Number 18, 2012.04.01.

臺灣大學「發育生物學與再生醫學研究中心」電子報

Research Center for Developmental Biology and Regenerative Medicine Newsletter

中心網頁：http://homepage.ntu.edu.tw/~ntucdbrm622/

中心主任：楊偉勛 教授
榮譽主任：鍾正明 院士

總編輯：謝豐舟教授
副總編輯：吳益群教授
編輯顧問：孫以瀚研究員、邱英明教授

編輯幹事： 陳敏慧教授、徐善慧教授、謝武勳副教授、黃彥華副教授、李士傑副教授、黃敏銓副教授、丁照棣副教授、陳信孚副教授、曹伯年助理教授、王弘毅助理教授、劉逸軒助理教授、陳佑宗助理教授、林頌然助理教授、林泰元助理教授、楊宗霖助理教授、鄭乃禎醫師、鄭暉騰醫師、陳沛隆醫師、顏伶汝副研究員

美編製作：劉麗芳
發行日期：**2012**年 **04**月 **01** 日

本次主題

1. 新聞
   中央大學與哈佛大學成立「跨國頂尖研究中心」

2. 活動預告
   (1) **2012.04.18-**專題演講
   劉俊揚副研究員/國家衛生研究院/細胞及系統醫學研究所
   Signal pathways in regulating mouse embryonic stem cell survival, differentiation and proliferation

   (2) **2012.04.30-**專題演講
   鍾政和醫師/馬偕醫院內分泌暨新陳代謝科
   Adult pancreatic endocrine stem/ progenitor cells

   (3) **2012.06.27-06.30-**第五屆東亞線蟲會議
   5th East Asia *C. elegans* Meeting

3. 追求真實的筆尖-活動照片
   格雷琴・凱・哈伯特的科學插畫展
   科學插畫到台大/謝豐舟教授

4. **2012.03.19-**專題演講
   Neuronal dendrites and synapses: the make and the use of thems
   簡正鼎研究員 /中研院分子生物研究所
   與果蠅大師一席談/謝豐舟教授

5. **Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster***
   台大醫院皮膚部 **/**洪楨邦 醫師
   台大醫學院分子醫學研究所**/**吳君泰 老師

新聞:

中央大學與哈佛大學成立「跨國頂尖研究中心」

新聞來源：中央大學新聞網 新聞網址：
http://www.ncu.edu.tw/~ncu7009/news/news/read/1152

文／陳如枝 2011.05.01

中央大學數據中心與哈佛大學醫學院共同成立的「跨國頂尖研究中心」，四月十六、十七日一連兩天召開「第一屆動態生醫指標暨轉譯醫學國際研 討會」，邀請到哈佛大學八位教授與國內頂尖醫學中心主任和教授進行學術 交流。就「生命」這個動態的過程，進行全方面的探討，為人類的疾病預防尋求更好的明天。

跨國頂尖研究中心 獲國科會一億元挹注　此跨國頂尖研究中心名為「動態生醫指標暨轉譯醫學研究中心」（**Center for Dynamical Biomarkers and Translational Medicine**， 簡稱 **CDBTM** ）由中央大學黃鍔院士領導的數據分析方法研究中心，以及哈佛 醫學院的教學醫院–貝斯以色列女執事醫療中心由彭仲康博士主導的雷研究 中心共同成立。

中央大學校長蔣偉寧指出，這項跨國計畫獲國科會大力支持，五年共計 一億元經費挹注，中央大學和哈佛大學也將共同出資。台灣只有中央大學、 台灣大學和台灣聯合大學系統三校獲得，在學術拔尖上具重要指標意義。

黃鍔院士表示，此跨國中心成立的之目標，在於匯集以系統觀點量化健 康和疾病狀態與用以分析系統的非線性交互作用的數學架構兩部分所需的專 業知識。重點將放在「動態生醫指標」研究，使用**HHT**（**Hilbert-Huang Transform**） 分析方法，來研究非線性和非穩態的問題，可建立並評估系統動態生醫指標。

動態生醫指標　監測複雜疾病最具效果的指標

「動態生醫指標」之所以受到重視，在於其為研究或監測複雜疾病最具 效果的指標，可從分子層次提昇到系統層次，要評估個體發生某些併發症的 風險，或監測其對治療的反應，可使用「巨觀」參數，偵測整體系統的動態 變化，這是分子層次指標所無法提供的。運用在臨床醫學上，可有效協助醫 師對患者的了解和診斷，可運用於心血管疾病、心律不整、神經醫學、老人 醫學和病理學等。

該中心由哈佛大學彭仲康教授擔任執行主任。彭教授為統計物理學家， 發展了許多演算法用來量化複雜系統的動態行為，並被廣泛應用於物理及生 物領域中，成果深受肯定。

彭仲康教授認為，就現代醫學而言，「這是最好的時代，也是最壞的時 代。」一方面，因生物醫學技術的進步，使我們能夠收集大量資訊，了解基 因、圖像和生理訊號。但大量的訊息，似乎並沒有幫助我們遏制不斷上升的 醫療成本。

「轉化醫學」，有助於許多創新性預防措施，以及如何早期診斷疾病。 其關鍵在於掌握背後隱藏的訊號，解碼這些動力學模式，最關鍵的挑戰在於 分析方法和工具，必須具有物理意義、數學嚴謹，與臨床相關性，而黃鍔院 士發明的**HHT**方法，為此提供了一個絕佳的方法。為了迎接這一挑戰，研究人 員必須在數學、物理、計算機科學、工程、生物醫學等多方面共同努力。

國內外一流學者與會

此次研討會一連為期兩天，結合了世界一流頂尖學者與會。包括美國國 家科學院院士、波士頓大學物理系教授**Gene Stanley**教授進行專題演講， **Stanley**教授為轉譯醫學建構重要理論基礎，是美國跨學科科學的先驅。另有 八名哈佛大學醫學院教授包含：哈佛醫學院教授暨貝斯以色列女執事醫學中 心高年科主任**Lewis Lipstz;**哈佛醫學院老年醫學副教授暨貝斯以色列女執事 醫療中心老年暈與厥跌倒實驗室主任**Vera Novak;**哈佛醫學院睡眠醫學副教授 **Robert J. Thomas**等。

台灣則有頂尖大學和醫學中心學者專家與會，包括台北榮民總醫院內科 部心臟科主任陳適安、神經醫學中心主任王署君、一般身心科主任蔡世仁、 台大醫院心臟衰竭中心主任何奕倫、台大醫學院麻醉部主任范守仁，國內學 者元智大學副校長江行全、陽明大學腦科學研究所長郭博昭、中大系統生物 與生物資訊研究所長李弘謙、資工系蘇木春主任、化材系陳文逸教授等，為 難得國際學術盛會。

活動預告:

演講人 ：劉俊揚副研究員

國家衛生研究院
細胞及系統醫學研究所

主　題：Signal pathways in regulating mouse embryonic stem cell survival, differentiation and proliferation

時　間：　2012年04月18日，星期三，
12:30-1:30pm

地　點：　台大生科院3F會議廳

研究專長與學經歷:

http://www.nhri.org.tw/NHRI_WEB/nhriw1001Action.do?emp_cd=960514

活動預告:

演講人 ：鍾政和醫師

馬偕醫院內分泌暨新陳代謝科

主　題：

Adult pancreatic endocrine stem/ progenitor cells

時　間：　2012年04月30日，星期一，
12:30-1:30pm

地　點：　台大醫學院202教室

Education

- Sanford-Burnham Medical Research Institute, CA, U.S.A, Ph.D. 2007-2011
- Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan, M.D. 1993-2000

Clinical training

- Attending Physician, Endocrinology and Metabolism, Mackay Memorial Hospital, Taipei, Taiwan 2005-Present
- Chief Resident in Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Mackay Memorial Hospital, Taipei, Taiwan. 2003-2005
- Residency in Internal Medicine, Mackay Memorial Hospital, Taipei, Taiwan. 2000-2003
- Intern, Mackay Memorial Hospital, Taipei, Taiwan. 1999-2000

Research Interests

- Adult pancreatic stem/ progenitor cells.
- Pancreatic beta cell regeneration.
- Stem cell biology
- Diabetes
- Endocrinology.

