

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050015

參展科別 動物學

作品名稱 魚類在面對酸逆境下醣類的代謝差異

得獎獎項

就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學

指導教師 黃鵬鵬、蘇雨菁

作者姓名 黃景揚、余沛殷

關鍵詞 環境酸化、醣類代謝

作者簡介



我是黃景揚，是師大附中科學班的學生。平時喜歡彈鋼琴，這是個能夠讓我紓壓的活動，另外閒暇時也會寫一些程式。在專題研究中，我根據自己的興趣選擇了生物相關的主題，結合目前環境逐漸改變，以「魚類在面對酸逆境下醣類的代謝差異」為題，展開了一系列的研究活動。



我是余沛殷，是師大附中科學班的學生。因為小時候對數理方面比較有興趣，因此選擇報考並就讀科學班，在專題研究課程中，選擇自己比較有興趣的生物，結合目前全球暖化及水質酸化的議題，以「魚類在面對酸逆境下醣類的代謝差異」為題，展開了一系列的研究。

摘要

溫室氣體產生造成環境變遷，使得水質酸化，進而影響生態系統。生存在水中的魚類，為了適應水質的酸化，他們的生理上必定有一些變化。為了找出魚類適應酸化環境所做出的改變，我們選擇以斑馬魚及青鱗魚做為實驗動物以研究水質酸化對於其代謝之影響，分析其中與能量代謝及合成相關的器官，包含消耗大量能量的以維持酸鹼平衡的鰓、能量供應相關的肝臟和肌肉。綜合即時聚合酶連鎖反應及免疫螢光染色的結果，我們發現斑馬魚在面對酸性環境下時醣類代謝的情形是有改變的，肝臟內肝醣分解及糖質新生的效率提升，且鰓部位醣類代謝效率提升，推測是運送葡萄糖給鰓部位進行排酸代謝，其鰓部位細胞內的酵素也因此出現了細胞分工的現象。而青鱗魚在面對酸性環境下時，透過肝醣分解提供更多的葡萄糖進行糖解作用，同時抑制了糖質新生反應效率，推測其演化出了高效率的排酸方法。相較於斑馬魚，青鱗魚醣類代謝不會產生過多的能量，也意味著青鱗魚能量使用效率有提升。

Abstract

Climate change bothers and alters the environment, even the ecosystem. For instance, the pH value of the seawater and freshwater has been declined by acidification. To adapt the acidic stress, fishes are sure to have changes in physiology. In order to find out how do fish adjust to acidic conditions, first, we selected Zebrafish and Medaka as our experimental animals. Since we were going to ascertain the effect of an acidic environment, we chose organs that related to the synthesis and metabolism of carbohydrates, including the gill which uses a great amount of energy for acid excretion, and liver and muscle which supply glucose to the gill. According to the results of quantitative polymerase chain reaction, we recognized that zebrafish have increased the metabolic efficiency in gill, and it's trying to produce more glucose in the liver. We speculated that the gill of zebrafish needs carbohydrates, such as glucose, to generate ATP for acid excretion, and the liver produces what it needs. Through immunofluorescence staining, we discovered that there is a division of labor on the enzyme in the cell. On the other hand, medaka has a highly effective metabolic pathway. We guessed that it was the result of the evolution.

壹、前言

一、研究動機

環境酸化是目前人類面臨的一個重要的議題，因為工業活動產生過多的二氧化硫，溶在水裡使得水的酸鹼值下降，而生存在水中的生物，為了適應水質的酸化，他們的生理上必定有一些變化，而影響水中生物的生態。我們在上網搜尋相關的議題時，發現不同魚種面對酸化水質時，醣類的代謝過程會產生不同改變，因此開始了與此相關的研究。

二、研究目的

(一) 探討斑馬魚在酸性環境下，鰓部位、肝臟內及肌肉內的醣類代謝差異

- 1、探討肝醣合成及分解反應酵素的表現量
- 2、探討糖解作用酵素的表現量
- 3、探討糖質新生相關酵素的表現量
- 4、探討麩醯胺酸分解反應時酵素表現量的差異性

(二) 探討青鱗魚在酸性環境下，鰓部位、肝臟內及肌肉內的醣類代謝差異

- 1、探討肝醣合成及分解反應時酵素表現量的差異性
- 2、探討糖解作用時酵素表現量的差異性
- 3、探討糖質新生時酵素表現量的差異性
- 4、探討麩醯胺酸分解反應時酵素表現量的差異性

(三) 觀察斑馬魚及青鱗魚在酸性及中性環境下，鰓部位醣類代謝酵素分佈變化

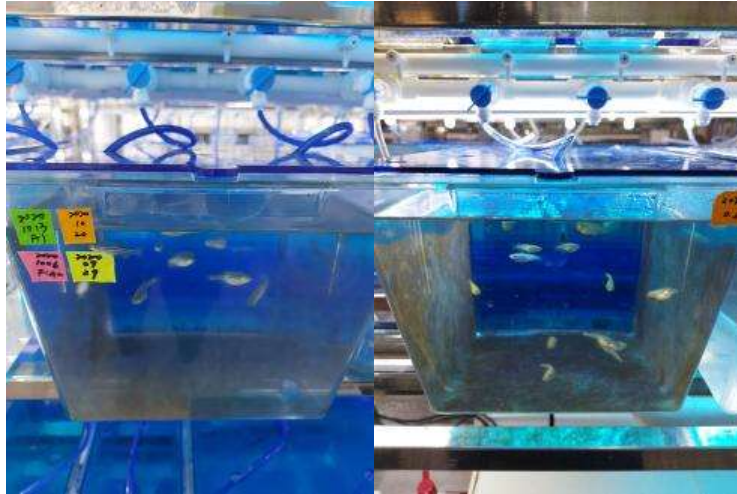
- 1、觀察斑馬魚鰓部位在酸性及中性環境下醣類代謝酵素分布變化
- 2、觀察青鱗魚鰓部位在酸性及中性環境下醣類代謝酵素分布變化

貳、研究方法與過程

一、魚群飼養及酸化環境處理

(一) 飼養條件

我們將斑馬魚及青鱗魚飼養於 28°C 的水中，每日監控並控制水溫於正負 1°C 的範圍內，並給予每日固定裝週期(光照期 14 小時、黑暗期 10 小時)(圖一)。



圖一、魚群飼養環境

(二) 酸化環境處理

將成年的斑馬魚及青鱗魚放入以 H_2SO_4 和曝氣水配製成的 pH 4 酸水中，馴養七天。在這七天的處理之間每天換水並監控 pH 值於 pH 3.9–4.1 之間。為了排除這七天操作的所有影響，以 pH 7 的環境(一般曝氣水)同時處理作為控制組 (control group)。

二、RNA 萃取

- (一) 將樣本連同 2 mL 微量離心管內的 Trizol Isolation Reagent 一併解凍後，以 RNase away 和均質棒將組織充分研磨成小碎塊後置於室溫反應五分鐘。
- (二) 加入 120 μL 的氯仿(chloroform)，搖晃均勻後置於室溫反應五分鐘。
- (三) 將微量離心管以 4°C、轉速 12000xg 離心 15 分鐘。
- (四) 取上層清液，加入 500 μL 異丙醇(2-propanol)並輕微搖晃後，至於室溫 15 分鐘。
- (五) 將微量離心管以 4°C、轉速 12000xg 離心 10 分鐘。
- (六) 將管內異丙醇吸出並加入 1mL 的 75%乙醇(ethanol)以沖洗沉澱物。

- (七) 放入離心機，以 4°C、轉速 12000xg 離心 5 分鐘，重複三次。
- (八) 將乙醇吸出，並置於抽風櫃使 RNA 沉澱物風乾直到透明無色，以滅菌水回溶。
- (九) 將回溶後的 RNA 以 NanoDrop2000 儀器測定 RNA 濃度、A260/A280 和 A260/A230 數值，確認 A260/A280 的值介於 1.8-2.0，以及 A260/A230 的值介於 2.0-2.3。
- (十) 用 3 μ L 的 RNA 混合 1 μ L 的樣本染劑(6x Loading Dye)經核酸染劑(Health view)內染的 1%洋菜膠(Agarose)進行 RNA 電泳 15 分鐘後，以 UV 照洋菜膠確認 RNA 品質。
- (十一) 萃取完成的 RNA 保存於-80°C 冰箱。

三、cDNA 合成

- (一) 於 PCR 微量離心管加入 11 μ gRNA、含有引子之 1 μ L 的反轉錄酵素(SSIV Reverse Transcriptase)、4 μ L 反應緩衝溶液(5x SSIV buffer)、補滅菌水至 20 μ L。
- (二) 使用 PCR 機器以下列的反應步驟將 RNA 反轉錄成 cDNA。
- 1.溫度 65°C，反應 5 分鐘。
 - 2.溫度 55°C，反應 10 分鐘。
 - 3.溫度 85°C，反應 10 分鐘。
- (三) 反應完成後得到的 cDNA 保存於-20°C 冰箱。

四、即時連鎖聚合酶反應(qPCR)

- (一) 配置混合液：

材料	×1	×27
基因螢光染劑	5 μ l	135 μ l
滅菌水	2 μ l	54 μ l
引子	1 μ l	27 μ l

- (二) 先將 2 μ l 的 cDNA 以 Pipette 注入 qPCR 孔盤，再注入 8 μ l 的混合液
- (三) 最後配置 NTC(以水代替 cDNA)，以確認 Primer 品質
- (四) 完成後將 qPCR 孔盤封膜，經離心後放入 qPCR 機器

五、免疫螢光染色

- (一) 將切片上的冷凍包埋劑以 PBST 清洗
- (二) 在切片樣本上滴上 5%BSA，持續搖晃 1.5 小時(室溫)
- (三) 將切片上的 BSA 以 PBST 清洗三次×五分鐘
- (四) 在切片樣本上滴上第一支一抗，持續搖晃 16~20 小時(4°C)
- (五) 回收第一支一抗，並以 PBST 清洗四次×五分鐘
- (六) 在切片樣本上滴上第二支一抗，持續搖晃 1 小時(室溫)
- (七) 回收第二支一抗，並以 PBST 清洗四次×五分鐘
- (八) 在切片樣本上滴上二抗，避光持續搖晃 1 小時(室溫)
- (九) 以 PBST 清洗四次×五分鐘
- (十) 在切片樣本上滴上 DAPI，並將其以蓋玻片密封
- (十一) 以螢光顯微鏡拍攝完成之玻片

