

電破法魚類轉殖技術之研發

耿全福、龔紘毅、陳志毅、廖欽峰、黃鵬鵬、吳金湧

中央研究院動物研究所

摘 要

將外來異質性基因利用生物技術之輔助，直接注射或間接送入受精卵中，使此基因能夠鑲嵌於欲研究之生物體遺傳物質上，而達到生物品系改良或基礎研究之目的，此種方法謂之基因轉殖(transgenic)研究，而此帶有異質性基因之動物種系，就稱之為“基因轉殖動物”。

魚類之基因轉殖研究，已經在鮭、鱒、鯉、吳郭魚、稻田魚、斑馬魚、金魚、泥鰱上得到成功的轉殖結果。在魚類基因轉殖上而言，原核通常較難察覺，而利用顯微注射法較常使用注射於已受精之卵細胞質中，而後再分析此注射入之特殊基因在魚體上之整合性、表現度與種系遺傳之情形。

實驗室中，以電破法為研究方法，以斑慈鯛為轉殖動物，研究電破法在基因轉殖之效率性。而利用pmiwZ以電破法轉殖進入斑慈鯛，八個細胞期的胚胎中，就Baekon 2000電破儀器而言，其最適宜的參數如下： $T_b=0.8\text{sec}$ ， $T_p=160\mu\text{S}$ ， $C_y=5\text{cycles}$ ， $N_p=64$ ， $D=395$ ，伏特數為7000伏特。而斑慈鯛經電破後有28%的存活率，其中22%具有 β -galactosidase活性表現，胚體表現為鑲嵌性的分布。

一、前 言

在許多魚種中，體外受精是一種天然的過程，而受精後，胚胎可以利用人工繁殖、養成之方式，畜養成長。而魚類一次產卵，可以產下數十萬之卵，故魚類就轉殖動物之層面而言，應屬良好之生物轉殖模式魚種，但情況並非如此。在某些魚種而言，受精卵卵分裂期，發育非常迅速，而很難達到基因轉殖之目的。許多魚卵，卵外包圍著一層硬卵鞘，致使利用顯微注射法之顯微注射長針無法穿透卵鞘之屏障。近年來，基因轉殖之研

究著重於「如何將外源性基因轉殖進入卵細胞中」，而基因轉殖技術發展計有DNA沈澱法、DEAE葡聚糖法、原生質融合法、微量注射法、雷射砲擊法、脂質體法、反轉錄病毒感染法、胚幹細胞法、精子載體法(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13)被發展出來。但這些方法不是相當費時，就是需要嫻熟的技藝或昂貴的儀器設備費。而最近發展出之電破法(electroporation)，具有快速、方便、不需精巧技術之優點。其基本原理是利用瞬間高壓電場使卵膜形成孔，讓外來基因轉殖至細胞中，最早使用於動物細胞的基因轉殖(14,15,16,17,18,19,20)，而今於植物(21,22,23,24,25,26,27,28,29)、原生動物(30)、黴菌(31)、酵母菌(32,33)及細菌(34)均有成功之例子。

1985年Zhu et al.首先將基因轉殖技術應用在魚類方面，Zhu et al.將MT-hGH以顯微注射法殖入法除卵殼之金魚受精卵中，結果以南氏點墨法(Southern blot)分析轉殖後50天大之金魚，顯示外來人類生長激素基因已成功插入魚體染色體中，許多學者相繼投入轉殖魚類的研究。到目前為止，做為基因轉殖研究的魚種，大部分是以高經濟價值的魚種為主，尤以鯉科(cyprinids: carp)、鮭鱒魚類(salmonids: salmon and trout)、慈鯛科(cichlids: tilapia)及鯰魚類(catfish)，約占全世界淡水養殖魚類總產量的80%。而以魚類做為基因轉殖的研究材料，除了因其經濟價值外，魚類實具有其特殊的生物特性：魚類通常行體外受精，使得胚胎實驗容易操作，不需複雜的處理步驟，如在轉殖老鼠(transgenic mice)需將交配後一個細胞期胚胎(one cell embryo)自母體輸卵管內取得，以顯微注射法將外來基因殖入pronucleus後，再放回假母親(foster mother)之子宮中。魚類的卵遠比哺乳類大且堅韌，使得卵的處理過程簡化了許多，且不需在無菌的狀態下操作。魚類相當多產，一次可產數百個或數千個卵，可提供充足的實驗樣品，許多魚種在生殖季期間，只要緩和擠壓魚體腹部，即有大量精、卵自生殖孔排出。某些魚種，例如：斑馬魚(zebrafish)、稻田魚(medaks)及斑慈鯛(zebracichlid)，因有透明的卵鞘，使得胚胎發育過程的觀察及操作容易許多。魚類的演化地位特殊，介於高等脊椎動物與低等無脊椎動物之間，適合做分子演化的相關研究。可提高魚類之經濟價值，如加速成長、抗寒、抗病性。

二、基因轉殖技術

動物基因轉殖之主要構成因素，可分三部分：(一)載體(vector)的構築；(二)啟動因子(promoter)與強化因子(enhancer)的應用；(三)基因轉殖之方法。

(一)、載體(vector)

1. SV40載體

SV40載體，是傳遞外來DNA進入動物細胞最常用的載體。其DNA為一個以共價鍵連接的圓環。其長度約為5,200鹼基對，可分為「早期基因」(early)及「晚期基因」(late)區域。早期基因在整個溶裂循環(lytic cycle)過程均能表現，而晚期基因僅於病毒的DNA開始複製後才表現。在早期基因與晚期基因之間DNA上含有一段控制DNA複製的始點(origin of viral DNA replication)。早期基因產物，大T抗體(large T antigen)是導致「非容許性」(nonpermissive)細胞（病毒不能在其體內完成複製的細胞）的惡性瘤的物質。其也為促使病毒DNA在容許性細胞中複製的因子。晚期基因的職司，為製造病毒的被囊體(Capsid)蛋白質，或稱病毒的外殼。

