

# 臺灣二〇〇六年國際科學展覽會

科 別：動物學

作 品 名 稱：斑馬魚 SULT2 ST2 在早期胚胎發育的 RNA 表現

得 獎 獎 項：佳作

學校 / 作者：臺北市立第一女子高級中學 呂璟昕  
臺北市立第一女子高級中學 林敬于

## 作者簡介



### 作者簡介：

我是呂璟昕，今年17歲，興趣除了運動以及電腦外，就是閱讀以及生物了。從以前我就覺得生物很有趣，也是我較出色的科目之一，雖然我還未完全確定將來的志向，但我肯定多多少少與生物有關，因此希望能在高中階段多接觸這方面的領域、多吸收相關的知識，奠定良好的基礎。從這次的科展中，我學到了很多，雖然有些辛苦，但跟夥伴都頗為樂在其中的，真的很謝謝胡老師與鍾老師的指導，以及實驗室學長姊的幫忙，我想，他們已經使我更愛生物了！



作者簡介：

我是林敬于，平常喜歡聽音樂和閱讀。國中時參加科展研究的經驗，讓我開始對生物感興趣，因為生物是最接近自己的生活也最充滿生命力的科目，學習起來充滿無限可能，所以我也期許自己能多接觸生物的領域，從中多方面的學習。很高興能有這次的機會做科展，一路上雖然辛苦，但也感受到為科學執著的人的熱情，謝謝我的夥伴，和所有幫助、教導我們的師長。

## 摘要

在哺乳動物裡，硫酸化是一種參與外來物解毒作用、內生組織的荷爾蒙調節、藥物代謝及膽汁解毒之重要路徑。其中，SULT2(hydroxysteroid sulfotransferase)是能進行上述反應的酵素之一。為了對SULT2的功能與早期發育所扮演的角色作進一步的研究，在本實驗中，我們以斑馬魚為模式動物，希望藉由原位雜交法(in situ hybridization)找到SULT2在斑馬魚早期胚胎發育的RNA表現位置。由目前的實驗結果，發現從卵巢到1-cell、dome、50%- epiboly、12小時，都可在胚胎細胞看到訊號表現，在24小時、36小時、48小時、72小時則可在脊椎兩側體節的肌肉、內胚層、嗅窩、頭部看到訊號表現，此外，在成腦的原位雜交染色結果中亦看到了訊號表現。由此可推論SULT2在斑馬魚早期發育確實扮演了重要的角色。

## Abstract

Sulphonation is an important pathway for detoxification of xenobiotics, bile acids, drug metabolism, and the regulation of endogenous hormones. SULT2 (hydroxysteroid sulfotransferase) is one of the enzymes which catalyse sulphonation. Zebrafish has emerged as a popular animal model in recent years. Compared with other vertebrates, it provides advantages including ease to get embryos, rapid external development, virtually transparent embryos and ease of genetic manipulation. The above-mentioned strong points made zebrafish a good model animal for us to understand the function of SULT2 during early embryonic development. We performed in situ hybridization to find out the RNA expression of SULT2 during zebrafish early development. According to our present results, we can detect expression signal on the edge of telencephalon and tectum opticum, the edge on the dorsal zone of corpus cerebelli and ventral zone of periventricular hypothalamus of the adult brain. Besides, we can observe signal evenly distributed in blastocytes of the embryo at 1-cell, dome, 50%-epiboly and 12 hours after fertilization. We also find signal on the muscle next to the spinal cord during the stages of 24, 36, 48 and 72hrs. There are also expressions on hypoblast of embryos at 24, 36 and 72hrs, the olfactory pit at 36 and 48hrs, and strong expression in head region at 48 and 72hrs. These results suggest that SULT2 may have some function at the early development of zebrafish.

## 壹、研究動機

在哺乳動物裡，硫酸化是參與外來物的解毒作用以及類固醇荷爾蒙、甲狀腺素等內生性複合物的生化轉譯過程的重要路徑(Her et al., 1998)。Cytosolic sulfotransferases(STs)是進行硫酸化反應的一類酵素，不同的物質經ST硫酸化之後可能會被活化或抑制它的生化作用，此外被硫酸化的物質其溶解度也可能會增加，更易隨水排出體外，這種反應對排毒有很大的幫助(Sugahara et al., 2003b)。

其中，hydroxysteroid sulfotransferases (SULT2)在藥物代謝、膽汁解毒和內生組織的荷爾蒙調節作用中扮演了關鍵性的角色(Runge-Morris et al., 1999)，因此了解SULT2的機制作用是非常重要的。

在哺乳動物有關SULT2的研究中，以對SULT2A1與SULT2B1在老鼠身上的表現研究有較顯著的結果。兩者最大的不同在SULTB1較偏向與膽固醇的反應有關，且在老鼠早期胚胎發育中開始表現的時期較SULT2A1早。目前已知SULT2A1會在老鼠的肝臟有極為明顯的表現。SULT2B1又分為SULT2B1a與SULT2B1b，而SULT2B1a在腦與脊椎神經的位置表現較清楚，SULT2B1b則是在皮膚的部分表現較多。因此推斷，SULT2A1與膽汁的硫酸化作用有關，SULT2B1a與老鼠中樞神經系統所需的神經類固醇其硫酸化作用有關，而SULT2B1b則是與皮膚發育相關的膽固醇硫酸化作用有關(Shimizu et al., 2003)。

由於SULT2在老鼠胚胎時期的許多細胞即有表現，似乎在發育早期即有功用，但是老鼠的胚胎發育須在母體的子宮內進行，有研究上的困難，與老鼠相比之下，同是脊椎動物的斑馬魚其體型較小，且有產卵數多、胚胎發育早期透明、發育快速等優點，且斑馬魚的胚胎發育機制和哺乳動物頗相似，因此在本實驗中，我們想以斑馬魚作為模式動物，研究SULT2在其早期胚胎發育的RNA表現，藉以更進一步了解SULT2對斑馬魚發育的影響。

## 貳、研究目的

利用原位雜交法(in situ hybridization)尋找SULT2 sulphotransferase 在斑馬魚早期胚胎發育的RNA表現時期及位置

## 參、文獻探討

### 一、Cytosolic sulphotransferase(ST)

硫酸化(sulphate conjugation)在解毒作用與類固醇荷爾蒙(steroid hormones)、神經遞質(neurotransmitters)等內生性複合物的生化轉譯反應中扮演重要的角色。其中能夠催化某些含OH<sup>-</sup>或NH<sub>3</sub><sup>+</sup>的物質之硫酸化反應的酵素稱做cytosolic sulfotransferases(STs)，這些基因又被稱做SULT(Her et al., 1998)。

在ST的gene superfamily中，主要的兩個family分別是PST (phenol ST) family (又稱為SULT1)以及HSST (hydroxysteroid ST) family (又稱為SULT2)。而HSST family又包含了DHEA STs (SULT2A) 和 cholesterol STs (SULT2B) 兩個subfamily(Sugahara et al., 2003c)。

已有研究發現，在人體中至少有10種SULT(Coughtrie, 2002)，在目前對人類SULT在人體內的表現位置之研究中，SULT2A1是有研究成果的一個。研究指出，SULT2A1會在肝臟以及新陳代謝較旺盛的器官如小腸和腎上腺皮質等部位大量表現(Fang et al., 2005)。也有不少研究找出在許多哺乳動物(如老鼠、兔子、狗等)身上有SULT的存在。

而在斑馬魚中亦有一系列的SULT被找出來，並做了初步的酵素分析(Sugahara et al., 2003a)，但是並沒有更進一步去探討有關SULT其RNA與蛋白質的表現，因此我們希望

就這方面做更深入的研究。在本實驗中，我們以已經選殖出來而且與人類SULT2A較為相近的斑馬魚SULT2基因合成探針，並利用原位雜交法研究斑馬魚SULT2在早期胚胎發育的RNA表現。

## 二、母體因子(maternal factor)

當母體生成卵子後，卵子內原本就儲存的核糖核酸(RNA)和蛋白質(Protein)會隨著卵子受精而傳至囊胚(blastomere)，這些核糖核酸和蛋白質即稱為母體因子。就動物胚胎的發育過程而言，因為胚胎自身的基因組無法在卵子受精之初便開始作用，所以從卵子受精到胚胎自身的基因組始活化的這段時間，母體因子是十分重要的，諸如在細胞間的黏著以及胚胎分裂的過程中，母體因子即是一個不可或缺的角色(Pelegri, 2003)。

母體因子對於不同動物的影響也不同，譬如無脊椎動物(線蟲、果蠅等)或低等脊椎動物(蛙類等)，其依賴母體因子的時間較長，必須等到胚胎分裂至數千個以上的細胞時，胚胎自身的基因組才會開始作用。

就斑馬魚的胚胎發育過程來說，其胚胎本身的基因組約在胚胎分裂至一千個細胞(約3小時)左右時開始表現(Kane and Kimmel, 1993)，因此若在卵巢與1-cell胚胎表現的核糖核酸或蛋白質即為母體因子。