六、生物統計分析

(一) qPCR 統計：

將 qPCR 測得的 CT 值平均，並與另一管家基因 (housekeeping gene) 比較，計算其 CT 值差(Δ CT)，以換算得到基因表現量相對值

參、研究結果與討論

一、研究結果

(一) 探討斑馬魚在酸性環境下，鰓部位、肝臟內及肌肉內的醣類代謝差異

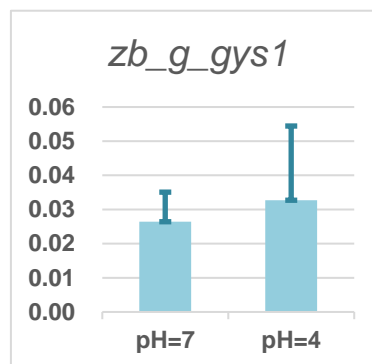
1、探討肝醣合成及分解反應酵素的表現量

(1) 鰓部位的肝醣合成及分解

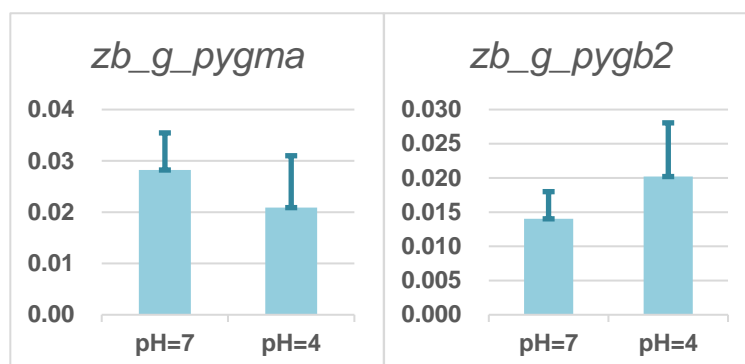
在鰓部位的合成肝醣反應中，我們測定了肝醣合成酶-1 (glycogen synthase 1, 簡稱 *gys1*)與肝醣合成酶-2(glycogen synthase 2, 簡稱 *gys2*)。

由於在鰓部位沒有特定分解肝醣的酵素，於是我們測定所有肝醣分解酵素基因的表現量，若其中幾個基因表現量有上升，即代表肝醣分解的效率有上升。因此我們在鰓部位的肝醣分解反應中，測定了肌肉內肝醣磷酸化酶-A(glycogen phosphorylase, muscle isoform A, 簡稱 *pygma*)以及腦內肝醣磷酸化酶 2 (glycogen phosphorylase, brain isoform 2, 簡稱 *pygb2*)。

經測定之後，在肝醣合成反應中，*gys1* 基因在 pH4 及 pH7 環境下的表現量沒有顯著差異(圖二)，而由於 *gys2* 基因表現量過低，致使 qPCR 無法測定出表現量，故無法作圖。在肝醣分解反應中，*pygma* 與 *pygb2* 基因在 pH4 及 pH7 環境下的表現量皆沒有顯著差異(圖三)。



圖二、斑馬魚在肝醣合成時鰓部位 *gys1* 基因表現量，*gys2* 因不表現魚鰓中而無法作圖



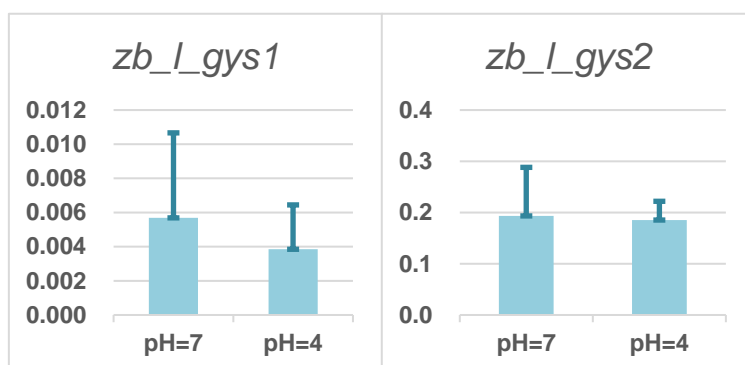
圖三、斑馬魚在肝醣分解時鰓部位 *pygma*,*pygb2* 基因表現量

(2) 肝臟內的肝醣合成及分解

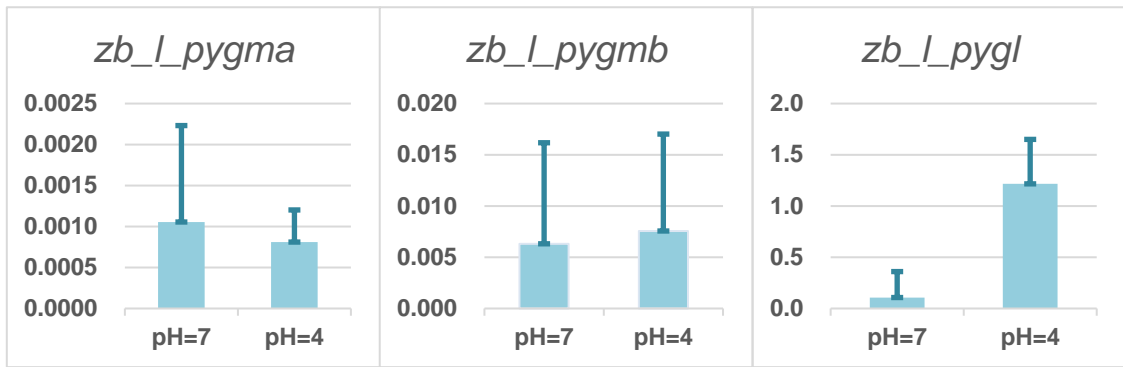
在肝臟內的肝醣合成反應中，我們測定了肝醣合成酶-1 (*gys1*)及肝醣合成酶-2(*gys2*)。

在肝臟內的肝醣分解反應中，我們測定了肌肉內肝醣磷酸化酶-A(*pygma*)、肌肉內肝醣磷酸化酶-B(glycogen phosphorylase, muscle isoform B, 簡稱 *pygmb*)、以及肝內肝醣磷酸化酶(glycogen phosphorylase, liver isoform, 簡稱 *pygl*)。

經測定之後，在肝醣合成反應中，*gys1* 及 *gys2* 基因在 pH 4 及 pH 7 環境下的表現量皆沒有顯著差異(圖四)。在肝醣分解反應中，*pygma* 與 *pygmb* 基因在 pH 4 及 pH 7 環境下的表現量皆沒有顯著差異，而 *pygl* 基因有顯著差異(圖五)。



圖四、斑馬魚在肝醣合成時肝內 *gys1*,*gys2* 基因表現量



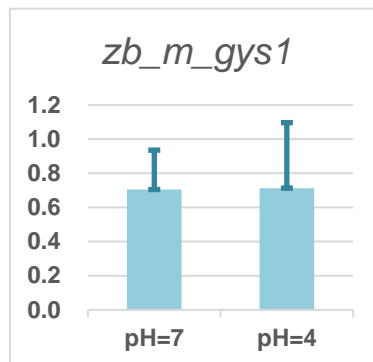
圖五、斑馬魚在肝醣分解時肝內 *pygma*,*pygmb*,*pygl* 基因表現量

(3) 肌肉內的肝醣合成及分解

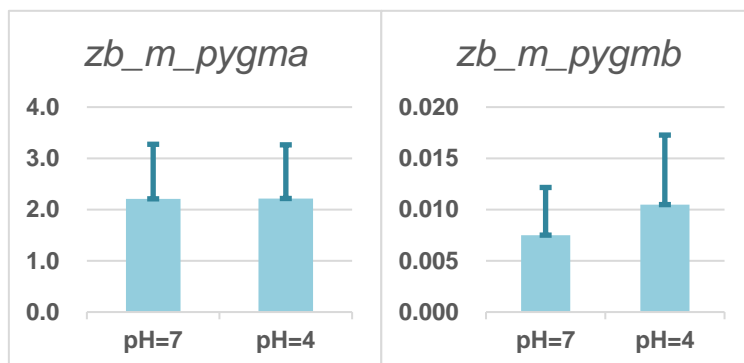
在肌肉內的肝醣合成反應中，我們測定了肝醣合成酶-1 (*gys1*)。

在肌肉內的肝醣分解反應中，我們測定了肌肉內肝醣磷酸化酶-A (*pygma*)以及肌肉內肝醣磷酸化酶-B(*pygmb*)。

經測定之後，在肝醣合成反應中，*gys1* 基因在 pH 4 及 pH 7 環境下的表現量沒有顯著差異(圖六)。在肝醣分解反應中，*pygma* 與 *pygmb* 基因在 pH4 及 pH7 環境下的表現量皆沒有顯著差異(圖七)。



圖六、斑馬魚在肝醣合成時肌肉內 *gys1* 基因表現量



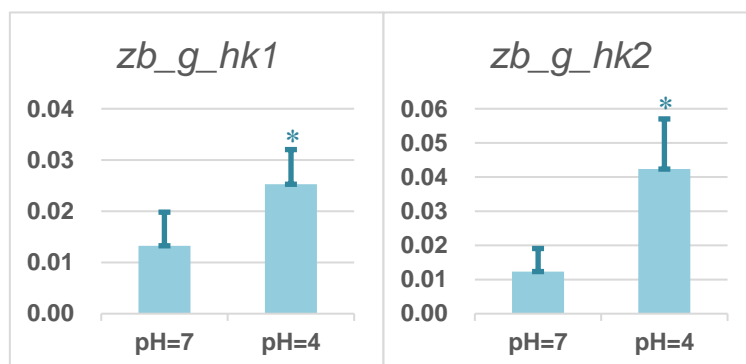
圖七、斑馬魚在肝醣分解時肌肉內 *pygma*,*pygmb* 基因表現量

2、探討糖解作用酵素的表現量

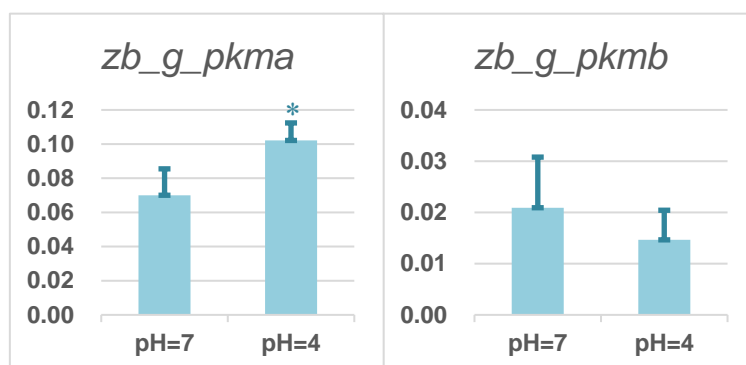
(1) 鰓部位的糖解作用

在鰓部位的糖解作用中，我們測定了六碳醣激酶(hexokinase,簡稱 *hk*)以及丙酮酸激酶(pyruvate kinase,簡稱 *pk*)，而在 *hk* 與 *pk* 中我們分別取 *hk1*、*hk2* 及 *pkma*、*pkmb* 進行測定。