活動預告:

第五屆東亞線蟲會議

5th East Asia *C. elegans* Meeting

- **時間**:2012.6.27~2012.6.30
- **地點**:**劍潭青年活動中心**
- **報名方式**:**線上報名**
- **會議與報名網址**:

http://eawm2012.lifescience.ntu.edu.tw/

第五屆東亞線蟲會議將於今年**6**月**27-30**日於台北劍潭青年活動中心舉行。我們很榮幸邀請到國際知名學者**Drs. Oliver Hobert(Columbia University)**、**Frank Slack(Yale University)**、**Karen Oegema(UC San Diego)**、**Ding Xue(University of Colorado)**來台灣參加第五屆東亞線蟲會議，會議內容涵蓋神經科學、神經發育與記憶、神經再塑性、神經發育與行為、基因調控與**RNA**干擾、細胞命運與分化、細胞週期與死亡、遺傳學與基因體學、系統生物學、老化與壓力。歡迎各位上網報名，報名網址**http://eawm2012.lifescience.ntu.edu.tw/**，感謝台大發育生物與再生醫學研究中心、台大系統生物學研究中心、台大生科院、細分學會和國科會等的經費支持。

- **聯絡人**:

台灣大學 分子與細胞生物學研究所
吳益群老師實驗室 助理 歐惠雯
Tel:(02)3366-2483
Fax:(02)3366-5248

追求眞實的筆尖-活動照片
格雷琴・凱・哈伯特的科學插畫展

2012年3月9日，記者會現場

陳俊宏教授 致詞

謝豐舟教授 致詞

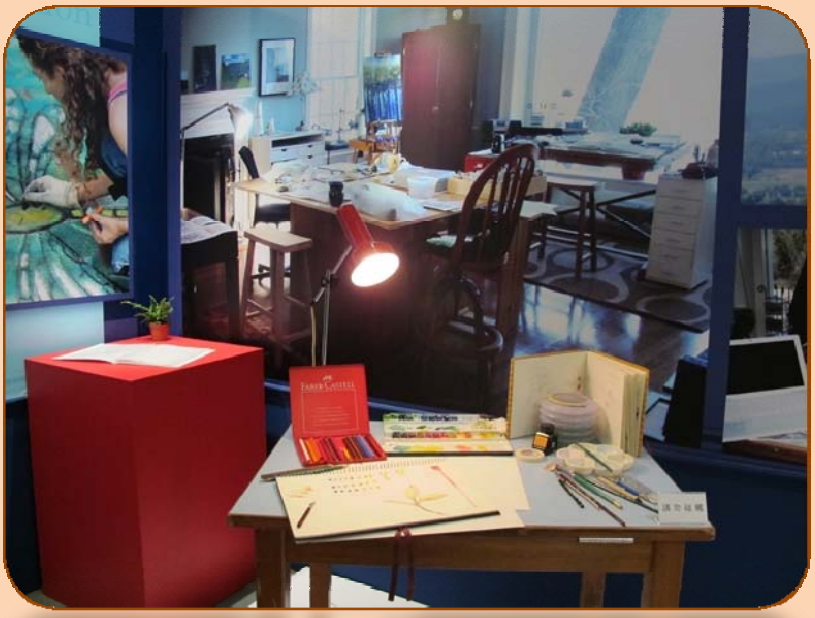
陳竹亭教授 致詞

插畫家(左)格雷琴、(中)翻譯、
(右)格雷琴先生

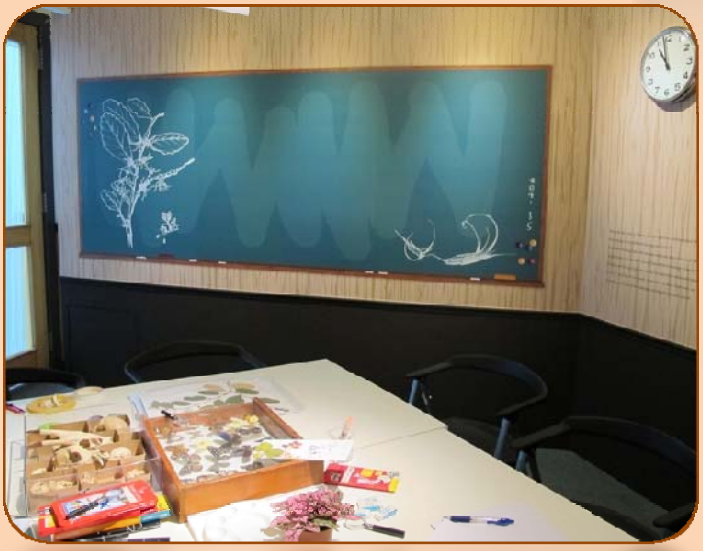
胡哲明老師

李嗣涔校長與格雷琴小姐
互送紀念品

校長與插畫家



科學插畫展的美麗角落



2012年3月9日 現場活動照片

林季珍醫師、謝豐舟教授、陳竹亭教授

敬重的學者認真討論

科學插畫到台大

謝豐舟 教授

去年的冬天似乎特別濕冷，好不容易熬到**1**月底，台大校園的茶花開始綻放，帶來了春天的第一個訊息。**2**月，山櫻耀眼的紅色三三兩兩地出現在校園的許多角落。三月，杜鵑花不負眾望地如期在台大校園燃燒起來，讓**3**月**10**日，**2012**年的台大杜鵑花節在**3**月**10**日如期開鑼。

2012年的台大杜鵑花節多出了一項前所未有的新節目**---**杜鵑花節的科學畫展。在台大十個單位的協力合作下，邀請美國插畫家**Gretchen Halpert**女士前來台大舉辦科學插畫工作坊，並在台灣大學總圖書館舉行她的科學插畫個展。

科學插畫是科學書籍、期刊、論文、教科書不可缺少的一部份，只是它一向不太被突顯，在台灣更是幾乎不存在的專業。在台灣許多學者不敢撰寫專書的原因就是因為沒有專人可以畫插圖。

我一向強醫學教學要注重素描**(sketch)**，在我給醫學生的二十封信中，有一篇**"**有了數位相機，還需要素描嗎**?"**。素描是訓練觀察最好的方法，因為素描是**-The most intensive visual observation(**最仔細的視察觀察**)**。要畫下一個物體，你一定要先弄清楚它的形狀、比例、材質，明暗才能動筆。數位相機雖然可以瞬間捉取物體的影像，但你對物體的細節卻是「有看沒有到」。你要把一個物體畫下來之前，一定要做仔細的觀察，例如你看了一朵杜鵑花，覺得很漂亮但你可知道它有幾個花瓣，花瓣與花瓣之間又是什麼關係？你雖然看過不知多少次杜鵑花，但是你大概回答不了這些問題，不過如果你得把它畫下來，你就必須算算它有幾個花瓣（五個）？花瓣之間的關係如何？你還會看到只有一個花瓣才有粉紅色的斑點，然後你也會注意到有一支特別長的雄蕊旁邊圍著許多短的蕊。

