

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 *
* : 銅離子對細胞發育的影響-以斑馬魚色素生成為指標 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生：張岱琪
學生計畫編號：NSC 97-2815-C-040-020-B
研究期間：97年07月01日至98年02月28日止，計8個月
指導教授：蔡淦仁

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

中華民國

98年05月31日

一、介紹

銅離子的生理角色

銅離子是執行正常生理功能的必需微量元素，在生物體內，某些微量元素構成了酵素的活性中心外另外某些金屬離子可作為酵素的輔因子；銅離子在細胞中對於發育、生長等等，皆有重要影響，在生物體內扮演功能，影響的層面包含呼吸鏈、神經傳導物質的合成、鐵的代謝等等諸多步驟，過多的銅離子會在細胞內形成自由基，對細胞造成毒性；銅離子過少則會使許多酵素喪失應有的功能，所以銅離子在體內平衡必須要有嚴謹的調控機制，其主要是由一群代謝銅離子的蛋白所負責，其中最重要的運輸者-ATP7A 及 ATP7B，對銅離子在細胞中的平衡扮演相當重要的角色^[1]。

銅離子參與黑色素生成

生物體內黑色素的生成是由酪胺酸酶(Tyrosinase)來控制，而酪胺酸酶是一種需要銅離子來當作輔因子的一種酵素，缺乏銅離子後酪胺酸酶將會失去應有的活性，導致個體皮膚、眼睛皆黑色素的形成異常。

銅離子透過 ATP7A 影響酪胺酸酶參與黑色素的形成

ATP7A蛋白是負責體內銅離子平衡的蛋白，當ATP7A蛋白有缺陷時，體內許多需銅酵素因為沒有銅離子作為酵素的活性中心而失去功能，酪胺酸酶就是眾多需銅酵素的其中一種，當酪胺酸酶缺乏銅

時，生物體外觀就會呈現色素生成異常，黑色素在體內對視神經發育的角色尤其重要，在脊椎動物胚胎發育中神經脊細胞會沿著背部神經管出現，分佈到整個軀體和分化成各種不同的細胞，包含感官細胞、交感神經細胞、許旺細胞、及色素細胞^{[2][3][4]}；而在視神經發育上，早期RPE細胞中的黑色素會帶領視神經走向正確的路徑，其中特別表現在RPE細胞中的RPE65a蛋白缺失時會對視覺上造成嚴重損傷，使11-cis-retinal缺乏無法再傳遞給視椎細胞，後續的生化路徑因此而停止^[5]。

ATP7A 蛋白平時落座在 transGolgi network (TGN) 上，參與銅離子運送，負責體內銅離子的恒定；文獻推測當酪胺酸酶由 ER 送往高基氏體時，在高基氏體上 ATP7A 蛋白接收銅離子之後，ATP7A 蛋白會將銅離子運送給酪胺酸酶，這時後酪胺酸酶就會形成具有完整功能的全酶^[6]，酪胺酸酶再輸送往需要作用的地方，特別是參與體內黑色素形成。

在哺乳類動物中的色素系統，有很多不同的功能，例如它可以保護動物免於紫外線傷害、在物種間也可用來吸引異性、在細胞內又可以用來清除自由基還有作為一些代謝的中間物，以及參與發育的過程。人體內的色素細胞分布在毛囊、眼球及皮膚，影響色素細胞的功能又由酪胺酸酶的活性來決定，黑色素的形成是由酪胺酸作為原料，

以酪胺酸酶催化黑色素的前兩個步驟，進而形成黑色素，而酪胺酸酶作用在催化羥化反應使酪胺酸形 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)、催化氧化反應使 DOPA 形成 dopaquinone (此反應在較低的合成速率下，可自發性的進行)以及 5,6-dihydroxyindole 形成 indole-5,6-quinone 三個反應，參予黑色素的生成(附圖一)^[7]。

控制色素細胞基因表現的一些機制，物種從魚到哺乳類動物都有高度的保留性，酪胺酸酶最主要表現在兩種細胞，第一種是黑色素細胞(melanocytes)，由神經脊細胞(neural crest cell)發育而來經由遷移，最後分佈到虹膜、耳蝸、皮膚、脈絡膜；另一種是 RPE 細胞(retinal pigment epithelium cells)，衍生自視杯(optic cup)。在缺乏黑色素的個體中，眼睛發育的部分有兩個現象，第一，在視網膜上中央凹的部份(這個地方是視覺最敏銳的部份，也是視像交點處)，這一層細胞會變薄^[8]，原因是因為在視網膜上神經節細胞數量有明顯的降低而導致；第二，視網膜上的光接收器視桿細胞的數量會降低百分之三十^[9]。文獻中指出，在白化的動物當中視網膜的神經發育，細胞週期會改變，短暫的使細胞增生後再增加細胞凋亡的數量，導致這些視桿細胞的缺乏^{[10][11]}。視覺上適應光線的能力，也就是視桿細胞及視椎細胞之間的轉換，是由酪胺酸酶作為主角，在斑馬魚中將轉錄轉譯成酪胺酸酶的基因，sdy，做突變後對光線的適應力會下降，原因包含視桿細胞