經測定之後，*hk1*、*hk2* 及 *pkma* 相對於 pH7 的環境，處於 pH4 環境下的表現量有顯著上升(圖八、圖九)。



圖八、斑馬魚在糖解作用時鰓部位 *hk1,hk2* 基因表現

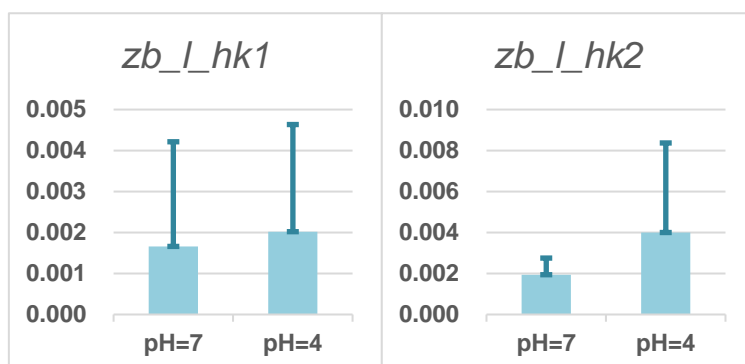


圖九、斑馬魚在糖解作用時鰓部位 *pkma,pkmb* 基因表現量

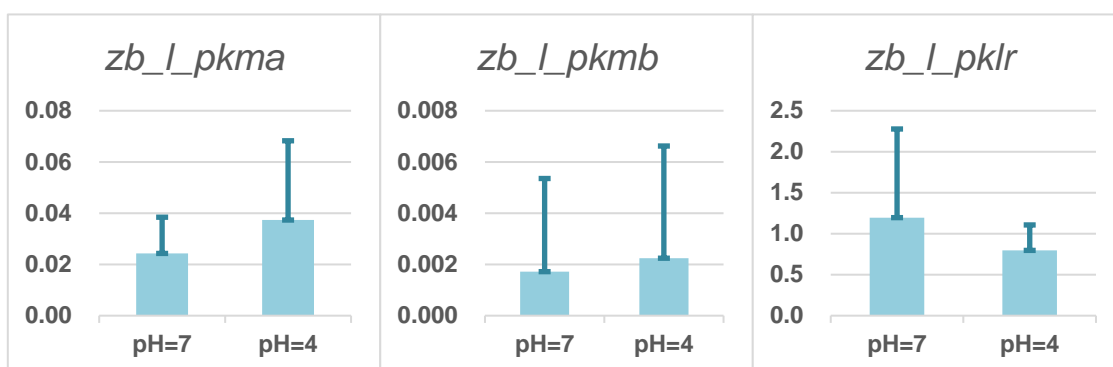
(2) 肝臟內的糖解作用

在肝臟內的糖解作用中，我們測定了六碳醣激酶(*hk*)以及丙酮酸激酶(*pk*)，而在 *hk* 與 *pk* 中我們分別取 *hk1,hk2* 及 *pkma,pkmb,pklr* 進行測定。

經測定之後，*hk1,hk2* 及 *pkma,pkmb,pklr* 的表現量均沒有顯著差異(圖十、圖十一)。



圖十、斑馬魚在糖解作用時肝臟內 *hk1,hk2* 基因表現量

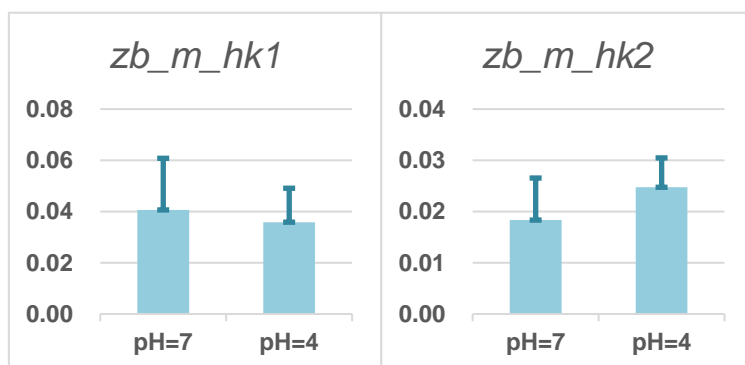


圖十一、斑馬魚在糖解作用時肝臟內 *pkma,pkmb,pklr* 基因表現量

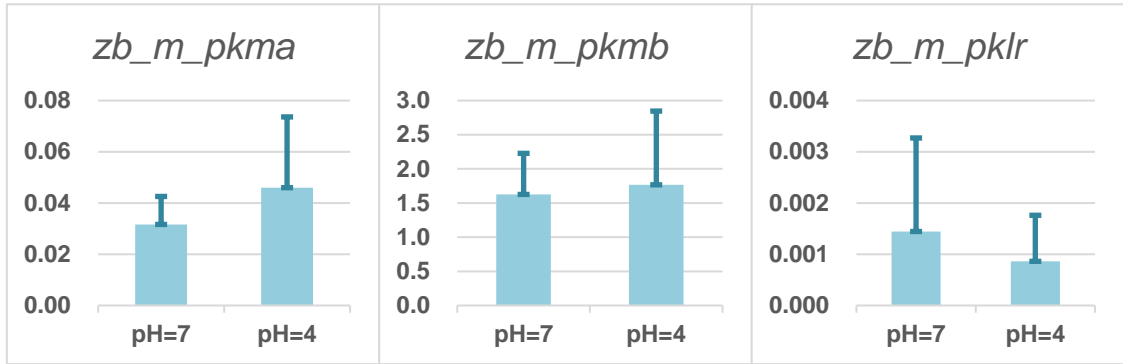
(3) 肌肉內的糖解作用

在肌肉內的糖解作用中，我們測定了六碳糖激酶(*hk*)以及丙酮酸激酶(*pk*)，而在 *hk* 與 *pk* 中我們分別取 *hk1,hk2* 及 *pkma,pkmb,pklr* 進行測定。

經測定之後，*hk1,hk2* 及 *pkma,pkmb,pklr* 的表現量皆沒有顯著差異(圖十二、圖十三)。



圖十二、斑馬魚在糖解作用時肌肉內 *hk1,hk2* 基因表現量



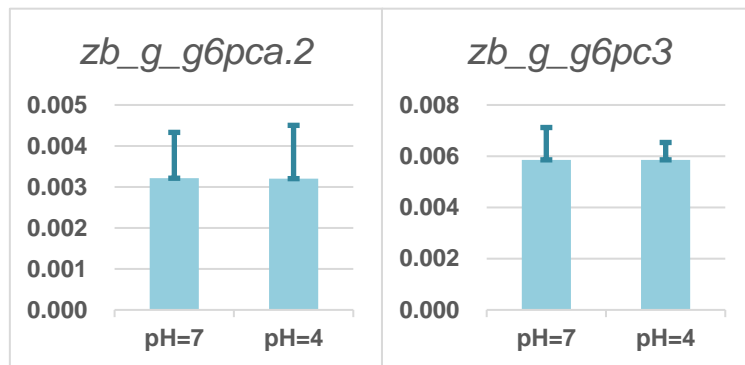
圖十三、斑馬魚在醱解作用時肌肉內 *pkma,pkmb,pklr* 基因表現量

3、探討糖質新生酵素的表現量

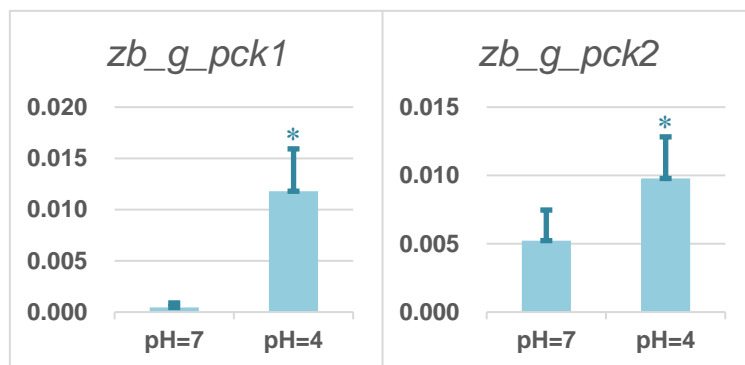
(1) 鰓部位的糖質新生

在鰓部位的糖質新生中，我們測定了葡萄糖-6-磷酸催化酶(Glucose-6-phosphatase catalytic, 簡稱 *g6pc*)以及磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(Phosphoenolpyruvate carboxykinase, 簡稱 *pck*)，而在 *g6pc* 與 *pck* 中我們分別取 *g6pca.2,g6pc3* 及 *pck1,pck2* 進行測定。

經測定之後，我們發現 *pck1* 及 *pck2* 相對於 pH7 的環境，處於 pH4 環境下的表現量有顯著上升(圖十四、圖十五)。



圖十四、斑馬魚在糖質新生時鰓部位 *g6pca.2,g6pc3* 基因表現量

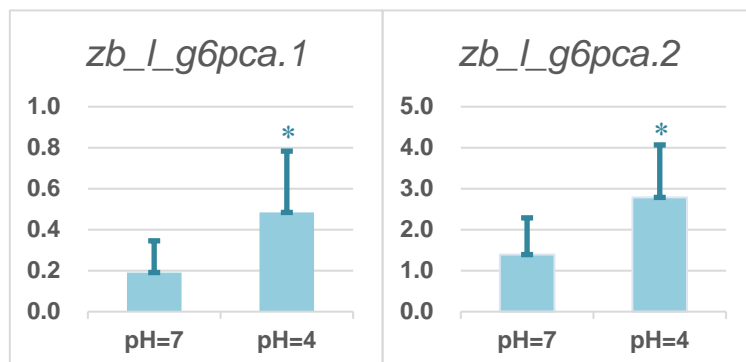


圖十五、斑馬魚在糖質新生時鰓部位 *pck1,pck2* 基因表現量

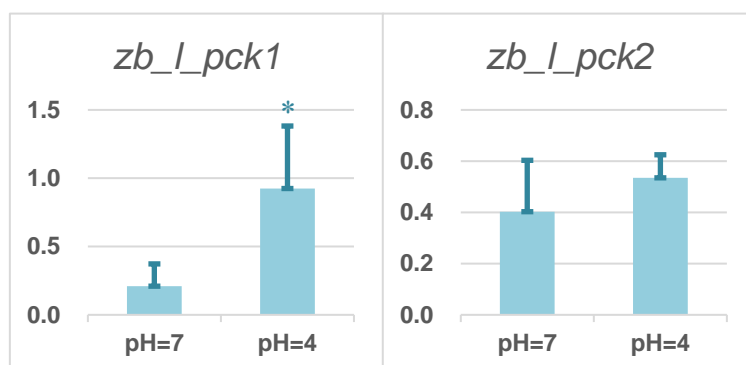
(2) 肝臟內的糖質新生

在肝臟內的糖質新生中，我們測定了葡萄糖-6-磷酸催化酶(*g6pc*)以及磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(*pck*)，而在 *g6pc* 與 *pck* 中我們分別取兩種型態 *g6pca.1*,*g6pca.2* 及 *pck1*,*pck2* 進行測定。

經測定之後，我們發現 *g6pca.1*,*g6pca.2*,及 *pck1* 相對於 pH7 的環境，處於 pH4 環境下的表現量有顯著上升(圖十六、圖十七)。



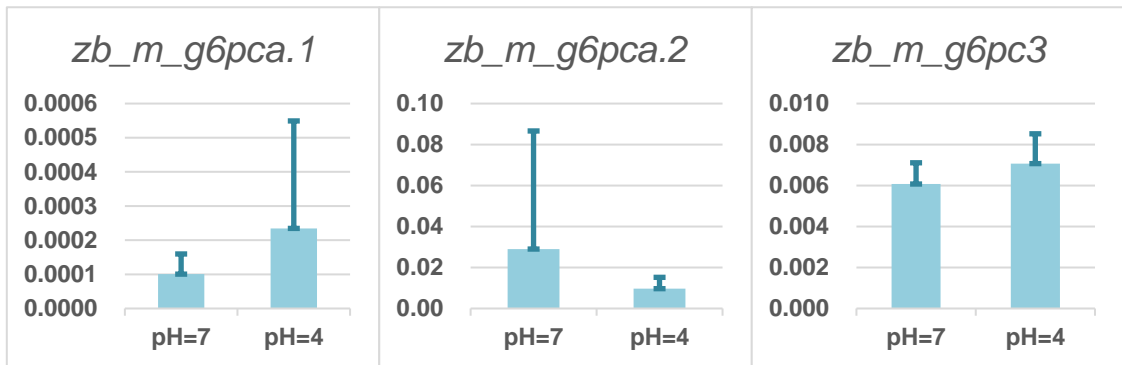
圖十六、斑馬魚在糖質新生時肝內 *g6pca.1*,*g6pca.2* 基因表現量