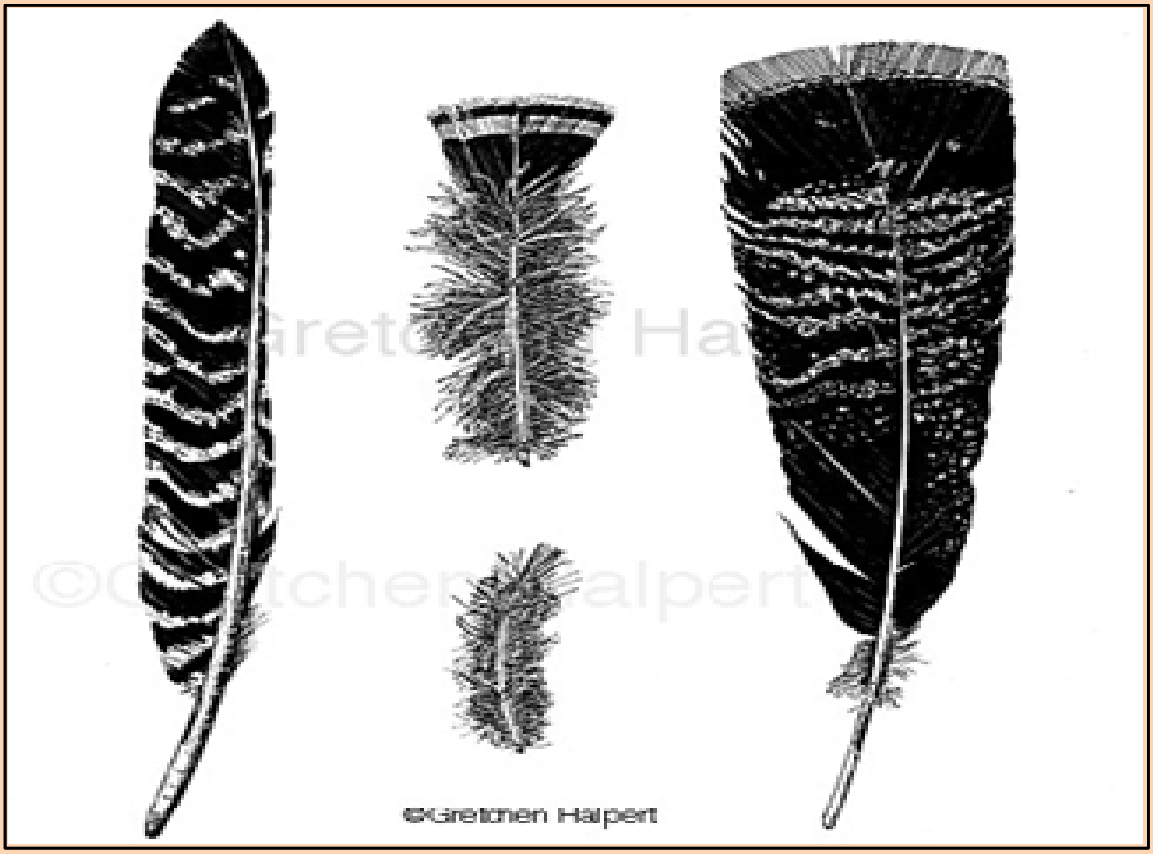
明朝的李時珍周遊各地，搜尋並記錄各種自然物，**1578**年寫成了本草綱目一書。全書收錄植物藥有**881**種，附錄**61**種，共**942**種，再加上具名未用植物**153**種，共計**1095**種。李時珍把植物分為草部、谷部、菜部、果部、木部五部，又把草部分為山草、芳草、溼草、毒草、蔓草、水草、石草、苔草、雜草等九類。

1700年出生的林內同樣地觀察自然。他將所有的植物依其雄蕊、雌蕊的數目及形狀分成**24**類，再利用他所創的二名法(種名+學名)加以命名，開啟了生物學與分類學的大門，達爾文的曠世鉅作"物種源起"一書，唯一的插圖就是林內的生命樹。反觀李時珍對植物物種的描述，僅有粗略的型狀與用途，而每種植物的名稱竟然有幾十種，所謂「名不正，則言不順」，李時珍的心血不能像林內的工作變成科學上重要的突破，其差別就在觀察的仔細與粗略以及由觀察衍生的歸納與詮釋了。

Gretchen大學主修植物，其後在生物醫學研究室工作了二十五年，她本身也是個畫家，結合了這二項背景，她致力於科學插畫的創作與推廣。這次台灣首見的台灣大學杜鵑花節插畫除了展出她的創作之外，台大圖書館也從館藏找出與科學插畫相關的不少典藏，要不是有這次的科學插畫活動，這些珍貴的館藏不知何時能見天日，展場中央布置成花圃，為展覽帶來田園氣氛。李嗣涔校長親自主持開幕典禮，他強調這個科學插畫展的舉辦顯示台大已經從單純的學術研究與教學進入另一個更高的層次，就是「知識與藝術」的結合。

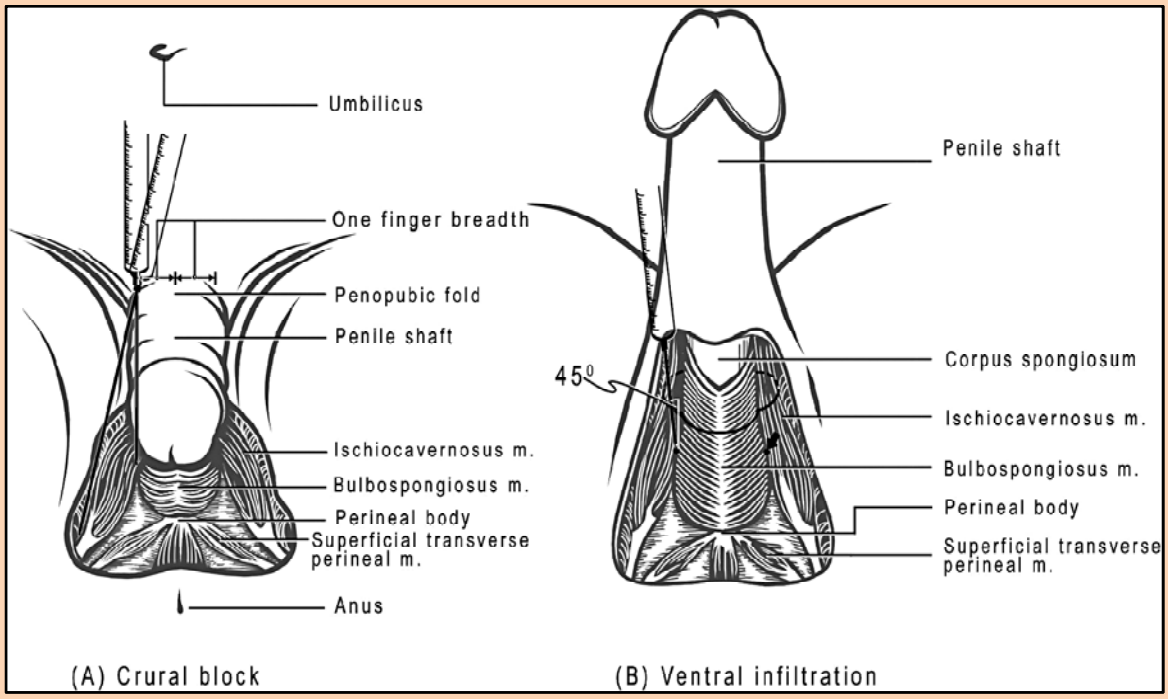
Gretchen除了在台灣大學的教學與展覽活動之外，**3**月**14, 15**日全日在醫學院訪問，演講與示範。這是台大醫學院有史以來第一次正式的科學插畫活動。她訪問解剖學科與寄生蟲學科，示範基本的繪圖技巧；訪問胸腔科病房指導胸部 x 光**sketch**；到安寧病房參觀安寧病患之藝術治療，這些行程完全由台大醫學系系學會劉政亨同學與綠野社社員安排。三月十四日晚上六點半，**Gretchen**於醫學院**103**講堂舉行一場公開演講，介紹「什麼是科學插畫**?**」她強調**realistic, accuracy**是科學插畫**(scientific illustration,** 簡稱**SI)**的最高原則，而且在做每一幅作品之前，要先做徹底的**research**。她做一幅作品的時間，大概有三分之二是花在做**research**上。令人意外的是**103**講堂幾乎全滿，可見對科學插畫有興趣的人還真不少。

三月十五日晚上在醫學院聯合教學館三樓學生活動中心會議室，舉辦了一場示範教學，共有二十二位同學參加。**Gretchen**示範了刮擦板技法**(scratch board)**。刮擦板是在紙板上覆蓋一層白色薄黏土**(clay)**，以墨水畫出圖形，再用刮筆將附有墨水的陶土刮去，顯露出其下的白紙板，在黑底上顯示白色細紋或點。此法最適合畫細緻的圖形，如羽毛、貝殼表面。這次示範教學使用的白色刮擦板均為**Gretchen**在美國購買寄來，因為台灣買不到此種畫材。同學們都是初次體驗此種技法，莫不為此一技法所能達到的細緻程度嘖嘖稱奇。特別感謝醫學院贊助經費才能促成台大醫學院有史以來第一次科插圖**workshop**。