## 肆、研究材料與方法

### 一、模式動物—斑馬魚(Zebrafish)

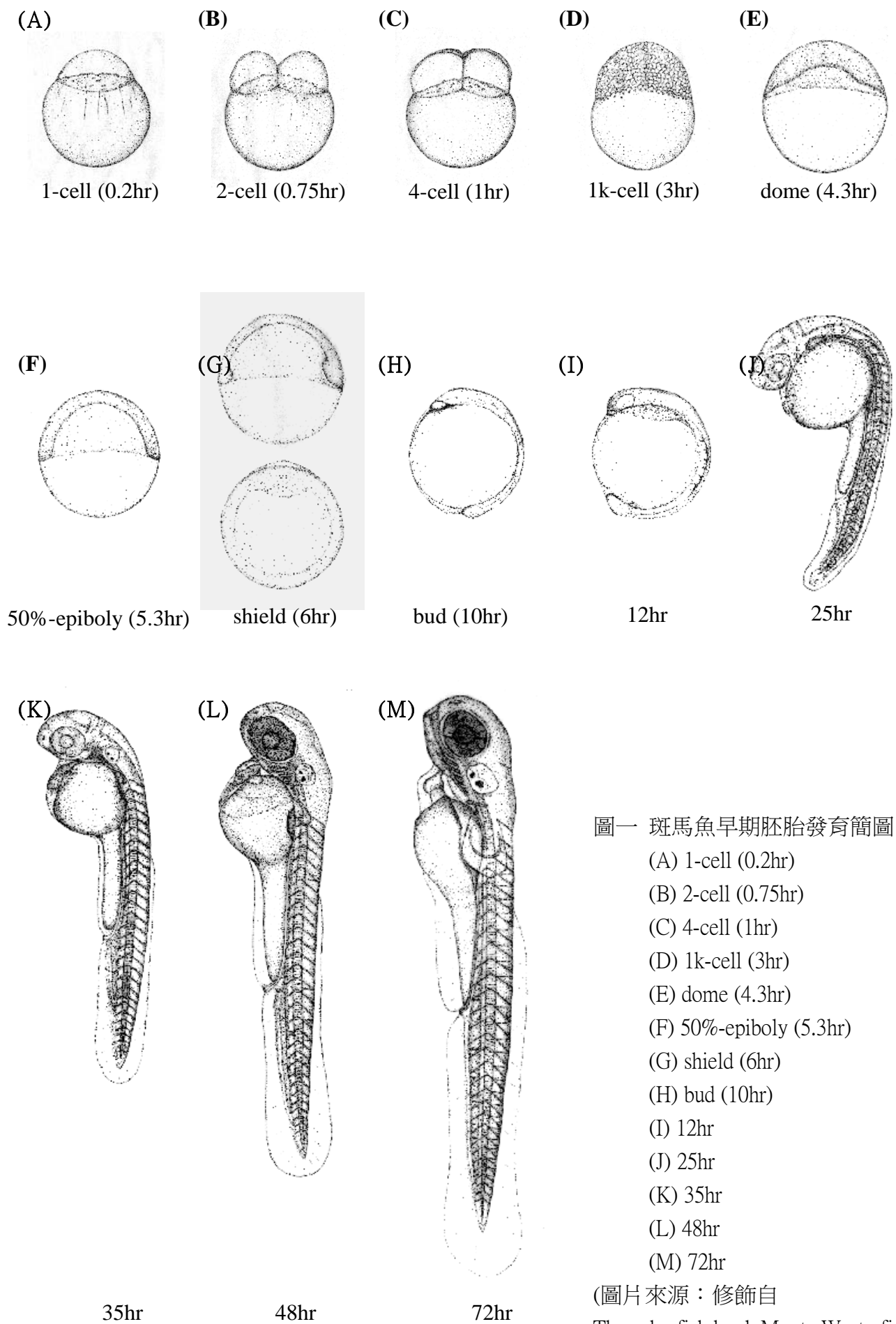
本實驗使用斑馬魚作為模式動物，斑馬魚有諸多優點：

- 1.成熟雌魚每週至少可產一次卵，產卵數可達200多顆。
- 2.其胚胎發育早期透明易觀察。
- 3.外部器官在2-4天內可發育完全，便於在短期內取得。
- 4.斑馬魚生長快速，達性成熟只約3個月。
- 5.其胚胎發育機制和哺乳動物類似。
- 6.斑馬魚在演化的分類上介於線蟲、果蠅與老鼠間，和線蟲、果蠅比起來是較接近人類的脊椎動物，而且斑馬魚在早期胚胎發育的研究上的困難度低於老鼠。

### 二、斑馬魚的發育過程

斑馬魚胚胎發育可分為：受精期(Zygote period)、卵分裂期(Cleavage period)、囊胚期(Blastula period)、原腸胚期(Gastrula period)、體分節期(Segmentation period)、咽期(Pharyngula Period)、孵化(Hatching period)七個階段。

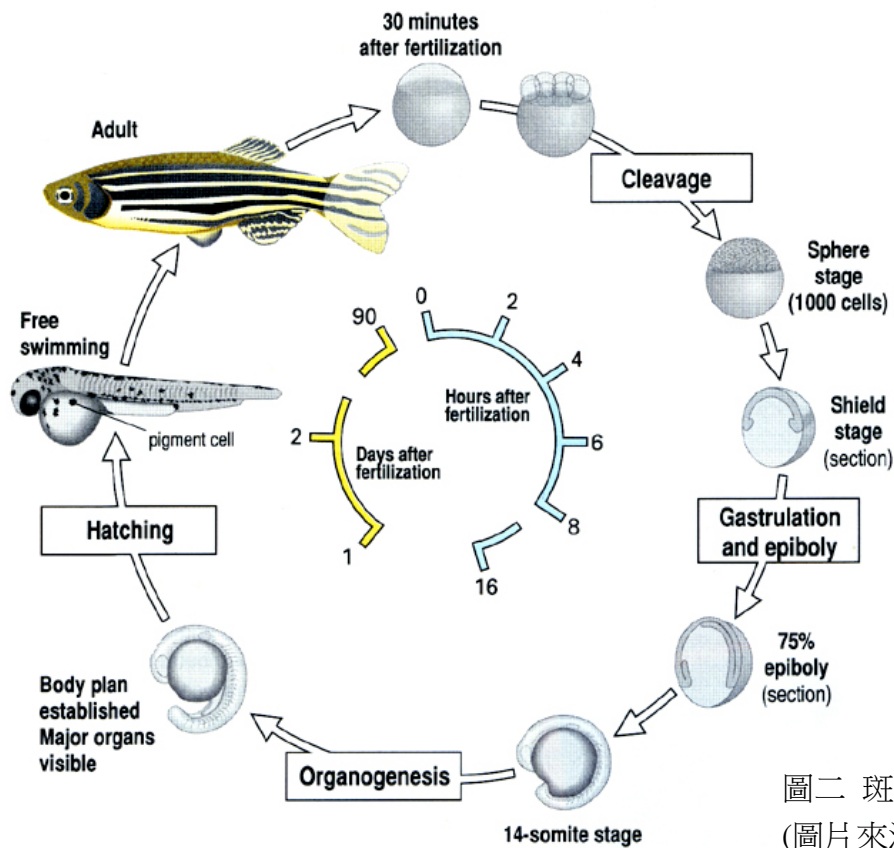
- 1.受精期:受精卵(受精後-0.75小時)。
- 2.卵分裂期:受精卵開始分裂(0.75-2.25小時)。
- 3.囊胚期：細胞持續分裂，卵黃上端囊胚成扁平狀，胚層由動物極(animal pole)開始外包(epiboly)卵(2.25-5.25小時)。
- 4.原腸胚期：胚層邊緣外包卵的程度達50%時，進入原腸胚期形成三個胚層(外胚層、中胚層、內胚層)(5.3-10.3小時)。
- 5.體分節期：體節出現(10.3-22小時)。
- 6.咽期：於24小時開始有紅血球在卵黃上流動和心臟跳動的情形(24-48小時)。
- 7.孵化：漸漸破殼而出，嘴巴形成且突出(48-72小時)。



圖一 斑馬魚早期胚胎發育簡圖

- (A) 1-cell (0.2hr)
- (B) 2-cell (0.75hr)
- (C) 4-cell (1hr)
- (D) 1k-cell (3hr)
- (E) dome (4.3hr)
- (F) 50%-epiboly (5.3hr)
- (G) shield (6hr)
- (H) bud (10hr)
- (I) 12hr
- (J) 25hr
- (K) 35hr
- (L) 48hr
- (M) 72hr

(圖片來源：修飾自  
The zebrafish book, Monte Westerfield)



圖二 斑馬魚生長發育簡圖  
 (圖片來源：修飾自 Principles of development, Wolpert)

### 三、原位雜交法(In Situ Hybridization)(Jowett, 2001)

#### 1. 實驗步驟：

##### 準備樣本

##### 配魚取卵

於實驗前一天將公、母魚(2隻:1隻)置於配對缸內，並以隔板隔開，隔天欲取卵時將隔板移走，使其交配。取得卵之後收於培養皿。

##### 固定(Fixation)

將所需時期之樣本放於4%PFA(paraformaldehyde)/PBS 固定並存放在4°C 至少一天(至一周)；大於20小時的樣本需加PTU(propylthiouracil)抑制其色素生成。

##### 脫水(Dehydration)

將準備好的樣本先以PBS清洗後，再用50%MEOH/50%PBS及100%MEOH脫水，放於-20°C 至少一小時。

##### 第一天

##### 覆水(Rehydration)

以溶於PBST的MEOH(25%、50%、75%、100%)將樣本脫水，再用PBST洗滌四次，每次五分鐘。洗到第三次時，可用細針為未脫殼之樣本脫殼。

##### 蛋白質水解作用(Proteinase K digestion)(於超過24小時的樣本)

將溶於PBST的Proteinase K(10 μg/μl)加入樣本反應5~20分鐘，後以PBST洗滌樣本，再加入4%PFA/PBS反應20分鐘，最後再以PBST洗滌樣本兩次，每次5分鐘。

##### 原位雜交(Hybridization)

將樣本放於HYB<sup>-</sup>，65°C，5分鐘後，再放於HYB<sup>+</sup>，65°C，反應一個晚上(或是2-5小時)。

將標有DIG的SULT2 ST2探針溶於HYB<sup>+</sup>裡(100~200  $\eta$  g/200  $\mu$  l)，70°C，10分鐘。

把probe/HYB<sup>+</sup>加入樣本，在65°C反應一個晚上。

## 第二天

### 移除探針(Probe removal)

將Probe/HYB<sup>+</sup>取出後存放於-20°C。將樣本以溶於2xSSCT 且濃度漸減的HYB<sup>-</sup> (100%、75%、50%、25%)洗滌，每次10分鐘，之後再加入2xSSCT於65°C洗滌一個小時，最後再以0.2xSSCT於65°C洗滌兩次，每次一小時。

