情況下，血球細胞 (Hematocyte) 會釋放出 *upd3*，活化脂肪體 (fat body, 等同於人類肝臟) 的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，進而活化 TEP 蛋白 (Thioester containing proteins)，促使噬菌作用 (phagocytosis) 發生，用以對抗外來微生物 (Agaisse *et al.*, 2003 ; Malagoli D *et al.*, 2008 ; Pastor-Pareja *et al.*, 2008)。

先前我們實驗室自哈佛醫學大學的 Harvard Exelixis Collection 中心取得 *upd3*^{d4951} 果蠅株，其 P-element 序列插入 *upd3* 基因前 244 bps 位置，發現具有小眼外表型 (圖一 C，圖二)，為此我們推論 *upd3* 可能參與調控果蠅眼睛發育。因此我研究目的主要在於了解在果蠅眼睛發育的過程中，*upd3* 所扮演的角色及其調控機制。

我的實驗結果發現，*upd3* 大量表達或失去功能時，會影響眼睛的大小。在 *upd3* 基因完全缺失的突變果蠅中，表達 *upd3* cDNA，則可使

眼睛大小恢復。此外利用 RNA 原位雜交方式 (RNA *in situ* hybridization)，發現 *upd3* 在早期果蠅眼睛發育時期的確有表現。結果中發現 *upd3* 可藉由 Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控眼睛大小。從 *upd3* 影響眼睛發育的調控機制中得知，*upd3* 會透過促使細胞增生而非影響細胞凋亡，進而影響眼睛大小。另一方面，*upd3* 經由活化眼睛正向調控因子 *dpp*，但並不影響負向因子 *wg* 在眼碟的表達。

實驗材料

Fly stocks

#1 <i>10x STAT-GFP/CyO</i>	Bach <i>et al.</i> , 2007
#2 <i>10x STAT-GFP/TM6B</i>	Bach <i>et al.</i> , 2007
¹¹¹⁶ <i>w ; dpp-GAL4, dpp-lacZ/S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
¹³¹ <i>w ; Dr/TM3, Δ2-3 Sb</i>	From Dr. Y. Henry Sun
¹⁴⁰⁴ <i>GMR-GAL4/CyO</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
¹⁴⁷ <i>w, omb^{p1}</i>	Sun <i>et al.</i> , 1995
¹⁴⁸⁰ <i>Df (1) os-UE19/C (1) DX, y¹ f¹/Dp (1;Y) W³⁹y⁺</i>	(Harrison <i>et al.</i> , 1998) from Dr. Y. Henry Sun
¹⁴⁹⁷ <i>os^s</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
¹⁵⁷⁶ <i>Df (3L) H99, kni^{ri-1} p^p/TM3Sb¹</i>	From Dr. Y. Henry Sun
¹⁹⁰⁶ <i>w ; Sp/CyO ; UAS-p35/TM6B</i>	From Dr. Y. Henry Sun
¹⁹⁵⁰ <i>FM7,P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3/C (1)</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>Dx, f¹</i>	
²⁶⁰⁵ <i>w UAS-reaper, c27 (X)</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>w ; ⁴⁻² UAS-upd3/TM6B</i>	From our Lab
⁴⁴⁹² <i>cv¹ ct¹ v¹ os^{upd-1} mal¹/FM7c</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
⁷⁸ <i>os^o</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>E132-GAL4</i>	(Halder <i>et al.</i> , 1995) from Dr. Y. Henry Sun
<i>E132-GAL4 ; Sp/CyO</i>	Sun
<i>E132-GAL4 ; Sp/CyO</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>E132-GAL4 ; UAS-GFP</i>	From our lab
<i>FM7a</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>GMR-GAL4, UAS-IP8763⁴⁻²/S-T</i>	From our Lab
<i>hs-Flp¹²² ; Ay>y⁺>GAL4, UAS-GFP/CyO</i>	(Ito <i>et al.</i> , 1997) from Dr. Y. Henry Sun
<i>omb/FM7 ; Sp/CyO</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>os¹ hop^{m13}/FM7</i>	Tsai <i>et al.</i> , 2007
<i>os¹, w ; ey-GAL4/S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun

<i>p[XP]upd3^{d871}</i>	Exelixis Drosophila Stock Collection at Harvard Medical School
<i>w ; Pin/CyO</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>w ; UAS-IP8763⁴⁻²/CyO</i> <i>(UAS-upd3 cDNA (II))</i>	From our Lab
<i>w ; UAS-p35/TM6B</i> <i>upd3^{d4951}</i>	(Hay <i>et al.</i> , 1994) from Dr. Y. Henry Sun Exelixis Drosophila Stock Collection at Harvard Medical School
<i>upd3^{d4951} ; dpp-lacZ/CyO</i>	From our Lab
<i>upd3^{d4951} ; wg-lacZ/S-T</i>	From our Lab
<i>upd3^{d4951} ; GMR-GAL4/CyO</i>	From our Lab
<i>upd3^{d4951} ; hs-Flp Sb, TM3/TM6B</i>	From our Lab
<i>upd3^{d4951} ; Sp/CyO</i>	From our Lab
<i>upd3^{p106-2} ; 10x STAT-GFP/TM6B</i>	From our Lab
<i>upd3^{p106-2} ; ey-GAL4/TM6B</i>	From our Lab
<i>upd3^{p106-2} ; Pin/CyO</i>	From our Lab
<i>upd3^{p106-2} ; TM3Sb/TM6B</i>	From our Lab
<i>upd3^{p106-2} ; UAS-upd3⁴⁻²/TM6B</i>	From our Lab
<i>w ; 10x STAT-DGFP/CyO</i>	Bach <i>et al.</i> , 2007
<i>w ; Ay-GAL4, UAS-lacZ ;</i> <i>10x STAT-GFP/S-T</i>	From our Lab
<i>w ; DH/S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>w ; Sp/CyO ; ey-GAL4/TM6B</i>	From our Lab
<i>w ; wg-lacZ , UAS-upd3⁴⁻²/S-T</i>	From our Lab
<i>w ; UAS-upd-GFP³⁵⁻¹ (II) /S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>w, Ay-GAL4, UAS-GFP ; dpp-lacZ/S-T</i>	From our Lab
<i>w, Ay-GAL4, UAS-GFP/CyO ;</i> <i>dpp-lacZ/TM6B</i>	From our Lab
<i>w, Ay-GAL4, UAS-GFP/CyO ; Dr/TM6B</i>	From our Lab
<i>w, ey-GAL4/TM6B</i>	(Quiring <i>et al.</i> , 1994) from Dr. Y. Henry Sun
<i>w, omb^{p1} ; Ay-GAL4, UAS-GFP/CyO</i>	From our Lab

<i>w, omb^{p1} ; Pin/CyO</i>	From our Lab
<i>w, omb^{p1} ; TM3Sb/TM6B</i>	From our Lab
<i>w, os¹</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>w, os^s ; ey-GAL4/TM6B</i>	From our Lab
<i>w, os^s ; Pin/CyO</i>	From our Lab
<i>w, Sp/CyO ; Dr/TM6B</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>w, Sp/CyO ; UAS-upd3⁴⁻²/TM6B</i>	From our Lab
<i>w, TM3,Sb/TM6B</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>w, UAS-Dicer2/CyO ; Dr/TM6B</i>	From Dr. Chun-Hong Chen
<i>w, UAS-Dicer2/CyO ; ey-GAL4/TM6B</i>	From our Lab
<i>w, UAS-Dicer2/CyO ; tub-GAL4/TM6B</i>	From our Lab
<i>w, wg-lacZ/CyO ; UAS-upd3⁴⁻²/TM6B</i>	From our Lab
<i>w⁺/w⁻ ; Sp/CyO ; dpp-lacZ/TM6B</i>	From our Lab
<i>w⁺/w⁻ ; wg-lacZ/CyO ; Dr/TM6B</i>	From our Lab
<i>w¹¹¹⁸</i>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>wg-lacZ ; dpp-GAL4/S-T</i>	From our Lab
<i>ywFlp²² ; hth¹⁴²²⁻⁴/S-T</i>	From Dr. Y. Henry Sun
<i>ywFlp²² ; UAS-IP8763⁴⁻² (II) /S-T</i>	From our Lab
<i>ywFlp²² ; UAS-upd-GFP³²⁻¹ (II) /S-T</i>	From our Lab
<i>UAS-hop^{Tuml}/CyO</i>	Luo <i>et al</i> , 1999
<i>UAS-hop3/CyO</i>	Luo <i>et al</i> , 1999

Mutants : P-excision lines (from *p[XP]upd3^{d871}*) - generated in this study

upd3^{p52-3}/FM7a

upd3^{p38-3}/FM7a

upd3^{p97-1}/FM7a

upd3^{p106-2}/FM7a

upd3^{p102-2}/FM7a (lethal)

upd3^{p124-3}/FM7a (lethal)

upd3^{p121-3}/FM7a

upd3^{p128-2}/FM7a

upd3^{p120-1}/*FM7a* (revertant)
upd3^{p130-1}/*FM7a* (revertant)
upd3^{p102-2}/*FM7,P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3*
upd3^{p124-3}/*FM7,P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3*

Mutants : P-excision lines (from *upd3*^{d4951})

- generated in this study (by Jyun-Ming Lai)

upd3^{Δ6-2}/*FM7a*
upd3^{Δ18-2}/*FM7a*
upd3^{Δ53-2}/*FM7a*
upd3^{Δ65-3}/*FM7a*
upd3^{Δ69-2}/*FM7a*
upd3^{Δ95-2}/*FM7a*
upd3^{Δ104-3}/*FM7a*
upd3^{Δ44-1}/*FM7,P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3*
upd3^{Δ53-2}/*FM7,P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3*
upd3^{Δ69-2}/*FM7,P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3*

Mutants : EMS mutagenesis - generated in this study

upd3^{E9:2}/*FM7a*
upd3^{E57:3}/*FM7a*
upd3^{E57:5}/*FM7a*
upd3^{E53-1:1}/*FM7a*
upd3^{E53-1:1}/*FM7a*
upd3^{E53-1:4}/*FM7a*
upd3^{E53-1:5}/*FM7a*
upd3^{E92-1:4}/*FM7a*
upd3^{E9:2}/*FM7,P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3*
upd3^{E57:3}/*FM7,P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3*
upd3^{E57:5}/*FM7,P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3*

upd3^{E53-1:1} / FM7, P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3
upd3^{E53-1:1} / FM7, P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3
upd3^{E53-1:4} / FM7, P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3
upd3^{E53-1:5} / FM7, P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3
upd3^{E92-1:3} / FM7, P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3
upd3^{E92-1:4} / FM7, P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3
upd3^{E110:3} / FM7, P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3
upd3^{E110:6} / FM7, P[w^{+mC}, Act-GFP]JMR3

化學藥品

35% H ₂ O ₂	Merck : 1.08600
37% HCl	Merck : 1.00317
5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)	Roche : 11383221001
Acetone	Merck : 100020
agar	BD : 214530
Agarose	Amresco : 0710
Ampicillin	Sigma : A9518
BSA (Bovine serum albumin)	Sigma : A9647
Chloroform	Merck : 1.02445
DEPC (Diethyl pyrocarbonate)	Sigma : D5758
DIG RNA Labeling Kit	Roche : 11175025910
DIG RNA labeling mix	Promega : 1277073
dNTP	Roche : 11969064001
EDTA	Merck : 1.08418
EtBr (Ethidium Bromide)	
Ethanol	Merck : 1.00983
Ether	Merck : 1.00921
Formaldehyde	Merck : 4003
Formamide	Merck : 1.09684

glutaraldehyde	Merck : 8.20603
Glycerol	Merck : 1.04093
Glycine	Bio-rad : 161-0724
IAA	Merck : 1.00979
Isopropanol	Merck : 1.09634
KCl	Merck : 1.04936
KH ₂ PO ₄	Merck : 1.04873
KH ₂ PO ₄	Merck : 1.04873
KOAc	Merck : 1.04820
LB Agar	Bio-101 Systems : 3001-232
MgCl ₂	Usb : 18641
MgSO ₄ • 7H ₂ O	Sigma : M1880
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	Merck : 1.06580
NaCl	Amresco : 0241
NaOH	Merck : 1.06498
NH ₄ OAc	Merck : 1.01116
n-Heptane	Merck : 1.04379
Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)	Roche : 11383231001
NP-40	Sigma : BM0919-1
paraformaldehyde	Merck : 1.04005
Pfu Turbo DNA Polymerase	Stratagene : 0380316
pGEM-T-vector	Promega : A362A
Phenol	Amresco : 0981
Prime Taq polymerase	GeNet Bio
Proteinase K	Roche : 03115879001
RNase	Promega : M6101
Rnasin	Promega : N2515
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Merck : 8.22050

SP6 RNA polymerase	Promega : P1085
T3 RNA polymerase	Promega : P2083
T4 ligase	Promega : M180A
T4 ligase 緩衝液	Promega : C126B
T7 RNA polymerase	Promega : P2075
TB DRY Powder Growth Media	Mo Bio : 12105-1
Tris	Amresco : 0710
Triton X-100	Sigma : T8532
tryptone	BD : 211705
Tween-20	Sigma : P5927
yeast extract	BD : 212750

Primers

CG15057-1F (<i>EcoRI</i>)	5'-AGAATTCATGGCCACCGCACAGACGC-3'
CG15057-2R (<i>Xho I</i>)	5'-ACTCGAGCGCCGCCGCTAAATGGGAT-3'
<i>upd</i> -1F	5'-GAATTCATGGCTCGTCCGCTGCTCCT-3'
<i>upd</i> -4R	5'-GCCCACTCGTCTTGGAGCG-3'
<i>upd</i> -5F	5'-TCACAGCAGTTGGCGGCAC-3'
<i>upd</i> -8R	5'-CCGCGGGCTATTTCCCGTGCGCTGCAC-3'
<i>upd2</i> -1f	5'-ATGGCCAATCCACTAACGCATCC-3'
<i>upd2</i> -2b	5'-CAGGACACACAACGCACAAAAGTATCT-3'
<i>upd2</i> -3f	5'-GCAACCTACACCAAGCTTTTCTTAC-3'
<i>upd2</i> -4R	5'-TCAAGACTCATTGGATCCGCC-3'
<i>upd3</i> -a1F	5'-CCTGATCCGCTGAGCCATTG-3'
<i>upd3</i> -a1R	5'-TAGATGATGCACCGATTCCCGC-3'
<i>upd3</i> -a1RF	5'-GCGGGAATCGGTGCATCATCTA-3'
<i>upd3</i> -a2F	5'-GCCGCCAGTGATACCCGATA-3'
<i>upd3</i> -a2R	5'-TGGCGGCAAAGGTGACCCC-3'
<i>upd3</i> -a3F	5'-CGCCGCCGCTAAATGGGAT-3'
<i>upd3</i> -up6F	5'-AGGTACC GGGCGCTAATTAAGTTTGGCTC-3'

<i>upd3-up5F</i>	5'-AGGTACCCTCTGCGCAGGAAGTATCAATACGG-3'
<i>upd3-a3R</i>	5'-TCATCGTTCTACGCGCACTCG-3'
<i>upd3-up4F</i>	5'-AGGTACC CGGTTCGCGGGTTCAAAGTTCTC-3'
<i>upd3-up3F</i>	5'-AGGTACC CTCGCCGGAAGTTCGTGTATG-3'
<i>upd3-up2F</i>	5'-AGGTACCCGTGTCTACGTACTATGCACACTGCC-3'
<i>upd3-up1F</i>	5'-CCGAATGGCAGGCACAGACA-3'
<i>upd3-5F0</i>	5'-GAATTCATGACACCGATCACCATCCGTAA-3'
<i>upd3-5F1</i>	5'-TGGCAGTGGCAGTGGCAGTGAGCGGT-3'
<i>upd3-3R10F</i>	5'-CGGCTCGCGGTTGAACAAATC-3'
<i>upd3-3R10</i>	5'-AGGATCCGATTTGTTCAACCGCGAGCCG-3'
<i>upd3-3R6F</i>	5'-CGGGGGTTACTTCGGAACG-3'
<i>upd3-3R6</i>	5'-CGTTCCGAAGTAACCCCG-3'
<i>upd3-5F2</i>	5'-GCGAGCGGGAGAGACAGTGAATA-3'
<i>upd3-5F2R</i>	5'-GATATTCAGTGTCTCTCCCGCTCGC-3'
<i>upd3-5F3</i>	5'-GCTCCTAGTTGCTAGTACCCTGGG-3'
<i>upd3-5F3.5</i>	5'-TGTGGAGCGATTGGAGCCTACCC-3'
<i>upd3-5F3R</i>	5'-CCCAGGGTACTAGCAACTAGGAGCC-3'
<i>upd3-3R11F</i>	5'-GCCAACATGACCGGCGGACGGATCCT-3'
<i>upd3-3R11</i>	5'-AGGATCCGTCCGCCGGTCATGTTTCGC-3'
<i>upd3-3R5F</i>	5'-GCAGACAGTCGAAGGCAGCGC-3'
<i>upd3-3R5</i>	5'-GCGCTGCCTTCGACTGTCTGC-3'
<i>upd3-5FET4</i>	5'-TACAAGTAACTACCGCAGGCGCGT-3'
<i>upd3-3R4</i>	5'-ACCGAGCACGCACAGGTGA-3'
<i>upd3-3R2</i>	5'-TGGCGGTGGCGGTGCTATC-3'
<i>upd3-3R1.5</i>	5'-CGTGTGTCCGGTGGAGGTCG-3'
<i>upd3-5F4</i>	5'-CACCGACGACGTCTGACGAAG-3'
<i>upd3-I3-5F1</i>	5'-AGATCTGTGAGTGTCGTCCATATGCCATAAG-3'
<i>upd3-3R7</i>	5'-CACCTCAAGCTCCCTGGCAAC-3'
<i>upd3-I3-5F2</i>	5'-AGATCTTTTAGTAATGCCAAATTGTCGGGG-3'
<i>upd3-I3-3R-1</i>	5'-CCGCGGACTGGTACTCCGTGGCAATCATTTC-3'
<i>upd3-I3-5F3</i>	5'-AGATCTGAACCCCCAGATCGGAACCCG-3'
<i>upd3-5F5</i>	5'-CGTCATGCATTCGCTCATAACC-3'