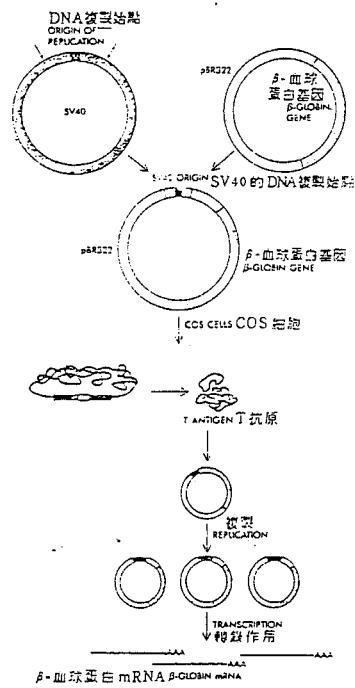
利用SV40病毒為轉殖基因載體的途徑有二。其一為製造SV40 DNA與外來DNA片段的重組體(recombinants)然後將其移入容許的細胞中，產生含有重組DNA的病毒顆粒。另外一種方法，是製造SV40 DNA與外來DNA片段的重組體如前述，但是不形成病毒顆粒。重組後的DNA可以移入細胞內暫時地以類似質體(plasmid-like)的形式自行複製，或插入細胞染色體中成為染色體的一部份。

任何帶有SV40複製始點的DNA均能自行複製插入SV40中的外來DNA，至少暫時會隨之在細胞染色體外開始複製。含有SV40複製始點及外來基因的重組DNA，於進入COS細胞後會大量複製。因此在這種似質體的DNA上外來基因，其轉錄機轉得以研究。在一個實驗中(35)學者發現，外來的 β -球蛋白(β -globin)基因，能正確地開始轉錄，而且產生經過適當接合(spliced)的mRNA(圖一)。

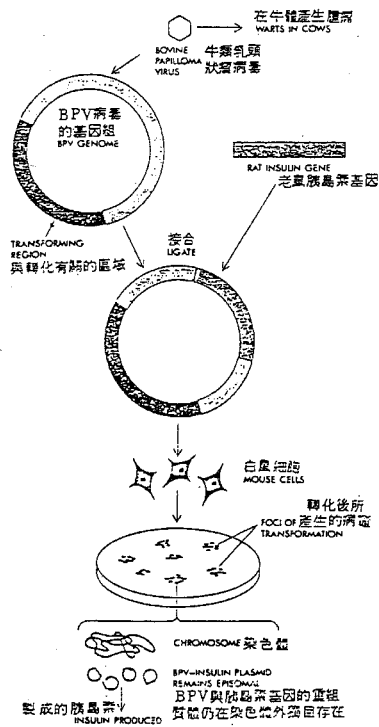
2. 乳頭狀瘤病毒載體

另外一種在真核細胞中從事基因傳遞的DNA病毒媒介，是牛類乳頭狀瘤病毒(bovine papilloma virus; BPV)。這種病毒能引起家畜的腫瘤。其DNA為環狀，長度為8,000鹼基對，能轉化某些白鼠細胞為惡性瘤的形態。在轉化的細胞中，BPV的DNA仍為環狀，且不與細胞的染色體結合。每一個細胞中含有大約30至100個這種病毒DNA。這種現象，首先清楚地顯示，「質體」(plasmid)類的DNA能夠在真核細胞中穩定地存在。利用這種病毒DNA，我們可以將其他的基因傳遞於白鼠細胞中。在白鼠細胞中帶有外來基因的病毒DNA，仍然獨立存，不與細胞的染色體合併。例如，老鼠的胰島素(insulin)基因，插於BPV病毒的DNA中(36)然後用以轉化白鼠細胞。在白鼠細胞內，此種重組DNA形成30至50個類似質體，且產生大量的胰島素mRNA及其蛋白質(圖二)。

BPV病毒DNA上如果插有pBR322質體的序列，則能往返大腸菌及白鼠細胞間，作為能夠傳遞外來基因於這兩種生物細胞的載體。(37)



圖一 利用外來基因及SV40 DNA之質體感染COS CELL，能產生大量之質體



圖二 牛類乳頭狀瘤病毒，能夠在白鼠細胞中自行複製，並且在每個細胞中維持50至200個之多

3. 逆轉錄病毒載體

逆轉錄病毒(retrovirus)也可用作傳遞外來基因至真核細胞的媒介。逆轉錄病毒含有一個RNA分子，後者的5'端有甲基化的頂蓋(methylated cap)，而3'端有聚A的長尾(poly-A tail)，如mRNA。在感染細胞時，病毒的RNA逆轉錄為雙股DNA，此DNA再插入細胞的基因內。於插入後，此種先驅病毒(provirus；即併入之病毒DNA)猶如細胞的基因維持在細胞的染色體上。合併於細胞染色體中的前驅病毒，其兩端有相同的long terminal repeat(LTR)序列，促使病毒基因表現的唯一啓動子(promoter)便在LTR中。而製造各種病毒蛋白質的RNA，會經過RNA接合(RNA splicing)的控制。前驅病毒的DNA，如果經外來DNA序列局部的置換，可用作傳遞基因至動物細胞的工具。受這種重組DNA轉殖的細胞，能夠在LTR序列處開始轉錄而產生大量新的mRNA。

(二)、啓動因子與強化因子的應用

研究人員發現利用SV40早期基因的啓動子(promoter)與其複製始點重組時，發現SV40大T抗原啓動子前方的某些鹼基序列，能夠大幅地增進其後幾乎任何啓動子的轉錄作用。這種稱為「增效序列」(enhancer sequences)的SV40片斷，長度為72鹼基對，且為前後相連的重複單位(repeated in a tandem fashion)。這種72鹼基對的重複序列，若同時與兔子的 β -血球蛋白基因，連接於一個質體中，然後移入人體細胞內，使能產生大量的 β -血球蛋白基因mRNA。反之，無增效序列的上述質體，則無產生 β -血球蛋白mRNA的能力。(38)

(三)、基因轉殖之方法

1. DNA沈澱法

根據白鼠細胞攝取tk基因的實驗結果顯示，當tk基因與他種DNA共同用 Ca^{++} 沈澱移入細胞中後，tk基因以及部分的他種DNA，均有插入細胞染色體的可能，DNA上的磷酸鹽，若欲與 Ca^{++} 形成沈澱，必須要達到一定量的要求。因此利用 Ca^{++} 沈澱tk基因時，經常需添加大量的他種DNA，作為載體(carrier)以滿足磷酸鹽在量方面的要求。在目前，我們還無法瞭解細胞優先攝取 Ca^{++} 沈澱的DNA的機制，利用這種共同轉殖的技術，幾乎任何選殖的DNA片段，均可進入培養的真核細胞。(1)