### Blocking

1. 將樣本以MABT洗滌兩次，每次5分鐘，後以blocking solution 於室溫下反應2~4小時。
2. 事先準備額外的樣本 (準備步驟同前，但不需加探針)中加入以blocking solution 稀釋一千倍的Anti-Dig-Ap(Anti-Digoxigenin-alkaline phosphate Fab fragment)，在室溫下反應至少2.5小時。

### 抗體黏合(Antibody binding)

3. 將2.中的抗體加入1.的樣本中，於4°C反應一天(或在室溫下反應四小時)。

## 第三天

### 洗淨(Wash)

將抗體存放於4°C。將樣本以MABT洗滌三次，每次25分鐘。後以1mM levamisol/PBST 洗滌三次，每次10分鐘。

### 染色(Coloring)

用新鮮現配的Detection solution洗滌三次，每次10分鐘。再加入已過濾的TNBT/BCIP 呈色液，將樣本阻絕光源以呈色。待樣本有褐色訊號出現後，即可進行停止的步驟。

### 停止(Stop)

以PBST洗滌樣本，加入4%PFA/PBST暫時保存於4°C一天

## 照相

將胚胎換到60% Glycerol中並保存於4°C

## 2.使用藥品配方：

Detection solution

(100mM Tris pH9.5 ,50mM MgCl<sub>2</sub>,100mM NaCl ,0.1% Tween 20)

HYB<sup>-</sup> (50%formamide ,5xSSC ,0.1%Tween20)

HYB<sup>+</sup> (HYB<sup>-</sup> ,5mg/ml tRNA ,50 $\mu$ g/ml heparin)

MABT(150mM Maleic acid ,100mM NaCl ,0.1% Tween20)

SSCT(5xSSC ,0.1%Tween20)

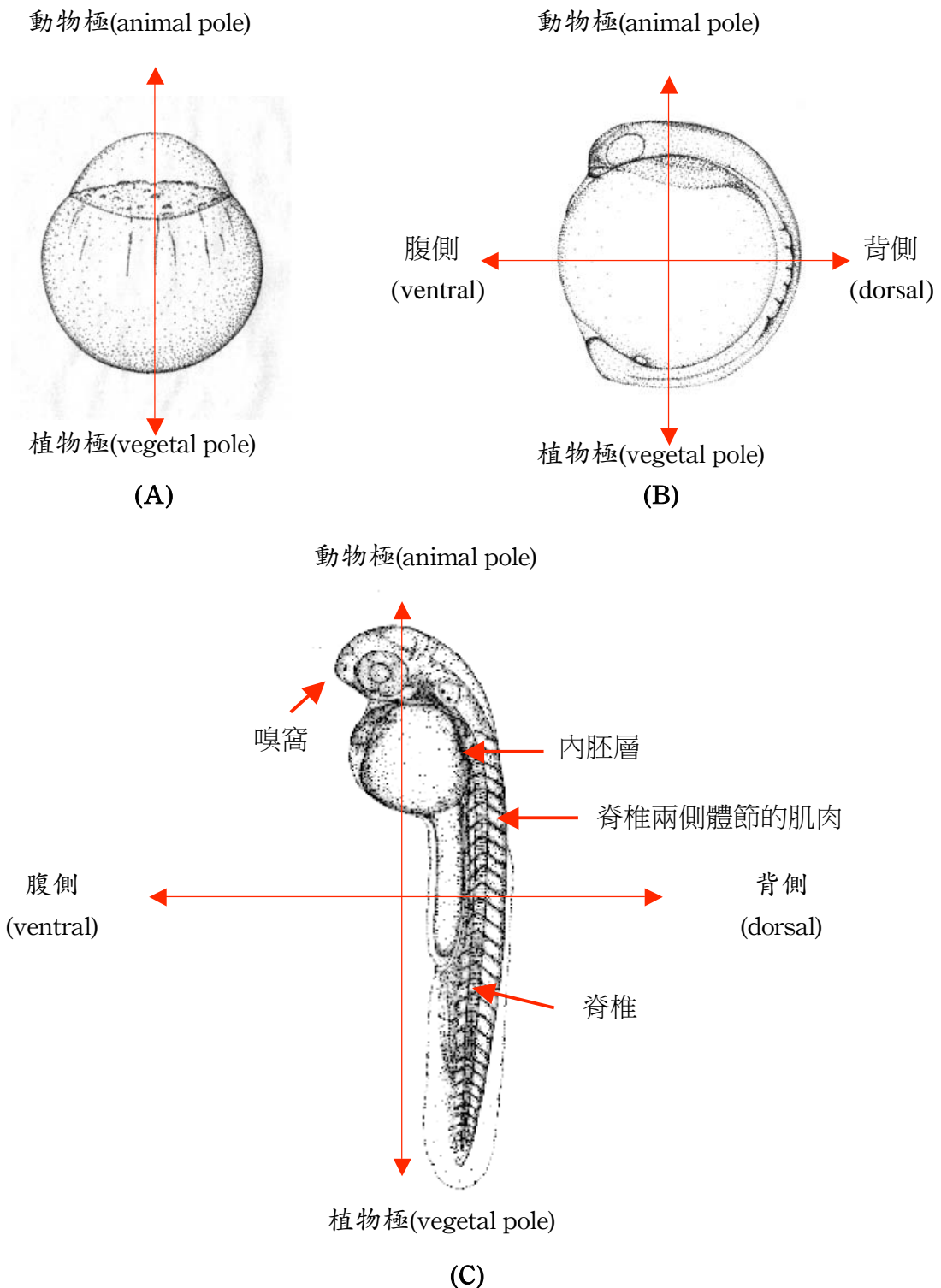
PBS (NaCl 8g ,KCl 0.2g ,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g ,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g pH=7.4)

PBST(DEPC/PBS ,0.1% Tween 20)

## 伍、研究結果

目前在本實驗中我們已經取用了成魚的卵巢、腦與1-cell、dome、50%-epiboly、12小時、24小時、36小時、48小時、72小時等不同時期的胚胎進行原位雜交，並觀察SULT2 於這些時期的RNA表現位置。

以下是本實驗結果的照片，除了卵巢與腦之外，其餘單一隻樣本(局部放大圖除外)的照片方向是從側面(lateral view)拍攝，動物極(animal pole)在上，植物極(vegetal pole)在下(如圖三-A)；而12小時之後的，已有背腹側之分，其拍攝方向為腹側(ventral)在左，背側(dorsal)在右(如圖三-B、C)。照片右下方之比例尺皆為100 $\mu$ m。



圖三 (A) 1-cell

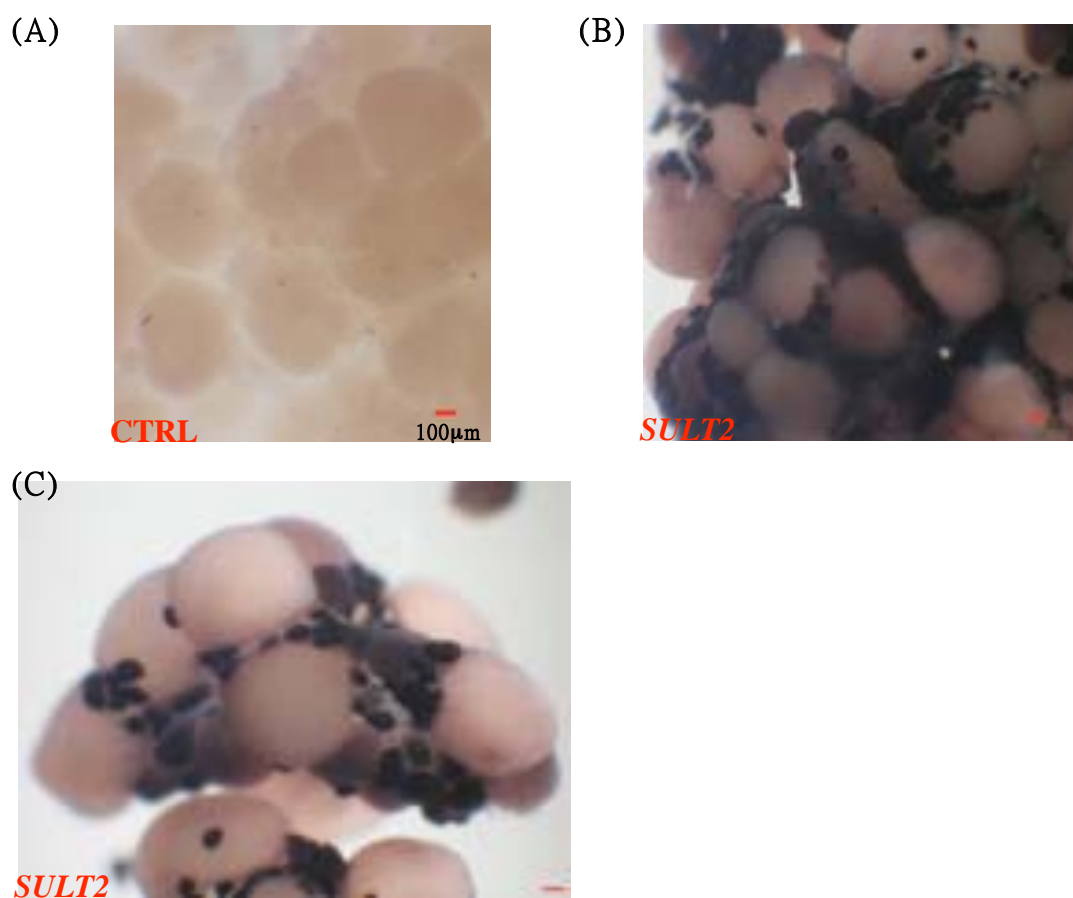
(B) 12hr

(C) 35hr

(圖片來源：修飾自 The zebrafish book, Monte Westerfield)

