

## 中文摘要

以水母綠螢光蛋白 cDNA (GFP cDNA) 為報導基因，具有容易檢測、高敏感度、可在活體直接觀察等優點。我們先建構含有 human cytomegalovirus immediate early enhancer/promoter 的 GFP cDNA 片段，經 *Sca* I 線性化後，各以不同 DNA 濃度，進行稻田魚未授精卵顯微注射實驗。結果顯示授精後 12 小時 (stage 15) 開始可以偵測到綠色螢光出現，表現率分別是 5  $\mu$ g/ml 組為 50%、7.5  $\mu$ g/ml 組為 63%、10  $\mu$ g/ml 組則為 100%；但是 GFP 胚胎在授精後 24 小時 (stage 19) 的存活率，發現 10  $\mu$ g/ml 組為 0，明顯較 5  $\mu$ g/ml 組 (40%)、7.5  $\mu$ g/ml 組 (50%) 低，顯示以太高濃度強啟動子表現 GFP 易影響稻田魚胚胎的正常發育。觀察 7.5  $\mu$ g/ml 組表現 GFP 存活的胚胎，其綠色螢光至少可維持至孵化後 10 天；與對照組比較，顯示在稻田魚發育早期無內生性的綠色螢光干擾。

於是進一步為了解由吳郭魚選殖出 *c-ski* 基因其在魚類胚胎早期的表現情形，將 *c-ski* 基因上游 3kb 建構至 GFP cDNA 表現載體，然後以 7.5  $\mu$ g/ml 的濃度做基因轉殖後，在稻田魚胚胎發育至授精後 12 小時 (stage 15) 即開始表現，進入原腸胚期後，則專一在卵黃囊外膜表現，至授精後 120 小時 (stage 34) 達到最高，並持續至孵化。孵化後，隨著卵黃囊消失而減弱，至孵化後第 5 天完全消失。顯示吳郭魚 *c-ski* 基因的表現可能與維持卵黃囊組織正常生理活動有關。

## 英文摘要

Because green fluorescence protein (GFP) is a reporter gene used for *in vivo* detection, we constructed a GFP cDNA driven by human cytomegalovirus immediate early enhancer and promoter and microinjected into medaka oocytes at various concentrations. Results showed that GFP was detectable starting at embryonic stage 15; the expression rates of 5  $\mu$ g/ml, 7.5  $\mu$ g/ml, and 10  $\mu$ g/ml groups were 50, 63 and 100%, respectively. However, the survival rates of these GFP embryos after stage 19 were 40, 50 and 0%, respectively, suggesting too high DNA concentration of microinjected DNA caused abnormal development of embryos. The GFP was detectable until 10 days after hatching without disturbing by endogenous green light for embryos microinjected with 7.5  $\mu$ g/ml.

Thus, we constructed a DNA fragment containing upstream 3 kb segment of tilapia *c-ski* gene fused with GFP cDNA and microinjected into medaka embryos at 7.5  $\mu$ g/ml. Results showed that GFP started to express at stage 15, but GFP was expressed exclusively at yolk sac at gastrula stage 34 and last until hatching out. When yolk sac was absorbed gradually the GFP disappeared gradually at the same time, and GFP was totally abolished at 5 days after hatching. Results suggest that *ski* protein of tilapia may involve in the development of yolk sac at early embryonic stage of fish.

## 前言

隨著分子生物學的急速進展，有越來越多的基因自生物體內被選殖與定序完成。了解這些基因在生物體內的功能與表現的動態，對於解釋生命現象有極大的助益。傳統上，從事此領域的研究方法多依賴蛙類卵細胞系統 (Oocyte system)、細胞株感染系統 (transfection system)、體外轉錄與轉譯系統 (*in vitro* transcription and translation system) 等，這些系統雖可以精準提供基因調節片段 (regulation region) 座落區域的資訊，但卻無法顯示基因在生物體內 (*in vivo*) 表現的真實狀況。自 Gordon *et al.* (1980) 首次以顯微注射法 (microinjection) 將DNA片段送入老鼠卵細胞，進而得到基因轉殖動物後，使得利用基因轉殖 (gene transfer) 的方式，直接在生物體內分析基因調節與表現的研究可以實現。

基因轉殖動物是利用各種人為的方式，迫使外源性基因進入動物細胞中，期生物體能表現所欲性狀的研究 (Chen and Powers, 1990)。此技術已在多項物種被完善建立，如：兔子、羊、豬 (Hammer *et al.*, 1985)、鳥 (Shuman, 1991)、青蛙 (Rusconi and Schaffner, 1981) 等。在魚類方面則包括：金魚 (Zhu *et al.*, 1985)、泥鰍 (Zhu *et al.*, 1986)、鱒魚 (Chourrout *et al.*, 1986)、稻田魚 (Ozato *et al.*, 1986)、鯰魚 (Dunham and Eash, 1987)、鮭魚 (McEvoy *et al.*, 1988)、斑馬魚 (Stuart *et al.*, 1988)、鯉魚 (Zhang *et al.*, 1990)、吳郭魚 (Brem *et al.*, 1988) 等。在基礎生物學的研究上，此技術可以應用在發生生物學、免疫學、神經生物學、或是產生新的實驗動物種系，以供生物學與醫學上使用 (Hew, 1989)。而魚類以其許多的生理優點，如：卵數多、卵徑大、體外受精、受精卵易照顧、胚胎發育快速等 (Maclean *et al.*, 1987; Winkler *et al.*, 1991)，使得以魚類為實驗動物，利用基因轉殖技術，研究脊椎動物的基因調控將較其他動物更為便利。日本稻田魚 (*Oryzias latipes*; medaka) 是已有多種同系繁殖株 (inbred strains) 建立的魚種：卵徑大且透明；在人為光照週期控制在14小時情況下，排卵週期為24小時，可以終年排卵；可以進行未受精卵細胞的顯微注射，將外來基因片段準確送入細胞核 (germinal vesicle)，以提高轉殖率等優點，使稻田魚成為目前常用的基因轉殖模式魚種 (Ozato *et al.*, 1989)。

所謂的報導基因 (reporter gene) 是指其基因產物具有容易偵測的特性。在報導基因上游架構 (construct) 欲研究的基因調節片段 (regulation region), 經由細胞株 (cell line) 或基因轉殖生物的表現, 藉以了解基因的調控, 所以在基因表現的研究是一個極為重要的工具。報導基因的效率 (efficiency) 與靈敏度 (sensitivity) 決定於其在生物體的表現程度 (level of expression) 基因產物的穩定度 (stability) 有無類似的內生性蛋白質 (endogenous protein) 干擾 以及是否容易偵測等 (Bronstein *et al.*, 1994) 常被使用的報導基因在水產動物方面包括: *cat* (Tsai *et al.*, 1996) *lacZ* (Tsai *et al.*, 1995) 等, 它們的基因產物皆可經由簡單的放射性標定、組織染色、或螢光偵測的方式加以分析。但是需犧牲樣品萃取基因產物、偵測過程中需添加反應受質 (substrate) 及不能直接由活體觀察表現動態則是這些報導基因的主要缺點。

水母 (*Aequorea victoria*) 綠螢光蛋白 (green fluorescent protein; GFP) 分子量約為 27 kDa, 具有 238 個氨基酸 (amino acid) (Prasher *et al.*, 1992)。發光基 (chromophore) 是分別由第 65~67 序列三個氨基酸 Ser、Tyr、Gly 所組成 (Cody *et al.*, 1993), 主要激發光波長為 395nm, 次為 475nm, 皆可產生一波長 508nm 的綠色螢光 (Morise *et al.*, 1974; Inouye and Tsuji, 1994)。發光機制為 *phot* 的基因產物 apoaequorin 與受質 coelenterazine 結合氧化 (oxidation) 後, 生成 aequorin, 加上鈣離子參與, 發出一波長約 470nm 的藍色螢光, 進而激發 GFP, 得到一明顯的綠色螢光 (Bronstein *et al.*, 1994; Inouye and Tsuji, 1994)。GFP 相當穩定, 在 pH 4~11 間, 或在 6M guanidinium、8M urea、1% SDS 的條件下, 仍皆可保有其產生綠色螢光的特質 (Ward *et al.*, 1980; Ward and Bokman, 1982), 因此, GFP 在生物體的任何生理環境, 對於其性質應不會有影響。雖然 GFP 的性質自 1970 年代起就陸續被了解, 但直至 Prasher *et al.* (1992) 定出其 cDNA 序列後, 才成為目前常用的報導基因, 為發生學、分子生物學等提供另一個新的研究工具。主要優點包括可以直接在活體觀察其表現動態、極高的靈敏度、以及不需添加任何反應受質等 (Amsterdam *et al.*, 1995)。

但是, 野生種 (wild type) GFP 的主要激發波長在 365nm, 雖然 475nm 對於其激發能力較弱, 不過卻因能量較小, 使得 GFP 受激發後產生的綠色螢光較為穩定,

且此波長也較符合目前常用螢光濾鏡 ( FITC 濾鏡 ) 的規格, 因此, Heim *et al.* ( 1995 ) 以點突變 ( point mutation ) 得到一改良型 GFP, 第 65 序列的 Ser 為 Thr 取代, 將原本野生種 GFP 原有的雙激發光波, 改變至僅在 470-490nm 可被激發, 此改良型 GFP 在 475nm 被激發得的靈敏度為野生種的 6.6 倍, 而轉錄後修飾 ( post-translation modification ) 也從原本的 2 小時縮短至 0.45 小時。Cormack *et al.* ( 1996 ) 則在野生種 GFP 氨基酸序列第 55~74 位置進行突變, 發現當 64 位置以 leu 代替 Phe, 65 位置一樣是以 Thr 代替野生種的 Ser 時, 所得的突變種 GFP 經大腸桿菌 ( *Escherichia coli* ) 表現後, 綠色螢光強度為原本野生種的 100 倍; 在 475nm 波長受激發的程度也遠勝於野生種約 20~35 倍; 轉錄後修飾作用時間更縮短至約 8 分鐘。比較野生種與突變種 GFP 的立體結構, 推測上述兩位置氨基酸序列的改變將有助發光基的環化 ( cyclization ) 與氧化, 使得突變種 GFP 的表現量與轉錄後修飾速率均優於野生種 ( Yang *et al.*, 1996 )。如此的改進, 將使運用 GFP 於基因調控的研究上, 可以得到更為準確的資訊。

水母綠螢光蛋白 cDNA 序列已分別在大腸桿菌 ( Chalfie *et al.*, 1994 ) 黴菌 ( Flach *et al.*, 1994 ) 植物 ( Haseloff and Amos, 1995 ) 哺乳類細胞株 ( Olson *et al.*, 1995 ; Pines, 1995 ) 線蟲 ( Chalfie *et al.*, 1994 ) 和果蠅 ( Wang and Hazelrigg, 1994 ) 等證明可以完善的表現。在脊椎動物方面, Amsterdam *et al.* ( 1995 ) 以蛙類 DNA elongation factor 1 enhancer-promoter 架構 GFP cDNA, 利用顯微注射將其送入斑馬魚 ( *Danio rerio* ) 受精卵中, 在受精後 20 小時的胚胎開始偵測到 GFP 的表現, 並可遺傳至 F1、F2 子代, 證明水母綠螢光蛋白 cDNA 在斑馬魚模式中, 可作為一個良好的報導基因。但在另一種模式魚類像日本稻田魚, GFP 從未有過被使用的報告, 因此在此研究中, 將利用含有 cytomegalovirus 的 immediate early enhancer/promoter 接 GFP cDNA 所建構的 DNA 片段, 以顯微注射的方式送入稻田魚未受精卵中, 經人工授精後, 觀察水母綠螢光蛋白 cDNA 可否在稻田魚模式中成為一個有用的報導基因, 以供日後利用其進行有關基因調控的研究。

Stavnezer ( 1978 ) 在經 tdB77 virus 感染的雞胚胎纖維母細胞株 ( chicken embryo fibroblast culture ) 中發現有轉型 ( transform ) 的細胞結節 ( foci )。但因為 tdB77 virus 是 Bratislava 77 avian sarcoma virus 經由轉型缺陷突變 ( transformation-defective

deletion mutant) 產生, 應不會發生細胞轉型的現象, 故可能是在 tdB77 virus 中仍含有少量原始的 B77 avian sarcoma virus 所致。但仔細觀察細胞結節的外部型態, 卻與由 avian sarcoma virus 引發的結節有明顯的不同 (Stavnezer *et al.*, 1981), 萃取經 virus 轉型細胞結節的 RNA, 與當時已知的致癌基因 (oncogene) 做雜合反應 (hybridization), 皆無正反應, 因此推測此 tdB77 virus 應含有未知的致癌基因 (Li *et al.*, 1986)。此現象是由在 New York 的 Sloan-Kettering Institute 首先發現, 故將此基因命名為 *ski*。