2. 顯微注射法

DNA也可以利用管尖極細(0.1至0.5微米)的玻璃微量注射管(glass micropipette)直接注入培養的細胞中。這種微量注射(microinjection)的程序，需有相當精密的設備，於製造細長管尖時，需用微量吸管拉長器(micropipette puller)，注射時需有固定管尖位置

的微量操縱器 (micromanipulator)，這種技術的長處，為任何DNA在原則上均可傳入任何種類的細胞內。而其缺點為其設備昂貴、操作技術需要有相當時間的練習，及每次只能注射相當有限細胞。(6)

3. 雷射法

把細胞和DNA溶液，經由雷射照射，使細胞膜短暫的形成小孔，而DNA就經由小孔進入細胞中，這種方法需要昂貴的雷射器材。(6)

4. 電破法

在瞬間高揚下，細胞膜形成可逆的破裂，而形成孔，DNA經由細胞膜孔而進入cell中，當電場消失後細胞膜可再回復，使DNA保留在細胞內。

一般而言，細胞膜或是平面的lipid bilayer膜，在極短時間內，通以高電場，會造成細胞膜的導電性和滲透性增加(39,40)，如果電場增加至某種程度，則會造成細胞形成孔，這種現象被稱為電性破裂(electrical breakdown)是屬於可逆性的破裂，如電場再增加，使細胞孔變得更大，形成不可逆性的破裂，會造成細胞死亡。這種現象可用下列公式表示(41,42,43)

$$\Delta V = \frac{3}{2} \cdot r \cdot E \cdot \cos \theta \dots \dots \dots \text{公式(1)}$$

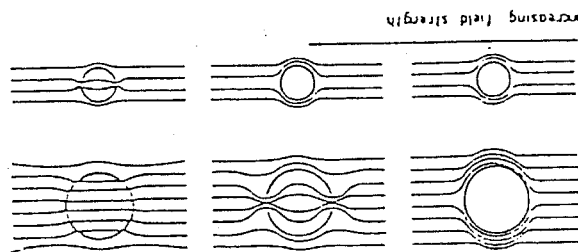
ΔV = 膜電壓

r = 細胞膜半徑

θ = 細胞膜上一點和電場線的夾角

E = 外加電場

因細胞膜是phospholipid bilayer組成，導電性低，當細胞溶液通電後，溶液中的離子就延著電場線運動，遇到低導電性的細胞膜，離子就堆積在細胞膜，形成膜電壓 (ΔV)，由公式(1)得知，外加電場愈大，膜電壓也就愈大，當膜電壓大過細胞膜所能忍受閾值，就會形成孔，如膜電壓和細胞直徑成正比 (公式1)，所以在相同的外加電場下，大細胞會先破裂，而小細胞保持完整，如圖三所示：注意電



圖三 細胞形成孔與細胞大小及電場方向的關係

場線的變化。

而膜電壓和電場線方向成正比，所以當電場慢慢上升到細胞溶液中，接近電場線的地方先破($\cos 0^\circ = 1$, $\cos 90^\circ = 0$)如圖四所示，注意平行電場線的地方先破。最先利用電穿孔轉移感細胞成功的是 Neumann et al.(43)，他提出電穿孔的模式如圖五：(a)DNA和細胞液，受外加電場(E)，而形成孔。(b)DNA由細胞破裂進入細胞中。(c)DNA再和核仁結合。(d)完整的細胞膜。(e)受到電場影響而形成孔的細胞膜。

5. 電破法儀器種類

電破法儀器依電場輸出方式可分為：(a)電容器放電，(b)電源供應器直接放電(21,22)。

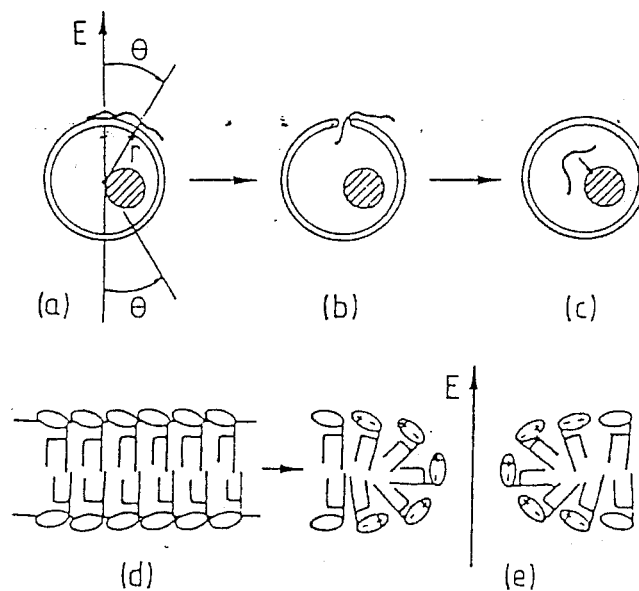
(a)電容器放電：電流先貯藏在電容器中，需要電場時，才由電容器，輸出瞬間高壓高脈，但是其輸出電壓和輸出時間成一個尖鋒(peak)關係存在如圖六，其電脈強度和電脈時間不易控制。

(b)電源供應器直接放電：瞬間高壓電，直接由power supply輸出，在某一電脈時間內，其電壓為一固定值，即輸出電壓和輸出時間成一方形關係存在，如圖七，其電脈強度和電脈時間，較電容器放電精確，如Beak 2000，電穿孔儀器即是。