## 一、卵巢(ovary)

*SULT2*有明顯的表現，訊號均勻的散佈在細胞質中，且隨著卵子的大小有所不同，在較小的早期卵子其訊號強度大於較大的晚期卵子(如圖四-C)。



圖四 *SULT2*於卵巢的表現

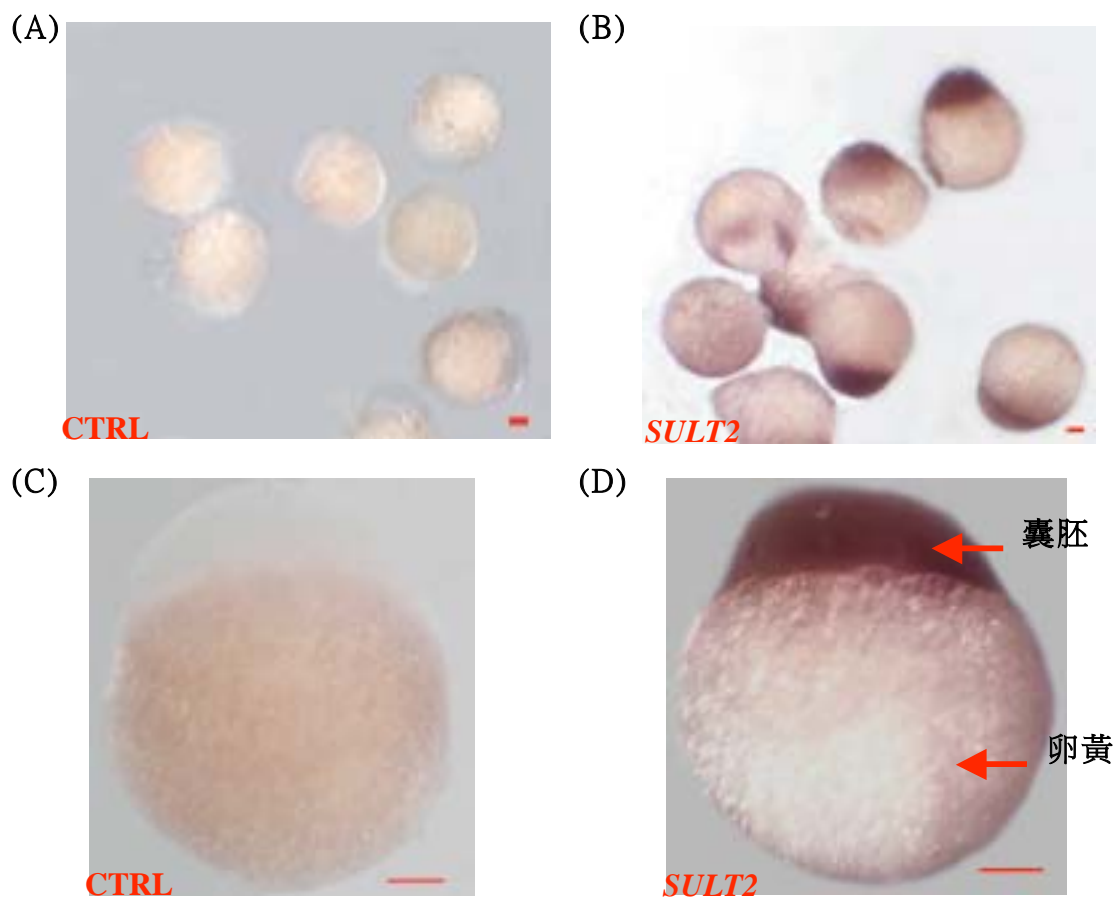
(A)未加入*SULT2*探針的對照組

(B)加入*SULT2*探針的實驗組

(C)加入*SULT2*探針的實驗組，可看見*SULT2*訊號均勻散佈在卵子的細胞質中

二、1-cell (0.2小時-0.75小時)

和對照組比起，可發現*SULT2*訊號均勻表現在卵黃以外的囊胚上(如圖五-D)。



圖五 *SULT2*於1-cell的表現

(A)未加入*SULT2*探針的對照組

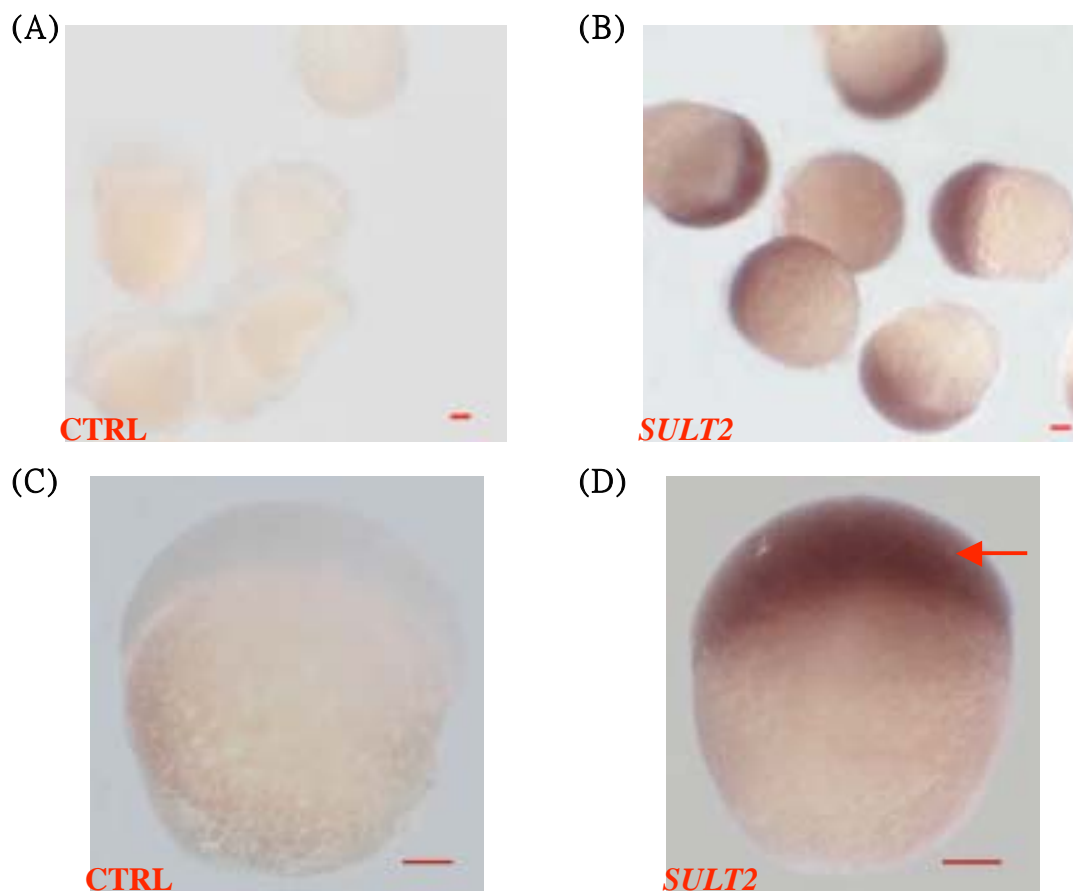
(B)加入*SULT2*探針的實驗組

(C)未加入*SULT2*探針的對照組

(D)加入*SULT2*探針的實驗組，可在囊胚上(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號

三、Dome (4.3小時-4.7小時)

*SULT2*訊號表現在胚胎細胞上，均勻分布於囊胚層中(如圖六-D)。



圖六 *SULT2*於dome的表現

(A)未加入*SULT2*探針的對照組

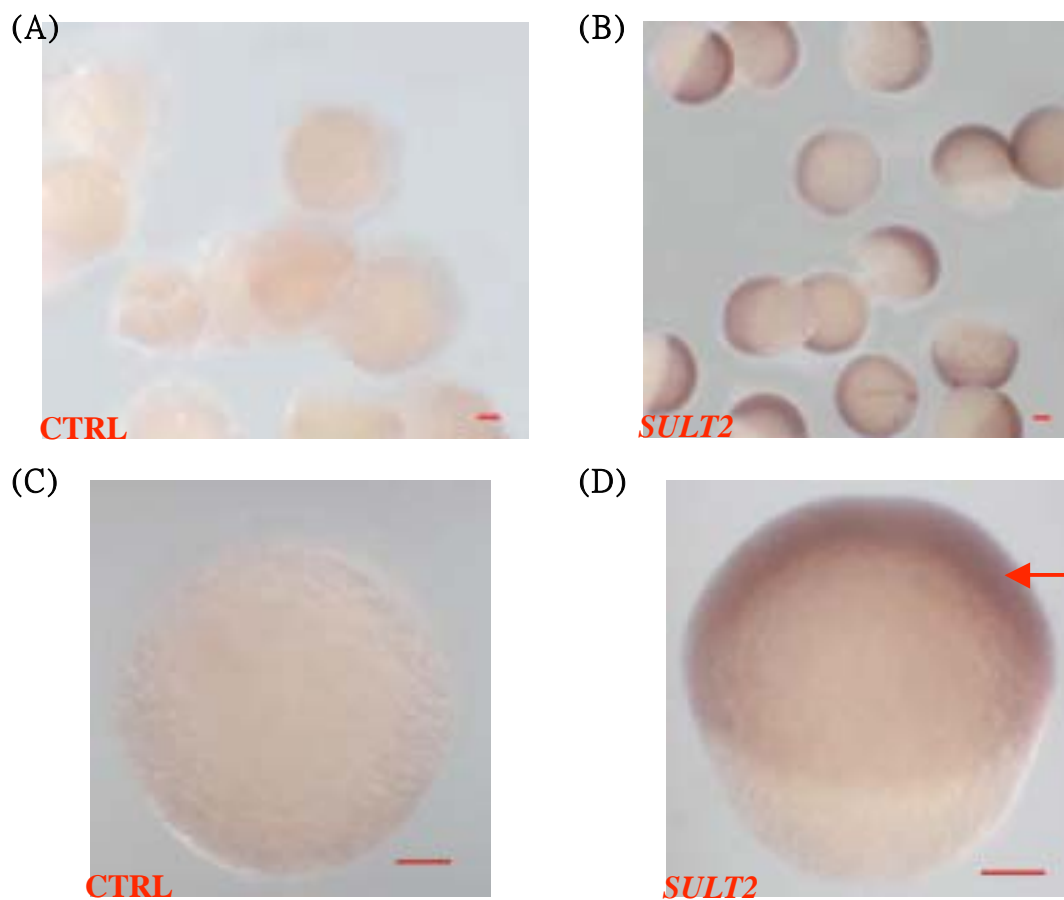
(B)加入*SULT2*探針的實驗組

(C)未加入*SULT2*探針的對照組

(D)加入*SULT2*探針的實驗組，可在胚胎細胞上(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號