在原型 (prototype) 的 *ski* virus (tdB77) 中, *v-ski* 位於 *gag* 中, 形成 *gag-ski-gag* 的序列; 有些 *ski* virus, 則只有 *gag-ski* 序列 (Stavnezer *et al.*, 1986)。至於 *c-ski* 序列的研究, Sutrave *et al.* (1989) 自 10 天大雞胚胎體壁細胞 cDNA 庫 (body wall cDNA library) 分離出 3 段長度不同的 *c-ski* cDNA, 經由序列分析比對, 推測此 3 段 cDNA 應是來自 alternatively spliced mRNAs, 最長約為 4.2kb。Grimes *et al.* (1992) 以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction) 南方氏轉漬法 (Southern blot) 分析雞的 *c-ski* 在體基因組 (genome) 分布狀況, 顯示其為一全長至少 65kb、含 8 個 exon 的基因序列。比較雞的 *v-ski* 和 *c-ski* cDNA 序列: *v-ski* 序列與 *c-ski* cDNA 第 244~1541 位置序列 (exon1~5) 僅在第 1284 位置處有一個 base 不同 (*v-ski* 為 C; *c-ski* 為 T), 此差異對於轉型能力並無任何影響 (Sutrave *et al.*, 1989)。

Ski 是一個功能十分複雜的蛋白質, 有許多生物活性 (biological activities), 包括: 對雞胚胎纖維母細胞的轉型潛力 (Stavnezer *et al.*, 1981)、骨髓細胞的分化 (myeloid cell differentiation) (Namciu *et al.*, 1994)、延遲紅血球母細胞的分化 (retardation of erythroblast differentiation) (Larsen *et al.*, 1992; Larsen *et al.*, 1993)、神經系統的分化與增生 (Lyons *et al.*, 1994) 等。不過, 它最引人注意的, 應是具有促使肌肉細胞分化與增生的功能 (Sutrave and Hughes, 1991):

以帶有 *v-ski* 的反轉錄病毒 (retrovirus) 感染鵝鶉胚胎細胞, 發現這些細胞分裂速率增快, 約為未感染細胞的 4 倍; 不論在有無血清 (serum) 的培養液中, 皆可促使這些細胞開始進行肌原分化 (myogenic differentiation), 但會受到 TGF (transforming growth factor) 及 *myc* 和 *src* 所抑制 (Colmenares and Stavnezer, 1989)。

以基因轉殖鼠模式研究雞 *c-ski* cDNA 的 *in vivo* 表現，發現 *c-ski* 能促使老鼠骨骼肌增厚 (hypertrophy)，觀察其顯微結構，增厚的部位主要為肌肉的 type II fast fiber (Sutrave *et al.*, 1990)。觀察不同階段 mRNA 的表現，剛出生的基因轉殖鼠，全身各部份 *c-ski* mRNA 的表現均是最低；出生後第 5 天至成鼠，橫隔膜部位 *c-ski* mRNA 表現量約增加 5 倍；但在與運動有關的大腿脛骨肌肉部份，在出生後第 5 天至第 12 天，*c-ski* mRNA 表現劇增 24 倍；並以免疫組織學技術，利用各種肌纖維單株抗體 (monoclonal antibody) 標定出 *c-ski* 基因轉殖鼠肌肉增厚部位應為 type IIb fast fibers。因此，*c-ski* 應可促進與劇烈運動有關肌纖維的增厚 (Leferovich *et al.*, 1995)。但由 *c-ski* 基因轉殖鼠後腿 X-ray 照片中，可以發現其脛骨密度較控制組酥鬆，且有多處骨折；再以原位雜交技術 (*in situ* hybridization) 分析，不論是 *c-ski* mRNA 或是 Ski 蛋白，發現在脛骨骨細胞 (osteocyte) 都有大量表現與堆積，因此，推測 *c-ski* 的過量表現 (over-expression) 會造成骨骼的不正常發育 (Lana *et al.*, 1996)。

吳郭魚為世界重要水產養殖經濟魚種。林 (1995) 以 RT-PCR 方式自 1.6 公分的吳郭魚 (*Oreochromis aurea*) 選殖定序出兩型的 *c-ski* cDNA，並以其中 exon 1 片段為探針，自體基因庫中選殖出一段 14kb 的 *c-ski* 片段，其中 5' 部份 TRASFAC MATRIX TABLE version 4.0 分析後，顯示出幾個 transcription factor response element (林, 1996)，包括：MyoD response element (-486~-502)、MZF-1 response element (-334~-341)、GATA-1 response element (-284~-293)、TATA box (-229~-234) 等。其中 MyoD 是肌肉專一性轉錄活化子 (muscle specific transcription activator) 可以誘導肌原分化 (myogenic differentiation) (Davis *et al.*, 1987; Thayer *et al.*, 1989)；MZF-1 是骨髓細胞專一化因子，可以誘導 hematopoietic progenitor cell 形成 myeloid lineage (Hromas *et al.*, 1991)；GATA-1 則是與紅血球分化有關 (Fucharoen *et al.*, 1990; Orkin, 1990)。

由於 *c-ski* 在魚類方面，林 (1995) 是第一篇的文獻報告，其功能未曾被研究。且其上游調控區域經資料庫比對，推測具有多個功能迥異的轉錄因子結合序列，因此，吳郭魚 *c-ski* 在不同的部位，應會有不同的表現與功用。基於可直接在活體觀察的優點，故選擇水母綠螢光蛋白 cDNA 為報導基因，建構吳郭魚 *c-ski* 上游 3kb 調控區域，以基因轉殖在稻田魚模式中研究其在胚胎發育早期表現動態。期能對於

魚類 *c-ski* 的調控表現有初步的認識。更由於其有促進肌肉分化與增生的潛力，若能應用於水產養殖產業，應有極大的貢獻。所以，了解吳郭魚 *c-ski* 的功能，不論在學術研究或產業應用都是必需且急迫的。

# 材料與方法

## 材料

### A. 實驗動物

日本稻田魚 (*Oryzias latipes*), 日本名古屋大學 Prof. Ozato 提供。

### B. 質體 ( plasmid ) 與菌種

#### a. 菌種---大腸桿菌 (*E. coli* DH5 $\alpha$ )

b. pGreen LANTERN ( Gibco BRL ): 全長 5030bp , 包含 CMV immediate early enhancer/promoter、*Aequorea victori* GFP cDNA ( 此為第 65 位置 Thr 的改良型綠螢光蛋白 cDNA ) ( Heim *et al.*, 1995 ) 以及 SV40 polyadnylation。

## 方法

### A. 轉殖用質體 ( plasmid ) 的製備

#### 1. 通透性細胞 ( competent cell ) 的準備

取大腸桿菌 DH5 單一菌落於 50ml 的 LB 培養液中, 37°C、250rpm 條件下, 搖盪培養過夜。而後在 400ml 的 LB 培養液中, 加入菌液 4ml, 同以 37°C、250rpm 條件, 搖盪培養至 OD<sub>590</sub>=0.375, 分裝於 50ml 離心管, 冰浴 5 至 10 分鐘, 4°C、3000rpm 離心 7 分鐘, 除去上清液, 各以 10ml 4°C 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液(60mM CaCl<sub>2</sub>、15% glycerol、10mM PIPES pH 7.0)重新溶解沉澱菌體, 冰浴 30 分鐘。4°C、25000rpm 離心 5 分鐘, 除去上清液, 再各以 10ml 4°C CaCl<sub>2</sub> 溶液溶解沉澱菌體, 冰浴 30 分鐘。4°C、25000rpm 離心 5 分鐘, 除去上清液, 將沉澱菌體各溶於 2ml 4°C CaCl<sub>2</sub> 溶液, 以每管 100  $\mu$ l 分裝至 1.5ml 微量離心管, 置於-70°C 中保存備用。

#### 2. 轉型作用 ( transformation )

將通透性細胞以手指體溫使其迅速溶解後, 加入 500ng 質體 DNA, 冰浴 30 分鐘後, 迅速增溫至 42°C ( heat shock ) 30 秒, 再置回冰中。加入 0.8ml LB 培養液, 37°C、250rpm 振盪培養 1 小時。分別取 50  $\mu$ l、100  $\mu$ l、200  $\mu$ l 的菌液於 LBA 培養基( 含 ampicillin 50  $\mu$ g/ml )上, 以 L 型玻棒均勻塗乾後, 倒置於 37°C 培養箱, 培養過夜。

### 3. 少量質體抽取

挑選 LBA 培養基上的單一菌落數個，分別接種於含 3ml LBA 培養液（含 ampicillin 50  $\mu$ g/ml）的試管中，37°C、250rpm 搖盪培養過夜。取 1.5ml 培養液於微量離心管中，4°C、12000rpm，離心 5 分鐘，去除上清液。加入 1ml STE 懸浮清洗菌體，同以 4°C、12000rpm 條件，離心 5 分鐘，去除上清液。以 100  $\mu$ l solution I 懸浮沉澱菌體，冰浴 5 分鐘。加入 200  $\mu$ l 新鮮的 solution II，上下倒置數次至黏稠狀，冰浴 5 分鐘後，再加 150 $\mu$ l solution III，緩和混合至白色物出現，冰浴 5 分鐘，4°C、12000rpm，離心 5 分鐘，吸取上清液至乾淨的微量離心管中。加入等體積 phenol : chloroform (1 : 1)，充份混合，12000rpm 離心 5 分鐘，小心吸取上層液。分別加入 1/10 體積的 3M Sodium acetate (pH5.2) 及 2 倍體積的冰冷無水酒精，置於-70°C、20 分鐘後，以 4°C、14000rpm 離心 20 分鐘，得到白色 DNA 沉澱物。再以 70%冰酒精清洗 DNA，14000rpm 離心 5 分鐘，迅速去除上清液，風乾沉澱物至無色透明狀，以 20  $\mu$ l TE buffer (pH 8.0) 重新溶解，置於-20°C 保存。

### 4. DNA 限制酶 (restriction enzyme) 反應

選用 *EcoR* I、*Not* I、*Sca* I 等酵素搭配適當的反應緩衝液，在最終體積 10  $\mu$ l 情況下，於 37°C 恆溫水浴槽中，與 200ng pGreen LANTERN 進行反應 2 小時。

### 5. 瓊脂凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 分析

在 0.5X TAE buffer 中，視濃度需要加入適量 agarose (AMRESCO)，混合均勻後，以微波爐加熱至完全溶解，倒入置於水平臺上的模板 (tray) 中，去除氣泡，插上槽梳 (comb)。凝固後，小心拔去槽梳。

將電泳膠置於盛有 300ml 0.5X TAE 的小型水平電泳槽 (Mupid-2, Cosmo)。以吸管 (pipet) 將各限制酶反應產物分別置入電泳膠中，調整電極方，使泳動方向由負極朝向正極，以 100V 電壓進行 20 分鐘。電泳膠以適當濃度 ethidium bromide 染色 10 分鐘，清水中退染 30 分鐘後，置於 UV 下觀察結果。

### 6. 菌種保存

以接種環勾取含所需質體的菌液約 1 l，置於 LBA 培養液 3ml，37°C、250rpm

培養過夜，取菌液 400  $\mu$ l 於微量離心管中，加入 200  $\mu$ l 甘油 (glycerol)，混合均勻後，置於-70°C 保存。

## 7. 大量質體抽取與純化

### a. 大量質體抽取

將含質體的單一菌種接種至 3ml 的 LBA 培養液中，在 37°C、250rpm 下，培養至  $OD_{600}=0.6$ 。再將此菌液倒入 500ml 的 LBA 培養液，同以 37°C、250rpm 培養過夜。分裝菌液至 500ml 滅菌離心管，以 2500g、4°C 離心 10 分鐘，去除上清液，再各以 50ml 4°C 的 STE 重新溶解清洗沉澱菌體，同以上述條件離心，留下沉澱菌體。各以 18ml solution I 均勻溶解沉澱菌體，加入 2ml lysozyme(10mg/ml in 10mM Tris.Cl pH 8.0)，37°C 反應 10 分鐘。接著加入新鮮的 solution II，均勻混合至黏稠狀，冰浴 10 分鐘。再加入 solution III 均勻混合至白色片狀物出現。冰浴 10 鐘後，以 4°C、8000g 離心 20 分鐘。將上清液以滅菌紗布過濾至無菌的 50ml 離心管中，分別加入 0.6 倍體積的 isopropanol，混合後，室溫反應 10 分鐘，4°C、12000g 離心 20 分鐘，得到白色 DNA 沉澱。各以 10ml 70%酒精清洗沉澱物，4°C、12000g 離心 10 分鐘，迅速去除上清液，將沉澱物風乾至透明狀後，各以 3.5ml TE(pH 8.0)溶解。

