

2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050010

參展科別 動物學

作品名稱 泌乳素(Prolactin)對斑馬魚鈣離子平衡的影響

得獎獎項 大會獎：三等獎

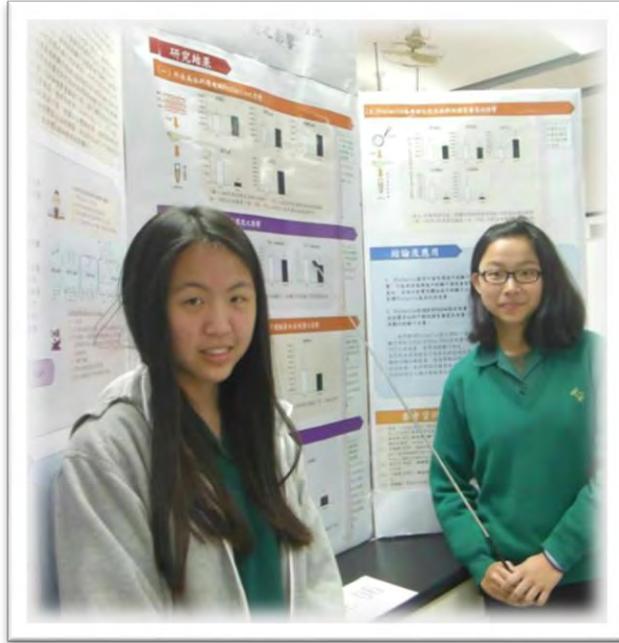
就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 孫譽真、黃鵬鵬

作者姓名 吳玟蓉、林亭妤

關鍵字 斑馬魚、鈣離子、泌乳素

作者簡介



我們是吳玟蓉和林亭妤，目前就讀臺北市立第一女子高級中學。學校設的數理資優班讓我們有機會進入中研院細生所黃鵬鵬老師實驗室參與動物學方面研究，於前年開始進行本專題研究。我們本身熱愛生命科學，閒暇時間經常前往聆聽一些生物研究的盛會，也參與台北市中等學校學生研究獎助計畫。在實驗過程及學習生命科學中，我們期勉自己能不斷探問並且永保熱情。非常感謝實驗室的大力支持和父母、師長同學的教導及鼓勵，讓我們無論在實驗操作或者思考邏輯皆精進許多。未來期望能更進一步探討本研究的各個面向，使其於生活層應用臻完備。

摘要

鈣離子在人類生理及代謝功能扮演著重要角色，已知泌乳素對哺乳類鈣離子吸收頗為重要。但在魚類生理上則缺乏這方面的研究。本實驗以斑馬魚為模式生物，探討泌乳素如何參與斑馬魚鈣離子的調控。實驗結果發現斑馬魚胚胎適應於不同鈣離子濃度中，泌乳素及其受體無明顯變化。然而將泌乳素基因弱化時，除鈣離子含量顯著下降外，鈉離子及氯離子含量亦顯著下降；另外，泌乳素基因弱化會造成斑馬魚鈣離子通道、維生素 D 受體顯著上升，而降鈣素則顯著下降；而鈣吸收細胞在發現泌乳素基因弱化後，細胞數量亦顯著下降。本研究結果可得知，泌乳素對鈣離子吸收具有相當程度的重要性，可能機制為泌乳素在上游端藉由調節其他賀爾蒙來影響鈣離子吸收。

Abstract

Calcium is critical for survival in all biological system. Previous studies suggested that prolactin may stimulate Ca^{2+} absorption in mammals. However, less is known about the prolactin regulation in Ca^{2+} absorption in fish so far. The aim of this study is to use zebrafish as a model to identify prolactin involved in Ca^{2+} absorption. First results indicate that mRNA expression of prolactin and prolactin receptors have no change in different concentration of Ca^{2+} environment. Secondly, the Ca^{2+} content, even Na^{+} and Cl^{-} content of zebrafish embryo are all significant decrease by knockdown prolactin. Knockdown of prolactin increase the mRNA expression of Ca^{2+} channel and Vitamin D receptor, while reduce mRNA expression of stanniocalcin. Finally, Knockdown of prolactin could severely reduce Calcium-absorption cell density. Taken together, this study demonstrated for that prolactin may up-regulating other hormone and be involved in Ca^{2+} absorption.

壹、前言

一、研究動機

在高一基礎生物及選修生物上冊第一章生命的特性中我們學到物質通過細胞膜的方式，其中提到鈣鈉氯等離子可以透過細胞膜上的離子幫浦進行主動運輸，以維持細胞內外的滲透壓平衡。鈣離子對於哺乳動物維持生命上扮演重要的角色，鈣為主要構成骨骼的成分，並調控體內血液酸鹼度、激素合成與分泌、神經及細胞基因表現、調節細胞分裂、啟動細胞凋亡機制及細胞間訊息溝通等。因此，一旦體內鈣離子濃度調控失衡，即造成生理上嚴重的損害。淡水魚類生活在鈣離子濃度不斷變動的淡水環境中，對淡水魚類而言，適當的調控鈣離子流進與流出身體以維持魚體內鈣離子的恆定性更是相當的重要。

過去研究中發現，斑馬魚具有四型離子細胞，其中鈣離子吸收是由位於斑馬魚成魚鰓上和斑馬魚胚胎皮膚上的富含鈉鉀幫浦細胞(Na^+/K^+ -ATPase rich cell, NaR cell)所負責，細胞頂膜上主要進行鈣離子吸收的是表皮鈣離子通道(epithelial calcium channel, ECaC)，ECaC 由外界吸收 Ca^{2+} 進入細胞，再由基側膜的鈣離子幫浦(basolateral plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, PMCA2)和鈉鈣交換蛋白($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX1b)打進體內。