四、50%-epiboly (5.3小時-5.7小時)

*SULT2*訊號均勻分布在胚胎細胞中(如圖七-D)。



圖七 *SULT2*於50%-epi的表現

(A)未加入*SULT2*探針的對照組

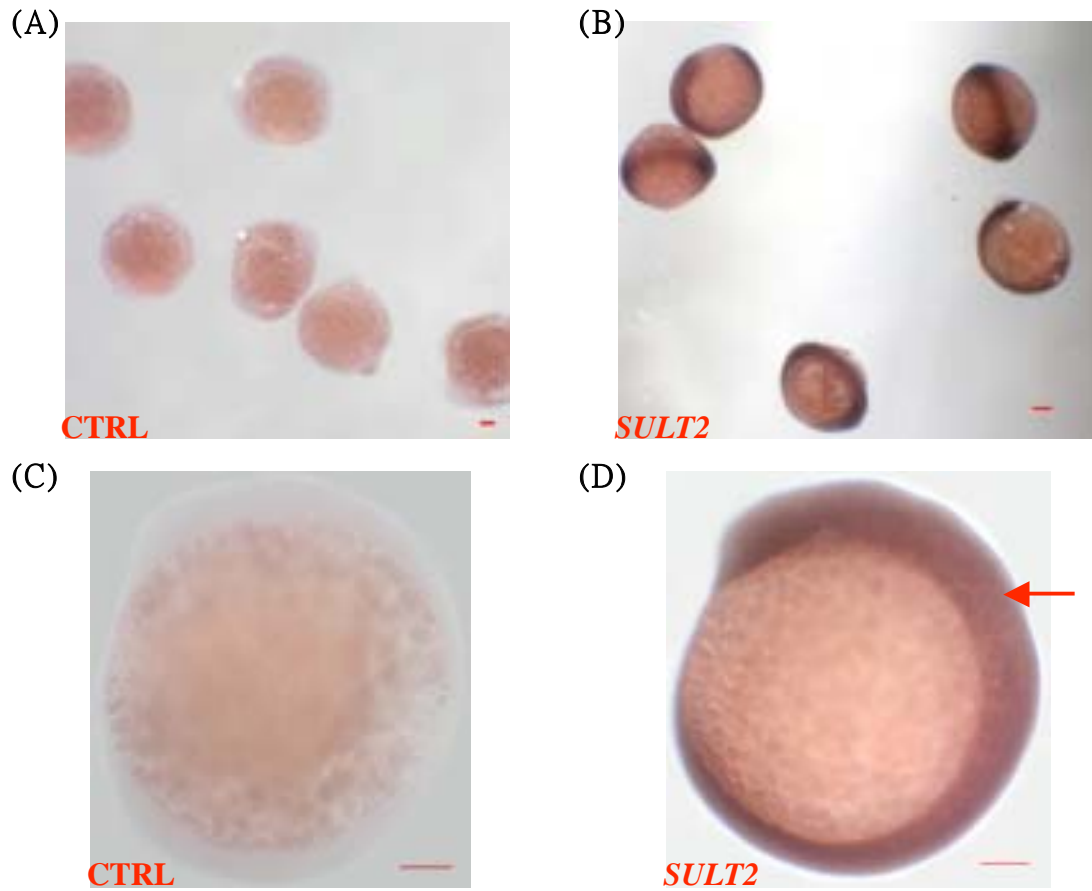
(B)加入*SULT2*探針的實驗組

(C)未加入*SULT2*探針的對照組

(D)加入*SULT2*探針的實驗組，可在胚胎細胞上(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號

五、12小時

*SULT2*訊號表現在胚胎細胞中(如圖八-D)。



圖八 *SULT2*於12小時的表現

(A)未加入*SULT2*探針的對照組

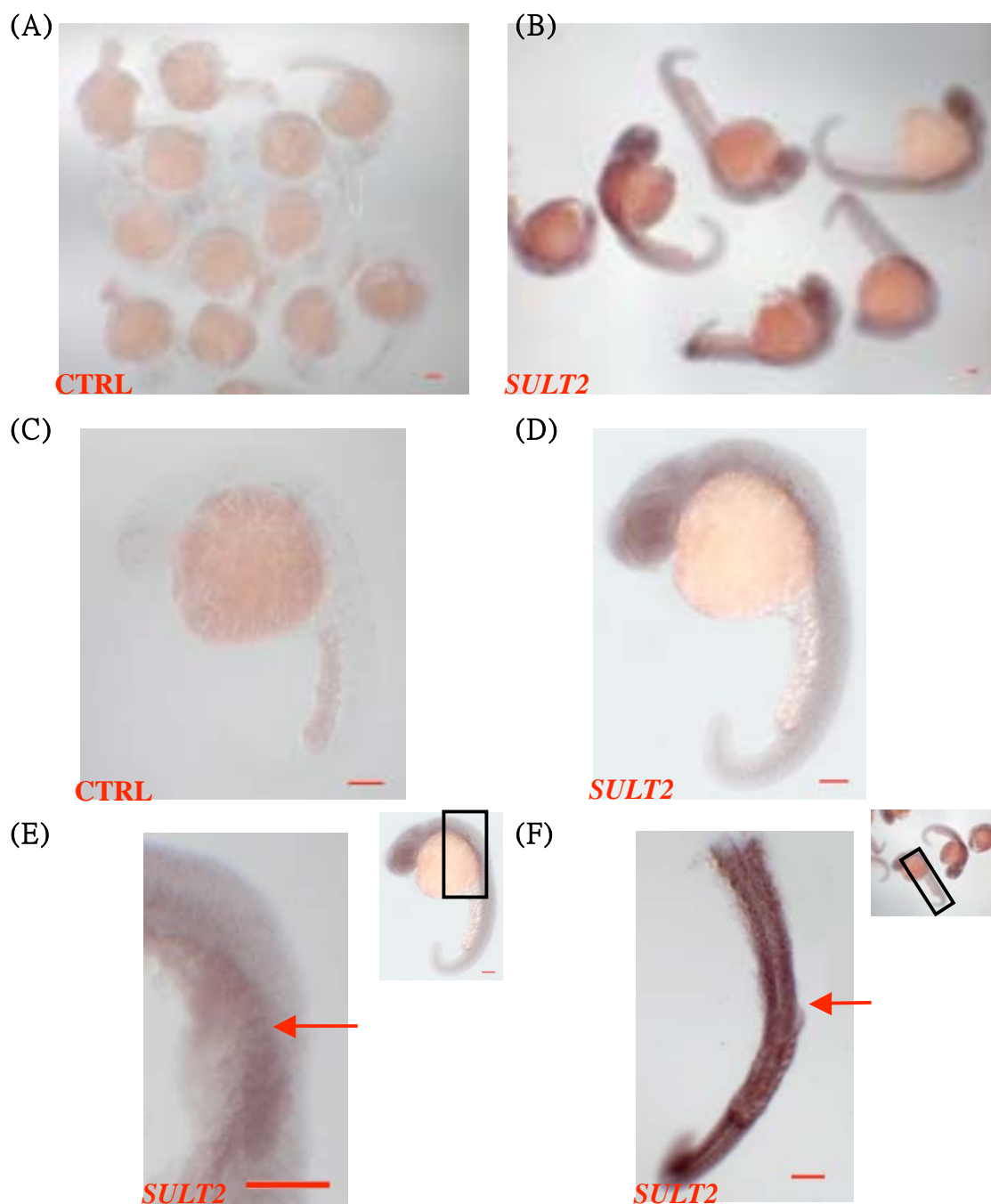
(B)加入*SULT2*探針的實驗組

(C)未加入*SULT2*探針的對照組

(D)加入*SULT2*探針的實驗組，可在胚胎細胞上(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號

