

腦垂體腺苷酸環化酶激活肽對體外培養雄性吳郭魚性腺蛋白質表現之 二維電泳分析

Analysis of *In Vitro* Protein Expression in the Gonads of Male Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) after Administration of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide by Two-Dimension Gel Electrophoresis

邱洪馨^{1*} 陳建豪¹ 劉景堯¹ 周承翰¹ 唐品琦^{2#} 黃尉東^{1#}

¹大葉大學分子生物科技學系 (彰化縣大村鄉學府路 168 號)

²國立中興大學動物科技學系 (台中市南區國光路 250 號)

^{1#}kater@mail.dyu.edu.tw; ^{2#}pctang@dragon.nchc.edu.tw

摘要

魚類及哺乳類透過下丘腦-腦垂體-性腺軸 (hypothalamus-pituitary-gonadal axis, HPG axis) 調控其性腺發育、配子生成 (gametogenesis) 與成熟、第二性徵 (secondary sex characteristics) 表現及性轉換 (sex reversion) 等功能。而腦垂體腺苷酸環化酶激活肽 (pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide, PACAP) 為一種神經勝肽，其能使細胞內之 cAMP 濃度增加，亦能調節生物體之各項機能，本研究室發現其存在吳郭魚 (tilapia, *Oreochromis mossambicus*) 之性腺中。而吳郭魚為台灣養殖漁業中之重要經濟魚種，然目前對其繁殖過程之內分泌蛋白質調控機制研究仍偏少，因此本試驗以蛋白質體學 (proteomics) 方式分析經體外培養吳郭魚精巢受 PACAP 誘導處理後其蛋白質之表現並探討其與繁殖之相關性。性成熟之吳郭魚精巢經 8 小時預培養 (Pre-Culture) 後添加 PACAP、Forskolin、H89 及共同添加 (PACAP+Forskolin) 藥劑等處理組培養 2 小時，並以未添加任何藥劑者 (新鮮組織 [Fresh]、Pre-Culture 及 Control) 為對照組，續以二維電泳分析比較其蛋白質之表現。結果顯示精巢精 PACAP 處理後其蛋白質點之表現數量顯著高於 Control 及添加 H89 組別，但於其他處理組則無顯著差異。目前結果證實吳郭魚精巢蛋白質於體外培養確實可受 PACAP 而影響其表現，若能進一步鑑定其差異性蛋白質身份，了解其調控路徑，則此研究結果將有助於釐清魚類繁殖過程之內分泌蛋白質調控機制，並對繁殖相關研究及漁業發展極具助益。

關鍵字：腦垂體腺苷酸環化酶激活肽、吳郭魚、性腺、蛋白質體學、二維電泳

前言

脊椎動物於發育及生長過程，包括發身(puberty)、成年期 (adulthood) 及衰老過程 (aging) 之生殖系統中，主要由下丘腦-腦垂體-性腺軸 (hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG axis) 路徑所共同調控，且為脊椎動物體內普遍之生殖週期調控軸。下丘腦 (hypothalamus) 位於丘腦 (thalamus) 下方，除受體內因素影響外，亦受周遭環境因子如光週期 (photoperiod)、溫度變化、季節轉換及群居狀態等刺激而分泌促性腺激素釋放素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH)，經由循環系統運送至腦垂體前葉 (anterior pituitary gland)，與促性腺 (gonadotrope) 上之受體 (receptor) 結合並刺激如濾泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 及促黃體激素 (luteinizing hormone, LH) 等促性腺激素 (gonadotropins,

GTHs) 分泌，並經由循環系統運送至性腺 (gonad) 與其受體結合後刺激如雌激素 (estrogen)、雄激素 (androgen) 及助孕激素 (progestins) 等固醇類賀爾蒙 (steroid hormones) 之生成，並調控性腺之生長、發育及配子生成 (gametogenesis)，亦促使第二性徵 (secondary sex characteristics) 之表現 (Schulz and Goos, 1999; Weltzien *et al.*, 2004; Pandolfi *et al.*, 2006)。

吳郭魚 (又稱台灣鯛, tilapia)，為慈鯛科 (Cichlidae) 之熱帶性魚類，其為養殖之重要經濟魚種，且具有對環境適應能力強及耐疾病等特性 (Davis *et al.*, 2009)，另其具 6 至 7 個月較短之繁殖世代週期，胚胎及幼苗易取得及相對容易產製其轉基因個體等優點，故成為目前內分泌、生理、分子遺傳學及養殖相關研究之模式動物 (Kocher *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2005; Melamed *et al.*, 1998; Seale *et al.*, 2002; Maclean *et al.*, 2002)。目前對吳郭魚生殖系統之內分泌蛋白質調控機制之研究，相較於哺乳類及其他魚種如斑馬魚 (zebrafish) 者為少，且其基因體之資料庫相對不足，故本試驗乃以吳郭魚 (*O. mossambicus*) 為研究模式動物，期對其生殖系統之相關研究奠定基礎。