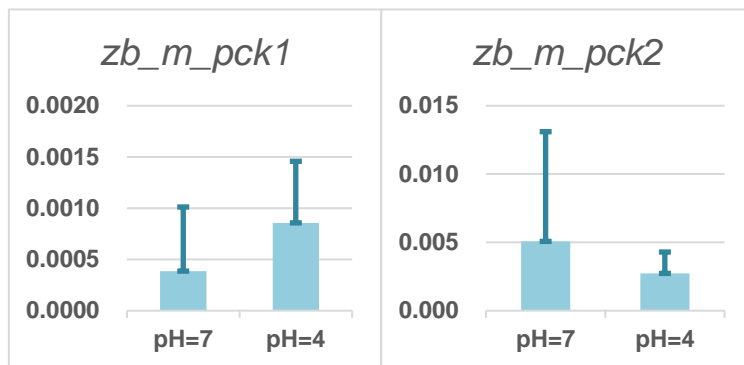
圖十七、斑馬魚在糖質新生時肝內 *pck1*,*pck2* 基因表現量

(3) 肌肉內的糖質新生

在糖質新生中，我們測定了葡萄糖-6-磷酸催化酶(*g6pc*)以及磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(*pck*)，而在 *g6pc* 與 *pck* 中我們分別取兩種型態 *g6pca.1*,*g6pca.2*,*g6pc3* 及 *pck1*,*pck2* 進行測定。經測定後，我們發現這五個基因的表現量都沒有顯著差異(圖十八、圖十九)。



圖十八、斑馬魚在糖質新生時肌肉內 *g6pca.1*,*g6pca.2*,*g6pc3* 基因表現量



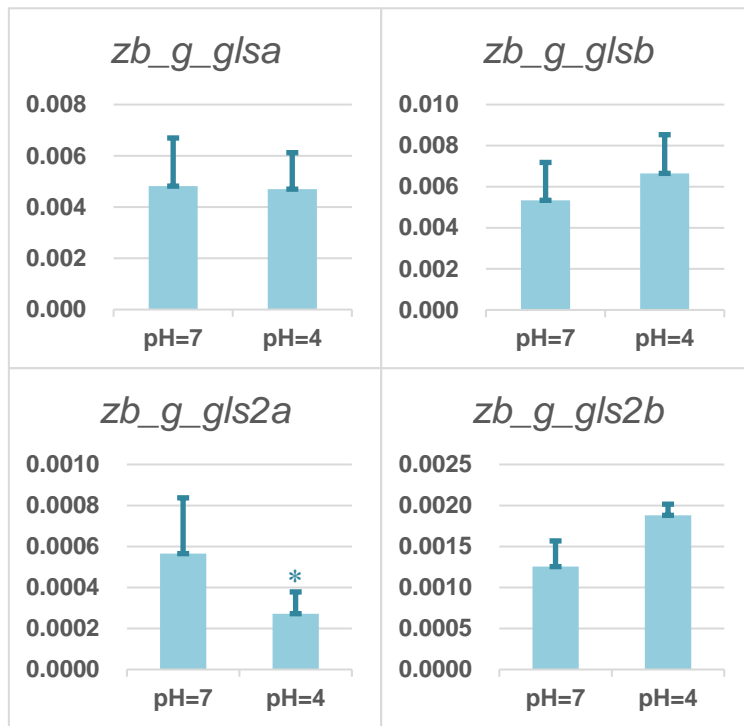
圖十九、斑馬魚在糖質新生時肌肉內 *pck1*,*pck2* 基因表現量

4、探討麩醯胺酸分解反應時酵素表現量的差異性

(1) 鰓部位的麩醯胺酸分解反應

在麩醯胺酸分解反應中，我們測定了麩醯胺酸分解酶(*glutaminase*, 簡稱 *gls*)，而在 *gls* 中我們分別取 *glsa*,*glsb*,*gls2a*,*gls2b* 進行測定。

經測定之後，我們發現 *gls2a* 相對於 pH7 的環境，處於 pH4 環境下的表現量有顯著下降(圖二十)。

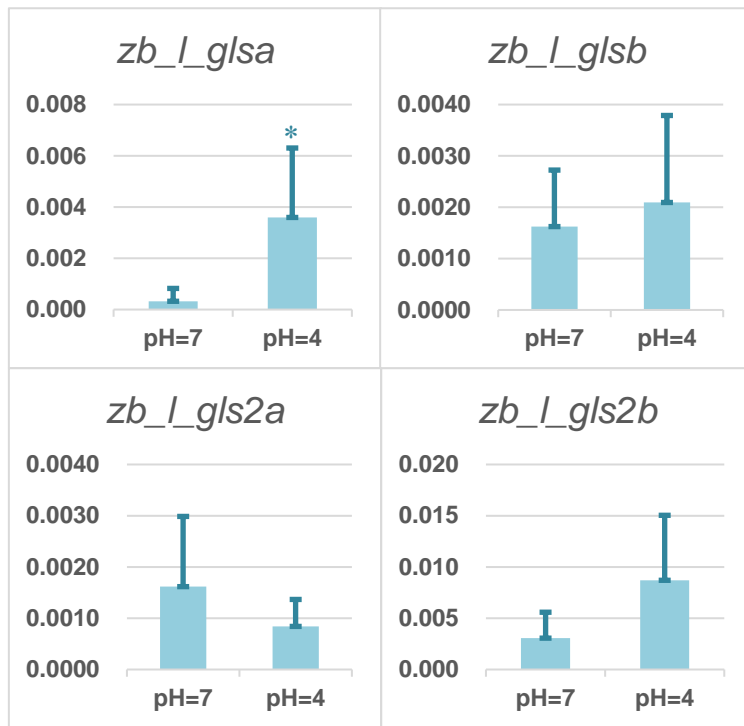


圖二十、斑馬魚在麩醯胺酸分解反應時鰓部位 *glsa,glsb,gls2a,gls2b* 基因表現量

(2) 肝臟內的麩醯胺酸分解反應

在麩醯胺酸分解反應中，我們測定了麩醯胺酸分解酶(*gls*)，而在 *gls* 中我們分別取 *glsa,glsb,gls2a,gls2b* 進行測定。

經測定之後，我們發現 *glsa* 相對於 pH7 的環境，處於 pH4 環境下的表現量有顯著上升(圖二十一)。

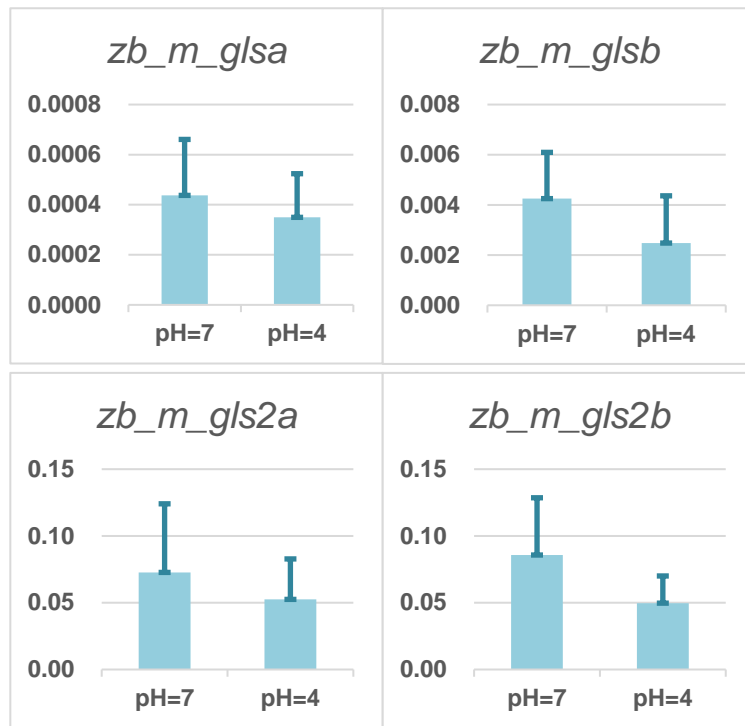


圖二十一、斑馬魚在麩醯胺酸分解反應時肝臟內 *glsa,glsb,gls2a,gls2b* 基因表現量

(3) 肌肉內的麩醯胺酸分解反應

在麩醯胺酸分解反應中，我們測定了麩醯胺酸分解酶(*gls*)，而在 *gls* 中我們分別取 *glsa,glsb,gls2a,gls2b* 進行測定。

經測定之後，我們發現 *gls* 基因在 pH4 和 pH 7 環境下的表現量沒有顯著差異(圖二十二)。



圖二十二、斑馬魚在麩醯胺酸分解反應時肌肉內 *glsa, glsb, gls2a, gls2b* 基因表現量

(二) 探討青鱗魚在酸性環境下，鰓部位、肝臟內及肌肉內的醣類代謝差異

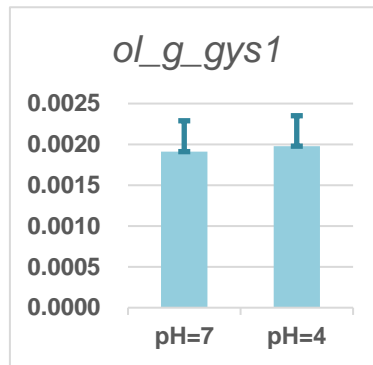
1、探討肝醣合成及分解反應時酵素表現量的差異性

(1) 鰓部位的肝醣合成及分解

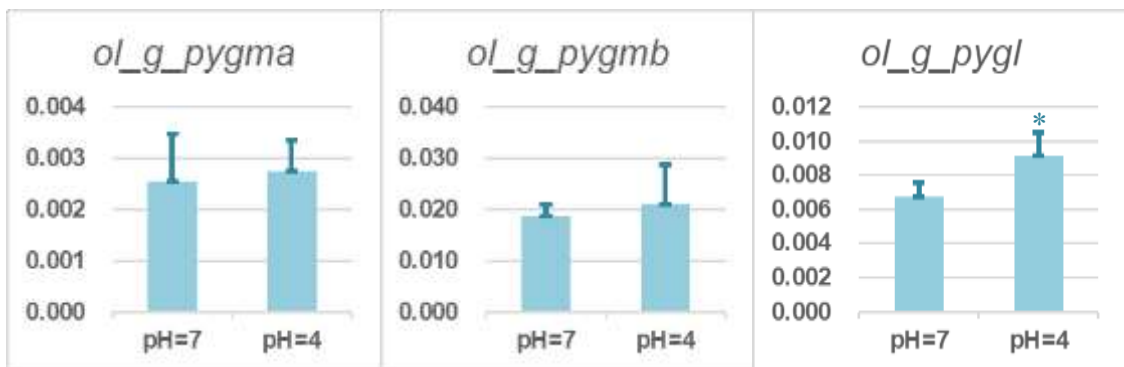
在鰓部位的合成肝醣反應中，我們肝醣合成酶-1(*gyl*)。

由於在鰓部位沒有特定分解肝醣的酵素，於是我們測定所有肝醣分解酵素基因的表現量，若其中幾個基因表現量有上升，即代表肝醣分解的效率有上升。因此我們在鰓部位的肝醣分解反應中測定了肌肉內肝醣磷酸化酶-A(*pygma*)、肌肉內肝醣磷酸化酶-B(*pygmb*)，以及肝內肝醣磷酸化酶(*pygl*)。