六、24小時

在斑馬魚的內胚層(如圖九-E)以及脊椎兩側體節的肌肉(如圖九-F)有 *SULT2* 訊號表現。



圖九 *SULT2*於24小時的表現

(A)未加入*SULT2*探針的對照組

(B)加入*SULT2*探針的實驗組

(C)未加入*SULT2*探針的對照組

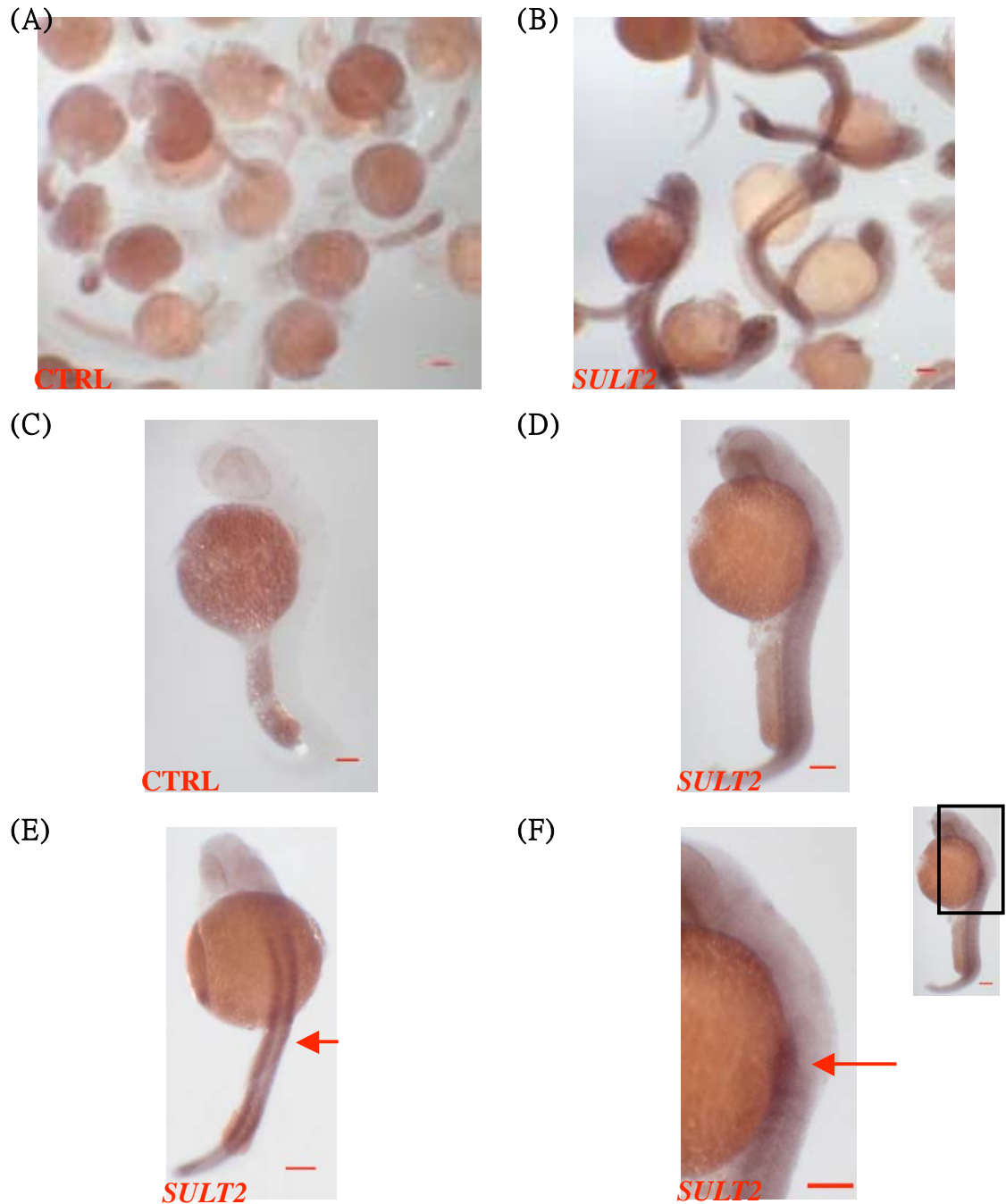
(D)加入*SULT2*探針的實驗組

(E)加入*SULT2*探針的實驗組，可在內胚層(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號

(F)加入*SULT2*探針的實驗組，可在脊椎兩側體節的肌肉(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號(由背側方向拍攝)

七、36小時

脊椎兩側體節的肌肉有明顯的SULT2訊號(如圖十-E)，在內胚層也可看見明顯的訊號表現(如圖十-F)，此外，在嗅窩(olfactory pit)亦可看見SULT2訊號表現(如圖十-G)。





圖十 *SULT2*於36小時的表現

(A)未加入*SULT2*探針的對照組

(B)加入*SULT2*探針的實驗組

(C)未加入*SULT2*探針的對照組

(D)加入*SULT2*探針的實驗組

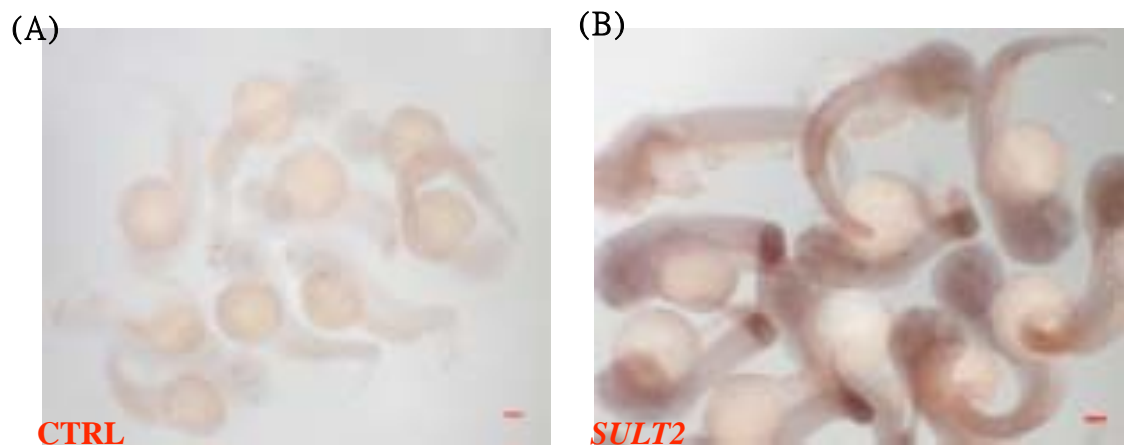
(E)加入*SULT2*探針的實驗組，可在脊椎兩側體節的肌肉(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號(由背側方向拍攝)

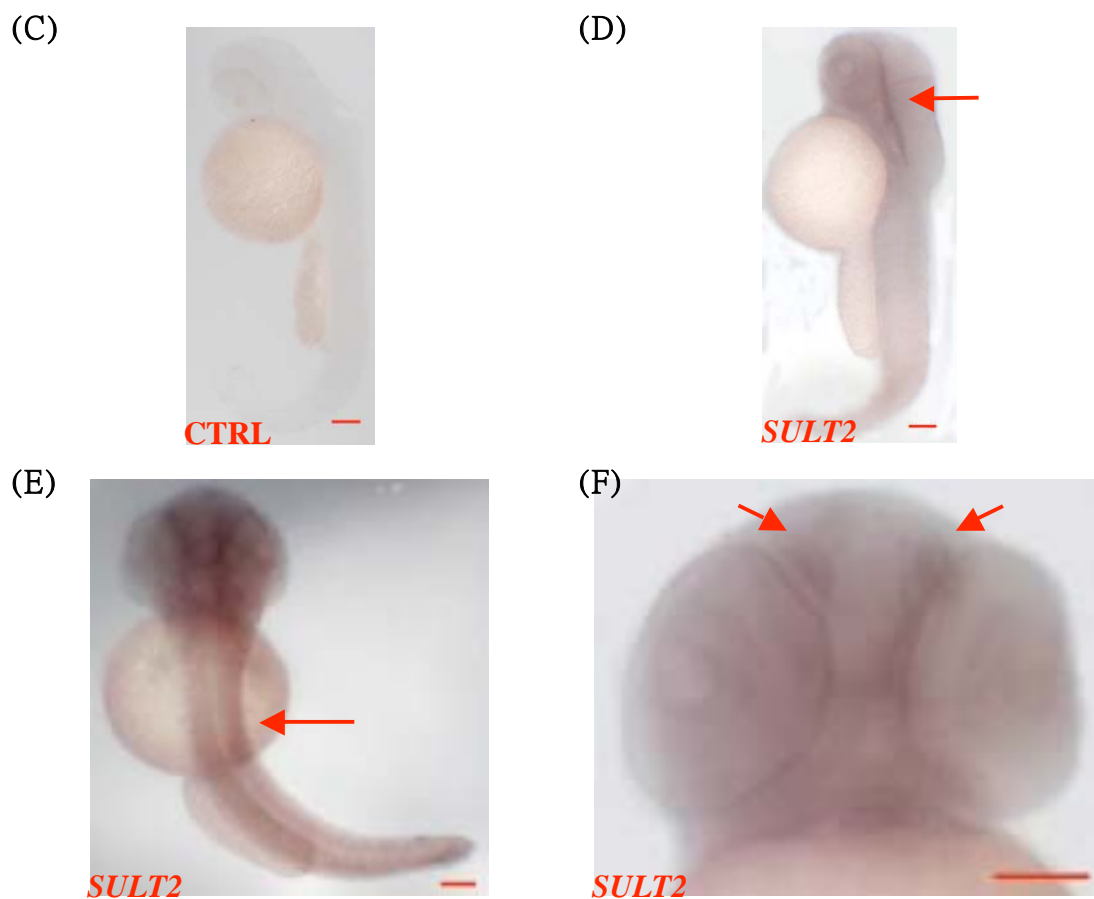
(F)加入*SULT2*探針的實驗組，可在內胚層(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號

(G)加入*SULT2*探針的實驗組，可在嗅窩(箭頭所指處)看見*SULT2*訊號(由腹側方向拍攝)

#### 八、48小時

在頭部可見強烈的訊號表現(如圖十一-D)，也可在脊椎兩側體節的肌肉部分看見*SULT2*訊號表現(如圖十一-E)，在嗅窩亦可看見微弱的*SULT2*訊號表現(如圖十一-F)。





圖十一 *SULT2*於48小時的表現

(A)未加入*SULT2*探針的對照組

(B)加入*SULT2*探針的實驗組

(C)未加入*SULT2*探針的對照組

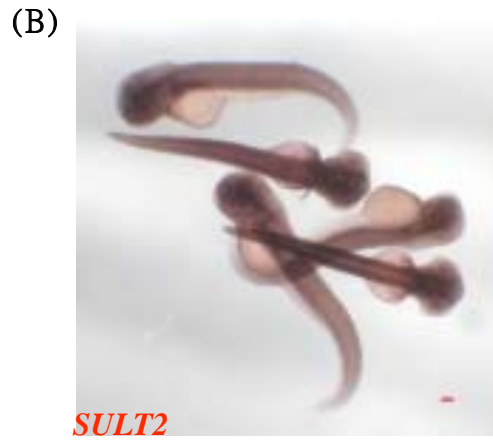
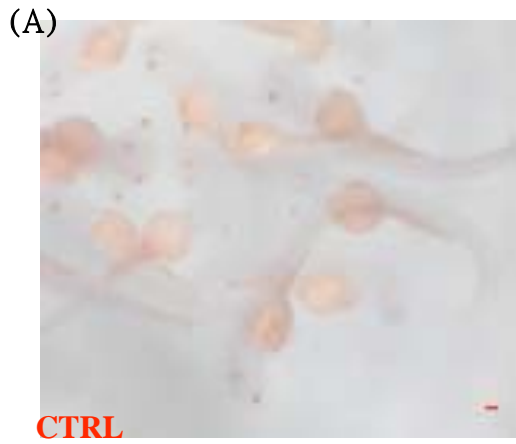
(D)加入*SULT2*探針的實驗組，可在頭部(箭頭所指處)看見*SULT2*訊號