缺乏、缺乏中央凹及視覺路徑被擾亂^[12]。

酪胺酸酶對視覺上潛在的影響

在文獻中指出，干擾黑色素的生成，也意味著許多色素異常的現象也會跟著產生，例如白化症。有趣的是這些現象也伴隨著視覺上有劇烈的變化，兩眼的視覺出現斜視、懼光及眼球震顫等症狀。在白化症患者中，視覺傳遞的神經纖維由眼睛到大腦的部份排列錯亂，所以視覺的能力遭受的嚴重的損傷，而 RPE 細胞又參與視交叉發育過程^{[13][14][15]}，在 RPE 細胞中的黑色素是否扮演決定的角色？由於這些文獻提供的線索，所以推測酪胺酸酶可能參與視覺發育的要角。

研究目的

銅離子對胚胎發育的影響在過去一直都沒有被探討過，因為過去缺乏一個很好的研究模型。在最近的研究中，發現人類胎盤是少數含有運輸銅的蛋白 ATP7A 及 ATP7B 的組織之一^[16]，表示這兩個基因以及銅離子可能對胚胎發育扮演著極重要的角色。在 2006 年的文獻中也發現，在胚胎培養的水中加入銅離子螯合劑，會造成胚胎發育異常，包括神經發育異常、色素形成異常、及血管生成異常等缺陷^[17]，這也說明了銅離子對細胞發育的重要性。

二、材料與方法

斑馬魚之飼養與胚胎操作

A. 斑馬魚(*Danio rerio*)之飼養

野生型斑馬魚(AB strain)，飼養於 28.5°C 恆溫系統中，日夜週期為光週期 14 小時與暗週期 10 小時，並以適量的豐年蝦與人工飼料餵食。

Morpholino microinjection

A. Morpholino 之配製

1. 300 nmole powder 以 ddH₂O 回溶成 10mM stock，儲存於-80°C。
2. 使用前先以 Danieau solution 稀釋成 2mM，再配成不同濃度注射。
3. 注射時期為胚胎受精後 1-2cell 時期，注射體積為 2.3µl/embryo，

注射濃度分別為 0.5(~4ng)、1(~8ng)、2(~16ng)pmole/embryo。

0.5pmole/2.3µl: 2mM MO 1µl + Danieau solution (含 phenol red) 8.2µl

1pmole/2.3µl: 2 mM MO 2µl + Danieau solution 6.28µl + 10X phenol red 0.92µl

2pmole/2.3µl: 2 mM MO 4µl + Danieau solution 4.28µl + 10X phenol red 0.92µl

B. Morpholino 之顯微注射

利用顯微注射器(Drummondsci, Nanoject II)先將 MO 吸入毛細管中，

再注射至 1~2cell 時期胚胎之卵黃內。

Danieau solution: 58mM NaCl、0.7mM KCl、0.4mM MgSO₄、0.6mM Ca(NO₃)₂、5mM HEPES，pH 7.6。

RNA 製備(TRI Reagent)

前置作業: 將已滅菌研鉢用鋁箔紙包好，放入 80°C 冰箱 over night

A. Homogenization: 將研鉢取出去除鋁箔紙，加入液態氮及魚體，將魚搗碎後加入 1ml TRI reagent，溶解後放室溫 5 分鐘，離心 4°C 12,000g 10min，取上清液到新的微量離心管。

B. RNA extraction: 每 1 ml TRI reagent 加入 100µl BCP，均勻混合，放室溫 5-15 分鐘，離心 4°C 12,000g 10-15min <100µl BCP 可用 200µl 的 chloroform (不包含 isoamyl alcohol) 代替 BCP>。

C. RNA precipitation and wash: 每 1ml TRI reagent，加入 500µl isopropanol，vortex 5-10 sec，室溫放 5-10 min，離心 4-25°C 12,000g 8min，去掉上清液，加入 1ml 75% ethanol，離心 7,500g 5min，ethanol 去除，RNA pellet air dry，用所選擇的 buffer 溶解 RNA 即可。

RT-PCR (ImProm-IITM Reverse Transcription System)

A. Target RNA and primer combination and denaturation: 取上述抽取的 RNA 1µg，加入 1µl primer Oligo dT (0.5µg/reaction)，1µl random

primer(0.5µg/reaction) , nuclease-free water 補到 5µl , 將 tube 以 70°C 反應 , 5min 。

B. reverse transcription: ImProm-IITM5X reaction buffer 4µl , MgCl₂ 1.2-6.4µl , dNTP mix 1µl , Recombination RNasin Ribonuclease Inhibitor 20u , ImProm-IITM Reverse Transcriptase 1µl , nuclease-free water 把水加到 15 µl , total 20µl , 42°C 1hr 。

C. 進行 PCR 反應

取 1µL DNA 加入 2µL 的 2.5mM dNTP mixture , 再加入 2.5µL 10X Taq DNA polymerase buffer 、 及 10pmole primer , 2.5 unit Taq DNA polymerase 加入無菌的去離子水 , 使達到總體積 25µL 。 置於 MJ Research PTC 200 Thermal Cycler 進行聚合酶連鎖反應反應條件為使模板 DNA 變性條件 94°C 10 分鐘 , 再以 94°C 1 分鐘 , 54°C 30 秒(根據引子所含 GC 數不同調整溫度設定) , 及 72°C 1 分鐘 30 秒(根據所要產生片段大小不同調整時間)重複約 35 循環的條件 , 最後 72°C 7 分中延伸 DNA 使反應完成 , 將 PCR 最終產物保存於 4°C 。