### b. CsCl 梯度離心

以每 ml DNA 溶液加入約 1g 重 CsCl 的比例，加入適量的 CsCl，充份溶解後，再以每 10ml DNA 溶液添加 0.8ml EtBr(10mg/ml)。如此應可使最後 DNA 溶液密度介於 1.55 g/ml~1.57 g/ml。8000rpm、20°C 離心 10 分鐘去除雜質，各在 5ml 的超高速離心管 (5PA seal tube, Hitachi) 加入 4ml 的乾淨 DNA 溶液，剩餘空間以礦物油 (miner oil, Sigma) 填滿，利用精密天平稱重，使每管重量差小於 0.05g 後，熱封離心管，60000rpm、20°C 離心 16 小時(Hitachi himas CS 120; rotor: RP80AT-229)。

### c. DNA 的透析純化

用手提式紫外燈在暗室中照射離心管(365nm)，可發現質體 DNA 在溶液中分為兩層：上層是線狀質體 DNA，下層為環狀質體 DNA。以 18G 注射針插入環狀 DNA

層的下緣，小心抽出，但避免污染到上層的線狀質體 DNA 及沉澱的 RNA。將環狀 DNA 溶液以每管 0.5ml 的量，分別裝入 1.5ml 微量離心管。各加入等量的 n-butanol，均勻振盪後，13000rpm 離心 5 分鐘，去除含 EtBr 的紅色有機層。反覆數次，直至 EtBr 不再殘留。

DNA 溶液中的 CsCl，則利用透析袋 (MW 6~8000; Spectrum)，先以去離子水透析 1 小時，反覆兩次，而後用 TE 緩衝液(pH 8.0)透析隔夜。自透析袋小心取出 DNA 溶液，以兩倍體積無水酒精沉澱 DNA，14000rpm、4°C 離心 20 分鐘。去除上清液，再以 1ml 70%酒精清洗沉澱物，以上述條件離心 5 分鐘，迅速去除上清液，風乾沉澱物。以適量的 TE 緩衝液(pH 8.0)溶解之，置於-20°C 中備用。

## 8. 轉殖用 DNA 的線性化 (linearization)

取適量 DNA 以 *Sca* I 進行限制酶反應後，取少量進行瓊脂凝膠電泳分析，確定質體 DNA 皆被線性化後，以等體積 phenol : chloroform (1 : 1) chloroform 純化 DNA、酒精沉澱、風乾沉澱物後，用 PBS 將濃度調整至 10 µg/ml 供顯微注射使用。

## B. 顯微注射 (microinjection)

### 1. 日本稻田魚的飼育

在 26°C、光週期 14 小時的培養箱中，雄、雌成魚以 1:3 的比例，共 24 尾，各置於 60 cm\*20 cm\*30 cm 的玻璃水族缸中。光週期開始與結束時，以適量的人工乾燥飼料 (Tetrabits, Tetra) 各餵食 1 次。此條件下馴養的稻田魚，約 1 個月後即可供作顯微注射實驗使用。

### 2. 卵細胞的收集

在光週期開始 1 小時，挑選排卵狀況佳的雌魚、與健壯的雄魚各數尾，分開置於 30 cm\*10 cm\*20 cm 的水族缸中。暗週期剛開始，在解剖顯微鏡下，小心取出雌魚體腔中的卵巢，在培養液(見附錄)中，去除卵細胞周圍黏附的組織，選擇卵徑大(直徑約 1 mm)、完整、細胞核明顯(直徑約 100~150 µm)、油滴分布均勻的卵細胞，以寬口吸管移至乾淨的培養液中，置於 10°C 恆溫箱中備用。

### 3. 顯微注射實驗

將 DNA 溶液注入由毛細管製成的玻璃注射針(3~5  $\mu\text{m}$ ), 以礦物油封口。在 100 倍放大倍率下, 使 DNA 注射入卵的細胞核中, 直至細胞核膜欲開始膨脹為止。所注射的溶液體積約 20~30  $\mu\text{l}$ 。

### 4. 卵細胞的培育與人工授精

已完成注射的卵細胞在 26°C 培養至卵細胞開始脫離濾泡層(follicle layer), 此時約等於原母魚自行排卵受精的時間。部份尚未自行脫離濾泡層的卵細胞, 則必需以人工方式, 利用鑷子將其去除。解剖取出雄魚精巢, 在 100  $\mu\text{l}$  培養液中, 以鑷子撕碎, 使精液均勻溶於培養液中後, 將其加入卵細胞中, 混合均勻, 靜置 1 小時。待油滴聚集至植物極, 以判別授精成功與否。去除未授精卵與授精卵的繫絲(attaching filament)後, 水洗 3 次, 置於 26°C 恆溫箱中培養。

### 5. 基因轉殖魚的飼育

在 26°C 下, 魚卵約 7 天後可以孵化。將孵化的小魚移至 30 cm X 10 cm X 10cm 的塑膠盆中飼養。前 3 天以剛孵化的豐年蝦幼苗飼養。之後則餵食人工乾燥飼料 (Tetrabits, Tetra), 1 天 2 次。

## C. 基因轉殖魚檢驗

### 1. 卵成熟率、授精率、畸型率、與存活率的計算

卵成熟率是指顯微注射後, 26°C 下培養卵細胞 6~7 小時, 其自行脫去濾泡層卵數相對於總實驗卵數間的比例。

人工授精率是指脫去濾泡層, 進行人工授精後, 卵細胞在 26°C 下發育至 2-cell stage 的比例。

畸形率是指在整個胚胎發育階段, 不正常發育之胚胎個數相對於授精成功卵數之比例。

存活率是指在授精後 24 小時 (stage 19), 正常發育的胚胎相對於授精成功卵細胞的比例。

## 2. GFP 偵測

將胚胎置於盛有少量水的圓形凹槽載玻片中，在螢光顯微鏡(顯微鏡：Olympus BH-2；螢光系統：燈源“USH 102D”、excitation B、excitation filter BP、dichroic mirror DM 500)下，觀察 GFP 表現與分布情形。並計算其中表現綠色螢光相對於實驗組總受精成功卵數之比例，是為 GFP 表現率。

## 3. 轉殖用質體 (pTskiGFP) 的架構

以 1  $\mu$ l *Sac*I (10u/ $\mu$ l) 將 200 ng pEGFP 線性化，電泳後，使用“Jetsorb” kit 回收 4.2kb 的線狀 pEGFP 載體。將線狀 pEGFP 以 1u calf intestine phosphatase, 37°C 反應 1 小時後，加入 1  $\mu$ l proteinase K (10mg/ml), 37°C 反應 15 分鐘，同以上述電泳回收的方式，純化 pEGFP。

將含有吳郭魚 *ski* type I 上游 3kb 片段的 pGEM-7zf 約 200ng，經 *Sac*I 反應後，同上述電泳回收方式，純化 3kb 片段。取線狀 pEGFP 1  $\mu$ l (約 10ng) 吳郭魚 *ski* type I 上游 3kb 片段 DNA 5  $\mu$ l (約 50ng)，加入 1  $\mu$ l T4 DNA ligase(3u/ml)，在最終體積 10  $\mu$ l、16°C 的條件下，反應 16 小時。進行轉型作用後，各取 250  $\mu$ l 菌液以 L 玻棒均勻地在含 kanamycin(50  $\mu$ g/ml)的 LB 培養基上塗乾，倒置於 37°C 下培養隔夜。自培養基上各挑選數個單一菌落，於 3ml 含 kanamycin(50  $\mu$ g/ml)的 LB 培養液中，37°C、250rpm 培養隔夜。各管取 1.5ml 菌液，以鹼處理法萃取質體 DNA 後，選擇 *Sca*I、*Xho*、*Sac*I、*Bgl*II、*Ssp*I、*Xba*I 等限制酶反應後，電泳檢驗之。

## 結果

### A. 注射DNA的濃度與卵細胞成熟率、授精率、和存活率的關係

注射三種不同濃度 ( 5  $\mu$  g/ml、 7.5  $\mu$  g/ml、 10  $\mu$  g/ml ) 的線狀pGreen LANTERN 10小時後,能進入最後成熟階段的卵數,隨著其DNA濃度增加而從91%降低至53%;但施打PBS的控制組,成熟率(成熟卵數/總卵數)約可維持在70%~86%。但不論是控制組或三種濃度的實驗組,其授精率(授精成功卵數/成熟卵數)皆在60%~70%。授精後24小時stage 19,控制組存活率介於71%~100%;而5  $\mu$  g/ml組和7.5  $\mu$  g/ml組存活率接近,各為40%、50%,但10  $\mu$  g/ml組全數死亡(表1 & 圖 1)。

### B. 注射DNA的濃度與GFP在胚胎時的表現率

在螢光顯微鏡下觀察GFP表現的時間,不論其注射濃度多寡,均在授精後12小時(stage 15),開始可以看到明顯綠色螢光,呈鑲嵌狀(mosaic)地分布在囊胚中期的細胞團上,表現率在5  $\mu$  g/ml組、7.5  $\mu$  g/ml組分別為50%、63%,10  $\mu$  g/ml組的表現率更高達100%。控制組則偵測不到任何綠色螢光;曾注射過經*Not I*處理、不含GFP cDNA的pGreen LANTERN ( 10  $\mu$  g/ml ),也同樣無綠色螢光產生。至於表現量,以肉眼觀察,DNA濃度並不影響其表現程度;但由授精後12小時(stage 15)畸型比例與24小時(stage 19)的存活率,可發現注射DNA濃度最高的10  $\mu$  g/ml組,所有卵皆為畸型且隨之死亡(圖 1)。

### C. GFP在胚胎表現的特性(圖2a~f)

連續觀察7.5  $\mu$  g/ml組的螢光表現位置,是呈全身鑲嵌點狀分布。在肌肉、血液、以及腹內臟器皆有表現。除了GFP產生的綠色螢光外,授精後(stage 23),體表黑色素陸續出現時,其在430nm螢光激發下,會產生黃色螢光,但不會與GFP產生混淆。至少至孵化後10天,皆還可以明顯的偵測到綠色螢光。

有GFP表現的授精卵若在發育過程中死亡,在無菌、乾淨、盛有去離子水的培養皿中,GFP可以穩定的存在死卵中約2~7天之久。

#### D. pTski-GFP 質體的建構與確認 (圖 3)

因含 Tski upstream region 片段的 pGEM-7zf 經 *Sac* I 作用後均為 3kb，電泳後回收並無法將此兩片段分開，所以針對 *Sca* I 在 pGEM-7zf 的 ampicillin resistant gene 有 1 個 cutting site，Tski upstream 3kb region 無此 cutting site 的特性，確認建構後 insert 片段的種類，結果顯示 *Sca* I 對於選殖出的 pTskiGFP 無法作用，確認其 insert 應為 Tski upstream 3kb region。以 *Bgl* II、*Ssp* I 確定其方向：因為 *Bgl* II 在 pEGFP 的 multi-cloning site 及 Tski upstream 3kb region 處各有 1 個 cutting site；*Ssp* I 在 pEGFP 的 4kb、4.6kb 及 Tski upstream 3kb region 處各有一個 cutting site。因此，選擇此兩種限制酶分別對 pTskiGFP 進行剪裁，經電泳分析後，*Bgl* II 得到了 5.2kb+2kb 片段；而 *Ssp* I 得到 5.1kb+1.5kb+0.5kb 3 個片段。所以，pTskiGFP 的建構過程與其方向應為正確。

#### E. pTskiGFP 在基因轉殖魚的早期表現 (圖 4a~h)

顯微注射進行兩次 (實驗組共 150 個卵；PBS 空白組 13 個卵；pEGFP 控制組 20 個卵)。在授精後 24 小時 (stage 19) 存活率分別為：PBS 組 50% (3/6)、pEGFP 組 40% (7/15)、實驗組 46% (32/70)。

授精後 12 小時 (stage 15)，在實驗組存活的 32 個卵中，有 12 個開始可以偵測到 GFP 呈鑲嵌點狀分布，但綠色螢光極弱，且只呈少數幾個點狀出現，位置則隨機分布。24 小時後 (stage 19)，實驗組原有螢光反應的卵，其螢光開始在卵黃囊外圍呈均勻分布，籠罩整個外膜，但在胚體則無綠色螢光出現。之後至孵化前，GFP 仍只局限在卵黃囊外圍均勻表現，且強度至授精後 120 小時 (stage 34) 最為明顯，到孵化前沒有減弱的情形。這段時間，雖然在胚體，如：心臟、頭部等位置曾出現點狀綠色螢光，但只發生在 1、2 個卵，且維持時間均不超過 1 天。孵化後，綠色螢光同樣局限於卵黃囊，隨著成長及器官發育，綠色螢光有減弱，至孵化後第四天，卵黃囊消失，綠色螢光反應僅在殘存的卵黃囊油滴及其週圍可以發現。至孵化後第 5 天，則偵測不到任何 GFP 的存在。至於 PBS 組與 pEGFP 組發育過程均偵測不到 GFP 的表現。