使用刮擦板技法(**scratch board**)所繪的野火雞羽毛

學員中有位郭映君女士，她在醫學插圖已有相當的實務經驗，但都是自己摸索，此次示範教學令她獲益良多。台大校園中有幾位同仁已有相當的生態繪畫基礎，此次**Gretchen**來台，他們都積極參與。我們希望這幾位同仁能成為台大科學插畫的種子教師，在校園中教導更多的人加入科學插畫的行列並進而推廣到全台灣。



郭映君女士醫學插圖作品

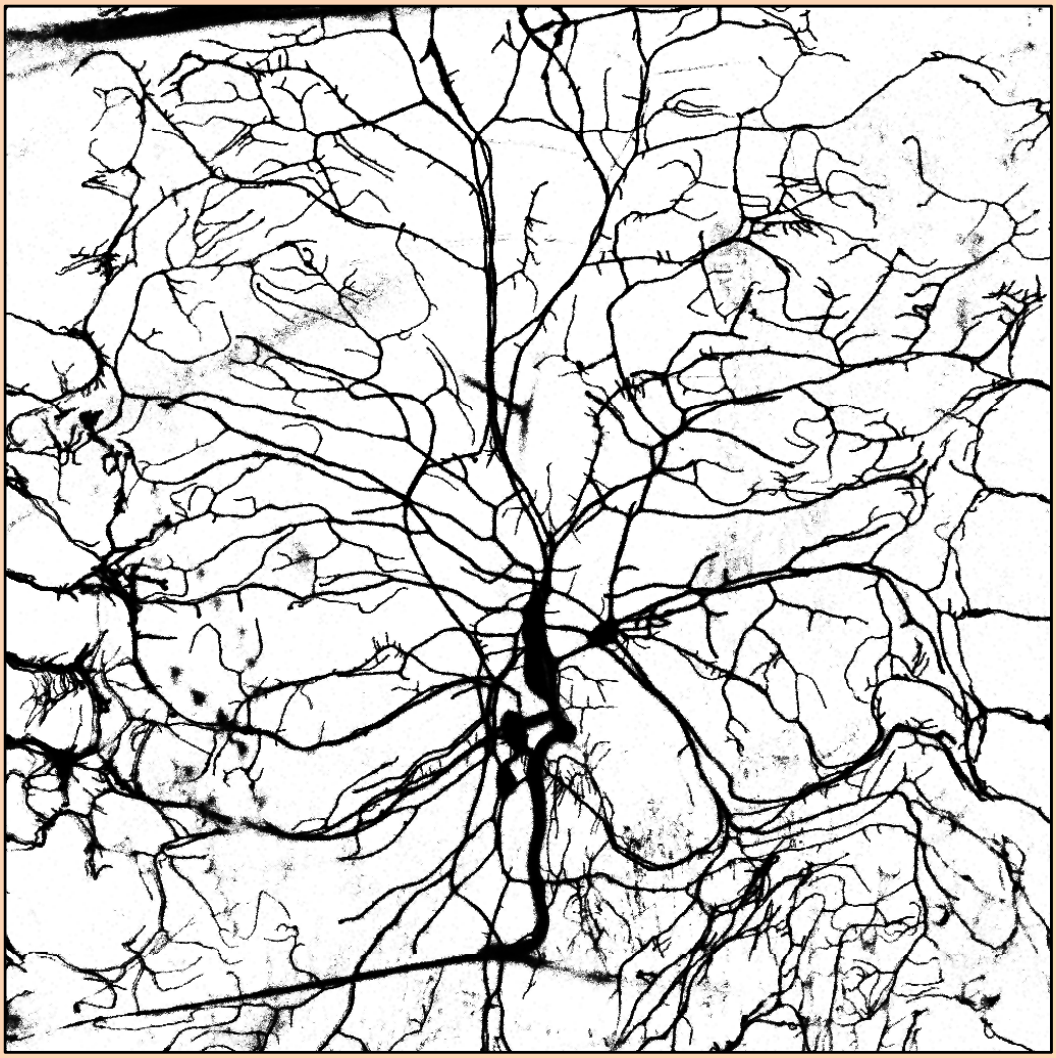
Neuronal dendrites and synapses: the make and the use of them

簡正鼎研究員
中研院分子生物研究所

為了感應環境的刺激與變化，表皮高密度的感覺樹突能將外部訊號轉換為神經細胞的活動。複雜的樹突分枝可來自少數的感覺神經元，例如果蠅幼蟲表皮各體節下大量的樹突分佈，僅來自15個樹枝狀樹突神經元。樹枝狀樹突神經元在感受域所形成的樹突有各種形狀，且往往是神經細胞體數百倍大。也因此，在發育過程中，遠離細胞體的樹突會有許多分支及生長現象。

遠端樹突極性生長過程極類似如酵母出芽、細胞遷移、花粉管端點生長及軸突延伸，極性生長需如內噬作用參與，而其中一個機制即為藉由**Clathrin**蛋白與**AP2**受器的磷酸化作用，進而將分子內化進入細胞。我們研究發現，在樹突發育過程中，**Serine/threonine**激脢**Nak**如被**RNA**干擾或缺失突變，樹突的分枝數量會減少且變短，這種缺陷在遠端高階樹突則更明顯，顯示**Nak**的激脢活性會促進樹突的形成。由中研院基因體醫學國家型科技計畫所提供的蛋白分析資料顯示，**Nak**可與**AP2**分子相互作用。在花環狀細胞中，**Nak**蛋白與內噬作用分子會共同表現在胞內相近位置且**nak**的活性與內噬作用有關。內噬機制的突變缺陷類似於**nak-RNAi**幼蟲的樹突，遺傳實驗指出**nak**會藉由內噬作用影響樹突分枝及延長的過程。

我們亦發現**clathrin**會與**Nak**共同表現於樹突內一些位點，且**clathrin**於樹突的位置分布受**nak**控制。樹突中的**Nak**及內噬作用位點與鄰近的樹突生長有關。內噬訊號受器可調控樹突生長。我們認為，細胞附著分子**Nrg**需經由連續循環機制被送到樹突遠端。若缺少**Nak**，**Nrg**則無法到達遠端樹突。過度表現**Nrg**則會造成樹突生長缺陷。但若同時過度表現**Nak**則以造成更多的內噬作用則能解開被黏著的樹突，甚至讓神經細胞長出更多的樹突。我們的研究提供一個對於樹突形態成形的重要觀點，未來的研究將著重於**Nrg**如何調控樹突形態及局部的內噬作用如何促進樹突生長。



The sensory tree of Drosophila dendritic arborization neuron

Nak regulates localization of clathrin sites in higher-order dendrites to promote local dendrite growth. . 72(2) 285-299.