Real-time PCR

定量 PCR 是使用 StepOne™ Real-Time PCR 系統 (Applied Biosystem) 以及 Fast SYBR Green Matrix Mix (Applied Biosystem) 。 引子序列由 Applied Biosystem Primer Express 3.0 設計而得 。 將所有材料混合均勻

後，設定步驟為(1)酵素活化，95°C 20 秒，(2) denature 及 anneal/extension，95°C 3 秒，60°C 30 秒此步驟重複 40 個循環。相較於 GAPDH 去偵測 Ct (threshold cycle)，來決定表現量為何。

DNA 電泳

為了進一步確認是否成功獲得 PCR 產物，利用洋菜膠體電泳分析記錄(agarose gel-electrophoresis)，也就是使用 1%(w/v)的洋菜膠(內含 0.5x TBE buffer)放置水平電泳槽中 (Mupid-II,Cosmo Bio Co.,Ltd)，在將部份 PCR 產物與 DNA 染劑作混合，將此混合物與含不同 DNA 片段大小的 DNA marker 分別放進洋菜膠上的 well 並通入電流(電壓約 100 伏特)，使 PCR 的 DNA 產物從負電極向正電極移動，於電泳結束後將洋菜膠放置 EtBr (Ethidium bromide)染色數分鐘，再將洋菜膠利用以數位影像擷取系統分析(Digital Image Analyzer, AlphaImager 2200) 拍照紀錄，調整拍照膠上產生螢光的 DNA 染色帶，並比較 DNA marker 中不同大小的 DNA 片段，確認 PCR 產物的 DNA 大小是否與預期相同。

第三章、實驗結果

一、斑馬魚胚胎型態觀察- 觀察注射 ATP7A MO 及生長在加了銅離子螯合劑培養液之斑馬魚胚胎發育型態之影響

比較 (1)野生型 (2)ATP7A 基因廢止 (3)生長於加了銅離子螯合劑(neocuproine) (4)及生長在加了銅離子螯合劑，再加入銅離子之斑馬魚胚胎，觀察這些斑馬魚在受精後 48 小時後，外觀上的差異。

(1) 野生型:

以野生型在受精後 48 小時來比對其他實驗組，觀察魚體上外觀有無任何差異，野生型黑色素生成在受精後 24-28 小時即會開始慢慢的呈現在魚體上，在顯微鏡底下可以很容易就觀察的到(如圖二 A) ，黑色素分佈最明顯的部位是在眼睛，在 48 小時除了眼睛佈滿黑色外，在胚胎身體其他部位有零星的黑色素生成，主要分佈在卵黃、背部、及沿著脊索是較較密集的部位；眼睛部份的外觀上佈滿黑色素，拍照時眼睛部份可以局部透光 (如圖二 E)。

(2) ATP7A 基因廢止後對斑馬魚胚胎色素型態的影響

注射了 4ng ATP7A-MO 基因廢止之斑馬魚相對於野生型，在受精後 48 小時黑色素還尚未生成，顯微鏡底下魚體外觀上沒有任何黑色素可供觀察，魚體發育也較野生型生長緩慢；相較於野生型，眼睛部

份完全沒有任何黑色素的生成。

(3) 觀察生長於加了銅離子螯合劑(neocuproine)之斑馬魚胚胎，色素形成差異

生長於 500nM neocuproine 的斑馬魚胚胎，相對於野生型，在受精後 48 小時黑色素在身體部份還未看到有任何黑色素生成，生長發育方面則無明顯的影響(如圖二 C)；相較於野生型，眼睛部份黑色素形成只有點狀的分布，黑色素生成大量降低(如圖二 G)。

(4) 觀察生長於加了銅離子螯合劑(neocuproine)，再加入銅離子予其中之斑馬魚胚胎型態變化

相對於生長於加了 500nM neocuproine 的斑馬魚胚胎，在加入 25 μ M CuCl₂ 後發現大約有九成的胚胎黑色素的分布有恢復的情況，身體部份的黑色素分布明顯密集許多(如圖二 D)；相較於生長在加了銅離子螯合劑的胚胎，恢復色素形成後的斑馬魚眼睛部份的黑色素在外觀上會與野生型較相似(如圖二 H)。