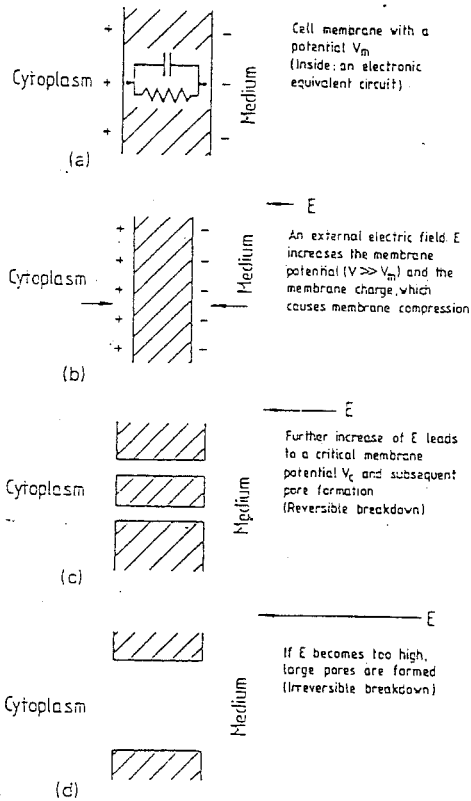
6. Beakon 2000電破法之儀器

Beakon 2000電破法儀器主要分為兩部分說明：(a)電壓輸出主機體(controller)，(b)電穿孔反應器(reactor)(圖八)。

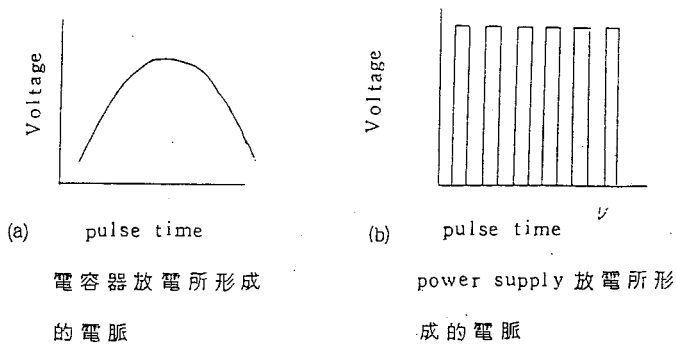
(a)電壓輸出主機體：Beakon 2000有五種可調節的參數：



圖四 電穿孔法轉移DNA到細胞之圖解

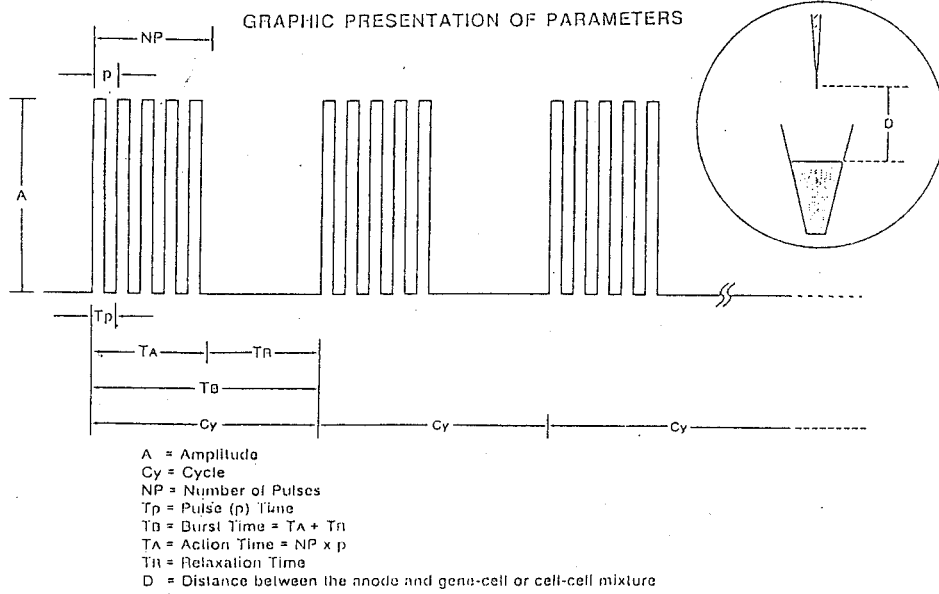


圖五 電穿孔法圖解

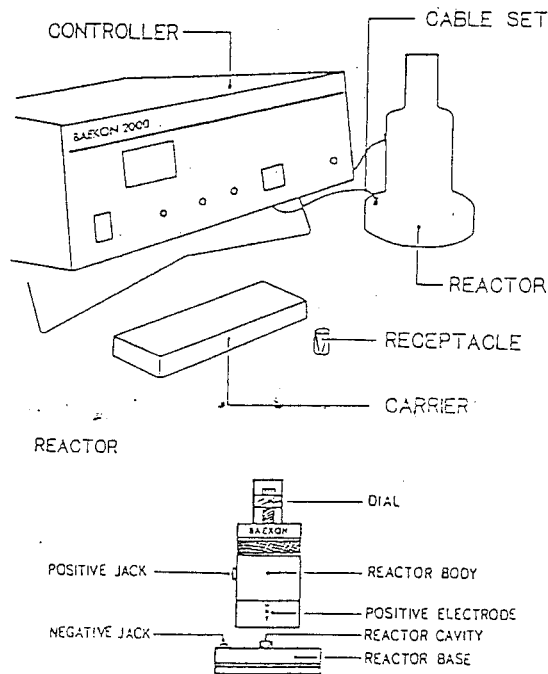


圖六 電容器放電與POWER SUPPLY放電所產生的電脈圖解

- (1)電壓：輸出電壓的範圍由0.1KV至10KV，最大電流是40mA。
- (2)電脈時間(pulse time)：電脈的定義是突然很強的增加電流。電脈時間範圍由0到160 μ sec，是屬於方形電脈輸出方式。
- (3)電脈數目(number of pulses)：電脈數目範圍由2 $^{\circ}$ 到2 $^{\mu}$ 。
- (4)電穿孔時間(burst time)：電穿孔時間可用下列公式表示。



圖七 Beakon 2000電穿孔儀器參數之相互圖解關係



圖八 Beakon 2000電穿孔儀器圖解

$$T_B = T_A + T_R$$

T_B = Burst time (電穿孔時間)

T_A = Action time = 真正電穿孔時間

= 電脈時間 × 電脈數目

T_R = Relaxation time

(5)循環次數：重覆(1)，(2)，(3)，(4)設立的參數稱為一個循環，循環範圍由 1 到無限多。

(6)電穿孔反應器：主要功能是調節電極和細胞溶液表面的距離，可由 Dial 所示(圖八)，而細胞和DNA溶液放在特殊電穿孔容器內(receptacle)，再放入Reacor cavity進行電穿孔。