經測定之後，在肝醣合成反應中，*gyl* 基因在 pH 4 及 pH 7 環境下的表現量沒有顯著差異(圖二十三)。在肝醣分解反應中，*pygma* 及 *pygmb* 基因在 pH4 及 pH7 環境下的表現量沒有顯著差異，而 *pygl* 基因相對於的 pH7 環境，處於 pH4 環境下的表現量有顯著上升(圖二十四)。



圖二十三、青鱗魚在肝醣合成時鰓部為 *gys1* 基因表現量



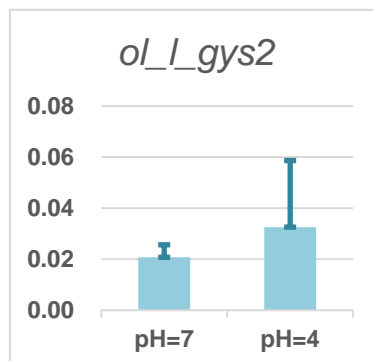
圖二十四、青鱗魚在肝醣分解時鰓部位 *pygma.pygb2.pygl* 基因表現量

(2) 肝臟內的肝醣合成及分解

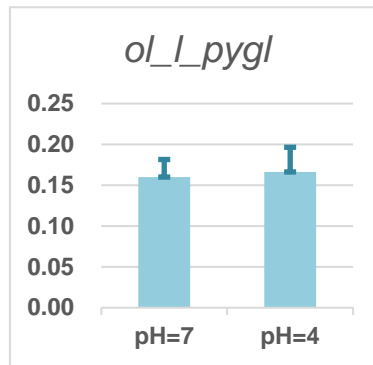
在肝臟內的肝醣合成反應中，我們測定了肝醣合成酶-2(*gys2*)。

在肝臟內的肝醣分解反應中，我們測定了肝內肝醣磷酸化酶(*pygl*)。

經測定之後，在肝醣合成反應中，*gys2* 基因在 pH4 及 pH7 環境下的表現量沒有顯著差異(圖二十五)。在肝醣分解反應中，*pygl* 基因在 pH4 及 pH7 環境下的表現量沒有顯著差異(圖二十六)。



圖二十五、青鱗魚在肝醣合成時肝臟內 *gys2* 基因表現量



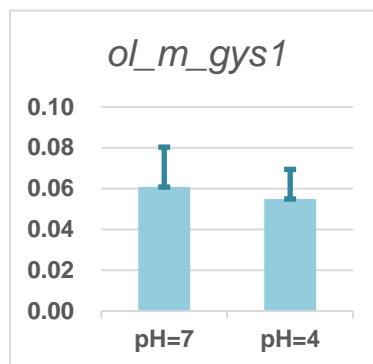
圖二十六、青鱗魚在肝醣分解時肝臟內 *pygl* 基因表現量

(3) 肌肉內的肝醣合成及分解

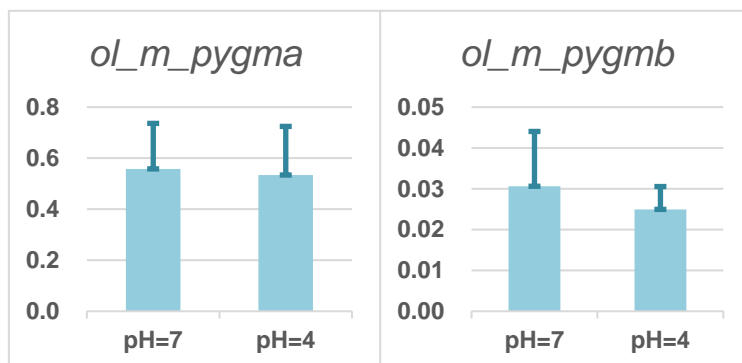
在肌肉內的肝醣合成反應中，我們測定了肝醣合成酶-1 (*gys1*)。

在肌肉內的肝醣分解反應中，我們測定了肌肉內肝醣磷酸化酶-A(*pygma*)以及肌肉內肝醣磷酸化酶-B(*pygmb*)。

經測定之後，在肝醣合成反應中，*gys1* 基因在 pH4 及 pH7 環境下的表現量沒有顯著差異(圖二十七)。在肝醣分解反應中，*pygma* 與 *pygmb* 基因在 pH4 及 pH7 環境下的表現量皆沒有顯著差異(圖二十八)。



圖二十七、青鱗魚在肝醣合成時肌肉內 *gys1* 基因表現量



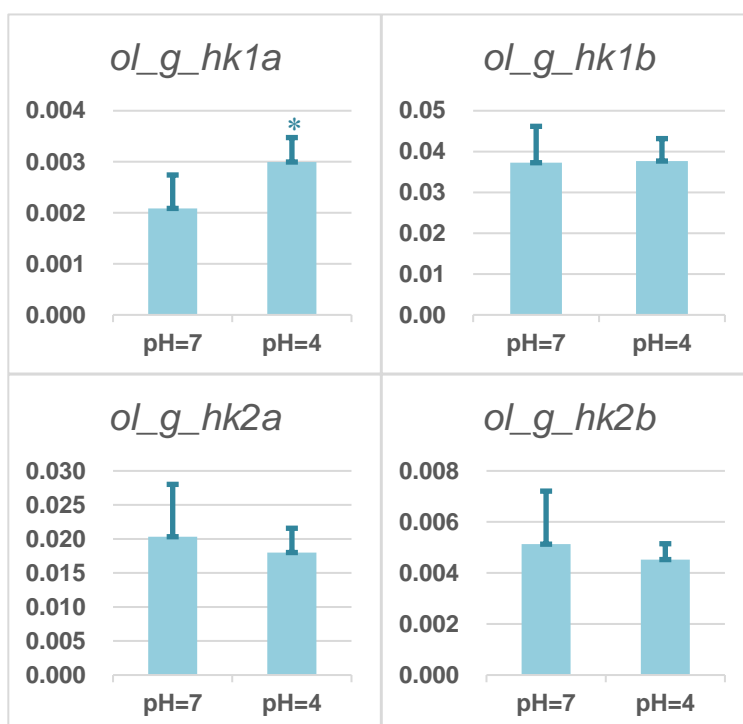
圖二十八、青鱗魚在肝醣分解時肌肉內 *pygma*,*pygmb* 基因表現量

2、探討糖解作用酵素的表現量

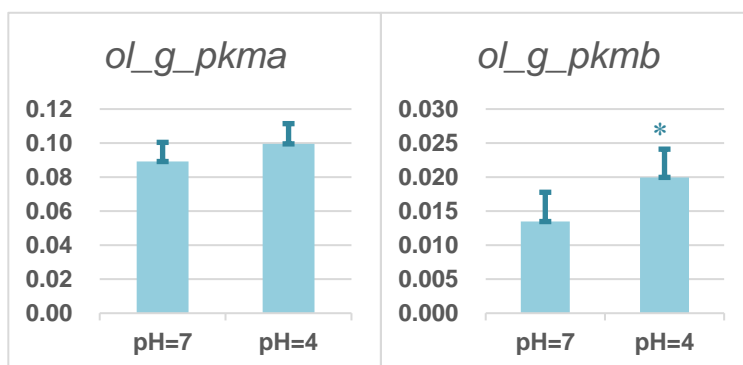
(1) 鰓部位的糖解作用

在鰓部位的糖解作用中，我們測定了六碳醣激酶(*hk*)以及丙酮酸激酶(*pk*)，而在 *hk* 與 *pk* 中我們分別取 *hk1a*,*hk1b*,*hk2a*, *hk2b* 及 *pkma*,*pkmb* 進行測定。

經測定之後，*hk1a* 及 *pkmb* 相對於 pH7 的環境，處於 pH4 環境下的表現量有顯著上升(圖二十九、圖三十)。



圖二十九、青鱗魚在糖解作用時鰓部位 *hk1a*,*hk1b*,*hk2a*,*hk2b* 基因表現量



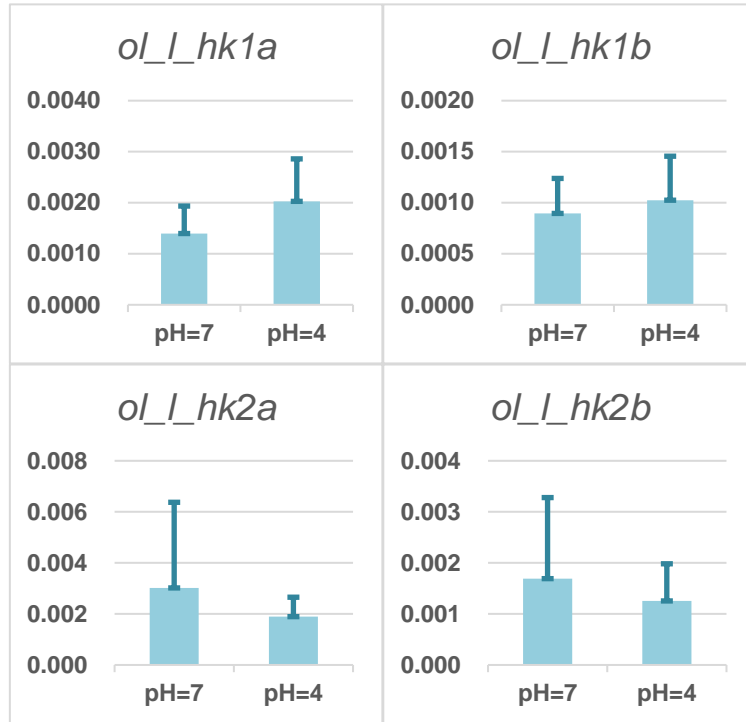
圖三十、青鱗魚在糖解作用時鰓部位 *pkma*,*pkmb* 基因表現量

(2) 肝臟內的糖解作用

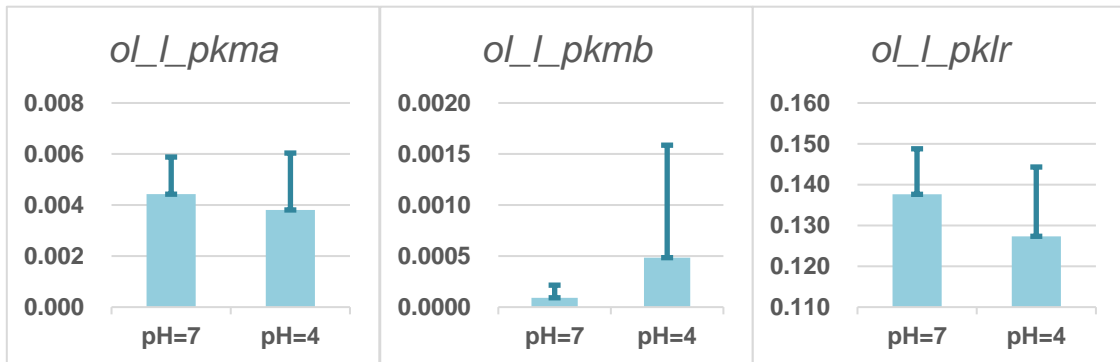
在肝臟內的糖解作用中，我們測定了六碳醣激酶(*hk*)以及丙酮酸激酶

(*pk*)，而在 *hk* 與 *pk* 中我們分別取 *hk1a*,*hk1b*,*hk2a*, *hk2b* 及 *pkma*,*pkmb*,*pklr* 進行測定。