二、比較 ATP7A 基因廢止及加入銅離子螯合劑至胚胎培養液後，對斑馬魚胚胎酪氨酸酶(Tyrosinase) mRNA 表現量的影響

酪氨酸酶(Tyrosinase)是一種需要銅離子做輔因子的酵素，缺乏了

銅離子，酪氨酸酶的活性也會跟著喪失。根據 2000 年文獻中顯示，在缺乏 ATP7A 蛋白的細胞株中，酪氨酸酶蛋白的表現不會受到抑制，但是酪氨酸酶的活性卻會喪失^[6]。一開始探討銅離子對生物體發育的影響時，觀察 ATP7A 基因廢止後魚體的外觀與一般 WT 的魚做比較，明顯發現黑色素的形成被抑制了，而酪氨酸酶是生物體合成黑色素的關鍵酵素，圖四中顯示，收集 48 小時受精後斑馬魚胚胎，利用定量 PCR 比較野生型和 ATP7A 廢止以及加入銅離子螯合劑這三組魚卵，去偵測酪氨酸酶 mRNA 的表現量是否具有受到影響，以釐清銅離子、ATP7A 如何調控黑色素生成路徑。圖四中明顯顯示這三組的表現量只有些微的浮動並沒有顯著的差異，可知 ATP7A 及銅離子並不影響斑馬魚胚胎酪氨酸酶(Tyrosinase) 的 mRNA 表現。根據先前文獻中提到 ATP7A 蛋白影響色素生成路徑，但不透過影響酪氨酸酶基因轉錄，可能是透過影響酵素活性而造成，推測在我們的實驗結果，可能也是相同路徑^[6]。

三、比較 ATP7A 及銅離子螯合劑對斑馬魚胚胎 tyrosinase related protein-1b mRNA 表現量的影響

Tyrosinase related protein-1b 作用主要影響在黑色素生成路徑的下游部分，影響部分黑色素生成。圖五中顯示，收集 48 小時受精後斑馬魚魚卵，利用定量 PCR 比較野生型和 ATP7A 基因廢止以及加入

銅離子螯合劑這三組魚卵，去偵測 Tyrosinase related protein-1b mRNA 表現量有無顯著的差異。結果顯示這三組表現量相近，並無明顯的差異。

四、比較 ATP7A 及銅離子螯合劑對斑馬魚胚胎 RPE65a mRNA 表現量的影響

RPE 細胞(retinal pigment epithelium cell)中表現的 RPE65a 蛋白主要作用於視覺上，其中在 RPE 細胞中黑色素的表現會影響視神經發育，缺失時在發育階段的視神經走向會錯亂。圖六比較收集 48 小時受精後斑馬魚魚卵，利用定量 PCR 比較野生型和 ATP7A 基因廢止以及加入銅離子螯合劑這三組魚卵，去偵測 RPE65a mRNA 的表現量是否具有差異，以釐清銅離子及 ATP7A 在這過程中所扮演的角色，結果顯示 ATP7A 基因抑制及銅離子缺乏造成斑馬魚胚胎 RPE65a mRNA 表現量明顯下降；圖六顯示注射 ATP7A MO 與野生型斑馬魚胚胎比較後 RPE65a mRNA 表現量下降約一半，而加入銅離子螯合劑與野生型斑馬魚胚胎下降的更為顯著，RPE65a mRNA 表現量下降約 75%。

第四章、討論

ATP7A 蛋白是維持體內銅離子平衡的重要蛋白之一，當 ATP7A 蛋白功能喪失的時候，體內銅離子在大部份組織中會缺乏，進一步造成體內許多需銅酵素也失去功能，這些需銅酵素喪失後引發的症狀就是 Menkes disease 的症狀，而酪胺酸酶是需銅酵素的其中一種，酪氨酸酶是體內合成黑色素的關鍵酵素，缺乏時將導致黑色素無法合成，反映出的個體表徵就是黑色素生成異常，Menkes disease 患者皮膚表面有不正常的色素斑。有了這樣的動機之後，進一步去探討 ATP7A 蛋白對酪胺酸酶的表現影響為何，而結果顯示將斑馬魚魚卵在一個細胞期時，用 ATP7A MO knockdown 之後，發育 48 小時後收集起來去偵測，圖四結果顯示與野生型斑馬魚胚胎做比較，ATP7A 基因對酪胺酸酶 mRNA 的表現量並沒有明顯的差異，比較文獻中顯示分別去偵測 ATP7A 蛋白對酪胺酸酶蛋白表現以及偵測酪胺酸酶活性後發現 MNK 蛋白並不會影響酪胺酸酶表現，反而是影響到酪胺酸酶的活性，文獻中與實驗結果是相符合的。

酪胺酸酶是一種需銅蛋白，它需要銅離子來當作酵素的輔因子，然而當失去銅離子會導致酪胺酸酶的活性消失，圖二 D、H 身體眼睛顯示在斑馬魚胚胎生長的水中加入銅離子螯合劑後，魚體的表徵也有白化的現象，同樣的將斑馬魚魚卵培養在加有銅離子螯合劑的水中，

發育 48 小時後收集起來去偵測酪胺酸酶 mRNA 的表現量，結果顯示與野生型斑馬魚胚胎做比較，經由銅離子螯合劑處理後的魚卵在酪胺酸酶 mRNA 的表現量與野生型的表現像並無明顯的差異，根據結果顯示可以推論銅離子是可能是透過影響酪胺酸酶的活性進而影響黑色素生成，而非透過影響酪胺酸酶蛋白生成。