2012年3月19日
簡正鼎教授 於台大醫學院演講

與果蠅大師一席談

謝豐舟 教授

2012年**3**月**19**日，果蠅大師簡正鼎博士蒞臨本中心演講，演講之後在點水樓小聚一番。

席間提及三十年來，我一直覺得有兩個非常重要的基因必然存在，希望簡大師能以他深厚的果蠅研究功力去尋找出來，相信會對人類作出重大貢獻，因為這兩個基因是影響人類行為的**Master gene**。

我對果蠅基因有深厚的興趣，但只有粗淺的認識。我知道果蠅基因的命名原則是：掌管什麼**phenotype**的基因，就以沒有什麼命名，例如**:**掌管**eye**生成的**master gene**就叫**eyeless gene**，而掌管翅膀生成的就叫**Wingless gene**。

我希望簡大師尋找的第一個基因叫**Shameless gene**。依果蠅命名原則，此基因應是讓生物會有羞恥心的基因，沒有了這個基因就是"禮義廉"。人是**social animal** ，要維持社會的秩序，人應該有羞恥心，許多偷雞摸狗的行為，因為人有羞恥心，怕被人恥笑，因此不敢去作，社會秩序因此得以維持。這就是所謂**mentalizing**，也就是思考自己在別人心目中的形象，也就是**reputation**。目前已知這是**medical prefrotalcortex**的**anterior region**的功能。

然而，有的人卻是臉皮超厚，明明是黑的卻要說是白的，還臉不紅氣不喘。在大學裡高聲提倡社會正義，批判精神，當了政務官卻是藐視人權，劫貧濟富。

我深信所有的**phenotype**必有其**geneticcomponent**，再加上環境的影響。看到這些「禮義廉」兼具人士的行為，我相信必然與某個基因有關。依照果蠅基因命名原則，此一基因可以命名為**Shameless gene**。不過我相信這個基因不會有全有或全無，應該有**copy number variation**，因為人完全沒有**shameless gene**是活不下去的，假若此基因全無功能，則必然會為一點點不道德，經不起別人的指責，立刻切腹自殺，這樣的人在天擇的原則下是不會存在的。因此，這個**shameless gene** 的**phenotype** 應與其**copy number**有關。前述**"**禮義廉**"**人士的**copy number**可能高達數千，一般人則只有二個**copy number**。

若能找到這個基因，進而找到其**inhibitor**，則社會上位高權重的人，可以在其擔任公職之前檢驗其**copy number**，公諸於世以供選民參考，必要時甚至可以給予**inhibitor**使其不致作出禍國殃民之事。

簡大師問我這種**shameless gene** 的**phenotype**在果蠅是什麼樣子**?**我提出一個粗淺的建議，我們可以從果蠅**mounting**的行為下手，例如別人不給他**mounting**，卻強要**mounting**，可能就是**shameless gene**在作怪。以此作為標準去作**genetic analysis**或許可以找到這個基因當。然事情不會如此單純，但是這就是簡大師深厚研究功力可以大大發揮的地方。

另一個基因則是**trade gene** 。我觀察到世界上愈有**trade**能力的人越有生存優勢。君不見，目前社會上誰有錢，誰就是對的一方，而有錢人的錢絕大部分是作生意來的，越會作生意越有錢，我推想他們的**trade gene**表現就越強。

有人說世界上最會作生意的就是中國人跟猶太人。真正會作生意的人不在價廉物美，童叟無欺，而是自己有東西，就拿自己的東西去賣，自己沒有東西，就拿別人的東西去賣，沒有真的東西就拿別人的東西去賣。不過果蠅沒有商業行為，用什麼**phenotype**來找這個基因，就有勞簡大師多費心了。

今天的世界問題多多，其原因在於人類的過於貪婪，雖然貪婪是生物的本性，但人類因為有個超級大腦，所以人類的貪是無止境的。貪婪必然要經由**shameless gene**與**trade gene**來表現，此一**pathway**若能被揭露並找到解放之道，或許**Hawkin**所說的：「人類已無藥可救，唯一的出路就是移民其它星球」不會成真。是以本中心**3**月**19**日之會，開啟了**shameless gene**與**trade gene**的研究，具有重大歷史意義，謹此為記，為人類歷史留下紀錄。

2012年3月19日 點水樓

Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*

台大醫院皮膚部 洪楨邦 醫師
台大醫學院分子醫學研究所吳君泰 老師

Development. 2007 Oct;134(20):3571-84

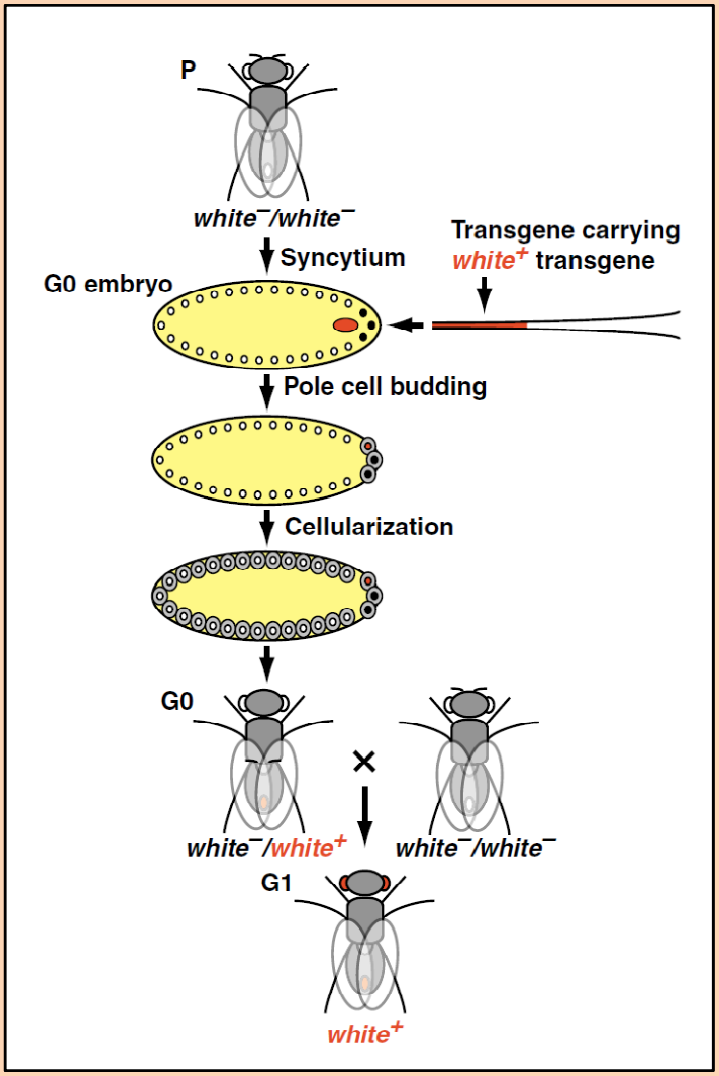
參考文獻:

Koen J.T. Venken and Hugo J. Bellen (2007) Transgenesis upgrades for Drosophila melanogaster. *Development*134(20): 3571-84.

果蠅(***Drosophila melanogaster***)是對發育、基因、細胞生物學、神經科學與疾病研究非常有吸引力的模式生物。以往是以**transposon-mediated integration of DNA**為主要的操作方式，最近幾年則發展了**transgenic techniques**使**DNA integrated**至特定的**DNA**位置，而這個進展則可加速**structure-function analyses of genes.**

傳統Drosophila transgenesis

由於果蠅的G0代(parental generation, P)embryo在發育早期(小於1小時)，會nuclear division without cell division，所以打入的transgene就有機會進到pole cell → germ cell，所以只要再與另一隻果蠅交配就可以生下帶有transgene的G1代. 右圖以帶有eye color(眼色) marker (white^{+})的transgene為例，由原本white$^{(-)}$ mutant白眼色的父代果蠅的background之下，從G1代挑出有深眼色的果蠅，即為transgene成功的例子.



Transposon-mediated transgenesis之應用與限制

主要在果蠅的運用有二:

Gene disruption methods: transposon insertion into gene時，干擾此gene的功能。

Transgenic technology: 有數種不同的應用，transposon-mediated phenotypic rescue of a mutation是做rescue實驗時的convincing evidence。然而，傳統的high-copy-number plasmids(包含*P*-element containing plasmids，最大只能帶20~25kb DNA)，雖然後來有改良將*P* element放到cosmid backbone(可帶40~50kb DNA)，但是要拿到integrated 30-50kb *P* element-based cosmid並不容易。因此，現在的transgenic cDNA rescue實驗，仍然是基於*GAL4/UAS* system.