## 討論

注射3種不同濃度的pGreen LANTERN溶液的稻田魚未受精卵，在發育10小時欲進入排卵階段的成熟卵比例依DNA濃度的上升，由91%→53%，似有降低的現象。只注射PBS的成熟卵比例則在70%~86%，介於實驗組卵成熟比例範圍內，因為控制組每次進行實驗的卵粒數均約為實驗組的1/3，且皆是先注射實驗組，後才進行控制組實驗，因此，很難結論較高濃度的DNA溶液對於未受精卵成熟有影響。在王（1995）的報告中是認為沒有顯著差異。授精率方面，在本實驗中，不論實驗組或是控制組皆在60%~70%間，與Ozato *et al.*報告的70%人工授精率並無差別，顯示外來DNA濃度的高低對於成熟未受精卵的人工授精成功率並無影響。

以CMV immediate early enhancer/promoter所驅動的GFP cDNA，在授精後12小時開始表現；而以此啟動子表現*lacZ*時也有相同結果（Tsai *et al.*, 1995）。但以GFP cDNA為報導基因，表現後可被偵測的卵數比例為50%以上，較*lacZ*的30%為高。Amsterdam *et al.*（1995）以南方氏進轉漬法憑估GFP cDNA在斑馬魚表現後可被偵測的靈敏度，推測僅需1 copy基因產生的GFP就可在螢光顯微鏡觀察到，顯示以GFP cDNA做為報導基因可能比*lacZ*具有較高靈敏度。

由於以此啟動子表現報導基因，皆可在12小時開始偵測到基因產物，因此，為準確推算存活率，不論是GFP cDNA或*lacZ*均以授精後24小時（stage 19），由囊胚期欲進入原腸胚期，評估實驗對於胚胎發育的傷害程度。比較同注射DNA濃度（10  $\mu$ g/ml）的GFP cDNA與*lacZ*實驗，發現GFP（存活率=0）對於胚胎發育的影響比  $\beta$ -galactosidase（存活率約為40%）大。Ozato *et al.*（1986）以10  $\mu$ g/ml的DNA（chicken  $\beta$ -crystallin gene）溶液進行稻田魚未受精卵細胞核顯微注射，與控制組比較，說明此濃度對於卵應無顯著的傷害。Tsai *et al.*（1995）同以此濃度進行顯微注射，研究四種病毒啟動子在稻田魚早期表現：經CMV啟動子表現出的  $\beta$ -galactosidase，對於稻田魚早期發育雖有影響，但也不似此實驗中的全數死亡。因此，以10  $\mu$ g/ml pGreen LANTERN進行顯微注射，造成其在囊胚期進入原腸胚期發育中斷的原因可能為過多的DNA影響其發育、或GFP的過度表現妨礙其生理功能：由於針口太大、或過量的注射DNA溶液，均會造成胚胎發育未至囊胚期時，即退化死

亡 ( Ozato *et al.*, 1989 )。但注射10  $\mu$  g/ml pGreen-LANTERN的胚胎可存活至囊胚中期，GFP開始表現；且曾以不含GFP cDNA的pGreen LANTERN ( 10  $\mu$  g/ml ) 進行一次實驗，授精後存活率為43%。因此，並非是過量的DNA使其發育中止。由於cytomegalovirus 可感染早期胚胎，所以，利用其immediate early enhancer/promoter 在稻田魚胚胎表現GFP應是十分有效率的！故推測過量表現的GFP可能會影響囊胚期進入原腸胚期的發育。若降低注射DNA濃度至7.5  $\mu$  g/ml就可以減少其死亡率。因此，欲以強啟動子 ( 如：CMV immediate early enhancer/promoter ) 表現GFP，應減少DNA至適當濃度，避免其過量表現影響胚胎的發育。

連續觀察7.5  $\mu$  g/ml存活的胚胎，發現在FITC螢光濾鏡下，稻田魚除本身黑色素會發出黃色螢光外，並無任何內生性的綠色螢光出現，所以，在稻田魚使用GFP cDNA為報導基因可以明確地判別其基因產物是否存在。此觀察持續至孵化後第10天，皆還能明顯的觀察到綠色螢光。但是同樣觀察10  $\mu$  g/ml組有表現GFP但以死亡的卵，發現在死卵中GFP仍能十分穩定的發出綠色螢光，因此，很難結論連續在7.5  $\mu$  g/ml組觀察到的綠色螢光是細胞新合成的，亦或早在囊胚期就被表現卻一直屯積在細胞內。

使用GFP cDNA在稻田魚模式動物中，具有高靈敏度、不需犧牲活體、容易偵測、明白空間表現等優點。但是，基因產物穩定的特性卻僅能提供基因時間調控研究上，外來基因調節片段何時被起動的訊息；至於何時停止，僅利用螢光偵測就無法提供準確的訊息，尚需配合mRNA分析的資料。

目前對於 *c-ski* 上游片段序列的了解十分不足，對於其在發生過程及成體生物的時空表現，仍多利用 mRNA 分析、及原位雜交 ( *in situ* hybridization ) 等技術進行。尚無以基因轉殖方式研究其上游調控區域在生物體表現。根據以前的研究結果，可以因其造成的生理現象歸納出其可能表現的部位，包括：肌肉、骨髓、神經索等。以資料庫將已知的轉錄因子結合序列 ( transcription response element ) 與吳郭魚 *c-ski* 上游片段做分析比對，也可以發現幾個與肌肉發育 ( MyoD )、紅血球發育 ( GATA-1 ) 神經細胞發育 ( MZF-1 ) 有關的轉錄因子結合序列。但連續觀察注射 pTskiGFP 基因轉殖魚的胚胎發育及 GFP 表現與分布情形，其結果似乎與已知的 *c-ski* 表現動態有極大的出入。

吳郭魚 *c-ski* 所驅動的 GFP cDNA 可在囊胚中期，即授精後 12 小時 (stage 15) 開始微弱表現。發育至原腸胚期後，僅局限於卵黃囊外圍部份表現，其表現與累積的狀況在授精後 120 小時 (stage 34) 最為旺盛 (以肉眼評估綠色螢光強度)，且維持至孵化。隨孵化後隨著卵黃囊的消失，而逐漸減弱。其發育期間雖也可在胚體看到零星點狀表現，但因表現部位 (心臟、頭部等) 及時間不定，所以，推測應為外來基因片段鑲入體染色體所引起的 position effect (Bonnerot *et al.*, 1990)。

魚類卵黃囊外圍的形成是由囊胚期階段，yolk sac syncytial layer 細胞不斷向植物極分裂、移動，最後完全覆蓋卵黃囊所致。其過程是由 yolk sac syncytial layer 細胞先行分融合再分裂，因此，多數細胞為多核的狀態 (Trinkaus, 1993)。Williams *et al.* (1996) 指出由於 yolk sac syncytial layer 細胞多核的特性，常會造成在斑馬魚模式中，轉殖基因表現的過高估計。但由於在囊胚期階段，GFP 的表現並不局限在 syncytial layer，且在卵黃囊外圍表現的專一性十分顯著，所以，吳郭魚 *c-ski* 表現的 GFP 應不是 yolk sac syncytial layer 細胞產生屯積所致。對於卵黃外膜的功能認識，多以為其與胚胎發育時的養份交換有關，若以過去對於 *c-ski* 的認識，似與其沒有關係。

雖然經資料庫比對，推論出幾個與肌肉、血球、骨髓發育有關的轉錄因子，但實驗結果顯示，GFP 的表現部位均與上述的推論毫無符合。事實上，目前對於 *c-ski* 的了解屬於起步階段，在魚類方面更僅有一篇報告，顯示 *c-ski* 有許多未知的調控機制與功能尚待研究。

## 參考文獻

- 王淑惠 1993. 顯微注射lacZ基因在稻田魚早期胚胎發育中的暫時表現. 碩士論文. 國立臺灣大學.
- 林哲揚 1996. 吳郭魚 c-ski 基因的選殖、定序、與比較. 碩士論文. 國立臺灣大學.
- Amsterdam, A., Lin, S. and Hopkins, N. 1995. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev. Biol.* 171, 123-129.
- Bonnerot, C., Grimber, G. Briand, P. and Nicolas, J.-F. 1990 Pattern of expression of position-dependent integrated transgenes in mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 6331-6335.
- Brem, G., Brenig, B., Horstgen-schwark, G. and Winnacker, E.L. 1988. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*) . *Aquaculture* 68, 209-219.
- Bronstein, I., Fortin J., Stanly, P.E., Stewart, G.S.A.B. and Kricka, L.J. 1994. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Anal. Biochem.* 219, 169-181.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chen, T.T. and Powers, D.A., 1990. Transgenic fish. *Trends Biotechnol.* 8, 209-215.
- Chourrout, D., Guyomard, R. and Houdebine, L.M. 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture* 51, 143-150.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G. and Ward, W.W. 1993. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32, 1212-1218.

Colmenares, C. and Stavnezer, E. 1989. The *ski* oncogene induces muscle differentiation in quail embryo cells. *Cell* 59, 293-303.

Cormack, B.P., Valdivia R.H. and falkow, S. 1996. FACS-optimized mutant of the green fluorescent protein ( GFP ) . *Gene* 173, 33-38.

Davis,R.L., Weintraub, H. and Lassar, A.B. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblast into myoblast. *Cell* 51, 987-1000.

Dunham, R.A. and Eash, J. 1987. Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Amer. Fisheries Soc.* 116, 87-91.

Flach, J., Bossie, M., Vogel, J., Corbett, A.H., Jinks, T., Willins, D.A. and Silver, P.A. 1994. A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Mol.Cell. Biol.* 14, 8399-8407.

Fucharoen, S., Shimizu, K. and Fukumaki, Y. 1990. A novel C-T transition within the distal CCAAT motif of the G gamma-globin gene in the Japanese HPFH : implication of factor binding in elevated fetal globin expression. *Nucleic Acid Res.* 18, 5245.

Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. and Ruddle, F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7380-7384.

Grimes, H.L., Szente, B.E. and Goodnew, M.M. 1992. C-*ski* cDNAs are encoded by eight exons, six of which are closely linked within the chicken genome. *Nucleic Acids Res.* 20, 1511-1516.

Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E.Jr., Wall, R.J., bolt, D.J., Ebert, K.M., Paliter, R.D. and Brinster, R.L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315, 680-683.

Haseloff, J. and Amos, B. 1995. GFP in plants. *Trends Genet.* 11, 328-329.

Heim, R., Cubitt, A.B. and Tsien, R.Y. 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664.

Hew, C.L. 1989. Transgenic fish : present status and future directions. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 409-413.

Hromas, R., Collins, S.J., Hickstein, D., Raskind, W., Deaven, L.L., O'Hara, P., Hagen, F.S. and Kaushansky, K. 1991. Retinoic acid-responsive human zinc finger gene, *MZF-1*, preferential expressed in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 266, 14183-14187.

Inouye, S. and Tsuji, F.I. 1994. *Aequorea* green fluorescent protein expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* 341, 277-280.

Lana, D.P., Lefferovicj, J.M., Kelly, A.M. and Hughes, S.H. 1996. Selective expression of a *ski* transgenic affect lib fast muscles and skeletal structure. *Dev. Dynamics* 205, 13-23.

Larsen, J., Beug, H. and Hayman, M.J. 1992. The *c-ski* oncogene cooperates with the *v-sea* oncogene in erythroid transformation by blocking erythroid differentiation. *Oncogene* 7, 1903-1911.

Larsen, J., Meyer, S., Steinlein, P., Beug, H. and Hayman, M.J. 1993. Transformation of chicken bone marrow cells by the *c-ski* gene. *Oncogene* 8, 3221-3228.

Leferovich, J.M., Lana, D.P., Sutrave, P., Hughes, S.H. and Kelly, A.M. 1995. Regulation of *c-ski* transgene expression in developing and mature mice. *J. Neurosci.* 15, 596-603.

Li, Y., Turck, M., Teumer, J.K. and Stavnezer, E. 1986. Unique sequence, *ski*, in Sloan-Kettering avian retro viruses with properties of a new cell-derived oncogene. *J. Virol.* 57, 1065-1072.

Lyon, G.E., Micales, B.K., Herr, M.J., Horrigan, S.K., Namciu, S., Shardy, D. and Stavnezer, E. 1994. Proto-oncogene *c-ski* is expressed in proliferating and postmitotic neuronal population. *Dev. Dynamics* 201, 354-365.

McEvoy, T.G., stack, M., Keane, B., Barry, T., sreenan, J.M. and Gannon, F. 1988. The expression of a foreign gene in salmon embryos. *Aquaculture* 68, 27-38.

Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H. and Winant, J. 1974. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13, 2656-2662.