二、銅離子透過影響 RPE65a，在視覺發育上扮演潛在的角色

人體內的色素細胞分布在毛囊、眼球及皮膚，影響色素細胞的功能又由酪胺酸酶的活性來決定。RPE 細胞中的黑色素不論是在成熟個體或者在個體發育時皆是對正常視覺發育的關鍵。RPE 細胞在視覺發育過程中會帶領視神經在視交叉形成時走向正確的路徑，而 RPE 細胞中的黑色素更是重要的主角。另外在 RPE 細胞作用時，會先由微血管內 Vitamin A(all-trans-retinol) 經由擴散到 RPE 細胞中，經由酵素 LRAT(lecithin retinol acyltransferase) 轉換成 all-trans-retinyl ester 再藉由 retinol dehydrogenase 以及 RPE65 催化形成 11-cis-retinal 最後運送給視椎細胞，當 RPE65 蛋白表現量降低，無法轉換成 11-cis-retinal 視覺就會受到影響。圖六中結果，比較野生型及 ATP7A MO knockdown 和加入銅離子螯合劑的 48 小時斑馬魚魚卵 mRNA 表現量

分析，顯示 ATP7A 基因抑制及銅離子缺乏，造成斑馬魚 RPE65a 的 mRNA 表現量下降，圖中注射 ATP7A MO knockdown 和野生型比較，RPE65a mRNA 表現量下降約一半；而加入銅離子螯合劑與野生型斑馬魚胚胎比較，下降量更降低 75%，顯示了銅離子在視覺發育上參與某些過程。

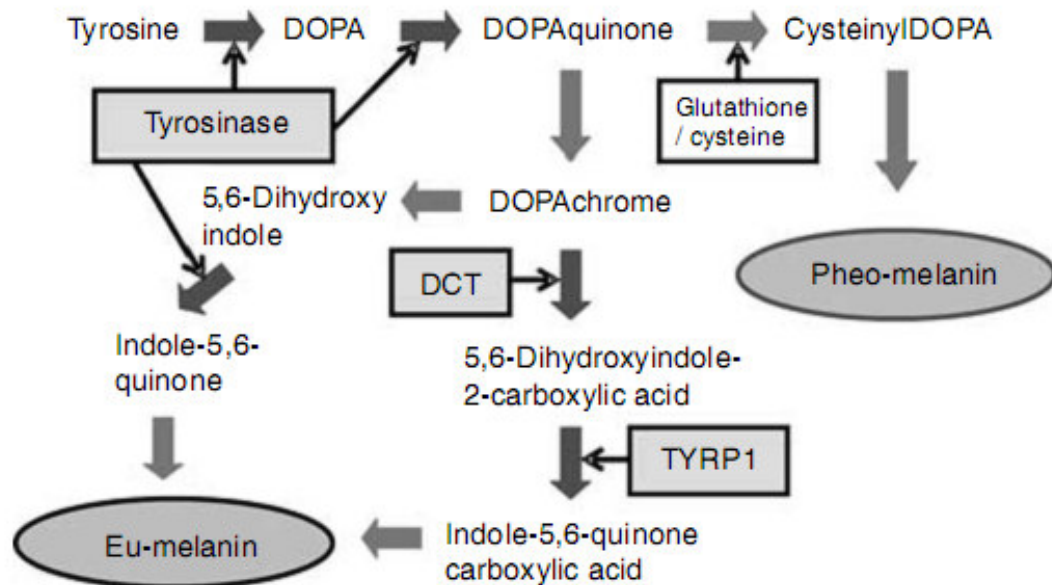
五、未來展望

銅離子對細胞發育影響的層面極廣，包括神經、造血、結締組織、色素形成等等，本篇文章只是探討其中的一小部份-對細胞黑色素形成的機制，以酪胺酸酶為主角，衍生去探討影響的層面，過去的研究中發現在視神經發育過程中，黑色素會帶領視神經走向正確的路徑，其中以 RPE 細胞中黑色素含量的角色最為重要，RPE 細胞直接影響視交叉的形成，但是在白化症中黑色素生成和視覺缺陷以及 RPE 細胞之間確切的關係還不清楚，間接也可衍伸到銅離子對視覺發育的重要關聯，是未來值得探討的部分。

