

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

魚體中卵黃蛋白先質快速檢測方法的可行性研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNEV-91-24

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

計畫主持人：陳健民

共同主持人：劉明昭

計畫參與人員：蘇于菁

執行單位：環境工程與科學系

中華民國 92 年 2 月 25 日

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

魚體中卵黃蛋白先質快速檢測方法的可行性研究

計劃執行時間:民國 91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

主持人:陳健民 環境工程衛生系 教授

共同主持人:劉明昭 助理教授

一.中英文摘要

環境荷爾蒙為近年來許多環境學者相當關切之環保問題。這些具有類似生物體內荷爾蒙作用之化學物質可能經由改變內分泌系統平衡而造成人類健康及生態危害。許多研究顯示一般家庭污水及事業廢水可能具仿雌激素之作用並可影響暴露魚類之正常生殖、發育及行為。然而,針對環境荷爾蒙物質對魚類之作用,目前雖有水中生物測試方法,但往往費時、費工。因此本計畫最主要目的是使用已開發的快速檢驗組來測試環境荷爾蒙物質對魚體的影響,以瞭解其可行性為何?

此快速方法是利用青將魚體內卵黃蛋白先質受雌激素物質誘導的特性,以不同業者所開發出的酵素免疫法 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)來檢測此類蛋白質在雄魚體內的含量。本計畫結果顯示兩種不同來源的檢測組皆有良好的檢量線關係,而所測試的青將魚肝臟細胞質液樣本所得的結果也相近,顯示此兩組檢測組具相當的準確度及可靠度,可考慮做為未來相關生物檢測工作的主要工具。

關鍵字: 環境荷爾蒙、青將魚、卵黃蛋白先質、酵素免疫法

Abstract

Endocrine disrupting compounds (EDCs) are of major concern by environmentalists in recent years due to their potential to alter endocrine systems in human or wildlife leading to

reproductive or developmental dysfunction and sequentially ecological damages. Studies showed that different effluents, such as discharges from municipal wastewater treatment plants, were also estrogenic to exposed fish resulted in reproductive, developmental, or behavior alterations. Although at the present, there is chronic or sub-chronic toxicity test suitable for fish in detecting EDCs in the water system, these protocols are either expensive or labor intensive, or both. This study was to test two bio-analytical kits developed by two companies for determination of effects of these chemicals on Japanese medaka (*Oryzias latipes*), and to evaluate their applicability of both products.

The bio-analytical screening kit is using vitellogenin, a inducible protein by environmental estrogens, as the ligand for ELISA assay. Results showed that these two kits could establish good antigen concentration dependent relationship. After quantification, VTG concentrations in the fish serum samples using two kits were similar. This indicates accuracy and reliability of the products. These two kits can be considered as a bio-analytical tool for future works.

Keywords: Environmental Hormones, Japanese medaka, vitellogenin, ELISA

二.緣由與目的

環境荷爾蒙為近年來許多環境學者相當關切之環保問題。這些具有類似生物體內荷爾蒙作用之化學物質可能經由改變內分泌系統平衡而造成人

類健康及生態危害。許多研究顯示一般家庭污水及事業廢水如紙漿/造紙廠排放水亦具仿雌激素作用並可影響暴露魚類之正常生殖、發育及行為。然而，針對環境荷爾蒙物質對魚類之作用，雖然已有許多以發展出的水中生物測試方法，但大多費時、費工。這些方法有由經濟合作開發組織 (Organization for Economic Development and Cooperation, OECD) 的幼期發展階段(early-life-stage, ELS) 毒性試驗之標準方法(OECD, 1992)。此法觀察之毒性終點包括:存活率、孵化率、異常發育及行為、體重或長度差異等，但僅能顯示出內分泌干擾物對魚卵或幼魚(larval)發育之影響卻無法提供有關性別或性徵發展及生殖能力等受損之相關訊息。另外，USEPA(1986)亦曾提出淡水之北美鰱魚及鹹水鰱魚(sheephead minnow, *Cyprinodon variegatus*)之全生命周期毒性試驗之標準方法，主要觀察的毒性終點包括整體生殖能力之表現(如產卵力、成熟時間等)。Patyna 等人(1999)曾提出青將魚的多世代及多終點的毒性測試方法，其可涵蓋生化、生理、組織及系統功能(生殖能力)等各方面的作用，似為近年來較有可能成為不同研究機構所採用做為評估環境荷爾蒙對水中魚類影響的測試方法。然而，其應用於田野的調查則仍相當有限。在這些方法當中，有使用卵黃先驅蛋白作為觀察的生物指標。

