

水產生物優良基因的選殖---鰻魚活體局部基因轉殖

曾福生、盧民益、余俊欣、劉文御

水產養殖組

由於抗生素藥物濫用，造成病原性微生物的抗藥性日益增加，以致可使用的抗生素種類愈來愈少，因此，為提昇水產動物的疾病耐受性，除了飼育環境衛生及養殖設施的改善外，也須研發新藥物、免疫刺激物或培育抗病魚介貝。近年來昆蟲類在抗菌的研究有相當的進展，如 cecropin β 及 cecropin p1 已針對一些魚類的病原菌 (*Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella ictaluri* and *Yersinia ruckeri*) 進行測試。Cecropins 為帶正電的兩性短鏈蛋白質，由 α -helices 彎曲而成，其狀似夾子，分子量約為 4kDa，由蠶蛹的血淋巴液發現而來，為昆蟲體內重要的防禦分子，有廣效的抗菌能力，其抗菌活力和現行的抗生素相當，其殺菌機制是在利用該分子具有強勢的正電荷聚集在細菌表面，分子的正電端穿透細菌的細胞膜，造成細菌的穿孔，導致細菌的通透性失恆溶解。Cecropins 非特異性的抗菌短鏈蛋白，為宿主對抗入侵微生物最早反應的防線，屬於先天性免疫系統中的一員。

本計畫以構築經由 CMV(cytomegalovirus)

啟動子帶有抗菌蛋白基因(cecropin cDNA)的表現質體，以活體方式 (*in vivo*) 轉形的肝臟及皮下，探討轉形的方法、經表現載體轉形後，鰻魚體內該表現載體殘存的時間及觀察經轉形後的鰻魚肝臟及外表的變化，以期進一步在密閉式的超集約系統進行鰻魚試驗(圖 1~2)。

鰻魚以活體方式進行肝臟及皮下組織以轉形外源性具表現能力的核酸質體(pCMV-cec)表現抗菌蛋白(cecropin)，分別實施電破法(electroporation)注射及單純的注射試驗，顯示活鰻對電壓的耐受性高(8kV)，比較施予電壓和未施予電壓之第 13 天的轉形率時，施予電壓組(100%)高於未施予電壓組(60%; 70%)(表 1)，施予電壓組注射法其 pCMV-cec 殘存於鰻魚體內長達 45 天，而未施予電壓組則有 12 天。

從已被 *Pseudomonas* spp. 感染的鰻魚分別以施予電壓和未施予電壓注射法對肝臟及皮下組織導入 pCMV-cec 進行測試，經一個月的觀察顯示施予電壓和未施予電壓組都沒有死亡率，但未處理之對照組則有 21% 的累積死亡率，結果顯示 pCMV-cec 具有抗病能力。



圖 1 Lane 1: 為 10kb DNA ladder 分子標記，lane 2 至 lane 6 經 pCMV-cec 肝臟電破轉形的鰻魚血液的 PCR 結果，lane 7 及 lane 11 為 positive DNA，lane 8 至 lane 10 僅以注射方式轉形的鰻魚血液，lane 12 至 lane 14 為第 45 天的鰻魚血液，lane 15, 16 negative DNA 的 PCR 經檢測結果

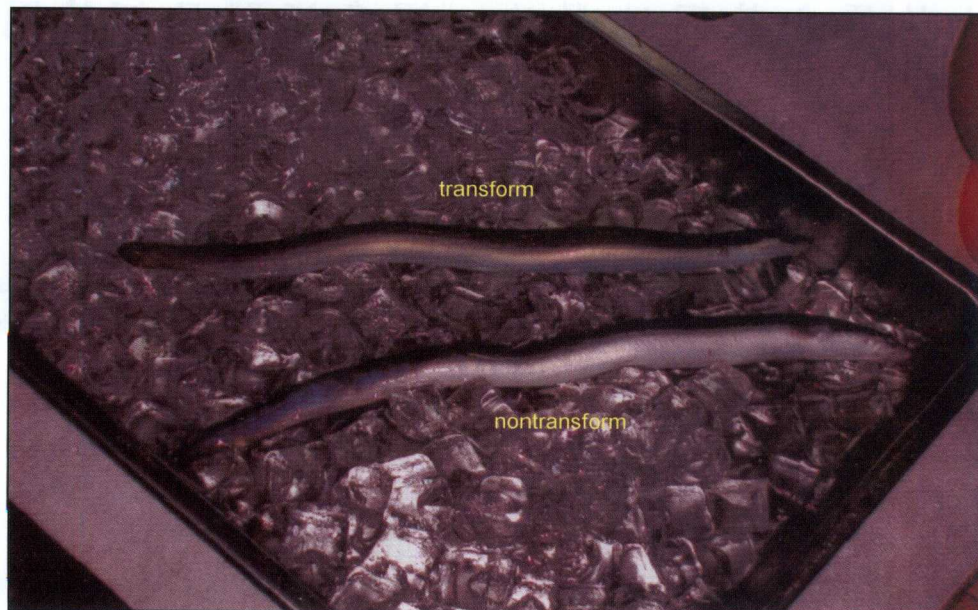


圖 2 經由 CMV 啟動子所控制的 cecropin 基因的表現質體轉形的鰻魚肝組織在肉眼觀察可清楚的看到有 pCMV-cec 注射(transformed)和沒注射(nontransformed)的差異在腹面、臀鰭基部、鰭邊緣及尾部有出血斑

表1 比較鰻魚在不同電壓 pCMV-cec 濃度下之轉形率及活存率

Voltage (kV)	Concentration μ g/g BW	No. of survivors/ no. tested	Survival %	Body length (x $\pm$ SD)cm	No. of PCR positive/ no. tested	No. of expression/ no. tested	Transformation %
2	0.1	8/8	100	44.9 $\pm$ 2.3	8/8	3/8	100
	2	6/6	100	67.3 $\pm$ 5.4	6/6	4/6	100
	saline	3/3	100	41.6 $\pm$ 4.1	0/3	0/3	0
5	0.1	11/11	100	53.1 $\pm$ 3.6	11/11	6/11	100
	2	5/5	100	63.9 $\pm$ 4.5	5/5	4/5	100
	saline	2/2	100	44.4 $\pm$ 3.8	0/2	0/2	0
8	0.1	7/7	100	31.2 $\pm$ 5.1	7/7	5/7	100
	2	9/9	100	50.6 $\pm$ 6.2	9/9	5/9	100
	saline	3/3	100	41.7 $\pm$ 2.3	0/3	0/3	0
*	0.1	5/5	100	52.3 $\pm$ 3.4	3/5	0/5	60
	2	10/10	100	58.6 $\pm$ 4.2	7/10	2/10	70
	saline	3/3	100	34.5 $\pm$ 4.3	0/3	0/3	0

No. of expression: detected FLAG in the fusion protein (FLAG-cecropin) by anti-FLAG monoclonal antibody.

* Non-electroporation only injection