<i>upd3-I3-3R-2</i>	5'-CCGCGGTCATTTCTTCTTCCGAACCGATCC-3'
<i>upd3-3R8</i>	5'-CGCGCCGCTCTCTCGTAAC-3'
<i>upd3-5F6</i>	5'-GGGGTAACTATGATGATTAAGTTGGG-3'
<i>upd3-I3-3R-3</i>	5'-CCGCGGCTGGAATGGGCAAGGAAAAAGATTGGA-3'
<i>upd3-3R0</i>	5'-CCGCGGCTAGAGTTTCTTCTGGATCGCCTTTG-3'
<i>upd3-down1R</i>	5'-CCTTGTGATTGTCTGGGGATTCT-3'

免疫抗體

Antibody	Host	Titer	Company
Cleaved Caspase-3	Rabbit	1:300	Cell Signaling:1050
Elav (7E8A10)	Rat	1:400	Developmental Studies Hybridoma Bank
Phalloidin-FITC		1:200	Molecular Probes
Phosphor-Histone H3	Rabbit	1:500	Upstate:06-570
Wingless (4D4)	Mouse	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank
β -galactosidase	Rabbit	1:1000	

二級抗體

Rat-IgG-Cy5	Donkey	1:200	Jackson Immuno Research
Rabbit-IgG-Cy5	Donkey	1:200	Jackson Immuno Research
Rat-IgG-Cy3		1:400	Jackson Immuno Research
Rabbit-IgG-Cy3		1:400	Jackson Immuno Research
Mouse-IgG-Cy3	Donkey	1:400	Jackson Immuno Research
Anti-DIG		1:1000	Roche:1207733

Blocking 緩衝液

Normal Goat Serum		10%	Jackson Immuno Research
-------------------	--	-----	-------------------------

實驗方法

篩選 *upd3* 基因突變果蠅株

P-element 跳離實驗 (見附圖四)

EMS mutagenesis (見附圖九)

配製 Solution I (100uM Tris pH7.5 and 10% Sucrose) , 滅菌後置於室溫保存。抽風櫃內鋪上抗污紙墊, 隨後準備 100ml deactivating solution (1M NaOH, 0.5% Thioglycolic acid) 、紙巾、手套、tip 並置於抽風櫃內。準備兩管 glass tube, 瓶底下放 kimwipes 或濾紙, 塞好棉花備用。每管分別置放 100 隻 male 果蠅, 置於空 glass tube 30 min 使果蠅處於脫水狀態。在抽風櫃內配置 EMS solution (Solution I : ddH₂O = 1:9 內含 25mM EMS)。將 EMS solution 倒入果蠅管內, 使瓶底 kimwipes 或濾紙沾濕 (小心勿使棉花塞沾染 EMS 溶液)。剩餘的 EMS solution 則和 deactivating solution 混合, 使 EMS 失去活性。在抽風櫃內, 將經處理過處於脫水狀態的 male 果蠅, 移至含 EMS 的果蠅管內, 於室溫置放隔夜。之後置換果蠅於乾淨的果蠅管內 30min 後再置換一次, 使其回復數小時後, 即可和處女蠅交配。之後四天每日 transfer 果蠅, 至第五天丟棄 male 果蠅, 觀察 F1 子代表型進行 F1 突變篩選(F1 mutant screening), 並在每盤取三管計算其平均子代孵出率(見附錄九)。

果蠅 genomic DNA 萃取

取 10~50 隻果蠅以二氧化碳氣體麻醉，隨後放入微量離心管置冰上 5 分鐘，加入 200 μ l Lysis 緩衝液（200mM Tris pH8.0、10mM EDTA pH8.0、100mM NaCl、8.5% SDS）至完全磨碎果蠅，再加入 600 μ l Lysis 緩衝液混合均勻後於 70 $^{\circ}$ C 水浴反應 30 分鐘。待冷卻至室溫後加入 112 μ l 8M KOAc，輕柔的上下倒置離心管均勻混合溶液，然後於冰上反應 30 分鐘，於室溫 13000 rpm 離心 15 分鐘，取出上清液加入 456 μ l Isopropanol 並輕柔混合溶液，於室溫反應 10 分鐘後離心 15 分鐘，上清液以 70% 酒精沖洗後離心 5 分鐘，將溶液抽乾後將沈澱物溶於 250 μ l TE 緩衝液。隨後加入 140 μ l 7.5M NH₄OAc 並分兩次加入 200 μ l（phenol : chloroform : IAA = 25 : 24 : 1），輕柔且均勻混合溶液後以 13000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液加入 100% 酒精混合均勻後，置室溫反應 5 分鐘使 DNA 沈澱，離心 10 分鐘後取出上清液再加入 70% 酒精沖洗且抽乾，隨後依果蠅隻數將濃度調整為每隻果蠅溶於 1 μ l TE 緩衝液。

轉型作用 (Transformation)

將實驗所需之養菌管、電擊管 (electroporation cuvette) 預冷，將保存於 -80 $^{\circ}$ C 勝任細胞 (*E.coli* XL-1Blue) 置於冰上回溶，待溶解後於冰

上與適量的質體 (plasmid) 混合均勻後加入電擊管內，以原核電穿孔儀 (Micro Pulser, Bio-Rad Co.) 1.8 kV、5 ms 之條件電擊後，立即加入 1 ml TB 培養液內於 37°C、180 rpm 震盪培養培養 40 分鐘。之後將菌液離心後，去除大部分上清液，以殘餘上清液混合菌液後，塗抹於含 80 μ l X-gal(2%)、80 μ l IPTG(20%) 及 100 μ g/ml ampicillin 的 LB agar plate 上，於 37°C 培養箱中培養 16-18 小時後進行藍白篩選。

小量 Plasmid 製備

將含有 plasmid 的菌體培養於 2ml TB 培養液，於 37°C、180rpm 震盪培養約 12~14 小時，所得菌液 vortex 混勻後取 1ml，以 13000 rpm 離心 1 分鐘後去除上清液加入 100 μ l Solution I (25mM Tris-HCl pH8.0、10mM EDTA pH8.0、50mM glucose) 沖散沈澱菌體，隨後加入 200 μ l Solution II (0.2N NaOH、1% SDS) 並輕柔的上下倒置離心管混合溶液，再加入 150 μ l Solution III (0.3M KOAc pH5.2) 輕柔混合溶液且靜置 1 分鐘後，加入 100 μ l (chloroform : IAA = 24 : 1) 後輕柔混合溶液，隨後以 13000 rpm 離心 10 分鐘，取出上清液後加入 2 倍體積 100% 酒精混合均勻後，置室溫反應 5 分鐘使 DNA 沈澱，之後 13000 rpm 離心 15 分鐘取出上清液，再加入 70% 酒精沖洗且抽乾，隨後加入 40 μ l TE 緩衝液及 1 μ l RNAase (10 μ g/ μ l) 保存於 4°C。

中量 Plasmid 製備

將含有質體的菌體培養於 50ml TB 培養液，於 37°C、180rpm 震盪培養約 12~14 小時，所得菌液震盪混勻後倒入高速離心管內（需平衡至小數點第 2 位），於 4°C 4000 rpm 離心 15 分鐘。準備 Midi-V100™ column 並加入 3ml 100% 酒精，以重力方式自然流出並去除過濾液，再加入 10ml VP4 緩衝液並去除過濾液後備用。菌液離心完後倒除上清液，加入 4ml VP1 緩衝液（Cell resuspension solution），回溶震盪沉澱的菌體。隨後加入 4ml VP2 緩衝液（Cell lysis Solution），輕微翻轉離心管後，靜置反應 5 分鐘。之後加入 4ml VP3 緩衝液（緩衝液儲存於 4°C），輕柔混合溶液後靜置反應 5 分鐘後，於 4°C 13000 rpm 離心 15 分鐘。將上清液倒入 Midi-V100™ column 後，使液體自然流出並去除過濾液，再加入 15ml VP5 緩衝液清洗。最後將 column 換至新的離心管，加入 5ml VP6 緩衝液清洗 column 並收集過濾液。隨後加入 5ml TE、15ml isopropanol 與 0.5ml 3M NaOAc，於 -20°C 反應 2 小時，之後以 4°C 13000 rpm 離心 15 分鐘。去除上清液後，將沈澱之質體以 70% 酒精，分別於 4°C 13000 rpm 離心 5 分鐘各沖洗 5 次。隨後加入 200µl TE 緩衝液將質體回溶，保存於 4°C。

聚合酶連鎖反應 (PCR)

取 2 μ l 純化後果蠅 genomic DNA (0.1 fly/ μ l) 做為模版，分別加入 5 pmol 正反向引子，以及 2.5 mM dNTP、2 μ l 10x Taq 緩衝液、適量 ddH₂O，待混合均勻後加入稀釋後的 2 μ l Taq 酵素並離心（稀釋後的 Taq 酵素內含 1 μ l Taq 酵素、11.5 μ l 10x Taq 稀釋液）。樣品置入 PCR 反應器（Applied Biosystems 9700, AB 9700）並設定所需之反應溫度。以 94 $^{\circ}$ C 預熱反應 3 分鐘後，溫度調整為 94 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘以解開使雙股 DNA，隨後依引子 T_m 值調整反應溫度作用 1 分鐘（見方法之引子黏合溫度），使引子與 DNA 黏合。之後調整溫度至 72 $^{\circ}$ C 反應 1 分鐘 30 秒進行 DNA 增殖，進行 30 次循環反應後，將溫度設為 72 $^{\circ}$ C 反應 7 分鐘，反應完成後將溫度降至 20 $^{\circ}$ C 後取出，以瓊脂膠體電泳（agarose gel electrophoresis），分析片段大小是否正確。

免疫螢光染色法

解剖盤內加入適量的 PBS 緩衝液，接著在解剖顯微下將果蠅二齡或三齡幼蟲欲染色觀察之眼碟取出，吸乾 PBS 後以 4% paraformaldehyde/PBS 於室溫固定 15 分鐘，以 PBST（1 X PBS，0.3% Triton X-100）清洗 3 次，加入含 10% NGS（Normal Goat Serum）的一級抗體於 4 $^{\circ}$ C 反應隔夜，之後再以 PBST 清洗 3 次後加入二級抗體於

室溫反應 2 小時，再以 PBST 清洗 3 次後以 DABCO 溶液（1X PBS，0.22M N-propyl gallate）封片，於 Zeiss LSM 510 共軛焦顯微鏡觀察。

掃描式電子顯微鏡 (SEM)

樣品製備

果蠅以二氧化碳氣體麻醉後放至樣本瓶內，接著以 50%、70% 每次 10 分鐘進行脫水置換，可保存於 4°C 數月。之後再以 70%、80%、95% 酒精每次 10 分鐘，進行脫水置換，接著以 100% 酒精 10 分鐘置換兩次，之後再以 100% 酒精與 100% Acetone 分別以 1:1、1:2、2:1 比例每次 10 分鐘做置換，最終置換樣品為 100% Acetone（每次 15 分鐘各兩次），即可將樣品進行臨界點乾燥程序。

臨界點乾燥

啟動臨界點乾燥器電源，設定溫度至 0~3°C 以冷卻樣品室 (chamber)。待指示燈由綠燈轉紅燈表示達指定溫度，即可開始使用。隨後開啟 CO₂ 鋼瓶，緩緩打開進氣閥注入 CO₂，當壓力達刻度尺 5 (50 kgf/cm²)，關閉進氣閥，並開啟排氣閥緩緩將 CO₂ 排出。隨後將樣品置換於樣品籃，此時樣品不可暴露在空氣，需完全浸在 Acetone 內。接著樣品籃後迅速放入樣品室後，緩緩開啟進氣閥注入 CO₂，使 CO₂ 液面

緩緩蓋過樣品籃。至液面達樣品室內刻度棒 5~5.5 位置後，關閉進氣閥靜置 5~10 分鐘，排氣至刻度棒 4.5 位置並重複三次(此時速度放慢，氣體不可低於樣品籃)。接著再慢慢打開進氣閥注入 CO₂，讓液面達刻度尺約第 7~8 格位置(壓力過高可排掉一點氣體，不可超過第 9 格)。之後關閉進氣閥及 CO₂ 鋼瓶，將溫度調至 20°C，達 20°C 後(壓縮機開始運轉)後靜置 15 分鐘，再將溫度調至 37°C (達 critical point : 31.4 °C)，待 CPD 壓縮機開始運轉後靜置 10 分鐘，(此時壓力應高於 90 kgf/cm²，液氣介面消失)再慢慢打開 Leak valve 排氣，排氣完畢後(紅球完全落下)將溫度調回 25°C，待達指定溫度後即完成樣品乾燥步驟。待樣品籃全部取出後，將管線內的氣體全部排出，再將進氣閥、排氣閥以及電源關閉。

金屬離子覆膜 (Coating)

SEM 樣品平台側邊標好編號後，底部黏上專用雙面膠後，將果蠅頭部朝內觀察面朝上依序排好。之後將樣品平台放入金屬離子覆膜機內，首先逆時針轉動 Leak valve 以破除樣品室真空，打開玻璃罩以拭鏡紙擦去金屬離子覆膜機上的油漬，並塗上適量的 oil。待置入樣品後蓋好蓋子並旋緊蓋子上 Leak valve 及 needle valve。開啟抽真空幫浦的電源後，以逆時針方向旋轉 90 度(與抽氣管呈平行狀態，此時紅色箭

頭朝自己方向) 開啟 LPG valve。待抽真空約 5 分鐘後，打開金屬離子覆膜機的電源，selector 選在 coat 位置。將 H.V. control 轉至 5 檢視真空度，按 Flash 鈕並同時檢視 Ion current 是否在 2mA 或以下。若達標準再將 H.V control 轉至 10，此時按 Flash 鈕 Ion current 應在 7mA 或以下。若亦達此標準則可進行樣品覆膜，否則再繼續抽真空。(若超過 5~10 分鐘後再做測試仍未達所需真空度，則可能樣品乾燥不完全或玻璃罩襯墊有棉絮污染，此時關閉 LPG valve 後並打開 Leak valve 解除真空，再一次清理玻璃罩及襯墊。) 此時若已達真空度，將 H.V control 轉至 8~10 位置，計時 1.5 分鐘。此時 Ion current 約在 7mA 左右，同時在樣品室內可見穩定的藍紫光 (coating 過程中可調整 H.V control 隨時控制 Ion current 在 7mA 的位置，若 H.V control 已轉至 10，Ion current 仍在 7mA 以下，則可微調 needle valve 用以調節)。接著關閉 LPG valve，開 Leak valve 以破真空取出樣品，金屬離子覆膜機器則待清理完及周邊後蓋回玻璃罩，並再次檢視真空度即可。樣品之後以 SEM (scanning electron microscope, Hitachi S2300) 觀察，並以數位影像擷取系統 (Digital Image Acquisition, GW Electronic, Norcross, GA)，拍攝結果影像。

原位雜交反應 (*in situ* hybridization)

體外轉錄合成 RNA 探針

以 *pBluescript KS-upd* 與 *T-upd3* cDNA 質體做為模版，分別取 3ug 質體 DNA，分別與不同限制酶 (*upd*: *Sac* II, *EcoR* I、*upd3*: *Xho* I, *Sal* I) 於 37°C 反應 4 小時，進行限制酶切割。酒精沈澱後溶於 6μl TE 緩衝液，取出 1μg 質體，分別與轉錄緩衝液 (1x)、DTT 還原劑 (10mM)、2 μl NTP (Dig-UTP)、1 μl RNase inhibitor、9 μl ddH₂O，並分別加入 2 μl 不同的 RNA 聚合酶 (*upd*: sense / anti-sense, T7 / T3、*upd3*: sense / anti-sense, T7 / Sp6)，於 37°C 反應 2 小時，進行體外轉錄反應 (*in vitro* transcription)。隨後並分別加入 2μl 0.2M EDTA 及 1μl DNase I，於 37°C 反應 15 分鐘，使聚合酶反應停止並去除多餘的 DNA。隨後加入 2.5μl 4M LiCl 以及 75μl 預冷後的 100%酒精，於-20°C 反應 2 小時。4°C 離心 13000 rpm 15 分鐘後，去除上清液，加入 50μl 70%預冷酒精再以 4°C 離心 13000 rpm 5 分鐘。於 42°C 烘乾後加入 100μl Hybridization 緩衝液回溶分裝備用，並取少量跑膠確認 RNA 探針之品質。

眼碟原位雜交反應

原位雜交反應使用所使用之藥品，皆以滅菌過的 0.1% DEPC 水配置。解剖盤以 0.1% H₂O₂ 處理防止 RNA 酶污染，隨後加入適量的 PBS

緩衝液，在解剖顯微下將果蠅二齡或三齡幼蟲欲染色觀察之眼碟取出。隨後馬上將眼碟置換於 4% formaldehyde / PBS，於室溫固定 15~20 分鐘。而後再將眼碟置換於 4% formaldehyde / PBS / TX (0.6% Triton X-100)，於室溫固定組織 15~20 分鐘。接著以 PBS / TX (0.3% Triton X-100) 清洗三次，並依序以 25%、50%、75% 酒精各一次，100% 酒精兩次置換，儲放於 -20°C 隔夜後，再依序置換為 PBST (0.1% Tween 20)。隨後加入 10 µg/ml Proteinase K 進行組織水解反應，並依眼碟不同大小調整反應時間 (二齡幼蟲眼碟：4 分鐘，早期三齡幼蟲眼碟：6 分鐘，三齡幼蟲晚期眼碟：9 分鐘)。隨後馬上加入 2 mg/ml glycine / PBST 清洗兩次，每次五分鐘，以停止蛋白水解酶反應。以 PBST 清洗一次後加入 4% paraformaldehyde / 0.2% glutaraldehyde / PBST，反應 20 分鐘以固定組織。以 PBST 清洗四次每次 5 分鐘後，將眼碟置換於 PBST: Hybridization 緩衝液 = 1:1 反應 10 分鐘，最終將組織完全置換於 Hybridization 緩衝液，並作用 10 分鐘以上。隨後加入 100µg/ml Salmon sperm DNA 以及 100µg/ml tRNA (於 80°C 預熱 10 分鐘後隨即置於冰上備用)，於 65°C 水浴反應 1 小時。去除上清液，加入 90µl Hybridization 緩衝液 (內含 sperm DNA 及 100µg/ml tRNA) 以及 10µl RNA 探針 (探針先於 80°C 預熱 10 分鐘後，隨即置於冰上備用)，於 65°C 水浴作用 48

小時。

呈色反應

以 Hybridization 緩衝液於 65°C 水浴，每次 20 分鐘清洗兩次後，於室溫再清洗兩次。隨後眼碟置換於 PBST:Hybridization 緩衝液=1:1，反應 20 分鐘後，最終將組織完全置換於 PBST，每次 20 分鐘再清洗五次。將組織清洗完畢後，加入 anti-Dig 抗體（1:1000）於室溫反應 1 小時。隨後以 PBST 每次 20 分鐘清洗五次後，接著加入 Levamisole 溶液每次 5 分鐘清洗三次。最後與 4.5 μ l NBT/3.5 μ l BCIP/Levamisole 溶液，於室溫避光反應。待組織呈色完成後，利用 PBST 每次 5 分鐘清洗 3 次後，組織以 50% glycerol 封片保存觀察。