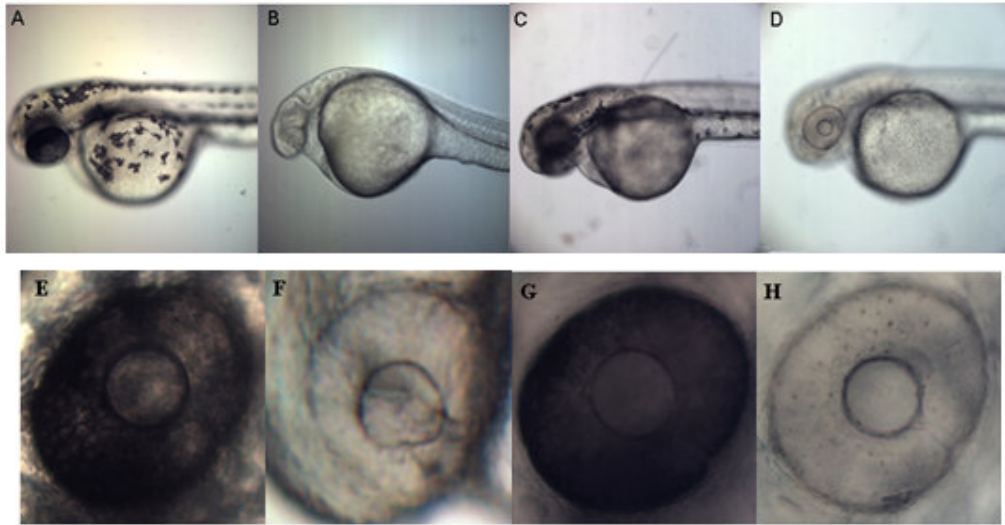
附表一:MO 及 Primer 序列

MO Name	Sequence
ATP7A-MO	5'-CAAGTCAAGCAGACCTGTTTGCAAT-3'
Primer Name	Sequence
GAPDH-Forward	5'-GGAGATCGTGGCCATCAATG-3'
GAPDH-Reverse	5'-TACTTTCCATGGGTGGAGTCGTA-3'
Tyrosinase-forward	5'-GGTGG CGGCA GGTAT CC-3'
Tyrosinase-reverse	5'-GCGAA AACCG ATGCG ATTAT-3'
Tyrosinase 1b-forward	5'-CACCG CTGCA GGGAC ACT-3'
Tyrosinase 1b-reverse	5'-TGAAC TCTCT GTTGT GCCCA AT-3'
RPE65a-forward	5'-TGGAC TGGGA CTCAA CCATT TC-3'
RPE65a-reverse	5'-AGGTC TCCTT AGTCC TCACA TTCAG-3'

附圖一:黑色素生成路徑

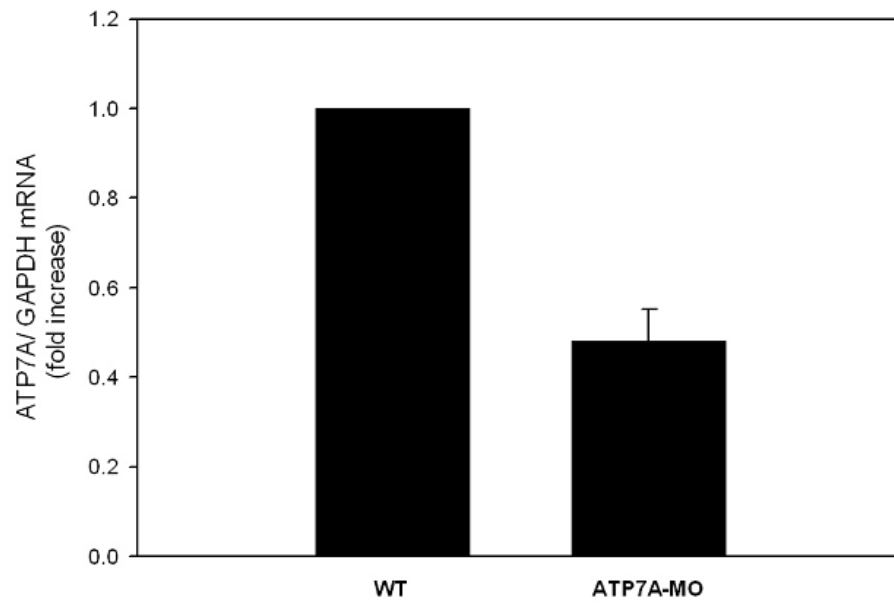


附圖二、比較受精後 48 小時之斑馬魚型態外觀



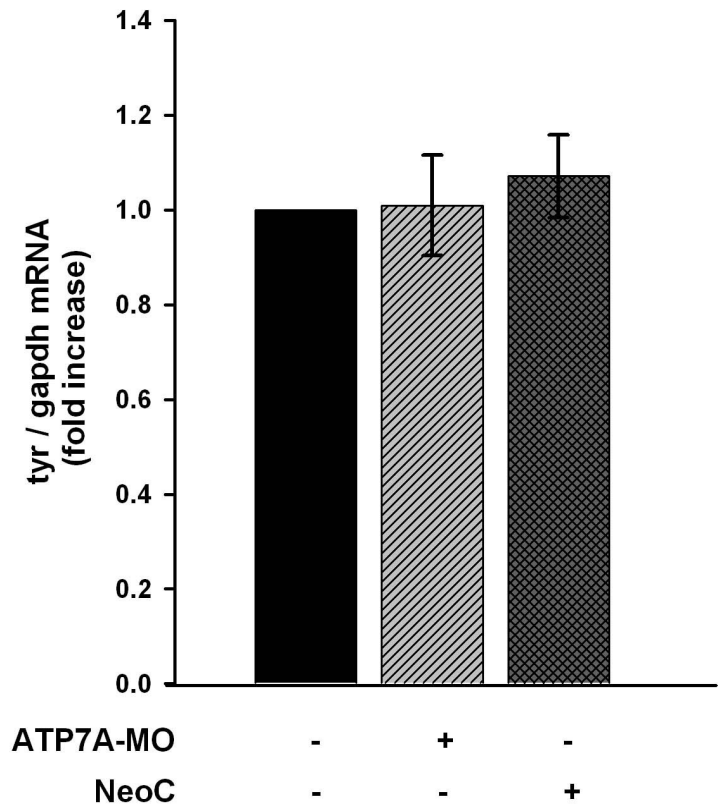
A-D 為魚體外觀的比較，E-H 則是相對於 A-D 的斑馬魚眼睛特寫；A、E 為野生型斑馬魚胚胎，黑色素生成正常；B、F 為 ATP7A 基因廢止後的型態，可發現魚體黑色素無法生成；C、G 為胚胎先生長於加入銅離子螯合劑的培養液後再加入銅離子之斑馬魚型態，比起 ATP7A 基因廢止黑色素生長回復；D、H 為斑馬魚生長於銅離子螯合劑(neocuproine)中之型態，魚體部分沒有明顯黑色素生成，但在眼睛部份有零星點狀黑色素形成。

