

基因轉殖斑馬魚卵母細胞於產製新型抗高血壓胜肽之應用

**The Application of Transgenic Zebrafish (*Danio rerio*) Oocytes in  
Production of the Novel Anti-hypertensive Peptide**

李建旻<sup>1\*</sup> 謝婉玲<sup>1</sup> 邱洪馨<sup>1</sup> 周承翰<sup>1</sup> 林巧淳<sup>1</sup> 朱書宏<sup>1</sup> 陳小玲<sup>2</sup> 黃尉東<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>大葉大學 分子生物科技學系 (彰化縣大村鄉學府路 168 號)

<sup>2</sup>大葉大學 生物資源學系

<sup>1#</sup> kater@mail.dyu.edu.tw

**摘要**

高血壓 (hypertension) 疾病至今為國人十大死因之一，同時亦是罹患心血管疾病之風險因子。然隨消費者預防保健意識之提升，控制血壓相關機能性食品與類藥物營養劑之需求已日益增加，其中預防高血壓之血管緊縮素轉化酶抑制胜肽 (angiotensin converting enzyme inhibiting peptide, ACEIP) 更受矚目。目前國立中興大學生命科學系陳全木教授與大葉大學分子生物科技學系陳小玲教授已自 kefir grain 發酵乳原料中分離出一新穎之抗高血壓胜肽 (anti-hypertensive peptide No. 1, AP1)，經定序解析後發現此關鍵胜肽為  $\beta$ -酪蛋白 ( $\beta$ -casein) 中一特定片段之胜肽，其活性表現亦優於現有市售之調節血壓健康食品產品之關鍵主成分 VPP 與 IPP。本研究以先前斑馬魚 (zebrafish, *Danio rerio*) 為模式動物產生抗菌蛋白 (anti-microbial peptide) 平台技術之經驗，針對上述之功能性蛋白生產進行試驗。本試驗將抗高血壓胜肽 AP1 基因構築於斑馬 VTG 之啟動子下游，續將之選殖入 pAAV-IRES-hrGFP 及 pEGFP-N1 之表現載體，並以吳郭魚卵巢細胞株 (tilapia ovary, TO-2 cells) 分析其表現，並以顯微注射導入斑馬魚受精卵內，觀察並分析其表現位置。結果顯示於細胞轉染第 48 小時後可觀察到其綠螢光之信號，續以 RT-PCR 與西方墨點反應分析，進一步證實具綠螢光蛋白之表現。SDS PAGE 分析亦顯示 AP1 蛋白之可能表現。另將上述之載體以顯微注射之方式轉置至斑馬魚胚胎中之結果顯示，於注射後 24、72、120 及 168 小時以螢光顯微觀察於卵黃囊或肝臟皆具綠螢光之表現，此親代斑馬魚並可產製具螢光表現之第二子代斑馬魚。因此，本試驗已將 AP1 基因成功轉置於斑馬魚基因組中，後續將可藉斑馬魚為生物反應器產製抗高血壓胜肽 (AP1) 並進行功能性分析。

關鍵字：斑馬魚、基因轉殖、抗高血壓胜肽、卵母細胞

**前言**

據行政院衛生署報告高血壓 (hypertension) 疾病歷年至今均為國人十大死因之前十位 (七至十名)，平均每天約有 5 人因高血壓疾病而死亡，且十大死因中與高血壓相關之慢性病即佔了一半 (包括腦血管疾病、心臟疾病、糖尿病、腎炎腎症候群及腎性病變及高血壓性疾病)，並占總死亡人數的三分之一，其亦為多數已開發國家主要慢性病及死亡原因之一。高血壓意指血壓超過正常範圍，亦即收縮壓 (systolic

blood pressure; SBP) 超過 140 毫米水銀柱 (mmHg), 或舒張壓 (diastolic blood pressure; DBP) 超過 90 mmHg, 除家族性遺傳外, 並與高血壓與吸菸、飲酒、體重控制及運動習慣極具相關性。依據行政院衛生署國民健康局 94 年「國民健康訪問調查」訪查 2 萬 7 千多名民眾之結果發現, 12 歲以上民眾自述罹患高血壓者佔 11.8%, 且隨著年齡增加而遞增, 40 歲以上佔 23.1%, 即約每 4 人就有 1 人患有高血壓, 而 65 歲以上更高達每 2.5 人即有 1 人, 且此些罹患高血壓之民眾約有 2 成未按醫囑服用高血壓藥物, 而較年輕 (40 歲以下) 之患者更有一半的人沒有規則服藥。根據中央健保局最新之健保用藥年度統計, 在排行前十大用藥品項中, 降血壓藥物就占了 6 種, 而這些前十名用藥的健保總給付金額, 則超過新台幣 100 億元。因此, 預防高血壓不僅應列為現代人保健的重要課題, 更是節省國家健保資源之關鍵。就預防醫學的角度而言, 理想血壓應保持在 SBP 120/DBP 80 mmHg 以下, 每增加 20/10 mmHg, 心血管疾病的風險就加倍。2004 年美國國家聯合委員會 (JNC) 所公布之高血壓預防、偵測、評估及診療報告 (第七版), 新增介於 130/80 至 139/89 mmHg 間之高血壓前期 (pre-hypertension) 類別, 此等族群未來發生高血壓的風險, 比低於 130/80 mmHg 者高出二倍。國人隨年齡增長血壓逐漸升高, 多數在高血壓前期未能及時改變飲食或生活形態, 遂成為高血壓病患, 必須終身與高血壓藥物為伍。然而, 市售降血壓藥物卻常有輕重不等的副作用, 如血壓過低、咳嗽、高鉀血症、腎功能損害、胚胎異常、血管水腫、不孕、嗜中性白血球減少症、皮疹及高蛋白尿等 (Brown *et al.*, 1998)。由此, 廣大的高血壓族群不僅需過著依賴藥物的低品質生活, 更成為耗損健保資源的社會負擔。有鑑於此, 逐年邁向高齡化結構的國人, 更應積極預防高血壓。

國立中興大學生命科學系陳全木教授與大葉大學分子生物科技學系陳小玲教授已自 kefir grain 發酵乳原料中分離出一新穎之調節血壓胜肽 (anti-hypertensive peptide, AP1) 基因, 經定序解析後發現此關鍵胜肽為  $\beta$ -酪蛋白 ( $\beta$ -casein) 第 177-195 位置之 19 個胺基酸胜肽, 可明顯降低自發性高血壓大鼠之收縮壓與舒張壓, 其活性表現亦優於現有市售之調節血壓健康食品產品之關鍵主成分 VPP 與 IPP, 並已申請美國、台灣與歐盟等之專利。二者已計畫開發「調節血壓健康食品」(行政院衛生署 96 年公告新增健康食品保健功效別), 針對上述廣大的高血壓前期族群, 訴求每日攝取可維持正常血壓, 以期延緩終身使用高血壓藥物之年齡, 甚或降低罹患高血壓之機率。