本實驗主要想探討內分泌如何調控體內離子的平衡。由於高中基礎生物下冊及選修生物下冊內分泌系統該章中有講述各激素的來源及功能，且過去在哺乳動物中研究中已知跟鈣離子吸收相關的賀爾蒙有幫助鈣吸收的副甲狀腺素(parathyroid hormone, PTH) 及維生素D (Vitamin D)，還有抑制鈣吸收的降鈣素(Calcitonin)，另外，除了以上廣為人知的鈣相關賀爾蒙外，研究發現泌乳素(Prolactin)在腸道中亦有幫助鈣離子吸收的功能，因此本實驗要探討內分泌如何調控體內離子的平衡。在人體內，泌乳素的功能主要為促進乳腺發育生長、乳汁形成及維持泌乳，有抑制促性激素的作用。在分娩後，表現在刺激卵泡黃體受體生成，間接促進黃體素的合成與分泌、抑制動情素的分泌及排卵。而泌乳素的分泌，既受到下丘腦催乳素

抑制因(PIH)與催乳素釋放因(PRF)及其他激素的調節，又能通過短環路反饋進行自我調節。

對於水生動物魚類來說，文獻指出泌乳素 Prolactin 能夠幫助魚體適應淡水環境，為參與滲透壓平衡的激素。然而，對於 Prolactin 是否影響鈣離子吸收則無較深入研究。

二、研究目的

在高中選修生物上冊動物的消化及吸收以及動物的排泄兩章中則提到哺乳動物主要透過腸道及腎臟來調節體內離子，而魚類則是利用鰓(仔稚魚為表皮)上的離子通道及交換蛋白來維持體內離子的恆定。本實驗採斑馬魚仔魚為模式動物，因其具有以下優勢：(1)繁殖容易且快速，可有效率提供大量實驗材料，而且容易飼育。(2)仔魚胚胎透明容易觀察。(3)目前斑馬魚基因體序列資料庫已近完整，成為近年來主要研究魚類離子平衡的實驗模式(4)斑馬魚為水生動物，方便我們藉由調整水中離子濃度進行各種不同條件的實驗。

本研究利用斑馬魚作為模式物種，探討魚類 Prolactin 在鈣吸收上的調控機制，主要想探討之問題為：(1)在環境不同高低鈣濃度下，斑馬魚體內 Prolactin 表現量之變化；(2) Prolactin 基因弱化時，體內鈣離子含量是否會被影響；(3) Prolactin 基因弱化時，斑馬魚運輸蛋白及鈣相關基因表現以 NaR 細胞數量表現之變化；Prolactin 基因弱化對其他鈣離子調節賀爾蒙的影響。本研究有助於我們了解 Prolactin 對鈣離子平衡調控的機制，並有機會將此理論運用在人類生長與保健上。

貳、研究過程與方法

一、研究設備及器材

(一) 實驗動物:斑馬魚三日齡仔魚

(二) 實驗藥品:SYBRgreen, chloroform,曝氣水, Trizol, Isopropanol, 75%Ethanol, PBST, blocking buffer, 一級抗體, 二級抗體, DNase I, DNase I buffer, ddH₂O, 50μM

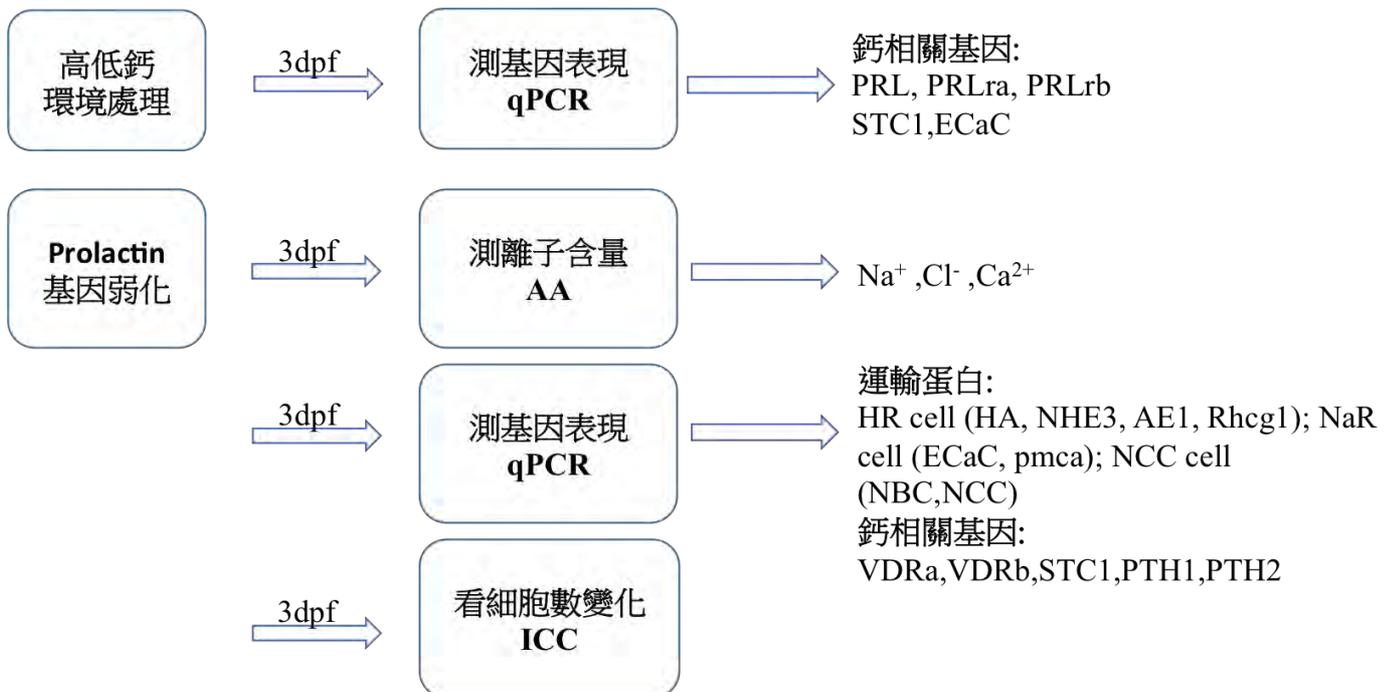
Oligo(dT)₂₀ Primer, 10 μM dNTP mix, First Strand Buffer, 0.1M DTT, RNase out, SSIII