腦垂體腺苷酸環化酶激活肽 (pituitary adenylylate-cyclase activating polypeptide, PACAP) 為一種神經類勝肽 (neuropeptides)，最初由綿羊之下丘腦 (hypothalamus) 分離出，經於體外 (*in vitro*) 與大鼠 (rat) 腦垂體前葉細胞共同培養後，發現其主要能刺激腺苷酸環化酶 (adenylylate cyclase, AC) 活化，促使細胞內之 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 濃度增加 (Miyata *et al.*, 1989; Filipsson *et al.*, 2001)，於生物體內 PACAP 將與其受體 (PACAP receptor) 結合後並刺激 G 蛋白 (G-protein) 以活化腺苷酸環化酶 (AC) 並促使胞內、外之 cAMP 之產量增加，而高濃度之 cAMP 亦可刺激蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 造成磷酸化 (phosphorylation) 進而影響其胞內之蛋白活化，而調控離子通道 (ion channel) 之開啟或其他訊息傳遞路徑 (Miyata *et al.*, 1989; Filipsson *et al.*, 2001)。於生物體內，PACAP 為由 27 及 38 個胺基酸所組成之結構，因此分別命名為 PACAP₂₇ 及 PACAP₃₈，而於大部分哺乳類體中，以 PACAP₃₈ 之形式存在最為廣泛 (Miyata *et al.*, 1989)。因結構與血管活性勝肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 之胺基酸序列具 68% 之同源性，故隸屬於 VIP 家族成員之一 (Filipsson *et al.*, 1998)。本研究室先前證實，於硬骨魚類中之吳郭魚 (tilapia, *Oreochromis mossambicus*) 精巢及卵巢皆有 PACAP 基因之表現 (Huang *et al.*, 2009)，另於劑量及時間試驗結果顯示，其性腺經促性腺激素 (gonadotropins) 及 ovine PACAP₃₈ 誘導 2 小時後，PACAP 基因表現量均可提升，證明 PACAP 可能以自分泌 (autocrine) 或旁分泌 (paracrine) 之方式調控吳郭魚性腺發育，因此 PACAP 於吳郭魚性腺中扮演重要之角色 (莫，2011；Huang *et al.*, 2009)。

目前仍無以蛋白質體學 (proteomic) 探討魚類性腺內分泌及 PACAP 調控相關者。先前本研究室已奠定以二維電泳技術 (two-dimension gel electrophoresis) 及蛋白質體學 (吳，2010；鍾，2012) 之方式分析經促性腺激素及固醇類賀爾蒙 (steroid hormones) 刺激處理後吳郭魚性腺內蛋白質之表現，並探討其與繁殖之相關性，故期以此系列試驗釐清魚類生殖內分泌相關蛋白質之調控機制並建立吳郭魚生殖調控相關之蛋白質資料庫，並運用於哺乳類生殖相關疾病及生醫研究之領域。

材料與方法

試驗材料

本試驗所選用之模式動物為吳郭魚 (莫三鼻口鯽魚種, tilapia, *O. mossambicus*)，由中研院細胞與個體生物學研究所特聘研究員吳金洌教授所提供。其飼養於本研究室之基因轉殖魚類養殖室中，飼養溫度條件為 25~28 °C，光照週期為 14 小時，並每日餵食人工乾燥顆粒飼料 (利澤，斗六，台灣) 兩次，每週定時清洗魚缸與換水。本試驗所選用性成熟之雄吳郭魚共約 35 隻，其體重約為 60~100 公克。

吳郭魚性腺組織蛋白質製備 (sample preparation)

試驗前將吳郭魚置於冰中昏迷後，測量魚體之體長（從頭部至尾鰭）及體重，而後取其性腺（精巢）秤其重量且紀錄，分析其生殖腺指數（gonado-somatic index, GSI）。取出精巢組織以DMEM培養液（Dulbecco's Modified Eagle's, D-8900, Sigma, Saint Louis, MO, USA）洗淨，且在組織液中將精巢組織分切成大小約為 2×2 mm之片段。完成洗淨之部分精巢組織留取做為Fresh組（新鮮組織對照組），其餘組織置入DMEM培養液中，於 25 °C及 5% CO₂之環境預培養 8 小時後，再取其部分組織做為Pre-Culture組（預培養對照組）。本試驗所使用之藥劑為ovine PACAP₃₈ (A1439, Sigma)、forskolin (F6886, Sigma) 及H89 (dihydrochloride hydrate; B1427, Sigma)，分別添加ovine PACAP₃₈、forskolin、H89、共同添加 (PACAP₃₈ + forskolin) 及未添加藥劑之對照組共五組，續分別加入DMEM培養液將每well體積補足至 4 mL。將預培養 8 小時之精巢組織切片平均置於每個well內，續以 25 °C及 5% CO₂之環境培養 2 小時，待培養結束後收集組織以進行total protein之萃取。將不同處理之吳郭魚精巢組織分別置於微量離心管（eppendorf tube），各加入protein extraction buffer (0.5 N NaCl, 20 mM HEPES, 0.1 mM EDTA)，經均質機（homogenizer, Pro200, Proscientific Inc., Oxford, CT, USA）將組織徹底磨碎後，以高速離心 20 分鐘，取其上清液，即為total protein水溶液。利用Bio-Rad之Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 進行蛋白質濃度分析（吳，2010；鍾，2012）。