本研究室先前亦以斑馬魚為模式動物, 將草蝦 (*Penaeus monodon*) 抗菌蛋白基因 (monodoncins) 序列構築於斑馬魚之雌性專一性透明帶基因 (female-specific zebrafish zona pellucida, *zpc*)、啟動子卵巢腫瘤 (ovarian tumor, OTU) 及卵黃生成素前質基因 (vitellogenin, *Vg1*) 等之啟動子其後, 使其專一於卵母細胞或肝臟表現, 並將前述魚卵經冷凍乾燥與磨碎後, 及不同時間水和後之顆粒或粉狀卵, 飼與精病菌感染之斑馬魚及吳郭魚, 證實可提高二者之存活率。斑馬魚 (zebrafish, *Danio rerio*) 擁有許多利於早期發育研究之優點, 如大而透明之卵較易於發育時期器官之觀察, 與小鼠相較之下, 斑馬魚較易於飼養且所需空間較小, 其高生產量及較迅速之發育過程及較晚成熟之免疫系統 (約 1 個月) 等時間、經費、生理與人力優勢條件, 均為使斑馬魚成為一小鼠外常被運用以研究人類疾病之發生及治療之試驗模式動物 (animal model) 之原因 (Kimmel *et al.*, 1995; Lieschke and Currie, 2007)。目前已有於肝臟、腸、內外分泌胰臟、心臟、腦、神經、肌肉、血管及血球等器官或組織表現螢光 (fluorescence) 之基因轉殖斑馬魚被產出。早期斑馬魚之研究多集中於胚胎發育機制、基因調控及環境毒物對其發育之影響, 現已擴展應用於人類疾病、藥物、毒物之篩選與癌症方面之研究 (Amatruda *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Lieschke and Currie, 2007; Love *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2009; Nicoli and Presta, 2007; Nicoli *et al.*, 2007; Shafizadeh and Paw, 2004; Topczewska *et al.*, 2006; Traver *et al.*, 2003)。此外, 功能性蛋白之生產目前多以細菌 (*E. Coli*) 或、酵母菌 (yeast) 或化學合成為主, 此雖可達大量生產之目的, 但所產製之功能性蛋白可能因

轉譯後修飾 (post-translational modification) 或生物活性 (bioactivity) 不佳之缺陷而產生問題。因此，斑馬魚除前述之應用外，亦有以斑馬魚卵產製人類第七凝血因子 (human coagulation factor VII; Hwang *et al.*, 2004) 與抗菌胜肽 (bactericidal peptide; Lin *et al.*, 2009) 等之醫藥用途或產生表現不同螢光之斑馬魚用於觀賞寵物 (Gong *et al.*, 2003) 方面等。因此，以魚類之卵或身體為生物反應器已成為家畜禽之外之最佳選擇。

本計畫將以前述之試驗結果為基礎，續以斑馬魚為模式動物，將抗高血壓胜肽基因 (AP1) 序列構築於斑馬魚之卵黃生成素前質基因 (Vg1) 基因啟動子啟動子其後，使其專一於卵母細胞表現，以斑馬魚為一生物反應器 (bioreactor) 產製此一抗高血壓胜肽，期可產生治療之效用。並將以此技術應用於繁殖力強或產卵數量多之魚種，如吳郭魚及烏魚等，以大量產製此抗高血壓胜肽，擴大其之應用。

## 材料與方法

### 1 試驗動物

本研究所使用之斑馬魚 (zebrafish, *Danio rerio*) 由中研院細胞與個體生物學研究所吳金洌教授所提供，飼養於本所之基因轉殖魚類養殖室。其培養條件為28°C及光週期14小時 (14 L:10 D)。以適量之人工乾燥飼料 (福壽, 台北, 台灣) 定時早晚餵食二次，並每日定時換水與清洗魚缸。

### 2 抗高血壓胜肽基因序列於含斑馬魚卵黃生成素前質基因 (vitellogenin) 啟動子之構築

卵黃生成素前質 (vitellogenin, Vg1) 為卵生 (oviparous) 動物之卵黃素 (vitellin) 前驅物，於胚胎發生期間系統性地調控胚胎之發育，其於肝臟 (liver) 中生成經由循環系統運送至卵巢濾泡細胞合成。本研究室先前已選殖到卵黃生成素前質 (Vg1) 基因啟動子2.0、1.5、1.0及0.5 kb等片段並進行分析，結果亦以1.0 kb片段效用較佳。故AP1基因序列將構築於含斑馬魚Vg1基因啟動子之pAAV載體，另亦以無啟動子及AP1基因序列之pAAV載體及含AP1序列之pEGFP-N1載體 (Clontech) 為對照組，而後以顯微注射之方式送入斑馬魚受精卵中，觀察其之表現並進行分析其活性。

### 3 細胞株之培養

#### 3.1 細胞株之培養條件

吳郭魚卵巢細胞 (TO-2; 由國立台灣大學生命科學院動物學研究所羅竹芳教授與郭光雄教授所提供) (L15 medium, 41300-039, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 培養於28°C無CO<sub>2</sub>之相對溼度100%之環境下，10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 16000-044; Gibco, Carlsbad, CA, USA) 與抗生素 (penicillin-streptomycin, 15140-122, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 之基礎培養液 (DMEM, 31800-022, Invitrogen) 進行培養。

#### 3.2 細胞株之繼代培養

當細胞於培養皿 (25T, 156340, Nunclon™, Roskilde, Denmark) 內長滿單層約8至9成時，便進行繼代培養，移除培養皿內舊有之培養液後，取10 mL之1×PBS (phosphate buffered saline, 70011-044, Gibco) 洗去殘留於細胞表面之舊培養基，去除PBS後加入適量之0.25% trypsin-EDTA (15400-054, Gibco) 溶液使細胞剝落，加入適當新鮮培養液並含10%胎牛血清混合均勻，經吸放數次以沖散細胞層，再分注於其他新之培養皿中繼續培養 (經計數約1×10<sup>6</sup>細胞)。而細胞之計數則經trypan blue (T8154, Sigma, Invive, UK) 染

劑染色後，將細胞置於血球計數器 (hemacytometer) 上，於顯微鏡 (IX 71, Olympus, Tokyo, Japan) 下觀察細胞存活並進行計數，存活之細胞外觀完整且圓亮，若死亡之細胞則因染劑之進入而呈現藍色。