RT, 70% HNO₃, Hg(SCN)₂, NH₄Fe(SO₄)₂·12H₂O

(三) 實驗器材: 微量滴管(pipetman)、離心機、PCR Thermo Cycler、磨針機、顯微注射機、均質機(TissueLyser II)、Nanodrop2000 光譜儀、螢光顯微鏡、火焰原子吸收光譜儀、Roche Real Time PCR LightCycler 480 II。

二、研究過程及方法

(一)、實驗設計



(二)、實驗方法

1. 高低鈣環境試驗

以二次水調配人工高鈣水(2 mM)和低鈣水(0.02 mM)：

(1)高鈣水(1 L): 5 ml Stock A/B +50 ml Stock C+5 ml Stock D

(2)低鈣水(1L): 5 ml Stock A & B+0.5 ml Stock C+5ml Stock D)

*Stock A: 40mM MgSO₄ 4.81g/1L ddH₂O); Stock B: 40mM

K₂HPO₄2.34g+KH₂PO₄1.8g/1L ddH₂O); Stock C: 20mM CaSO₄·2H₂O3.44g/1L ddH₂O;

Stock D: 1M NaCl 58.5g/1L ddH₂O

2.顯微注射反義嗎啉基寡核苷酸(MO)

本實驗之斑馬魚所用 MO 由柏森生物科技設計與合成，Prolactin MO 設計於能互補 Prolactin 基因 5'端非轉譯區(5' untranslated region, 5' UTR)的位置，序列為 5'TAGACCCTTGAGCCATTACTAGAAC 3'，將 MO 以 phenol red 稀釋，在測試各種施打劑量並觀察其發育及外表型態是否正常後，最後決定施打的劑量為 2 ng/ embryo，並在受精後三天 (3 dpf)採樣觀察。

3.RNA 萃取

取 30 份三日齡魚組織加入 1 ml Trizol 試劑中，以研磨機將組織均勻打碎後，加入 0.2ml chloroform，劇烈搖晃呈粉紅乳色，靜置其分層後放入預冷至 4°C之離心機以 12000 xg 離心三十分鐘。取上清液並加入等量的 Isopropanol 混和均勻，置於-20°C過夜。離心後，移除上清液並以 75%酒精清洗沈澱 pellet 兩次，以純水溶解 RNA pellet。之後利用 RNA 的純化套組(Roche DNase I kit) 進行純化，去除 DNA 及其他雜質，最後將 RNA 沉澱物溶於 20µl 純水中。

4.互補 DNA 合成

取 5µM RNA 加入 2.5µM Oligo(dT)₂₀·0.5mM dNTPs，並以純水加至 11µl，以 65°C 加熱 5 分鐘後立即放置冰上冷卻 2 分鐘，再依序加入 2µl 10 x First strand buffer · 5 mM

DTT、RNase OUT 和 SSIII RT，均勻混合後先以 50°C 反應 1 小時，接著以 70°C 加熱 15 分鐘再以 4°C 冷卻 2 分鐘，互補 DNA(cDNA) 即製備完成。

5. 即時定量聚合酶鍊鎖反應 (Quantitative-PCR) :

取 20~30 ng cDNA 做為模板，加入 5 μ l 2 x SYBRGreen I Master Mix、0.5 μ M 引子，融合成總體積 10 μ l 的反應物。以 Light Cycler real-time PCR system 進行螢光反應的偵測。該結果表示方法採用相對於 *rpl13a* 基因表現量。

6. 火焰式原子吸光光度計 (atomic absorption spectrophotometer)

取 3 日齡魚組織以去離子水清洗，取十五份為一個樣本，經 70% 硝酸於 60°C 硝化後以去離子水稀釋五倍。再導入原子化器中進行原子化(atomization)，使形成氣態之基態原子，然後以陰極含欲測金屬元素之中空陰極燈(hollow cathode lamp)照射，由單光器選擇測定波長，以偵檢器測定光源被原子吸收前後強度之變化，以測定試樣中待測原子之吸光度並與標準溶液(0, 0.5, 1, 2, 4 ppm Ca²⁺ & Na⁺ 硝化溶液)進行比較。

7. 比色法測氯離子含量

取 15 份三日齡魚組織放入每一管中(共 6 管)並將管中的水烘乾(overnight)；在每管中加入 1ml ddH₂O，並放入鋼珠打碎組織並離心 30 分鐘。配置標準溶液並在每管中加入標準溶液、100 μ gHg(SCN)₂ 與 200 μ g NH₄Fe(SO₄)₂·12H₂O。使用比色法測定氯離子含量:將標準溶液及樣本溶液加入分光管，以 Nanodrop 測定標準溶液(0, 0.5, 1, 2, 4 ppm Cl⁻ 水溶液)的吸光度，並將吸光度對濃度作圖，繪製檢量線，後測定樣本溶液，得到樣本溶液之透光率並對照標準溶液測定後所得的工作 i 線換算成樣本中的離子濃度。

8. 螢光染色

將原儲存在酒精內的樣本使用 PBST 清洗三次(每次十分鐘)，再加入 blocking buffer 填補仔魚皮膚之不平整，以避免影響離子通道訊號傳遞。靜置 1~1.5 小時後，用 PBS 將一級抗體 HA&NKA 稀釋 200 倍加入樣本中(室溫下避光靜置 2 小時)，再加入二級抗體於室溫下避光靜置 2 小時，用 PBST 清洗螢光染色後的樣本數次，使其照相時之背景螢光亮度降低。在解剖顯微鏡下將組織排列整齊後使用倒立螢光顯微鏡拍攝照片，實驗結果以 ImageJ 軟體計算鈣離子平衡調控細胞之數量。

9. 統計分析

實驗數據以平均值正負標準差表示，實驗所得知數據由 Student's *t*-test 作為統計檢定方法。

參、研究結果及討論

一、研究結果

(一) 外在環境鈣濃度對 Prolactin 之影響

為了解環境高低鈣是否會對鈣相關基因造成影響，取 1 到 2 個細胞期的斑馬魚胚胎馴養於高鈣水(2 mM)及低鈣水(0.02 mM)中，之後採取 3 dpf 的魚體組織進行分析，結果發現斑馬魚胚胎在高鈣水馴養下，STC1 之基因表現量較低鈣組明顯增加，而 ECaC 則顯著下降，此結果符合過去報告所提出，然而，PRL, PRLra 及 PRLrb 表現量皆無顯著變化。