二維電泳分析 (two-dimension gel electrophoresis)

第一維電泳選用長 11 cm、寬 0.3 cm之固定式pH梯度電泳膠條（immobilized Ph gradient gel, IPG gel, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA）所選用之pH範圍為 3~10 或 4~7。將完成定量之蛋白質依組別分別置入微量離心管中，續加入IPG buffer將體積補足至 200 μL，並注入PROTEAN IEF System (Bio-Rad) 之聚焦盤（strip holder）中。將一維電泳膠置入機器中進行蛋白質等電點分離。完成後，取出膠條以ddH₂O沖洗膠條背面後，置於拋棄式之聚焦盤（strip tray）於-80 °C環境下保存。一維電泳聚膠後，膠條先加入DTT平衡液搖晃反應 15 分鐘，使蛋白質之雙硫鍵還原。完成後將DTT平衡液移除並加入IAA平衡液搖晃反應 15 分鐘，進行烷化作用（alkylation）。平衡後之膠條以SDS-PAGE之running buffer潤洗後，置於SDS-PAGE內，另取protein marker (SM0431, Fermentas, Mainz, Germany)滴至 3 M紙片上置於膠條旁，完成後於上層加入已熱融化之agarose buffer固定膠條與protein marker紙片。將完成固定之膠片置入電泳槽內於上部緩衝液槽（upper buffer chamber），電壓設定為 100 V，待藍色細線移至膠片底部即停止。以楔形砌膠器（wedge separator）將玻片分開，並將膠體置入染膠盆內，加入ddH₂O洗去多餘之SDS與glycine以備後續之膠片染色（吳，2010；鍾，2012）。

硝酸銀染色法 (silver stain)

將完成電泳之膠片分別浸泡於固定試液以震盪反應 30 分鐘或隔夜，去除固定液後，加入敏化試液以震盪反應 30 分鐘。去除敏化試液後，以ddH₂O潤洗 5 次。潤洗完成後，移除ddH₂O續加入硝酸銀試液以震盪反應 20 分鐘進行染色，而後以ddH₂O潤洗後即可進行呈色反應。膠片加入呈色試液震盪反應，待蛋白質影像呈現後立即去除呈色試液，續加入終止試液反應 10 分鐘，完成銀染之膠片浸泡於ddH₂O中，待以掃描器掃描影像後進行蛋白質點統計與分析（吳，2010；鍾，2012）。

Coomassie Brilliant Blue R-250 染色法

取下電泳分離後之膠片，加入Coomassie Blue染色液反應 4 小時或隔夜進行蛋白質染色。回收Coomassie Blue 染色液，續加入ddH₂O潤洗 1 小時重複 3 次後，加入退染液進行退染，直到蛋白質點清晰且背景呈透明狀即可 (吳，2010；鍾，2012)。

影像掃描分析

將膠片置於掃描機(10000 XL, EPSON, Nagano-Ken, Japan)，啟動掃描軟體 (Lab scan, EPSON) 使用穿透式掃描模式，解析度300 dpi進行掃描，完成後以TIF檔儲存即可 (吳，2010；鍾，2012)。

蛋白質點之軟體分析

使用蛋白質點分析軟體 (Phoretix 2D, Nonlinear Dynamics, Durham, NC, USA) 進行蛋白質點之統計及挑點對比 (吳，2010；鍾，2012)。

半定量 (semi-quantitation) 統計分析

蛋白質點經上述之軟體 (Phoretix 2D) 進行分析後，將於各組間不受調控能持續並穩定表現之蛋白質點及表現變化具有明顯差異性之蛋白質點 (消失/出現為優先，高度增加/高度抑制為次之) 比對出並定量之。差異性之蛋白質點以N1點作為內控制組 (internal control)，而控制組則設定為未添加任何藥劑組 (Control組)，進行半定量 (semi-quantitation) 系統分析，分析完成後將其數據於Excel (Microsoft office Excel 2003, Microsoft Taiwan Corporation) 作圖，續以統計軟體 (Statistical Analysis System, version 8.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 進行分析，數據分析皆以平均值±標準差 (mean ± standard error mean) 表示之，具顯著差異者則以鄧肯是分析法 (Duncan's multiple range test) 分析比較之，顯著之差異程度設定為 $P < 0.05$ ，每次試驗皆獨立重複五次 (N = 5) (吳，2010；鍾，2012)。

