

2011 年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

編號：120010

作品名稱

以基因轉殖斑馬魚胚胎作為生物感測器偵測環境污染物之研發與應用

得獎獎項

三等獎

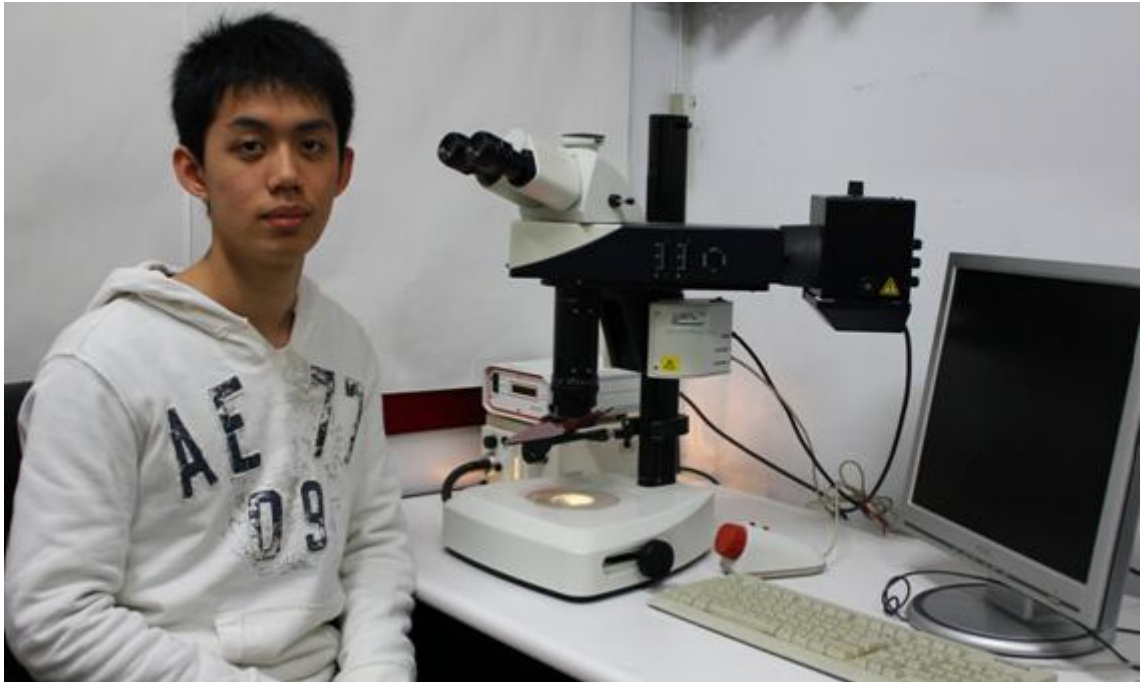
作者姓名：呂怡勤、徐培鈞

就讀學校：臺北市立建國高級中學

指導教師：蔡懷楨、朱芳琳

關鍵字：環境監測動物(environmental monitoring animal)、內質網壓力(ER stress)、斑馬魚(*Danio rerio*)

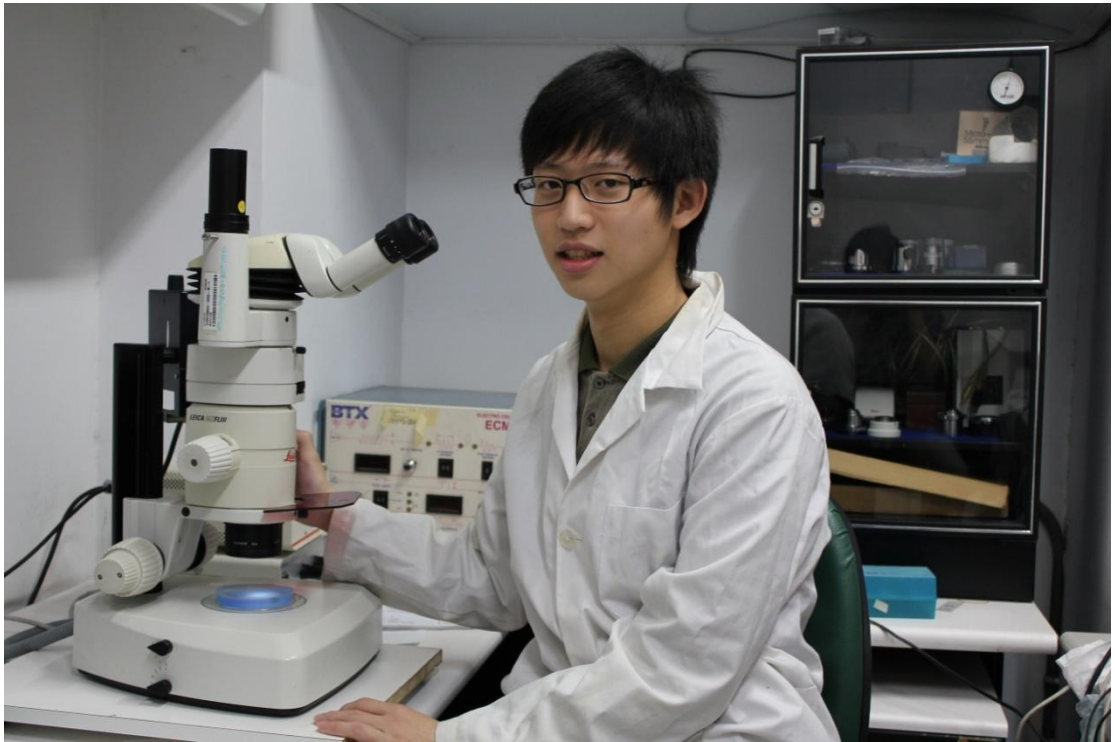
作者簡介



我是這個研究的作者之一，我叫呂怡勤。上了高中之後發現有一門課叫做專題研究，在對生物的興趣以及種種的因緣際會之下，開始了我的專題生活。

從剛進實驗室熟悉環境，到實驗操作、結果討論，直至寫出一篇報告，過程雖然漫長繁瑣，當中卻蘊藏了許多樂趣，是一個很有趣的經驗，也是一個成長的機會。

很感謝實驗室的老師給我在實驗室學習的機會，也多虧了學長姐的實驗方法及技術上的指導，讓我能夠順利進行這個專題。



我是徐培鈞，天性樂觀、熱愛生命而且獨立自主，凡事都喜愛自己動手做，對世界充滿好奇心。平時喜愛閱讀科普書籍、聽音樂、外出接觸大自然，培養出我熱愛大自然和生物的情懷。在學校參加春暉社，經常至社區服務或至各小學宣教。

為國爭光是我的志向！有幸能進入實驗室才發現真正的實驗並不如想像中簡單，而在實驗室能研究未知的事物更是充滿挑戰性與驚喜，感謝老師與學長姐給我這與眾不同的機會。而以後期許自己做一個對科學與社會有貢獻的人。

摘要

近年來，水污染成為全球性重大議題，被指出可能為造成生物疾病與死亡的主要因素。因此發展環境感測動物，用來偵測環境污染，以提供足夠應變時間相當重要。本研究利用斑馬魚作為模式動物。研究結果指出，當斑馬魚胚胎經過逆境(stress)處理，如熱休克、酒精與 thapsigargin (ER stress inducing drug)時，ER stress 相關基因如 *PERK*、*chop*、*Bip*、*ATF3* mRNA 和 CHOP 蛋白質均大量表現，顯示斑馬魚有潛力作為 *in vivo* 研究 ER stress 的模式動物。之後，我們利用轉殖品系 *Tg(KY43-3)*（帶有人類 uORF^{chop}-GFP 報導基因）證明人類 uORF^{chop} 片段抑制下游轉譯的特性在不同物種中具有高度保守性。而當 *Tg(KY43-3)* 胚胎受高低溫、缺氧、重金屬、農藥等污染逆境刺激後，其綠螢光被誘發表現；此外 *Tg(KY43-3)* 胚胎可在胚胎死亡前反應逆境造成的傷害而表現綠螢光，故我們可由觀察綠螢光表現判斷環境污染物是否對生物造成傷害。綜合以上，*Tg(KY43-3)* 可作為研究或偵測各種環境污染逆境的環境監測動物。

Using Transgenic Zebrafish Embryo As a Biosensor to Detect Aquatic Pollution

Abstract

Recent years, water pollution is a major problem in the global context. It has been suggested that it is the leading worldwide cause of deaths and diseases. Consequently, developing an environmental monitoring animal that could respond to pollutant and allow sufficient time for intervention is necessary. In this study, we used zebrafish as an animal model. We found that the ER stress-associated genes, including *PERK*, *chop*, *Bip*, and *ATF3*, were greatly induced by heat-shock stress, alcohol, and thapsigargin (a kind of ER stress inducing drug), suggesting that zebrafish might be an excellent modal in studying the role of ER stress *in vivo*. Secondly, we proved that the functions of both upstream open reading frame of *chop* (uORF^{*chop*}) from human and zebrafish are highly conserved. Moreover, a transgenic line *Tg*(KY43-3), in which the human uORF^{*chop*} is fused with *gfp* and driven by cytomegalovirus (CMV) promoter, was used in this study. We found that the GFP was not apparent under normal condition; however, the *gfp* mRNA was transcribed throughout the embryos, indicating that the translation of *gfp* was completely inhibited by the uORF^{*chop*} cassette. Interestingly, when *Tg*(KY43-3) embryos were treated with heat-shock stress, thapsigargin and alcohol, the GFP was greatly detected in these embryos, suggesting that ER stress might direct the uORF^{*chop*} cassette to abolish its translational inhibition. Furthermore, we found that the GFP expression of *Tg*(KY43-3) embryos was able to respond to various environmental pollutant before the embryos died, indicating that *Tg*(KY43-3) embryo may be a great environmental monitoring animal. Taken together, our transgenic line *Tg*(KY43-3) might be an excellent alternative animal model to study the response of embryo against ER or ER- associated stresses, and was capable of being an environmental monitoring animal

which sensitively responded to aquatic pollution.

一、前言

近年來隨著農業、工業的持續發展，化學肥料、農藥、重金屬等大量排入環境中，導致許多環境污染和生態平衡的浩劫。有許多環境污染的實例，如綠牡蠣、痛痛病、水體優養化等等，時常在我們身邊發生，所以我們便對這個議題產生了興趣。

目前主要利用指標生物的死亡做為水質惡化的判斷依據。然而以生物大量死亡為指標，在發現問題產生時卻為時已晚，需要花費大量的時間、金錢、人力來進行污染整治和河川復育。或是頻繁以化學儀器檢測水中污染物含量，則會有成本較高的問題，開發中或未開發國家往往難以負擔。

若是可以找到一個便宜、操作容易、靈敏度適中的水質指標生物，並藉以制定一個水質標準，則必將可以對於水質檢驗方面做出極大貢獻。因此我們希望能提出新的水污染生物指標，能夠在逆境剛開始傷害水中生物時就發出警訊，讓我們可以更及時的對水污染進行處理，且可以提供一個成本較低的水質偵測方式。

有許多研究指出許多污染物或逆境會誘發內質網壓力，進而對生物產生傷害，故偵測內質網壓力的發生可能可以作為環境污染的指標。於是在本研究中，我們希望能建立一個可以偵測內質網壓力的基因轉殖動物以偵測環境污染。

近年來斑馬魚已成為一種重要的模式動物，其優勢在於多產繁殖、胚胎可直接以顯微鏡觀察、基因轉殖容易等等。有鑑於上述之優點，所以我們選用斑馬魚 (*Danio rerio*) 作為模式動物。

二、 文獻探討

內質網壓力與 UPR 反應

內質網(endoplasmic reticulum, ER)是一個由膜組成的胞器，主要可分為粗糙內質網(rough endoplasmic reticulum, RER)與平滑內質網(smooth endoplasmic reticulum, SER)兩部分。ER 主要的功能包括製造蛋白質、幫助蛋白質正確摺疊、控制蛋白質分布、參與醣類與脂質的修飾、維持內質網模內外 Ca^{2+} 濃度等等。幫助蛋白質正確摺疊的是內質網內的伴護蛋白(chaperone)，包括 Binding immunoglobulin protein (BiP)、protein disulfide isomerase (PDI)、70 kDa heat shock proteins (Hsp70s)等。

很多原因皆可造成內質網壓力(ER stress)的發生，如氧化還原反應失衡而影響蛋白質雙硫鍵形成(Chakravarthi *et al.*, 2006)、ER 內 Ca^{2+} 濃度不正確而影響蛋白質折疊(Xu *et al.*, 2005)、酒精亦會使肝臟細胞產生嚴重的 ER stress (Kaplowitz and Ji, 2006)、長時間的高溫可能導致神經細胞內 reactive oxidant species (ROS)累積而產生氧化壓力(Gunes *et al.*, 2009)。而在實驗中，thapsigargin、tunicamycin 等皆常用於誘發內質網壓力，其中 thapsigargin 會抑制 ER 上 Ca^{2+} ATPase 而影響 ER 內的 Ca^{2+} 平衡(Ma and Hendershot, 2004)；tunicamycin 則抑制 N-link glycosylation，影響蛋白質摺疊(Dricu *et al.*, 1997)。

當 ER 受到胞內或胞外的刺激，使未折疊或錯誤摺疊蛋白開始堆積時，會產生 ER stress，並引發一串稱作 unfolded protein response (UPR)的反應：活化 ER 上三個壓力感應蛋白(stress sensor)，分別為 inositol-requiring protein-1 (IRE1)、activating transcription factor 6 (ATF6)、protein kinase RNA-like ER kinase (PERK)。

當壓力感應蛋白被活化後，IRE1 形成 dimer，將 X-box binding protein-1(XBP1) pre-mRNA intron 進行修飾，使之可合成出具有 transcriptional activator 活性的

XBP1s (Calfon *et al.*, 2002)；ATF6 從 ER 運送至高基氏體，經 site1 protease (S1P) 和 site2 protease (S2P) 的切割後進入細胞核中(Haze *et al.*, 1999)並使 ER 中的伴護蛋白(chaperone)表現量增加；PERK 可磷酸化位於 eukaryotic initiation factor-2 α (eIF2 α) 上的 Ser51，抑制 eIF2 β 進行 GDP-GTP 交換及降低將核糖體與 initiator Met-tRNA 結合成複合體(complex)的效率(Scheper *et al.*, 1998; Ashe *et al.*, 2001)，使一般基因的轉譯效率下降、chaperone 基因開啟(Scheuner *et al.*, 2001; Calfon *et al.*, 2002)，以幫助蛋白質折疊。

chop 基因在轉錄與轉譯的調控

C/EBP homologous protein (*chop*) 基因屬 CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family，普遍存在於不同物種之間。*chop* 平時表現量不多，但當遇到 ER stress (Oyadomari and Mori, 2004)時，才會被大量誘導表現。

而 *chop* 的誘發分為轉錄和轉譯層次：轉錄層次上，XBP1、ATF4 分別被前述的 IRE1 及 PERK 被活化後，會分別結合 *chop* promoter 上相對應的位置，而使 *chop* mRNA 大量表現(Oyadomari and Mori, 2004)。在轉譯層次的調控中，由於 *chop* mRNA 上的 5' 不轉譯區(5'UTR)帶有起始密碼子(uAUGs)而帶有一段 upstream open reading frame(uORF)。這段 uORF 平時會抑制下游 *chop* 轉譯，然而 uORF^{*chop*} 的抑制作用在 ER stress 發生時會降低，使之可轉譯出 CHOP 蛋白質(Jousse *et al.*, 2001)，然而其中機制尚不清楚。在核內 CHOP 會和 C/EBP family 成員組合成 hetero dimmers (Ron and Habener, 1992)，此 dimers 會和特定 DNA 序列作結合(Ubeda *et al.*, 1996)，活化 growth arrest-DNA damage protein 34 (GADD34)達到誘發細胞凋亡的功能(Marciniak *et al.*, 2004；Oyadomari and Mori, 2004)。