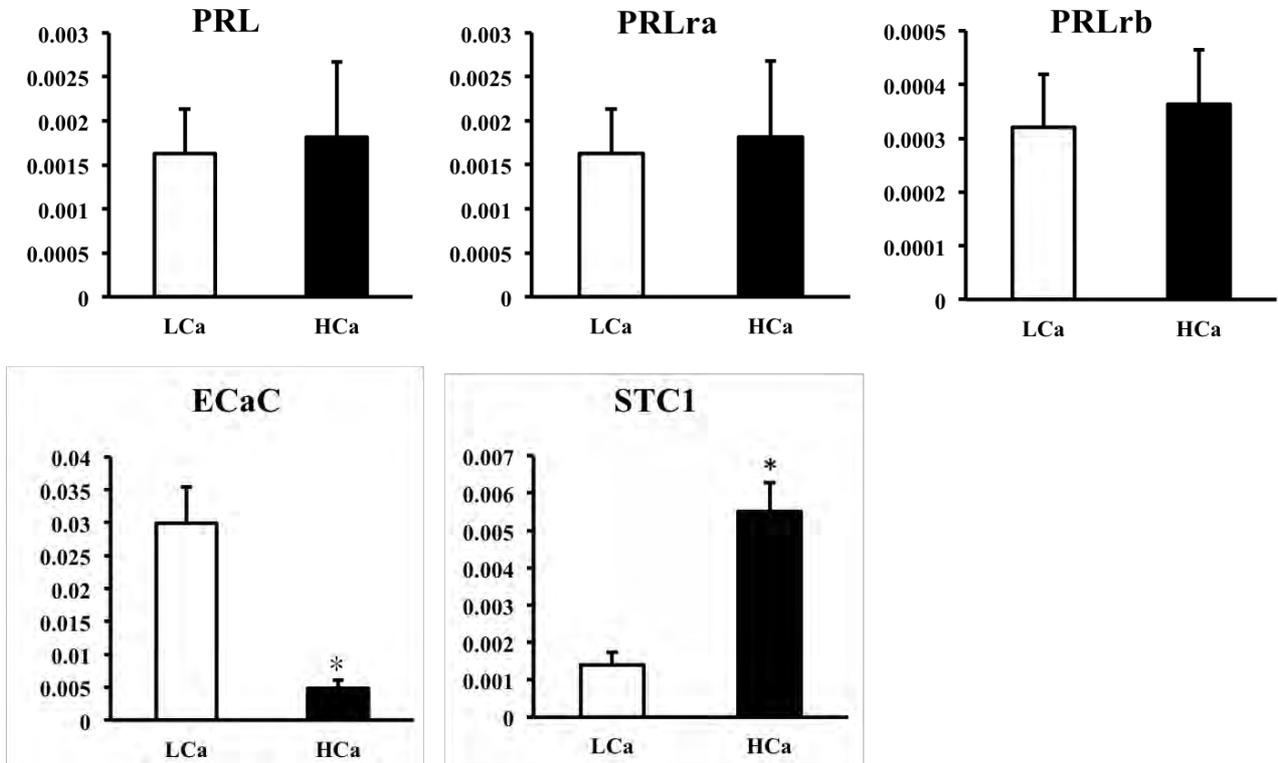
(圖一)

根據實驗結果推測外在環境高低鈣並不會直接影響魚體 Prolactin 的含量，而在高鈣環境下 ECaC 表現會顯著下降以降低鈣離子進入體內，維持體內濃度平衡。

Enviromental Ca^{2+} concentration



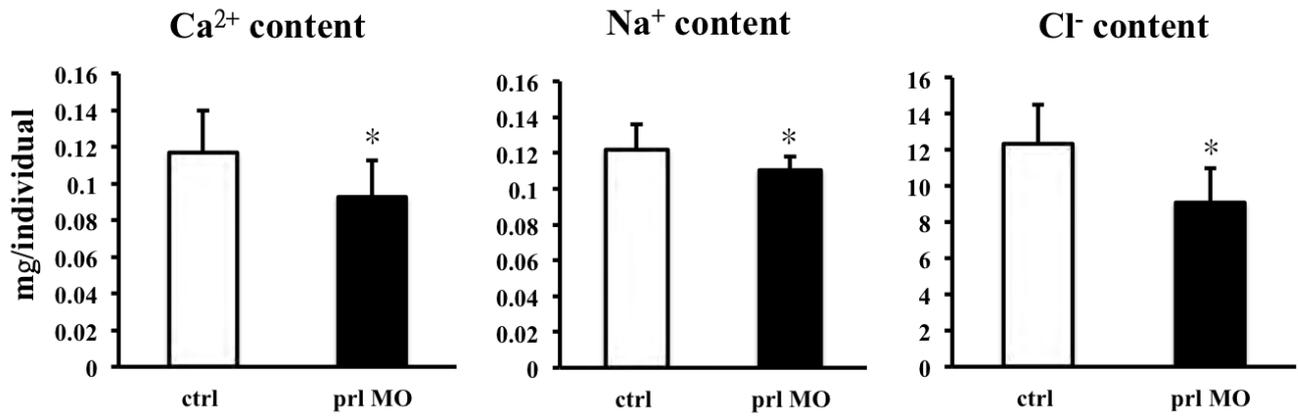
Ca^{2+} related gene expression



(圖一)