- Namciu, S., Lieberman, M.A. and Stavnezer, E. 1994. Induction of the *c-ski* proto-oncogene by phorbol ester correlates with induction of megakaryocyte. *Oncogene* 9, 1407-1416.
- Olson, K.R., McIntosh, J.R. and Olmstead, J.B. 1995. Analysis of MAP4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *J. Cell. Biol.* 130, 639-650.
- Orkin, S.H. 1990. Globin gene regulation and switching : Circa 1990. *Cell* 63, 665-672.
- Stavnezer, E., Gerhard, D.S., Binari, R.C. and Blzas, I. 1981. Generation of transformation virus in cultures of chicken fibroblasts infected with an avian leukosis virus. *J. Virol.* 39, 920-934.
- Ozato, K., Kondoh, H., Inohara, H., Iwamatsu, T., Wakamatsu, Y. and Okada, T.S. 1986. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken  $\gamma$ -crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differ.* 19, 237-244.
- Ozato, K., Inoue, K. and Wakamatsu, Y. 1989. Transgenic fish: biological and technical problems. *Zool. Sci.* 6, 445-457.
- Pines, J. 1995. GFP in mammalian cells. *Trends Genet.* 11, 326-327.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233.
- Rusconi, S. and Scaffner, W. 1981. Transformation of frog embryos with a rabbit  $\gamma$ -globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5051-5055.
- Schuman, R.M. 1991, Production of transgenic birds. *Experientia* 47, 897-902.
- Stavnezer, E., Barkas, A.E., Brennan, L.A., Brodeur, D. and Li, Y. 1986. Transformation Sloan-Kettering viruses generated from the cloned *v-ski* oncogene by *in vitro* and *in vivo* recombinations. *J. Virol.* 57, 1073-1083.

- Stuart, G.W., McMurray, J.V. and Westerfield, M. 1988. Reproduction, integration and stable germline transformation of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* 103, 403-412.
- Sutrave, P and Hughes, S.H. 1989. Isolation and characterization of three distinct cDNAs for the chicken *c-ski* gene. *Mol. Cell. Biol.* 9,4046-4051.
- Sutrave, P., Kelly, A.M. and Hughes, S.H. 1990. *ski* can cause selective growth of skeletal muscle in transgenic mice. *Genes Dev.* 4, 1462-1472.
- Sutrave, P. and Hughes, S.H. 1991. The *ski* oncogene. *Oncogene* 6, 353-356.
- Thayer, M.J., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Wright, W.E., Lasser, A.B. and Weintraub, H. 1989. positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1. *Cell* 58, 241-248.
- Trinkaus, J.P. 1993. The yolk sac syncytial layer of *Fundulus*: its origin and histology and its significance for early embryogenesis. *J. Exp. Zool.* 265,258-284.
- Tsai, H. J., Wang, S.-H., Inoue, K., Takagi, S., Kimura, M., Wakamatsu, Y. and Ozato, K. 1995. Isolation of the transgene *lacZ* gene expression medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 4, 1-9.
- Wang, S. and Hazellrigg, T. 1994. Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369, 400-402.
- Ward, W.W., Cody, C.W., Hart, R.C. and Cormier, M.J. 1980. Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green-fluorescent proteins. *Photochem. Photobiol.* 31, 611-615.
- Ward, W.W. and Bokman, S.H. 1982. Reversible denaturation of *Aequorea* green fluorescent protein : Physical separation and characterization of the renature protein. *Biochemistry* 21, 4535-4540.

Williams, D.W., Muller, F., Lavender, F.L., Orban, L. and Maclean, N. 1996. High transgene activity in the yolk syncytial layer affects quantitative transient expression assays in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Transgenic Res.* 5,433-442.

Winkler, C., Vielkind, J.R. and Scharf, M. 1991. Transient expression of foreign DNA during embryonic and larval development of the medaka fish (*Orizias latipes*). *Mol. Gen. Genet.* 226, 129-140.

Yang, F., Moss, L.G. and Phillips Jr., G.N. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotech.* 14, 1246-1251.

Zhang, P., Hayat, A., Joyce, C., Gonzalez-Villasenor, L.J., Lin, C.M., Dunham, R., Chen, T.T. and Powers, D.A. 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout GH-cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Mol. Repro. Dev.* 25, 3-13.

Zhu, Z., Li, G., He, L. and Chen, S. 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of goldfish (*Carassius auratus* L. 1758). *Z. Appl. Ichthyol.* 1, 31-34.

Zhu, Z., Xu, K., Li, G., Xie, Y. and He, L. 1986. Biological effects of human growth hormone gene microinjected into the fertilized eggs of loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor). *Kexue Tongbao* 31, 988-990.

表一 注射不同濃度 pGreen LANTERN 對稻田魚胚胎早期發育的影響

DNA] ( $\mu\text{g/ml}$ )	total		fert.		expression (12 hr.)		abnormal (12 hr.)		survival (24 hr.) (expression)	
	mock	Exp.	mock	Exp	mock	Exp	mock	Exp	mock	Exp
5	21	61	7	20	0	10	2	3 (2)*	5	8
7.5	15	99	3	22	0	14	1	6 (3)*	3	11
10	27	76	8	17	0	17	3	17 (17)*	5	0

\* ( ) : GFP was detected.

表1

比較不同DNA濃度，進行顯微注射餐人工授精成功卵數、授精後12小時GFP表現及畸型卵數、授精後24小時有GFP表現之存活卵數 ( mock : PBS控制組 ; Exp : 注射pGreen LANTERN組 ; fert : 人工授精 )

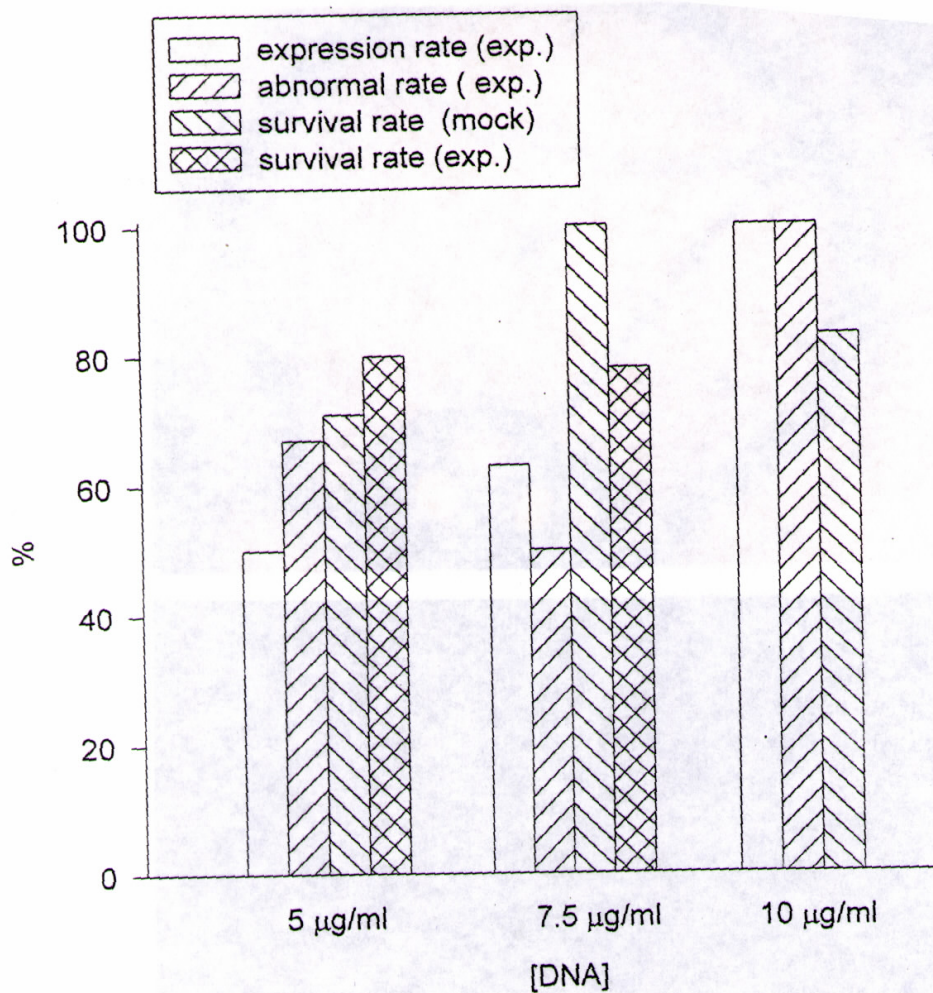


圖1：比較授精後12 小時注射不同濃度pGreen LANTERN 之GFP的表現率與畸型率，以及授精後24小時表現 GFP陰胎的存活率。

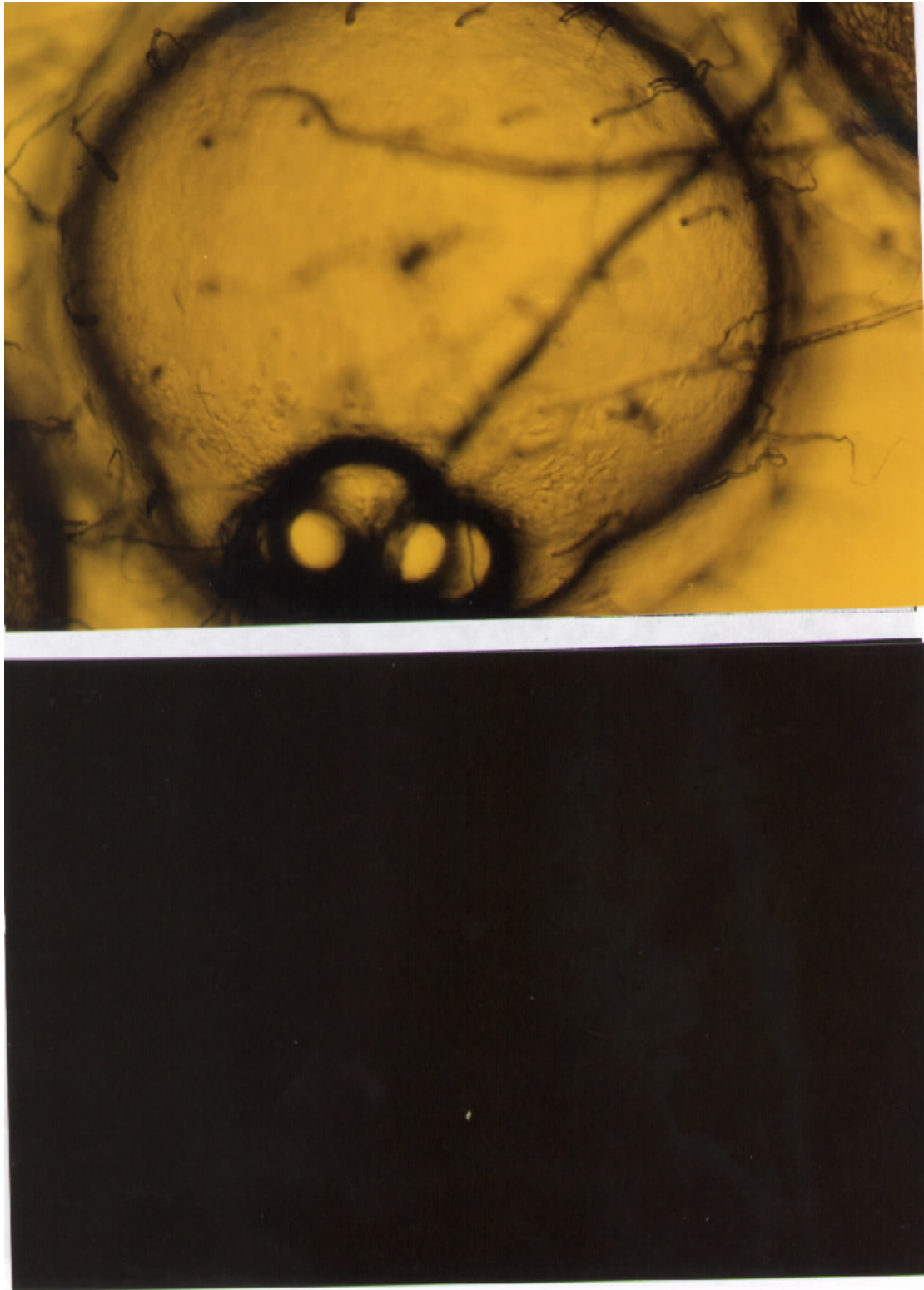


圖2a：注射PBS對照組。授精12小時後的胚胎，無綠色螢光產生。(放大倍率75X)