人類 uORF^{*chop*} 在斑馬魚中調控下游基因表現的特性

在 ER stress 過程中 *chop* 可透過其位在 5 端不轉譯區(5'-untranslated region)的 uORF 序列進行轉譯的調控(Jousse *et al.* 2001)。然而，目前對 uORF 調控下游所接

基因轉譯的機制仍不清楚，過去文獻雖指出一些可能的機制，但是目前 uORF 的研究全是於 *in vitro* 環境中進行，所以在 *in vivo* 環境中的研究顯得更為的重要。故在過去的研究中 Liu (2007)及 Lin (2008)利用當代注射被 cytomegalovirus (CMV) promoter 驅動，接於人類 uORF^{chop} 片段後的 *gfp* 片段，發現人類 uORF^{chop} 在斑馬魚體內也是可以抑制下游基因轉譯的。

將被 cytomegalovirus (CMV) promoter 驅動，接於人類 uORF^{chop} 片段後的 *gfp* 片段利用顯微注射轉殖進斑馬魚體內，構築成穩定的轉殖品系後，即為轉殖品系 Tg(KY43-3)。在 Tg(KY43-3)中人類 uORF^{chop} 的抑制作用與當代注射質體的研究結果類似，且在 Lin (2008)的研究中發現 Tg(KY43-3)胚胎在受到熱休克(heat shock)時，其人類 uORF^{chop} 抑制下游基因表現的作用會減弱，而使綠螢光表現，暗示 Tg(KY43-3)胚胎的綠螢光表現可能反應 ER stress 或內質網相關壓力(ER-associate stress)。

目前用以檢測水質的方法與指標生物

目前已有許多檢測、管制廢水的排放的方法與標準。台灣檢測環境污染的方法分為大致可以分為理化法和生物法。理化法主要藉由各種儀器，如氣相層析儀、液相層析儀、火焰式原子吸收光譜儀.....等，測得水中的各種數值，以懸浮固體、溶氧、生化需氧量、酸鹼度、總磷、氨氮與重金屬等參數評估水質。其優點在於快速、準確、方法標準化；缺點則是難以確切反應污染對水域環境生物的衝擊與影響。現有的生物感測器主要利用酶、抗體、微生物、細胞等作為感測所用的生物材料：當被測物質與生物識別系統發生作用時，產生電、光、熱等反應，再將此信號轉換為可輸出的信號。這種檢測方法有靈敏度高、檢測快速、專一度高等優點，然而這些生物感測器所檢測出的結果仍然只侷限於數值的層次，較沒有實際生物上的意義，和理化法較為相似。

生物法方面，指標生物與生物感測器構想最早由德國生物學家 Kolkwitz and

Marsson (1908)提出，彌補理化方法的缺點，使水質評估完整。於是，利用水質指標生物的方法因而產生，這類方法從生物與生態的角度，評估中長期水質的變化，是一優良靈敏的輔助方法，適合用在長期監測。目前的水質指標生物包括魚類、大型無脊椎動物、大型水生植物、藻類、細菌、節肢動物等等，藉由觀察這些生物受到環境刺激的反應和受到的衝擊程度來評估水質好壞。這個方法主要仰賴觀察水中物種歧異度、某些水中生物的有無、健康狀況等等，較為耗時、費力，且各地生物相不同，每個地方無法沿用相同的標準或方法。

就單一指標生物而言，在利用上也有許多限制，且其大部分是以半數死亡作為判斷。以死亡做為指標，常常在發現污染時水質已經相當糟糕、在復育水體上困難重重；其次，許多水中微生物的死亡是難以判斷的，而會造成研究或檢驗上的困難。而大部分水生藻類或植物是以生長而非死亡當作指標，然而這些藻類大部分需要較長的時間來反應逆境。舉例而言，水蚤(*Daphnia magna*)是一個對水質非常敏感的生物，常作為水質指標；然而其敏感度有時可能會有過高之虞無法適用所大部分水體，且有時其死亡若無外觀上損傷則較難判斷，再者，水蚤的生命周期較短，無法進行長時間試驗。再舉藍鰂魚(*Lepomis macrochirus*, bluegill)為例，藍鰂魚是一種大型魚，亦常用於作為水質指標；然而其對於水質靈敏度事實上並不高，且要分析其健康情形需靠切片、解剖等方法，技術要求方面較高，且其成本相當昂貴。

若可以提出一個環境監測動物，有便宜、使用容易、靈敏度適中的特點，且可以在生物受到不可挽回的傷害以至於死亡前就以一個非常容易判斷的方式發出警訊，並藉以制定一個水質標準，則必將可以對於水質檢驗方面做出極大貢獻。

三、 研究方法與過程

(一)、實驗生物

斑馬魚(*Danio rerio*)胚胎。

(二)、一般化學藥品

Ethanol、thapsigargin (SIGMA)、1-phenyl-2-thiourea (PTU)、CaCl₂、MgSO₄·7H₂O、NaHCO₃、diethylpyrocarbonate (DEPC) (SIGMA)、Paraformaldehyde、Methanol、KCl、Na₂HPO₄·7H₂O、KH₂PO₄、NaOH、HCl、sodium citrate·2H₂O、NaCl、MgCl₂、Tris-HCl、polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20)、Agarose I、Sodium dodecyl sulfate (SDS)、5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (SIGMA)、nitro blue tetrazolium (NBT) (SIGMA)、sucrose、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF)、β-mercaptoethanol、bromophenol、glycerol、glucose、KOAc、chloroform、phenol、isopropanol、CuSO₄·5H₂O、CoCl₂·6H₂O、DIG labeling RNA mix (Roche)、Anti-DIG AP (Roche)、Formamide (SIGMA)、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、sheep serum、Albumin, bovine serum (BSA) (SIGMA)、REzol™ C&T (PROtech)、Tris、Glass beads (SIGMA)、pGEM-T easy vector (Promega)、大滅松 (Dimethoate)、penicillin、streptomycin。

(三)、酵素試劑

SP6 RNA polymerase (Roche)、T4 DNA Ligase (NEB)、Proteinase K (SIGMA)、Tag DNA polymerase (QIAGEN)、M-MLV Reverse Transcriptase (Roche)、DNase I (Promega)、RNase inhibitor (RNasin) (Promega)、RNase A (NEB)、RNase H (BioLab)。

(四)、實驗藥品成分

Embryo medium (EM) : 0.137 M NaCl , 5.4 mM KCl , 0.25 mM Na₂HPO₄ , 0.44 mM KH₂PO₄ , 1.3 mM CaCl₂ , 1.0 mM MgSO₄ , 4.2 mM NaHCO₃ , pH7.2 。

10× PBS : 8% NaCl , 0.2% KCl , 1.42% Na₂HPO₄ , 0.24% KH₂PO₄ , pH 7.3 。

PBST : 1× PBS , 0.1% Tween 20 。

20× SSC : 17.53% NaCl , 7.42% sodium citrate 。

2× SSC : 2× SSC , 0.1% Tween 20 。

0.2× SSC : 0.2× SSC , 0.1% Tween 20 。

solution I : 50 mM glucose , 50 mM EDTA , 25 mM Tris , pH 8.0 。

solution II : 0.2 N NaOH , 1% SDS 。

solution III : 3 M potassium acetate , 5 M acetic acid , pH 4.8 。

Hybridization⁺ buffer : 50% formamide , 4× SSC , 9.2 mM citric acid pH6.0 ,

500 g/mL yeast tRNA , 50 g/mL heparin , 0.1% Tween 20 。

Hybridization⁻ buffer : 50% formamide , 4× SSC , 9.2 mM citric acid pH6.0 ,

0.1% Tween 20 。

Blocking solution : 1× PBST , 1% DMSO , 2% sheep serum (vol/vol) , 2 mg/mL BSA 。

Buffer 9.5 : 100 mM Tris-HCl pH 9.5 , 50 mM MgCl₂ , 100 mM NaCl , 0.1% Tween 20 。

Buffer 2.2 : 0.1 M Glycine-HCl pH2.2 , 0.1% Tween 20 。

Deyolking buffer : 55 mM NaCl , 1.8 mM KCl , 1.25 mM NaHCO₃ 。

1× washing buffer : 110 mM NaCl , 3.5 mM KCl , 2.7 mM CaCl₂ , 10 mM Tris-HCl 。

5× Sample buffer : 1 mM EDTA , 250 mM Tris-HCl pH6.8 , 4% SDS , 2%

β -mercaptoethanol , 0.2% bromophenol 、 50% glycerol 。

running buffer : 25 mM Tris-HCl , 200 mM Glycine , 0.1% SDS 。

transfer buffer : 192 mM Glycine , 25 mM Tris-Base , 0.1% SDS , 20% methanol 。

E3 medium : 5 mM NaCl , 0.17 mM KCl , 0.4 mM CaCl_2 , 0.16 mM MgSO_4 。

protease solution : 1 $\times$ PBS , 0.25% trypsin , 1 mM EDTA , pH8.0 。

stop solution : 1 $\times$ PBS , 30% BSA , 6 mM CaCl_2 。

sorting solution : 1 $\times$ PBS , 5% BSA , 50 U/mL penicillin , 0.05 mg/mL streptomycin 。

suspension medium : 1% BSA , 0.8 mM CaCl_2 , 50 U/mL penicillin , 0.05 mg/mL streptomycin , DMEM 。

(五)、器材

解剖顯微鏡(Leica MZFL III)、螢光光源(Hg 100W and filter set GFP-Plus)、數位相機(Nikon D3)、照相系統(Nikon camera control pro)、分光光度計(Gene Quant pro, Amershan Biosciences)、低溫離心機(eppendorf centrifuge 5415)、FACS Aria cell sorting system (BD)、微量吸管(1000 μL 、200 μL 、100 μL 、20 μL 、2 μL) (GILSON)、28.5 $^{\circ}\text{C}$ 恆溫培養箱、100 mm $\times$ 20 mm dish、55 mm $\times$ 15 mm dish、35 mm $\times$ 15 mm dish、40 μm nylon mesh (Falcon)、5 mL tube (Falcon) 。

Ambion mMESSAGE mMACHINE[®] SP6 Ultra, 1345、QIAGEN RNeasy Mini Kit、GENEAID High-Speed Plasmid Mini Kit、GENEAID Gel/PCR DNA fragments Extraction Kit 。

(六)、引子序列 (源資國際生物科技股份有限公司)

PERK :

forward: 5'-ATggAgCggCCCCTggACAACg-3'

reverse: 5'-TTACgAggTgTCATCAAACAggCT-3'

chop :

forward: 5'-ACAAAgCTTATggTTAACATgAgCgATC-3'

reverse: 5'-TgTgCATTTTCACgCTCTCCACAAgAAgA-3'

SP6 : 5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'

T7-19 : 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'

(七)、實驗步驟

1. 斑馬魚的飼養與胚胎的收集

斑馬魚 zebrafish (*Danio rerio*) 野生種 AB stain, 個體成長至兩個月, 養殖在 28.5 °C、光/暗週期分別 14/10 小時的恆溫培養箱中, 雄、雌成魚比例為 2:3, 約 40 尾, 飼養於 60 cm × 20 cm × 30 cm 的玻璃水族箱中, 以適量的人工乾燥飼料與豐年蝦餵食之。顯微注射前一天, 晚間 11 點, 在恆溫箱即將進入暗週期前, 將魚集中於寵物箱中, 以隔離網隔離, 於隔日早上光週期開始後, 每隔 15~20 min 收集一次魚卵。基因轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 飼養與受精卵取得方式與野生種斑馬魚相同。

2. 顯微注射

將 DNA 或 RNA 利用 zebrafish microinjector (Drummond) 吸入毛細管中, 注射之毛細管直徑開口為 10~15μm, 以毛細管插入一細胞時期之動物極中, 並將 DNA 或 RNA 注入, 所注入的 DNA 或 RNA 量約為 0.0023 μL。

3. 受精卵的培育

將注射過的受精卵培養於裝有等張溶液或色素抑制劑 (1-phenyl-2-thiourea, PTU), 直徑為 10 cm dish 中, 一個 dish 約培養

100 隻胚胎。之後放在 28.5 °C 恆溫箱培養，之後依斑馬魚胚胎生長發育進行連續觀察，並以 hours post fertilization (hpf) (Kimmel *et al.*, 1995)區分發育時期。

4. 以酒精浸泡斑馬魚胚胎

收集 48 hpf 之斑馬魚胚胎並將卵膜(chorion)去除。於直徑 3.5cm dish 中加入 30 隻胚胎。吸乾 dish 內原有之液體後每 dish 加入 3 mL 之 1.5% 酒精 (95% 酒精以 PTU 進行稀釋)。每隔 24 小時換新的酒精，以確保濃度正確。於胚胎 96 hpf 時進行觀察。

5. 以 thapsigargin 處理斑馬魚胚胎

收集 72 hpf 之斑馬魚胚胎。於直徑 3.5 cm dish 中加入 30 隻胚胎。吸乾 dish 內原有之液體後每 dish 加入 3 mL 之 1 μ M thapsigargin (1 mM thapsigargin (SIGMA)以 PTU 進行稀釋)。於胚胎 96 hpf 時進行觀察。

6. 以熱逆境處理斑馬魚胚胎

收集 72 hpf 之斑馬魚胚胎。先取 9 mL 的 PTU 加於 15 mL 離心管中，置於 40 °C 水浴槽預熱 30 min；同時於裝有 1 mL PTU 之 2 mL eppendorf 中加入 30 隻胚胎，置於 28.5 °C。待預熱完畢後，將胚胎加入 15 mL 離心管中以 40 °C 熱處理 40-1 hr。完成後將胚胎放於 28.5 °C 培養。於胚胎 96 hpf 時進行觀察。

7. 以冷逆境處理斑馬魚胚胎

收集 72 hpf 之斑馬魚胚胎。於直徑 3.5 cm dish 中加入 30 隻胚胎。吸乾 dish 內原有之液體後每 dish 加入 3 mL PTU。將胚胎放於 10 °C 或 5 °C 冰箱中 8-12 hr 後取出，放於 28.5 °C 培養。於胚胎 96 hpf 時進行觀察。

8. 以缺氧逆境處理胚胎

先取 PTU，以微波爐煮沸後加於 15 mL 離心管中，加滿後迅速封緊蓋口，置於 28.5 °C 冷卻。待冷卻完畢後，將 30 隻胚胎加入 2 mL eppendorf 中，迅速加入缺氧 PTU 後蓋緊，處理 5-7 hr。完成後將胚胎放於 28.5 °C 培養。於胚胎 96 hpf 時進行觀察。

9. 以重金屬及農藥處理斑馬魚胚胎

收集 72 hpf 之斑馬魚胚胎。於直徑 3.5 cm dish 中加入 30 隻胚胎。吸乾 dish 內原有之液體後每 dish 加入 3 mL 之重金屬或農藥溶液，濃度如下述：CuSO₄ 1 μM，ZnSO₄ 5mM，NiSO₄ 1 mM，CoCl₂ 4mM，Dimethoate 19 μM；皆以 PTU 進行稀釋。於胚胎 96 hpf 時進行觀察。