### 3.3 細胞株之轉染 (transfection)

以0.5 mg/mL pH 7.4之聚乙烯亞胺 (polyethylenimine, PEI, 23966-2, Polysciences, Warrington, PA, USA) 進行細胞轉染試驗，預先培養 $2 \times 10^5$  cells/mL之293T細胞於6-well (140675, Nunclon™) 培養皿中培養約至八分滿，取1  $\mu$ g之載體及10 ng  $\beta$ -galactosidase與200  $\mu$ L之0.15 M NaCl，震盪1秒並離心後加入5.6  $\mu$ L之PEI使其混合均勻，離心數秒靜置室溫下15分鐘，此時移除6-well中原先之舊培養液，清洗後添加新500  $\mu$ L無胎牛血清及抗生素之培養液至well中，另加入含前述載體DNA (pAAV-IRES-Vg1-AP1) 及控制組DNA (pAAV-IRES及pEGFP-N1) 與PEI所混合之培養液，於28°C培養約3小時，之後再加入2.5 mL含胎牛血清及抗生素之培養液。於28°C培養48小時，之後再吸取培養液並加入2 mL之新鮮培養液。

## 4 AP1及EGFP基因於轉染細胞之分析

### 4.1 Total RNA之分離

試驗中所使用之器械均需經過RNase free處理，器材則以3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡16小時，再以DEPC (Diethylpyrocarbonate, D5758, Sigma) 水清洗。以1×PBS，將轉染後之細胞沖洗離培養盤，置入1.5 mL離心管中，加入1 mL之Trisolution reagent Plus (TS200-plus, GeneMark, Taipei, Taiwan)。加入所使用Trisolution reagent五分之一體積之氯仿 (chloroform, Katayama Chemical, Osaka, Japan)，並均勻振盪15秒以混合反應液。離心20分鐘，吸取上層液至新的離心管，加入等量體積之iso-propanol (P1025, Katayama Chemical) 於室溫中靜置20分鐘，離心20分鐘以沉澱RNA。離心後管壁將有RNA沉澱物 (pellet)，以1 mL DECP-H<sub>2</sub>O-70%酒精 (經過濃度0.1%之DEPC所處理過之二次水) 清洗RNA pellet，離心5分鐘將離心管靜置風乾RNA。加入20  $\mu$ L DEPC水將RNA溶解，定量製備完成之total RNA。

### 4.2 反轉錄酶-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

互補DNA (cDNA) 之合成則以RT-PCR system (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) 進行製備。20  $\mu$ g之total RNA與Oligo (dT<sub>20</sub>) (50  $\mu$ M) 及random hexamers (100 ng/50  $\mu$ L) 於65 °C去活性 (denature) 5分鐘後，再將此去活性之RNA 置於含DTT (0.1 M)、50  $\mu$ M dNTPs、1  $\mu$ L Rnase Out (40 U) 及0.5  $\mu$ L ThermoScript RT (反轉錄酶) 之混合液中進行反應。其反應條件如下: 1 cycle/55 °C/125分鐘及1 cycle/85 °C/5分鐘。經反轉錄之作用後，此產物先與1  $\mu$ L (2 U) *E. coli*. RNase H於37 °C培養20分鐘後，再貯存於-20 °C備用。

上述合成之互補DNA將進行PCR反應。此PCR反應除以1  $\mu$ g之cDNA為模板 (template) 外，其他之添加物為5  $\mu$ L之10× High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen,)、1  $\mu$ L之10 mM dNTP (Invitrogen)、1  $\mu$ L之50 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) 及各2  $\mu$ L 10 mM之5'與3'引子 (AP1、EGFP與內控制組 $\beta$ -actin) 加入0.5  $\mu$ L Taq High Fidelity DNA polymerase (Invitrogen) 及加入滅菌水至總反應體積為50  $\mu$ L。PCR之反應條件如下: 94°C/5分鐘; 94°C解離30秒; primer T<sub>m</sub>值減5至10°C黏合30秒、72°C合成1分鐘，再以解離、引子黏合、合成步驟重複35個循環，最後再於72°C保持10分鐘進行最後1個循環後，於4°C下保存。PCR之產物除以2%之洋菜膠 (agarose gel) 進行電泳分析，以溴乙錠 (EtBr) 染色後於紫外光下檢查各基因片段之分佈並照相存證外，另做定序分析 (sequencing)，以確定其為正確之序列。

## 5 轉染細胞之西方吸漬分析

### 5.1 細胞蛋白質之萃取

將轉染後之細胞移除培養液，以1 mL之PBS將細胞沖洗下來收集至1.5 mL之離心管中，並以5,000 rpm離心10分鐘去除PBS，而後加入50  $\mu$ L之PBS將細胞打散與25  $\mu$ L 3 $\times$  sample buffer 混合，於沸水中加熱5分鐘之後立即置冰上10分鐘，而後保存於-20°C。以Bio-Rad protein Assay Dye Reagent試劑進行定量。另將10  $\mu$ L之待測試樣品，加入1 mL之試劑中進行測定，所得之數值以內插法計算出蛋白質樣品之濃度。

## 5.2 西方吸漬分析

將35~100  $\mu$ g蛋白質溶液與sample buffer以1:1 (V/V) 混合後，於100°C加熱10分鐘，再放入冰中10分鐘，而後加入膠體樣品之stacking gel槽內。先以80 V進行電泳，待樣品蛋白質跑入分離層膠體後(stacking gel底部，約10~20分鐘)，改以120 V進行電泳(約60分鐘)，待樣品中之bromophenol blue跑至膠體末端時即可停止電源，將兩玻片分開小心緩慢取出膠體，以進行電轉印或膠體染色。當蛋白質轉印完畢，取出硝化纖維膜，浸在TBS洗液中洗2分鐘，以去除殘留電泳膠。於雜交管內加入含5%脫脂乳粉之blocking buffer，與硝化纖維膜在室溫下旋轉進行blocking 30分鐘至1小時，以降低非專一性所產生之背景值。而後加入稀釋以施打化學合成之抗高血壓胜肽(AP1)至大鼠(rat)所製成之polyclonal初級抗體溶液或GFP (B-2, sc-9996, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 與 $\beta$ -actin (A-5441, Sigma) 初級抗體(抗體稀釋於5% 脫脂乳粉之blocking buffer)，於室溫下雜交反應1~2小時。續之倒掉溶液，以TBS/tween溶液清洗3次，每次5分鐘。再加入稀釋之二級抗體溶液(Goat anti-Rat IgG-heavy and light chain HRP conjugated, 抗體稀釋於5%脫脂乳粉之blocking buffer)，於室溫下雜交1小時。而後再以TBS/tween溶液清洗3次，每次5分鐘；再以TBS清洗5分鐘，以去除Tween-20。最後以ECL套組(Amersham RPN 2106) 與硝化纖維膜進行呈色，並以X光底片感光，約1~2分鐘後即可沖洗底片觀察結果，曝光時間或依訊息強弱而有所調整。藉以定量卵母細胞中抗高血壓胜肽之濃度。