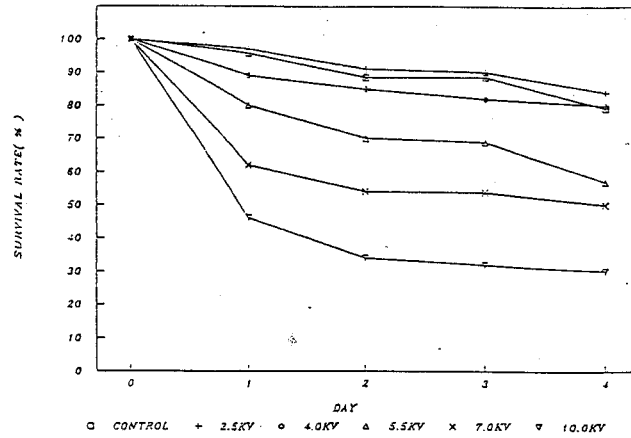
三、計劃執行成果

電破法實為較適合魚類的生殖策略(卵數多)的基因轉殖法。斑慈鯛一次可產400-800顆卵，即若能成功地以電破法進行轉殖，則可使斑慈鯛成為更佳之轉殖魚類模式系統。參考Baekon 2000所提供之電破法參數，先固定五個參數： $T_b=0.8\text{sec}$ ， $T_p=160\text{us}$ ， $N_p=64$ ， $C_y=5$ ， $D=1\text{mm}$ ，改變不同電壓大小，先不加質體DNA，對斑慈鯛不同細胞期魚卵進行電穿孔，觀察電壓大小對其存活率的影響。表一為發育至桑椹期(morula)的魚卵，施以不同電壓後至其孵化之存活率比較。施以7000伏特以上電壓後，馬上可見大量魚卵死，在顯微鏡下觀察可見大部分魚卵是因卵黃部分受到嚴重傷害而致死，肉眼即可見魚卵反白，至第四天孵化後，其存活率自4000伏特以下與未施電破之控制組沒有明顯差異，而5500伏特存活率只有57%，見圖九及表一，此次實驗所用魚卵為同一對魚一次所生共696顆。表二及圖十為胚胎在一個細胞期時(1 cell stage)施以4000，5500，7000伏特三種電壓，其卵發育至孵化之存活率比較，由結果可見當施以

SURVIVAL RATE AFTER ELECTROPORATION:

Day No. volts	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
10000	100(100%)	46(46%)	34(34%)	32(32%)	30(30%)
8500	100(100%)	65(65%)	56(56%)	54(54%)	52(52%)
7000	100(100%)	62(62%)	54(54%)	54(54%)	50(50%)
5500	100(100%)	80(80%)	70(70%)	69(69%)	57(57%)
4000	100(100%)	89(89%)	85(85%)	82(82%)	80(80%)
2500	100(100%)	97(97%)	91(91%)	90(90%)	84(84%)
Control	96(100%)	92(92%)	85(88.5%)	85(88.5%)	76(79.2%)

表一 Numbers of survival and survival rate of zebrafish embryos until hatching after electroporated at morula stage with different voltages.

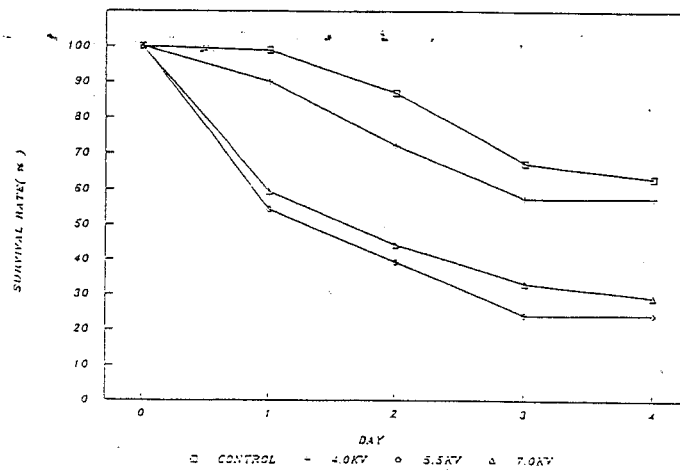


圖九 Survival rate of zebra - cichlid embryos until hatching after electroporated at morula stage with different voltages.

SURVIVAL RATE AFETR ELECTROPORATION:

Day No. volts	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
7000	100(100%)	59(59%)	44(44%)	33(33%)	29(29%)
5500	100(100%)	54(54%)	39(39%)	24(24%)	24(24%)
4000	100(100%)	90(90%)	72(72%)	57(57%)	57(57%)
Control	91(100%)	90(98.9%)	79(86.8%)	61(67%)	57(62.6%)

表二 Numbers of survival and survival rate of zebra-cichlid embryos until hatching after electroporated at 1 cell stage with different voltages.



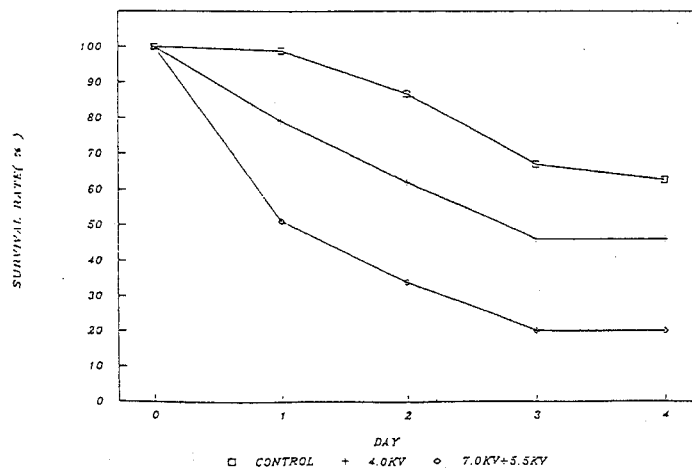
圖十 Survival rate of zebra - cichlid embryos until hatching after electroporated at 1 cell stage with different voltages.