經測定之後，*hk1a*,*hk1b*,*hk2a*,*hk2b* 及 *pkma*,*pkmb*,*pklr* 的表現量皆沒有顯著差異(圖三十一、圖三十二)。



圖三十一、青鱗魚在糖解作用時肝臟內 *pkma*,*pkmb* 基因表現量



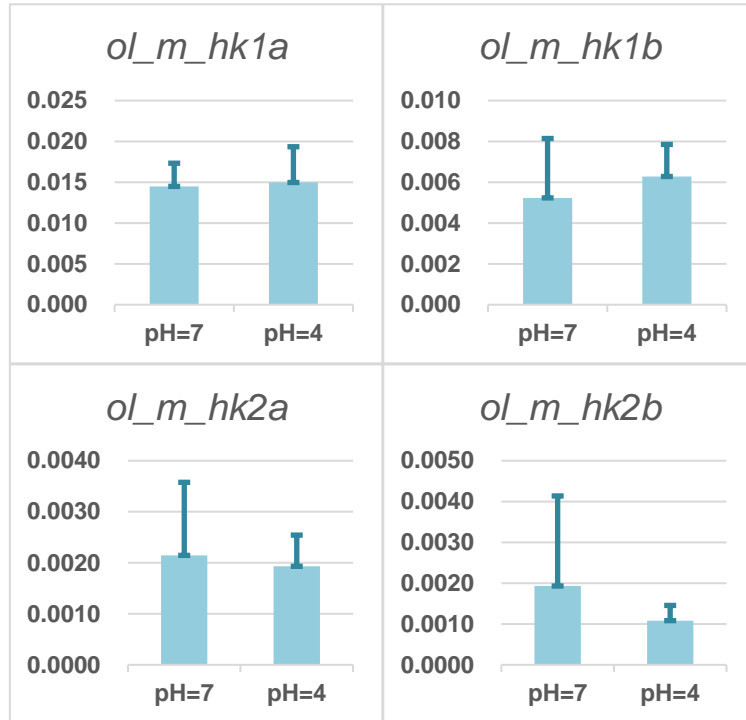
圖三十二、青鱗魚在糖解作用時肝臟內 *pkma*,*pkmb*,*pklr* 基因表現量

(3) 肌肉內的糖解作用

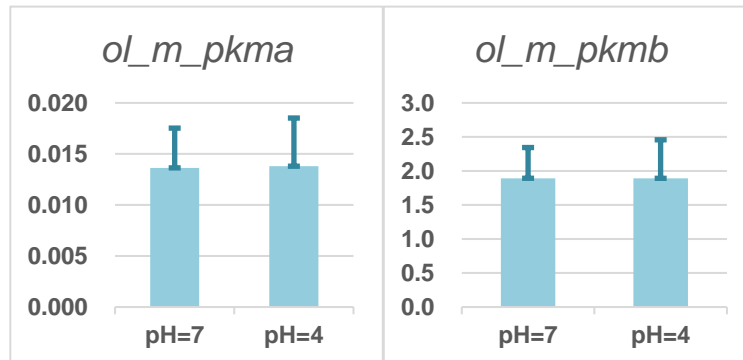
在肌肉內的糖解作用中，我們測定了六碳糖激酶(*hk*)以及丙酮酸激酶(*pk*)，而在 *hk* 與 *pk* 中我們分別取 *hk1a*,*hk1b*,*hk2a*, *hk2b* 及 *pkma*,*pkmb* 進行測定。

經測定之後，*hk1a*,*hk1b*,*hk2a*,*hk2b* 及 *pkma*,*pkmb* 的表現量皆沒有顯著

差異(圖三十三、圖三十四)。



圖三十三、青鱗魚在糖解作用時肌肉內 *hk1a,hk1b,hk2a,hk2b* 基因表現量



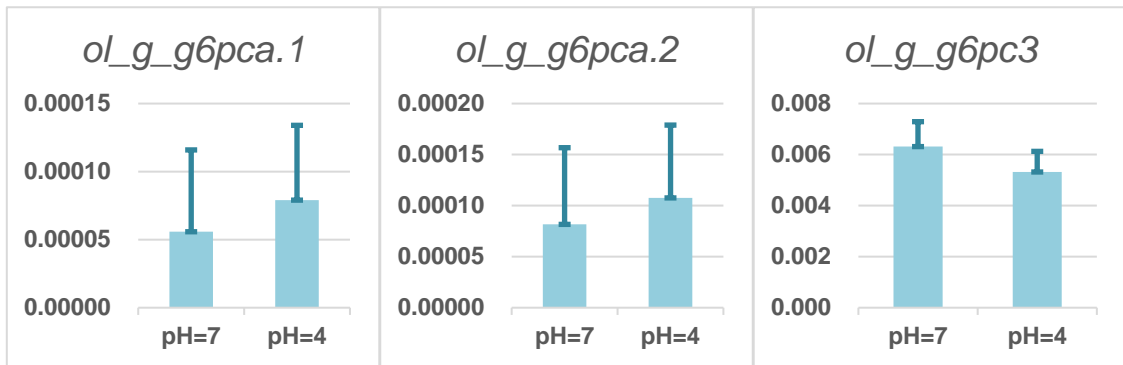
圖三十四、青鱗魚在糖解作用時肌肉內 *pkma,pkmb* 基因表現量

3、探討糖質新生酵素的表現量

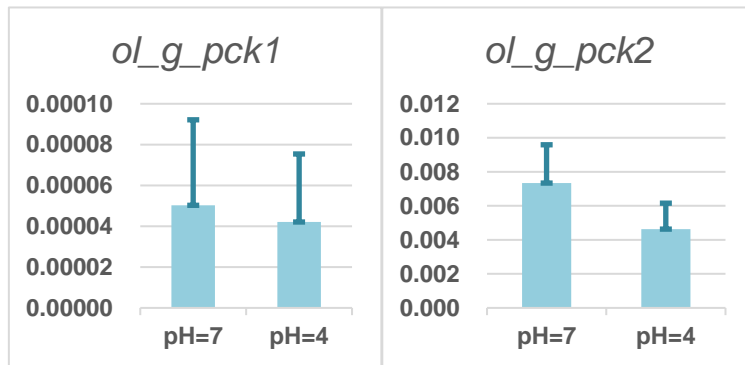
(1) 鰓部位的糖質新生

在鰓部位的糖質新生中，我們測定了葡萄糖-6-磷酸催化酶(*g6pc*)以及磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(*pck*)，而在 *g6pc* 與 *pck* 中我們分別取 *g6pca.1,g6pca.2,g6pc3* 及 *pck1,pck2* 進行測定。

經測定之後，*g6pca.1,g6pca.2,g6pc3* 及 *pck1,pck2* 表現量皆沒有顯著差異(圖三十五、圖三十六)。



圖三十五、青鱗魚在糖質新生時鰓部位 *g6pca.1,g6pca.2,g6pc3* 基因表現量

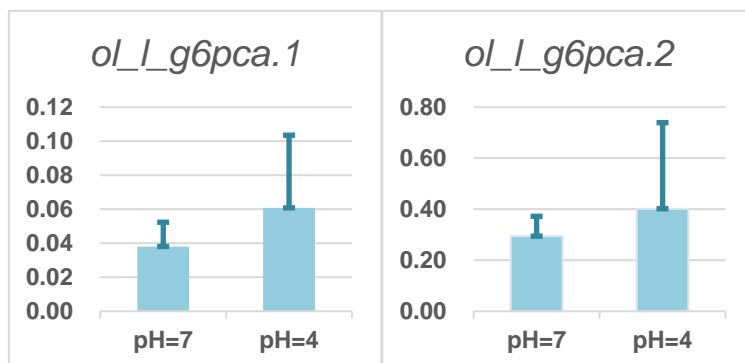


圖三十六、青鱗魚在糖質新生時鰓部位 *pck1,pck2* 基因表現量

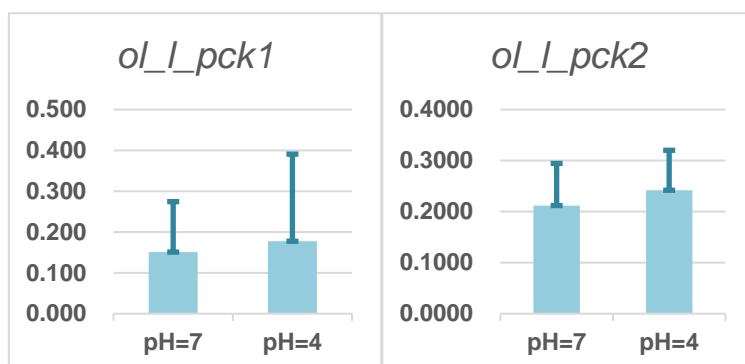
(2) 肝臟內的糖質新生

在肝臟內的糖質新生中，我們測定了葡萄糖-6-磷酸催化酶(*g6pc*)以及磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(*pck*)，而在 *g6pc* 與 *pck* 中我們分別取 *g6pca.1,g6pca.2* 及 *pck1,pck2* 進行測定。

經測定之後，*g6pca.1,g6pca.2* 及 *pck1,pck2* 的表現量皆沒有顯著差異 (圖三十七、圖三十八)。



圖三十七、青鱗魚在糖質新生時肝臟內 *g6pca.1,g6pca.2* 基因表現量

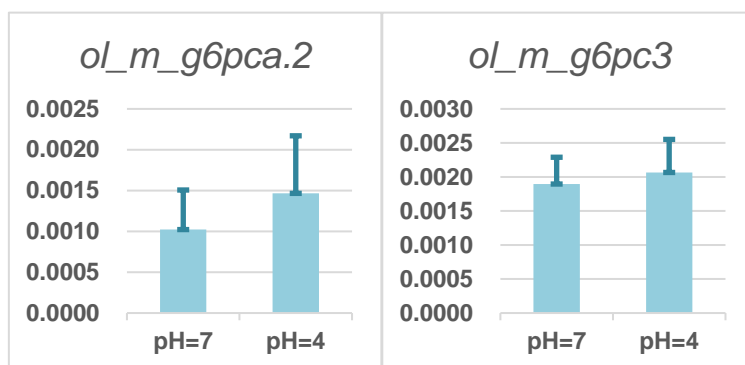


圖三十八、青鱗魚在糖質新生時肝臟內 *pck1,pck2* 基因表現量

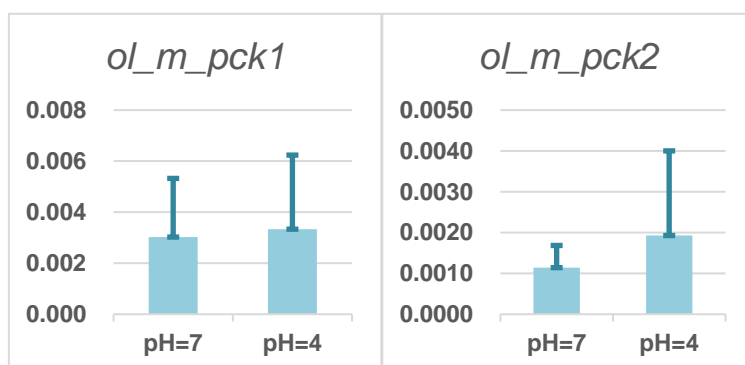
(3) 肌肉內的糖質新生

在肝臟內的糖質新生中，我們測定了葡萄糖-6-磷酸催化酶(*g6pc*)以及磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(*pck*)，而在 *g6pc* 與 *pck* 中我們分別取 *g6pca.2,g6pc3* 及 *pck1,pck2* 進行測定。