## 6 抗高血壓胜肽基因載體於斑馬魚卵母細胞之顯微注射與分析

本研究將AP1之基因構築於前述之pAAV及pEGFP-N1載體後，以顯微注射之方式送入斑馬魚受精卵中，觀察其之表現並於仔稚魚及成魚進行分析，以螢光顯微鏡觀察此基因之表現是否表現。

### 6.1 斑馬魚之飼養與產卵

將斑馬魚飼養於28°C之魚房，並給予14小時之光照，待斑馬魚成長到三個月大，將公母魚分開飼養，每天定時投與飼料及定時換水與清洗魚缸。產卵前一天最後一次餵食後，撈出公母魚(1:1)至產卵箱，並以擋板區隔，待隔天開始光照後，立刻更換產卵箱之水並拉開擋板，待15分鐘後收取魚卵。

### 6.2 顯微注射

先將魚卵排列整齊排列於置卵盤上之溝中(置卵盤為以1% agarose所製成)，再以毛細管(OD 1.0 mm, ID 0.5 mm, 10 cm length, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) 以水平拉針器(P-97, Sutter Instrument Co.) 拉成針形，並置於磨針器(EG-400, Narishige, Tokyo, Japan) 磨盤上以俯角30~40度磨出適當口徑與角度。製作成玻璃注射針並吸取事先混合0.2% phenol red之AP1載體溶液，由顯微鏡(SMZ800, Nikon, Tokyo, Japan) 下調整針頭與魚卵之間之焦距，放大100倍率下，利用氣壓式注射器(IM300, Narishige International, East Meadow, NY, USA) 釋放於卵黃中或細胞與卵黃介面附近，待進入二細胞期即停止注射，將魚卵放在含embryo medium之培養皿，於28°C培養箱中培養，定時以螢光顯微鏡(顯微鏡:IX 71 Olympus, Tokyo, Japan; 照相裝置: Digital Camera, Chroma 73901, Tokyo, Japan) 下，觀察綠螢光蛋白(GFP; 吸收波長488 nm, 激發波長507 nm) 之表現及分布情形，並照相記錄之，直至成體。

## 結果

### 1 抗高血壓胜肽基因質體之功能活性分析

#### 1.1 TO-2 細胞轉染

將構築完成之 pAAV-VTG-AP1 及 pEGFP-N1-AP1 各以 1  $\mu$ g 轉染 (transfection) 至吳郭魚卵巢細胞株 (TO-2) 中，並以未轉染之細胞、轉染 pAAV 空載體及 pEGFP-N1 為控制組，於轉染 48 小時後以螢光顯微鏡觀察其表現並拍照記錄。結果顯示 VTG 啟動子基因經轉染於 TO-2 細胞 48 小時後可被驅動而表現綠螢光蛋白 (圖 1)，而經轉染 120 小時後將萃取其細胞之 RNA 或蛋白質以進行後續之分析。

#### 1.2 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 及西方墨點反應 (Western blot) 之分析

將上述經轉染 120 小時之 TO-2 細胞株收下，並萃取其 RNA 與蛋白質分別以 RT-PCR 反應及西方墨點反應分析其表現。結果顯示於此將細胞可偵測到 GFP (約 720 bp) 及 AP1 (約 204 bp) 之表現 (圖 2)；另將細胞蛋白質定量為 50  $\mu$ g，經西方西漬分析可偵測到綠螢光蛋白 (GFP，分子量為 28 kDa) 之表現 (圖 3)。

### 2 斑馬魚卵顯微注射之分析與觀察

單細胞期之斑馬魚卵經以 pAAV-VTG-AP1 及 pEGFP-N1 載體顯微注射後之 24 (圖 4A)、72、120 及 168 (圖 4B) 小時以螢光顯微鏡觀察之結果顯示，於 24 小時之魚卵開始有部分或全身性之螢光表現，而 pAAV-VTG-AP1 質體於注射後 7 天其螢光部分似表現於肝臟位置。控制組 (control) 則為未經顯微注射及 pEGFP-N1 二者。將前述具有綠螢光之魚卵挑選出並持續飼養成為親代 (Founder, F0)，親代成長 3 個月性成熟後，使親代母魚與野生型公魚進行雜交產生第一子代 (F1)，續進行第一子代基因轉殖分析。

### 3 斑馬魚第一子代基因轉殖分析

由親代 (F0) 母魚與野生型雄魚產製出 96 顆魚卵，以螢光顯微鏡觀察並挑選出具螢光表現之魚卵，稱其為第一子代 (F1)。結果顯示，96 顆魚卵中，共挑選出 6 顆魚卵於受精後 24 小時具螢光表現，續觀察受精後 1 個月 (圖 5A) 及 2 個月 (圖 5B) 之魚卵皆可於肝臟及消化道之位置具綠色螢光之表現。