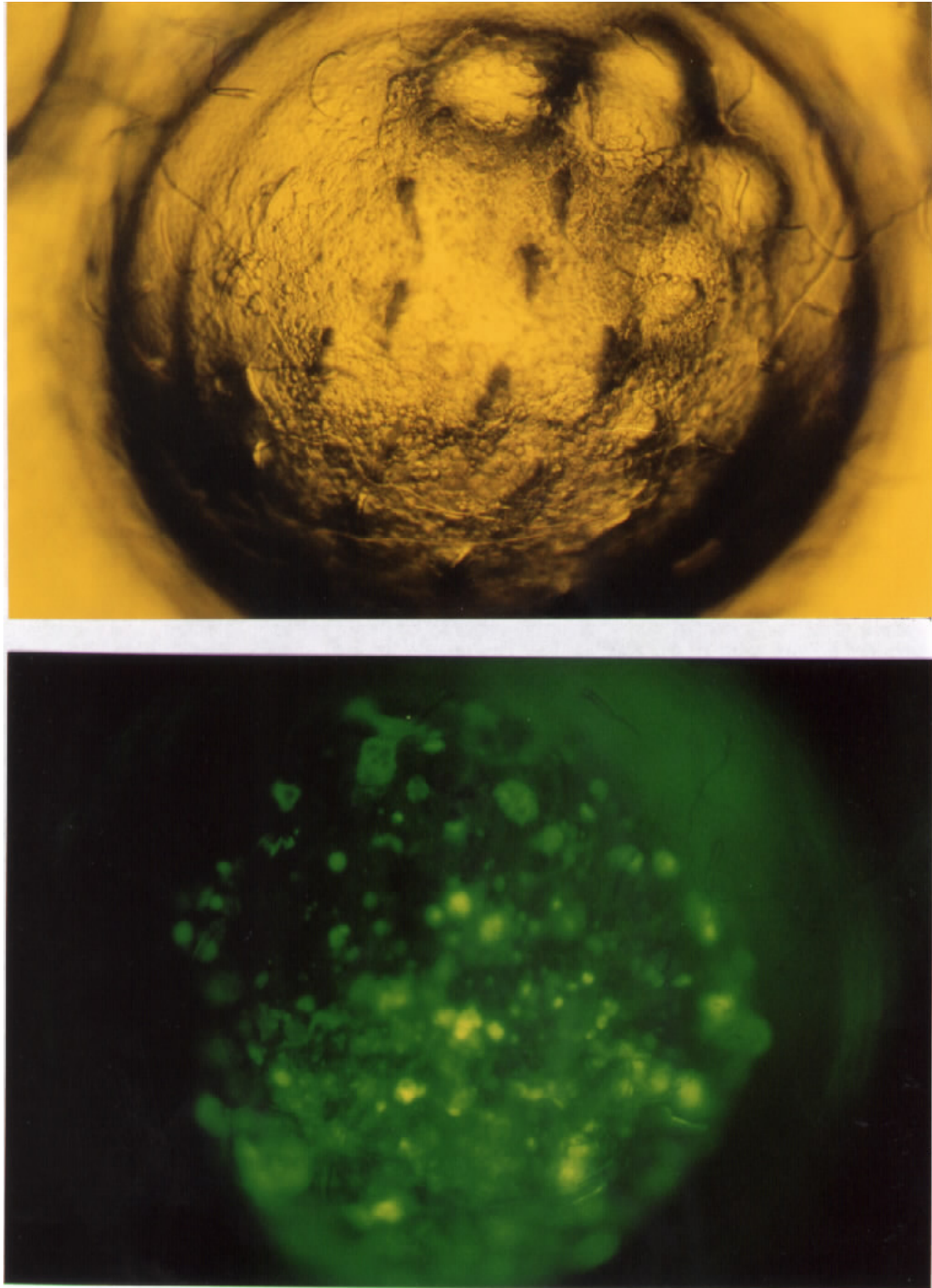


圖2b：注射7.5  $\mu$ g/ml pGreen LANTERN。授精12小時後的胚胎，綠色螢光為GFP。（放大倍率75X）

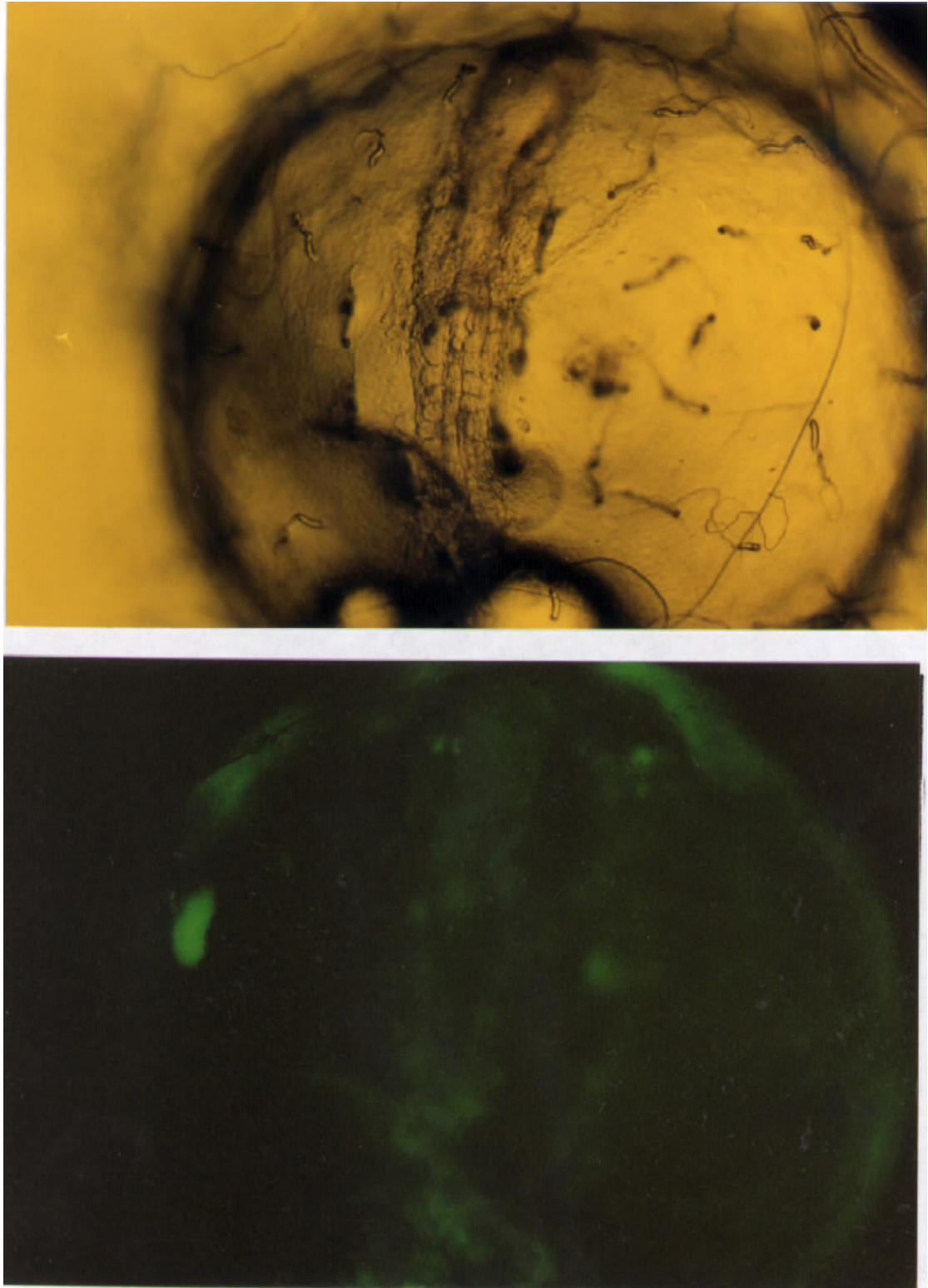


圖2c：注射7.5  $\mu$ g/ml pGreen LANTERN。授精40小時後的胚胎，綠色螢光為GFP。（放大倍率75X）

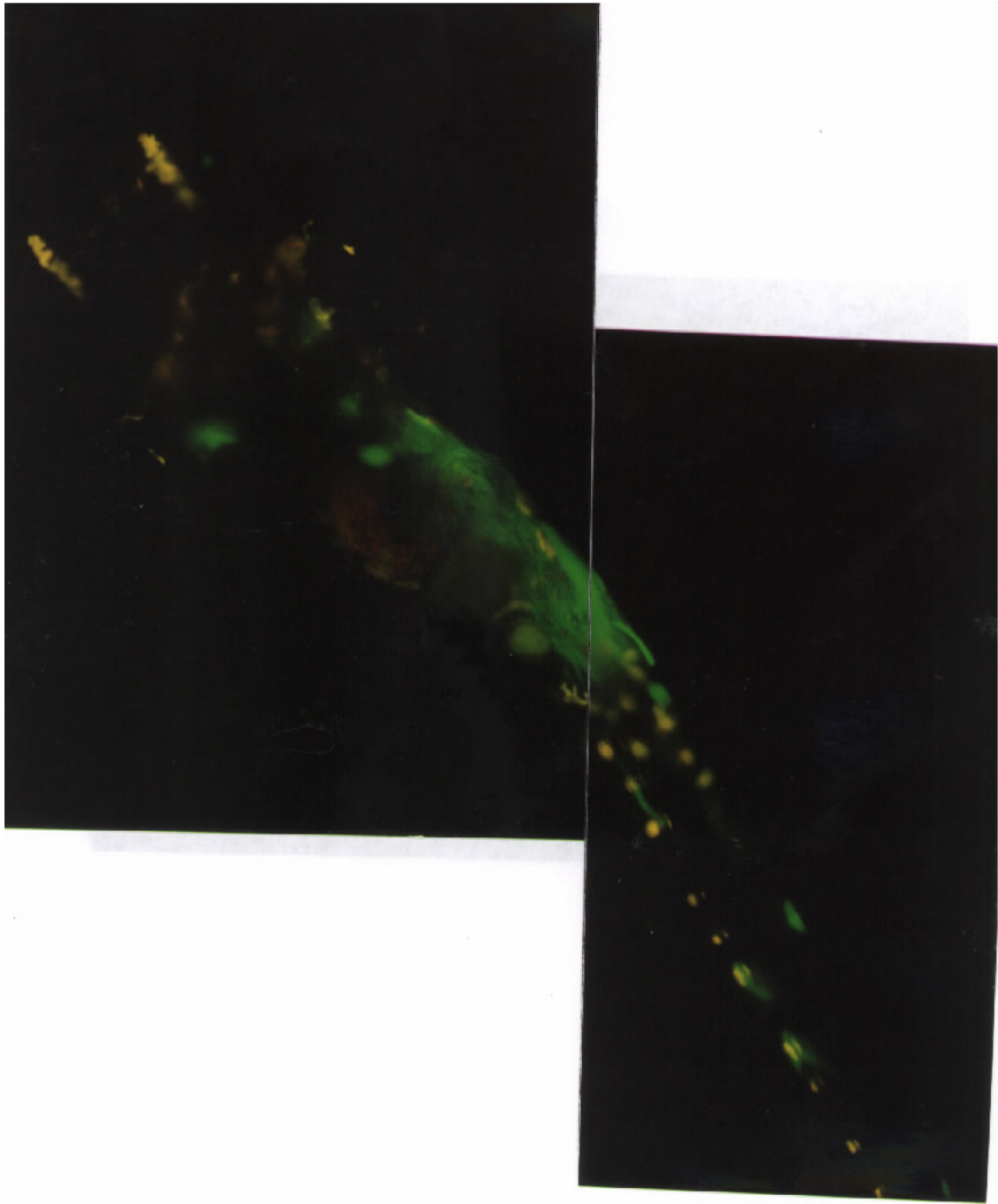
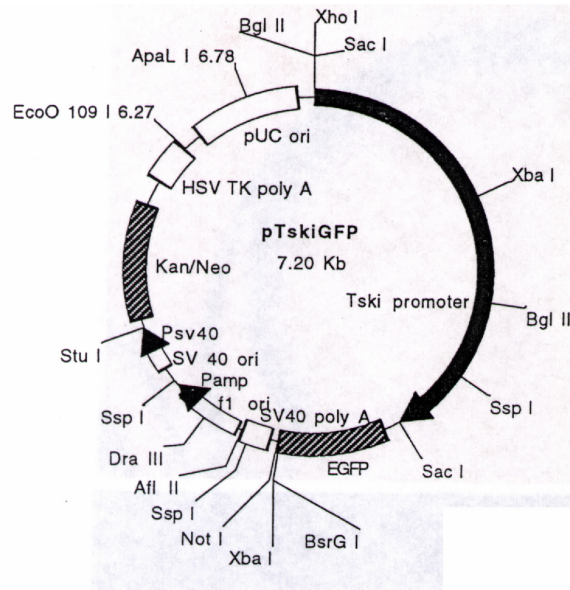


圖2c：注射7.5  $\mu$ g/ml pGreen LANTERN。孵化10天後的仔稚魚，綠色燭光為GFP。（放大倍率75X）

(a) 以 Sac I 為接點, 建構吳郭魚 c-ski 基因上游 3kb 片段 (Tski promoter) 至 pEGFP。



(b) 分別以 Sca I (lane 2) Xho I (lane 3) Sac I (lane 4) Xba I (lane 5) Bgl II (lane 6) 及 Ssp I (lane 7) 確認 Tski promoter 的方向性。(M: DNA/Hind III)