10. *in vitro* transcription

將 pcDNA-DsRed 及 pcDNA-zfuORF-DsRed 以 SmaI 限制酵素(NEB)切割後以 Geneaid Gel/PCR DNA fragments Extraction Kit 加以回收，製成 DNA 模板。以 Ambion (mMESSAGE mMACHINE® SP6 Ultra, 1345)的 I.V.T. system 合成加有 5'cap 的 mRNA。加入 10 μL 2× NTP mix、2 μL 10× transcription buffer、2 μL SP6 RNA polymerase、6 μL DNA 模板，於 37 °C 作用 2 hr。加入 30 μL RNase-Free Water、30 μL lithium chloride，混合均勻後置於-20 °C overnight。於 4 °C 以 13,000 rpm 離心 30 min，去上清液。加入 1 mL 70%酒精，於 4 °C 13,000 rpm 離心 15 min。去上清液後置於 65 °C 烘乾。加入 50 μL RNase-Free Water 於 65 °C 回溶。樣品置於-20 °C 備用。

11. Polymerase Chain Reaction (PCR)

以設計之 primers，將目標 DNA 片段夾出，以利於選殖於載體上。每一管反應物含核酸模板、10 μM 正負向引子各 1 μL，10 mM dNTP

mix 4 μL , 10 $\times$ reaction buffer 5 μL 及 Tag DNA polymerase (Qiagen) 1 unit 並以去離子水將體積補至 50 μL 。

混合均勻後，於 PCR 儀器中進行如下反應：

(1)94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (2)denaturing 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec (3)annealing 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec
(4)elongation 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec (5)於 72 $^{\circ}\text{C}$ 反應 8 min 完成反應。

其中 annealing 的溫度視 primer 的 T_m 而定；elongation 的時間視所欲夾的 DNA 片段大小而定。(2)~(4)需重複進行 25~35 次。elongation 時間長度 DNA 片段 500 bp 約 30 sec，每多 500 bp 提高 10 sec。

12. DNA 接合反應(Ligation)

將 vector 及欲接入的 insert 經限制酵素切割後，將所需要之片段回收 (Geneaid Gel/PCR DNA fragments Extraction Kit)。分別加入莫耳數比為 1:6 的 vector 與 insert，1 μL 的 10 $\times$ ligase buffer (NEB)，T4 DNA ligase 400 U/ μL (NEB)，加水至總體積為 10 μL ，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 overnight。

13. 大腸桿菌之 transformation

將已備之 plasmid DNA 加入 100 μL 之勝任細胞中，混合置於冰上 20 min，置於 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 sec，置冰上 3 min，加入 1 mL LB，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養 1 hr，離心後將菌液以 L 型玻棒均勻塗在含抗生素之 LB 培養基上，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 氣浴培養 14~16 hr 後可得轉型菌落。

14. 質體製備

將培養基上的菌落以牙籤單獨挑起，培養於裝有 2~5 mL LB 培養液之試管中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴培養 14~16 hr 後可得轉型菌種之菌液。將菌液置於 2 mL eppendorf 中，以 13,000 rpm 離心 5 min，得到含有大腸桿菌之沉澱。使之懸浮於 100 μL 之 solution I 中並以 vortex 混合，再

加入 200 μ L solution II 稍加搖動，再加入 150 μ L solution III，以 13,000 rpm 離心 30 min，收取上清液。加 1/10 體積之 3 M sodium acetate 及 2 倍體積之 99%酒精，置於-20 °C 沈澱，1 hr 後，於 4 °C 以 13,000 rpm 離心 30 min，倒去上清液，沈澱物加入 70%酒精後於 4 °C 以 13,000 rpm 離心 15 min 後烘乾，所得 DNA 以含有 RNase A 之去離子水 20 μ L 回溶。

15. 斑馬魚胚胎 total RNA 抽取

收集特定時期斑馬魚胚胎約 50 隻，加入 1.5 mL eppendorf 中。把多餘的水以 dropper 抽乾後，加入 500 μ L 之 REzol™ C&T (PROtech)，保存於-80 °C 中，可存放數月備用。欲進行實驗時將胚胎自-80 °C 取出，加入少量細玻璃珠後於 4 °C 以震盪器上震盪約 5~10 min。將已震碎之胚胎取出，於 4 °C 以 13,000 rpm 離心 10 min，取上清液。於上清液中加入 1/5 上清液體積之 chloroform（不含 isopropanol），震盪約 30 sec 後於室溫靜置約 5 min，使之分層。於 4 °C 以 13,000 rpm 離心 15 min，取最上層之澄清液體。加入 10 μ L 之 DNase I 於 37 °C 作用 1 hr。加入等體積之 isopropanol，混合均勻後於室溫靜置約 10 min。於 4 °C 以 13,000 rpm 離心 15 min，去上清液後加入 1 mL 70%酒精，於 4 °C 以 13,000 rpm 離心 15 min。去上清液後置於 65 °C 烘乾。加入 50 μ L DEPC water 於 65 °C 回溶。加入 50 μ L 之 8 M LiCl 後置於-20 °C 沉澱 overnight。於 4 °C 以 13,000 rpm 離心 30 min，去上清液。加入 1 mL 70%酒精，於 4 °C 13,000 rpm 離心 15 min。去上清液後置於 65 °C 烘乾。加入 50 μ L RNase-Free Water 於 65 °C 回溶。樣品置於-80 °C 備用。

16. RT-PCR（合成 cDNA）

於 PCR 離心管中加入前實驗所製備之 RNA 1.5 μ g 及 10 mM Oligo dT

1 μ L，總體積以 RNase-Free Water 補至 12 μ L。於 70 °C 作用 3 min。於 PCR 離心管中加入 5 $\times$ M-MLV RT buffer (Roche) 4 μ L、10 mM dNTP mix 2 μ L、RNasin (Promega) 1 μ L。於 42 °C 作用 15 min。加入 M-MLV Reverse Transcriptase (Roche) 1 μ L。於 42 °C 作用 90 min、於 70 °C 作用 15 min。加入 RNase H (NEB) 1 μ L。於 37 °C 作用 30 min、於 70 °C 作用 15 min。合成之 cDNA 置於-20 °C 備用。

17. 合成 DIG labeling riboprobe 所用之 DNA 模板製備

以質體 (pGEMTe-*PERK*、pGEMTe-*chop*、pcDNA-*gfp*) 為模板，以 T7-19 及 SP6 primer 進行 PCR。將 PCR 產物加入等體積 phenol/chloroform (1:1)，劇烈搖晃至樣品呈乳白色混濁狀。以 13,000 rpm 離心 30 min。取上清液，加 1/10 體積之 3 M sodium acetate 及 2 倍體積之 99%酒精，置於-20 °C 沈澱 overnight。於 4 °C 以 13,000 rpm 離心 30 min，倒去上清液，沈澱物加入 70%酒精後於 4 °C 以 13,000 rpm 離心 15 min 後烘乾，加入 RNase-Free Water 於 65 °C 回溶。樣品置於-20 °C 備用。

18. DIG labeling riboprobe 合成

於 1.5 mL 離心管中加入：1.5 μ g 之 DNA 模板、SP6 RNA polymerase (Roche) 20 unit、DIG RNA labeling mix(含 10 mM ATP、10 mM CTP、10 mM GTP、6.5 mM UTP、3.5 mM DIG-labeled UTP, Roche) 1 μ L、10 $\times$ Transcription buffer (Roche) 1 μ L，以經 DEPC 處理之去離子水補體積至 10 μ L。於 37 °C 水浴槽作用 2 hr，加入 DNase I (Promega) 1 unit 並於 37 °C 水浴槽作用 30 min。將樣品體積以經 DEPC 處理之去離子水補體積至 100 μ L 後取 1 μ L 進行電泳，確認產物長度與模板吻合。以 QIAGEN RNeasy Mini Kit 進行回收。將樣品貯存於-20 °C 備用。

19. 原位雜交染色(Whole-mount in situ hybridization, WISH) (Thisse and Thisse, 2007)

以 4% paraformaldehyde (PFA) 固定胚胎後，保存於 -20 °C 95% methanol (MetOH) 中。以 75% MetOH / 25% 1× PBS、50% MetOH / 50% 1× PBS、25% MetOH / 75% 1× PBS wash 各 5 min。以 PBST(1× PBS, 0.1% Tween20 (vol/vol)) wash 4 次，每次 5 min。以 10 µg/mL Proteinase K (SIGMA) 處理。以 PFA 於室溫固定 20 min。以 PBST wash 4 次，每次 5 min。hybridization mix (HM, 50% formamide, 5× SSC, 0.1% Tween 20, 50 mg/ml heparin, 500 mg/mL RNase-free tRNA) 於 65 °C 進行 prehybride 4 hr。將 hybridization mix 200 µL 加入 160~180 ng 前實驗所置備之 riboprobe 於 65 °C 進行 hybridation 16 hr。於 65 °C 以 100% HM wash 2 min。依次於 65 °C 以 75% HM / 25% 2× SSC (2× SSC, 0.1% Tween 20)、50% HM / 50% 2× SSC、25% HM / 75% 2× SSC wash 5 min、2× SSC wash 20 min、0.2× SSC (0.2× SSC, 0.1% Tween 20) wash 2 次，每次 20 min。於室溫以 75% 0.2× SSC / 25% PBST、50% 0.2× SSC / 50% PBST、25% 0.2× SSC / 75% PBST 各 wash 5 min。Blocking buffer (1× PBST, 1% DMSO, 2% sheep serum (vol/vol), 2 mg/mL BSA) 室溫處理 4 hr。再以 anti-DIG-AP (Roche) / Blocking solution 1:8000 於 4 °C 處理 16 hr。室溫下用 PBST 洗 15 min 6 次。Tris buffer 9.5 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) wash 3 次，5 min。NBT/BCIP / Buffer 9.5 4.5 : 3.5 : 1000 於 4 °C 進行呈色，直至 signal 出現。以 PBST wash 5 min，以 Buffer 2.2 wash 2 次，每次 10 min。以 PBST wash 5 min。以 PFA 室溫固定 20 min 後，以 PBST wash 4 次，一次 5 min。以 25% MetOH / 75% PBS、50% MetOH / 50% PBS、75% MetOH / 25% PBS wash 5 min。

以 100% MetOH wash 2 hr 以上。以 75% MetOH / 25% PBS、50% MetOH / 50% PBS、25% MetOH / 75% PBS wash 5 min。以 PBST wash 5 min 後保存於 PFA 中。

20. 斑馬魚胚胎之總蛋白質抽取

將已 dechorion 的胚胎放至 1.5 mL 離心管內，將離心管吸乾，加入 500 μ L Deyolking buffer，以低速震動 2 min，以 4 °C 2000 rpm 離心 30 sec 後丟棄上清液。加入 500 μ L 1 $\times$ washing buffer 低速震動 2 min，以 4 °C 2000 rpm 離心 30 sec 丟棄上清液，並重複此步驟一次。接著以 4 °C 高速離心 5 min，並將上清液徹底抽乾。加入胚胎數 1/5 之 5 $\times$ Sample buffer，並以置於沸水中 5 min，重複上述步驟一次，並將其震碎，spin down 後即取得蛋白質並儲存於-80 °C。

21. 西方浸漬法(western blot)

製備 10% acrylamide gel 浸泡在 running buffer 中，將已純化好的蛋白質加至已做好的 SDS-PAGE well 中，並將空的 well 加入 Sample buffer，以 80 V stacking 30 min 後以 120 V running 1 hr。接著切除 stacking gel。

轉印之前 PVDF membrane 必須浸在 100% methanol 10 min，以 transfer buffer rinse 架設轉印夾，其中 SDS PAGE 靠負極，PVDF 靠正極，以濾紙及海綿夾緊避免空隙產生而導致轉印結果暈開（注意此處濾紙需比 membrane 大）。在 transfer 中注入 transfer buffer，以 100 V、400 mA 進行轉印 1 hr。transfer 結束後以鉛筆先描出 gel 外框以便後續裁剪 membrane，並以 TBST wash 三次，每次 5 min。接著以 5% skim milk/TBST 進行室溫 blocking 1 hr 後，再以 TBST wash 3 次，每次 5 min。接著加入 first antibody (anti-CHOP 1:1000、anti- α tubulin 1:1000)於 4°C incubator overnight。隔日以 TBST wash 6

次，每次 5 min，隨後加入 second antibody 於室溫作用 1 hr，之後以 TBST wash 六次，每次 5 min，再加入 Buffer 9.5 wash 兩次，每次 5 min，即可加入呈色劑 NBT/BCIP/Buffer 9.5 於 4 °C 進行呈色，直至 signal 出現，以 Buffer 2.2 wash 15 min 後即可存於清水中保存。

22. 螢光顯微鏡及照相系統

利用解剖顯微鏡(Leica MZFL III)，配合螢光光源(Hg 100 W and filter set GFP-Plus)，觀察不同時期斑馬魚胚胎發育情形及螢光表現情況。再利用數位相機(Nikon D3)，以照相系統(Nikon camera control pro)進行拍攝。經原位雜交染色的斑馬魚胚胎拍攝方式相同。

23. 斑馬魚胚胎細胞分離(Embryo dissection) (Covassin *et al.*, 2006)

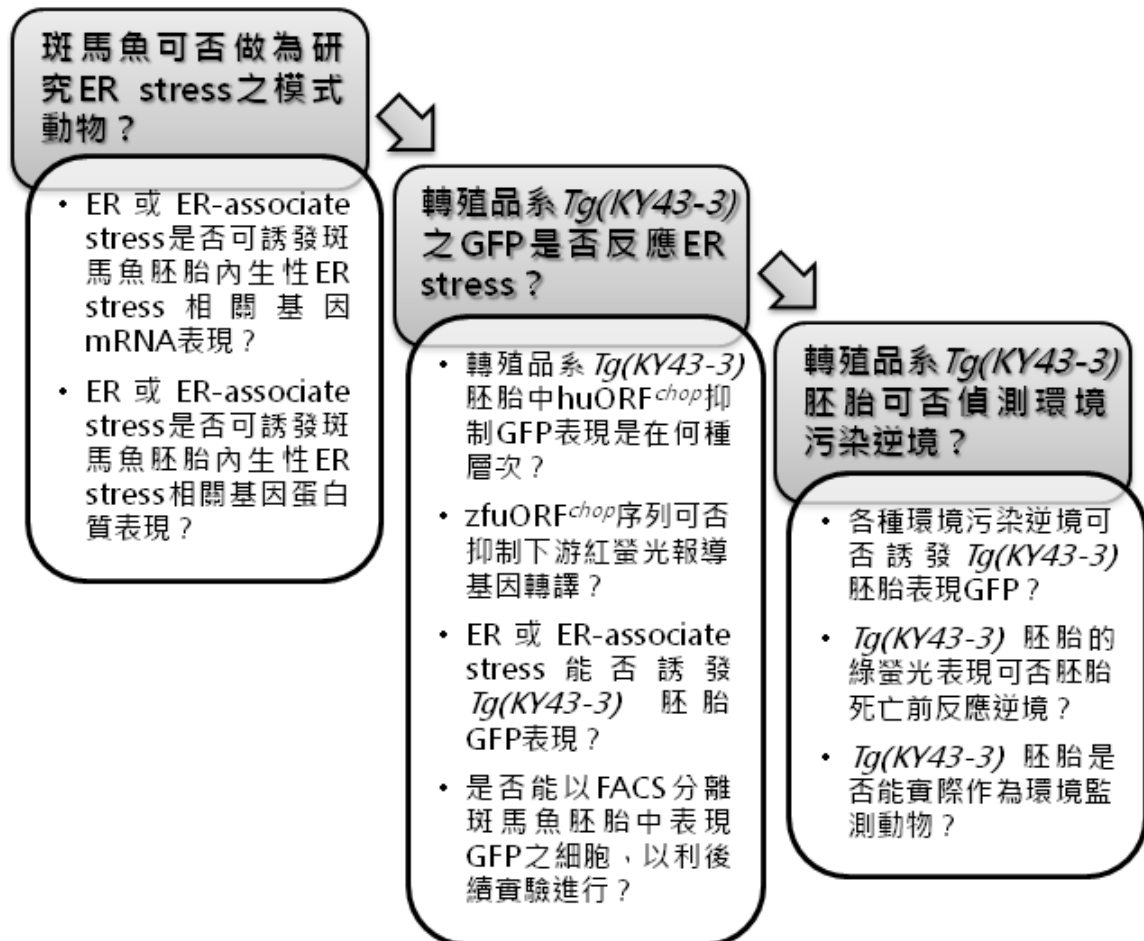
將 400 隻 120 hpf 斑馬魚胚胎以刀片切下頭部，並將頭部收集至 2 mL eppendorf 中。把 2 mL eppendorf 中的水吸乾後，以 E3 medium 潤洗兩次。把 E3 medium 吸乾後將胚胎加到 1.2 mL 28 °C protease solution 中，在 28 °C 反應 10 min。反應完後以 1000 μ L pipetman pipet 50 次打散胚胎組織，放回 28 °C 反應 3 min，重複兩次，以確實將組織打散。細胞均勻分散後，加入 200 μ L stop solution，pipet 50 次後於 28 °C 反應 5 min，以停止 trypsin 反應。反應完後於 4 °C 400 g 離心 5 min，將上清液吸至剩下 100 μ L，加入 1 mL sorting solution，pipet 50 次將細胞打散。若要進行 FACS，則將細胞置於冰上備用。

24. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) (Dobson *et al.*, 2009)

上機前，將溶於 sorting solution 的細胞以 40 μ m nylon mesh 過濾，將濾液收集於 5 mL tube 中。利用 FACS Aria cell sorting system 進行細胞分選。先以 FSC-A（前散射）和 SSC-A（側散射）分析其細胞大小與顆粒性，圈選欲分選細胞群。接著便從圈選區域再以綠螢光進

行二次分析。先利用不含綠螢光之細胞作為控制組進行校正。分選後將 GFP-positive 和 GFP-negative 細胞分別收集於含有 8 mL suspension medium 的 15 mL 離心管中。

(八)、研究過程



四、 研究結果

斑馬魚可以作為研究內質網壓力的模式動物

本研究中篩選兩個與 ER stress 相關，分別為 UPR 反應的上游與下游基因：*PERK* 及 *chop*，並觀察這兩個基因的表現情形。根據已知斑馬魚 *PERK* 序列 (NM_001077149.1) 設計 primer 後利用 PCR 從斑馬魚 cDNA 中夾取 *PERK* 基因。經膠體電泳分析後 (Fig.1 A)，發現在大約 400 bp、600 bp、1000 bp 的位置各發現一條片段。經過比對 GenBank 的序列後，回收位於 1000 bp 位置的片段，並將之接入 pGEM-T easy vector 中，構築成 pGEMTe-*PERK* 質體 (Fig.1 B)。經定序 (源資國際生物科技股份有限公司) 後確認為正確的序列。此外，pGEMTe-*chop* 則由 Liu (2010) 根據 Eichenbaum *et al.* (2009) 設計 primer 後進行構築。

首先，為了確認斑馬魚內生性 *PERK* 及 *chop* 是否反應 ER 或 ER-associate stress，進行以下實驗：在 mRNA 的層次上，以 pGEMTe-*PERK* 及 pGEMTe-*chop* 合成 *PERK* 及 *chop* 之 riboprobe，針對 72 hpf wild type 斑馬魚胚胎進行 WISH (Fig.2)。發現內生性 *PERK* 及 *chop* mRNA 於 72 hpf wildtype 斑馬魚胚胎微量的表現於中腦頂蓋 (tectum) 及後腦 (hindbrain) 中，且表現位置有 co-localize 現象。然而，在經過熱誘導及 thapsigargin 處理後，*PERK* 及 *chop* mRNA 大量的在受刺激的斑馬魚胚胎頭部表現。此外，本實驗中亦選用了酒精做為另一個誘發 ER-associate stress 的藥物。結果顯示受到酒精刺激的斑馬魚胚胎中也有 *PERK* 及 *chop* mRNA 大量表現的情形發生。另一方面，也利用 Q-PCR 偵測經過熱誘導及 thapsigargin 處理的胚胎內生性 *PERK*、*Bip*、*ATF3* 等基因 mRNA 表現情形 (Fig.3)：與 Wild type 斑馬魚胚胎相較，在 72-73 hpf 經過 40 °C 熱誘導的 96 hpf 胚胎 *PERK*、*Bip*、*ATF3* 表現量分別增加 3.1 倍、2.8 倍、2.2 倍；72-96 hpf 經過 1 μ M thapsigargin 處理的胚胎 *PERK*、*Bip*、*ATF3* 表現量分別增加 2.9 倍、4.8 倍、2.9 倍。

由於 CHOP 蛋白質的表現是內質網壓力發生的一個很重要的指標，故在蛋白質層次利用人類 CHOP 抗體，以 western blot 觀察 CHOP 蛋白在受到刺激的斑馬魚胚胎的表現情形(Fig.4)。結果顯示未處理之 wild type 96 hpf 斑馬魚胚胎所萃取之蛋白質在約 26 kDa 及約 30 kDa 偵測到兩條蛋白質表現。而在 72-96 hpf 經過 1 μ M thapsigargin 處理或 48-96 hpf 經過 1.5% 酒精處理，則其 CHOP 蛋白質表現量皆較 wild type 高。

以上結果顯示斑馬魚胚胎內生性各種 ER stress 相關基因的轉錄及轉譯可被各種 ER stress 或 ER-associate stress 所誘發，證明斑馬魚確實可以做為研究 ER stress 的模式動物。

在轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎中人類 uORF^{chop} 可以有效抑制下游報導基因轉譯

了解 ER stress 的反應保守存在於斑馬魚中後，更進一步探討轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 是否可以反應 ER stress 的產生。首先，在未受到任何逆境或藥物刺激的 *Tg(KY43-3)* 胚胎中觀察不到綠螢光的表現(Fig.5 B, C)。然而利用 WISH 觀察 *Tg(KY43-3)* 胚胎 *gfp* mRNA 表現情形，發現在 72 hpf 及 96 hpf 的 *Tg(KY43-3)* 胚胎中 *gfp* mRNA 在頭部、軀幹等位置大量表現(Fig.5 F, G)，推論在 *Tg(KY43-3)* 胚胎中人類 uORF^{chop} 的抑制下游報導基因的作用是在轉譯層次，而且抑制得十分徹底。

在斑馬魚胚胎中斑馬魚 uORF^{chop} 抑制下游基因轉譯的作用和人類 uORF^{chop} 十分相似

由於斑馬魚的 *chop* 基因在 5'UTR 也有一段 uORF，於是更進一步探討斑馬魚 uORF^{chop} 是否也和人類 uORF^{chop} 有類似的作用。首先構築 pcDNA-DsRed 及 pcDNA-zfuORF-DsRed 質體(Fig.6)；此二質體由 CMV promoter 驅動，其後分別帶有 DsRed 基因與前端接有斑馬魚 uORF^{chop} 的 DsRed 基因。將質體線性化後以顯微注射送入一細胞時期斑馬魚胚胎。於 30 hpf 時觀察，發現注射 pcDNA-zfuORF-DsRed 質體的斑馬魚胚胎紅螢光表現量明顯較注射 pcDNA-DsRed

的斑馬魚胚胎低(Fig.6 A, B),顯示斑馬魚 uORF^{chop} 確實可以抑制下游基因的表現。

為了了解斑馬魚 uORF^{chop} 的抑制作用是在轉錄或轉譯層次,顯微注射 *DsRed* 與 zfuORF-*DsRed* mRNA,並觀察其紅螢光表現情形。結果顯示注射 zfuORF-*DsRed* mRNA 的斑馬魚胚胎中幾乎沒有紅螢光表現,與注射 *DsRed* mRNA 的胚胎差異很大(Fig.6 C, D),顯示斑馬魚 uORF^{chop} 和人類 uORF^{chop} 同樣在轉譯層次抑制下游報導基因轉譯,且抑制作用相當徹底。

帶有人類 uORF^{chop}-GFP 片段的轉殖品系 Tg(KY43-3)胚胎之綠螢光表現可反應其內生性內質網壓力發生

過去 *in vitro* 的研究指出人類 uORF^{chop} 在 ER stress 發生時會失去抑制下游 chop 基因轉譯作用(Jousse *et al.*, 2001)。

在前述研究結果中可以發現在斑馬魚胚胎中斑馬魚 uORF^{chop} 和人類 uORF^{chop} 的特性十分相似,故人類 uORF^{chop} 或許可以在斑馬魚胚胎中作為 ER stress 發生的指標。於是以 thapsigargin 和酒精分別處理 Tg(KY43-3)胚胎,並觀察其螢光表現情形。結果發現經過 thapsigargin 和酒精處理的 Tg(KY43-3)胚胎皆在腦部表現綠螢光(Fig.7)。其中經過 thapsigargin 處理的 Tg(KY43-3)胚胎中,腦部大量表現綠螢光且其綠螢光表現多集中在後腦中軸;在經過酒精處理的 Tg(KY43-3)胚胎中,腦部大量表現綠螢光且其綠螢光表現多集中在後腦。而對照其 chop mRNA 表現情形,顯示在受到 thapsigargin 和酒精刺激的 Tg(KY43-3)胚胎的綠螢光和 chop mRNA 表現位置是有 co-localize 的情形的。

由此可知在受到 ER stress 或 ER-associated stress 的 Tg(KY43-3)胚胎中,huORF^{chop}-GFP 片段可反應斑馬魚胚胎內生性 ER stress 和 ER-associated stress 反應,進而以綠螢光的形式表現。

轉殖品系 Tg(KY43-3)胚胎可以對各種環境污染逆境產生反應

由於希望更進一步利用 *Tg*(KY43-3)胚胎可反應 ER stress 的特性來進行環境污染物的檢測，故嘗試以各種不同的環境污染逆境來處理 *Tg*(KY43-3)胚胎。本研究將所採用的逆境粗略分為物理性逆境、重金屬、其他。

以物理性逆境(Fig.8 B-D)處理胚胎：高溫、低溫、缺氧。於 72-73 hpf 經 40 °C 高溫逆境處理的 *Tg*(KY43-3)胚胎，於腦部(brain)、脊柱(spinal cord)、下顎(jaw)、皮膚(skin)與胸鰭(fin)等位置可觀察到大量綠螢光表現；於 72-84 hpf 經 10 °C 低溫逆境處理之 *Tg*(KY43-3)胚胎，於腦部與脊柱可觀察到微量的綠螢光表現。於 72-75.5 hpf 經缺氧處理之胚胎，於腦部可觀察到綠螢光表現。

以重金屬逆境(Fig.7 E-H)處理胚胎：ZnSO₄、CoCl₂、NiSO₄、CuSO₄。於 72-96 hpf 經 0.5 mM ZnSO₄ 處理的 *Tg*(KY43-3)胚胎，於腦部、後半部軀幹肌肉束可觀察到大量綠螢光表現。於 72-96 hpf 經 1 mM CoCl₂ 處理的 *Tg*(KY43-3)胚胎，於腦部、肌肉束可觀察到大量綠螢光表現，其中以腦部表現量較多。於 72-96 hpf 經 1 mM NiSO₄ 處理的 *Tg*(KY43-3)胚胎，於腦部、肌肉束可觀察到大量綠螢光表現，其中肌肉束表現的螢光較強。於 72-96 hpf 經 1 μM CuSO₄ 處理的 *Tg*(KY43-3)胚胎，於皮膚可以觀察到大量斑點狀綠螢光表現。

以農藥(Fig.8 I)處理胚胎：大滅松(Diamethoate)。於 72-96 hpf 經 19 μM Dimethoate 處理的 *Tg*(KY43-3)胚胎，可於腦部、肌肉束觀察到微量綠螢光表現。

Acrylamide 為一種神經毒素，常用於工業，並存在於油炸食品中，而過量長期暴露於 acrylamide 的環境下亦可能致癌。(Fig.8 J)於 72-96 hpf 經 6.25 mM acrylamide 處理的 *Tg*(KY43-3)胚胎，可於腦部、脊柱觀察到綠螢光表現。

從研究結果中可以發現經過這些逆境處理後的 *Tg*(KY43-3)胚胎皆表現不同型態的綠螢光，且在未經刺激的 control 組中看不到任何綠螢光表現的情形，顯示 *Tg*(KY43-3)胚胎可以反應各種環境污染逆境，且對於不同的逆境產生不同螢光型態。

轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎的綠螢光可以在死亡前反應逆境

為了探討受逆境刺激後的 *Tg(KY43-3)* 胚胎綠螢光表現和胚胎死亡的關係，接下來以不同濃度的 CoCl_2 於 72-96 hpf 處理轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎，以了解 *Tg(KY43-3)* 胚胎在受到不同強度的逆境的反應(Fig.9)。從結果中可以看到在 CoCl_2 濃度為 1 mM 時綠螢光開始表現，而沒有任何死亡的發生。然而隨著 CoCl_2 濃度上升，螢光表現率在濃度高於 1.5 mM 後開始維持在 15-20%之間，而反觀胚胎死亡率隨著 CoCl_2 濃度上升而持續攀升，顯示 *Tg(KY43-3)* 胚胎的綠螢光表現可以在胚胎死亡前反應逆境。

轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎可實際做為偵測水質的環境感測生物。

在前述實驗證明 *Tg(KY43-3)* 胚胎的綠螢光可以反應各種環境汙染逆境，且可以在胚胎死亡前反應逆境。故接下來欲更進一步測試 *Tg(KY43-3)* 胚胎是否可以用來檢測實際水體水質。於是與水體採樣公司合作，取得實際地面水體浸泡 *Tg(KY43-3)* 胚胎。(Fig.10)為 2010 年 9 月 7 日於台南縣仁德鄉二仁溪鯽潭橋測站取得水樣，於 72-120 hpf 時浸泡 *Tg(KY43-3)* 胚胎。結果可看出浸泡後之胚胎於軀幹皮膚表現大量綠螢光，和(Fig.7 H)浸泡 CuSO_4 的 *Tg(KY43-3)* 胚胎十分相似。再對照行政院環保署所提供之測站水體資料，由其所含重金屬成分中可看出，水體中 Cu^{2+} 超標，高達 0.104 mg/L。推測 *Tg(KY43-3)* 胚胎不但可以對實際水體產生反應，更可以反應其汙染成分，使其應用價值更高。