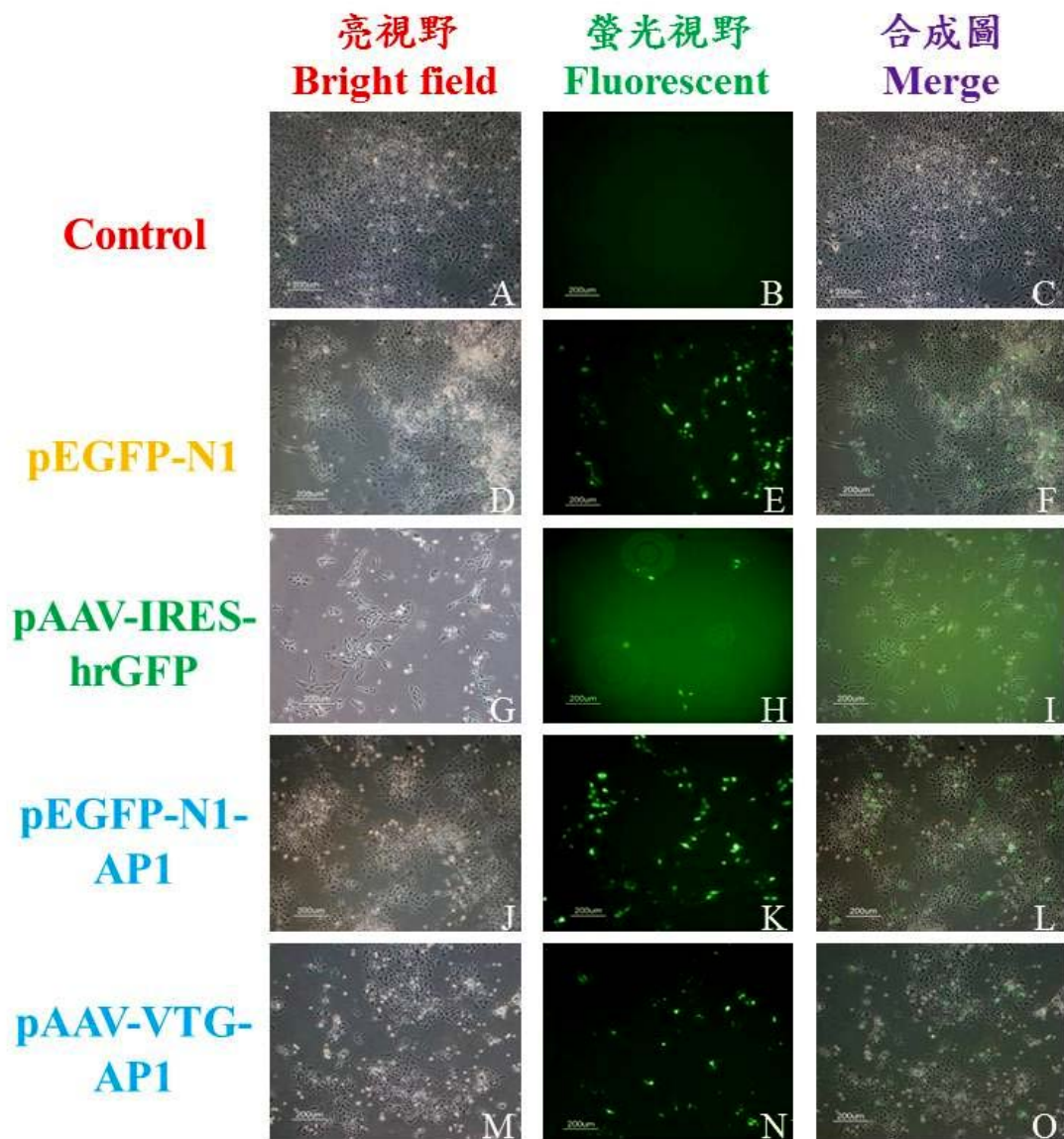


圖 1. 抗高血壓胜肽 (AP1) 及 VTG 基因啟動子構築於 pAAV 載體並轉染於 TO-2 細胞 48 小時後之螢光表現結果

A、B 與 C 為未轉染之控制組，D、E 與 F 為 pEGFP-N1 轉染，G、H 與 I 為 pAAV 空載體轉染，J、K 與 L 為 pEGFP-N1-AP1 轉染，M、N 與 O 為 pAAV-VTG-AP1 轉染，A、D、G、J 及 M 為亮視野下之觀察，B、E、H、K 及 N 為螢光顯微鏡下觀察綠螢光之表現結果，C、F、I、L 及 O 為綠螢光及亮視野之合成圖 (C、F、I、L 及 O 分別為 A 與 B，D 與 E，G 與 H，J 與 K 及 M 與 N 之合成圖)。Scale bar = 200 $\mu$ m

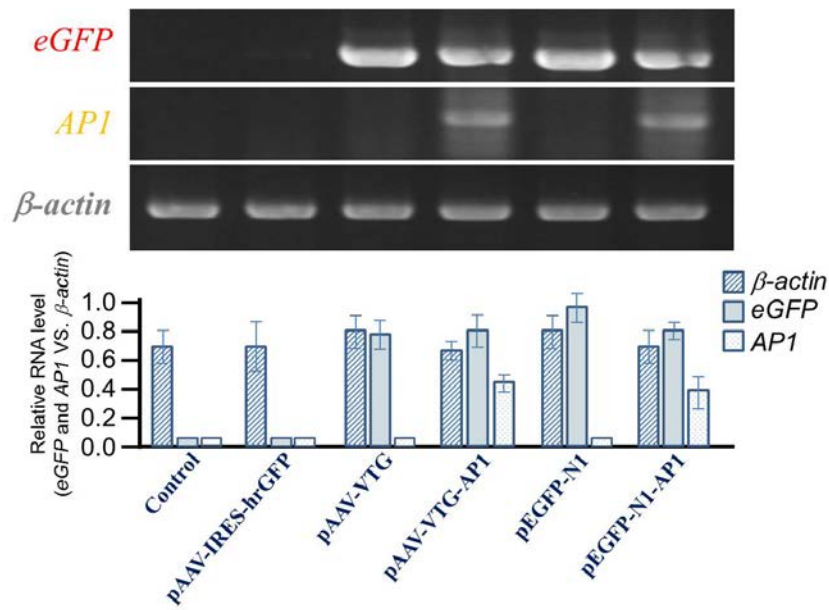


圖 2. TO-2 細胞經轉染不同載體 120 小時後反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 分析之結果

a – 未轉染之 TO-2 細胞 RNA, b – pAAV 之空載體, c – pAAV-VTG 質體, d – pAAV-VTG-API 質體, e – pEGFP-N1 質體, f – pEGFP-N1-API 質體。eGFP、 $\beta$ -actin 及 AP1 分子量大小分別約為 720 bp、675 bp 及 204 bp。

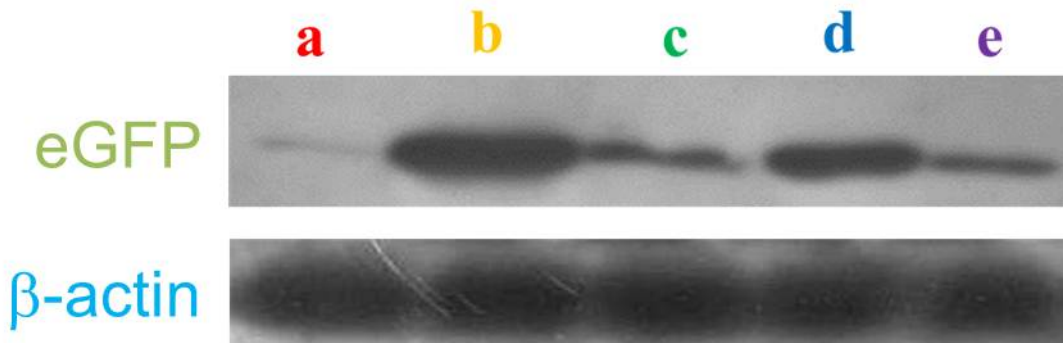


圖 3. TO-2 細胞經轉染不同載體 120 小時後以西方吸漬分析 eGFP 蛋白之結果  
a – 未轉染之 TO-2 細胞蛋白質, b – pAAV-VTG 質體, c – pAAV-VTG-API, d – pEGFP-N1, e – pEGFP-N1-API。eGFP 及  $\beta$ -actin 分子量大小分別為 28 kDa 及 43 kDa。