4000伏特電壓時，卵的存活率與未施以電壓之控制組沒有差異，而5500伏特與7000伏特至孵化時存活率不到30%。表三及圖十一與表二及圖十為同一批魚卵591顆，但是至其發育至2-4細胞期才施以電壓，結果可見施以5500與7000伏特之存活率只有20%，不到4000伏特的一半。表四及圖十二為魚卵發育八個細胞期才施以不同電壓，至魚卵孵化其存活率之比較。此次7000伏特以上，魚卵只有4%的存活率，5500伏特有32%存活率。同一批卵施以7000及5500伏特兩種電壓，此次電破時以100ug/ml之pmiwZ質體DNA溶於一次水中，每次處理50顆卵，電擊反應容器(receptacle)總體積為500ul，結果由表五及圖十三。可見施以5500伏特與7000伏特孵化時之存活率沒有顯著差異，約為25%。而未施以電壓之控制組存活率為90.5%，可見此批魚卵之卵質甚佳。

SURVIVAL RATE AFTER ELECTROPORATION:

Day No. volts	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
7000+ 5500	100(100%)	51(51%)	34(34%)	20(20%)	20(20%)
4000	100(100%)	79(79%)	62(62%)	46(46%)	46(46%)
Control	91(100%)	90(98.9%)	79(86.8%)	61(67%)	57(62.6%)

表三 Numbers of survival and survival rate of zebra cichlid embryos until hatching after electroporated at 2-4 cell stage with different voltages.



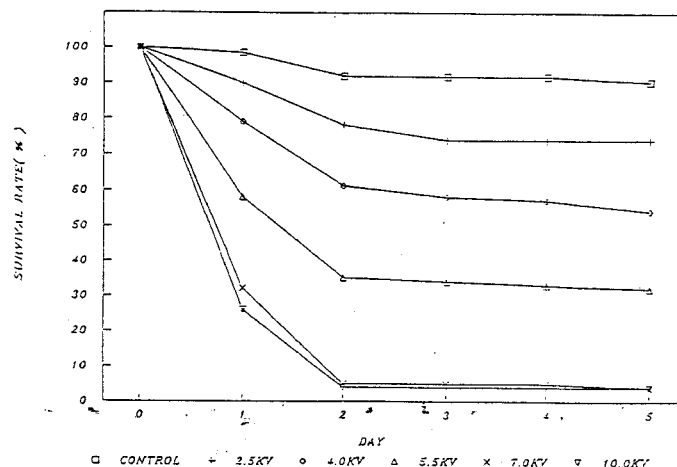
圖十一 Survival rate of zebra cichlid embryos until hatching after electroporated at 2 - cells stage with different voltages.



SURVIVAL RATE AFTER ELECTROPORATION:

Day No. volts	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
10000	50(100%)	14(28%)	2(4%)	2(4%)	2(4%)	2(4%)
8500	100(100%)	26(26%)	9(9%)	9(9%)	9(9%)	5(5%)
7000	100(100%)	32(32%)	5(5%)	5(5%)	5(5%)	4(4%)
5500	100(100%)	58(58%)	35(35%)	34(34%)	33(33%)	32(32%)
4000	100(100%)	79(79%)	61(61%)	58(58%)	57(57%)	55(55%)
2500	50(100%)	45(90%)	39(78%)	37(74%)	37(74%)	37(74%)
Control	74(100%)	73(98.6%)	68(91.9%)	68(91.9%)	68(91.9%)	67(90.5%)

表四 Numbers of survival and survival rate of zebra cichlid embryos until hatching after electroporated at 8 cell stage with different voltages.



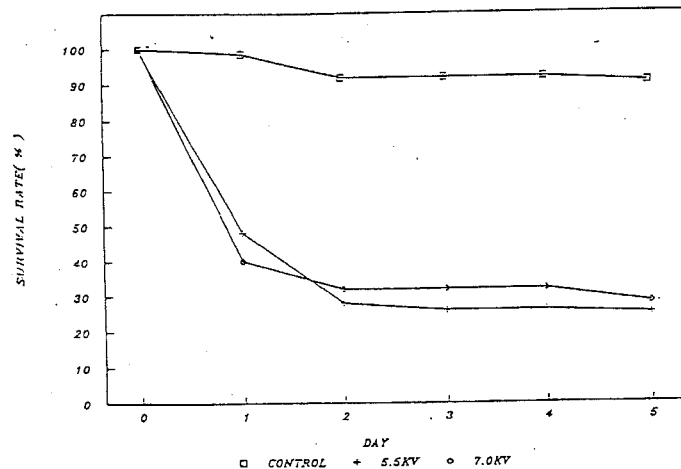
圖十二 Survival rate of zebra - cichlid embryos until hatching after electroporated at 8 cells stage with different voltages.

pmiwZ 為含有 lacZ (β -galactosidase gene) 之質體，為一很好測試其表現的 reporter gene。魚卵孵化一天後（體長約 5mm），偵測其 β -galactosidase 在胚體的表現。若胚體某一特定細胞有 β -galactosidase 表現，則 β -galactosidase 會將滲入胚體中之 X-gal (lactose 之類同物) 分解，氧化而呈現藍色。施以 7000 伏特電壓之 14 隻孵化稚魚 (larva) 有 11 隻有 β -galactosidase 表現。施以 5500 伏特電壓之 25 隻稚魚，有 11 隻有 β -galactosidase 表現。施以 7000 伏特電壓時，有 28% 魚卵會存活至孵

SURVIVAL RATE AFETR ELECTROPORATION:

Day No. volts	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Dan 5
7000	50(100%)	20(40%)	16(32%)	16(32%)	16(32%)	14(28%)
5500	100(100%)	48(48%)	28(28%)	26(26%)	26(26%)	25(25%)
Control	74(100%)	73(98.6%)	68(91.9%)	68(91.9%)	68(68%)	67(90.5%)

表五 Numbers of survival and survival rate of zebrafish embryos until hatching after electroporated at 8 cell stage with 100ug/ml pmiwz plasmid DNA.



圖十三 Survival rate of zebra - cichlid embryos until hatching after electroporated at 8 cells stage with 100 ug / ml pmiwZ plasmid DNA.