實驗結果

果蠅的基因組中有 3 個可能的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈配體：Upd、Upd2 及 Upd3。當中以 *upd* 調控眼睛發育的研究較為清楚。已知 *upd* 可藉由調控 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，透過同時抑制 MF 分化的負向因子 *wg*，並促進正向調控因子 *dpp* 的表現，進而影響視神經分化（Bach *et al.*, 2003；Tsai *et al.*, 2007）。*upd2*、*upd3* 在果蠅眼睛發育過程中，所扮演的角色仍不清楚。*upd2* 完全喪失功能的果蠅突變株，眼睛大小幾近為正常。先前本實驗室自哈佛醫學大學的 Harvard Exelixis Collection 中心取得 *upd3*^{d4951} 果蠅株，其 P-element 序列插入 *upd3* 基因前 346 bps 位置，發現具有小眼外表型（圖一 C, 圖二）。誘使 *upd3*^{d4951} 果蠅株的 P-element 跳離原來位置後發現，P-element 完整跳離後果蠅眼睛即恢復正常大小。得知 *upd3*^{d4951} 為 P-element 序列插入，造成 *upd3* 基因變異之突變果蠅（by Jyun-Ming Lai）。因此推論 *upd3* 可能參與影響果蠅眼睛發育。然而目前對於 *upd3* 在果蠅眼睛發育的過程中，所扮演的角色及其調控機制仍不清楚。因此在我的研究中，首先將探討 *upd3* 是否影響果蠅複眼之發育。

I. *upd3* 調控果蠅複眼發育

篩選 *upd3* 突變果蠅

為了進一步瞭解，*upd3* 在果蠅眼睛發育的過程中，所扮演的角色，我分別利用 EMS 突變（附圖九）及 P-element 跳離方式（附圖四）篩選 *upd3* 突變果蠅。*upd3^{d871}* 為 *upd3* 基因的 P-element 插入株（果蠅株來源為 Harvard Exelixis Collection 中心），P-element 插入點位於 *upd3* 基因 intron3（exon4 前 670 bps）（圖二）。與野生型果蠅眼睛相比，*upd3^{d871}* 果蠅眼睛幾近於正常大小。利用 *upd3^{d871}* 果蠅，同時表現轉位酶（transposase），誘使 P-element 跳離原來位置（篩選方法見附圖四）。P-element 跳離時，則有可能造成插入點附近的 DNA 序列基因缺失，或者在跳離後插入附近序列造成突變。藉由 *upd3^{d871}* P-element 跳離實驗，我篩選出 8 個 *upd3* 基因可能的突變株（6 個可存活株，2 個致死突變株），當中可存活的突變株皆有小眼外表型（附圖四）。

為了確認所篩選出的果蠅株是否為 *upd3* 突變株，接著分別利用遺傳與分子生物學的方式分析其 *upd3* 基因是否發生變異。首先利用遺傳學上互補測試（complementation test）的方式，藉由雜交的方法，將兩個對偶基因突變（mutant allele）同時表現在一隻果蠅，藉此分辨突變是發生在相同或相異的基因。若為同一個基因突變，由於基因無法互

補，基因無法正常表達，則可藉由觀察果蠅是否具有突變外表型，判定是否同一基因變異。我分別利用 os^1 以及 $Df(1) os-UE19$ ，與可能的 $upd3$ 基因突變株果蠅做互補測試。 os^1 目前得知為 upd , $upd2$ 及 $upd3$ 皆發生變異，具小眼外表型（圖一 B）。 $Df(1) os-UE19$ 則為 upd 與 $upd3$ 基因缺失突變株。以篩選到的小眼果蠅突變株 $upd3^{p106-2}$ 為例（圖一 D），與已知的 $upd-like$ 基因突變果蠅： os^1 與 $Df(1) os-UE19$ 皆觀察到小眼外表型，顯示無法互補（圖一 E, F，附圖四）。

此外分別與 $upd-like$ 基因， upd 、 $upd2$ -完全失去功能的突變株及 $upd3$ -突變株， $cv^1 ct^1 v^1 os-upd^1 mal$ 、 $upd2^{10-2(null)}$ 及 $upd3^{d4951}$ 進行互補測試。 $upd3^{d4951}$ 為 P-element 序列插入 $upd3$ 基因前 346 bps，造成 $upd3$ 基因變異，且具有小眼外表型（圖一 C，圖二）（果蠅株來源為 Harvard Exelixis Collection 中心）。 $upd3^{p106-2}$ 和 upd 、 $upd2$ -完全失去功能的突變株互補結果，眼睛大小則和野生型相近，顯示可以互補（圖一 G, H）。但 $upd3^{p106-2}$ 和 $upd3$ 突變果蠅 $upd3^{d4951}$ 則無法互補，果蠅仍為小眼外表型（圖一 I）。以上結果認為， $upd3^{p106-2}$ 為 $upd3$ 基因突變株。此外其餘篩選到的 7 個突變株，亦和已知的 $upd3$ 基因突變果蠅進行相同的互補測試，結果亦顯示無法互補（附圖四）。綜合以上結果得知，此 8 個突變株皆為 $upd3$ 基因發生變異，並非 upd 或 $upd2$ 基因突變。

接著我利用分子生物學的研究方法，以 PCR 方式逐一定序分析 *upd3* 基因區域。由於 P-element 跳離時有可能造成插入點附近基因缺失，或者在跳離後插入附近序列造成突變，所以我在 P-element 插入點附近利用一系列 *upd3* 基因引子（附圖五），利用 PCR 方式分析這 8 個 *upd3* 突變株 *upd3* 基因的缺失位置。目前實驗結果得知其中一個小眼突變株：*upd3^{p106-2}*，*upd3* 基因發生大片段基因序列缺失（deletion）。自 P-element 插入點算起，往前造成 13,464 bp 的缺失，*upd3* 基因 Exon 1-3 則發生大片段缺失（deletion）突變（圖二）。藉由遺傳方式及分子層次的分析其缺失位置，認為 *upd3^{p106-2}* 為 *upd3* 基因功能完全缺失突變株（null mutant）。後續實驗將以此 *upd3^{p106-2(null)}* 做為工具，研究 *upd3* 基因在果蠅眼睛發育所扮演的角色，及其可能參與的調控機制。

upd3 影響果蠅眼睛發育

實驗針對 *upd3* 基因變異及大量表現時，對果蠅成蟲眼睛大小的影響進行研究，用於探討 *upd3* 基因是否參與調控果蠅眼睛發育。首先觀察 *upd3* 基因突變時，對果蠅成蟲複眼大小的影響。實驗室先前取得的 *upd3^{d4951}* 果蠅株具有小眼外表型（圖三 B），且為已知的 *upd3* 基因突變株。利用 *upd3^{d4951}* 及篩選到的 *upd3* 基因突變株 *upd3^{p106-2(null)}*，與野生型果蠅眼睛大小相比。發現已知的 *upd3* 基因變異果蠅 *upd3^{d4951}*、

upd3^{p106-2(null)}皆具有小眼外表型 (圖三 B, C)。當中 *upd3*^{p106-2(null)}小眼數目僅約為 520±20 個 (n=9)，小眼數目明顯少於野生型 (約 750~800 個)。顯示 *upd3* 基因失去功能，使果蠅眼睛變小。接著我更進一步檢視，大量表現 *upd3* 基因時，對果蠅眼睛發育的影響。實驗主要利用 *GAL4/UAS* 系統 (Brand and Perrimon, 1993)，利用 *GMR-GAL4* 在果蠅三齡幼蟲發育中的視神經細胞，專一表達 *GAL4* 蛋白，藉此大量表現 *UAS-upd3* cDNA 序列。結果顯示，*upd3* cDNA 大量表現時，果蠅眼睛明顯變大 (圖三 D)。

我進一步觀察在 *upd3* 突變果蠅眼睛中，大量表達 *upd3* cDNA 序列，觀察成蟲複眼是否可恢復正常大小。*upd3*^{d4951} 為實驗室目前已知的 *upd3* 基因突變株，其 P-element 序列位於 *upd3* 基因之前 (圖二 A，圖三 B)。由於 *upd3*^{d4951} 的 P-element 兩端有 *UAS* 序列 (圖二 B)，因此利用 *ey-GAL4* 在眼睛表現 *GAL4* 蛋白，即可大量表現插入點後的 *upd3* 基因。藉此可在 *upd3* 基因變異的背景下，表現 *upd3* 基因來檢測果蠅眼睛大小是否能回復。此外我也利用 *upd3*^{p106-2(null)}，在 *upd3* 基因完全缺失的情況下，利用 *ey-GAL4* 大量表現 *UAS-upd3* cDNA，觀察果蠅眼睛大小是否能回復。由實驗觀察得知，於已知的 *upd3* 突變株 *upd3*^{p106-2(null)} 與 *upd3*^{d4951}，補回 *upd3* 基因活性，可使果蠅眼睛大小恢復

(圖三 F, data not shown)。由以上結果得知，*upd3* 的表現與否確實會影響果蠅眼睛大小。

II. *upd3* 是經由 Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控果蠅眼睛發育

大量表現 Jak/STAT 下游 *hop* 與 *upd3* 皆可使果蠅眼睛增大

為了瞭解 *upd3* 是否經由 Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控果蠅眼睛發育，透過比較大量表現 Jak/STAT 下游活化態的 Jak 及 *upd3* cDNA，觀察兩者對於果蠅眼睛大小的影響是否相同。我推測若兩者是經由同一個訊息傳遞鏈，大量表達或者缺失上游配體與傳遞鏈下游因子，對果蠅眼睛所造成的影響應極為相似。已知果蠅 *hop*^{*Tum-1*} 突變株使 Jak 維持在持續活化的狀態，並引起果蠅黑素瘤的生成 (melanotic tumors)，在高溫情況下 (temperature-sensitive) 則嚴重致死 (Harrison *et al.*, 1995)。在眼睛大量表現野生型 Jak (*hop*) 則導致果蠅眼睛變大，或生成異位性眼睛 (Harrison *et al.*, 1995)。實驗觀察得知，大量表現 *upd3* cDNA，表現持續活化態 *hop* (*hop*^{*Tum-1*}) 或 *hop* cDNA (*hop*³)，皆可使果蠅眼睛變大 (圖三 E, data not shown)。比較 *upd3* 及前人所述 *hop* 的外表型，發現兩者皆會使果蠅眼睛變小，因此推論 *upd3* 極有可能是透過 Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控果蠅眼睛發育。

upd3 可活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈

為了檢視 *upd3* 是否有能力活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，我們利用 *10x STAT-GFP* 報導基因來檢測 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性。此報導基因包含 10 個 STAT 結合位點 (圖四 A)。當 STAT 活化後進入到核內後，則可辨識此結合位點，使 GFP 螢光蛋白得以表現。因而可藉由觀察 GFP 檢測 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性 (Bach *et al.*, 2007)。野生型果蠅 Jak/STAT 訊息活性，在三齡幼蟲眼碟時期從 MF 至眼碟後端有表現 (圖四 B, B')。 *upd3^{p106-2(null)}* 三齡幼蟲眼碟中， Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性明顯下降，僅侷限在眼碟後端有表達 (圖四 C, C')。藉由在眼碟異位性表達 *upd3* 或 *upd3* cDNA，觀察其對於 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性之影響。利用 *upd3^{d4951}* 突變株，在這個 *upd3* 基因變異的背景下表現 *upd3* 基因。由於 *upd3^{d4951}* 所插入 P-element 兩端有 UAS 序列，因此藉由表現 GAL4 蛋白，則可大量表現插入點後的 *upd3* 基因。結果顯示在眼碟異位性表達 *upd3* 或 *upd3* cDNA，可在眼碟兩側活化 *10x STAT-GFP* 報導基因 (圖四 D, F)。但 *upd3^{d4951}* 在眼碟中央表現時 (圖 E)，則無法活化 Jak/STAT 訊息的活性。

大量表現 *Jak* (*hop*) 可補回 *upd3* 突變時所造成的小眼外表型

為了釐清 *upd3* 是否透過 Jak/STAT 訊息傳遞鏈調控眼睛發育。藉

由觀察在 *upd3* 失去功能的情況下，補回 Jak/STAT 下游分子活性，是否可使果蠅眼睛回復至正常大小。我利用 *upd3*^{p106-2(null)} 突變株，在 *upd3* 失去功能的情況下，大量表現持續活化態 *hop* (*hop*^{Tum-l}) 或 *hop* cDNA (*hop*³)，觀察果蠅眼睛大小是否能回復。結果顯示，在 *upd3* 失去功能的情況下，大量表現持續活化態 *hop* 或 *hop* cDNA，皆可使眼睛回復至正常大小 (圖三 G, H)。從以上實驗結果推測，*upd3* 是經由 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，調控果蠅眼睛發育。

III. *upd3* 於果蠅眼睛發育時期表現時間點及位置

為了深入瞭解 *upd3* 在眼睛發育時期是否有表現，進而影響眼睛發育。我以 RNA 原位雜合反應 (RNA *in situ* hybridization)，檢測不同發育時期野生型的果蠅眼碟中，*upd3* 表現的時間及位置。首先以 *upd3* cDNA 做為模版 (附圖六)，進行體外轉錄反應 (*in vitro* transcription)，製作正向探針 (sense RNA probe) 和反向探針 (anti-sense RNA probe)。若果蠅發育過程中 *upd3* mRNA 有表達，則會和反向探針雜合並在眼碟中呈色，藉此方式可觀察在不同果蠅發育時期，*upd3* 表現時間點及位置。結果發現，在二齡幼蟲眼碟中，*upd3* 的 RNA 在整個眼碟皆有表現 (圖五 A)。在二齡晚期至早期三齡的幼蟲眼碟中，*upd3* 則表現在 MF 起始位置 (圖五 B)。到三齡中期時 MF 開始啟動，此時 *upd3* 則表

現於 MF 之前，及眼碟背側 (Ventral) 的原生細胞 (peripodial membrane) 之中 (圖五 C)。當眼碟發育至晚期三齡後，此時 *upd3* 則無表現 (圖五 D)。同時利用 *GMR-GAL4*，在眼睛大量表現 *upd3* cDNA，以反向探針偵測 *upd3* 表現作為正向控制組 (圖五 E)，並以正向探針結果作為負向控制組 (圖五 F)。綜合以上實驗結果得知，*upd3* 表達在早期果蠅發育過程中眼碟，此外 *upd3* 的突變及大量表現會影響果蠅複眼大小，顯示 *upd3* 與眼睛發育的調控扮演重要的角色。

IV. *upd3* 可透過調控細胞增生進而影響眼睛大小而非使細胞凋亡

果蠅眼睛的發育受到一連串嚴密的調控，使器官能維持在正常的大小範圍，而眼睛的大小與發育時期細胞增生的多寡以及凋亡的數量極為相關，若發育時期眼碟細胞增生的數量過少，或者凋亡的數量太多，皆有可能使果蠅眼睛變小。由於 *upd3* 基因突變會使果蠅眼睛變小，因此我們推測 *upd3* 有可能是經由調控細胞增生或凋亡進而影響眼睛大小。

三齡幼蟲的眼碟有兩波會同時進行分裂及增生的細胞，稱為 1st mitotic wave 及 2nd mitotic wave。為了檢測 *upd3* 是否透過影響細胞增生進而影響眼睛大小，我利用抗體標定 M phase 的標記蛋白磷酸化組蛋白 (phospho-histone H3, pH3)，藉此觀察眼碟細胞增生的情形。結果顯

示， $upd3^{p106-2(null)}$ 細胞增生數量（1st mitotic wave：36±5；2nd mitotic wave：34.8±7；n=13），與野生型相比明顯變少（1st mitotic wave：55.4±9；2nd mitotic wave：61.2±8；n=15）（圖六 A a, b）。利用眼睛專一表達的 GMR-GAL4 大量表現 $upd3$ cDNA 時，眼碟細胞增生數量則明顯變多（1st mitotic wave：85.4±14；2nd mitotic wave：73.5±9；n=15）（圖六 A c）。由以上結果推測在果蠅眼睛發育的過程中， $upd3$ 會影響眼碟細胞的增生。

為了瞭解 $upd3$ 突變時，細胞凋亡的數量是否增加，接著以免疫螢光染色標定活化態的 Caspase-3，以標示三齡幼蟲眼碟中的凋亡細胞。結果發現，已知 $upd3$ 突變果蠅株的三齡幼蟲 $upd3^{d4951}$ 與 $upd3^{p106-2(null)}$ ，眼碟中細胞凋亡的數量，與野生型 w^{1118} 相比並無增多（圖七 E-G）。同時利用 GMR-GAL4 於眼睛大量表現致凋亡基因 *reaper*（Hay et al., 1995），作為抗體染色的正向控制組（圖七 H）。

文獻指出，p35 蛋白可透過抑制 Caspases 的活性，抑制細胞凋亡的發生（Hay et al., 1994）。因此實驗利用 *ey-GAL4* 大量表現抗凋亡蛋白（p35），觀察在 $upd3$ 突變的情況下阻斷細胞進行凋亡，果蠅眼睛大小是否可恢復。結果發現在 $upd3^{p106-2}$ 突變果蠅中，大量表現抗凋亡蛋白（p35），眼睛無法恢復正常大小（圖七 C）。進一步觀察在眼碟發育

過程中，*upd3* 是否經由影響細胞凋亡過程，進而影響眼睛發育。推測在 *upd3* 基因突變的情況下，減少細胞凋亡必要因子 (*hid, reaper, grim*) 的表現，應可使果蠅眼睛恢復正常大小 (Goyal *et al.*, 2000)。結果發現在 *upd3* 突變果蠅中減少細胞凋亡必要因子 *hid, reaper, grim* 的表現，並無法使果蠅眼睛恢復正常大小(圖七 D)。綜合以上實驗結果，顯示 *upd3* 是透過調控細胞增生而非細胞凋亡，進而影響眼睛大小。