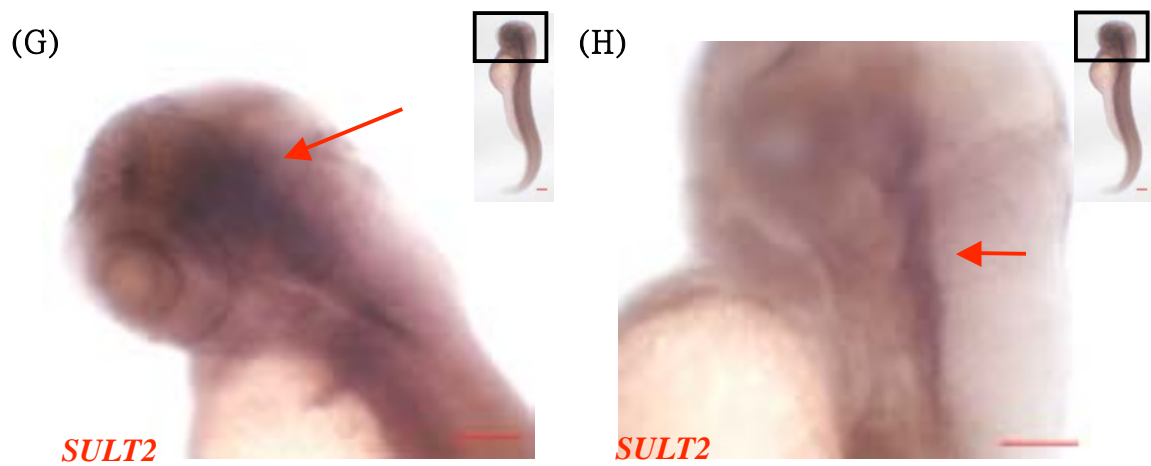
(E)加入*SULT2*探針的實驗組，可在脊椎兩側體節的肌肉(箭頭所指區域)看見  
*SULT2*訊號(由背側方向拍攝)

(F)加入*SULT2*探針的實驗組，可在嗅窩(箭頭所指處)看見*SULT2*訊號(由腹側方向  
拍攝)

九、72小時

在脊椎兩側體節的肌肉可看見清楚的訊號表現(如圖十二-E)，在內胚層也可看見強烈的訊號表現(如圖十二-F)，此外，在頭部亦可看到明顯的訊號表現(如圖十二-G、十二-H)。





圖十二 *SULT2*於72小時的表現

(A)未加入*SULT2*探針的對照組

(B)加入*SULT2*探針的實驗組

(C)未加入*SULT2*探針的對照組

(D)加入*SULT2*探針的實驗組

(E)加入*SULT2*探針的實驗組，可在脊椎兩側體節的肌肉(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號(由背側方向拍攝)

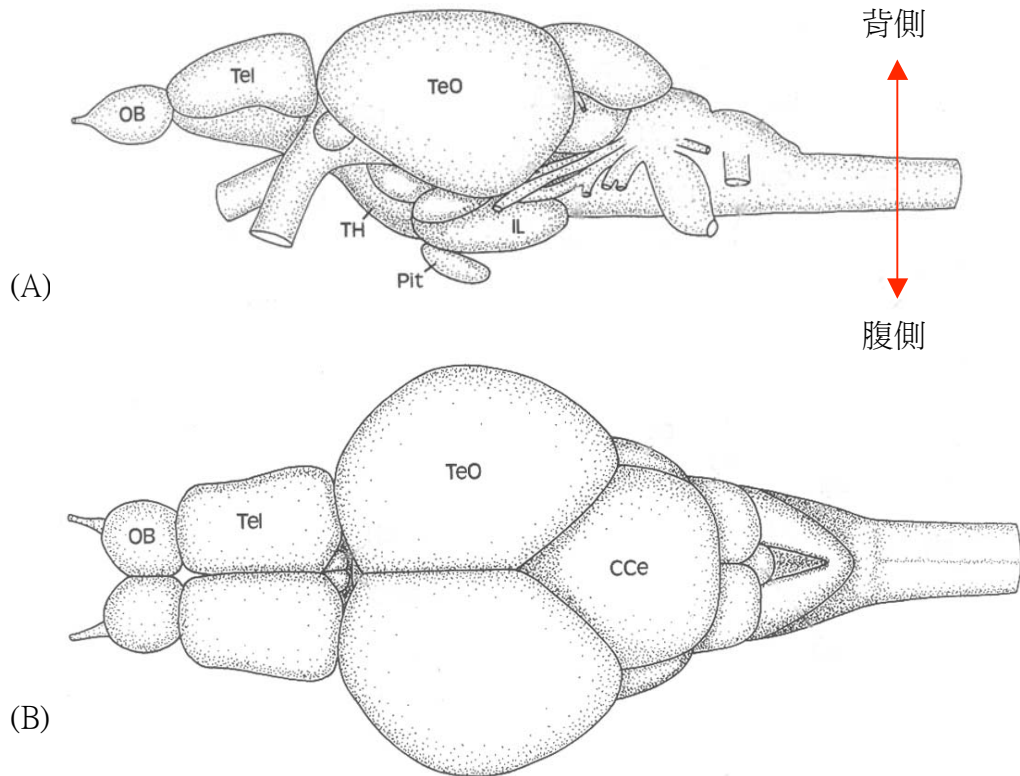
(F)加入*SULT2*探針的實驗組，可在內胚層(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號

(G)加入*SULT2*探針的實驗組，可在頭部(箭頭所指處)看見*SULT2*訊號

(H)加入*SULT2*探針的實驗組，可在頭部(箭頭所指處)看見*SULT2*訊號

## 十、腦(brain)

從腹側(ventral)觀看，在端腦(telencephalon)的側邊以及腦頂蓋(tectum opticum)的側邊有*SULT2*訊號表現(如圖十四-B)，在下視丘下葉(inferior lobe of hypothalamus)的側邊也有*SULT2*訊號表現(如圖十四-E)，在環室下視丘腹側(ventral zone of periventricular hypothalamus)上有明顯的彎月狀*SULT2*訊號表現(如圖十四-F)。從背側(dorsal)觀看，則可在小腦(corpus cerebelli)外圍看到*SULT2*訊號，端腦及腦頂蓋的側邊亦有訊號表現(如圖十四-D)。



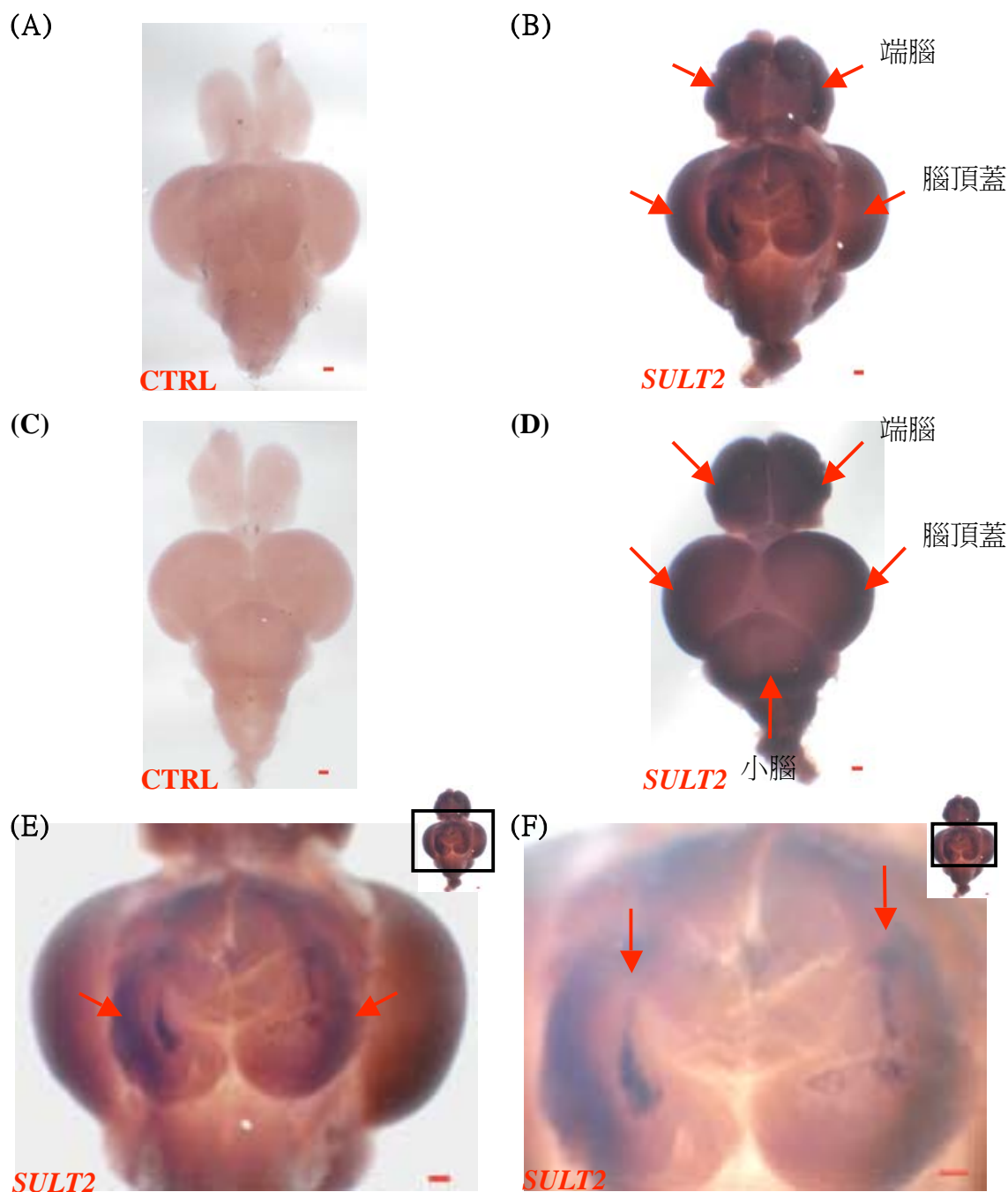
- OB olfactory bulb (嗅球)
- Tel telencephalon (端腦)
- Teo tectum opticum (腦頂蓋)
- TH tuberal hypothalamus (下視丘)
- Pit pituitary (腦下垂體)
- IL inferior lobe of hypothalamus (下視丘下葉)
- CCe corpus cerebelli (小腦)