五、 討論

以轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎作為研究內質網壓力的模式動物

內質網壓力已被證明參與一些神經病變疾病，如阿茲海默症、帕金森氏症、亨丁頓舞蹈症等(Lindholm *et al.*, 2006)，而且近年來一些研究指出許多常見的環境污染逆境，如鎘(cadmium, Cd) (Kitamura and Hiramatsu, 2010)、砷(arsenic, As) (Del Razo *et al.*, 2001)、缺氧(hypoxia) (Bi *et al.*, 2005)等等也被指出會誘發內質網壓力。但目前關於內質網壓力的研究都集中在 *in vitro* 層次，而缺乏 *in vivo* 層次的研究，故這些逆境或疾病對於生物體的影響或致病機制目前仍未被研究透徹。所以建構一個理想的研究內質網壓力的模式動物是十分重要的。

thapsigargin 是一種可以藉由抑制 ER Ca^{2+} -ATPase，改變胞內 Ca^{2+} 濃度(Thastrup *et al.*, 1990)，進而造成內質網的功能異常，並在過去研究中被普遍用於誘發 ER stress 的一種藥物。實驗結果顯示，在斑馬魚胚胎內 *PERK*、*chop*、*Bip*、*ATF3* mRNA 以及 CHOP 蛋白質可以被熱誘導、thapsigargin 或酒精誘發而大量表現。這顯示高等脊椎動物 ER stress 的調控路徑保守的存在於斑馬魚中，證明斑馬魚確實可以做為研究 ER stress 的模式動物。

現有唯一可以螢光反應內質網壓力的基因轉殖動物為 Iwawaki *et al.* 在 2004 年發表的 ERAI-transgenic mice。其利用 *XBP1* 基因表現時會進行 splicing switch 的特性對內質網壓力產生反應。然而 *XBP1* 在正常生理上具有功能，故在平時亦會產生 mRNA splicing switch 的現象。在未經誘導下，ERAI-transgenic mice 的肌肉(muscle)以及胰腺(pancreas)等部位也會表現綠螢光，導致 leaky 的現象，而無法精確辨認微弱的內質網壓力。且 *XBP1* mRNA splicing switch 在一些逆境，如高溫逆境中不會發生，故無法用以辨認這些逆境。反之 *chop* knockout mice 並無特殊的 phenotype 產生(Oyadomari *et al.*, 2001)，顯示 *chop* 基因可能並未參與正常生理發育的調控。

本研究中所使用的轉殖品系 *Tg(KY43-3)*，雖然其胚胎體內 *gfp* mRNA 於全身都有表現，但在未經任何處理的胚胎中完全沒有螢光表現。顯示人類 *uORF^{chop}* 在 *Tg(KY43-3)* 胚胎中徹底抑制下游基因轉譯。且在研究結果中，經 thapsigargin 或酒精刺激的胚胎中表現大量 GFP，且其 GFP 表現位置與 *PERK* 及 *chop* mRNA 表現位置 co-localize，顯示 *Tg(KY43-3)* 胚胎的綠螢光表現可以作為內質網壓力發生的指標，故 *Tg(KY43-3)* 可以做為研究內質網壓力的理想模式動物。

目前小鼠被常用於進行內質網壓力相關的各種病理研究，包括缺氧、胎兒酒精症候群(fetal alcohol syndrome, FAS)等等，但是在其實驗操作上困難度與使用條件上皆有其限制與瓶頸：小鼠若要進行缺氧實驗，必須先以手術移除或阻塞其血管，而斑馬魚只需浸泡於缺氧水中即可達到類似效果；而若要研究酒精對胎兒的影響，則需控制母體小鼠之血液酒精濃度，然而這其實相當難以辦到，而以斑馬魚胚胎做實驗則只需將胚胎浸泡於所欲使用的濃度即可。此外，小鼠的胚胎於母體內發育，無法即時觀察到胚胎發育的過程與其病理成因，若欲進行觀察則必須犧牲母鼠與小鼠，而斑馬魚胚胎透明，可即時觀察，較沒有這方面的限制。

以轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎作為環境污染逆境的指標

在一個生態系中，各個層級的生物（如水蚤、青將魚、藻類、羅漢魚）是否皆能正常生存、覓食、繁殖是維繫生態平衡的主要因素。然而，現行的各種污染數值、標準，多是針對污染對人類的影響所訂定，再以理化法進行檢測後，比對數值並加以評估污染狀態。如此顯然對於生態保育上不甚理想，故需搭配以不同的指標生物觀察，才能達到較好的污染監控效果。而目前的水污染模式生物，相對缺乏以脊椎動物胚胎進行研究；然而在一個水域生態系中，魚的胚胎與幼體是否可以生存、正常成長事實上是相當重要的。若是胚胎無法生存，則族群的繁衍即會大受影響以至於滅絕。而 *Tg(KY43-3)* 胚胎即可以彌補這方面的不足。更可以完善整個生物指標系統。

在前述的研究結果中顯示 *Tg*(KY43-3)胚胎所表現的綠螢光可以反應內質網壓力的產生。且在研究結果中發現 *Tg*(KY43-3)胚胎會在受到高溫、缺氧、重金屬、農藥等逆境刺激時會表現綠螢光，顯示 *Tg*(KY43-3)胚胎可以反應這些逆境。而利用不同濃度之 CoCl_2 處理 *Tg*(KY43-3)胚胎的實驗結果，證明 *Tg*(KY43-3)胚胎確實可以在生物受到不可修復的傷害前對逆境做出反應。而在實際應用方面，*Tg*(KY43-3)胚胎亦可對實際河川水體的污染產生反應，且其螢光表現形態反應水體的成分。以上結果顯示 *Tg*(KY43-3)胚胎的應用價值相當高。除此之外，Table 1 也針對不同水中生物對 Cu^{2+} 逆境的反應及其靈敏度進行整理。由表格中可以看到：除了水蚤 (*Daphnia magna*)外，其於水中動物皆是以死亡(mortality)來當作污染的指標。以死亡當作指標是有其壞處的：首先，而表中大部分水生藻類或植物是以生長(growth)而非死亡當作指標，然而這些藻類大部分需要較長的時間來反應逆境，且其靈敏度也不甚理想。

和這些水中模式生物相比，轉殖品系 *Tg*(KY43-3)胚胎在偵測環境污染物上是有其優勢的。由於其利用綠螢光表現來當作水污染的指標，且其綠螢光可以在胚胎死亡前表現，故其對於逆境的反應是十分敏銳的且反應快速，在別的模式生物需要 72-96 hr 時，*Tg*(KY43-3)胚胎只需要 24 hr 來進行反應。另一方面，在反應靈敏的同時，*Tg*(KY43-3)胚胎的綠螢光表現同時也有很高的專一度：在沒有受到逆境刺激的胚胎中完全觀察不到綠螢光表現的情形，不會造成實驗觀察上的誤判。而且 *Tg*(KY43-3)胚胎可以反應很多種逆境，不只是對特定逆境反應，應用範圍較廣。

另一方面，這裡也整理了一個比較以理化方法與 *Tg*(KY43-3)胚胎偵測環境污染的比較表格(Table 2)。以各種理化方法分析水質則可以將各種數值，如 pH、各種重金屬、有機溶劑……等，精密且完整地檢驗出來。然而，這些方法往往需要利用各種精密的儀器與藥劑，且需有大量專業操作人員才能進行分析，在成本上較為高昂，是以在檢驗頻率以及採樣點的數目上會有所限制，較適合在重點保護區、已開發國家長期定時檢測。而利用 *Tg*(KY43-3)胚胎則無法了解各種污染物的

精確含量，只可以看出水中污染物的綜合毒性。然而其優勢在於低廉的成本，且其反應具有生物上的意義，故可以用來當作日常監控水質的一個偵測器，也較適合開發中或未開發國家的水質偵測。

以轉殖品系 *Tg(KY43-3)*作為研究各種環境污染逆境的模式動物

近年來斑馬魚已成為一種重要的研究模式動物，其優勢在於多產繁殖，母魚可以定期下蛋而且每次產下大量胚胎；各器官於受精後五天發育完成，生長至性成熟只需三個月；胚胎透明，可不需做任何干預即可以顯微鏡觀察；容易進行顯微注射，可注射 RNA 或 Morpholino 以過量表現或抑制特定基因；以顯微注射進行基因轉殖容易，可建構各種轉殖品系以供研究使用。此外，斑馬魚在進行各種逆境處理是相當便利的。與大型魚類相比，斑馬魚無論進行各種逆境處理，其所需的空間、器材、操作的難易度上皆具有優勢。

而在本研究中所提出的轉殖品系 *Tg(KY43-3)*可以以綠螢光即時反應各種環境污染逆境的特性使其亦具有作為研究水污染逆境模式動物的價值。

在前述的研究結果中，可以發現 *Tg(KY43-3)*胚胎的綠螢光表現對於溫度的逆境是有反應的。在 heat-shock 方面，在許多生物中均被發現與 Hsp70、Hsp90 等基因有關，且其反應途徑、傷害機制等皆被研究得較為透徹。然而在 cold shock 的方面研究相對稀少，且大部分集中在植物的抗凍、抗寒機制，而較少動物在 cold shock 方面的研究。在養殖漁業技術的發展上，抗寒一直是一個相當重要的題目，卻一直無法找到適合的模式動物進行研究。而 *Tg(KY43-3)*胚胎的綠螢光會反應 cold shock，或可提供這方面的一個研究途徑。

此外，斑馬魚在進行藥物篩檢上也是常用的模式動物，而 *Tg(KY43-3)*胚胎無疑是一個篩選各種抗逆境的方式的一個優秀工具。

六、 結論與應用

在本研究中欲利用斑馬魚建構一個研究內質網壓力與環境污染逆境的平台，並加以應用在水質檢測的方面。研究結果顯示：

- (一)、斑馬魚可以做為研究內質網壓力之模式動物。
- (二)、轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎可以作為研究內質網壓力的模式動物。
- (三)、轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎可以用來偵測環境污染逆境，且有其獨特的優勢存在。

在應用的方面，*Tg(KY43-3)* 胚胎主要可以應用在兩方面：由於 *Tg(KY43-3)* 胚胎的綠螢光可以反應各種環境污染逆境，故可做為研究環境污染物刺激方面的模式動物：可利用斑馬魚便宜、多產、可即時觀察胚胎等等特點，進行污染物對胚胎發育影響或是抗逆境藥物篩選的研究。且在研究結果中可看出，對於不同的逆境，*Tg(KY43-3)* 胚胎於不同的組織或部位表現綠螢光，顯示其亦可用來研究這些逆境對於不同組織造成傷害的機制與路徑。

此外，*Tg(KY43-3)* 胚胎也顯示出其在水質監測上的潛力：可以在水中生物死亡前反應逆境，且斑馬魚胚胎成本較化學儀器測量低廉，故做為未開發或開發中國家的水質偵測工具相當具有潛力。目前淨水廠對於取水地點的水質檢測方式多以原水養殖小魚，觀察其死亡率或健康程度，藉以評估原水毒性；而 *Tg(KY43-3)* 胚胎的應用也可以嘗試使用此種方式，且所占空間、所需時間皆較以小魚做指標為低。

七、 未來展望

為了在未來的研究中利用 microarray 分析表現 *Tg(KY43-3)* 胚胎中綠螢光的細胞是否有特殊的基因表現，參與其 ER stress 調控路徑或影響其 *huORF^{chop}* 抑制下游報導基因表現的能力，故嘗試以 FACS 將 *Tg(KY43-3)* 胚胎中表現綠螢光與未表現綠螢光的細胞分離。(Fig.11)為將轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎以酒精處理後，嘗試以 FACS 分離其表現綠螢光與未表現綠螢光細胞的結果。先利用 FSC/SSC 分析其細胞大小與顆粒性，圈選欲分選細胞群。接著便圈選較密集細胞群再以綠螢光進行二次分析。結果發現進行 FACS 前，未經任何處理的 *Tg(KY43-3)* 胚胎中 GFP-positive 細胞占 0%，而 GFP-negative 細胞占 100%。而進行 FACS 前，經酒精處理的胚胎，GFP-positive 細胞占 1.9%，而 GFP-negative 細胞占 97.3%。接著進行 FACS，將酒精處理之胚胎細胞分離後再次分析，發現 GFP-positive 細胞中表現螢光的占 93.1%，而仍有部分細胞未表現螢光，占 6.6%；而 GFP-negative 細胞中表現螢光的占 0%，而未表現螢光占 100%。再以螢光顯微鏡觀察所分離之細胞，可觀察到 GFP-positive 細胞確實表現綠螢光，而顆粒大小差異不大；GFP-negative 細胞不表現綠螢光，而顆粒大小同樣差異不大。顯示確實可利用 FACS 分離 *Tg(KY43-3)* 胚胎中表現綠螢光與未表現綠螢光的細胞，未來可以以 microarray 分析其基因表現情形，更進一步了解斑馬魚胚胎中 ER stress 的機制或環境汙染逆境對於胚胎的傷害。

而未來的研究方向主要可以分為三部分：

(一)、更加實際、詳細的探討 *Tg(KY43-3)* 胚胎作為環境監測動物的能力與特性：

1. 與行政院農委會殘毒管制組合作，以更多種不同的環境逆境刺激胚胎，觀察其反應；並以不同濃度或強度之逆境處理胚胎，以更加强解其對逆境的反應程度、靈敏度。
2. 持續請水檢公司採取污染與未污染實際水體，並用以處理 *Tg(KY43-3)*

胚胎，以更加了解其在實際偵測水質的實用性，且其反應與現行各種指標、數值的關係。

3. 進一步實測是否亦可利用 *Tg(KY43-3)*成魚進行環境污染的檢測。

(二)、深入了解在 *Tg(KY43-3)*胚胎中 ER stress 的路徑與其體內 huORF^{chop} 抑制下游報導基因的機制：

1. 以 microarray 分析 *Tg(KY43-3)*胚胎中表現綠螢光的細胞基因表現情形，更進一步了解斑馬魚胚胎中 ER stress 的機制或環境汙染逆境對於胚胎的傷害。

(三)、進一步了解 *Tg(KY43-3)*胚胎的綠螢光表現與胚胎死亡的關係：

1. 將 *Tg(KY43-3)*胚胎以逆境處理，直到觀察到綠螢光產生後，將胚胎移至正常環境培養，觀察其是否可以存活並成長成成魚。
2. 將 *Tg(KY43-3)*胚胎以逆境處理，直到觀察到綠螢光產生後，繼續以逆境處理，觀察其綠螢光出現至死亡所需的時間。

八、 參考資料

- Abel, E. L. (1981). Behavioral teratology of alcohol. *Psychol Bull*, 90(3), 564-581.
- Abel, E. L. (2006). Fetal alcohol syndrome: a cautionary note. *Curr Pharm Des*, 12(12), 1521-1529.
- Ashe, M. P., Slaven, J. W., De Long, S. K., Ibrahimo, S., & Sachs, A. B. (2001). A novel eIF2B-dependent mechanism of translational control in yeast as a response to fusel alcohols. *EMBO J*, 20(22), 6464-6474.
- Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., & Fafournoux, P. (2004). Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem*, 279(7), 5288-5297.
- Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., et al. (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J*, 24(19), 3470-3481.
- Bilotta, J., Barnett, J. A., Hancock, L., & Saszik, S. (2004). Ethanol exposure alters zebrafish development: a novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicol Teratol*, 26(6), 737-743.
- Blader, P., & Strahle, U. (1998). Ethanol impairs migration of the prechordal plate in the zebrafish embryo. *Dev Biol*, 201(2), 185-201.
- Blais, J. D., Filipenko, V., Bi, M., Harding, H. P., Ron, D., Koumenis, C., et al. (2004). Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. *Mol Cell Biol*, 24(17), 7469-7482.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., et al. (2002).

- IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92-96.
- Chakravarthi, S., Jessop, C. E., & Bulleid, N. J. (2006). The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep*, 7(3), 271-275.
- Carvan, M. J., 3rd, Loucks, E., Weber, D. N., & Williams, F. E. (2004). Ethanol effects on the developing zebrafish: neurobehavior and skeletal morphogenesis. *Neurotoxicol Teratol*, 26(6), 757-768.
- Chen, G., Ma, C., Bower, K. A., Shi, X., Ke, Z., & Luo, J. (2008). Ethanol promotes endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death: involvement of oxidative stress. *J Neurosci Res*, 86(4), 937-946.
- Deanovic, L., Connor, V. M., Knight, A. W., & Maier, K. J. (1999). The use of bioassays and toxicity identification evaluation (TIE) procedures to assess recovery and effectiveness of remedial activities in a mine drainage-impacted stream system. *Arch Environ Contam Toxicol*, 36(1), 21-27.
- Dricu, A., Carlberg, M., Wang, M., & Larsson, O. (1997). Inhibition of N-linked glycosylation using tunicamycin causes cell death in malignant cells: role of down-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor in induction of apoptosis. *Cancer Res*, 57(3), 543-548.
- Feldman, D. E., Chauhan, V., & Koong, A. C. (2005). The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors. *Mol Cancer Res*, 3(11), 597-605.
- Gunes, S., Dirik, E., Yis, U., Seckin, E., Kuralay, F., Kose, S., et al. (2009). Oxidant

- status in children after febrile seizures. *Pediatr Neurol*, 40(1), 47-49.
- Galanis, A., Karapetsas, A., & Sandaltzopoulos, R. (2009). Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signalling. *Mutat Res*, 674(1-2), 31-35.
- Ginsburg, K. A., Blacker, C. M., Abel, E. L., & Sokol, R. J. (1991). Fetal alcohol exposure and adverse pregnancy outcomes. *Contrib Gynecol Obstet*, 18, 115-129.
- Girling, A. E., Pascoe, D., Janssen, C. R., Peither, A., Wenzel, A., Schafer, H., et al. (2000). Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicol Environ Saf*, 45(2), 148-176.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, 10(11), 3787-3799.
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M. J., Wozniak, D. F., Koch, C., Genz, K., et al. (2000). Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287(5455), 1056-1060.
- Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., & Miura, M. (2004). A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med*, 10(1), 98-102.
- Jousse, C., Bruhat, A., Carraro, V., Urano, F., Ferrara, M., Ron, D., et al. (2001). Inhibition of CHOP translation by a peptide encoded by an open reading frame localized in the chop 5'UTR. *Nucleic Acids Res*, 29(21), 4341-4351.
- Kaplowitz, N., & Ji, C. (2006). Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 Suppl 3, S7-9.

- Kaplowitz, N., & Ji, C. (2006). Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 Suppl 3, S7-9.
- Karntanut, W., & Pascoe, D. (2002). The toxicity of copper, cadmium and zinc to four different Hydra (Cnidaria: Hydrozoa). *Chemosphere*, 47(10), 1059-1064.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 203(3), 253-310.
- Kitamura, M., & Hiramatsu, N. (2010). The oxidative stress: endoplasmic reticulum stress axis in cadmium toxicity. *Biometals*.
- Kojima, C., Ramirez, D. C., Tokar, E. J., Himeno, S., Drobna, Z., Styblo, M., et al. (2009). Requirement of arsenic biomethylation for oxidative DNA damage. *J Natl Cancer Inst*, 101(24), 1670-1681.
- Koritzinsky, M., Magagnin, M. G., van den Beucken, T., Seigneuric, R., Savelkoul, K., Dostie, J., et al. (2006). Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control. *EMBO J*, 25(5), 1114-1125.
- Lodhi, H. S., Khan, M. A., Verma, R. S., & Sharma, U. D. (2006). Acute toxicity of copper sulphate to fresh water prawns. *J Environ Biol*, 27(3), 585-588.
- Lu, P. D., Jousse, C., Marciniak, S. J., Zhang, Y., Novoa, I., Scheuner, D., et al. (2004). Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. *EMBO J*, 23(1), 169-179.
- Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2004). ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat*, 28(1-2), 51-65.

- Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., et al. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 18(24), 3066-3077.
- Meijer, H. A., & Thomas, A. A. (2002). Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem J*, 367(Pt 1), 1-11.
- Novikoff, A. B. (1976). The endoplasmic reticulum: a cytochemist's view (a review). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(8), 2781-2787.
- Oyadomari, S., & Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*, 11(4), 381-389.
- Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., et al. (2001). Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10845-10850.
- Rasheva, V. I., & Domingos, P. M. (2009). Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*, 14(8), 996-1007.
- Ron, D., & Habener, J. F. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*, 6(3), 439-453.
- Rutkowski, D. T., & Kaufman, R. J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*, 14(1), 20-28.
- Sanchez, D., Graca, M. A., & Canhoto, J. (2007). Testing the use of the water milfoil (*Myriophyllum spicatum* L.) in laboratory toxicity assays. *Bull Environ Contam*

Toxicol, 78(6), 421-426.

Scheper, G. C., van der Knaap, M. S., & Proud, C. G. (2007). Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease. *Nat Rev Genet*, 8(9), 711-723.

Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., et al. (2001). Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*, 7(6), 1165-1176.

Sherba, M., Dunham, D. W., & Harvey, H. H. (2000). Sublethal copper toxicity and food response in the freshwater crayfish *Cambarus bartonii* (Cambaridae, Decapoda, Crustacea). *Ecotoxicol Environ Saf*, 46(3), 329-333.

Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R., & Dawson, A. P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(7), 2466-2470.

Thisse, C., & Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc*, 3(1), 59-69.

Ubeda, M., Wang, X. Z., Zinszner, H., Wu, I., Habener, J. F., & Ron, D. (1996). Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol*, 16(4), 1479-1489.

Vattem, K. M., & Wek, R. C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(31), 11269-11274.

Xu, C., Bailly-Maitre, B., & Reed, J. C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*, 115(10), 2656-2664.

Zhang, H., Duncan, G., Wang, L., Liu, P., Cui, H., Reddan, J. R., et al. (2007). Arsenic trioxide initiates ER stress responses, perturbs calcium signalling and promotes apoptosis in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res*, 85(6), 825-835.

九、 附錄：圖表

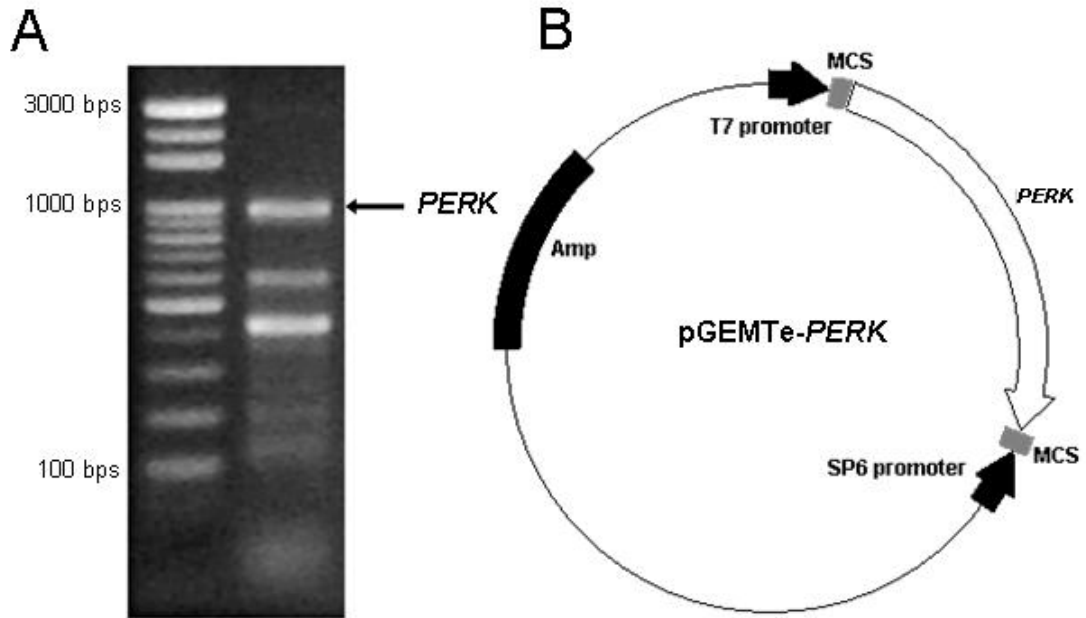


Figure 1. 以 PCR 夾出 *PERK* 片段之膠體電泳分析圖(A)與 pGEMTe-*PERK* 質體(B)。

利用所設計之 *PERK* 引子自 72 hpf 斑馬魚 cDNA 夾出 *PERK* 基因，並將產物以 2% Agarose 膠體電泳分析。發現位於約 400 bps、600 bps、1000 bps 位置各有一條清晰的 major band。回收位於 1000 bps 大小之片段並接入 pGEM-T easy vector 後，構築成 pGEMTe-*PERK* 質體。

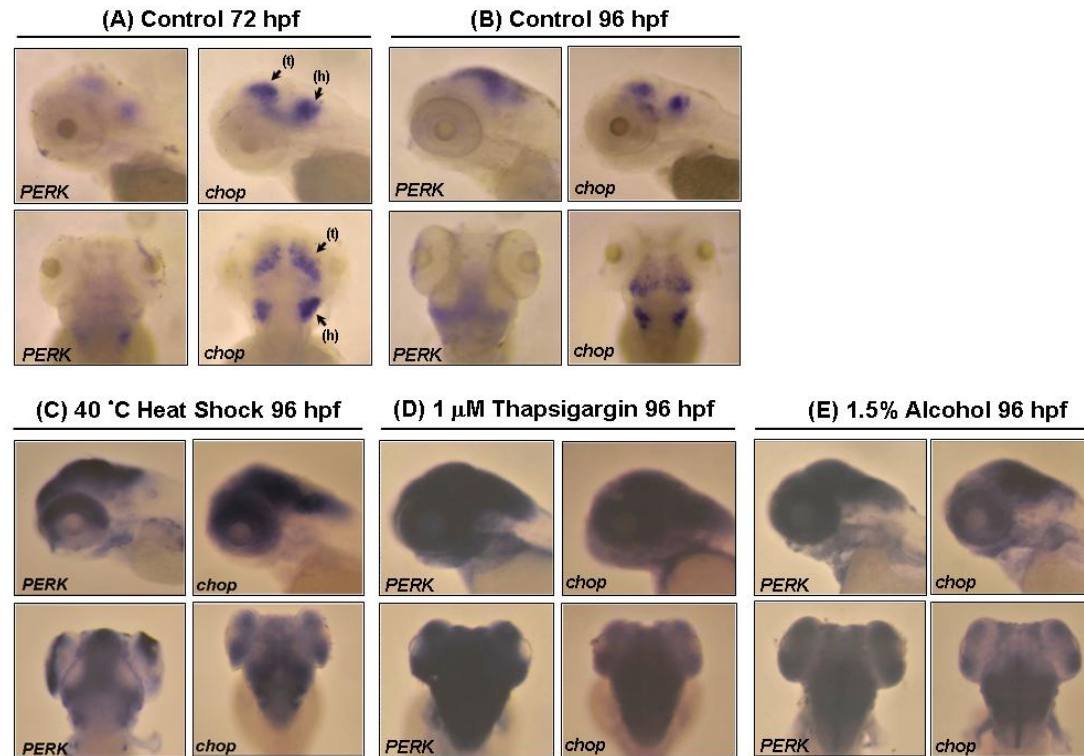


Figure 2. 熱誘導、thapsigargin 及酒精等 ER 或 ER-associate stress 可誘發斑馬魚胚胎內生性 *PERK* 及 *chop* mRNA 表現。利用 WISH 觀察斑馬魚胚胎內生性 *PERK* 及 *chop* mRNA 表現位置。在未經誘導的(A) 72 hpf 及(B) 96 hpf 的斑馬魚胚胎中，*PERK* 及 *chop* mRNA 微量而專一地表現在中腦頂蓋(tectum, t)及後腦(hindbrain, h)的位置。而(C)在 72-73 hpf 經過 40 °C 熱誘導的 96 hpf 胚胎當中可以發現 *PERK* 及 *chop* mRNA 皆大量表現於頭部，但 *PERK* 表現範圍較 *chop* 小；在(D) 72-96 hpf 經過 1 μ M thapsigargin 處理的胚胎當中可以發現 *PERK* 及 *chop* mRNA 皆大量表現於頭部，其表現範圍較經熱誘導胚胎大；在(E) 48-96 hpf 經過 1.5% 酒精處理的胚胎也可以觀察到 *PERK* 及 *chop* mRNA 大量表現於頭部的情形，但表現範圍及表現量較經 thapsigargin 處理的胚胎小，較集中在後腦。

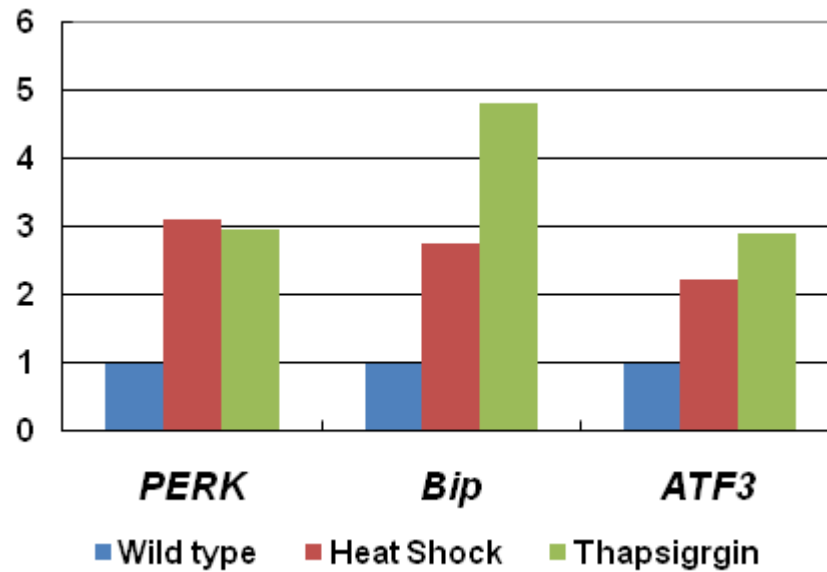


Figure 3. 經過熱誘導和 thapsigargin 處理的斑馬魚胚胎內生性 *PERK*、*Bip* 與 *ATF3* mRNA 表現量增加。
 利用 Q-PCR 偵測經逆境誘導之斑馬魚胚胎內生性 *PERK*、*Bip* 與 *ATF3* mRNA 表現量 (以 elongation factor-1 α (EF-1 α)作為 internal control)，並以 Wild type 斑馬魚胚胎的此三 mRNA 表現量定為 1 後比較其 relative level。由圖中可看出在 72-73 hpf 經過 40 °C 熱誘導的 96 hpf 胚胎 *PERK* 表現量增加 3.1 倍、*Bip* 表現量增加 2.8 倍、*ATF3* 表現量增加 2.2 倍；72-96 hpf 經過 1 μ M thapsigargin 處理的胚胎 *PERK* 表現量增加 2.9 倍、*Bip* 表現量增加 4.8 倍、*ATF3* 表現量增加 2.9 倍。