經測定之後，*g6pca.2,g6pc3* 及 *pck1,pck2* 的表現量皆沒有顯著差異(圖三十九、圖四十)。



圖三十九、青鱗魚在糖質新生時肌肉內 *g6pca.2,g6pc3* 基因表現量



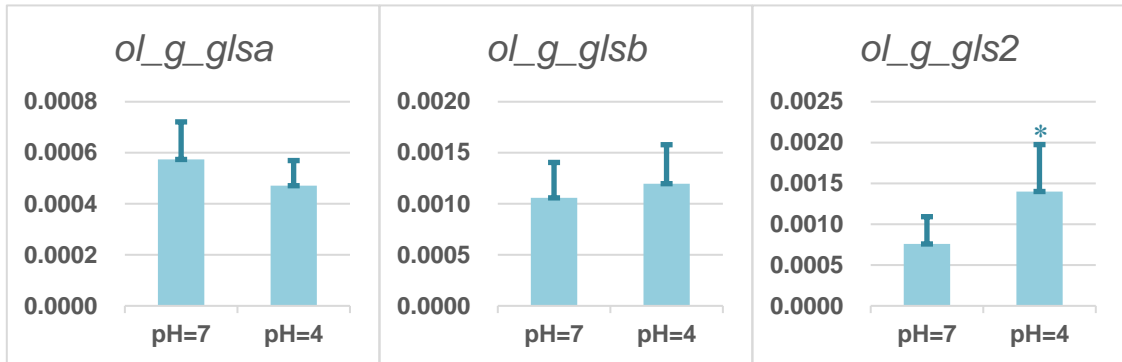
圖四十、青鱗魚在糖質新生時肌肉內 *pck1,pck2* 基因表現量

4、探討麩醯胺酸分解反應時酵素表現量的差異性

(1) 鰓部位的麩醯胺酸分解反應

在麩醯胺酸分解反應中，我們測定了麩醯胺酸分解酶(*gls*)，而在 *gls* 中我們取 *glsa,glsb,gls2* 進行測定。

經測定之後，我們發現 *gls2* 相對於 pH7 的環境，處於 pH4 環境下的表現量有顯著上升(圖四十一)。

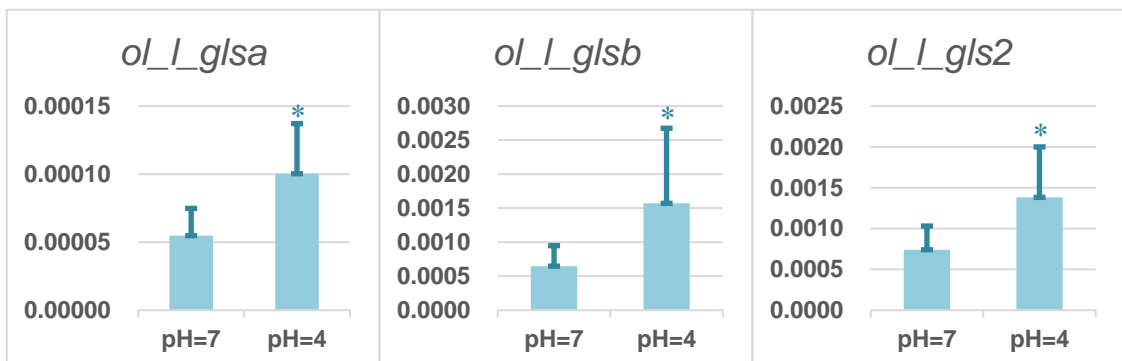


圖四十一、青鱗魚在麩醯胺酸分解反應時鰓部位 *glsa,glsb,gls2* 基因表現量

2、肝臟內的麩醯胺酸分解反應

在麩醯胺酸分解反應中，我們測定了麩醯胺酸分解酶(*gls*)，而在 *gls* 中我們分別取兩種型態 *glsa,glsb,gls2* 進行測定。

經測定之後，我們發現 *glsa,glsb,gls2* 相對於 pH7 的環境，處於 pH4 環境下的表現量有顯著上升(圖四十二)。

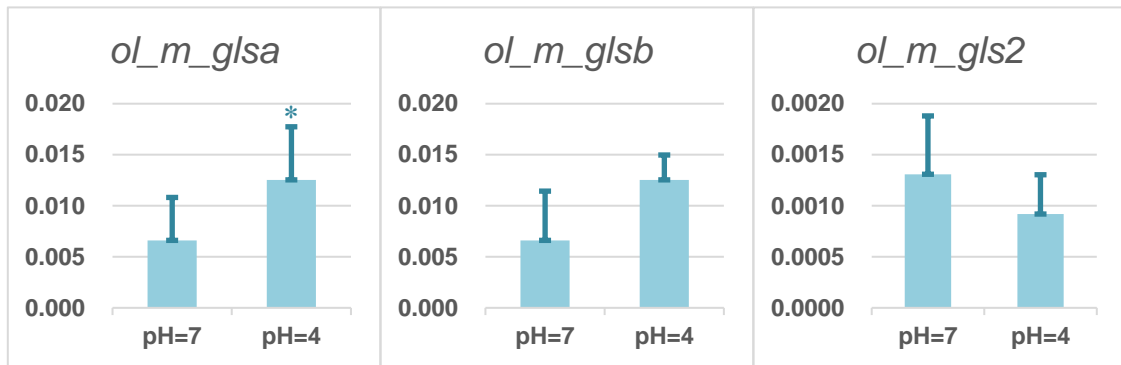


圖四十二、青鱗魚在麩醯胺酸分解反應時肝臟內 *glsa,glsb,gls2* 基因表現量

3、肌肉內的麩醯胺酸分解反應

在麩醯胺酸分解反應中，我們測定了麩醯胺酸分解酶(*gls*)，而在 *gls* 中我們分別取兩種型態 *glsa*,*glsb*,*gls2* 進行測定。

經測定之後，我們發現 *glsa* 相對於 pH7 的環境，處於 pH4 環境下的表現量有顯著上升(圖四十三)。

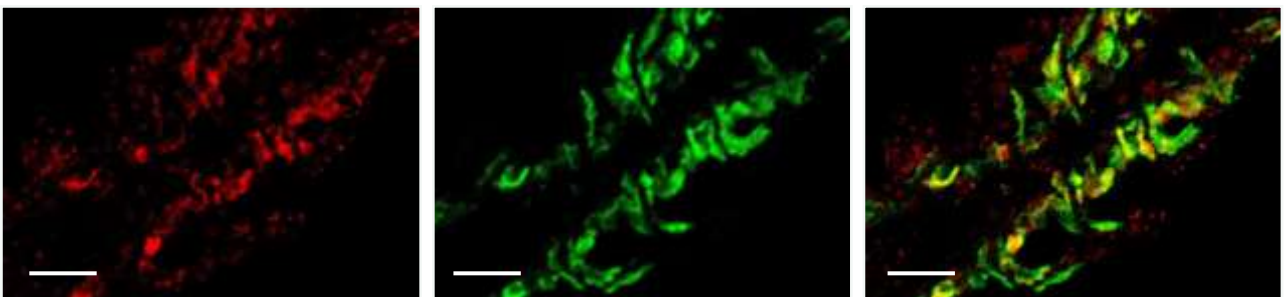


圖四十三、青鱗魚在麩醯胺酸分解反應時肌肉內 *glsa*,*glsb*,*gls2* 基因表現量

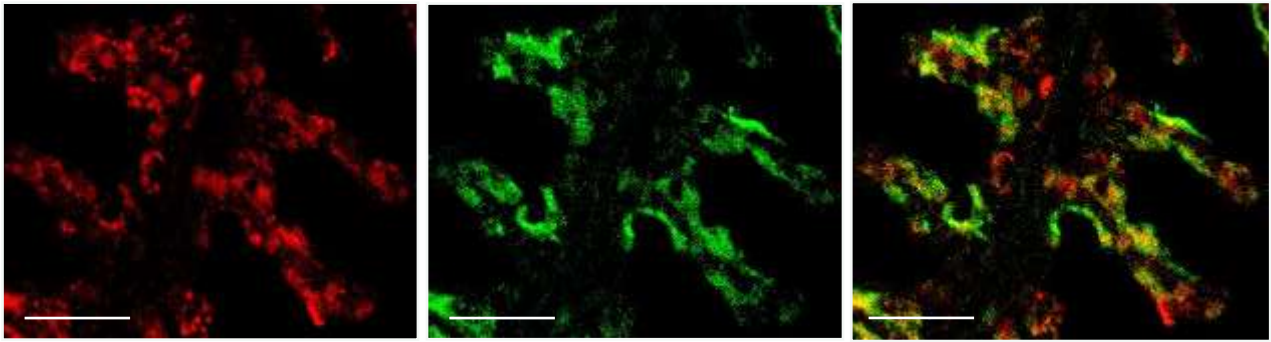
(三) 觀察斑馬魚及青鱗魚在酸性及中性環境下，鰓部位醣類代謝酵素分佈變化

1、觀察斑馬魚鰓部位在酸性及中性環境下醣類代謝酵素分布變化

將斑馬魚鰓部位經免疫螢光染色處理後，在中性環境下檸檬酸合成酶(CS)跟鈉鉀幫浦(NKA)都位在同樣的細胞中(圖四十四)。而在經過酸化處理後，斑馬魚鰓部位的細胞中，CS 和 NKA 的訊號不完全分布在同一個細胞內(圖四十五)。



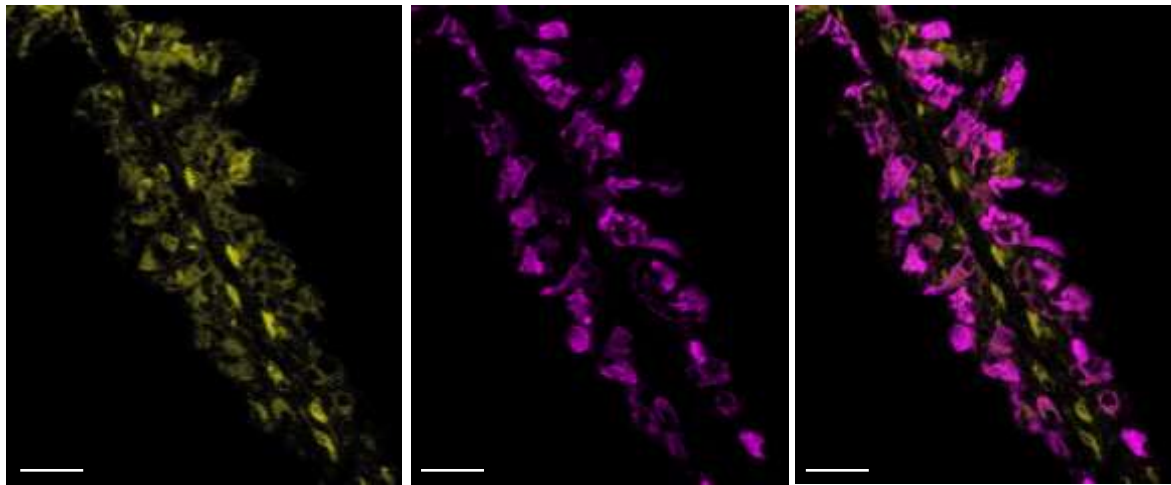
圖四十四、中性環境下螢光顯微鏡下斑馬魚鰓的染色結果，紅色為檸檬酸合成酶(CS)，綠色為鈉鉀幫浦(NKA)，可由右圖看到 CS 與 NKA 都在同一個細胞中。比例尺 =10 μ m。