➡ **GAL4是yeast transcriptional activator, 它的high-affinity binding site是UAS(upstream activating system). 當需要ectopically表現一個gene時，可以選tissue specific GAL4 drosophila line去 cross to an effector line(帶有UAS fused to a gene of interest)，所以只要果蠅子代帶有GAL4與UAS，就可以specifically表現這個gene.**

Position effects

Transposon-mediated transgenesis除了上述的限制，***P* element-mediated transgenesis**還有一個很大的缺點，那就是***P* element**傾向去插入基因的**5' regulatory region.** 所以用有兩個不討喜的結果**: 1. Insertion**會造成某個基因的破壞 **2.** 由於任意插入**genome**的關係，會隨著插入點而有無法預測的**position effects:** 指**local chromosomal environment**造成**transgene**的表現量，或是表現**pattern**改變，這通常與**local chromatin configuration**或**nearby cis-acting regulatory element**有關。

要解決**position effects**也有方法，例如加入**insulator sequences, FLP recombinase-mediated transgene remobilization, *P* element replacement**，或是作費時的**gene targeting.**

這篇**review**的文章提出了一個比較有效率的方法，那就是作**site-specific transgenesis**，也就是用特殊的方法將**transgene**插入同一個**docking site**，而這個**docking site**可以是挑過的，最沒有**position effect**。以下會特別介紹實際的方法。

另外，若要做完整基因的**transgene**，就需將大的**DNA**片段帶到**transposon plasmid**去，但**transposon**要帶大的**DNA**片段並不容易，而且要在這大片段**DNA**上作**manipulation**也不十分容易，因此這篇**review**在後面也有提及**Recombineering by BAC transgenesis.**

Part I

Site-specific transgenesis for *Drosophila*

為了解決**position effect**，上述所使用的方法非常費時費力，因此，需要發展更有效的方法，適用於所有的**transgenesis model**，於是**site-specific transgenesis**即被發展出來。

現在比較常用的**site-specific transgenesis**方法有三種:

ΦC31integrase-mediated transgenesis

Cre- and FLP-mediated RMCE (recombinase-mediated cassette exchange)

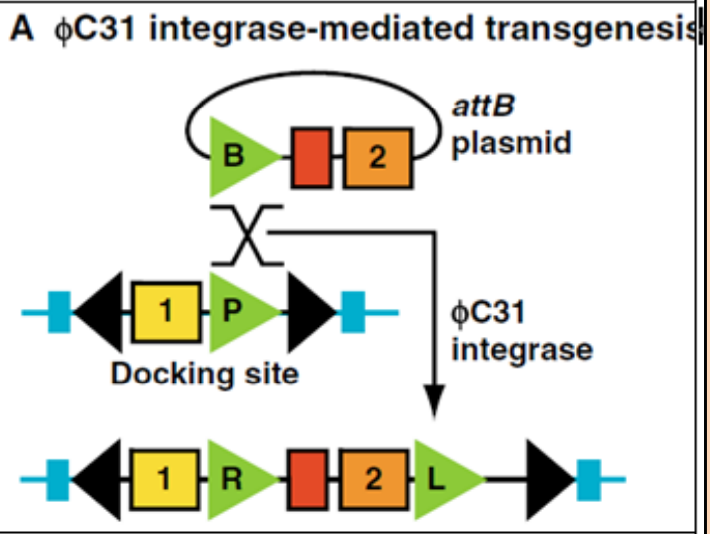
Φ31 integrase-mediated RMCE

以下依次序介紹:

I. ΦC31integrase-mediated transgenesis

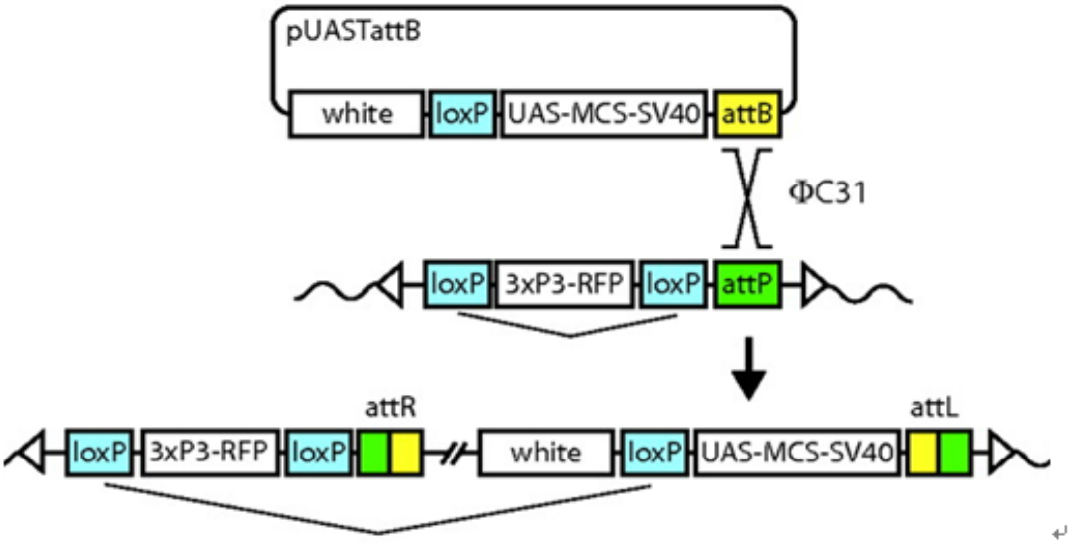
Bacteriophage 的 ΦC31integrase 可以使大片段的 DNA 插入到 donor genome 中特定的 docking site。方法是藉用催化 phage attachment site (*att*P)與 bacterial attachment site (*att*B)之間的 recombination.

(右圖係用單一個 *att*P 與 *att*B 之間的 recombination，所以 donor plasmid 的 DNA 整個都會被放到 docking site)

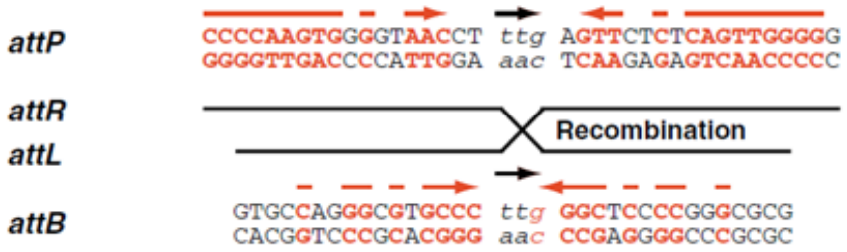


Concept:

見下圖，由於 *att*P 與 *att*B 內部的 recombination，造成(1) donor gene(帶 white marker)會插入 *att*P 所在的特定位置。(2) *att*P 與 *att*B 在 recombination 之後就不完整，變成 *att*L 與 *att*R，如此一來 ΦC31integrase 就認不得，因此，此反應為 irreversible.

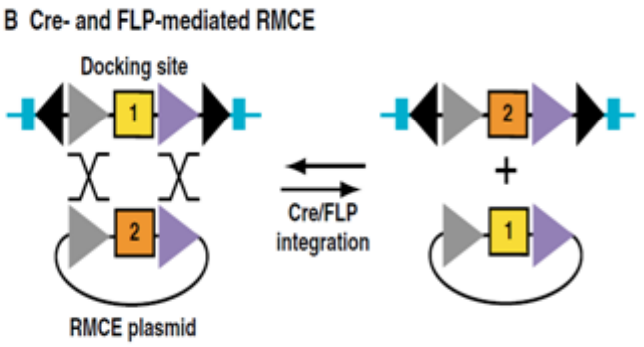


下圖為 *att*P 與 *att*B 作 recombination 的示意圖，完成後變 *att*L 與 *att*R



II. Cre- and FLP-mediated RMCE(recombinase-mediated cassette exchange)

藉由兩組 loxP 或 FRT 之間引發的 recombination，將 flanked gene 插入特定位置，再用 maker 1/2 篩選出來插入的 clone.