V. *upd3* 影響眼睛分化的調控機制

在果蠅三齡幼蟲時期，眼碟上的細胞凹溝 MF 會自眼碟後端移動到前端，在 MF 後面的細胞在未來則有能力分化成神經細胞，並在蛹期進一步分化成複眼 (附圖一)。MF 生成受到一連串訊息如 *decapentaplegic* (*dpp*) 和 *wingless*(*wg*) 所調控 (Theisen *et al.*, 1996)。先前研究得知，*dpp* 表現於眼碟後端，並 MF 啟動後促使 MF 自眼碟後端往前端移動 (Borod and Heberlein, 1998)。 *wg* 表現在眼碟背腹邊緣兩側，為 MF 啟動的負向調控因子 (Ma and Moses, 1995; Treisman and Rubin, 1995)。目前已知 *wg* 和 *dpp* 會互相抑制彼此表現，使得 MF 能固定自眼碟後端平行移動至前端 (Theisen *et al.*, 1996) (附圖一)。從前人研究得知，*upd* 可透過抑制 MF 分化的負向因子 *wg*，並且促進正

向調控因子 *dpp* 的表現 (Tsai *et al.*, 2007 ; Ekas *et al.*, 2006)，影響眼睛發育。為了瞭解 *upd3* 是否影響 MF 啟動，進而影響果蠅眼睛發育，為此我進一步檢測 *upd3* 是否調控 *dpp* 與 *wg* 在眼碟中的表達。

upd3 可活化影響眼睛發育正向因子 *dpp* 表現

實驗利用異位表現 *upd3* cDNA 的方式，觀察 *upd3* 是否調控 *dpp* 在眼碟中的表達。前人研究中指出，*upd* 在眼碟的側邊前端的位置表現時，可活化 *dpp* 表現，並誘導新的複眼生成(圖八 B)(Tsai *et al.*, 2007)。結果發現，在眼碟前端異位表現 *upd3* cDNA 可促使 *dpp* 表現(圖八 C)。顯示 *upd3* 可能藉由誘導 *dpp* 表現，影響 MF 生成。除此之外，我發現 *upd3* cDNA 在眼碟的側邊前端的位置表現，並無法誘導新的複眼生成(圖八 D)。顯示 *upd3* 與 *upd* 皆有能力誘使 *dpp* 表現，但僅有 *upd* 有能力有誘使新的複眼於眼碟前端生成。

upd3 不影響眼睛發育負向調控因子 *wg* 及 *omb* 表現

實驗藉由異位表現 *upd3* 觀察 *upd3* 是否藉由 *wg* 調控途徑，如 *wg* 與下游分子 *optomotor-blind* (*omb*) 影響 MF 生成，進而調控眼睛發育。*os¹hop^{m13}* 為 *upd-like* 基因及 *Jak* 同時缺失的突變株，此時 *Jak/STAT* 訊息傳遞鏈活性極低，*wg* 則不受到 *Jak/STAT* 訊息傳遞鏈的控制，因而

延伸到眼碟後端表現 (圖九 B) (Tsai *et al.*, 2007)。前人研究中指出，*upd* 在眼碟的側邊前端的位置表現時，可透過抑制 MF 分化的負向因子 *wg*，誘導新的複眼生成(圖九 C) (Tsai *et al.*, 2007 ; Ekas *et al.*, 2006)。實驗以 *upd3^{d4951}* 突變株，在 *upd3* 基因變異的背景下表現 *upd3* 基因。結果得知異位表現 *upd3*，並無法抑制 *wg* 表達 (圖九 D)。此外利用 *dpp-GAL4* 於眼睛大量表現 *upd* 以及 *upd3 cDNA* 得知，*upd* 可抑制 *wg* 表現，而 *upd3 cDNA* 並不影響眼睛發育負向調控因子 *wg* 表現 (圖九 E, F)。

前人研究得知，*omb* 為 *wg* 下游分子，為 MF 生成的負向調控因子 (Zecca *et al.*, 1996)。因此為了瞭解 *upd3* 是否藉由 *wg* 調控途徑，如影響下游 *omb* 表現，藉此調控 MF 生成。利用異位表現 *upd3 cDNA* 方式，探討 *upd3* 是否會影響 *omb* 的表達。結果中發現，*wg* 下游基因 *omb* 亦不受到 *upd3* 基因影響其表現 (圖九 G, H)。從以上實驗結果得知，*upd3* 並非透過影響眼睛發育負向調控因子 *wg* 訊息，來調控果蠅眼睛大小。

討論

從我的研究中發現，*upd3* 的確參與調控果蠅眼睛發育過程。*upd3* 在眼睛發育早期即有表達，且在眼碟發育過程，具有促進細胞增生的功能。藉由調控 Jak/STAT 訊息傳遞鏈來影響眼睛發育，透過影響 *dpp* 但不影響 *wg* 訊息傳遞鏈，進而影響眼睛的大小。

***upd3* 與 *upd* 皆可透過 Jak/STAT 訊息傳遞鏈影響果蠅眼睛發育**

先前研究指出，*upd* 可透過 Dome/Hop/STAT92E 訊息傳遞鏈，影響眼碟細胞增生，進一步影響果蠅眼睛發育 (Tsai and Sun, 2004)。從本研究中發現，*upd3* 在眼睛發育時期，亦可活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈 (圖四)。此外在 *upd3* 失去功能的情況下，大量表達 *Jak* (*hop^{Tum-1}*) 則可使眼睛大小恢復 (圖三)。推測 *upd3* 可能是透過 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，影響果蠅眼睛發育。此外 *upd3* 可透過調控細胞增生而非使細胞凋亡，進而影響眼睛大小 (圖六，七)。藉由偵測 *upd3* 表達的時間點及位置得知，在果蠅發育早期 (二齡早期至三齡早期)，*upd3* 在眼碟即有表現，而晚期三齡後期則無表達 (圖五)。此外 *upd3* 在二齡早期表達位置與 *upd* 極為相似，皆表現在 MF 起始位置。且在眼睛發育過程中兩者有表現，但表達的位置似乎與有所不同，當中三齡早期表現位置

的差異更為顯著。綜合以上結果，我認為 *upd* 與 *upd3* 在果蠅眼睛發育中所扮演部分重複角色，但在三齡早期 *upd3* 可能具有和 *upd* 不同的功能。推測 *upd* 與 *upd3* 在發育早期，彼此之間可能有交互作用，進一步影響眼睛的發育。

upd3 與 *upd* 影響眼睛發育機制的相同與相異之處

前人研究中指出，*upd* 可透過同時抑制 MF 分化的負向因子 *wg*，並促進正向調控因子 *dpp* 的表現，進而影響眼睛發育（圖十）（Bach *et al.*, 2003 ; Tsai *et al.*, 2007）。而從我的從實驗結果得知，*upd3* 雖然可透過活化眼睛正向調控因子 *dpp*，生成異位性 MF。但由於 *upd3* 並不影響負向因子 *wg* 及其下游基因在眼碟的表達，因此沒有能力生成異位性眼睛（圖十）。從以上結果得知，*upd3* 和 *upd* 皆可活化 *dpp*，但僅有 *upd* 可抑制 *wg* 表達，並進一步生成異位性眼睛，顯示兩者之間對於調控眼睛發育的機制仍有所不同。

最早的 *upd-like* 基因突變 *os^s* 為 *upd3* 基因突變株

os^s 突變株具小眼外表型（附圖七 B），於 1925 年被 Morgan 等人篩選出來（Morgan, Bridges and Sturtevant, 1925），已知 *os^s* 位於染色體 17A 附近位置發生變異，且可能為 *upd-like* 基因之突變株。但直至

今日為止，尚不明瞭 os^s 確切為何種基因發生變異。本研究藉由遺傳方法與分子方式分析 os^s 突變株果蠅。首先分別使 os^s 與 $upd-like$ 基因突變株果蠅 os^l 進行互補測試，並觀察是否能互補回復成為正常大小 (worked by Yu-Ting Peng)。結果得知 os^s 與 os^l 突變果蠅株並不能互補 (附圖七 E)，推測可能為 $upd-like$ 基因產生變異。此外分別 os^s 與 upd^- ($cv^l ct^l v^l os-upd^l mal$) 及 $upd2^-$ ($upd2^{10-2(null)}$) 完全失去功能的突變株果蠅進行互補測試，結果顯示可互補 (附圖七 F, G)，因而認為並非 upd 或 $upd2$ 基因突變。而 os^s 與 $upd3^-$ ($upd3^{p106-2(null)}$) 完全失去功能的突變株互補測試結果，顯示無法互補 (附圖七 H)。證明 os^s 極有可能為 $upd3$ 基因之突變株。此外進一步在 os^s 突變株及 $upd3^{p106-2(null)}/os^s$ ，大量表現 $upd3$ cDNA，補回 $upd3$ 基因活性，則可使眼睛回復為正常大小 (附圖七 I, J)。利用分子生物學方式，以 PCR 方式逐一定序分析 os^s 的 $upd3$ 基因。結果顯示，在 $upd3$ 基因的 intron1 與 exon1 附近的序列，觀察到基因重排的現象 (gene rearrangement) (見圖二)，但有待進一步分析。綜合以上結果我們認為 os^s 為最早被篩選出的 $upd-like$ 基因突變。由我們實驗室證明 os^s 為 $upd3$ 基因突變，造成小眼性狀。

Upd、Upd2 與 Upd3 蛋白質序列比較

目前已知果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞練，其包括三個配體 (Unpaired: Upd、Upd2 與 Upd3)，其基因位置皆位於 X 染色體 17A 位置上，且彼此相鄰 (附圖八 A)。Upd1、Upd2 及 Upd3 蛋白質序列平均長度為 395 個氨基酸，蛋白質序列之相同度與相似度分別僅為 7.3% 與 24% (附圖八 B)。進一步以 ClustalW2 軟體比對此三個配體的蛋白質序列，發現其序列上有一段 77 個氨基酸極為相似的區域，我們稱之為 Upd 區域 (Upd domain) (附圖八 C)。仔細比較後發現，此三個配體間 Upd 區域相似度達到 52.6%。分別比較配體後得知，Upd1 與 Upd2 的 Upd 區域，其相似度更達到 75.6%。Upd1 與 Upd2 相似度為 66.7%，Upd2 與 Upd3 相似度則為 59% (附圖八 D)。Upd1、Upd2 及 Upd3 當中的 Upd 區域，以 T-coffee 軟體比對發現，此區域具 Helix 蛋白結構 (附圖八 F)。此外 Upd 區域在其餘 11 個已定序完成的果蠅物種中極為相同 (aligned by Dr. Jyung-Hurng Liu)，顯示此序列在演化上十分保留。因此我們認為，此 Upd 區域所扮演的角色應極為重要，可能為接收體結合位置，或者為配體結構或功能上的重要區域，因而演化上此序列被保留下來。

參考文獻

- Agaisse H, Petersen UM, Boutros M, Mathey-Prevot B and Perrimon N. (2003) Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* 5:441–450.
- Arbouzova NI and Zeidler MP. (2006) JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* 133:2605-2616
- Bach EA, Ekas LA, Ayala-Camargo A, Flaherty MS, Lee H, Perrimon N and Baeg GH. (2007) GFP reporters detect the activation of the *Drosophila* JAK/STAT pathway in vivo. *Gene Expr Patterns. Gene Expr Patterns* 7:323–331
- Bach EA, Vincent S, Zeidler MP and Perrimon N. (2003) A sensitized genetic screen to identify novel regulators and components of the *Drosophila* janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Genetics* 165:1149-66
- Baker NE. (1988) Transcription of the segment-polarity gene *wingless* in the imaginal discs of *Drosophila*, and the phenotype of a pupal-lethal *wg* mutation. *Development* 3:489-97.
- Bate CM and Martinez-Arias A. (eds.) (1993) The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Betz A, Ryoo HD, Steller H and Darnell JE Jr. (2008) STAT92E is a positive regulator of *Drosophila* inhibitor of apoptosis 1 (DIAP/1) and protects against radiation-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105 (37) :13805-10
- Borod ER and Heberlein U. (1998) Mutual regulation of *decapentaplegic* and *hedgehog* during the initiation of differentiation in the *Drosophila* retina. *Dev Biol*

197:187-97.

Brand AH and Perrimon N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118 : 401-15.

Brown S, Hu N and Castelli-Gair Hombría J. (2001) Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr Biol* 11, 1700-1705.

Buchon N, Broderick NA, Poidevin M, Pradervand S and Lemaitre B. (2009) *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. *Cell Host Microbe*. 5:200-11

Castelli-Gair Hombría J, Brown S, Häder S and Zeidler MP. (2005) Characterisation of Upd2, a *Drosophila* JAK/STAT pathway ligand. *Dev Biol* 288:420-433.

Chanut F and Heberlein U. (1997) Role of *decapentaplegic* in initiation and progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* retina. *Development* 124: 559-567

Chen HW, Chen X, Oh SW, Marinissen MJ, Gutkind JS and Hou SX. (2002) *mom* identifies a receptor for the *Drosophila* JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes Dev* 16, 388-398.

Cho KO, Chern J, Izaddoost S and Choi KW.(2000)Novel signaling from the peripodial membrane is essential for eye disc Patterning in *Drosophila*. *Cell* 103: 331-342.

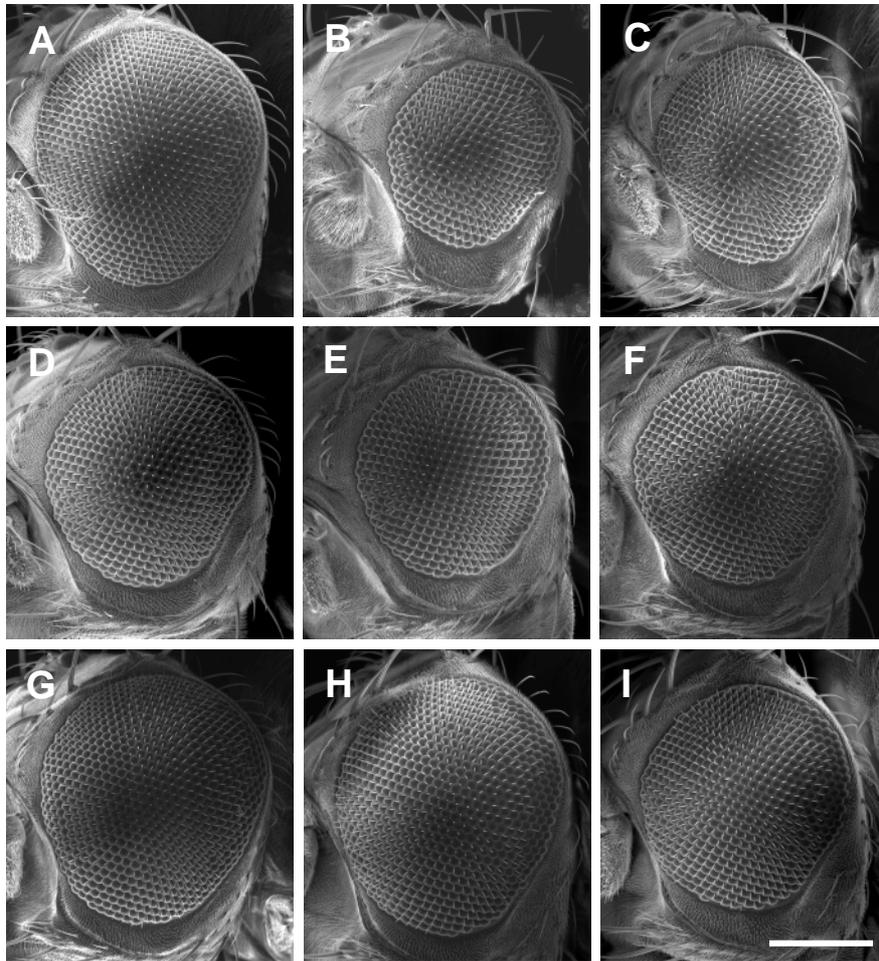
Curtiss J and Mlodzik M. (2000) Morphogenetic furrow initiation and progression during eye development in *Drosophila*: the roles of *decapentaplegic*, *hedgehog* and *eyes absent*. *Development* 6:1325-36.

- Ekas LA, Baeg GH, Flaherty MS, Camargo AA and Bach EA. (2006) JAK/STAT signaling promotes regional specification by negatively regulating *wingless* expression in *Drosophila*. *Development* 133: 4721-4729
- Gilbert MM, Weaver BK, Gergen JP and Reich NC. (2005) A novel functional activator of the *Drosophila* JAK/STAT pathway, *unpaired2*, is revealed by an *in vivo* reporter of pathway activation. *Mech Dev.* 122:939-948.
- Goyal L, McCall K, Agapite J, Hartweg E and Steller H. (2000) Induction of apoptosis by *Drosophila reaper*, *hid* and *grim* through inhibition of IAP function. *EMBO J.* 4:589-97.
- Halder G, Callaerts P and Gehring WJ. (1995) Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267:1788-1792.
- Harrison DA, Binari R, Nahreini TS, Gilman M and Perrimon N. (1995) Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J.* 12 : 2857–2865.
- Harrison DA, McCoon PE, Binari R, Gilman M and Perrimon N. (1998) *Drosophila unpaired* encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev.* 12, 3252-3263.
- Hay BA, Wassarman DA and Rubin GM. (1995) *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 7:1253-62.
- Hay BA, Wolff T and Rubin GM. (1994) Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* 8:2121-9.
- Hombría JC and Brown S. (2002) The fertile field of *Drosophila* Jak/STAT signalling. *Curr Biol.* 16:569-75

- Hombría JC, Brown S, Häder S and Zeidler MP. (2005) Characterization of Upd2, a *Drosophila* JAK/STAT pathway ligand. *Dev Biol* 288:420-33.
- Hou XS, Melnick MB and Perrimon N. (1996) Marelle acts downstream of the *Drosophila* HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. *Cell* 84, 411-419.
- Igaz P, Tóth S and Falus A. (2001) Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice. *Inflamm. Res.* 50:435-441.
- Ito K, Awano W, Suzuki K, Hiromi Y and Yamamoto D. (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124:761-71.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J and Schindler CW. (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285:1-24.
- Langer JA, Cutrone EC and Kotenko S. (2004) The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15:33-48.
- Luo H and Dearolf CR. (2001) The JAK/STAT pathway and *Drosophila* development. *Bioessays* 23:1138-47.
- Luo H, Asha H, Kockel L, Parke T, Mlodzik M and Dearolf CR. (1999) The *Drosophila* Jak kinase Hopscotch is required for multiple developmental processes. *Dev Biol* 213: 432-41.
- Ma C and Moses K. (1995) *wingless* and *patched* are negative regulators of the morphogenetic furrow and can affect tissue polarity in the developing *Drosophila*

- compound eye. *Development* 121:2279-2289.
- Malagoli D, Sacchi S and Ottaviani E. (2008) *unpaired (upd)-3* expression and other immune-related functions are stimulated by interleukin-8 in *Drosophila melanogaster* SL2 cell line. *Cytokine* 44:269-74
- Pastor-Pareja JC, Wu M and Xu T. (2008) An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis Model Mech.* 1:144-54
- Quiring R, Walldorf U, Kloter U and Gehring WJ. (1994) Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science* 265:785-9.
- Rawlings JS, Rosler KM and Harrison DA. (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117: 1281-1283.
- Ready DF, Hanson TE and Benzer S. (1976) Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev Biol* 53:217-40.
- Subramaniam PS, Torres BA and Johnson HM. (2001) So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Cytokine* 15:175-187.
- Sun YH, Tsai CJ, Green MM, Chao JL, Yu CT, Jaw TJ, Yeh JY and Bolshakov VN. (1995) *white* as a reporter gene to detect transcriptional silencers specifying position-specific gene expression during *Drosophila melanogaster* eye development. *Genetics.* 141:1075-86.
- Theisen H, Haerry TE, O'Connor MB and Marsh JL. (1996) Developmental territories created by mutual antagonism between Wingless and Decapentaplegic. *Development* 12:3939-48.