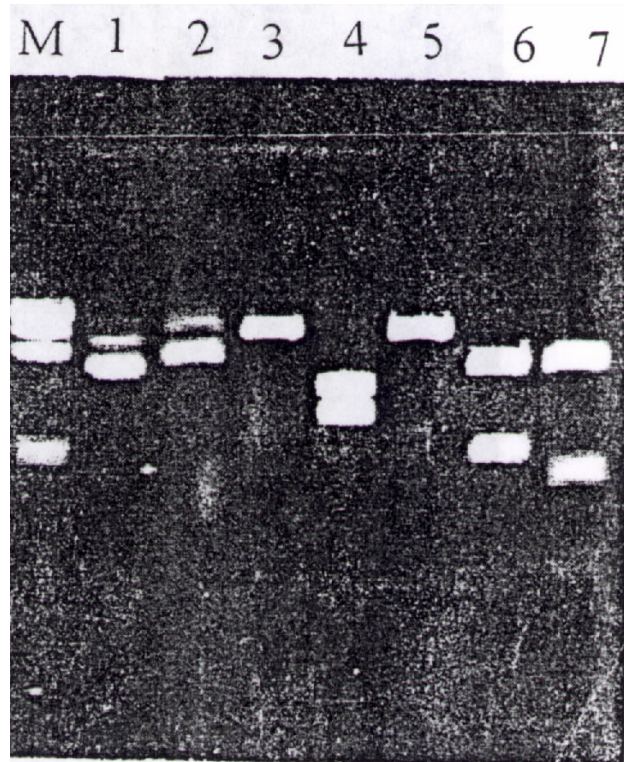


圖3：pTskiGFP質體圖譜

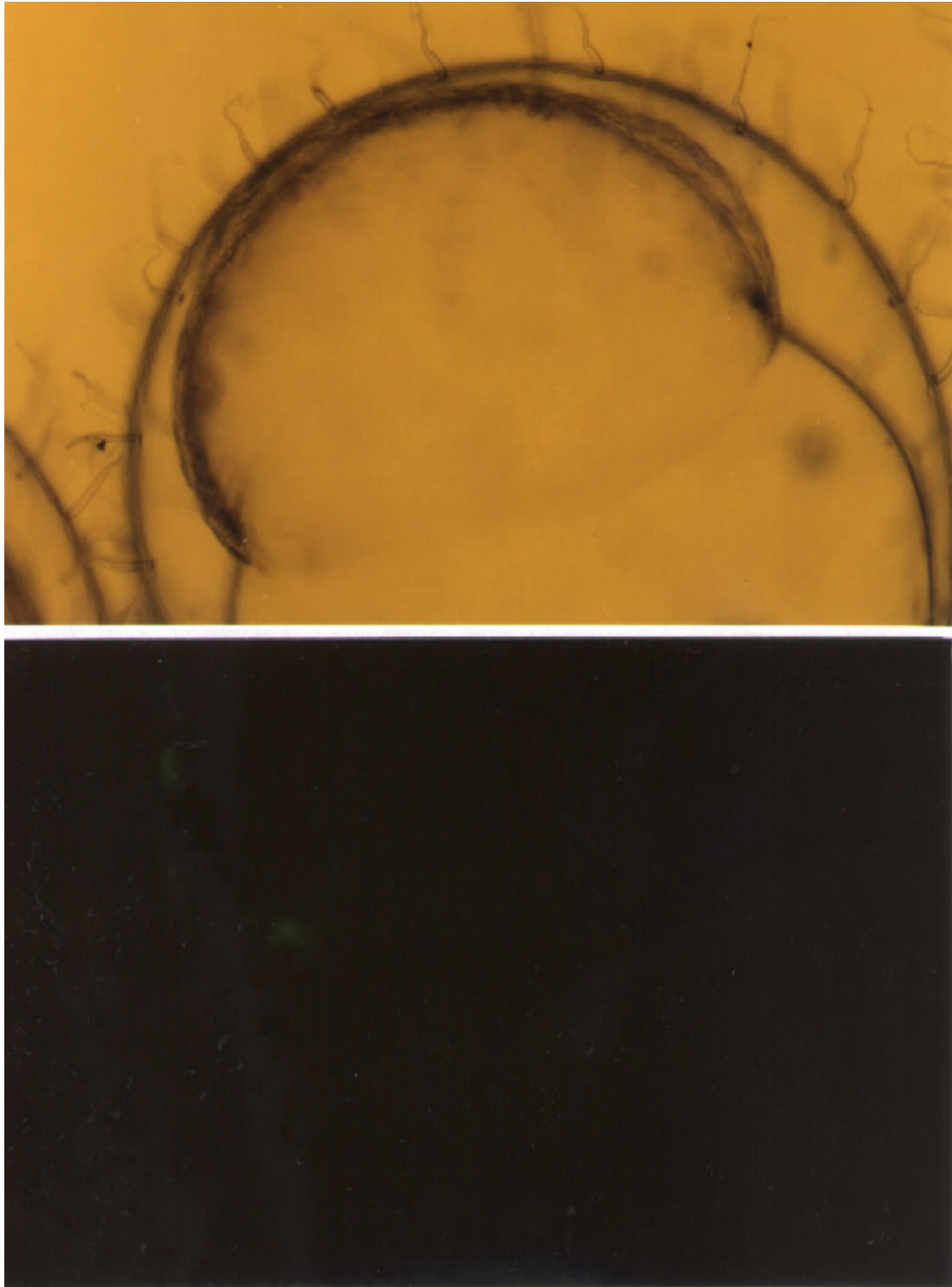


圖4a：注射 $10\ \mu\text{g/ml}$  pTskiGFP。授精12小時後的胚胎，綠色螢光為GFP。（放大倍率75X）

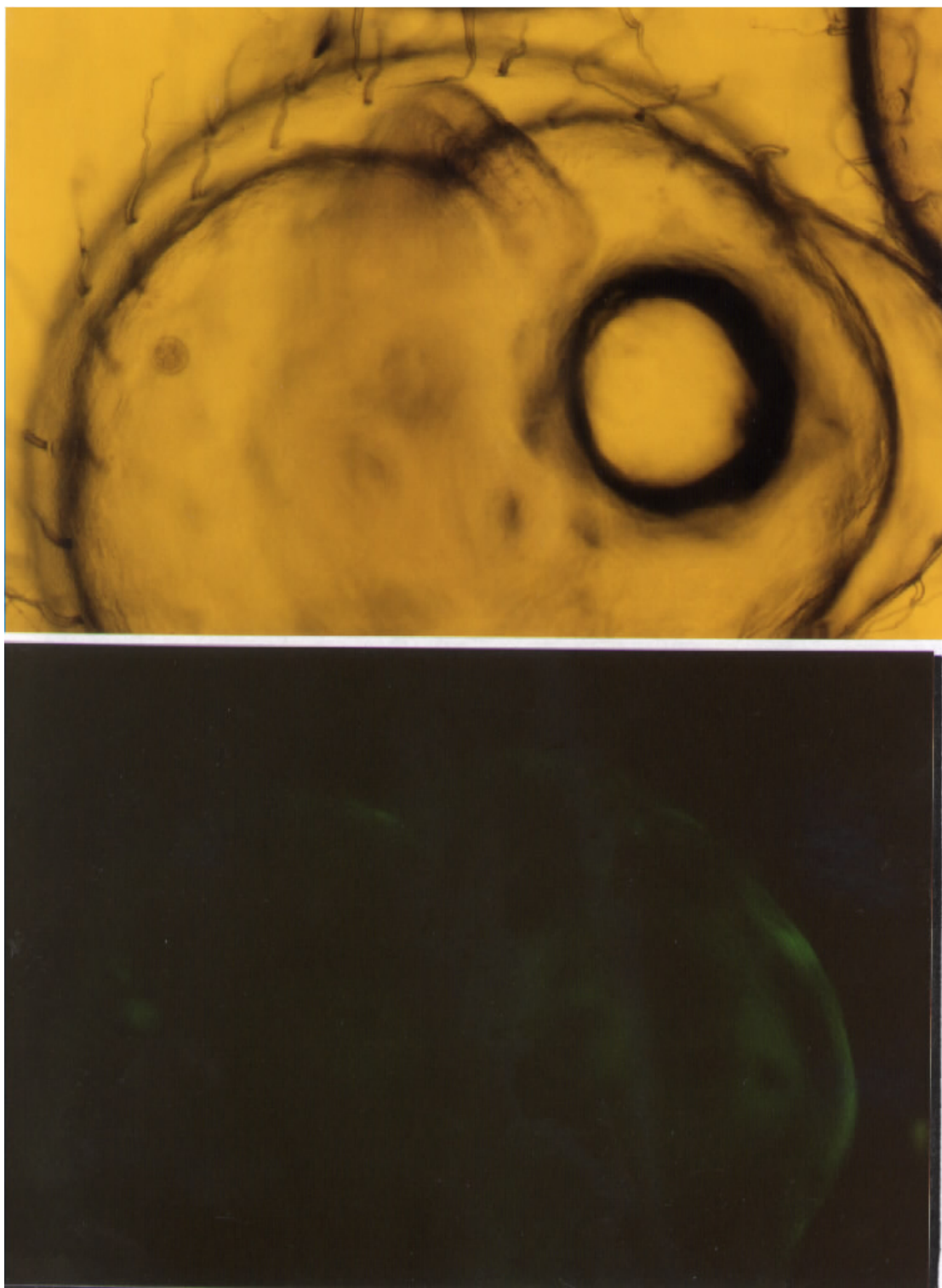


圖4b：注射 $10\ \mu\text{g/ml}$  pTskiGFP。授精24小時後的胚胎，綠色螢光反應僅在卵黃囊外圍出現。（放大倍率75X）

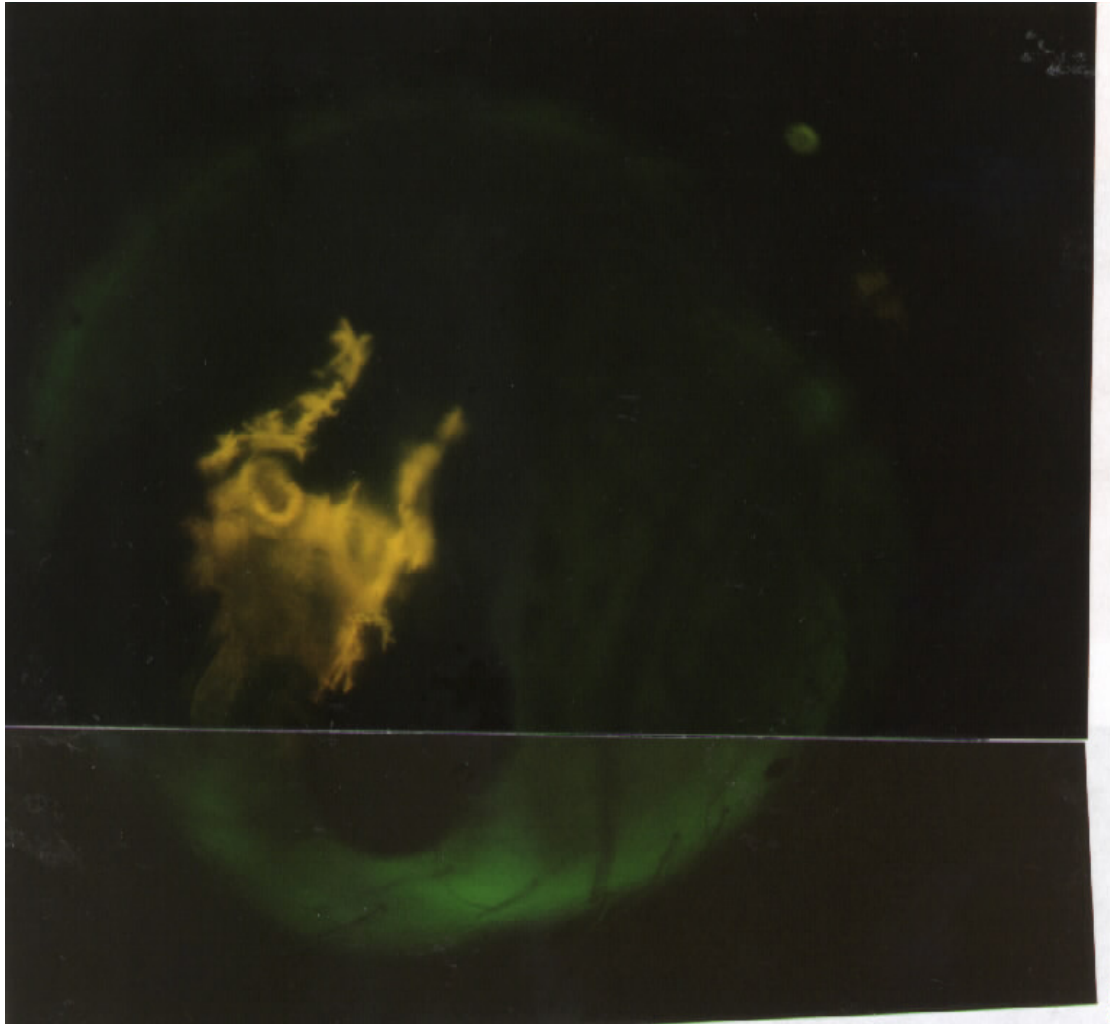


圖4c：注射 $10\ \mu\text{g/ml}$  pTskiGFP。授精72小時後的胚胎，綠色螢光反應僅在卵黃囊外圍出現。（放大倍率75X）

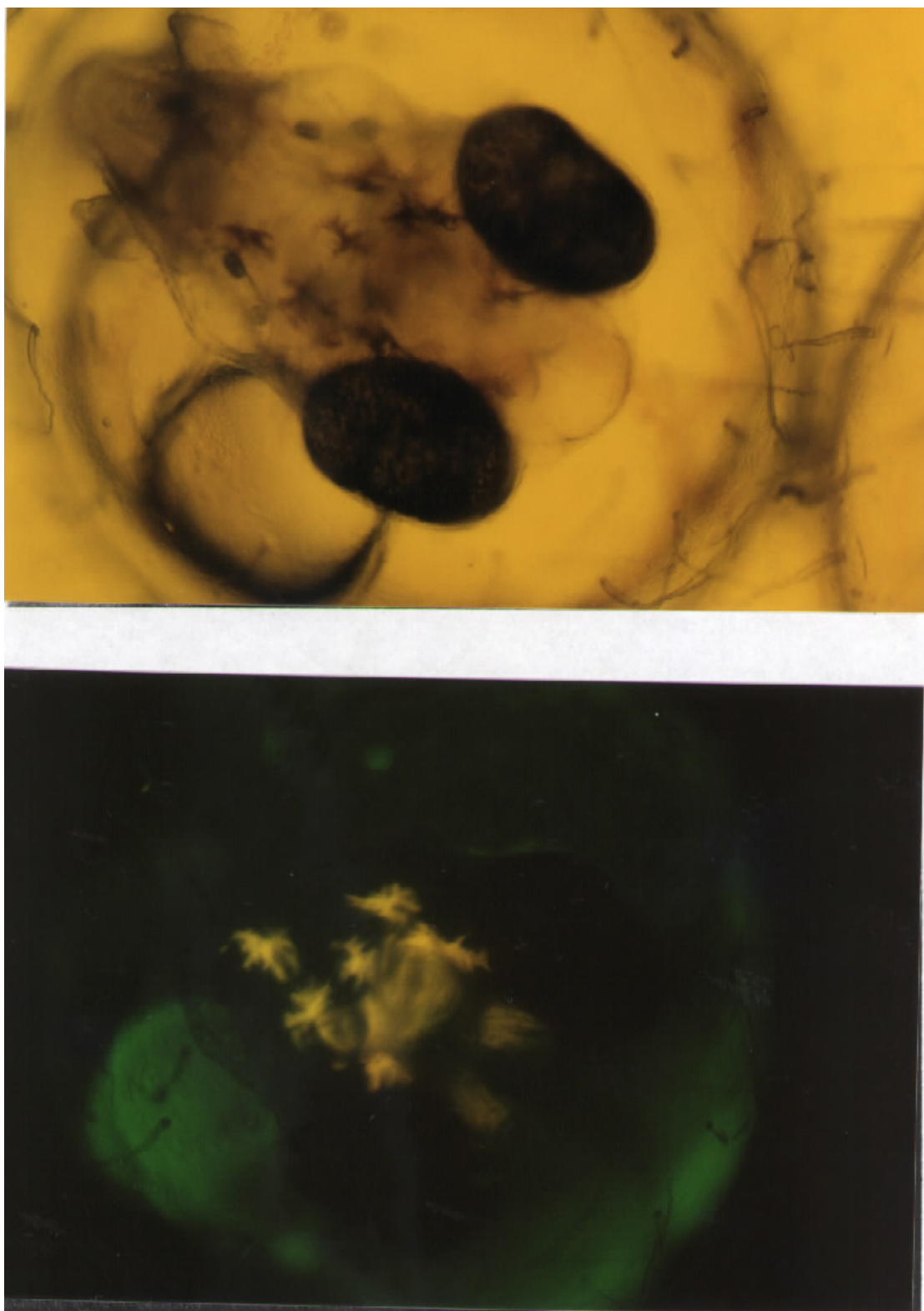