附圖三、定量 PCR 確認 ATP7A-MO 造成 RNA 剪接異常之效果



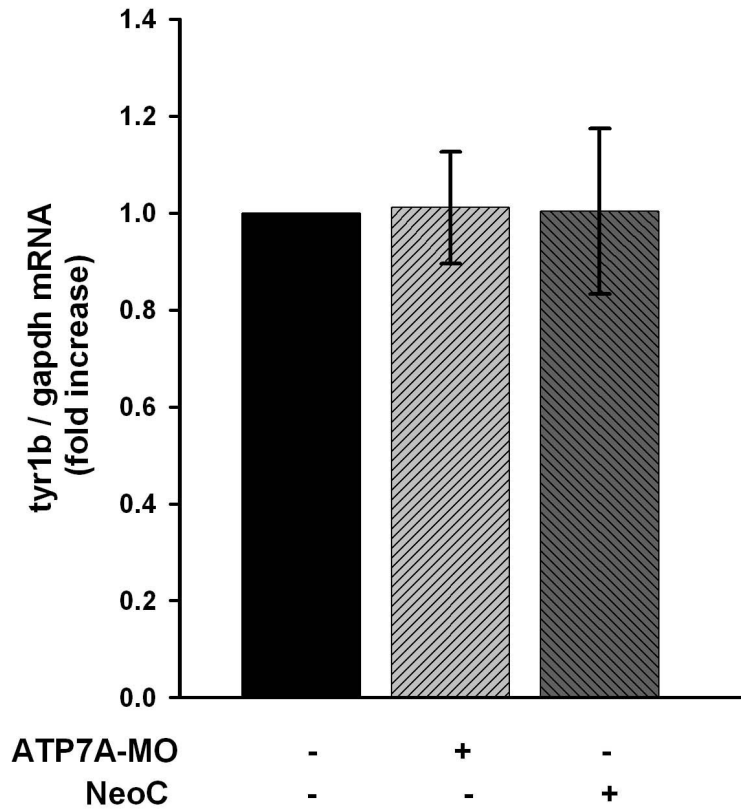
收集受精後 48 小時之斑馬魚胚胎，比較其野生型及注射 4ng 之 ATP7A-MO 後，ATP7A mRNA 表現量，明顯可見注射 ATP7A-MO 確認了 MO 之抑制效果。

附圖四、比較酪胺酸酶 mRNA 之表現量



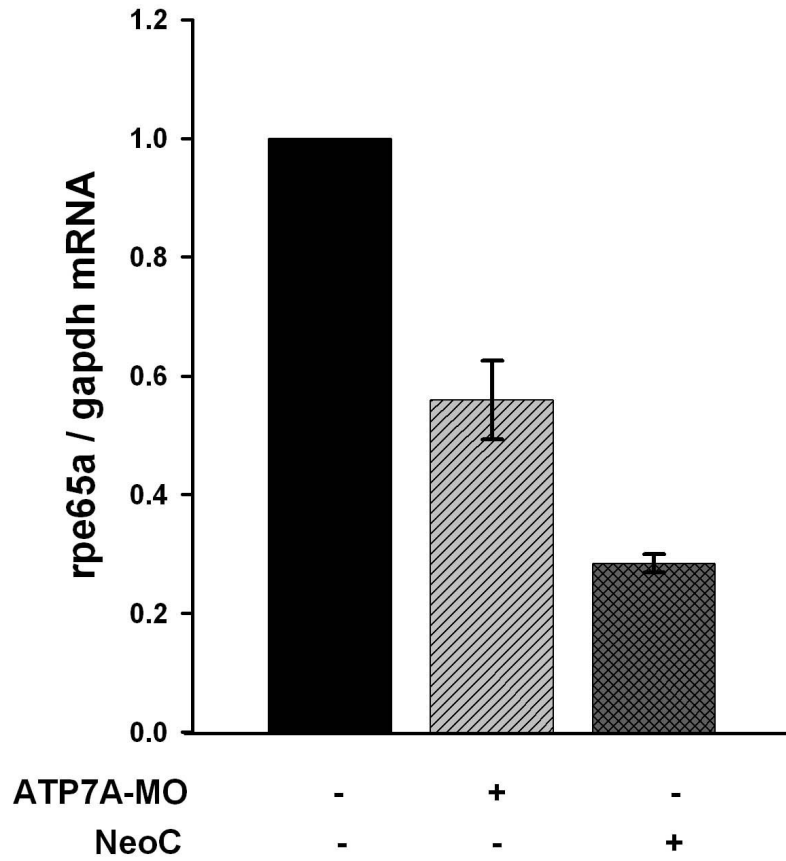
比較受精後 48 小時斑馬魚胚胎之野生型(左)、注射 ATP7A-MO 後造成的 ATP7A mRNA 剪接異常(中)及生長培養基中加入銅離子螯合劑三者之間酪胺酸酶的 mRNA 表現量相較於野生型是否具有差異，圖中顯示注射 ATP7-MO 及加了銅離子螯合劑之斑馬魚胚胎在受精後 48 小時其酪胺酸酶 mRNA 表現量並無明顯差異。