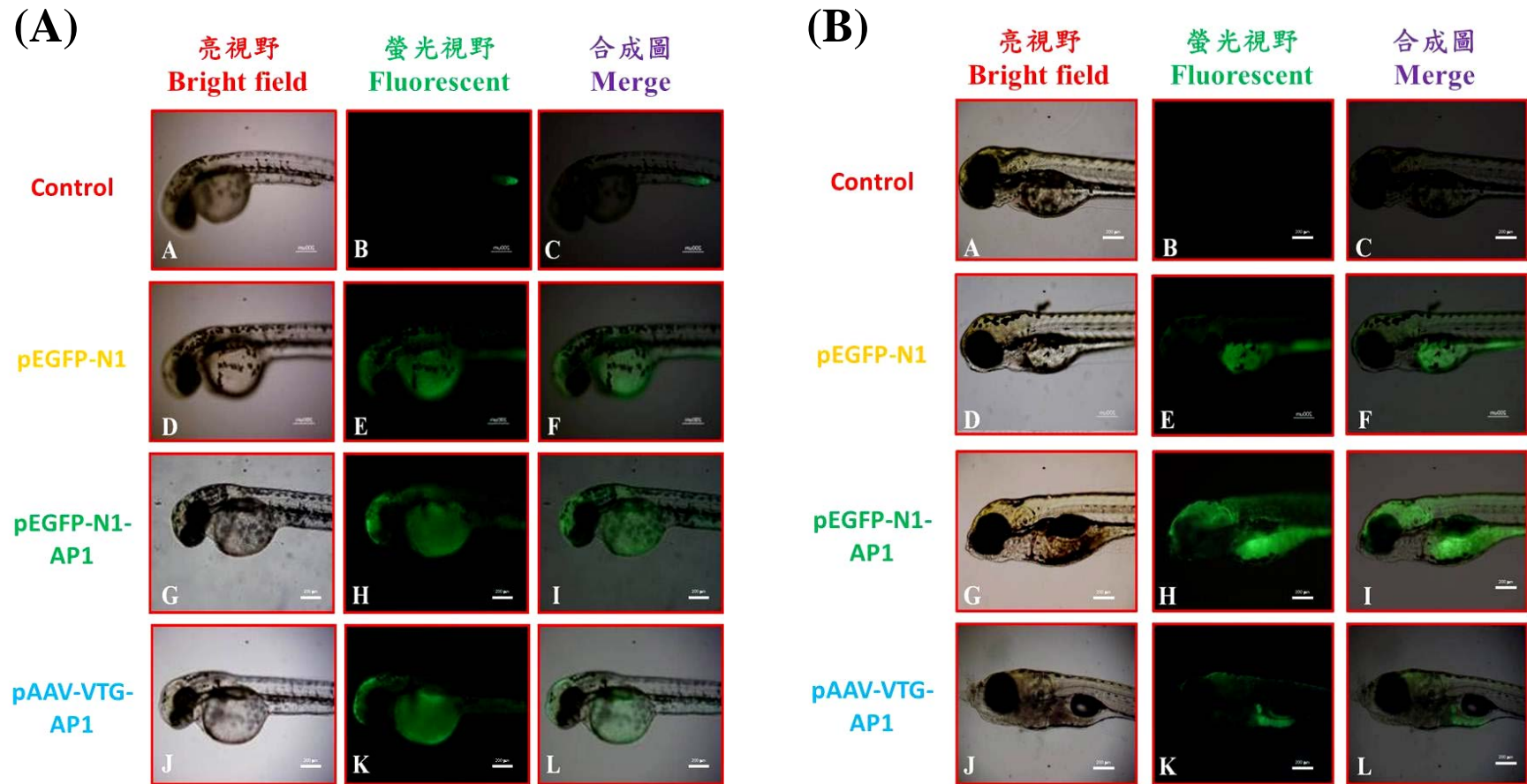
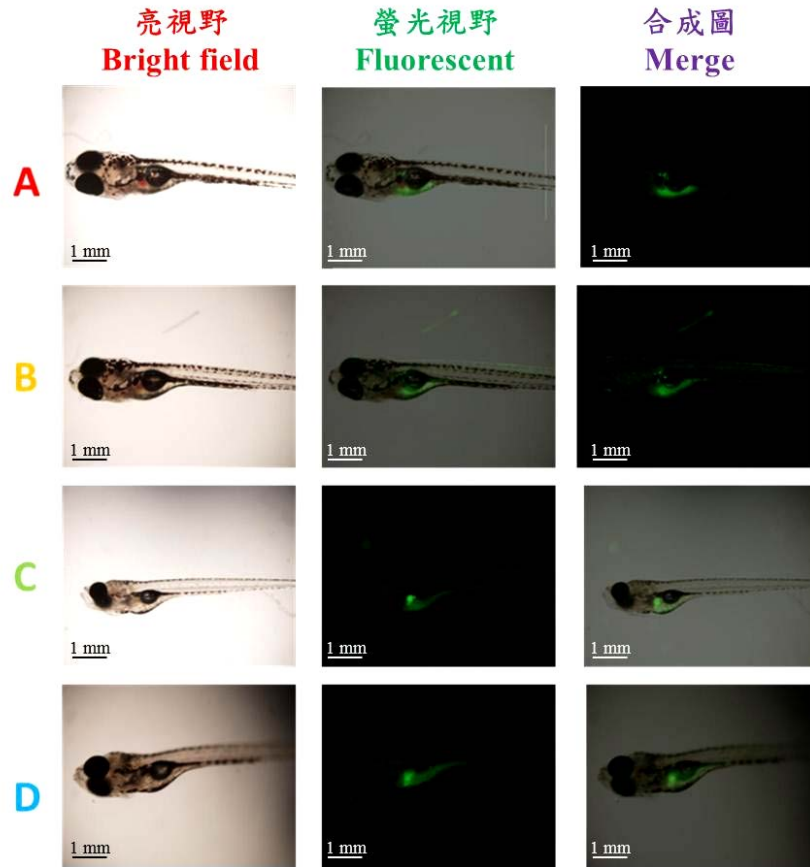


圖 1. 斑馬魚卵經注射 pAAV-VTG-AP1 及 pEGFP-N1-AP1 質體 24 (A) 及 168 (B) 小時之表現結果

A、B 與 C 為未顯微注射之控制組，D、E 與 F 為注射 pEGFP-N1 質體，G、H 與 I 為注射 pEGFP-N1-AP1 質體，J、K 與 L 為注射 pAAV-VTG-AP1 質體。A、D、G 及 J 為亮視野下之觀察，B、E、H 及 K 為螢光顯微鏡下觀察綠螢光之表現結果，C、F、I 及 L 為綠螢光及亮視野之合成圖（C、F、I 及 L 分別為 A 與 B，D 與 E，G 與 H，J 與 K 之合成圖）。Scale bar = 200  $\mu$ m

(A)



(B)