結果

吳郭魚精巢經藥劑誘導後之蛋白質表現分析

吳郭魚之精巢經 8 小時預培養後以藥劑 (PACAP 5 nM、Forskolin 10 μ M、H89 10 μ M 及 PACAP 5 nM+Forskolin 10 μ M) 持續誘導 2 小時，另以新鮮組織 (Fresh)、預培養 8 小時 (Pre-Culture) 及未添加藥劑之控制組 (Control) 等三組為對照組。培養完成後抽取以上各組織 total 蛋白質進行二為電泳 (2-DE) 及銀染 (silver stain) 後，利用軟體 (Phoretix 2D) 分析其蛋白質之表現及分布情況。

精巢蛋白質之 pH 3~10 範圍表現分析

先前少有文獻探討吳郭魚精巢蛋白質經 PACAP 誘導之相關研究，故其蛋白質之表現情形並未明瞭，為瞭解其蛋白質之表現形態，乃先利用 pH 3~10 範圍之電泳膠條分析其內蛋白質點之表現分佈。由對照組 (圖 1) 及處理組 (圖 2) 之二維電泳結果顯示，蛋白質點分佈集中於膠片中段部位，即 pH 值範圍約於 pH 4~7 之區塊 (如圖 2 方框部分)，而分子量之範圍主要分佈於 14~66 kDa 區域間，且結果發現 25~66 kDa 區塊間之蛋白質點經肉眼判斷較多於 14~18 kDa 之區塊，另於各組別間之點分佈情況，於不同分子量或不同 pH 值範圍間經肉眼判斷皆具差異性，其中於圖二各組之方框中段部份 (約分子量 18~25 kDa 區塊)，其蛋白質點表現區塊結果發現，受 PACAP (圖 2，A)、Forskolin (圖 2，B) 及同時含有前述兩種藥劑 (圖

2, D) 之誘導組別，蛋白質點分佈情形與受 H89 藥劑誘導 (圖 2, C) 之組別經肉眼判斷後於分佈上有差異性。而於對照組間 (圖 1)，蛋白質點之表現分佈並無顯著差異性，然與經藥劑誘導之處理組 (圖 2) 之蛋白質點相較後，經 PACAP、Forskolin 及同時含有兩種藥劑誘導之蛋白質點 (圖 2, A、B 及 C) 較對照組 (圖 1) 之蛋白質點為多，而經 H89 藥劑誘導 (圖 2, C) 組別之蛋白質點與對照組相較下，並無明顯差異性。另於約 pH 6~10 之範圍亦具少量之蛋白質分佈 (圖 2 及圖 1 方框右邊之區域)，雖然表現量極少，但亦可觀察出各組間於此範圍具有些微之分佈差異性。

精巢蛋白質之 pH 4~7 範圍表現分析

經觀察吳郭魚精巢之蛋白質點主要分佈於偏中性之 pH 範圍，且其明確分佈位置及表現濃度不易判斷，故為更進一步確認其點之細部分佈及具差異性蛋白質點，因此將其精巢蛋白質以 pH 4~7 之電泳膠條進行蛋白質點分析。結果顯示，多數於 pH 3~10 範圍中表現量微弱之蛋白質點或肉眼無法辨識清楚之點，皆於圖上顯現且清晰可分辨 (圖 3 及圖 4)，且分佈於分子量較高之區域，其蛋白質點具明顯之表現分佈，並發現於各處理組間，不論高低分子量或 pH 之範圍間，蛋白質點分佈經觀察後皆具顯著之差異性，且主要於膠片中段區域 (約分子量 18~25 kDa 區塊) 之點變化較具顯著差異，如受 PACAP (圖 4, A)、Forskolin (圖 4, B) 及同時含有兩種藥劑誘導 (圖 4, D) 之組別，此區域之蛋白質點與受 H89 藥劑誘導 (圖 4, C) 組者，經肉眼判別具顯著差異性，與前述 pH 3~10 範圍之蛋白質點表現結果相符合，但於各對照組間 (圖 3)，蛋白質點之表現分佈無明顯差異性，以新鮮精巢之組別 (圖 3, A) 其蛋白質點表現量最高，其次為預培養之組別 (圖 3, B)，而未添加任何藥劑之組別 (圖 3, C) 之蛋白質點表現量相較於其他兩組最少。另於各處理組間 (圖 3 及圖 4)，經觀察發現有少數之蛋白質點據持續且穩定表現之情形，此類蛋白質不論是否經藥劑所誘導，其於各組間之表現量皆具一致性，故將可針對此類之蛋白質點於後續進行蛋白質身分鑑定，以作為吳郭魚精巢蛋白質中之內標性蛋白質，有助於往後對具差異性之蛋白質點之選取，作為比較及對照之標準。