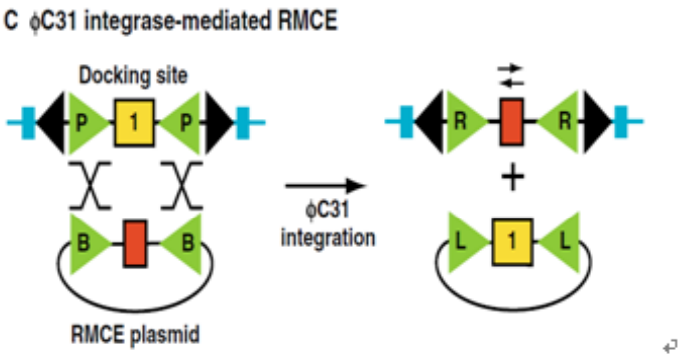
Concept:

同上圖三角型圖示，由於 recombination 中，兩個 vector 上都各帶有一組 loxP (or FRT) flanking cassette 時，可能會造成兩個 cassette 的 exchange (double-reciprocal cross-over)，或者是將自己的 cassette 剪掉，一般而言，後者較容易發生。因但如果我們在 flanking 兩端放的是 heterotypic direct-oriented recombination sites (RS)，例如 'RS1'是 *loxP*(灰)，'RS2' 是 *lox2272* (紫).因為這特別的 RS spacer variants 如 *lox2272*，會傾向於 cassette 之間的 double-reciprocal cross-over 而非 cassette deletion.

另外，由於 RS1, RS2 一直存在，因此這個 cassette exchange 是雙向性的。

III. ΦC31 integrase-mediated RMCE

綜合上述兩種方法的優點，以 ΦC31integrase 將 transgene 用 *attP* 與 *attB* flank 起來，即可將 cassette gene 置換入 docking sites.



Concept:

上圖係用兩個 *attP* 與 *attB* 之間的 recombination，所以只有 flanked cassette 會被置換到 docking site 中，不會有 cassette deletion 的問題。由於是 ΦC31 integrase，所以反應為 irreversible，但置換入的 cassette 有兩種可能的方向(箭頭)

Part II

Recombineering: BAC transgenesis for *Drosophila*

Transposon承載**Cargo**的能力不十分地好(雖然也有學者可以在**transposon**中放入**100kb**的片段)，因此限制了可以移動/插入的**DNA size.** 因此在果蠅作大片段**DNA integration**需要特別的考量**:**

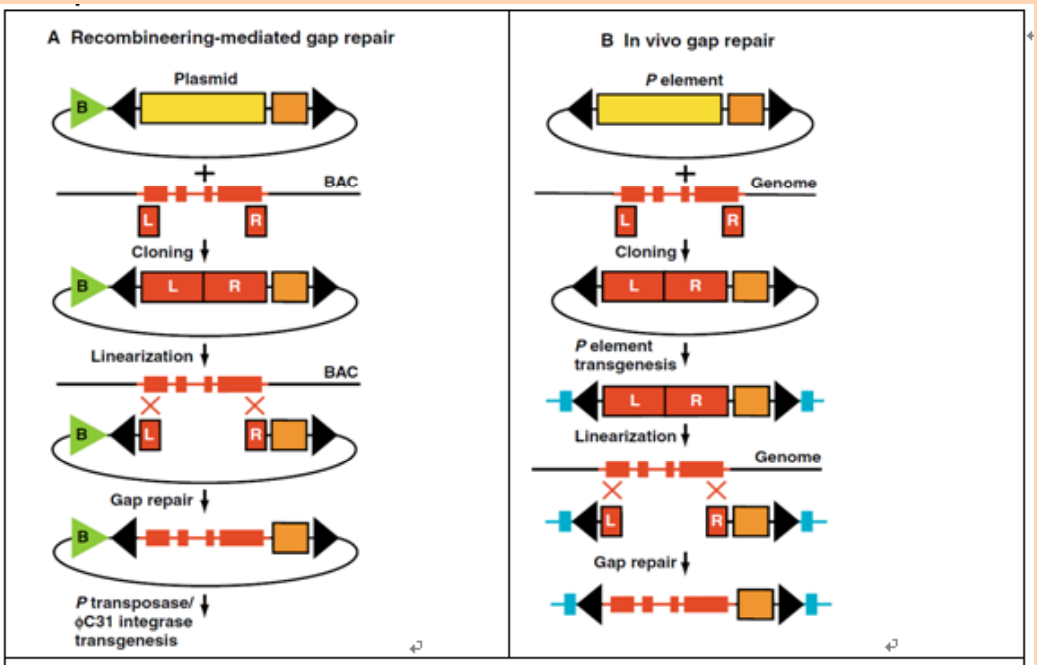
Transgene之**size limitation**，可藉由**site-specific integration system**來達成(例如**ΦC31integrase)**，然而，果蠅並不像**mouse**有**ESC (embryonic stem cell) culture system**，因此沒辦法有效率地在**germline**作**site-specific integration**。**Mouse**的系統中，因為有**ESC culture**，故可以在**ESC**中作**gene targeting**，篩選成功的**clone**，再打**blastocyst**即有機會產生**chimera**，但果蠅沒有類似的**ESC culture**，只能在**G0 embryo**操作，後代也需要每一隻果蠅都去檢查是否有帶**transgene**，因此果蠅需要一個高效率的**targeting system**，否則要挑出**positive**的子代會非常耗時耗力。

通常最大承載大小**(upper size limit of the insert)**與**plasmid copy number**呈反比，也就是可以承載較大片段**DNA**的**plasmid,** 例如**bacterial artificial chromosomes (BACs)**，只會有比較低的**copy number**，而且不幸的是，這些**plasmid**容易干擾**cloning** 與**microinjection procedures**，所以需要高量的**DNA**濃度來進行。但這點現在亦可藉由**specialized plasmid backbone**來改善(即**: conditionally amplifiable BAC**含有兩個**origins of replication,** 以增加複製的效率**)**。

在果蠅的系統中，現在已經由以下三者的結合，形成一個有效率的**recombineering platform: 1. Recombineering: recombination-mediated genetic engineering. 2. The ability to amplify plasmid copy number at will. 3. ΦC31 integrase-mediated transgenesis**。

承上的第1點，用gap repair來達成recombineering，而gap repair方法的好處是，可以從amplifiable BAC backbone中，獲得大片段的gene(即在low-copy number BAC中，利用gap repair的方式夠效率地進行recombineering，再將gene fragment帶入high-copy and medium-copy number plasmid)。若選的是High and medium-copy plasmid，最大可承載30 (high)~80(medium) kb的DNA；若是maintaining the plasmids at low copy number，最大到102kb仍可有效率地經gap-repair接到plasmid上.

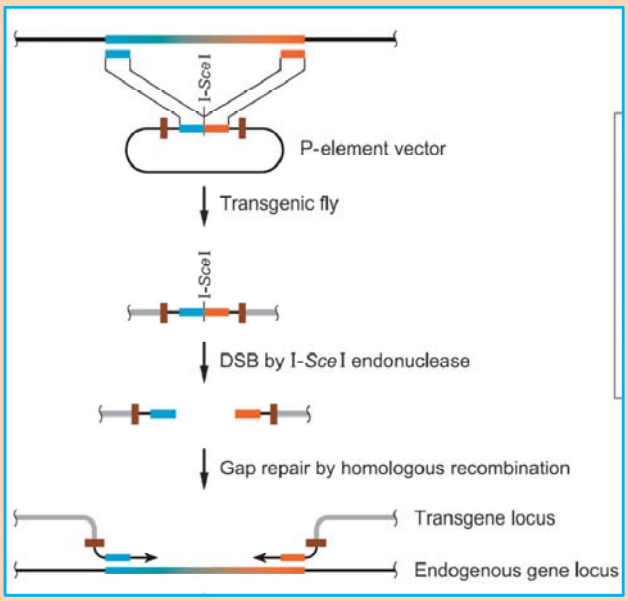
見下頁圖，在一般的bacteria中進行recombineering，設計*P* element transposon帶有homologous arm: L與R接在一起，cloning時將L與R中間切開，即可以利transposon上的L與R的homologous recombination來將BAC gene置換入plasmid中(BAC中同時有這兩段序列，但分別在5'及3'端，因此原本的transposon的L與R需切開才能做recombination)。



Concept:

Gap repair 只是將前述的 RMCE(recombination-mediated cassette exchange)的方法套用，差別在於帶有 transposon 的 plasmid 上，會經由 meganuclease (認 18bp recognition site 的 endonuclease，所以不會亂切到其他的部分)，將設計好的 L 與 R 兩個 homologous 切開(gap 產生)，就可以去認 BAC 上或 Host cell genome 上的大段 DNA 片段的 5' and 3' ends，homologous recombination 之後，就可以將此大段的 DNA 接到 gap 處，即 gap repair.