(二) Prolactin 對體內離子含量之影響

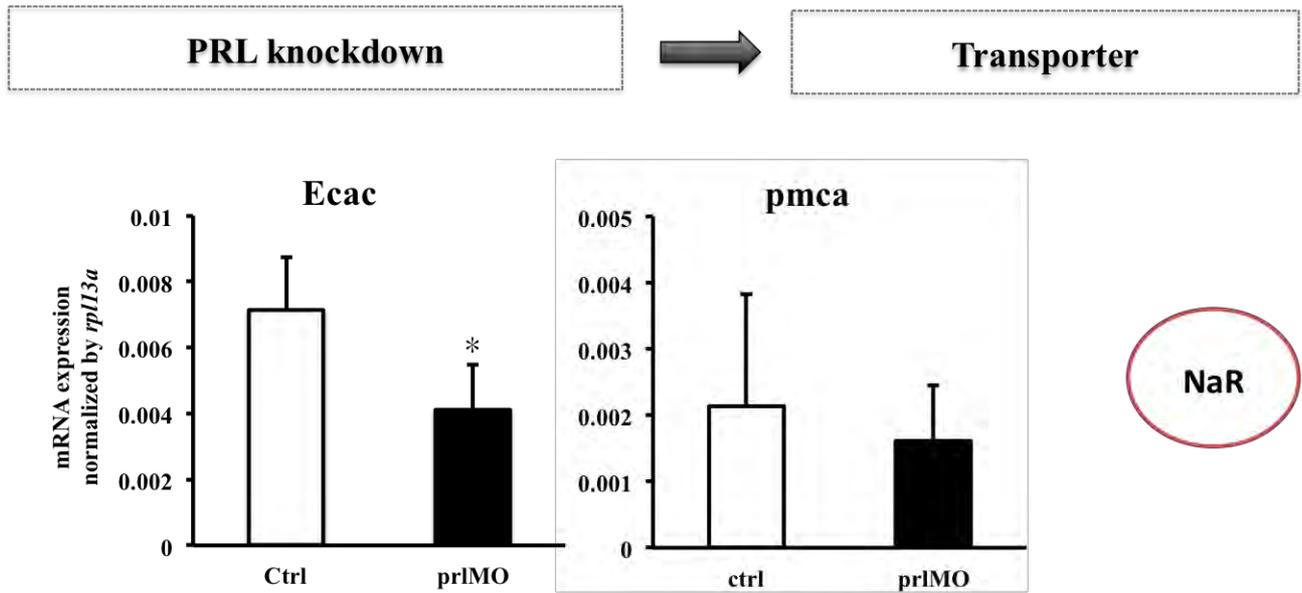
為了解泌乳素是否會影響體內離子含量，本實驗進行 Prolactin MO 顯微注射以抑制斑馬魚 Prolactin 的轉錄作用，以弱化其基因，透過原子吸收光譜法及比色法分別測定魚體組織鈣離子和鈉、氯離子濃度，結果發現經基因弱化的實驗組其鈣離子、鈉離子和氯離子濃度較對照組為低，且與對照組皆有顯著差異。(圖二)



(圖二)

(三) Prolactin 基因弱化對 NaR 細胞上鈣離子運輸蛋白表現量之影響

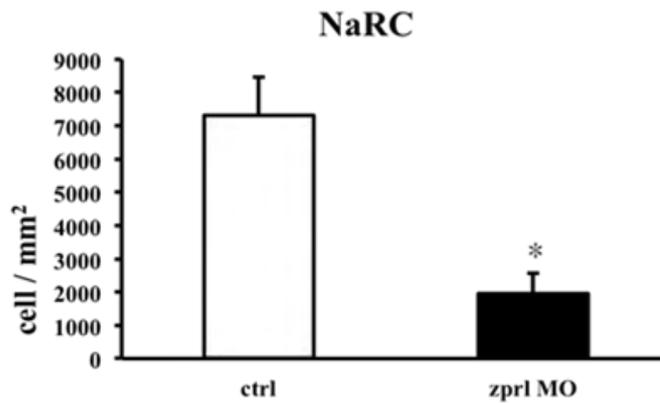
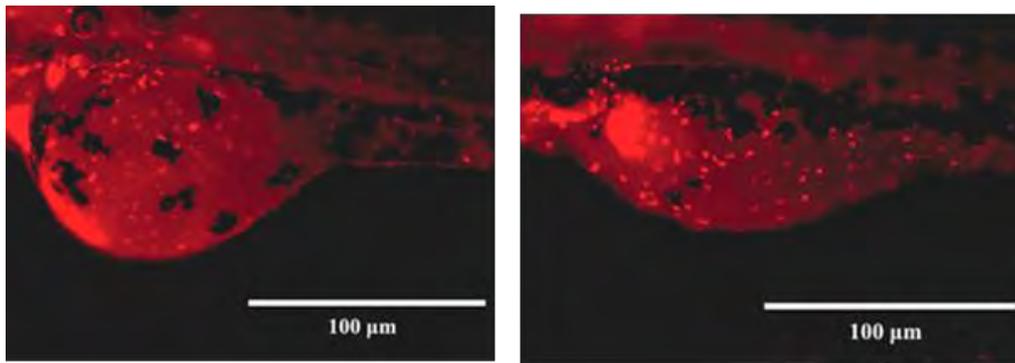
經 Prolactin 基因弱化之實驗組，以即時定量聚合酶鍊鎖反應分析鈣離子運輸蛋白之基因表現量變化，發現經基因弱化後，鈣相關基因 *ECaC* 表現量皆顯著下降，而 *pmca* 表現量沒有顯著改變。(圖三)



(圖三)