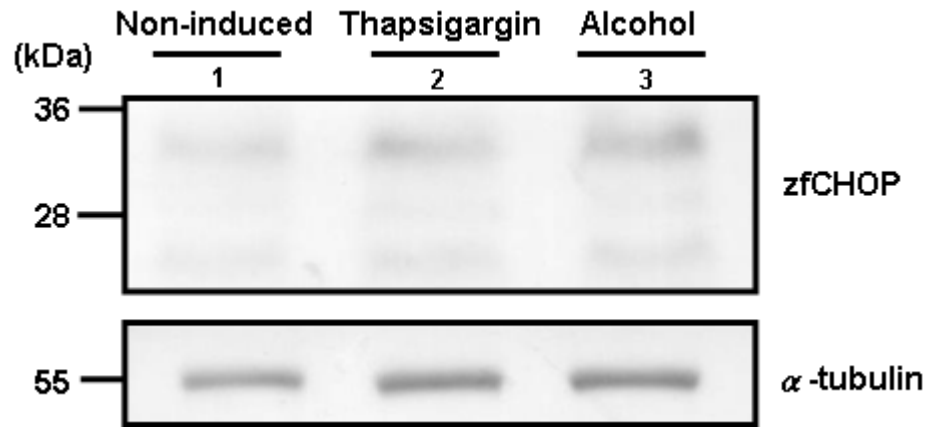


Figure 4. 經過 thapsigargin 與酒精誘導的斑馬魚胚胎 CHOP 蛋白質表現量增加。

利用 western blot 分別觀察經過誘導與未經誘導的斑馬魚胚胎中 CHOP 蛋白質的表現量 (α -tubulin 作為 internal control)。以 96 hpf wild type 斑馬魚胚胎作為 control (lane 1)，以人類 CHOP 抗體可偵測在約 26 kDa 及約 30 kDa 偵測到兩條蛋白質表現。若在 72-96 hpf 經過 1 μ M thapsigargin 處理 (lane 2) 或 48-96 hpf 經過 1.5% 酒精處理 (lane 3)，則其 CHOP 蛋白質表現量皆較 wild type 高。

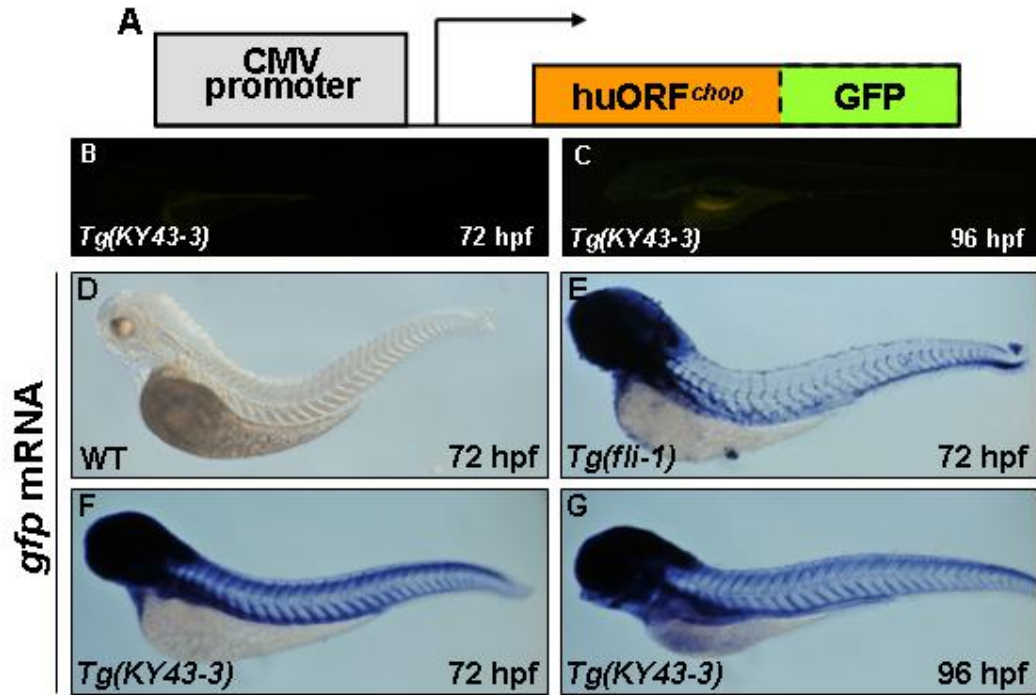


Figure 5. 轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎中 $huORF^{chop}$ 抑制 GFP 表現是在轉譯層次。

利用 WISH 觀察未經藥物誘導的轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎中 *gfp* mRNA 表現。其中 72 hpf wild type 斑馬魚胚胎(D)及 72 hpf *Tg(fli-1)* 胚胎(E)分別做為 negative control 及 positive control，確認所用之 *gfp* riboprobe 之專一性。(A)為轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 體內所帶有的基因片段。(B) (C)顯示未經處理的轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎不表現綠螢光，然而在(F) (G)中可以觀察到 *gfp* mRNA 在轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎中於頭部、軀幹等位置大量表現。

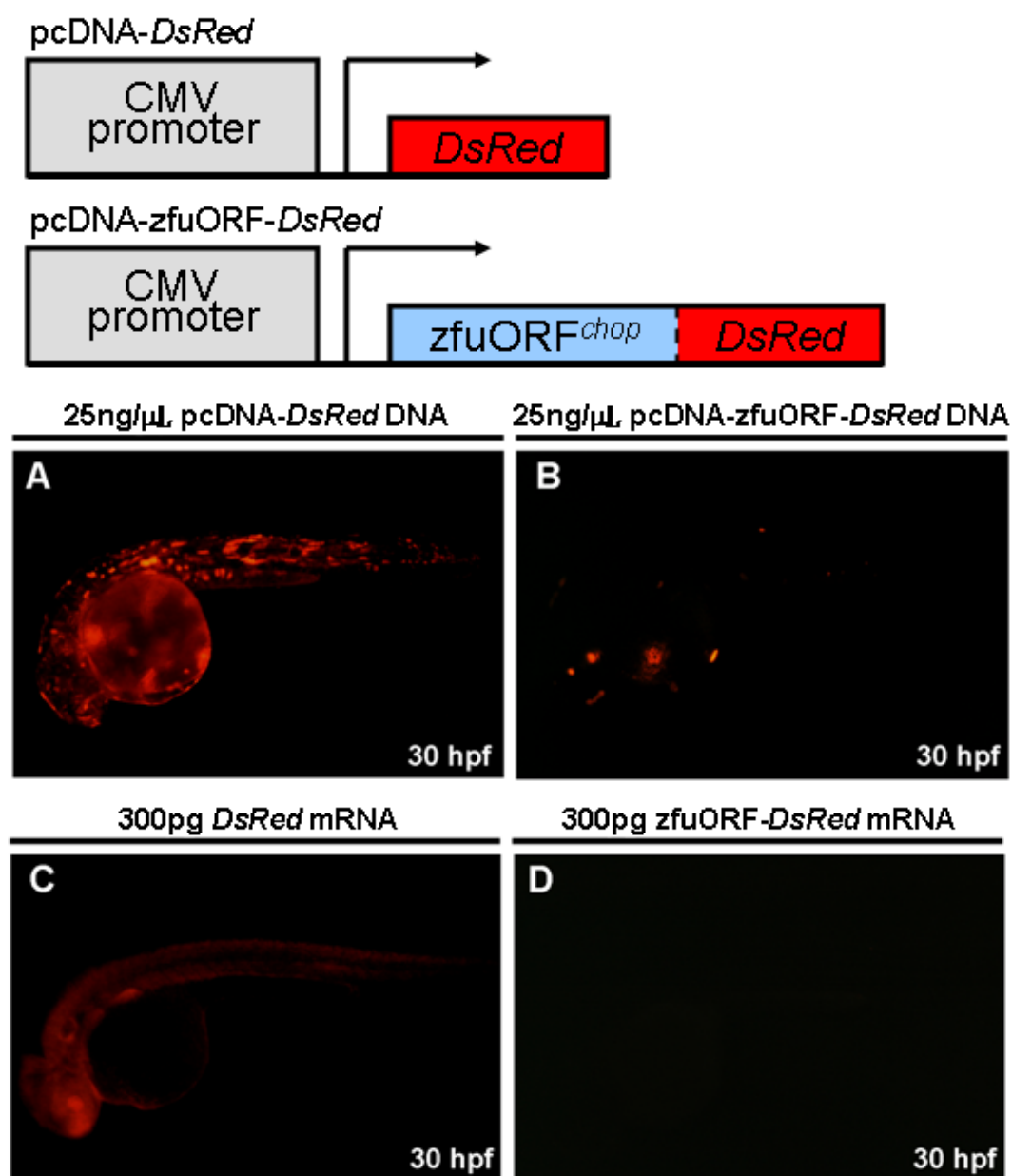


Figure 6. zfuORF^{chop} 序列可抑制下游紅螢光報導基因轉譯。
 注射線性化後的 pcDNA-*DsRed*、pcDNA-zfuORF-*DsRed*，即是由 CMV promoter 驅動的 *DsRed* 及 zfuORF-*DsRed* DNA 片段。發現(A) 注射 pcDNA-*DsRed* 的斑馬魚胚胎其紅螢光於全身斑點狀的大量表現，然而在(B)注射 pcDNA-zfuORF-*DsRed* 的斑馬魚胚胎則明顯只於在局部區域表現小量紅螢光。而(C)注射 *DsRed* mRNA 片段的斑馬魚胚胎中紅螢光在全身大量均勻的表現，相反的，(D)注射 zfuORF-*DsRed* mRNA 片段的胚胎則觀察不到紅螢光表現的情形。

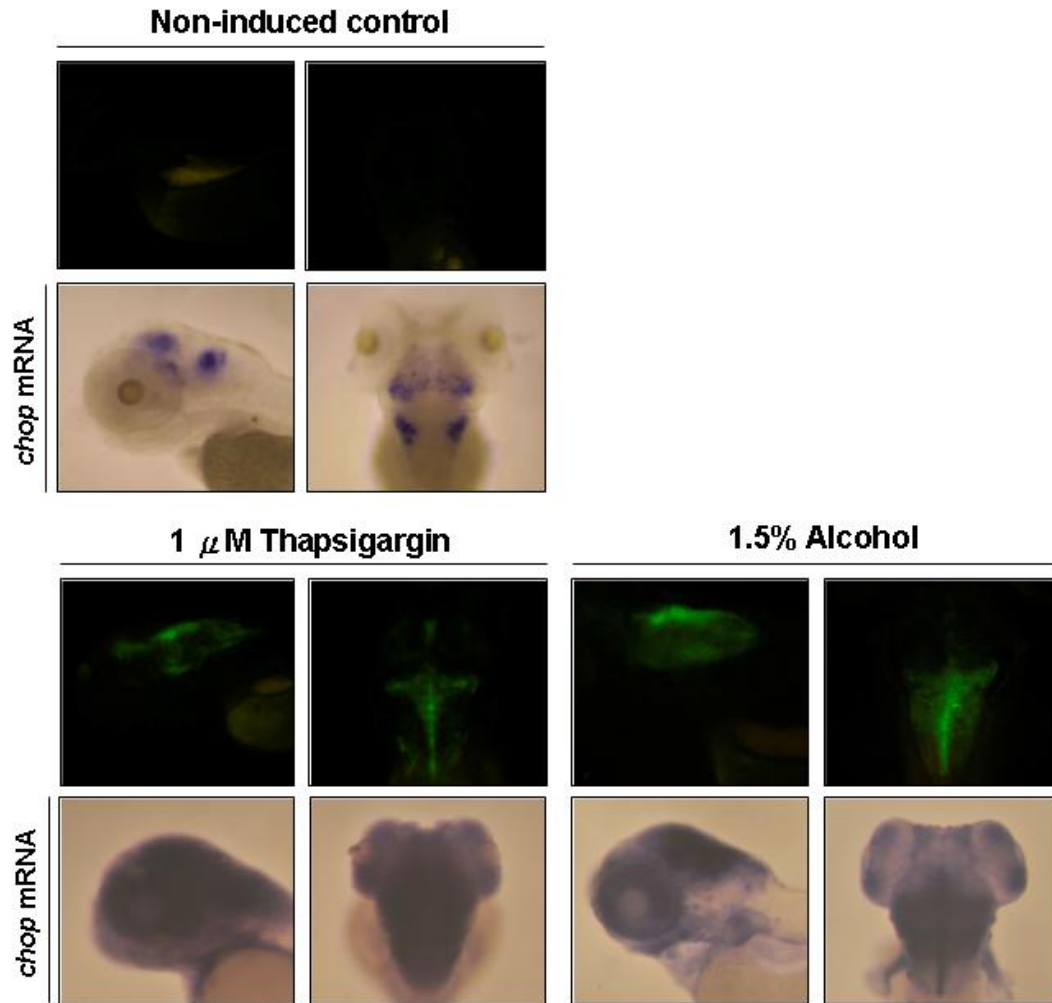


Figure 7. thapsigargin 及酒精皆能誘發 *Tg(KY43-3)* 胚胎綠螢光表現，且其與 *chop* mRNA 表現位置相似。

在未經處理的情況下，96 hpf *Tg(KY43-3)* 胚胎不表現綠螢光；而其 *chop* mRNA 微量地表現在中腦頂蓋及後腦的位置。然而，在經過 thapsigargin 處理的 *Tg(KY43-3)* 胚胎中，腦部大量表現綠螢光且其綠螢光表現多集中在後腦中軸；其 *chop* mRNA 皆大量表現於頭部。在經過酒精處理的 *Tg(KY43-3)* 胚胎中，腦部大量表現綠螢光且其綠螢光表現多集中在後腦；其 *chop* mRNA 皆大量表現於頭部，亦多集中於後腦部分。由圖中可看出，經誘導後 *Tg(KY43-3)* 胚胎綠螢光表現與 *chop* mRNA 有 co-localize 的情形。