圖4d：注射 $10\mu\text{g/ml}$  pTskiGFP。授精96小時後的胚胎，綠色螢光反應僅在卵黃囊外圍出現。（放大倍率75X）

（上）明視野；（下）暗視野

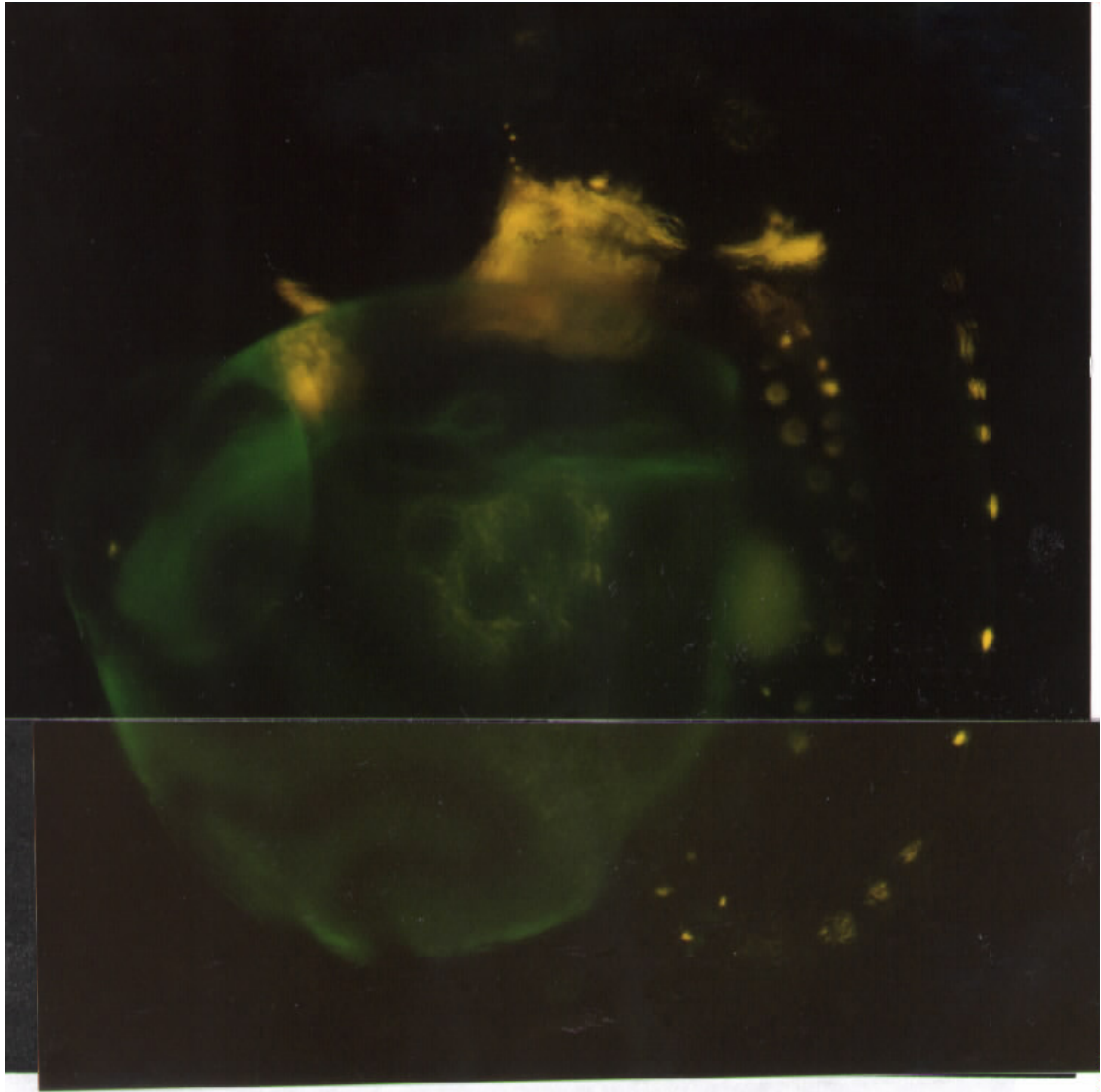


圖4e：注射 $10\ \mu\text{g/ml}$  pTskiGFP。授精120小時後的胚胎，綠色螢光反應僅在卵黃囊外圍出現。（放大倍率75X）

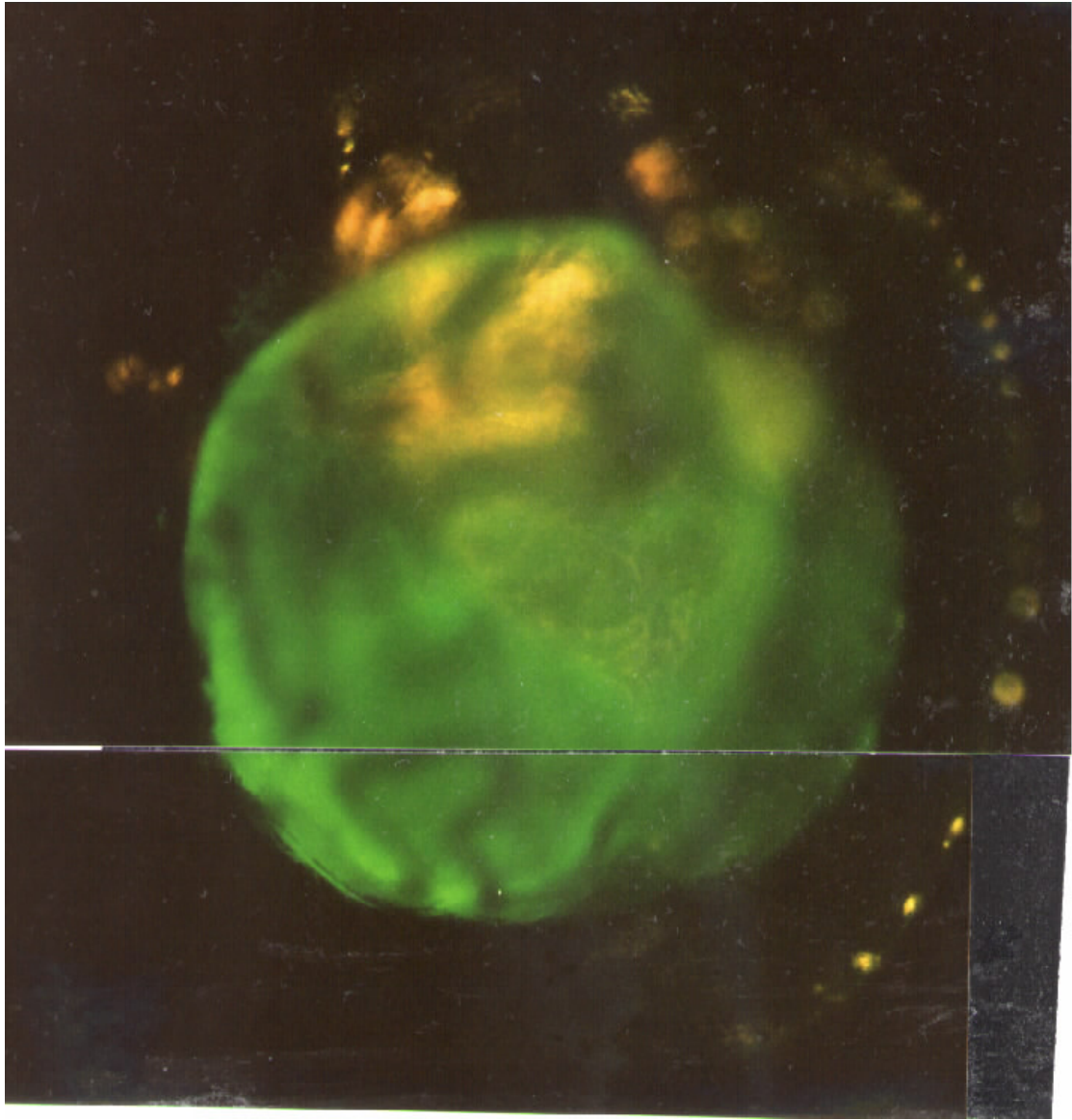


圖4f：注射 $10\ \mu\text{g/ml}$  pTskiGFP。授精196小時後的胚胎，綠色螢光反應僅在卵黃囊外圍出現。（放大倍率75X）



圖4g：注射 $10\ \mu\text{g/ml}$  pTskiGFP，剛孵化的仔稚魚，綠色螢光反應僅在卵黃囊外圍出現。（放大倍率75X）



圖4h：注射 $10\ \mu\text{g/ml}$  pTskiGFP，孵化後第4天，卵黃囊欲消失的仔稚魚。綠色螢光反應圍繞在卵黃油滴周圍。（放大倍率75X）