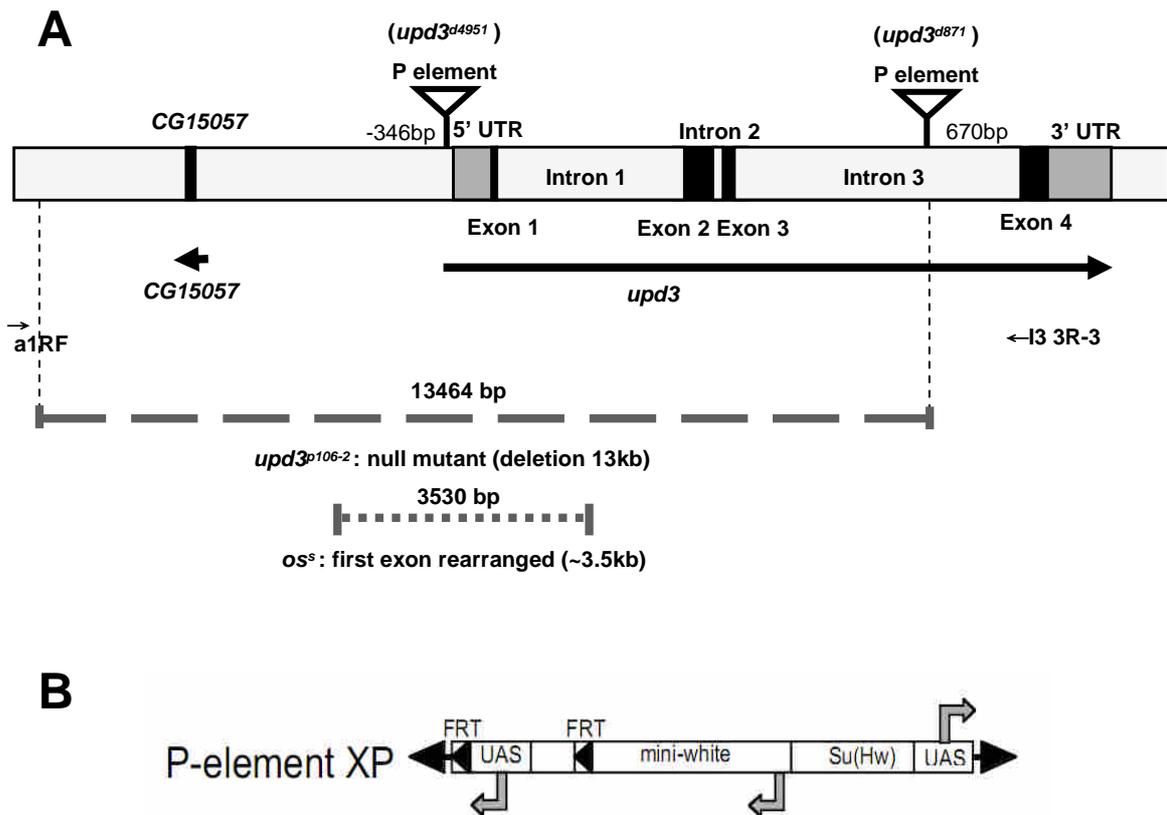
- Treisman JE and Rubin GM. (1995) *wingless* inhibits morphogenetic furrow movement in the *Drosophila* eye disc. *Development* 121:3519-3527.
- Tsai YC and Sun YH. (2004) Long-range effect of *upd*, a ligand for Jak/STAT pathway, on cell cycle in *Drosophila* eye development. *Genesis* 39:141-53.
- Tsai YC, Grimm S, Chao JL, Yao JG, Hofmeyer K, Shen J and Sun YH. (2008) *optomotor-blind* inhibits cell proliferation, morphogenetic furrow initiation and retinal differentiation during *Drosophila* eye development. The 49th Annual *Drosophila* Research Conference, San Diego, CA, USA. Compendium.
- Tsai YC, Yao JG, Chen PH, Posakony JW, Barolo S, Kim J and Sun YH. (2007) Upd/Jak/STAT signaling represses *wg* transcription to allow initiation of morphogenetic furrow in *Drosophila* eye development. *Dev Biol* 306:760-71.
- Yan R, Small S, Desplan C, Dearolf CR and Darnell JE Jr. (1996) Identification of a Stat gene that functions in *Drosophila* development. *Cell* 84:421-43
- Zecca M, Basler K and Struhl G. (1996) Direct and long-range action of a *wingless* morphogen gradient. *Cell* 5:833-44.
- Zeidler MP, Perrimon N and Strutt DI. (1999) Polarity determination in the *Drosophila* eye: a novel role for *unpaired* and JAK/STAT signaling. *Genes Dev* 13:1342-53.



圖一、利用遺傳方法分析*upd3*基因突變株

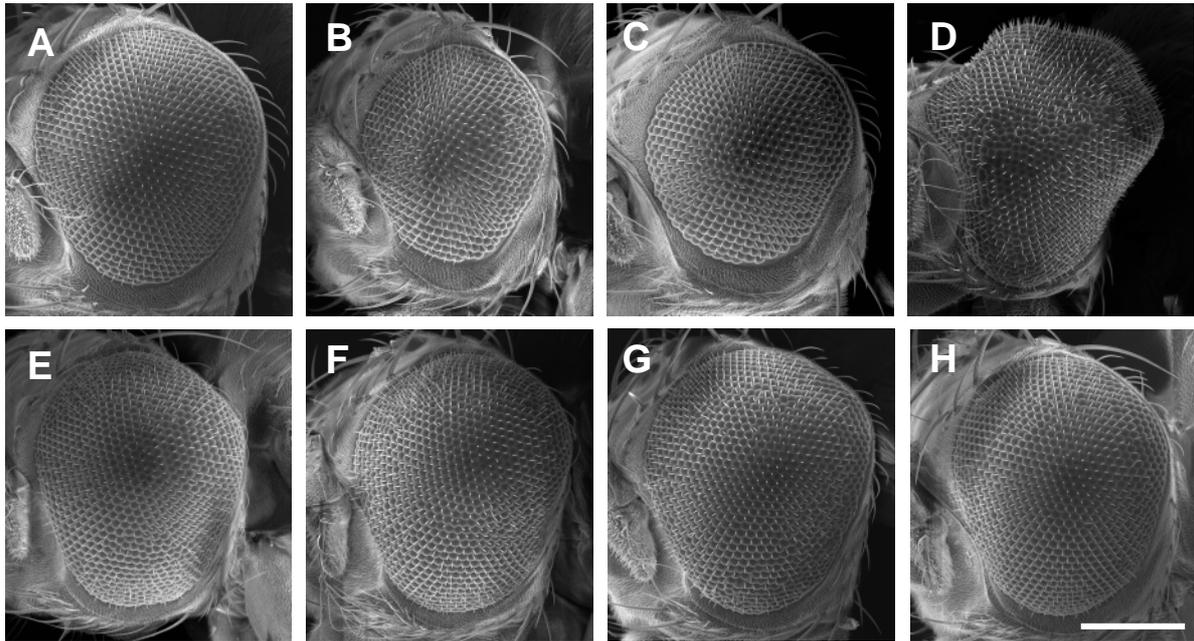
圖一、利用遺傳方法分析*upd3*基因突變株

(A-I) 圖為果蠅成蟲眼睛，以掃描式電子顯微鏡 (Scanning electron microscope, SEM) 觀察其眼睛大小。利用P-element跳離實驗，我篩選到 8 個 *upd3* 可能的突變株。實驗以互補測試 (complementation test) 的方式，利用 *upd-like* 基因突變株 *os^l* 與 *Df(1)os-UE19*，與篩選到的可能 *upd3* 基因突變株果蠅進行互補測試，用以確認其 *upd3* 基因是否發生變異。圖 (A) 為野生型 *w¹¹¹⁸* 果蠅。(B) *os^l* 目前得知其 *upd*, *upd2* 及 *upd3* 皆發生變異，具小眼外表型。*Df(1)os-UE19* 則為 *upd* 與 *upd3* 基因缺失的致死突變株。(C) *upd3^{d4951}* 為 P-element 插入使 *upd3* 基因變異，造成小眼之突變株。(D) *upd3^{p106-2}* 為篩選到的小眼果蠅突變株，(E, F) 和已知的 *upd-like* 基因突變果蠅 *os^l* 以及 *Df(1)os-UE19* 互補測試結果，皆觀察到小眼外表型，顯示無法互補。此外分別與 *upd-like* 基因，*upd⁺ (cv^lct^l v^los-upd^l mal)*、*upd2⁻ (upd2¹⁰⁻² (null))* 完全失去功能的突變株，及 *upd3⁻ (upd3^{d4951})* 進行互補測試。(G, H) *upd3^{p106-2}* 和 *upd⁺*、*upd2⁻* 完全失去功能的突變株互補結果，眼睛大小和野生型相近，結果顯示可以互補。(I) *upd3^{p106-2}* 和已知的 *upd3* 突變果蠅 *upd3^{d4951}* 互補結果得知，果蠅為小眼外表型，顯示無法互補。以上結果認為，*upd3^{p106-2}* 為 *upd3* 基因突變株。此外其餘篩選到的7個突變株，亦和已知的 *upd3* 基因突變果蠅進行相同的互補測試，結果亦顯示無法互補。綜合以上結果得知，此 8 個突變株皆為 *upd3* 基因皆發生產生變異，並非 *upd* 或 *upd2* 基因突變。(Scale bar = 200 μm)



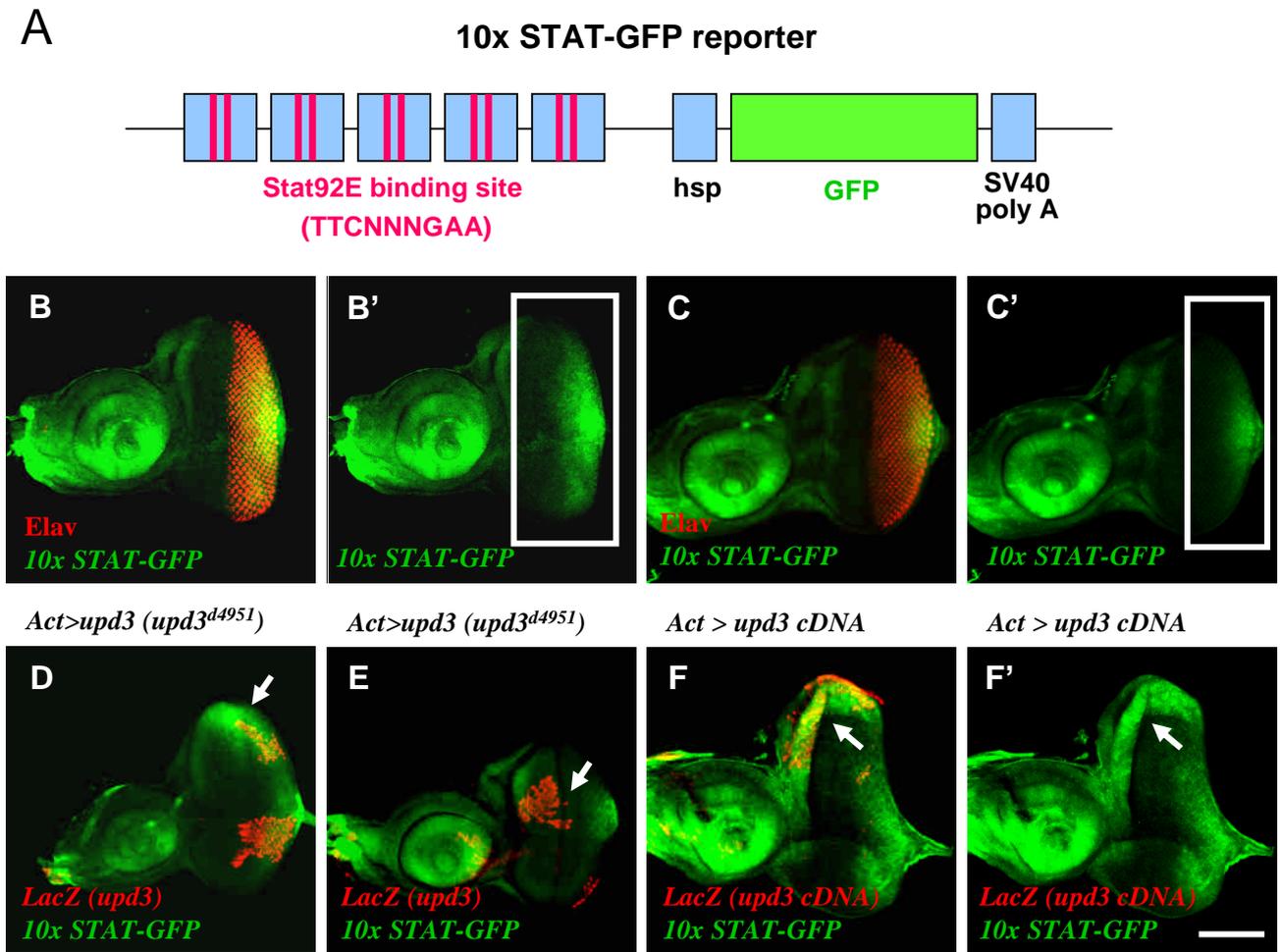
圖二、*upd3*突變株於*upd3*基因的缺失位置

(A) *upd3* 基因在X染色體 17A2-5 位置上，位於 *CG15057* 基因 3' 端 4185 bp 的位置。*upd3^{d4951}* 為 *upd3* 基因小眼突變株，其 P-element 序列插入 *upd3* 基因前 244 bp，造成*upd3*基因變異。*upd3^{d871}*為 P-element 插入株，P-element 插入點位於 *upd3* 基因 intron3 (exon4前 670 bp)。與野生型果蠅眼睛相比，*upd3^{d871}* 果蠅眼睛幾近於正常大小。利用 *upd3^{d871}* P-element跳離實驗，篩選出 8 個 *upd3* 基因可能的突變株。並以分子生物學方式，以 PCR 方式逐一定序分析其 *upd3* 基因。當中 *upd3^{p106-2}* 為 *upd3* 基因完全缺失突變株。自 *upd3^{d871}* 的 P-element 插入點算起，往前造成 13,464 bp 的缺失，*upd3* 基因Exon 1-3則發生大片段缺失 (5495 bp)。*os^s* 突變株具小眼外表型，由互補測試結果得知，*os^s* 極有可能為 *upd3* 基因之突變株。進一步以 PCR 方式分析 *os^s* 的 *upd3* 基因顯示，*upd3* 基因的 intron1 與 exon1 附近的序列 (約 3.5kb)，觀察到基因重排的現象 (gene rearrangement)，但需更進一步的分析。(B) 由於 *upd3^{d4951}* 上插入的 P-element 兩端有UAS序列 (Thibault *et al.*, 2004)，因此利用 GAL4 /UAS系統可大量表現插入點後的 *upd3* 基因。



圖三、*upd3*透過Jak/STAT訊息傳遞鏈調控果蠅眼睛發育

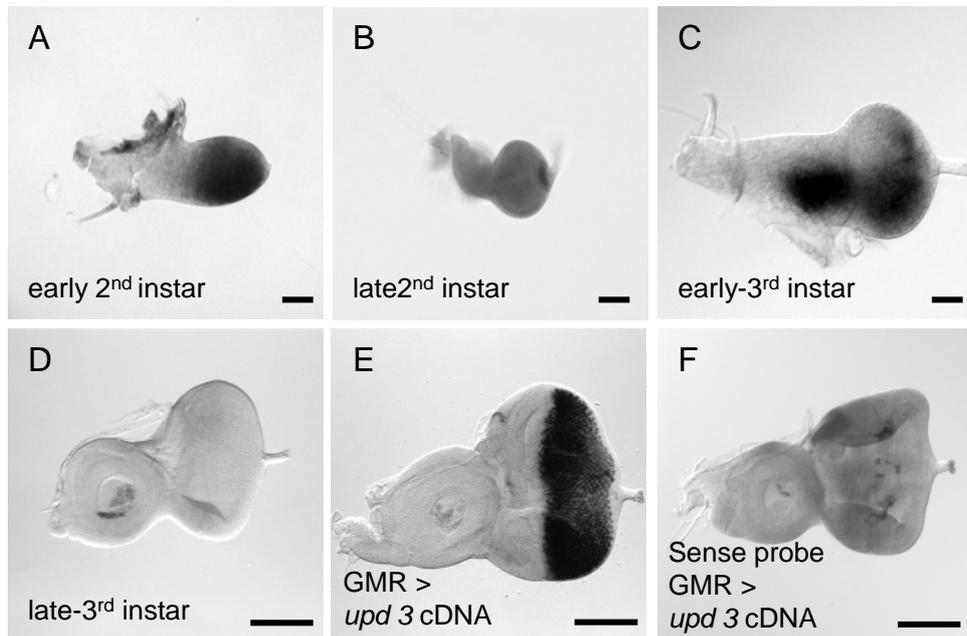
(A-H) 果蠅成蟲眼睛以掃描式電子顯微鏡觀察眼睛大小。(A) 野生型 w^{1118} 果蠅眼睛。(B, C) 觀察得知 *upd3* 基因變異果蠅 *upd3^{d4951}*、*upd3^{p106-2(null)}*，皆具有小眼外表型。*upd3^{p106-2(null)}* 小眼數目僅約為 520 ± 20 個 ($n=9$)，小眼數目明顯少於野生型 (約750~800個)。顯示 *upd3* 基因失去功能時果蠅眼睛變小。(D, E) 在果蠅眼睛利用 *ey-GAL4* 大量表現 *upd3* cDNA，或者表現持續活化態 *hop* (*hop^{Tum-l}*)，皆可使眼睛變大。進一步利用篩選到*upd3*突變株果蠅 *upd3^{p106-2(null)}*，在*upd3*失去功能情況下補回其活性。(F) 以*ey-GAL4*大量表現 *upd3* cDNA、(G) 持續活化態 *hop* (*hop^{Tum-l}*) 或 (H) *hop* cDNA (*hop³*)，皆則可使 *upd3^{p106-2(null)}* 果蠅眼睛回復至幾近野生型眼睛大小。從以上結果發現，*upd3* 極有可能是透過Jak/STAT訊息傳遞鏈調控果蠅眼睛發育。(Scale bar = $200 \mu m$)