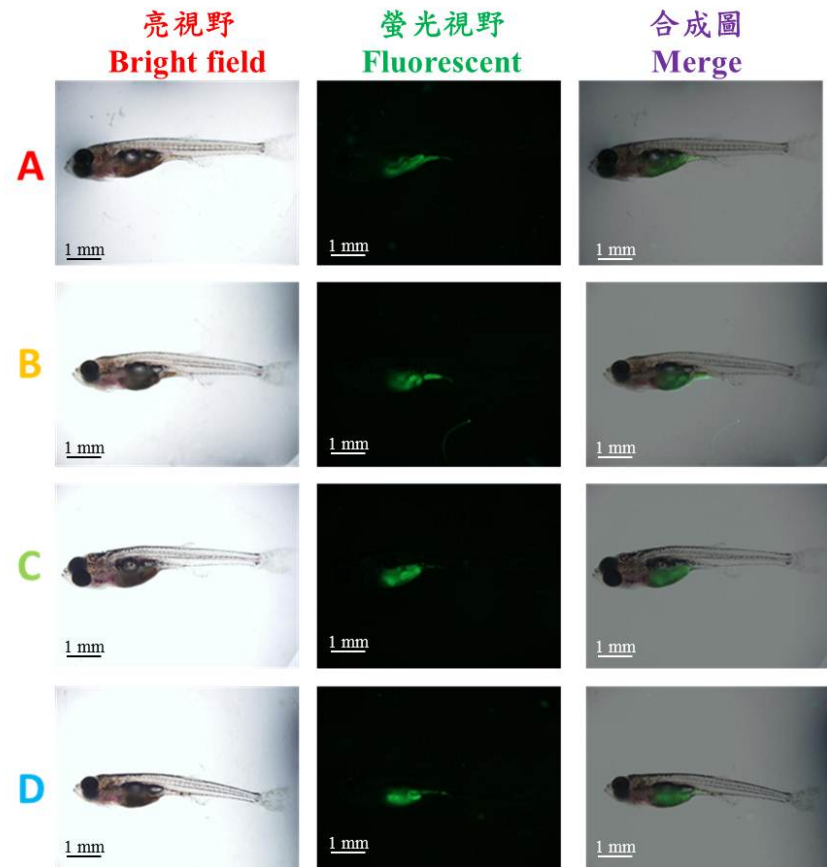


圖 5. 以親代進行雜交試驗所產製之第一子代抗高血壓胜肽基因轉殖斑馬魚，於受精後一個月 (A) 及二個月 (B) 利用螢光顯微鏡觀察之結果

A、B、C 及 D 為自子代中挑選出具有螢光表現之斑馬魚，分別以亮視野、螢光視野及合成圖觀察其表現情形。

## 討論

高血壓 (hypertension) 疾病至今為國人十大死因之一，同時也是罹患心血管疾病之風險因子，因此控制血壓相關機能性食品與類藥物營養劑之需求日益增加。雖目前國際市場上已有此類之保健食品，然國內卻無成功之研究與商品，仍亟待開發。本研究應用之胜肽序列為國立中興大學生命科學系陳全木教授與大葉大學分子生物科技學系陳小玲教授已自kefir grain發酵乳原料中分離出一新穎之抗高血壓胜肽 (anti-hypertensive peptide, AP1)，其可明顯降低自發性高血壓大鼠之收縮壓與舒張壓，其活性表現亦優於市售之調節血壓健康食品產品之關鍵主成分VPP與IPP，並已申請美國、台灣與歐盟等之專利。

而功能性蛋白之生產目前多以細菌 (*E. Coli*)、酵母菌 (yeast) 或化學合成為主，此雖可達大量生產之目的，但所產製之功能性蛋白可能因轉譯後修飾 (post-translational modification) 或生物活性 (bioactivity) 不佳之缺陷而產生問題。斑馬魚與小鼠相較下，其擁有大而透明之卵，易於觀察，且所需飼養空間較小，具高生產量及迅速之發育過程等優點。早期斑馬魚之研究多集中於胚胎發育機制、基因調控及環境毒物對其發育之影響，現已擴展應用於人類疾病、藥物篩選與毒物及癌症方面之研究。本研究室先前曾對抗生素停用及抗菌蛋白生產之改進等問題，以斑馬魚 (*Danio rerio*) 為模式動物，將前述之草蝦 (*Penaeus monodon*) 抗菌蛋白基因 (monodocins) 序列構築於斑馬魚之雌性專一性透明帶基因 (female-specific zebrafish zona pellucida, *zpc*)、卵黃生成素前質基因 (vitellogenin) 及卵巢腫瘤 (ovarian tumor, OTU; Mo *et al.*, 2005) 基因啟動子其後，使其專一於卵母細胞表現。經顯微注射構築之 pAAV-pzfZPC-AMP 載體至斑馬魚受精卵後，觀察其性腺之發育及其繁殖產卵行為之表現結果顯示，經注射後6至48小時以RT-PCR方式分析魚體及卵母細胞中均可偵測到AMP基因之表現，培育2個月後，其AMP及螢光於性腺及消化器官似均有表現，其子代 (F1) 亦可以RT-PCR偵測到AMP之基因 (Chen *et al.*, 2008, 2009)。另將AMP片段構築於含1 kb 之卵黃生成素前質基因 (Vg1) 與卵巢腫瘤基因 (OTU) 基因啟動子片段之pEGFP-1及pAAV載體中，並將此二構築之載體 (1 kb Vg1-pAAV-AMP及1 kb OTU-pAAV-AMP) 顯微注射至斑馬魚受精卵中或轉染至細胞株中，結果顯示經注射或轉染後6至48小時均可偵測到螢光 (GFP) 或AMP基因之表現，且隨培養時間增加，其之表現位置專一集中於肝臟所在。於活體 (*in vivo*) 方面，前述經注射構築之pAAV-pzfZPC-AMP、1 kb Vg1-pAAV-AMP及1 kb OTU-pAAV-AMP載體有表現之斑馬魚，部分已有子代產生 (Hsu *et al.*, 2007; Mo *et al.*, 2008)。將試驗前述魚卵經冷凍乾燥與磨碎後，及不同時間水和後之顆粒或粉狀卵，斑馬魚及吳郭魚均會進食，經細菌感染試驗證實可提高存活率。以抗菌蛋白轉殖斑馬魚之卵分離之蛋白質進行經格蘭氏陰性菌-溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 及大腸桿菌 (*E. coli*) 菌類感染處理後，其對 *Vibrio alginolyticus* 抑菌之最佳之使用劑量約為1,000 µg AMP。吳郭魚 TO-2 細胞經轉染CMV-AMP-pEGFP-N1或CMV-pEGFP-N1載體後所萃取之不同濃度蛋白質應用於 *E. Coli* 及 *Vibrio alginolyticus* 之抗菌試驗之結果顯示，600 µg以上之AMP即有抗菌效果 (Chen *et al.*, 2008, 2009)。目前於魚類已有類似報告，分別以斑馬魚卵產製人類第七凝血因子 (human coagulation factor VII; Hwang *et al.*, 2004) 與抗菌胜肽 (bactericidal peptide; Lin *et al.*, 2010) 及以鱒魚 (rainbow trout) 胚產製金魚 (goldfish) 之促黃體激素 (luteinizing hormone; Morita *et al.*, 2004) 等之醫學用途或產生表現不同螢光之斑馬魚用於觀賞寵物 (Gong *et al.*, 2003) 方面等。因此，以魚類之卵或身體為生物反應器 (bioreactor) 已成為家畜禽之外之最佳選擇。