卵黃蛋白先質(vitellogenin, VTG)為雌魚體內受雌激素作用後所產生的蛋白質。一旦在肝臟被製造出後，VTG 將被運送至卵巢並被分解為卵黃。雄魚體內由於僅有極為微量的雌激素，因此其應不具有卵黃蛋白先質於其體內。許多文獻皆指出暴露於環境荷爾蒙物質能導致雄魚體內卵黃蛋白先質的發生並被檢測出。Purdom 等人(1994)將未成熟之彩虹鱒(*Oncorhynchus mykiss*)及鯉魚(*Cyprinus carpio*)置於都市廢水處

理廠廢水排放口之箱網中，並發現其體內之卵黃蛋白先質(VTG)被明顯的提高。另外，Lye 等人(1997)採自英國北方海域水體之鰈魚(flounder, *Platichthys flesus*)，其雄魚體內之 VTG 及肝臟體重比(hepatosomatic index, HSI)皆明顯提升且有異常發育之精巢，而此海域即為都市廢水之承受水體。Harries 等人(1996)亦指出置於都市廢水處理廠排放水下游之箱網中養殖三周的彩虹鱒體內 VTG 同樣有升高之現象。而都市廢水中所含之 alkylphenol ethoxylates 及其衍生物則被認為是對魚類產生微弱雌激素作用之主要化合物(Jobling and Sumpter, 1993)。因此，VTG 的誘導可做為魚類暴露於環境雌激素物質的生物指標。本計畫主要是以生物技術業者所開發出的快速生物蛋白質檢測組來分析青將魚肝臟細胞所分離出的 VTG 含量，並比較不同品牌(Biosense 與 Transgenic Inc.)的差異，以及與傳統的西方點墨法所得之結果進行比對。

本計畫將青將魚(原計畫使用吳郭魚，但應無相對應的 ELISA 檢測組而改用青將魚)連續暴露於 nonylphenol 與 bisphenol-A 中共計有 30 天，然後取其肝臟細胞加以分析。前述的快速檢測組是以 ELISA(酵素連結免疫吸附法, enzyme-linked immunosorbent assay)為其原理，方法與步驟簡述如下：先將樣本(經離心後的肝臟細胞質液)以被覆液(coating solution)稀釋，再分量注於 96 槽培養盤中，於 4°C 中隔夜培養後，再以含 50%的 Tween20 清洗液沖洗三遍，加入 200μL 的 blocking buffer 並於室溫培養 30 分鐘，再以清洗液沖洗三遍。加入 VTG 抗體後，於 37°C 中培養 2 小時。再以 200μL 清洗液沖洗三遍，並加入二次抗體(Goat anti-mouse IgG 及 Horseradish Peroxidase Conjugate)緩衝液，於 37°C 中培養 2 小時。以 200μL 清洗液沖洗

五遍，加入 100 μ L 的 OPD-peroxidase substrate 溶液，並於室溫培養 15~30 分鐘。最後加入 50 μ L 的 4N H₂SO₄ 以停止反應，並於波長 492 nm 的 ELISA 讀取機中讀取吸光值並以標準品(純化的青將魚 VTG)定量。另外，西方點墨法是依據 Patyna 已發表之文獻報告 (Patyna et al., 1999)，方法簡述如下：肝細胞細胞質液以 SDS-PAGE(7.25%) 將其所含之蛋白質分離。經轉移至 nitrocellulose 模片後，陸續以主要 (mouse anti-VTG) 及次要 (Goat anti-mouse IgG 及 Horseradish Peroxidase Conjugate) 抗體使其結合，並以 streptavidin-biotinylated alkaline phosphatase complex 使其顯色。

三.結果與討論

1.西方點墨法

青將魚 VTG 誘導實驗共測試了 2 種化合物，分別為 nonylphenol (NP) 與 bisphenol-A。圖一與二為青將魚肝臟中 VTG 含量的表現。對照組與各暴露組之雄魚對 nonylphenol 皆無 VTG 的反應(圖一)。對照組雌魚有微量的 VTG，但 nonylphenol 暴露濃度為 0.1ppb 者並沒有測出 VTG；而暴露在濃度 1 ppb 10 ppb 50 ppb 者皆有 VTG 的反應，且有明顯之劑量與反應關係。暴露於不同濃度 bisphenol-A 之雄魚並未如預期的有被誘導的現象發生(圖二)，此結果與 nonylphenol 相似。

2.ELISA

我們以挪威 Biosense 以及日本 Transgenic 公司的 ELISA kit 檢測暴露於 nonylphenol 雌魚體內的 VTG。兩組檢測組的檢量線如圖三與圖四所示，皆有相當好的線性關係。經檢量線推估所求得不同暴露組的 VTG 含量如表一所示，其中兩公司檢測組的分析結果相似，僅有在較高濃度時有較明顯的差異。由本實驗結果可知此兩產品