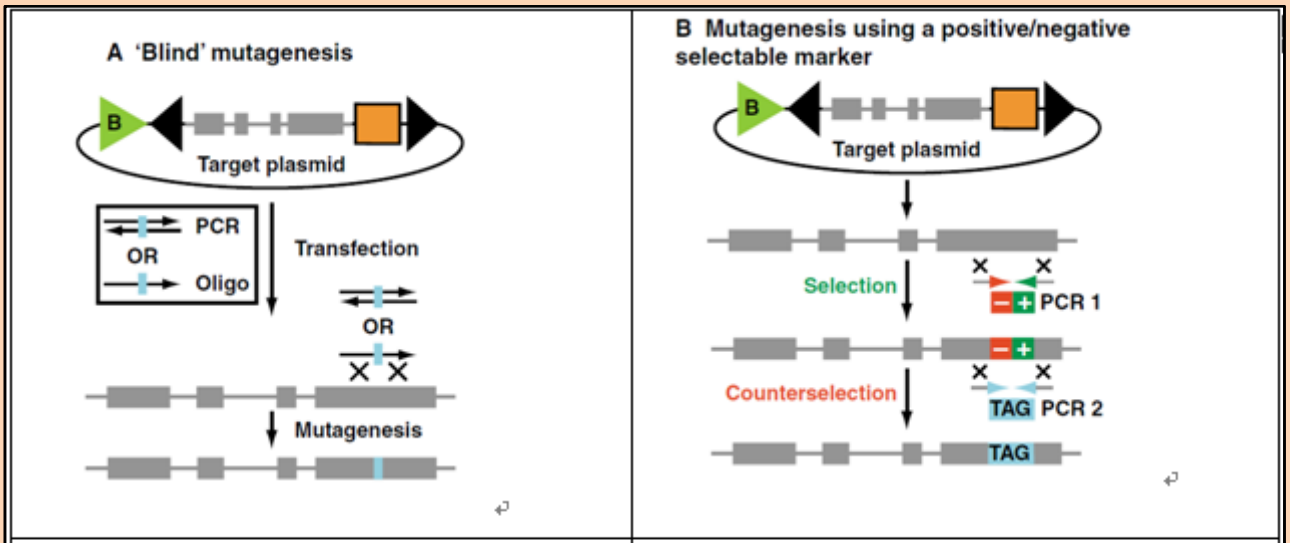
見下圖，**in vivo gap repair**與上述圖**A**很像，只是將**BAC**換成**fly genome**，先將**homologous arm clone**入***P* element**，作出**transgenic fly**，再藉由**endogenous fly enzyme (cross**帶有**I-*Sce*I**的**strain)**將兩個**arm(**藍橘**)**切開後，將**cell genome**中的大**DNA**片段，經由**homologous recombineering**的方式帶入***P* element transposon:**



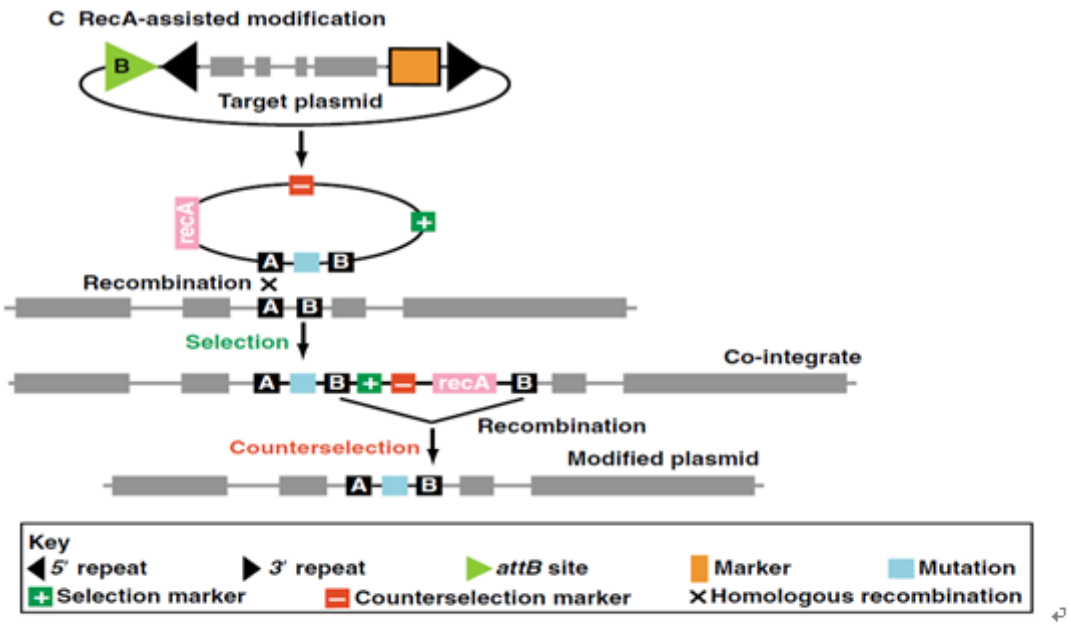
Reference:
In vivo construction of transgenes in Drosophila.
Genetics **175**,2019-2028.

由於對大片段**DNA**而言，**restriction enzyme**與**DNA ligase**並不容易操作，越大的**plasmid size**會造成**unique cutting sites**數目的減少，因此還是作**recombineering**比較容易。這一點對**mouse genetic engineering**很重要，因為**mouse genes**與人一樣，有很多**multiple distant regulatory regions**，**size**太大，所以很難用**high-copy plasmid backbones**來處理，因此需採用**BAC modification by recombineering**的方法來操作。

最後這一個部分來介紹如何作**recombineering-mediated mutagenesis** (下圖): 發展**recombineering**技術還有一個很大的用處，那就是做出含**mutation**的**gene**片段，由上一段可以知道，大**size DNA**的操作不容易用**restriction enzyme**與**ligation**來達成，因此，若要在大片段的**DNA**(或是基因)上製造**mutagenesis**，最好還是用**recombineering**的方法，將設計好的**mutation template**，以**homologous recombination**的方法置換入**target DNA**中，以下介紹三種在果蠅常用的**recombinering mutagenesis.**



簡單將 mutation 帶入 target plasmid 的方法:利用帶有 mutation 的 PCR fragment 或 oligonucleotide，與 plasmid 上的 homologous arm 作 recombination，再去 screen 那些 bacteria clone 帶有這一 mutation.	**利用 positive&negative selection 來帶入 target DNA:** 與 A 圖類似，但先經由 recombineering 帶入 positive&negative selection marker(+ -)，藉 positive selection 篩選出成功 target 入 marker 的 clone; 接著再做 target DNA(這邊是 TAG)的 recombineering，理論上，有成功 target TAG 的 clone，由於去除了 negative selection marker，所以在 negative selection(即上圖的 counterselection)時會存活下來，即可達到有效率的篩選.



Rec-A assisted modification: 概念承上，但 counterselection 的部分，是藉由帶入一個 B arm，與原來的 B arm 會在 recAgene 的產物(RecA protein)作用之下，將兩個 B arm 中間的部分切除掉，於是失去 negative selection maker，在 counterselection 時存活下來

總結:

這一篇**review article**最重要的是告訴我們如何在果蠅的系統中，由於沒有**mouse**的**ESC culture**，因此做**targeting**最有效率的方法仍是以**transposon system**做**transgenesis**，但是**transgenesis**會遇到兩個很大的問題，第一是**position effect**，第二則是**transposon**能攜帶的**cargo size**有限，這篇文章最大的重點就是在解決這兩個問題: 關於**position effect**的問題，可以用**ΦC31 integrase-mediated transgenesis**，固定選擇一個最小**position effect**的**docking site**，來將**position effect**給中和掉。至於**carrier cargo size**的問題，則是用**recombineering-mediated genetic engineering**來操作大片段的基因，同時利用**medium/low-copy number plasmid**來增加可攜帶的**DNA cargo size**。