吳郭魚精巢之蛋白質表現量之比較

除經上述觀察各處理組間具差異性外，另經由軟體之分析，並統計各處理組之蛋白質表現量 (圖 5)。於本試驗中，雄性吳郭魚性腺之二維電泳試驗，不論於 pH 3~10 或 pH 4~7 範圍之蛋白質表現結果，皆進行至少 3 次以上之重複試驗。由 pH 3~10 範圍電泳膠條分析精巢蛋白質之二維電泳結果經軟體分析統計蛋白質點數目後，可觀察各組間之蛋白質點數目具差異性。以添加 PACAP 藥劑組別之點數目最多，與未添加任何藥劑組及添加 H89 藥劑組相較具顯著性差異 (273 ± 32 vs. 201 ± 13 and 179 ± 26 , $P < 0.05$)，而與新鮮精巢組、添加 Forskolin 藥劑組別及同時含有 PACAP 與 Forskolin 藥劑之組別，蛋白質點並無顯著差異 (273 ± 32 vs. 214 ± 10 and 246 ± 7 and 261 ± 21 and 291 ± 13 , $P > 0.05$)。於經以 pH 4~7 範圍電泳膠條分析後之蛋白質點數目統計結果顯示，以新鮮精巢組之蛋白質點明顯較多，而於預培養組、添加 PACAP 組、添加 Forskolin 組及同時含有 PACAP 與 Forskolin 藥劑組並無顯著性差異 (189 ± 24 vs. 147 ± 19 and 154 ± 15 and 168 ± 23 and 176 ± 30 , $P > 0.05$)，而未添加任何藥劑組及添加 H89 組相較具顯著性差異 (189 ± 24 vs. 113 ± 6 and 107 ± 9 , $P < 0.05$)。將 pH 3~10 與 pH 4~7 之蛋白質點統計作比較後，除未添加任何藥劑組別及添加 H89 組相較具顯著性差異 ($P < 0.05$) 外，其餘之處理組別皆無顯著差異 ($P > 0.05$) (圖 5)。

討論

本試驗以吳郭魚為研究模式動物，針對經 PACAP 誘導之性腺（精巢）蛋白質進行分析，並利用蛋白質體學之方式探討其與繁殖調控間之相關性。經體外培養之吳郭魚精巢，參考先前內源性（endogenous）基因表現之結果（Huang *et al.*, 2009），培養 8 小時降低精巢之內源性表現；續添加藥劑培養 2 小時，並參照先前體外培養性腺中添加不同濃度 PACAP 之基因表現量分析試驗，選以 5 nM 為最佳作用濃度進行精巢之誘導，另添加 Forskolin 及 H89 藥劑作為對照組，Forskolin 對性腺蛋白有促進之效果，而 H89 則有抑制之效果，故可作為對照之標準（Huang *et al.*, 2009）。

因吳郭魚性腺蛋白質之相關文獻偏少，故未知其內蛋白質點之表現分佈，因此先以 pH 3~10 範圍之二維電泳分析其內蛋白質點之表現分佈，發現蛋白質點分佈集中於膠片中段部分，即 pH 值範圍約略於 pH 4~7 之區域，此結果與本研究室先前之結果相輔（吳，2010；鍾，2012），故續以 pH 4~7 之範圍進行分析。試驗結果可發現 PACAP 對體培養之精巢表現確有影響，造成不同處理組間之蛋白質點表現形態及分佈具差異性（圖 3 及圖 4），因此 PACAP 似對性腺之蛋白質表現具影響力。吳郭魚精巢蛋白質點表現數量之比較結果中，經 pH 3~10 範圍分析後所統計之蛋白質點數目明顯多於 pH 4~7（圖 5）。pH 4~7 範圍之蛋白質點與 pH 3~10 範圍者為分離，其 pH 4~7 範圍亦較清晰且辨識度高。而精巢之 3 種對照組間，其蛋白質點表現經培養後具減少之趨勢，與先前體外培養性腺之 PACAP 及其受體之內源性表現測試結果相符（Huang *et al.*, 2009），推測其內源性蛋白質似亦受體外培養而降低表現。

試驗所用之吳郭魚乃以 2~3 隻魚之精巢大小平均分成七種處理組作為一重複試驗且皆重複三次以上，以排除個體差異，然於每次重複試驗中發現，相同處理但於不同重複之組別中，蛋白質點之表現分佈具差異性，推測蛋白質亦可能受環境及季節等之影響，此結果可說明蛋白質體乃以動態（dynamic）之形式存在（Mann and Jensen, 2003）；此外，亦可能受人為影響或樣品處理過程之差異所致。後續將由結果中找出固定且共同表現之蛋白質進行鑑定，並作為內標蛋白質，以此於試驗中作為對照組，乃因試驗過程中，蛋白質容易受人為或非人為之因素影響，以內標性蛋白質作對照找出差異性之蛋白質點，使結果之可信度提高，亦可解決前述之問題。