圖十三 斑馬魚的成腦簡示圖

(A) 從側面方向觀看

(B) 從背側方向觀看

(圖片來源：修飾自Neuroanatomy of the zebrafish brain, M.F.Wullimann, B.Rupp, and H.Reichert)



圖十四 *SULT2*於成腦的表現

(A)未加入*SULT2*探針的對照組(由腹側方向拍攝)

(B)加入*SULT2*探針的實驗組，可在端腦的側邊以及腦頂蓋的側邊(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號(由腹側方向拍攝)

(C)未加入*SULT2*探針的對照組(由背側方向拍攝)

(D)加入*SULT2*探針的實驗組，可在端腦的側邊、腦頂蓋的側邊以及小腦的下側外圍(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號(由背側方向拍攝)

(E)加入*SULT2*探針的實驗組，可在下視丘下葉的側邊(箭頭所指區域)看見*SULT2*訊號(由腹側方向拍攝)

(F)加入*SULT2*探針的實驗組，可在環室下視丘腹側上(箭頭所指彎月狀處)看見*SULT2*訊號(由腹側方向拍攝)

表一：斑馬魚*SULT2*於24、36、48以及72小時胚胎的RNA表現

時期\部位	內胚層	脊椎兩側體節的肌肉	嗅窩	頭部
24小時	●	●		
36小時	●	●	●	
48小時		●	●	●
72小時	●	●		●

● 表示此處有明顯的*SULT2*訊號表現

## 陸、結論

*SULT2*在卵巢中即有表現，訊號均勻的散佈在細胞質中，且隨著卵子的大小有所不同，在較小的早期卵子其訊號強度大於較大的成熟卵子，直到1-cell時，細胞質集中於動物極，*SULT2*訊號於囊胚上再次有強烈的表現。在1-cell、dome、50%-epiboly以及12小時的胚胎中，其卵黃以外的部位皆有均勻的訊號表現，但是並無特定的表現位置。24小時、36小時和72小時的胚胎其內胚層可看見明顯的*SULT2*訊號表現，24小時、36小時、48小時以及72小時的胚胎其脊椎兩側體節的肌肉部份亦有*SULT2*訊號表現，36小時與48小時的胚胎則可在嗅窩看見訊號表現，48小時和72小時在頭部也有清楚的*SULT2*訊號。*SULT2*在腦的部份區域也有表現，從腹側觀看，可在端腦、下視丘下葉及腦頂蓋的側邊發現*SULT2*訊號，其中在環室下視丘腹側上有明顯的*SULT2*訊號表現；從背側觀察，亦可在端腦和腦頂蓋的側邊及小腦的外圍看到*SULT2*訊號。

## 柒、討論

- 一、由實驗得知，*SULT2*在卵巢、1-cell至72小時等不同時期的胚胎皆有表現，所以我們推測，硫酸化作用對斑馬魚早期的胚胎發育而言是不可或缺的，此外*SULT2*在各時期胚胎的表現區域多而廣，故猜測*SULT2*對斑馬魚早期的胚胎發育來說亦是極為重要的基因。
- 二、在卵巢中即可見到*SULT2*訊號均勻的散佈在細胞質，而且隨著卵子的發育，可見到尚未成熟、較小的早期卵子比體積較大的成熟卵子有更強烈之訊號表現。我們推測，由於此時*SULT2*在卵子中的含量應是相同的，但是因為早期卵子的體積較小，成熟卵子的體積較大，因此*SULT2*在前者的表現便顯得強烈而明顯，在後者的表現則顯得較弱而分散。
- 三、我們在卵巢以及1-cell的胚胎中，都可以偵測到*SULT2*的RNA表現。由於斑馬魚自身的基因組在上述時期尚不會作用，故推知這時候*SULT2* RNA的表現是母體因子，因此，*SULT2*可能在早期發育有很重要的作用。
- 四、在24小時、36小時以及72小時的胚胎中，我們皆可於卵黃和脊索交界處的內胚層看到*SULT2*訊號表現，由於內胚層與身體內部器官如肝臟的發育有關，而且已知在以老鼠為模式動物的*SULT2*研究中，發現*SULT2A1*會在老鼠的肝臟有極為明顯的表現，所以我們推測，*SULT2*可能會在成魚的肝臟表現，因此我們將會取成魚的肝臟來做原位雜交法，偵測*SULT2*是否在肝有表現。

- 五、在48小時和72小時的胚胎可見到頭部有強烈的*SULT2*訊號表現，我們推測該表現位置可能為腦部，24小時、36小時以及72小時的胚胎在內胚層亦有*SULT2*訊號表現，但兩處確切的表現位置以及細胞型態，必須再做組織切片與做標記(marker)基因的原位雜交才能知道。
- 六、我們在成魚的原位雜交結果中，則可在端腦、腦頂蓋、下視丘下葉的側邊以及小腦外圍看到*SULT2*訊號表現，其中環室下視丘腹側有強烈的訊號表現，但是*SULT2*確切的表現位置則需要做組織切片後才能確定。
- 七、若欲更深入了解*SULT2*對斑馬魚早期胚胎發育的影響，我們可以利用morpholino (Nasevicius and Ekker, 2000)降低*SULT2*酵素在斑馬魚的表現，進一步觀察其對斑馬魚發育的影響。

#### 捌、參考文獻

- 1.辜維瑤·斑馬魚*cyp11a1*與*hsd3b*基因表現之控制 (2004)·國立陽明大學生命科學院生物化學研究所碩士論文
- 2.M.F.Wullimann, B.Rupp, and H.Reichert·*Neuroanatomy of the zebrafish brain* (1996)·Birkhäuser Verlag
- 3.Monte Westerfield·*The zebrafish book* (1995) Edition 3·Institute of Neuroscience University of Oregon
- 4.Wolpert·*Principles of development* (2001)·Oxford University Press
- 5.Coughtrie, M. W. (2002). Sulfation through the looking glass--recent advances in sulfotransferase research for the curious. *Pharmacogenomics J* 2, 297-308.
- 6.Fang, H. L., Strom, S. C., Cai, H., Falany, C. N., Kocarek, T. A., and Runge-Morris, M. (2005). Regulation of human hepatic hydroxysteroid sulfotransferase gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha transcription factor. *Mol Pharmacol* 67, 1257-1267.
- 7.Her, C., Wood, T. C., Eichler, E. E., Mohrenweiser, H. W., Ramagli, L. S., Siciliano, M. J., and Weinshilboum, R. M. (1998). Human hydroxysteroid sulfotransferase *SULT2B1*: two enzymes encoded by a single chromosome 19 gene. *Genomics* 53, 284-295.
- 8.Jowett, T. (2001). Double in situ hybridization techniques in zebrafish. *Methods* 23, 345-358.
- 9.Kane, D. A., and Kimmel, C. B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development* 119, 447-456.
- 10.Nasevicius, A., and Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 26, 216-220.
- 11.Pelegri, F. (2003). Maternal factors in zebrafish development. *Dev Dyn* 228, 535-554.
- 12.Runge-Morris, M., Wu, W., and Kocarek, T. A. (1999). Regulation of rat hepatic hydroxysteroid sulfotransferase (*SULT2-40/41*) gene expression by glucocorticoids: evidence for a dual mechanism of transcriptional control. *Mol Pharmacol* 56, 1198-1206.
- 13.Shimizu, C., Fuda, H., Yanai, H., and Strott, C. A. (2003). Conservation of the hydroxysteroid sulfotransferase *SULT2B1* gene structure in the mouse: pre- and postnatal expression, kinetic analysis of isoforms, and comparison with prototypical *SULT2A1*. *Endocrinology* 144, 1186-1193.
- 14.Sugahara, T., Liu, C. C., Govind Pai, T., and Liu, M. C. (2003a). Molecular cloning, expression,

and functional characterization of a novel zebrafish cytosolic sulfotransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 725-730.

15. Sugahara, T., Liu, C. C., Pai, T. G., Collodi, P., Suiko, M., Sakakibara, Y., Nishiyama, K., and Liu, M. C. (2003b). Sulfation of hydroxychlorobiphenyls. Molecular cloning, expression, and functional characterization of zebrafish SULT1 sulfotransferases. *Eur J Biochem* 270, 2404-2411.
16. Sugahara, T., Yang, Y. S., Liu, C. C., Pai, T. G., and Liu, M. C. (2003c). Sulphonation of dehydroepiandrosterone and neurosteroids: molecular cloning, expression, and functional characterization of a novel zebrafish SULT2 cytosolic sulphotransferase. *Biochem J* 375, 785-791.

## 評語

本論文利用 RNA 離法探討 SULT2 在斑馬魚胚胎的表現，已觀察到初步的表現狀況，將進一步探討蛋白質的表現及其生物功能，本作品仍有發展的空間。