(四)Prolactin 基因弱化對 NaR 細胞數量之影響

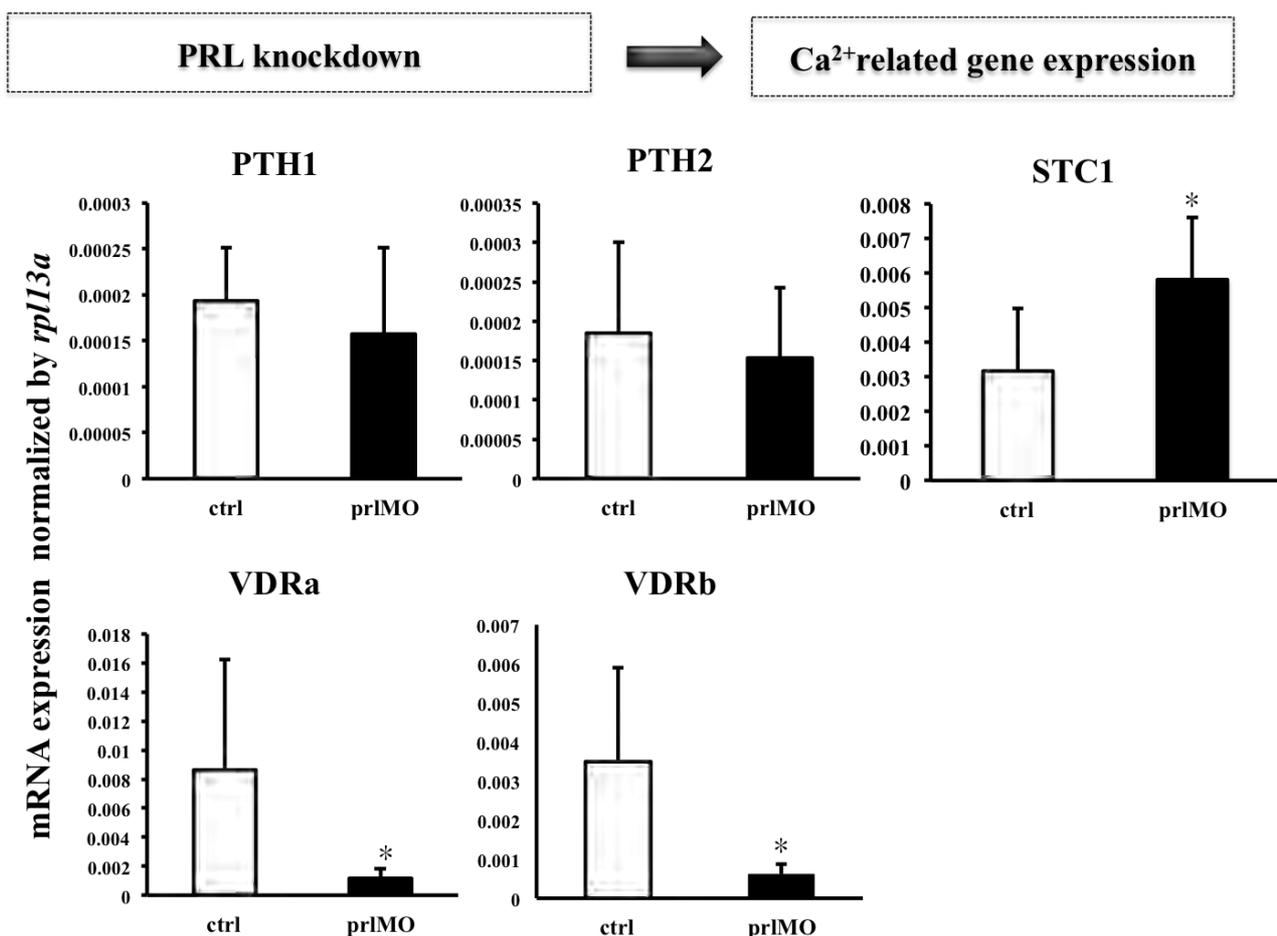
本實驗經泌乳素基因弱化後，透過免疫螢光染色偵測位於 NaR cell 基底膜之鈉鉀幫浦(Na^+ - K^+ ATPase $\alpha 5$, NKA $\alpha 5$) 以標定鈣吸收細胞 NaR 細胞，實驗結果發現泌乳素基因弱化之後，卵黃囊上細胞數量較對照組顯著下降。(圖四)



(圖四)

(五)Prolactin 基因弱化對其他鈣相關賀爾蒙之影響

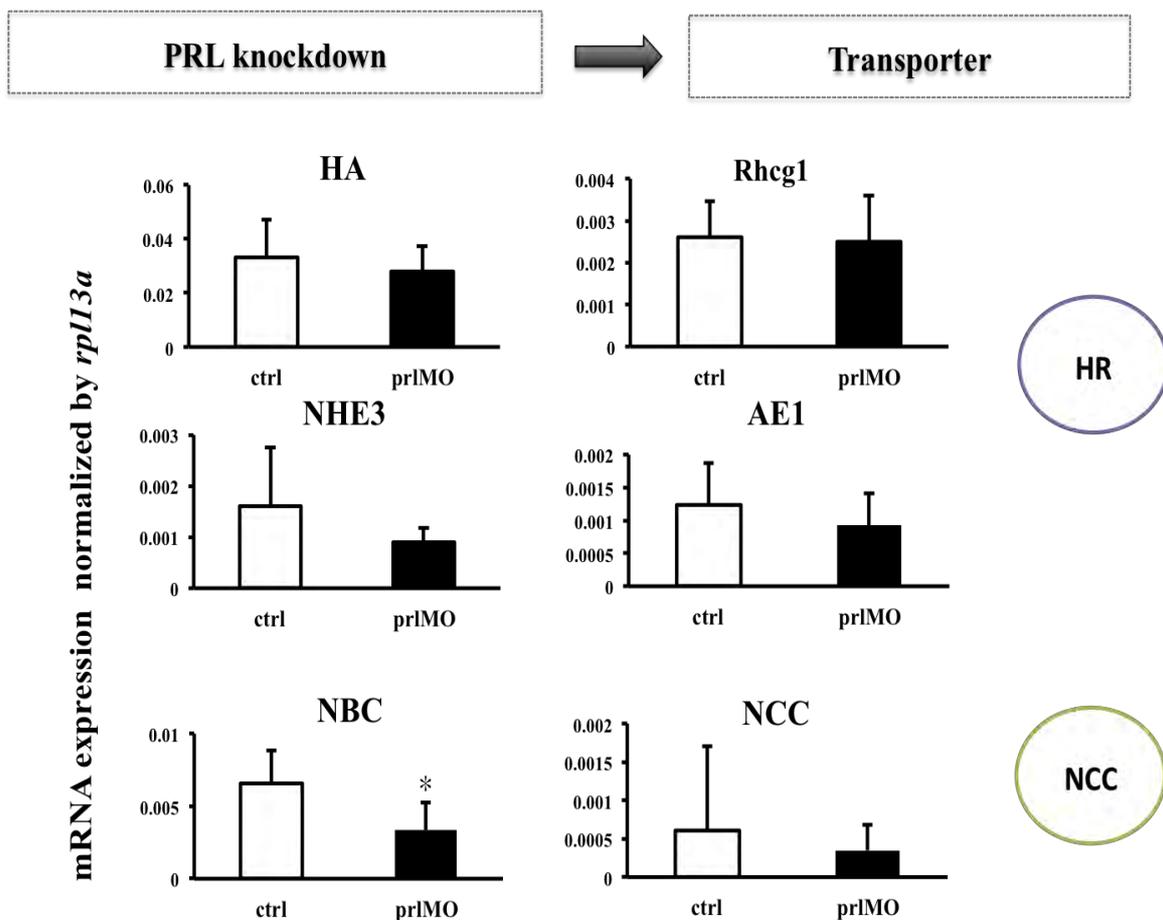
經 Prolactin 基因弱化後，以即時定量聚合酶鍊鎖反應分析鈣離子相關基因及離子運輸蛋白之基因表現量變化，發現鈣相關基因 VDRa,VDRb 表現量皆顯著下降，而 STC1 表現量則顯著上升，PTH1, PTH2 表現量沒有顯著改變。(圖五)