綜合本研究室先前之研究與本試驗之結果，於基因體學方面，PACAP 及其受體可能透過自分泌或旁分泌之方式參與促性腺素-性腺生殖路徑之調控，並影響固醇類賀爾蒙之生成（莫，2011）。而本試驗結果說明，於蛋白質體學方面，PACAP 亦可以影響性腺之蛋白質，故 PACAP 可能於吳郭魚繁殖系統上扮演重要之調控角色。由於吳郭魚性腺蛋白質之相關資料庫尚未完整，故本試驗除可釐清 PACAP 調控吳郭魚性腺蛋白質之機制外，亦可增加吳郭魚性腺蛋白質之相關資料庫，供後人以本試驗做為參考，期於未來可對魚類繁殖或發育有更深入之了解。

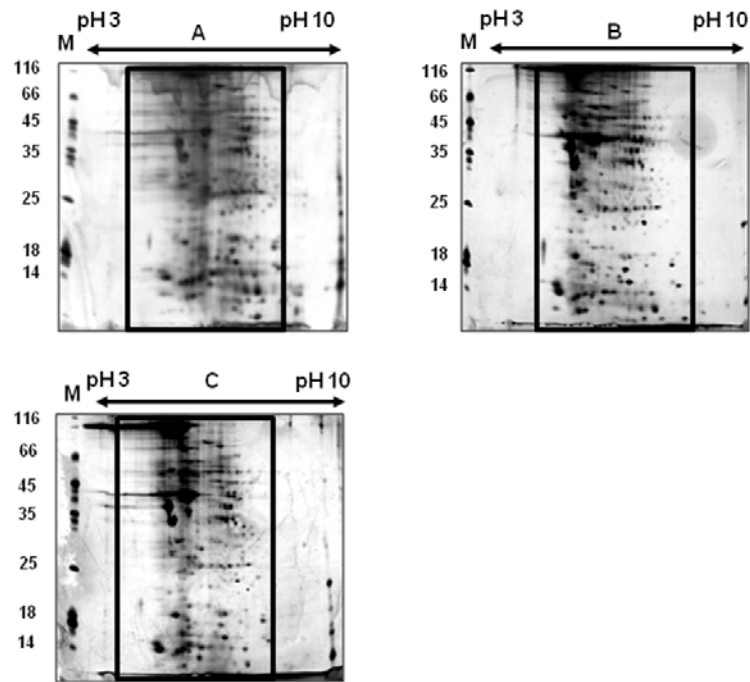


圖 1、吳郭魚精巢經不同時間培養後其蛋白質二維電泳 (pH 3~10) 及銀染之結果。A：新鮮組 (Fresh) ； B：預培養組 (Pre-culture，8 小時) ； C：未添加任何藥劑組 (Control，10 小時) 。第一維：11 cm 膠條； 第二維：12% SDS-PAGE； M：分子量標記； 蛋白質定量：200 μ g；方框部份為蛋白質分佈之區域。

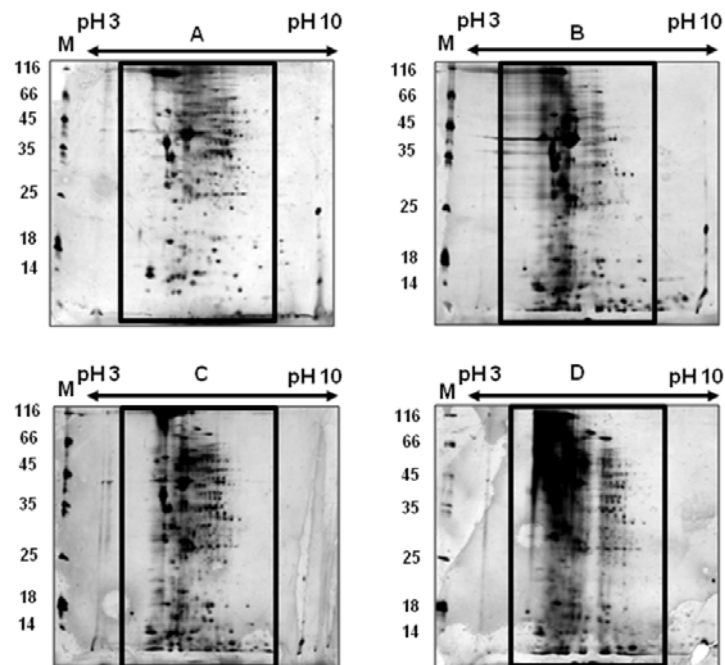


圖 2、吳郭魚精巢經不同藥劑培養後其蛋白質二維電泳 (pH 3~10) 及銀染之結果。A：添加 PACAP 藥劑組 (PACAP，2 小時)；B：添加 Forskolin 藥劑組 (Forskolin，2 小時)；C：添加 H89 藥劑組 (H89，2 小時)；D：添加 PACAP 及 Forskolin 藥劑組 (Combine，2 小時)。第一維：11 cm 膠條；第二維：12% SDS-PAGE； M：分子量標記；蛋白質定量：200 μ g；方框部份為蛋白質分佈之區域。