化，其中有71.4%有 β -galactosidase活性表現；施以5500伏特電壓時，有25%魚卵會存活至孵化，其中有44%表現 β -galactosidase活性。而且由胚體之呈色，可明顯觀察到受7000伏特比5500伏特的胚體，其 β -galactosidase表現強了許多，且分布之細胞範圍較廣，但仍均為鑲嵌狀分布，因此可知7000伏特與5500伏特之存活率沒有差異，但轉殖效果及表現率7000伏特較5500伏特為佳，故7000伏特為較5500伏特為更適當之轉殖條件。但同樣施以7000伏特電壓，由胚體呈現藍色程度及分布可明顯看出不同仔稚魚其 β -galactosidase表現程度有所差異。

四、結語

將外來基因轉殖入動物體內，已發展出多種方法。例如：以顯微注射

法(microinjection)，以重組反轉錄病毒(recombinant retrovirus)感染，及經由embryonic stem cells或teratocarcinoma cells進行轉殖，均已在老鼠上發展成功(45)。而以電破法(electroporation)進行基因轉殖，已在各種不同型態的細胞轉殖成功，包括培養的細胞株，哺乳類的primary cell cultures, embryonic stem cell，植物protoplasts及細菌等。而魚類的細胞株亦以電破法轉殖成功(46)。Inoue et al.(1990)首先將帶有虹鱒生長激素cDNA之質體DNA以電破法對稻田魚未分裂之受精卵進行轉殖，成功得到基因轉殖動物。Inoue et al.的結果顯示以稻田魚未分裂之受精卵，進行轉殖，成功得到基因轉殖動物。Inoue et al.的結果顯示以稻田魚未分裂之受精卵進行電破轉殖，其轉殖效率(4%)遠比以卵母細胞進行顯微注射轉殖之效率(27%)為低，但因電破法一次可轉殖大量受精卵，可彌補其轉殖效率低的缺點。而Powers et al.以電破法進行斑馬魚未去除卵鞘的受精卵轉殖，其轉殖率為25%至75%，由此結果更加顯示電破法實具有十足潛力，可取代顯微注射法成為魚類基因轉殖(gene transfer)的主要方法。尤其是對海水魚而言，其生殖策略為產卵量多，但存活率低，且海水魚生殖季短，以顯微注射法轉殖之效率太低，故本計劃擬發展電破法為魚類基因轉殖的主要方法。

而斑慈鯛因一次產卵量為400~800顆，且卵鞘柔軟，因此本實驗室希望能將其發展成為電破法轉殖之模式系統。此次實驗轉殖含有 β -galactosidase之質體pmiwZ，因 β -galactosidase為一很容易偵測的reporter gene，故轉殖此基因能快速找到斑慈鯛電破轉殖之較佳條件。因電破法為將魚卵浸在DNA溶液中，故只要能與外界DNA溶液接觸的細胞均有可能有DNA進入其細胞質中，所以電破法應可適用於多細胞胚胎的轉殖，如此則可有效地延長基因轉殖的時間，自一個細胞期至多個細胞期皆可。此次實驗以八個細胞期之斑慈鯛受精卵進行電破轉殖，以100ug/ml pmiwZ之DNA濃度下，固定Baekon 2000之其他五個參數：Tb=0.8, Tp=160us, Np=64, Cy=5, D=1mm，以7000伏特及5500伏特兩種電壓進行電破轉殖。結果7000伏特與5500伏特之存活率沒有差異，但 β -galactosidase活性偵測顯示7000伏特之轉殖效果比5500伏特好得多， β -galactosidase分布區域較廣，表現亦較廣。但以7000伏特電破轉殖， β -galactosidase之表現仍為鑲嵌性(mosaic)分布於全身各組織。以八個細胞期的電破轉殖條件為基礎，應可推廣至其他細胞期進行轉殖。而以 β -galactosidase此reporter gene找到電破轉殖的條件後，可用不同的具有組織特異性(tissue-specific)的起動子(promoter)，連接 β -galactosidase基因，趨動 β -galactosidase表現，並以斑慈鯛為模式魚種研究組織特異性之基因表現與調控。而海水魚的電破轉殖亦可以此reporter gene進行，幫助其快速找到轉殖所需之條件。以Baekon 2000對斑慈鯛八個細胞期的受精卵進行電破轉殖，約有20%的魚卵存活至孵化，而其轉殖基因表現率為

44% - 71.4%。Inoue et al.(1990)以Shimadzu GTE-1對稻田魚未分裂受精卵進行電破轉殖，亦約有25%的孵化率，但其中只有4%偵測到帶有外來基因。斑慈鯛之轉殖效率遠比稻田魚高，可能是因為斑慈鯛具有柔軟的卵鞘，而稻田魚的卵鞘較為堅韌。而Powers et al.對斑馬魚未去除卵鞘受精卵進行電破轉殖，有25% - 75%帶有外來基因，與斑慈鯛之轉殖效果相當。

謝 辭

承行政院農業委員會之計劃經費支持，吳鴻程生先、龔紘毅先生、耿全福先生實驗計劃之推展，在此一併誌謝。

參考文獻

1. Graham FL, AJ Van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virolog* 52:456-467.
2. McCutchan JH, JS Pagano. 1968. Enhancement of the infectivity of Simian Virus-40 DNA with diethyl amino-ethyl dextran. *J. Natl. Cancer Inst.* 41:351-357.
3. Schaffner W. 1980. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2163-2167.
4. Rassoulzadegan M, B Bintruy, F Cuzin. 1982. High frequency of gene transfer after fusion between bacteria and eukaryotic cells. *Nature* 295:257-259.
5. Yamamoto F, M Furusawa, I Furusawa, M Obinata. 1982. A new efficient technique for mechanically introducing foreign DNA into the nuclei of culture cells. *Exp. Cell Res.* 142:79-84.
6. Kurata S, M Tsukakoshi, T Kasuyu, Y Ikawa. 1986. The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells. *Exp. Cell Res.* 162:372-378.
7. Gruber HE, KD Finley, RM Hershberg, SS Katzman, PKL aikind, JE Seegmiller, T Friedmann, J-K Yee, DJ Jolly. 1985. Retroviral vector-mediated gene transfer into human hematopoietic progenitor cells. *Science* 230:1057-1061.
8. Cone RD, RC Mulligan. 1984. High efficiency gene transfer into mammalian cells: Generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6349-

6353.