圖四、*upd3*可活化果蠅眼碟Jak/STAT訊息傳遞鏈

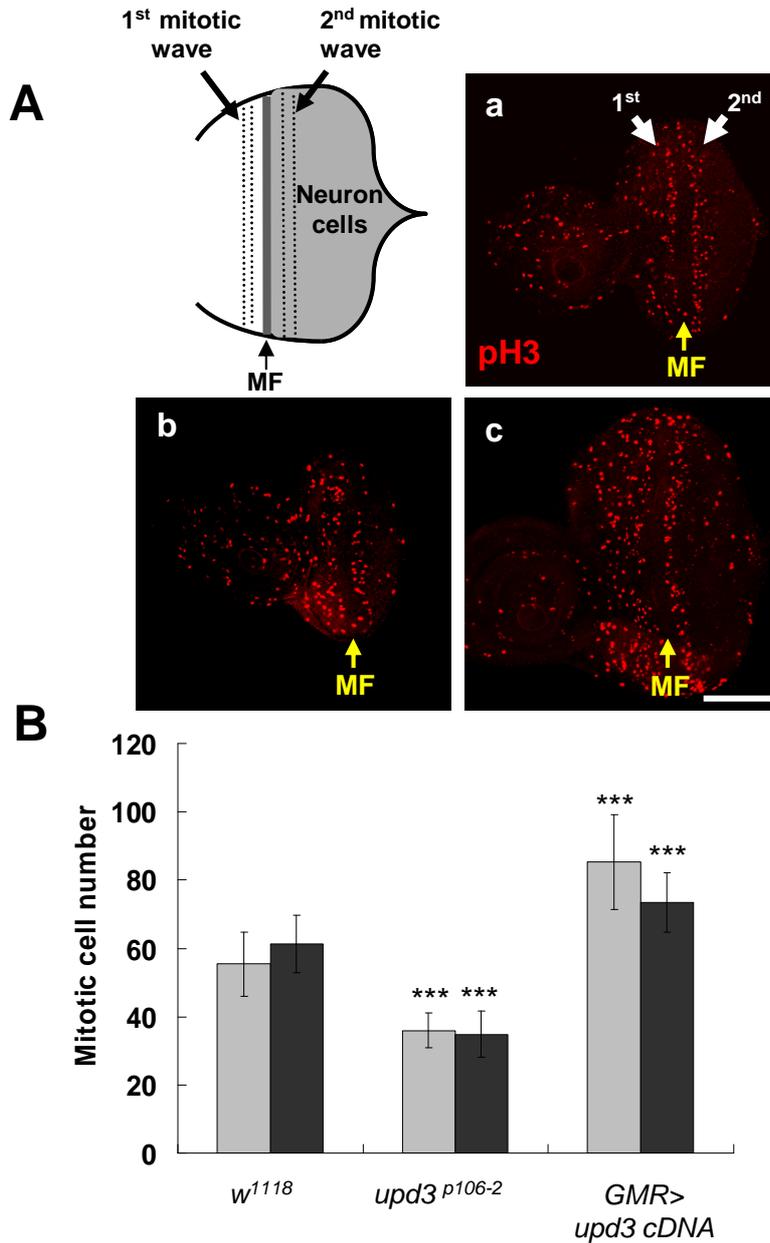
圖四、*upd3*可活化果蠅眼碟Jak/STAT訊息傳遞鏈

(A) *10x STAT-GFP* 報導基因的示意圖。*10x STAT-GFP* 報導基因，可在果蠅體內反應Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性 (Bach *et al.*, 2007)。此報導基因包含 10 個 STAT 結合位點，當 STAT 活化後進入到核內後，則可辨識此結合位點，使 GFP 螢光蛋白得以表現，因此可藉由觀察 GFP 蛋白表現，檢測 Jak/STAT 訊息傳遞鏈的活性。(B-F) 為果蠅三齡幼蟲之眼碟之免疫螢光染色結果。(B, B') 顯示野生型 *w¹¹¹⁸* 果蠅 Jak/STAT 訊息活性，從 MF 至眼碟後端有表現 (綠色螢光)。(C, C') *upd3^{p106-2(null)}* 的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性與野生型相比明顯降低，僅侷限在眼碟後端有表達。藉由在眼碟異位性表達 *upd3* 或 *upd3 cDNA*，觀察其對於 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性之影響。由於 *upd3^{d4951}* 所插入 P-element 兩端有 *UAS* 序列，因此可藉由表達 GAL4 蛋白，大量表現插入點後的 *upd3* 基因 (圖二B)。(D, E) 利用 *upd3^{d4951}* 突變株，在 *upd3⁻* 的背景下表表現 *upd3* 基因。結果顯示在眼碟異位性表達 (D) *upd3* 或 (F, F') *upd3 cDNA*，可活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈活性。(E) 但在眼碟中央表現 *upd3*，則無法活化 Jak/STAT 訊息。(綠色螢光：*10x STAT-GFP*；紅色螢光：(B, C) *Elav*，用以標示視覺神經細胞，(D-F) *LacZ (upd3)*) (Scale bar = 100 μ m)



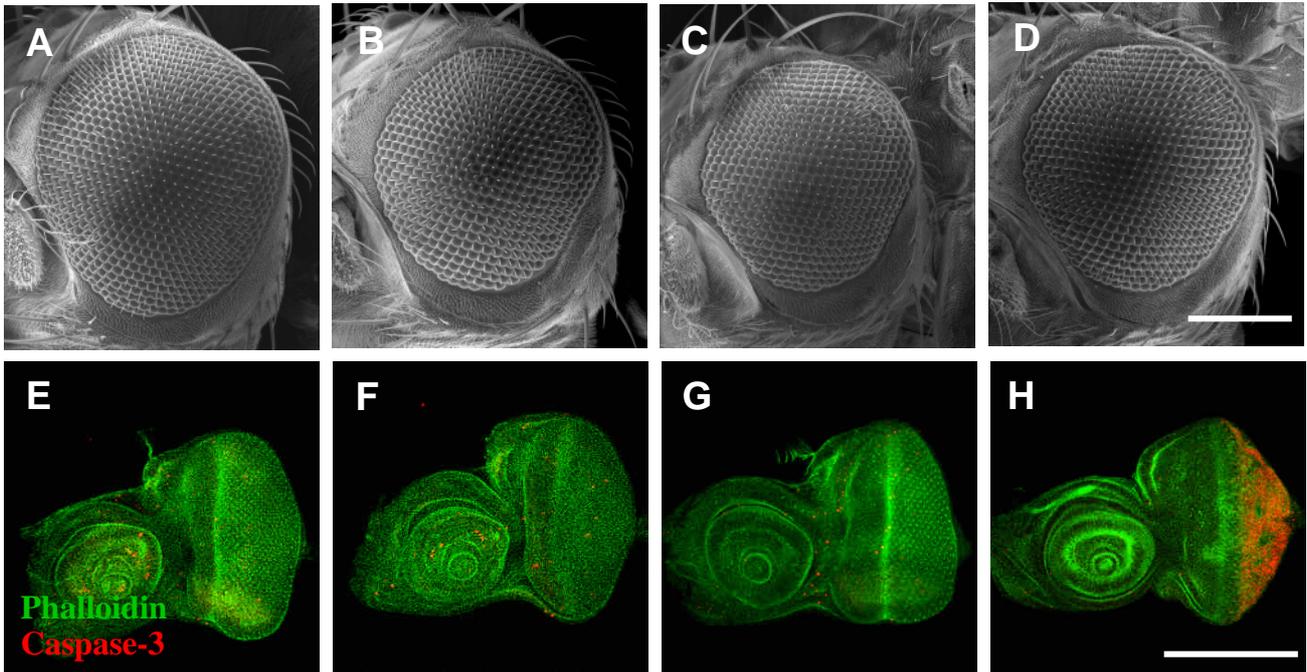
圖五、*upd3*在果蠅眼碟的表現的時間及位置

不同發育時期的野生型 w^{1118} 果蠅眼碟，利用反向探針進行原位雜合反應 (RNA *in situ* hybridization) 之實驗結果。為了偵測 *upd3* 在果蠅眼碟的表現的時間及位置，以 *upd3* cDNA 做為模版，利用體外轉錄反應 (*in vitro* transcription)，製作正向探針 (sense RNA probe) 和反向探針 (anti-sense RNA probe)。 (A-C) 結果顯示 *upd3* 在眼碟發育早期 (二齡早期至三齡早期) 皆有表現。 (D) *upd3* 至晚期三齡後則無表現。 (E) 同時利用 GMR-GAL4，在眼睛大量表現 *upd3* cDNA，並以反向探針偵測 *upd3* 表現作為正向控制組， (F) 以正向探針結果作為負向控制組。 (Scale bar = 50 μ m)



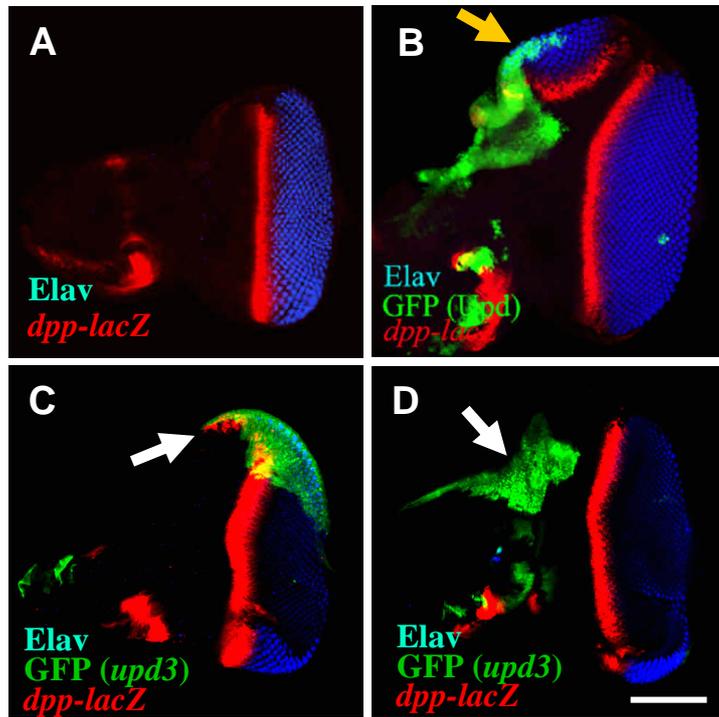
圖六、 *upd3*可透過調控細胞增生進而影響眼睛大小

(A) 三齡幼蟲的眼碟有兩波會同時進行分裂及增生細胞，稱為 1st mitotic wave 及 2nd mitotic wave。(A, a-c) 為果蠅三齡幼蟲眼碟，以抗體標定磷酸化組蛋白 (phospho-histone H3, pH3)，藉此觀察正在增生的細胞。(a) 為野生型 *w¹¹¹⁸* 三齡幼蟲眼碟增生細胞之染色結果 (1st mitotic wave : 55.4±9, 2nd mitotic wave : 61.2±8, n=15)。(b) 顯示 *upd3^{p106-2}* 三齡幼蟲眼碟細胞，與野生型相比增生數量明顯變少 (1st mitotic wave : 36±5, 2nd mitotic wave : 34.8±7, n=13)。(c) 利用眼睛專一表達的 *GMR-GAL4* 大量表現 *upd3* cDNA，眼碟細胞增生數量則明顯變多 (1st mitotic wave : 85.4±14; 2nd mitotic wave : 73.5±9, n=15)。(B) 為圖 (A) 組蛋白染色訊號之量化結果。因此我們認為在果蠅眼睛發育的過程中，*upd3*的確會影響細胞的增生進而影響眼睛大小。(灰色：1st mitotic wave；黑色：2nd mitotic wave) (***) : P-value < 0.01, Scale bar = 100 μm)



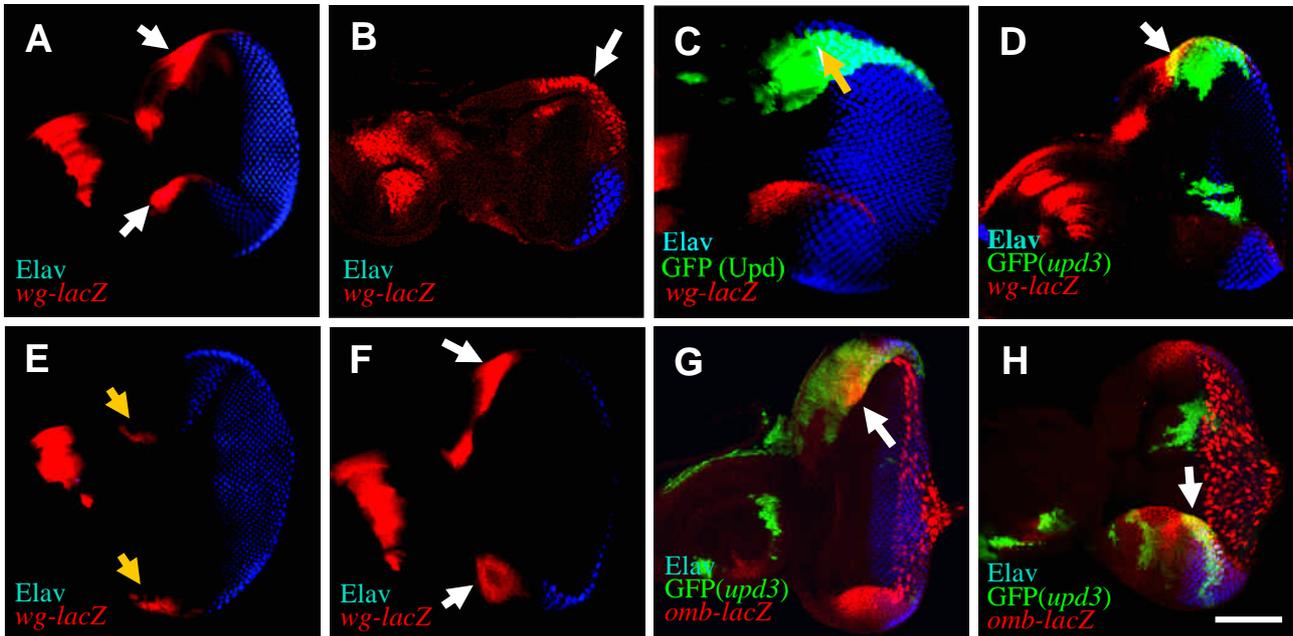
圖七、*upd3* 並非藉由影響細胞凋亡影響眼睛大小

(A-D) 果蠅成蟲眼睛，利用掃瞄式電子顯微鏡之觀察結果。(A) 為野生型 *w¹¹¹⁸* 果蠅。(B) 為 *upd3* 基因功能完全缺失突變株 *upd3^{p106-2}(null)*，小眼數目明顯少於野生型。為了驗證 *upd3* 是否透過影響細胞凋亡影響眼睛大小。在 *upd3^{p106-2}* 突變果蠅中，(C) 在眼睛利用 *ey-GAL4* 大量表現抗凋亡蛋白 p35，(D) 減少一半的細胞凋亡因子劑量 (*hid*, *reaper*, *grim*)，觀察果蠅眼睛大小是否可回復。結果顯示即使影響細胞凋亡的訊息途徑，仍無法使 *upd3* 突變果蠅眼睛回復至正常大小。(E-H) 為果蠅三齡幼蟲眼碟之免疫螢光染色結果。以抗體標定活化態的 Caspase-3 標示凋亡的細胞，觀察 *upd3* 突變時，細胞凋亡的數量是否增加。(E) 野生型 *w¹¹¹⁸* 果蠅之染色結果。(F, G) 已知的 *upd3* 突變果蠅株 *upd3^{d4951}* 與 *upd3^{p106-2}* 與野生型相比，三齡幼蟲眼碟中細胞凋亡的數量並無增多。(H) 同時以 *GMR-GAL4* 於眼睛大量表現致凋亡基因 *reaper*，作為抗體染色的正向控制組。由以上結果推論，*upd3* 並非藉由影響細胞凋亡影響眼睛大小。(紅色螢光：活化態的 Caspase-3；綠色螢光：Phalloidin) (Scale bar = 200 μ m)