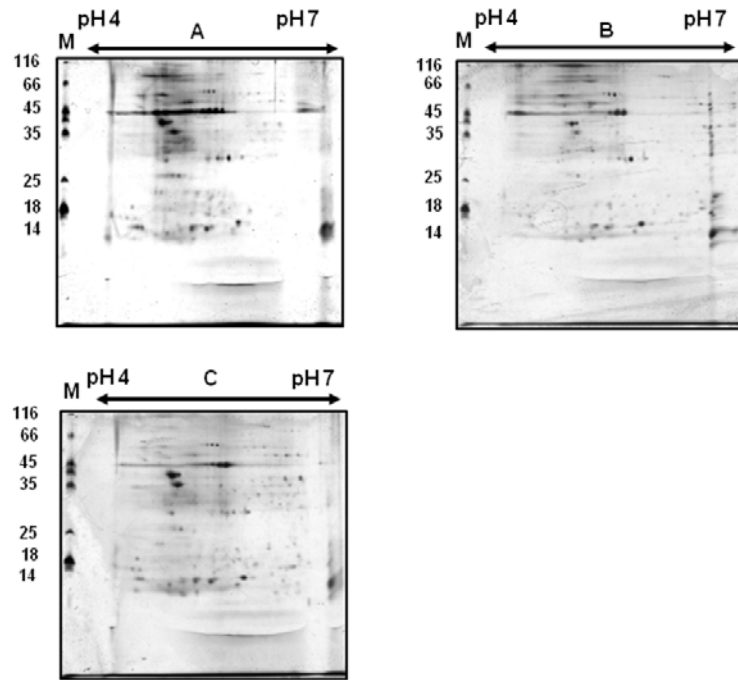


圖 3、吳郭魚精巢經不同時間培養後其蛋白質二維電泳 (pH 4~7) 及銀染之結果。A：新鮮組 (Fresh)；B：預培養組 (Pre-culture，8 小時)；C：未添加任何藥劑組 (Control，10 小時)。第一維：11 cm 膠條；第二維：12% SDS-PAGE；M：分子量標記；蛋白質定量：200 μg 。

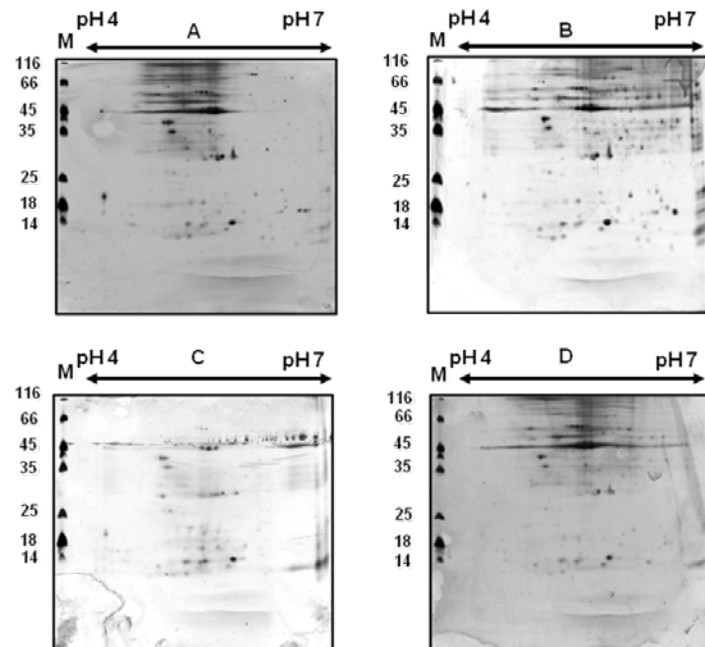


圖 4、吳郭魚精巢經不同藥劑培養後其蛋白質二維電泳 (pH 4~7) 及銀染之結果。A：添加 PACAP 藥劑組 (PACAP，2 小時)；B：添加 Forskolin 藥劑組 (Forskolin，2 小時)；C：添加 H89 藥劑組 (H89，2 小時)；D：添加 PACAP 及 Forskolin 藥劑組 (Combine，2 小時)。第一維：11 cm 膠條；第二維：12% SDS-PAGE；M：分子量標記；蛋白質定量：200 μg 。