(圖五)

(六) Prolactin 基因弱化對其他離子細胞上運輸蛋白表現量之影響

負責排酸之 HR 細胞上離子運輸蛋白：氫離子幫浦(H^+ -ATPase, HA), 鈉氫交換蛋白 (Na^+ - H^+ exchanger, NHE3), 氨運輸蛋白(Rhcg1)及陰離子交換蛋白(anion exchanger 1, AE1); 負責吸收氯之 NCC 上鈉氯共同運輸蛋白 NCC(Na^+ - Cl^- cotransporter)之表現量不受到 Prolactin 基因弱化的影響，唯有鈉-碳酸氫根共同運輸蛋白(Na^+ - HCO_3^- cotransporter, NBC)表現量顯著下降。(圖六)



(圖六)

二、討論

本篇研究首次探討斑馬魚 Prolactin 在調控鈣離子吸收上扮演的角色及其作用機制。過去已知 Prolactin 在哺乳類動物腸道中幫助鈣離子吸收，然而，在魚類生理上則缺乏 Prolactin 鈣離子影響的相關資料。本實驗選用基因資料庫相當完備的斑馬魚做為實驗物種，利用已有許多有關斑馬魚鈣離子調控的探討資料。發現如下：

根據前人的研究指出，ECaC 在低鈣環境下表現量應明顯上升；而 STC1 在低鈣環境下表現量應明顯下降，本實驗符合以上前人提出的論點。實驗結果發現外在環境高低鈣並不會直接影響魚組織內 Prolactin 及其受體之 mRNA 基因表現量，推測外在環境中鈣離子濃度可能會刺激腦下垂體將 Prolactin 分泌到血液中，而不是直接影響 Prolactin 基因的表現量。

經基因弱化後表現出鈣離子濃度降低。因此我們認為泌乳素可能有助於鈣離子吸收，另外，也發現鈉及氯離子濃度也因基因弱化而降低，故推測泌乳素不只有調控魚吸收鈣離子，可能也影響鈉及氯離子的調控，可以作為我們日後探討的方向之一，以期能幫助我們對於 Prolactin 調控體中離子濃度的機制有更周全的推想。

位於 NaR 細胞上之 ECaC 在過去研究中被認為是最主要吸收鈣之離子通道，且斑馬魚的鰓或是胚胎上表現量遠比 *ncx1b* 和 *pmca2* 基因表現量高，過去發現於其他內分泌 (isotocin, STC-1, cortisol 跟 calcitonin) 調控鈣離子吸收的研究中 ECaC 也是最主要被調節之運輸蛋白。本實驗結果發現 Prolactin 基因弱化後，ECaC 表現量顯著下降，此結果符合過去觀點。免疫螢光染色結果發現 Prolactin 基因弱化後卵黃囊上 NaR 細胞表現顯著下降，更輔證 Prolactin 會幫助 NaR 細胞表現增加以促進鈣離子吸收。

另外，過去發現有助於鈣吸收之維生素 D 受器 VDra 及 VDrb 表現量在 Prolactin 弱化後亦顯著下降，而抑制鈣吸收之 STC1 則表現量上升。在斑馬魚研究中，PTH1 過去被證明幫助鈣離子之吸收，而 PTH2 則不參與鈣離子調控，本實驗結果發現 Prolactin 基因弱化並不會影響 PTH1 及 PTH2 之基因表現量，推測因其表現量過低而無法有顯著差異。根據以上結果，我們推測 Prolactin 在上游除了直接調節幫助鈣離子吸收之 ECaC 及 VDra, VDrb 表現量外，亦可抑制 STC1 之表現量，來幫助鈣離子吸收。除了鈣吸收相關基因外，我們也發現 NBC 在經基因弱化後表現量也有顯著下降。此結果發現 Prolactin 除了調控鈣吸收外，也可能對其他離子之恆定具有影響力，在未來將針對此部分做進一步的探討。

肆、結論與應用

一、結論

(一) Prolactin 基因不會受環境中鈣離子濃度高低影響，可能原因為環境中鈣離子濃度會影響 Prolactin 蛋白，並進而影響魚體血液中鈣離子分泌而不是直接影響 Prolactin 基因的表現量。

(二) Prolactin 透過控制 NaR 細胞表現量、ECaC 表現量並影響其他鈣平衡相關賀爾蒙表現量(STC1,VD_r)調控魚體內鈣離子含量。我們推測 Prolactin 在上游除了直接調節幫助鈣離子吸收之 ECaC 及 VD_a,VD_rb 表現量外，亦可抑制 STC1 之表現量，來幫助鈣離子吸收。