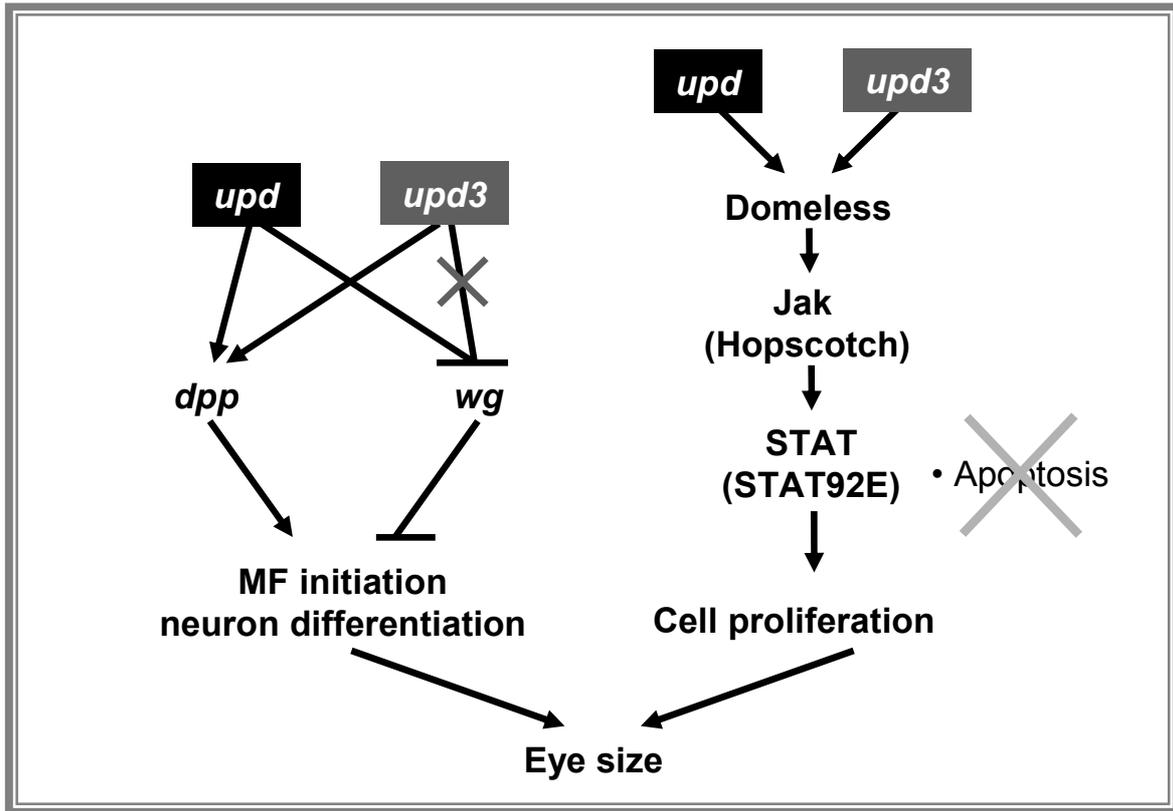
圖八、 *upd3* 可能藉由誘導 *dpp* 表現影響MF生成

(A-D) 為果蠅三齡幼蟲眼碟免疫螢光染色結果。實驗利用異位表現 *upd3* *cDNA* 的方式，觀察 *upd3* 是否調控 *dpp* 在眼碟中的表達。(A)為野生型 *w¹¹¹⁸* 果蠅眼碟，*dpp* 表現於MF之上(紅色螢光)。(B) *upd* 在眼碟的側邊前端的位置表現時(以GFP訊號標示*upd*表達細胞)，可活化 *dpp* 表現，並誘導新的複眼生成(橘色箭頭)(Tsai *et al.*, 2007)。(C) 在眼碟前端異位表現 *upd3* *cDNA*，可促使 *dpp* 表現(白色箭頭)，顯示 *upd3* 可能藉由誘導 *dpp* 表現影響MF生成。(D) 但 *upd3* *cDNA*在眼碟的側邊前端背面的位置表現時，並無法誘導新的複眼生成(白色箭頭)。(紅色螢光：*dpp-LacZ*；藍色螢光：Elav，用以標示視覺神經細胞；綠色螢光：GFP用以標示(B) *upd* 以及 (C, D) *upd3* 表現) (Scale bar = 100 μ m)



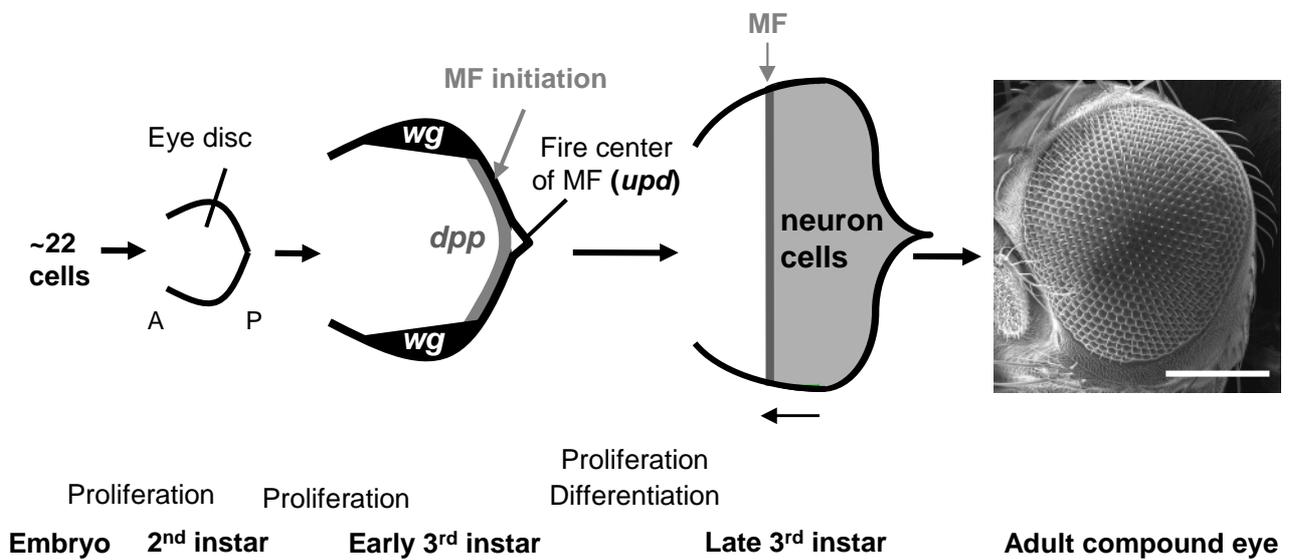
圖九、*upd3*不影響眼睛發育負向調控因子*wg*及*omb*表現

(A-H) 為果蠅三齡幼蟲眼碟之免疫螢光染色結果。異位表現 *upd3* 觀察其是否影響 *wg* 途徑，如 *wg* 與下游分子 *omb* 影響MF生成，進而調控眼睛發育。(A)野生型 *w¹¹¹⁸* 果蠅眼碟，*wg* 表現於眼碟邊緣兩側(紅色螢光)。(B) *os¹hop^{m13}* 為 *upd-like* 基因及 *Jak* (*hop*) 同時缺失之突變株，此時 *Jak/STAT* 訊息傳遞鏈活性極低，*wg* 則不受到 *Jak/STAT* 訊息傳遞鏈的調控，因而延伸到眼碟後端表現 (Tsai *et al.*, 2007)。(C) *upd* 在眼碟的側邊前端的位置表現時，可透過抑制 MF 分化的負向因子 *wg*，誘導新的複眼生成 (Tsai *et al.*, 2007 ; Ekas *et al.*, 2006)。由於 *upd3^{d4951}* 所插入 P-element 兩端有 *UAS* 序列，因此可藉由表達 *GAL4* 蛋白，大量表現插入點後的 *upd3* 基因。(D) 利用 *upd3^{d4951}* 突變株，在 *upd3* 基因變異的背景下游異位表現 *upd3*，結果並無法抑制 *wg* 表達。(E, F) 利用 *dpp-GAL4* 於眼睛大量表現 *upd* 以及 *upd3* *cDNA*，*upd* 可抑制 *wg* 表現，*upd3* *cDNA* 則並不影響。(G, H) 顯示異位表現 *upd3* *cDNA*，*wg* 下游基因 *omb* 亦不受到 *upd3* 影響其表達。(紅色螢光：(A-F) *wg-lacZ*，(G-H) *omb-lacZ*；綠色螢光：(B) *upd*、(D,G, H) *upd3*；藍色螢光：Elav，用以標示神經細胞) (Scale bar = 100 μ m)



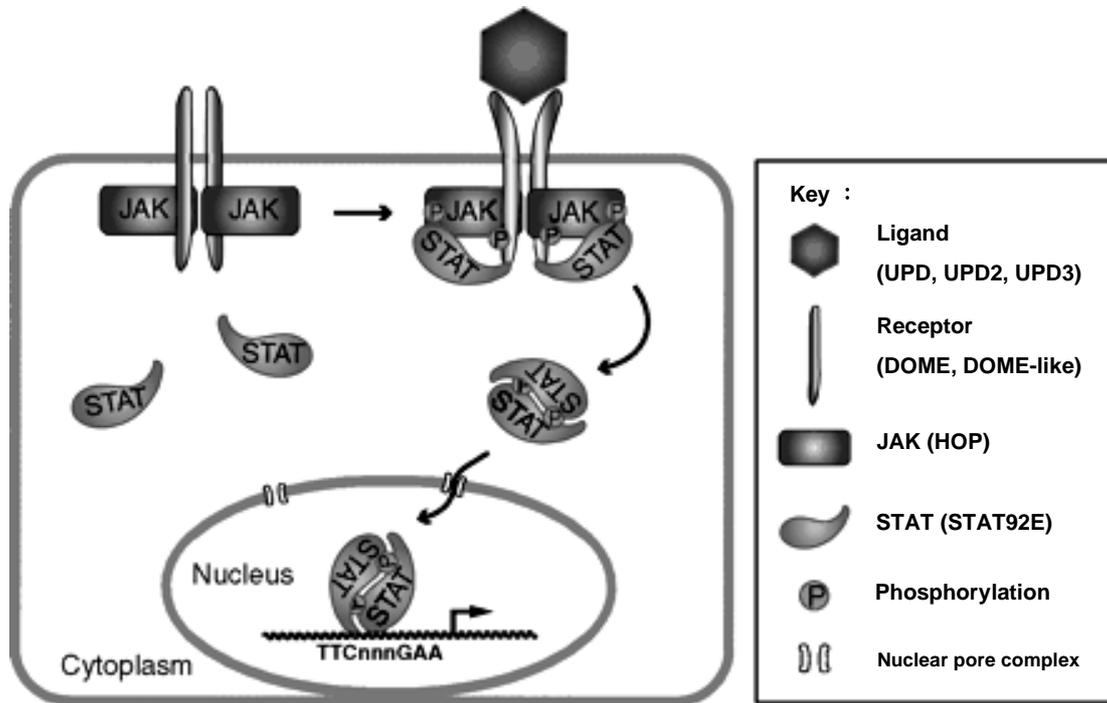
圖十、*upd3*與*upd*影響眼睛發育機制

過去研究中指出，*upd* 可透過同時抑制 MF 分化的負向因子 *wg*，並促進正向調控因子 *dpp* 的表現，進而影響視神經分化 (Bach *et al.*, 2003 ; Tsai *et al.*, 2007)。從實驗結果推測，*upd3* 同樣可透過活化 *dpp*，生成異位性 MF。但由於 *upd3* 並不影響 *wg* 及其下游基因 *omb* 在眼碟的表達，因此沒有能力生成異位性眼睛。此外前人研究中指出，*upd* 可透過 Dome/Hop/STAT92E 訊息傳遞鏈，影響眼碟細胞增生，進一步影響果蠅眼睛發育 (Tsai and Sun, 2004)。從本研究中發現，*upd3* 在眼睛發育時期，亦可活化 Jak/STAT 訊息傳遞鏈，並經由影響眼碟細胞增生而非使細胞凋亡，調控眼睛發育。



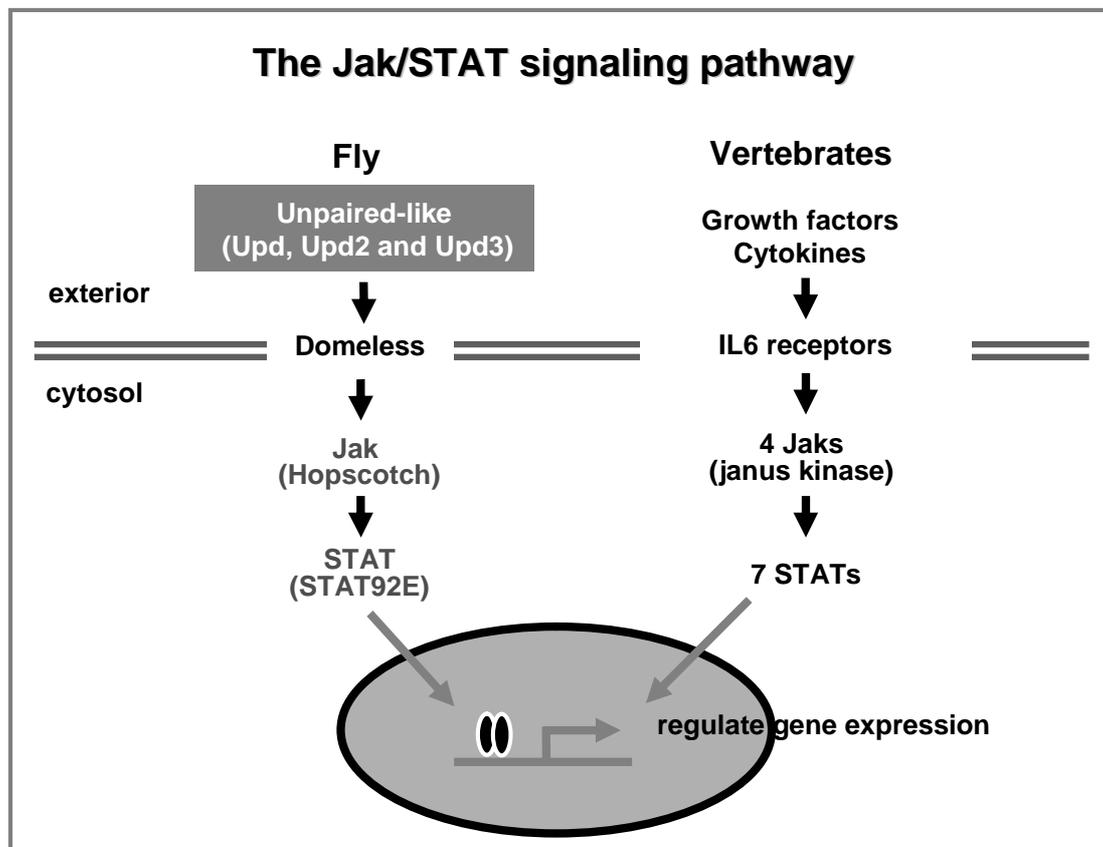
附圖一、果蠅眼睛發育

成年的果蠅眼睛是由一盤狀構造稱之眼碟 (eye imaginal discs) 所發育而來。早期發育時期，眼碟上的細胞不斷的增生至一定數量。在三齡幼蟲時期，眼碟上的細胞會壓縮成一個凹溝稱之為 morphogenetic furrow (MF)，自眼碟後端移動到前端。在MF上的部分細胞則有能力被選擇，未來分化成為神經細胞。先前研究指出，在二齡、早期三齡果蠅幼蟲，*upd* 表現於眼碟後端邊緣的中間位置，可透過活化影響MF分化的正向因子 *decapentaplegic* (*dpp*) 表現，並抑制 MF 分化的負向因子 *wingless* (*wg*) 表現，藉由調控 MF 的起始，影響眼睛發育。(Ready *et al.*, 1976 ; Bate and Martinez-Arias, 1993)



附圖二、果蠅Jak/STAT 訊息傳遞鏈

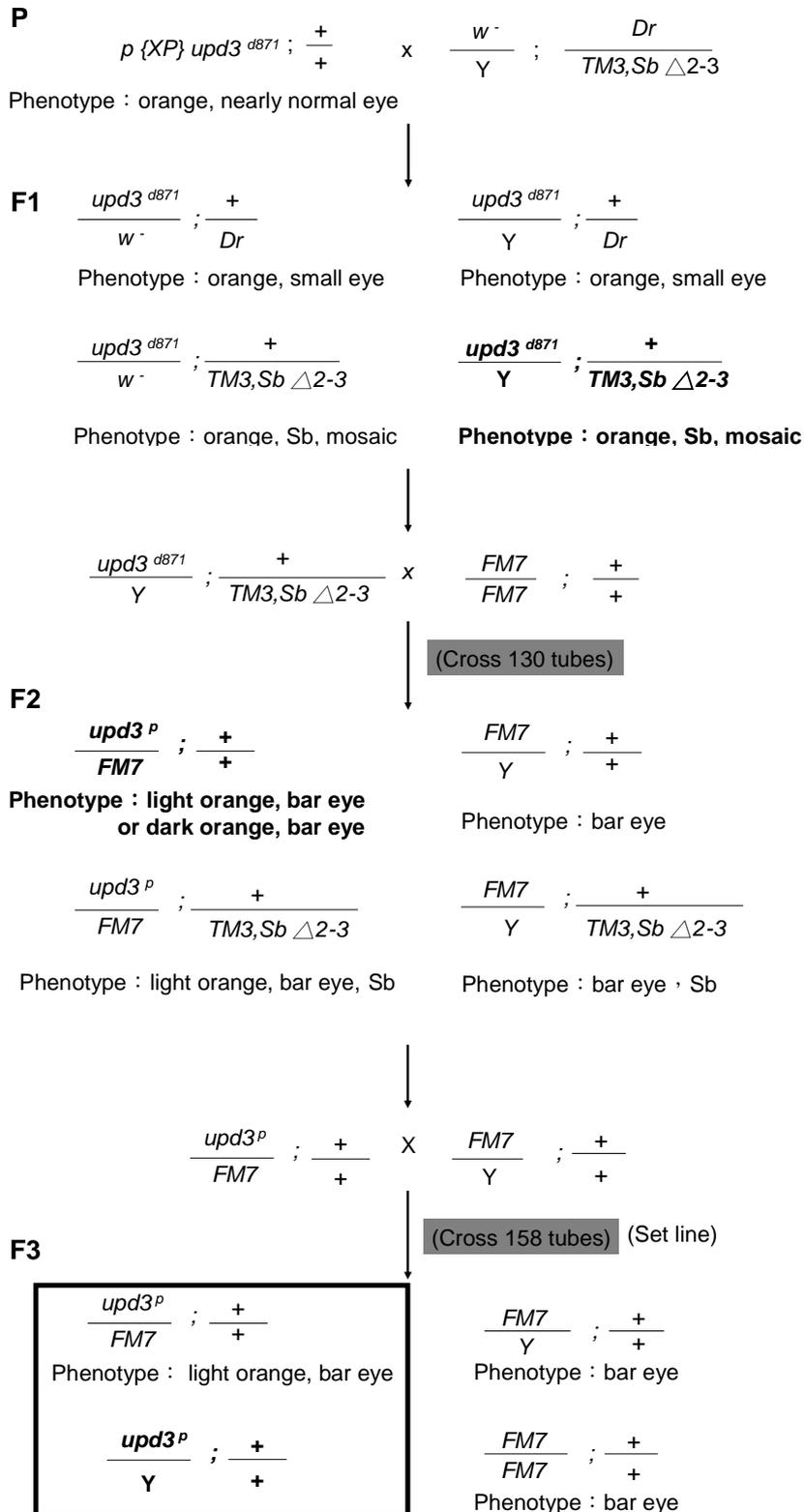
Jak/STAT 訊息傳遞鏈主要由 Janus Kinases (JAKs) 與 Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) 組成。當細胞因子與受體結合，受體形成二聚體並進一步活化 JAK (Hop)，隨後細胞質內的 STAT(STAT92E) 靠往受體並被 JAK 所磷酸化，STAT 形成二聚體後則可轉位到核內，從而調控基因表達。(Arbouzova and Zeidler, 2006)