皆有極佳的準確度及可靠度，而在操作及使用上皆相當快速及簡易。因此，若能善加利用此類產品，並多應用於實際的田野工作上，在未來對相關評估調查工作上的進行將有莫大的助益，不僅能降低分析成本、檢測時間，並能兼顧環境分析所需的精準度以及對低濃度樣本的敏感度。

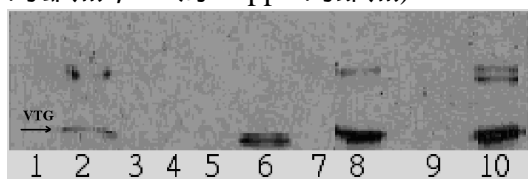
四.參考文獻

- Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Routledge EJ, Ryecroft R, Sumpter JP, Tyloe T. 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:1993-2002.
- Jobling S and Sumpter JP. 1993. Detergent components in sewage effluents are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 27:361-372.
- Lye CM, Frid CLJ, Gill ME, McCormick D. 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Mar. Pollut Bull.* 34:34-41.
- OECD, Organization for Economic Development and Cooperation. 1992. Fish, early-life stage toxicity test. Organization for Economic Development and Cooperation, Guideline for testing of chemicals No.210. Paris France: OECD.
- Patyna PJ, Davi RA, Parkerton TF, Brown RP, Cooper KR. 1999. A proposed multigeneration protocol for Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors. *Sci Total Environ.* 233:211-220.
- Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Eco.*

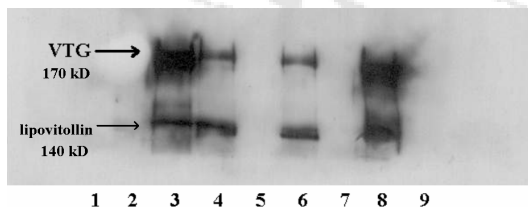
8:275-285.
USEPA, US Environmental Protection Agency. 1986. Fish life-cycle

toxicity tests. USEPA Standard Evaluation Procedure. EPA 540/9-86-137.

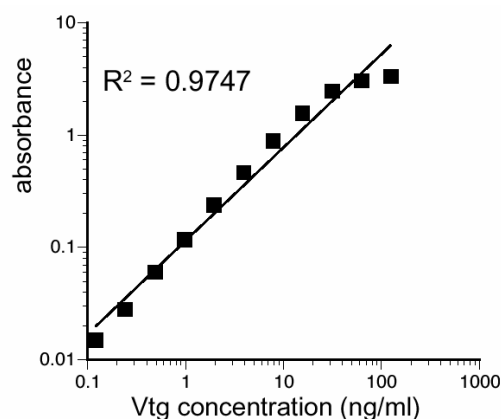
圖一. 暴露於 nonylphenol 之青鯊魚肝臟內 VTG 的表現(1 為對照組雄魚, 2 為對照組雌魚, 3 為 0.1ppb 的雄魚, 4 為 0.1ppb 的雌魚, 5 為 1 ppb 的雄魚, 6 為 1 ppb 的雌魚, 7 為 10ppb 的雄魚, 8 為 10ppb 的雌魚, 9 為 50ppb 的雄魚, 10 為 50ppb 的雌魚)



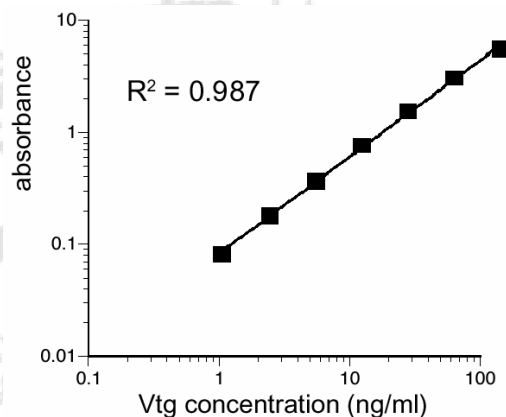
圖二. 暴露於 bisphenol-A 之青鯊魚肝臟內 VTG 的表現(1 為 marker, 2 為對照組雄魚, 3 為對照組雌魚, 4 為暴露在濃度 0.005 ppb 的雌魚, 5 為暴露在劑量 0.005 ppb 的雄魚, 6 為暴露在劑量 0.1 ppb 的雌魚, 7 為暴露在劑量 0.1 ppb 的雄魚, 8 為暴露在劑量 5 ppb 的雌魚, 9 為暴露在劑量 5ppb 的雄魚)



圖三. Biosense ELISA kit 標準品檢量線



圖四. Transgenic ELISA kit 標準品檢量線



表一、以 Biosense 與 Transgenic 檢測組所測之青將魚肝臟中所含 VTG 含量

Bisphenol-A 濃度(μg/l)	Biosense (ng/ml)	Transgenic (ng/ml)
對照組	7.9	16.3
0.1	4.3	8.9
1	25.8	25.6
10	53.5	77.4
50	126.2	150.9