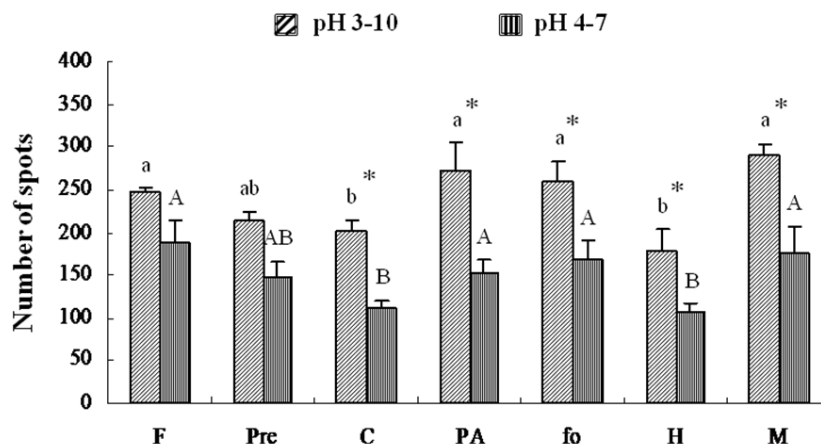


圖 5、吳郭魚精巢蛋白質精二維電泳分析後 (pH 3-10 及 pH 4-7) 之蛋白質點比較 (N=3)。F：新鮮組；Pre：預培養組 (Pre-culture，8 小時)；C：未添加藥劑組 (Control，10 小時)；PA：PACAP (2 小時)；Fo：Forskolin (2 小時)；H：H89 (2 小時)；M：添加 PACAP 及 Forskolin (Combine，2 小時)。a、b 及 A、B：於同一 pH 值範圍內之各組間不具相同字母者據統計上之差異；星號 (*) 表示於同一處理組中 pH 3~10 及 pH 4~7 二者比較後具顯著差異 ($P < 0.05$)。

誌謝

本計畫經費由行政院國家科學委員會所提供 (計畫編號: NSC 99-2632-B-212 -001 -MY3 及 NSC 100-2313-B-212 -004 -)，特此致謝。

參考文獻

- 吳柏叡。2010。固醇類荷爾蒙對體外培養吳郭魚性腺組織之蛋白質二維電泳分析。大葉大學分子生物科技學系碩士論文。
- 莫閔翔。2011。性腺素於體外培養吳郭魚性腺之固醇類荷爾蒙與腦垂體腺苷酸環化酶激活狀及其受體基因表現之調控分析。大葉大學分子生物科技學系碩士論文。
- 鍾孟樺。2012。促性腺激素對體外培養吳郭魚性腺蛋白質表現之二維電泳分析。大葉大學分子生物科技學系碩士論文。
- Burbaum, J. and Tobal, G.M. (2002). Proteomics in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, 6: 427-433.
- Davis, L.K., Fox, B.K., Lim, C., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., Hirano, T. and Grau, E.G. (2009). Induction of vitellogenin production in male tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by commercial fish diets. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 154: 249-54.
- Filipsson, K., Sundler, F., Hannibal, J. and Ahrén, B. (1998). PACAP and PACAP receptors in insulin producing tissues: localization and effects. *Regul Pept*, 74: 167-175.
- Filipsson, K., Martina, K.R. and Bo, A. (2001). The neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and islet function. *Diabetes*, 50(9): 1959-1969.
- Huang, W.T., Li, C.J., Wu, P.J., Chang, Y.S., Lee, T.L. and Weng, C.F. (2009). Expression and *in vitro*

- regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (*pacap38*) and its type I receptor (*pac1-r*) in the gonads of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Reproduction*, 137: 449-67.
- Kocher, T.D., Lee, W.J., Sobolewska, H., Penman, D. and McAndrew, B.** (1998). A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 148: 1225-32.
- Lee, B.Y., Lee, W.J., Streelman, J.T., Carleton, K.L., Howe, A.E., Hulata, G., Slettan, A., Stern, J.E., Terai, Y. and Kocher, T.D.** (2005). A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis spp.*). *Genetics*, 170: 237-44
- Maclean, N., Rahman, M.A., Sohm, F., Hwang, G., Iyengar, A., Ayad, H., Smith, A. and Farahmand, H.** (2002). Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene*, 295: 265-77.
- Mann, M and Jensen, O.N.** (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, 21: 255-261.
- Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A. and Yaron, Z.** (1998). Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 119: 325-38.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D. and Coy, D.H.** (1989). Isolation of a novel 38 residue hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 164(1): 567-574.
- Pandolfi, M., Lo Nostro, F.L., Shimizu, A., Pozzi, A.G., Meijide, F.J., Vazquez, G.R. and Maggese, M.C.** (2006) Identification of immunoreactive FSH and LH cells in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* during the ontogeny and sexual differentiation. *Anat Embryol (Berl)*, 211: 355-65.
- Schulz, R.W. and Goos, H.J.T.** (1999) Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 177: 5-12.
- Seale, A.P., Riley, L.G., Leedom, T.A., Kajimura, S., Doros, R.M., Hirano, T. and Grau, E.G.** (2002). Effects of environmental osmolality on release of prolactin, growth hormone and ACTH from the tilapia pituitary. *Gen Comp Endocrinol*, 128: 91-101.
- Tanaka, S., Sakai, A., Kimura, K., Yoshida, H., Fushitani, H., Ogata, A., Miyamoto, A., Fukushima, M., Wada, A. and Tanigawa, N.** (2008). Proteomic analysis of the basic proteins in 5-fluorouracil resistance of human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Int J Oncol*, 33: 361-70.
- Weltzien, F.A., Andersson, E., Andersen, O., Shalchian-Tabrizi, K. and Norberg, B.** (2004) The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (*Pleuronectiformes*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 137: 447-77.