附圖三、果蠅與哺乳類之Jak/STAT 訊息傳遞鏈

演化上哺乳類及果蠅的 Jak/STAT 訊息傳遞鏈具高度保留性，在細胞內皆可找到相對應的分子。相較於哺乳類動物，果蠅中的 Jak 及 STAT 組成較簡單，對訊息功能影響較為直接。哺乳類動物中，Jak/STAT 訊息傳遞鏈包含了 4 個 *Jak* 和 7 個 *STAT* 基因 (Kisseleva et al., 2002)。受到如細胞白介素 (interleukin)、干擾素 (interferon) 及細胞激素 (cytokines) 活化 (Langer et al., 2004; Subramaniam et al., 2001)。果蠅 Jak/STAT 訊息傳遞鏈包括三個配體 (Unpaired: Upd、Upd2 與 Upd3)、兩種細胞膜上的受器 *Domeless* 及 *CG14225* (亦稱 Domelike 或 Latran)、一個 JAK (Hopscotch, Hop) 與一個 STAT (STAT92E)。(Arbouzova and Zeidler, 2006; Rawlings et al., 2004)

Generate *upd 3* deletion mutants by P-element-mediated excision



附圖四、以P-element跳離實驗篩選出8個*upd3*基因可能的突變株

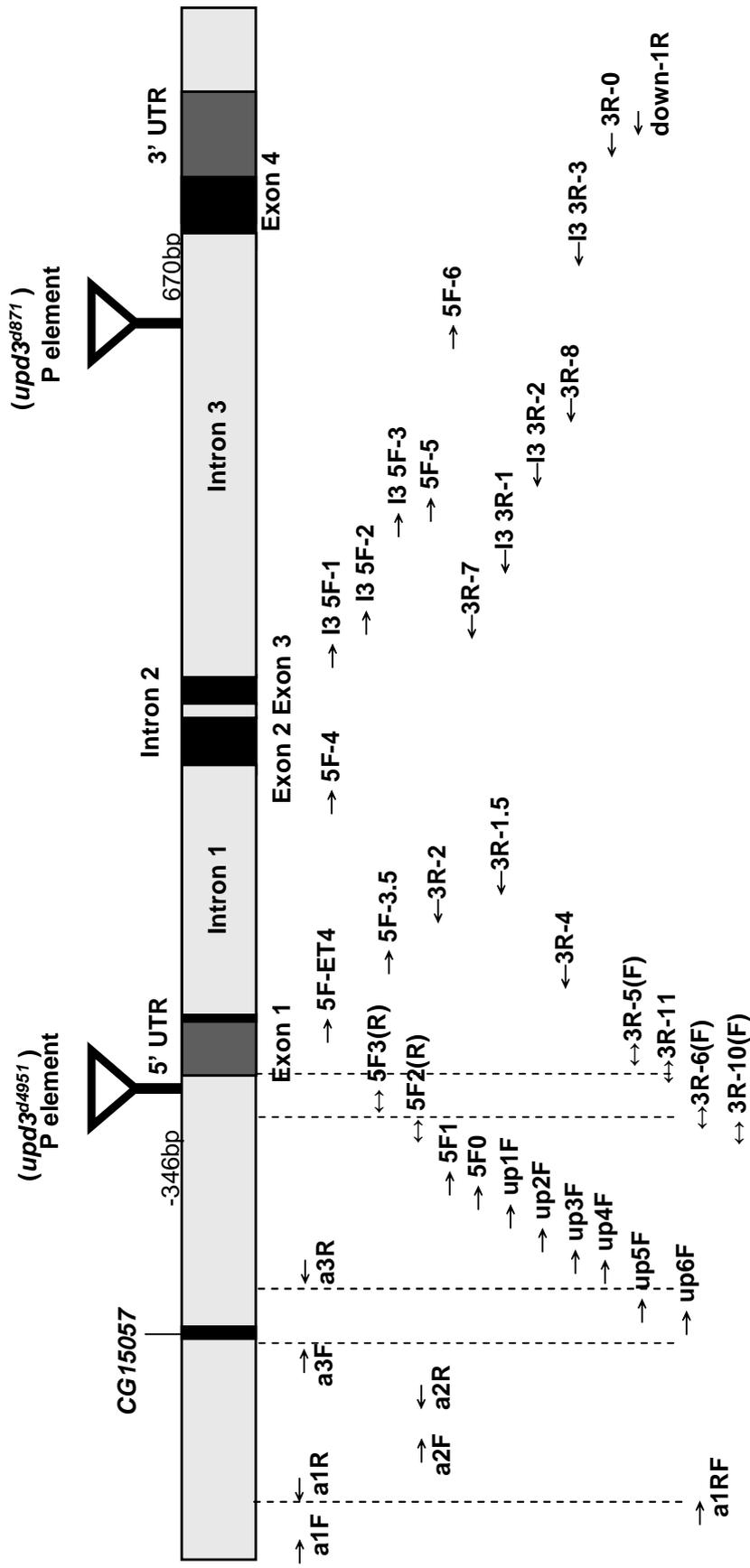
The phenotype of *upd3^P*
Y

1.Revertant	wild type eye phenotype	34 lines	Frequency : 34/158x100% =21.5%
2.Mutation	small eye and white eye	4 orange small eye 2 white small eye lines	Frequency : (4+2+2)/158x100% =5%
	lethal (all male are <i>FM7</i>)	2 lines	

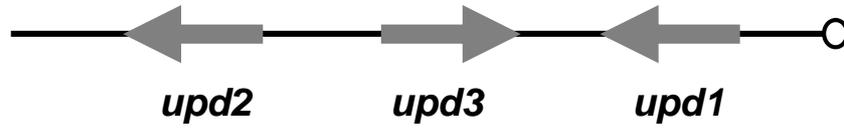
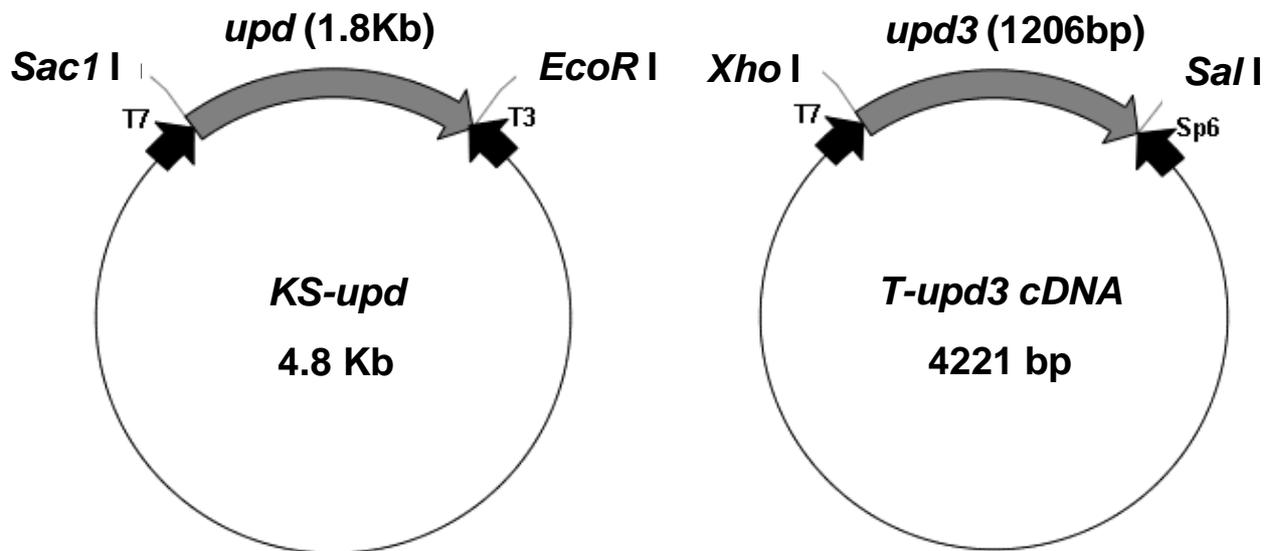
Candidate 8 lines	P 52-3	(orange small eye)
	P 38-3	(orange small eye)
	P 97-1	(white small eye)
	P 106-2	(white small eye)
	P 102-2	(Lethal)
	P 128-2	(orange small eye)
	P 121-3	(orange small eye)
	P 124-3	(Lethal)

附圖四、以P-element跳離實驗篩選出8個*upd3*基因可能的突變株

實驗利用 *upd3^{d871}* 果蠅，使其同時表現轉位酶 (transposase)，誘使 P-element 跳離原來位置，造成基因缺失，或者在跳離後插入附近序列造成突變。藉由 *upd3^{d871}* P-element 跳離實驗，我篩選出 8 個 *upd3* 基因可能的突變株 (6個可存活株，2個致死突變株)，在此當中可存活的突變株皆有小眼外表型。



附圖五、引子(Primers)位於*upd3*基因之相對位置

A**X chromosome : 17A2-5****B**

T7 : sense probe

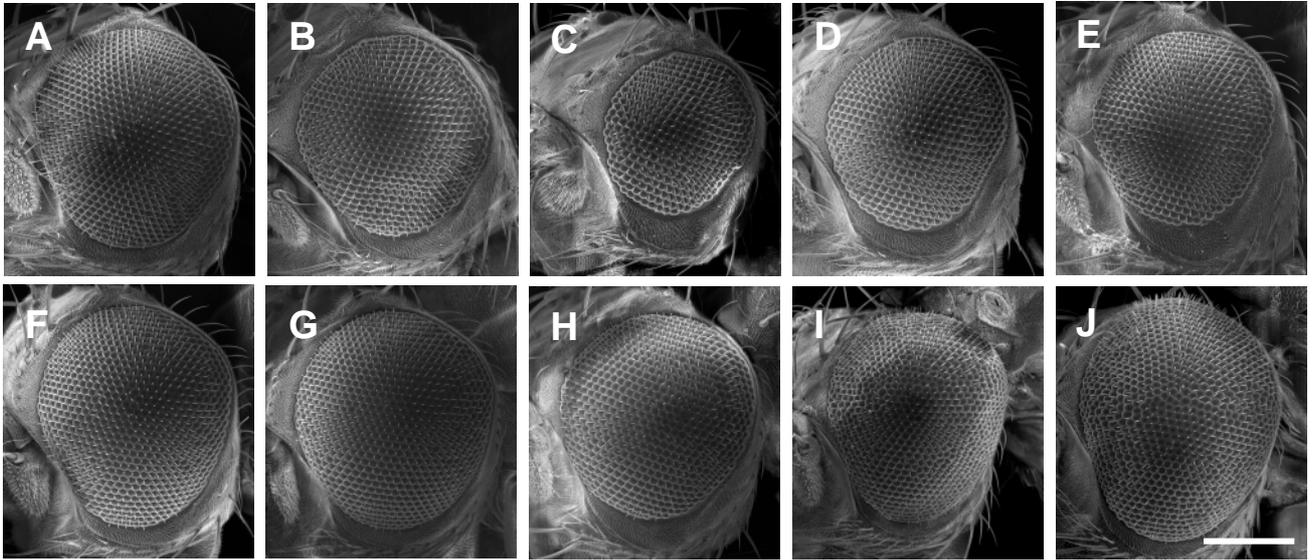
T3 : anti-sense probe

T7 : sense probe

Sp6 : anti-sense probe

附圖六、原位雜交使用之質體

(A) *upd-like* 基因皆位於果蠅X染色體17A2-5位置。(B) *KS-upd* 與 *T-upd3* cDNA 質體圖譜。以 *KS-upd* 與 *T-upd3* cDNA 質體做為模版，進行體外轉錄反應 (*in vitro* transcription)，製作正向探針 (sense RNA probe) 和反向探針 (anti-sense RNA probe)。利用 RNA 原位雜交方式 (RNA *in situ* hybridization)，檢測 *upd3* 在果蠅眼碟的表現的時間及位置。



(Yu-Ting Peng)

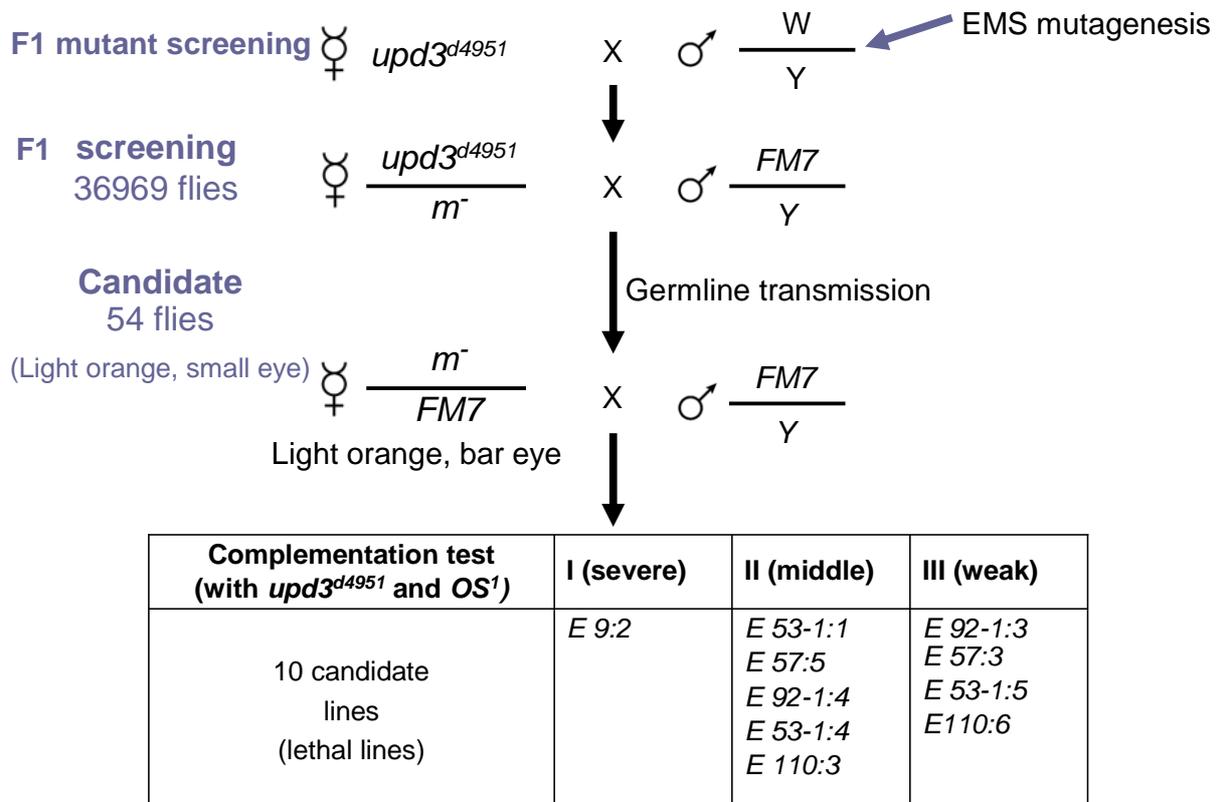
附圖七、*os^s* 為 *upd3* 基因突變株

附圖七、*os^s*為*upd3*基因突變株

(A-J) 果蠅成蟲眼睛，利用掃描式電子顯微鏡之觀察結果。(A) 野生型 w^{1118} 果蠅眼睛。(B) *os^s* 突變株具小眼外表型，於1925年被Morgan等人分離出來(Morgan, Bridges and Sturtevant, 1925)，已知 *os^s* 位於染色體17A附近位置發生變異，且可能為 *upd-like* 基因之突變株。但直至今日為止，尚不明瞭 *os^s* 確切為何種基因發生變異。本研究藉由遺傳方法與分子方式分析 *os^s* 突變株果蠅。

(C) *os^l* 目前得知其 *upd*, *upd2*及*upd3* 皆發生變異，具小眼外表型。首先將 *os^s* 與 *os^l* 突變株果蠅進行互補測試。(E) 結果得知 *os^s* 與 *os^l* 突變果蠅株並不能互補，眼睛仍為小眼。推測 *os^s* 可能為 *upd-like* 基因產生變異。(F-H) *os^s* 分別與 *upd-like* 基因，*upd^l* (*cv^lct^l v^los-upd^l mal*)、*upd2⁻* (*upd2¹⁰⁻² (null)*) 及 (D) *upd3⁻* (*upd3^{p106-2}(null)*) 完全失去功能的突變株進行互補測試。(F, G) 顯示 *os^s* 與 *upd⁻*、*upd2⁻* 兩者皆可互補，因而認為並非 *upd* 或 *upd2*基因突變。(H) *os^s* 與*upd3* 完全失去功能的突變株 *upd3^{p106-2}(null)* 互補測試結果為無法互補，認為 *os^s* 極有可能為*upd3*基因之突變株。(I, J)在 *os^s* 突變株以及 *upd3^{p106-2}/os^s* 中，大量表現 *upd3 cDNA* 以補回 *upd3* 基因活性，可使眼睛回復為正常大小。(圖二 A) 我們也進一步利用分子方式，以 PCR 方式逐一定序分析 *os^s* 的 *upd3* 基因，在 *upd3* 基因的intron1與exon1附近的序列，觀察到基因重排的現象(gene rearrangement) (圖二)，但有待進一步分析。綜合以上結果我們認為，*os^s* 為 *upd3* 基因變異之小眼突變株。

Generate *upd3* mutants by EMS mutagenesis



附圖九、以EMS mutagenesis實驗篩選出11個*upd3*基因可能的突變株

實驗利用 *w¹¹¹⁸* 雄性果蠅，使其食入至突變劑 ethyl methanesulfonate (EMS)，誘使基因突變，與 *upd3^{d4951}* 處女蠅交配後，進行F1突變篩選 (F1 mutant screening)。藉由 EMS mutagenesis實驗，總計篩選了36969隻果蠅，篩選出11個 *upd3* 基因可能的突變株 (皆為致死突變株)。和已知的 *upd-like* 基因突變果蠅 *os¹* 以及 *upd3* 突變果蠅 *upd3^{d4951}* 進行互補測試的結果得知，11個突變株皆為 *upd3* 基因之突變株。

個人資料

中文姓名：黃鈺婷

英文姓名：Yu-Ting Huang

出生日期：1983 年 8 月 31 日

戶籍地址：台中縣大里市永興路 265 巷 8 號

聯絡電話：(家) (04)24817753

(手機) 0933-512821

電子信箱：lraruku@gmail.com

學歷：

弘光科技大學食品營養科五專部(1998-2003)

屏東科技大學食品科學系二技部(2003-2005)

東海大學生命科學系生物醫學組碩士班(2007-至今)

經歷：

台中榮民總醫院心臟內科專任研究助理(2005-2007)

東海大學生命科學系遺傳學實驗兼任助教(2007)

東海大學生命科學系生物多樣性實驗兼任助教(2008)