附圖五、比較 Tyrosinase related protein-1b mRNA 之表現量



比較受精後 48 小時斑馬魚胚胎之野生型(左)、注射 ATP7A-MO 後造成的 ATP7A mRNA 剪接異常(中)及生長培養基中加入銅離子螯合劑三者之間 tyrosinase related protein 1b 的 mRNA 表現量相較於野生型是否具有差異，圖中顯示注射 ATP7-MO 及加了銅離子螯合劑之斑馬魚胚胎在受精後 48 小時其酪胺酸酶 mRNA 表現量並無明顯差異。

附圖六、比較 RPE65a mRNA 之表現



比較受精後 48 小時斑馬魚胚胎之野生型(左)、注射 ATP7A-MO 後造成的 ATP7A mRNA 剪接異常(中)及生長培養基中加入銅離子螯合劑三者之間 RPE65a 的 mRNA 表現量相較於野生型是否具有差異，圖中顯示 ATP7A 基因抑制及銅離子缺乏造成斑馬魚 RPE65a mRNA 表現量下降。

参考文献

- [1] Joseph R Prohaska. (2008). "Role of copper transporters in copper homeostasis¹⁻⁴." *Am J Clin Nutr* 88(suppl):826S-9S.
- [2] Weston, J. A. (1970) *Advances in morphogenesis* 8, 41-114
- [3] Weston, J. A. (1982) *Progress in clinical and biological research* 85 Pt B, 359-379
- [4] Raible, D. W., Wood, A., Hodsdon, W., Henion, P. D., Weston, J. A., and Eisen, J. S. (1992) *Dev Dyn* 195(1), 29-42
- [5] Helia B. Schonthaler, Johanna M. Lampert, Andrea Isken, Oliver Rinner, Andreas Mader, Matthias Gesemann, Vitus Oberhauser, Marcin Golczak, Oliver Biehlmaier, Krzysztof Palczewski, Stephan C. F. Neuhauss, and Johannes von Lintig. "Evidence for RPE65-independent vision in the cone-dominated zebrafish retina"(2007). *Eur J Neurosci*,26(7): 1940±1949.
- [6] Michael J. Petris, Daniel Strausak and Julian F.B. Mercer. (2000). "The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase." *Human Molecular Genetics*, Vol.9, No.19 2845-2851.
- [7] Hideya Ando, Hirofumi Kondoh, Masamitsu Ichihashi and Vincent J. Hearing. (2007). "Approaches to Identify Inhibitors of Melanin Biosynthesis via the Quality Control of Tyrosinase." *Journal of Investigative Dermatology* 127, 751-761.
- [4] Jeffery, G., Darling, K., Whitmore, A. (1994a). Melanin and the regulation of mammalian photoreceptor topography. *Eur. J. Neurosci.* 6 (4),657-667.
- [5] Ilia, M., Jeffery, G. (2000). Retinal cell addition and rod production depend on early stages of ocular melanin synthesis. *J. Comp. Neurol.* 420 (4), 437-444.
- [6] Ilia, M., Jeffery, G. (1996). Delayed neurogenesis in the albino retina:evidence of a role for melanin in regulating the pace of cell generation.*Brain Res.* *Dev Brain Res.* 95 (2), 176-183.
- [7] Ilia, M., Jeffery, G. (1999). Retinal mitosis is regulated by dopa, a melanin,precursor that may influence the time at which cells exit the cell cycle:analysis of patterns of cell production in pigmented and albino retinae.*J. Comp. Neurol.* 405 (3), 394-405.
- [8] Patrick S Page-McCaw, S Clare Chung, Akira Muto, Tobias Roeser, Wendy Staub, Karin C Finger-Baier, Juan I Korenbrot & Herwig Baier. (2004). "Retinal network adaptation to bright light requires tyrosinase." *Nature Neuroscience* 7, 1329 - 1336.
- [9] Sanderson, K.J., Guillery, R.W., Shackelford, R.M. (1974). Congenitally abnormal visual pathways in mink (*Mustela vison*) with reduced retinal pigment. *J. Comp. Neurol.* 154 (3), 225-248.

- [10] LaVail, J.H., Nixon, R.A., Sidman, R.L. (1978). Genetic control of retinal ganglion cell projections. J. Comp. Neurol. 182 (3), 399–421.
- [11] Balkema, G.W., Drager, U.C. (1990). Origins of uncrossed retinofugal projections in normal and hypopigmented mice. Vis. Neurosci. 4 (6), 595–604.
- [16] Hardman, B., Michalczyk, A., Greenough, M., Camakaris, J., Mercer, J. F., and Ackland, M. L. (2007) The Biochemical journal 402(2), 241-250
- [17] Merchant, S. S., and Sagasti, A. (2006) Cell metabolism 4(2), 99-101