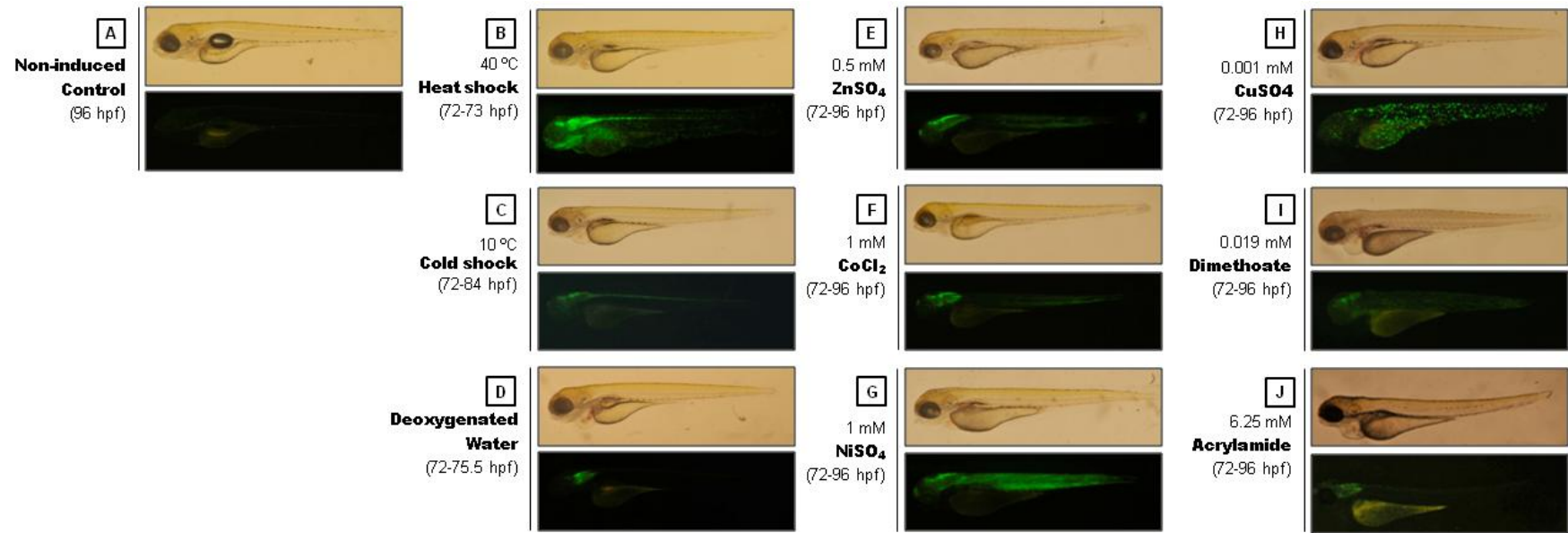


Figure 8. 經各種環境污染物或逆境處理的 96 hpf *Tg(KY43-3)* 胚胎皆會表現大量綠螢光。
 (A)為培養於 28.5 °C、未經逆境處理之 96 hpf *Tg(KY43-3)* 胚胎，作為 control 組。(B)-(D)為經過物理性逆境處理的 *Tg(KY43-3)* 胚胎。(B)於 72-73 hpf 經 40 °C 高溫逆境處理，於腦部(brain)、脊柱(spinal cord)、下顎(jaw)、皮膚(skin)與胸鰭(fin)等位置可觀察到大量綠螢光表現。(C)為 72-84 hpf 經 10 °C 低溫逆境處理之胚胎，於腦部與脊柱可觀察到微量的綠螢光表現。(D)為 72-75.5 hpf 經缺氧處理之胚胎，於腦部可觀察到綠螢光表現。(E)-(H)為經過重金屬處理之 *Tg(KY43-3)* 胚胎。(E)為 72-96 hpf 經 0.5 mM ZnSO_4 處理的胚胎，於腦部、肌肉束可觀察到大量綠螢光表現。(F)為 72-96 hpf 經 1 mM CoCl_2 處理的胚胎，於腦部、肌肉束可觀察到大量綠螢光表現。(G)為 72-96 hpf 經 1 mM NiSO_4 處理的胚胎，於腦部、肌肉束可觀察到大量綠螢光表現，其中肌肉束表現的螢光較強。(H)為 72-96 hpf 經 1 μM CuSO_4 處理的胚胎，於皮膚可以觀察到大量斑點狀綠螢光表現。(I)為 72-96 hpf 經 19 μM Dimethoate 處理的胚胎，可於腦部、肌肉束觀察到微量綠螢光表現。(J)為 72-96 hpf 經 6.25 mM Acrylamide 處理的胚胎，可於腦部、少部分於脊柱觀察到綠螢光表現。

以不同濃度之 CoCl_2 處理之*Tg(KY43-3)*胚胎螢光表現率與死亡率

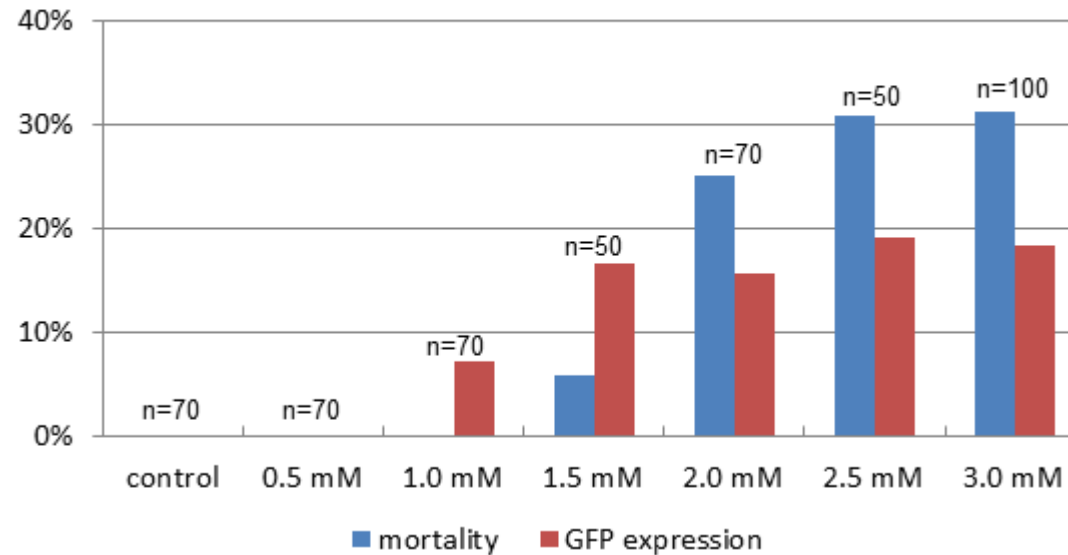
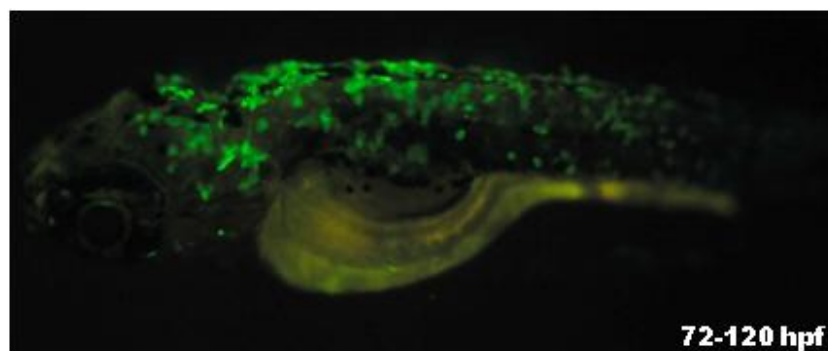


Figure 9. *Tg(KY43-3)*胚胎的綠螢光表現可在胚胎死亡前反應逆境。

以不同濃度之 CoCl_2 自 72 hpf 至 96 hpf 浸泡 *Tg(KY43-3)* 胚胎，並觀察其綠螢光表現率。紅色長柱代表經過 CoCl_2 處理的 *Tg(KY43-3)* 胚胎綠螢光表現率，而藍色長柱代表死亡率。由圖中可以看出在所浸泡的 CoCl_2 濃度在 0.5 mM 以下時不會有胚胎死亡或綠螢光表現。而濃度在 1.0 mM 以上胚胎開始表現綠螢光，但綠螢光表現率在 1.5 mM 以上呈現持平狀態，不隨濃度上升而增加。胚胎在 CoCl_2 濃度超過 1.5 mM 後開始出現死亡的情形，且死亡率隨著 CoCl_2 濃度上升而呈現不斷攀升的情形。



台南縣 仁德鄉 二仁溪 鯽潭橋測站 (RPI : 8.25)

採樣日期	時間	銅 (mg/L)	鉛 (mg/L)	六價鉻 (mg/L)	銅 (mg/L)	鋅 (mg/L)
2010/09/07	11:10	<0.001	<0.003	<0.002	0.104	0.052
資料來源： 行政院環保署		汞 (ug/L)	砷 (mg/L)	硒 (mg/L)	錳 (mg/L)	銀 (mg/L)
		<0.3	0.0124	<0.001	0.261	<0.001

Figure 10. *Tg(KY43-3)* 胚胎可實際作為環境監測動物。

與水體採樣公司合作，取得實際地面水體浸泡 *Tg(KY43-3)* 胚胎。2010 年 9 月 7 日於台南縣仁德鄉二仁溪鯽潭橋測站取得水樣，於 72-120 hpf 時浸泡 *Tg(KY43-3)* 胚胎。圖中可看出浸泡後之胚胎於軀幹皮膚表現大量綠螢光。而由行政院環保署所提供之水體所含重金屬成分中可看出，水體中 Cu^{2+} 超標，高達 0.104 mg/L。

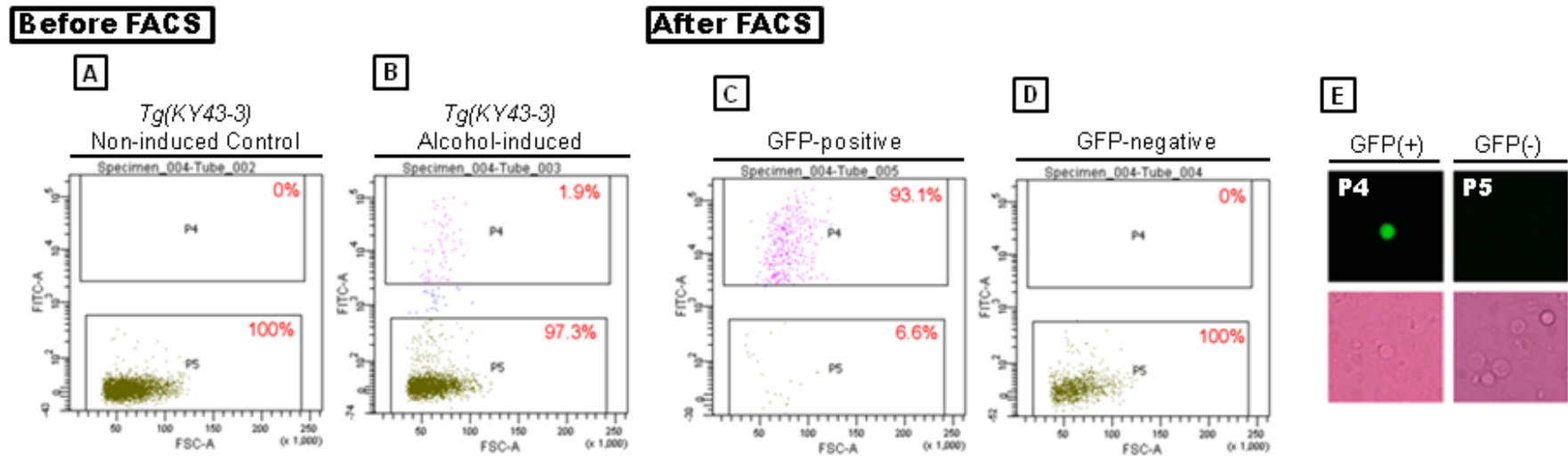


Figure 11. 將轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎以酒精處理後，可以利用 FACS 分離胚胎中表現 GFP 之細胞。

於 120 hpf 將轉殖品系 *Tg(KY43-3)* 胚胎頭部切下，並將其細胞打散後以 FSC/SSC 分析其細胞大小與顆粒性，圈選較密集細胞群後分析。(A)進行 FACS 前，未經任何處理的胚胎，GFP-positive 細胞(P4)占 0%，而 GFP-negative 細胞(P5)占 100%。(B)進行 FACS 前，經酒精處理的胚胎，GFP-positive 細胞占 1.9%，而 GFP-negative 細胞占 97.3%。(C)將酒精處理之胚胎細胞進行 FACS 後再次分析，發現 GFP-positive 細胞中表現螢光的占 93.1%，而未表現螢光占 6.6%。(D) 將酒精處理之胚胎細胞進行 FACS 後再次分析，發現 GFP-negative 細胞中表現螢光的占 0%，而未表現螢光占 100%。(E)以螢光顯微鏡觀察所分離之細胞，可觀察到 GFP-positive 細胞(GFP (+))確實表現綠螢光，而顆粒大小差異不大；GFP-negative 細胞(GFP (-))不表現綠螢光，而顆粒大小同樣差異不大。

模式生物		指標	時間	Cu ²⁺ mg/L	reference
72 hpf Tg(KY43-3) embryo		GFP Expression	24 h-EC₅₀	0.064	Present work
藻類(Algae)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Growth	72 h-EC ₅₀	0.079	Girling <i>et al.</i> , 2000
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Growth	72 h-EC ₅₀	0.12	
	<i>Euglena gracilis</i>	Growth	120 h-EC ₅₀	7.9	
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Growth	96 h-EC ₅₀	0.008	Deanovic <i>et al.</i> , 1999
	<i>Skeletonema costatum</i>	Growth	120 h-EC ₅₀	0.995	Environmental Fate and Effects Division. US EPA, Washington, DC, 2000
原生動物(protozoa)	<i>Hydra vulgar</i>	Mortality	96 h-LC ₅₀	0.056	Karntanut and Pascoe, 2002
	<i>Hydra oligartisi</i>	Mortality	96 h-LC ₅₀	0.084	
	<i>Hydra viridissima</i>	Mortality	96 h-LC ₅₀	0.025	
甲殼綱動物(crustacean)	<i>Cambarus robustus</i>	Mortality	24 h-LC ₅₀	3.48	Sherba <i>et al.</i> , 2000
	<i>Orconectes rusticus</i>	Mortality	24 h-LC ₅₀	2.5	
	<i>Gammarus pulex</i>	Mortality	48 h-LC ₅₀	0.047	Girling <i>et al.</i> , 2000
	<i>Daphnia magna</i>	Immobility	48 h-EC ₅₀	0.072	Environmental Fate and Effects Division. US EPA, Washington, DC, 2000
輪蟲(rotifera)	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Mortality	24 h-LC ₅₀	0.026	Girling <i>et al.</i> , 2000
魚類	<i>Lepomis macrochirus</i>	Mortality	96 h-LC ₅₀	0.355	Environmental Fate and Effects Division. US EPA, Washington, DC, 2000

Table 1. 不同水中模式生物對於 Cu²⁺ 逆境之反應指標與靈敏度之比較表。

將模式生物分為 Tg(KY43-3)胚胎、藻類(Algae)、原生動物(protozoa)、甲殼綱動物(crustacean)、輪蟲(rotifera)，以及魚類後比較其對 Cu²⁺ 逆境反應靈敏度。其中受到 Cu²⁺ 逆境傷害的指標分為綠螢光表現(GFP expression)、生長(growth)、死亡(mortality)、靜止(immobility)；時間方面分為 24 h、48 h、72 h、96 h 及 120 h。其中 LC₅₀ 代表半數致死濃度，適用於以死亡做為指標的模式生物，指的是一定時間內造成指標生物半數死亡之水中 Cu²⁺ 濃度。EC₅₀ 則代表半數影響濃度，適用於以綠螢光、生長等做為指標的模式生物。其中 72 hpf Tg(KY43-3)是以綠螢光表現 24 h-EC₅₀ 做為定義。

	<i>Tg</i> (KY43-3)胚胎	理化分析
獨特優勢	利用 ER stress 機制，可反應污染毒性的生物意義、成本低廉	制度成熟、快速、成分分析精準
檢測成本	較低	數萬台幣（每一樣本）
監測頻率	連續監測	次數受成本限制
角色定位	日常監控	定期全方面檢測
監測對象	工業區、田間、貧窮國家	人類密集處、重點保護區
檢驗地點	就地監測（行動測站）	一定距離內
適用對象	降低工業廢水監測處理成本	精準嚴格之環境定期檢測

Table 2. 以生物法 *Tg*(KY43-3)胚胎與理化分析法偵測污染之比較表。

針對成本與使用對象方面比較生物法 *Tg*(KY43-3)胚胎與理化法之間的特性。以理化法能精確分析水樣成份、標準快速，完整保護人類及水質監控，其數據能反映採樣瞬間的水質；以 *Tg*(KY43-3)胚胎則能偵測長期多重污染所造成的魚體傷害且成本相較低廉許多。