本研究目前所得之結果與先前之研究結果相符，於RT-PCR、西方吸漬分析及斑馬魚卵活體顯微注射分析均可證實斑馬魚肝臟專一性之卵黃生成前質啟動子及AP1之作用與表現。因此期以前述已建立之技術與經驗產製可生產抗高血壓胜肽之魚系，並將此含抗高血壓胜肽之卵母細胞以加工之飼料型式，飼與

自發性高血壓大鼠，期可產生治療之效用。如此模式成功，將以此技術應用於繁殖力強或產卵數量多之魚種，如吳郭魚及烏魚等，以大量產製此抗高血壓胜肽，即可以食用之方式攝取此胜肽，進而預防或治療高血壓之發生。斑馬魚雖可產多量之魚卵（200~300個/周），但受限於體積及卵子均小，產量無法提昇，而烏魚為臺灣冬季西部海域重要經濟性洄游魚類，具雜食性、成長快、繁殖力強等生物特性，故非常適合人工養殖，加上其廣溫、廣鹽之特性，故於本省多處水源乾淨及充足之所在皆可進行養殖；本省天然烏魚捕獲量逐年減產，烏魚卵巢加工所製成之烏魚子不僅國人需求高，亦是外銷日本之產品，外銷管道順暢；近年來烏魚養殖已逐漸增加，抱卵烏魚養殖之經濟效益亦逐漸提高。因此如能以烏魚卵產製此一抗高血壓胜肽，除可大量生產外，亦可增加其經濟效益。

### 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），特此致謝。

### 參考文獻

- Amatruda, J. F., Shepard, J. L., Stern, H. M. and Zon, L. I. 2002. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell* 1:229-231.
- Brown, N. J. and Vaughan, D. E. 1998. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation* 97:1411-1420.
- Chen, H. L., Hsu, P. C., Mo, M. H., Lee, S. Y., Wu, J. L., Lu, J. K., and Huang, W. T. 2009. Antimicrobial peptides (Monodoncins) production in zebrafish (*Danio rerio*) oocytes – a new bioreactor. In “Proc. Symp. of the 24<sup>th</sup> Joint Annual Conference of Biomedical Science”, Taipei, Taiwan. P-548.
- Chen, H. L., Mo, M. H., He, Y. C., Tseng, Y. J., Wu, J. L., Lu, J. K., and Huang, W. T. 2008. Zebrafish (*Danio rerio*) as a bioreactor for the production of antimicrobial peptides (monodoncin) in oocytes. In “Proc. Symp. of the 23<sup>th</sup> Joint Annual Conference of Biomedical Science”, Taipei, Taiwan. P-384.
- Gong, Z., Wan, H., Tay, T. L., Wang, H., Chen, M. and Yan, T. 2003. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:58-63.
- Hsu, Y. N., Chen, H. L., Wu, P. J., Lin, C. J. F., Chang, Y. S., Lu, J. K., Wu, J. L., and Huang, W. T. 2007. Cloning and biological assay of the gonad- and liver-specific proximal promoter regions in zebrafish (*Danio rerio*). In “Proc. Symp. of the 22<sup>th</sup> Joint Annual Conference of Biomedical Science”, Taipei, Taiwan. P-052.
- Hwang, G., Muller, F., Rahman, M. A., Williams, D. W., Murdock, P. J., Pasi, K. J., Goldspink, G., Farahmand, H. and Maclean, N. 2004. Fish as bioreactors: transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Mar. Biotechnol.* 6:485-492.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203:253-310.
- Lee, L. M., Seftor, E. A., Bonde, G., Cornell, R. A. and Hendrix, M. J. 2005. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev. Dyn.* 233:1560-1570.
- Lieschke, G. J. and Currie, P. D. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev.*

- Genetics 8:353-367.
- Lin, C. Y., Yang, P. H., Kao, C. L., Huang, H. I., and Tsai, H. J. 2010. Transgenic zebrafish eggs containing bactericidal peptide is a novel food supplement enhancing resistance to pathogenic infection of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 28:419-427.
- Love, D. R., Pichler, F. B., Dodd, A., Copp, B. R. and Greenwood, D. R. 2004. Technology for high-throughput screens: the present and future using zebrafish. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15:564-571.
- Marques, I. J., Weiss, F. U., Vlecken, D. H., Nitsche, C., Bakkers, J., Lagendijk, A. K., Partecke, L. I., Heidecke, C. D., Lerch, M. M. and Bagowski, C. P. 2009. Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer.* 9:128.
- Mo, M. H., Liu, C. Y., Huang, W. J., Chiang, C. C., He, Y. C., Chen, H. L., Chang, Y. S., Wu, J. L., and Huang, W. T. 2008. Functional analysis of hepatic- and ovarian-specific proximal promoters in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis mossambicus*) cell lines. In "Proc. Symp. of the 23<sup>th</sup> Joint Annual Conference of Biomedical Science", Taipei, Taiwan. P-150.
- Mo, S., Song, P., Lv, D., Chen, Y., Zhou, W., Gong, W. and Zhu, Z. 2005. Zebrafish z-otu, a novel Otu and Tudor domain-containing gene, is expressed in early stages of oogenesis and embryogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1732:1-7.
- Morita, T., Yoshizaki, G., Kobayashi, M., Watabe, S. and Takeuchi, T. 2004. Fish eggs as bioreactors: the production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. *Transgenic Res.* 13:551-557.
- Nicoli, S. and Presta, M. 2007. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat. Protoc.* 2, 2918-2923.
- Nicoli, S., Ribatti, D., Cotelli, F. and Presta, M. 2007. Mammalian tumor xenografts induce neovascularization in zebrafish embryos. *Cancer Res* 67:2927-2931.
- Shafizadeh, E. and Paw, B. H., 2004. Zebrafish as a model of human hematologic disorders. *Curr. Opin. Hematol.* 11:255-261.
- Topczewska, J. M., Postovit, L. M., Margaryan, N. V., Sam, A., Hess, A. R., Wheaton, W. W., Nickoloff, B. J., Topczewski, J., Hendrix, M. J., 2006. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat. Med.* 12:925-932.
- Traver, D., Paw, B. H., Poss, K. D., Penberthy, W. T., Lin, S. and Zon, L. I. 2003. Transplantation and *in vivo* imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nat. Immunol.* 4:1238-1246.