9. Minden MD, JF Cugella, D Houaman. 1984. Chromosome-mediated transfer of the malignant phenotype by human acute myelogenous leukemic cells. *Blood* 64:842-846.
10. Schaeffer-Ridder M, Y Wang, PH Hofshneider. 1982. Liposomes as gene carriers: Efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene. *Science* 215:166-168.
11. Sanford JC, TM Klein, ED Wolf, N Allen. 1987. Delivery of substance into cells and tissues using a particulate bombardment process. *Particulate Science and Technology* 5:27-37.
12. Inoue K, S Yamashita, J Hata, S Kabeno, S Asada, E Nagahisa, T Fujita. 1990. Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Differ. Dev.* 29:123-128.
13. Hammer RE, VG Pursel, CE Rexroad, JrRJ Wall, DJ Bolt, KM Ebert, RD Paltimeer, RL Brinster. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature (London)* 315:680-683.
14. Margaret MJ, E Ito, JR Bertino, R Narayanan. 1987. Use of electroporation for high-molecular-weight DNA-mediated gene transfer. *Exp. Cell Res.* 171:513-517.
15. Narayanan R, MM Jastreboff, CF Chiu, JR Bertino. 1986. *In vivo* expression of a nonselected gene transferred into murine hematopoietic stem cells by electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 141:1018-1024.
16. Margaret MJ, JA Sokoloski, JR Bertino, Narayanan. 1987. Use of electroporation to study the cytotoxic effects of fluorodeoxyuridylate in intact cells. *Biochem. Pharmacol.* 36:1345-1348.
17. David JWS Thomas, JH Taylor, I Hussain, AP Johnstone. 1988. Electric shock-mediated transfection of cells. *Biochem. J.* 251:427-434.
18. Betsy MS, PV Bennett. 1984. Transformation of human cells by DNA transfection. *Cancer Res.* 44:2760-2772.
19. Stopper H, H Jones, U Zimmermann. 1987. Large scale transfection of mouse L-cells by electroporation, *Biochim. Biophys. Acta.* 900:38-44.
20. Reiss M, MM Jastreboff, JR Bertino, R Narayanan. 1986. DNA-mediated gene transfer into epidermal cells using electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137:244-249.
21. Hiromichi M, A Iida, C Matsui, Ikegami, Y Yamada. 1986. Gene transfer into intact cells by electroinjection through cell walls and

- membranes. *Gene* 41:121-124.
22. Toshiyuki N, K Okada, T Kawazu, I Takebe. 1987. Cauliflower mosaic virus 358 promoter directs S phase specific expression in plant cells. *Mol. Gen. Genet.* 207:242-244.
 23. Paul C, JE Murphy, WF Swain. 1987. Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:3962-3966.
 24. Nishiguchi M, T Sato, F Motoyoshi. 1987. An improved method for electroporation in plant protoplasts: infection of tobacco protoplasts by tobacco mosaic virus particles. *Plant Cell Reports* 6:90-93.
 25. Hibi T, H Kano, M Sugiura, T Kazami, S Kimura. 1986. High efficiency electro-transfection of tobacco mesophyll protoplasts with tobacco mosaic virus RNA. *J. Gen. Virol.* 67:2037-2042.
 26. Shillito RD, MW Saul, J Paszkowski, M Muller, I Potrvkus. 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. *Biotechnol.* 3:1099-1103.
 27. Michael F, LP Taylor, V Walbat. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:5824-5828.
 28. Lee TM, R Turgeon, R Wu. 1986. Expression of a foreign gene linked to either a plant-virus or a *Drosophilla* promoter, after electroporation of protoplasts of rice, wheat and sorghum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:6815-6819.
 29. Michael EF, LP Taylor, V Walbot. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319:791-793.
 30. Gibson WC, TC White, PW laird, P Borst. 1987. Stable introduction of exogenous DNA into *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 6:2457-2461.
 31. Douglas JM. 1987. Introduction of plasmid DNA into *Streptomyces lividans* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 42:239-244.
 32. Hashimoto HH, Morikawa, Y Yamada, A Kimure. 1985. A novel method for transformation of intact yeast cell by electroinjection of plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21:336-339.
 33. Weaver JC, GI Harrison, JG Bliss, JR Mourant, KT Powell. 1988. Electroporation: High frequency of occurrence of a transient high-permeability state in erythrocytes and intact yeast. *FFB* 229:30-34.
 34. Stefan F, R Wirth. 1988. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem.* 170-38-44.
 35. Joyce KD Yee. 1987. Electroporation: parameters affecting transfer of

- DNA into mammalian cells. *Anal. Biochem.* 164: 44-52.
36. Law MF, DR Lowy, I Dvoretzky, PM Howley. 1981. Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2727-2731.
 37. DiMaio D, R Treisman, T Maniatis. 1982. Bovine papilloma virus vector that propagates as a plasmid in both mouse and bacteria cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4030-4034.
 38. Banerji J, S Rusconi, W Shaffner. 1981. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27:299-308.
 39. Zimmermann Z, J Vienken. 1982. Electric Field-induced cell-to-cell fusion. *J. Membrane Biol.* 67:165-182.
 40. Benz R, U Zimmermann. 1981. The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta.* 640:169-178.
 41. Justin T, TY Tsong. 1981. Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. *Biochemistry* 20:1548-1554.
 42. Zimmermann U. 1982. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochimica et Biophysica Acta.* 694:227-277.
 43. Neumann E, M Schaefer-Ridder, Y Wang, PH Hofschneider. 1992. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1:841:845.
 44. Suemori H, Y Kadodawa, K Goto, I Araki, H Kondon, N Nakatsuji. 1990. A mouse embryonic stem cell line showing pluripotency of differentiation in early embryo and ubiquitous β -galactosidase expression. *Cell Differ. Develop.* 29:181-186.
 45. Palmiter RD, RL Brinster. 1986. Germ-line transformation of mice. *Ann. Rev. Genet.* 20:465-499.
 46. Huang RC, J Price, B Gouvlie. 1988. Regulation of antifreeze gene expression in winter flounder and in transgenic fish cells symposium on application of biotechnology in aquaculture and agriculture, Program and Abstracts, pp. 17.