二、未來展望

更進一步的實驗我們將透過原位雜交染色技術來探討 Prolactin 的受體是否也位在 NaR 細胞上，另外，藉由 STC-1 基因弱化確認 Prolactin, STC-1 及 NaR 細胞之間的交互作用。將來我們可進一步剔除 Prolactin 基因，進行更深入的實驗研究。我們期許本研究日後可以幫助建立非侵入性的斑馬魚胚胎表皮模式來取代目前使用於藥物開發或是電生理實驗上侵入性的小腸模式或是腎臟模，而研究成果除了對內分泌與環境之間的關係提供更進一步的了解，未來研究方針更期許可以在環境生物學上有更多貢獻。

伍、參考資料及其他

一、參考資料

(一)陳黎、王思貽(2009)•*Prolactin 及 Angiotensin II 與斑馬魚離子調控之分子機制*•台北市:中央研究院高中生命科學研究人才培育計畫專題研究報告。

(二)陳佩琪(2008)•*斑馬魚鈣離子吸收機制：表皮鈣離子通道表現及調節*•台北市:中央研究院高中生命科學研究人才培育計畫專題研究報告。

- (三)徐浩軒(2010)•*日本種稻魚適應海水之分子及細胞功能調控機制*(碩士論文)•台北市:國立臺灣大學漁業科學研究所。
- (四)胡惠鈞(2013)•*維生素D3 調控斑馬魚表皮離子細胞分化的機制*(碩士論文)•台北市:國立臺灣大學漁業科學研究所。
- (五)林怡均、楊貽淦(2011)•*日本稻田魚適應不同環境下調節表皮鈣離子通道 (ECaC) 之機制*•台北市:中央研究院高中生命科學研究人才培育計畫專題研究報告。
- (六)蘇哲賢(2012)•*鈣離子感應接受器在斑馬魚鈣離子吸收功能上之角色*(碩士論文)•台北市:國立臺灣大學漁業科學研究所。
- (七)黃鵬鵬(2007)•*Expression and water calcium dependence of calcium transporter isoforms in zebrafish gill mitochondrion-rich cells.*•中央研究院生命科學圖書館•取自 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/354>
- (八)劉芳宇(2009)•*鈉鉀幫浦次單元在斑馬魚離子調控機制中的角色*(碩士論文)•台北市:國立臺灣大學漁業科學研究所。
- (九)張偉斌、黃育文、吳振龍、劉德明(2007)•*鈣離子通道調控與嚴重合併性免疫不全症候群*•北市醫學雜誌•取自 http://ir.ym.edu.tw/ir/bitstream/987654321/26695/1/911203608_abstract.pdf
- (十)丁楓峻(2009)•*維他命D 對斑馬魚胚胎鈣離子吸收之影響*(碩士論文)•台北市:國立臺灣大學漁業科學研究所。
- (十一)黃鵬鵬、黃銓珍(2007)•*魚類如何適應淡水：老問題的新答案*•台北市:中央科學研究院。

(十二)Smirnova OV.(2011). Prolactin osmoregulatory function in fishes and its projection on mammals. *Usp Fiziol Nauk*,42(4),59-75, Oct-Dec,2011,from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22145311>

(十三) Manzon LA.(2002). The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen Comp Endocrinol*, 125(2):291-310, Feb 1,2002,from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884075>

(十四) Sakamoto T1, McCormick SD.(2006). Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *Gen Comp Endocrinol*,147(1):24-30, May 15, 2006,from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406056>

二、附件

附件一即時定量聚合酶鍊鎖反應引子序列

Primer Name		Primer sequence
HA	F	5'GAGGAACCACTGCCATTCCA3'
	R	5'CAACCCACATAAATGACATCG3'
NHE3	F	5' TGCAGACAGCGCCTCTAGC3'
	R	5'TGTGGCCTGTCTCTGTTTGC3'
Rhcg1	F	5'TGCCAACTGTCCAGGGTG3'
	R	5'AGGATAAGACGGGAGGAATAAT3'
AE1	F	5'CCTGTGCGTTTCATCTTCATCC3'
	R	5'AATAGAGGCGAACATCATCCACA 3'

ECaC	F	5'TCCTTTCCCATCACCTC3'
	R	5'GCACTGTGGCAACTTTCGT3'
pmca	F	5'AAGCAGTTCAGGGGTTTAC3'
	R	5'CAGATCATTGCCTTGTATCA3'
NBC	F	5'GCCTCGTTAAATGGGGTTCAG3'
	R	5'GATGATGGCGGCTACTGTTGA3'
NCC	F	5'TTCTGCTGTTGCTTGTTCGTTCA3'
	R	5'TTGGAGGTCCTGACAGAACGA3'
PRL	F	5'GGGGAAGAGGACCACACAG3'
	R	5'TCCAGCAAATCATTTCAGACCCA3'
PRLra	F	5'CCTCCAACCACTGATTACGA3'
	R	5'GTCATTTCCACTTCCTCCCAT3'
PRLrb	F	5'GTGGTGTCCGACTGTGATGA3'
	R	5'CGTTCCTTTGCTGCTTT3'
STC1	F	5'CACGAGATCTGCAACGTCTT3'
	R	5'AGCGCTTA ATGGTCTGGAAAC3'
PTH1	F	5'GTTTCCATCAACGGGAATTT3'
	R	5'CATCAGCTGCACTTCATTCA3'
PTH2	F	5'ATACGTTGTTTGGAGAAAGCC3'
	R	5'CATTGTGCATCAGCTGAACTT3'
VDra	F	5'CTCGGATTCTGTGGATGCTT3'
	R	5'GGCCTTACGCTTCATACTGC3'
VDrb	F	5'ACACAGCGTGGAGTGGAGT3'

	R	5'ACACTCCATGGCAAGAACA3'
<i>rpl13a</i>	F	5'GCACTGTGGCAACTTTCGT3'
	R	5'AGACGCACAATCTTGAGCAG3'

F, forward primer; R, reverse primer

【評語】 050010

本實驗係用斑馬魚探討泌乳素對鈣離子吸收及平衡的主題瞭解，研究之主題明確，研究中以 Prolactin 基因之表現來探討鈣離子的平衡，研究過程邏輯合理而研究結果亦是以支持研究目標，是一篇不錯的研究報告，在未來的發展方向則似乎較不容易，因其他離子調控似乎與鈣離子並不盡相似，建議針對鈣離子之平衡機制再作深入探討就好。