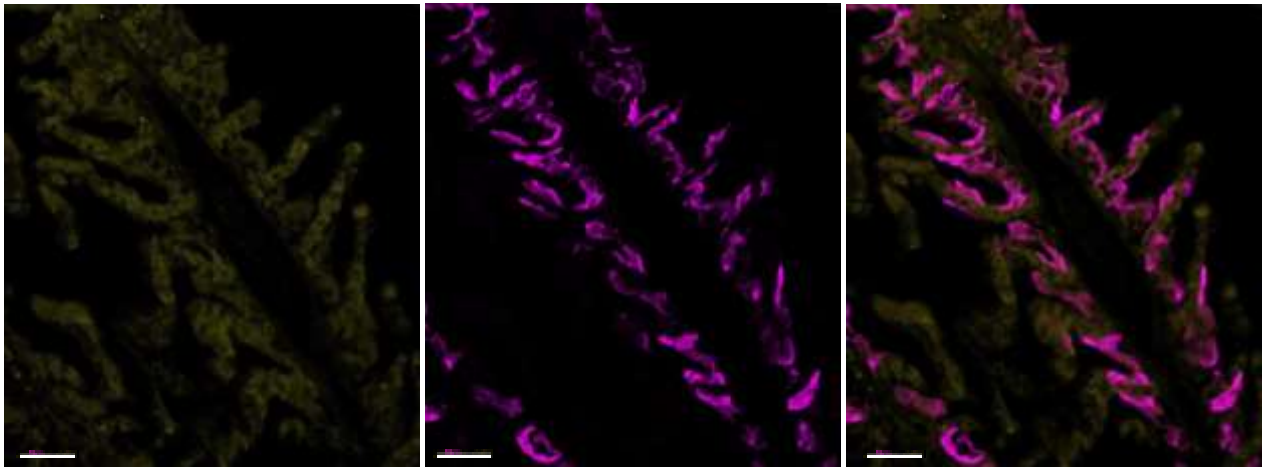
圖四十五、酸性環境中螢光顯微鏡下斑馬魚鰓的染色結果，紅色為檸檬酸合成酶(CS)，綠色為鈉鉀幫補(NKA)，可由右圖看到 CS 與 NKA 不完全分布同一個細胞內。比例尺=10 μ m。

2、觀察青鱗魚鰓部位在酸性及中性環境下醣類代謝酵素分布變化

將青鱗魚鰓部位經免疫螢光染色處理後，在中性環境下有部分 CS 出現在 NKA 所標定的離子細胞以外的細胞(圖四十六)。而在經過酸化處理後，青鱗魚鰓部位的細胞中，可以看出 CS 的訊號明顯減少(圖四十七)。



圖四十六、酸性環境中螢光顯微鏡下青鱗魚鰓的染色結果，黃色為檸檬酸合成酶(CS)，紫色為鈉鉀幫補(NKA)，可由右圖看到 CS 開始出現在由 NKA 標定的離子細胞外的不同細胞。比例尺=10 μ m。



圖四十七、酸性環境中螢光顯微鏡下青鱗魚鰓的染色結果，黃色為檸檬酸合成酶(CS)，紫色為鈉鉀幫補(NKA)，可由右圖看到 CS 在酸性環境下的訊號明顯減少。比例尺 =10 μ m。

二、討論

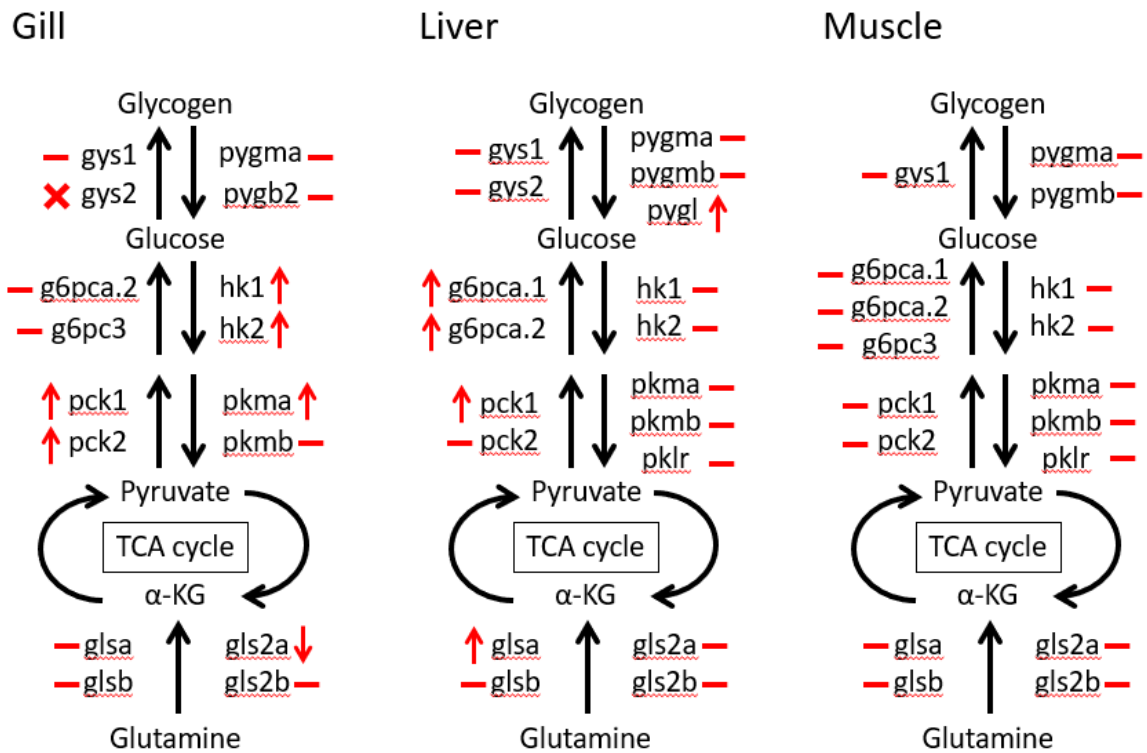
在斑馬魚的 qPCR 的實驗結果中，我們發現鰓部位內參與糖解作用酵素(*hk,pk*)、參與糖質新生酵素(*pck*)的基因表現量增加，而參與麩醯胺酸分解反應的酵素(*gls*)的基因表現量減少；肝臟內參與肝醣分解的酵素(*pygl*)、參與糖質新生酵素(*pck,g6pc*)、以及參與麩醯胺酸分解反應的酵素(*gls*)的基因表現量增加；而肌肉內測定的酵素都沒有顯著變化(圖四十八)。

我們推測在酸性環境下，鰓部位糖解作用效率提升，可能代表著在鰓部位需要消耗能量供鰓部位的離子細胞排酸。糖質新生中 *pck* 的基因表現量有提升，我們推測在酸性環境下產生大量 ATP 的同時，*pck* 基因被誘導而使糖質新生效率上升。而斑馬魚利用糖解作用所產生的丙酮酸進行克氏循環產生能量，使得麩醯胺酸分解效率下降。

肝臟內分解肝醣及糖質新生的效率提升，推測是為了產生更多的葡萄糖，並轉移給其他器官做使用，因為肝臟中的糖解作用經過酸化環境處理之後並沒有變化。麩醯胺酸分解效率上升，可能是為了驅使糖質新生進行，故將麩醯胺酸轉換成 α -酮戊二酸(α -Ketoglutaric acid, 簡稱 α -KG)，以推動糖質新生反應。

而在肌肉內，我們發現在肝醣合成及分解、糖解作用、糖質新生及麩醯胺酸分解反應的酵素基因表現量均沒有差異，可能表示著肌肉的醣類代謝過程不受酸性環境影響。

Zebrafish



圖四十八、斑馬魚各部位酵素基因表現量變化示意圖，—表示無顯著差異，↑表示在酸性環境下表現量顯著提升，↓表示在酸性環境下表現量顯著提升，×表示不表現

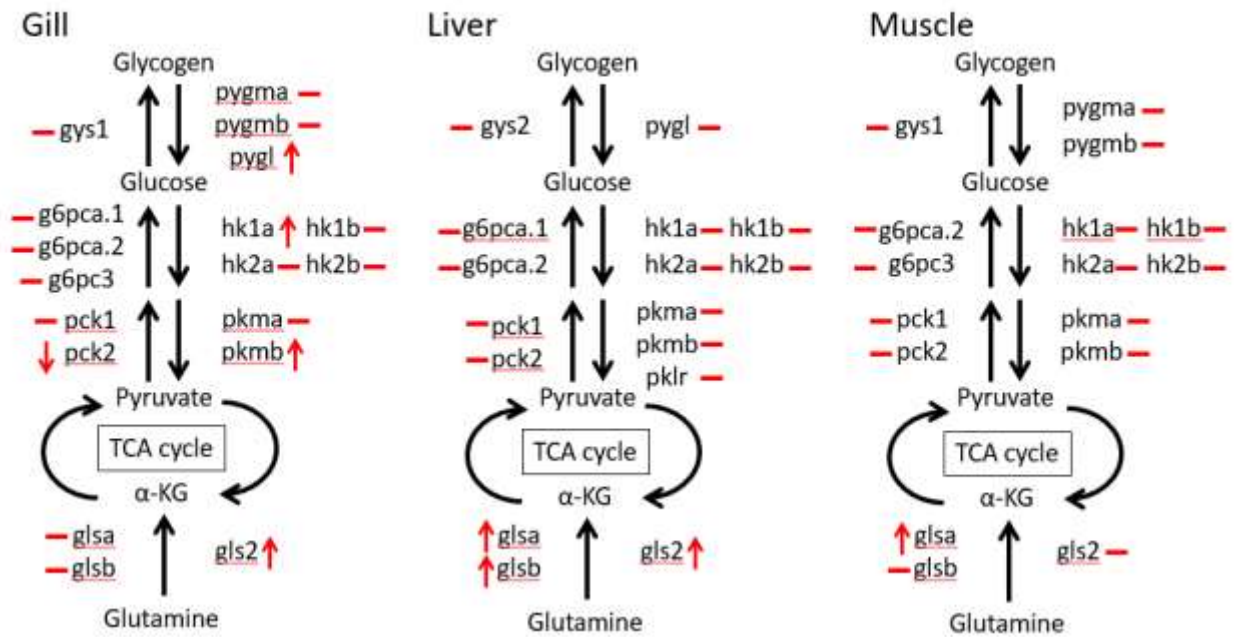
在青鱗魚的 qPCR 實驗結果中，我們發現鰓部位內參與肝醣分解酵素(*pyg*)、參與糖解作用酵素(*hk, pk*)、以及參與麩醯胺酸分解反應(*gls*)的基因表現量有增加，但參與糖質新生酵素(*pck*)的基因表現量有減少；而肝臟與肌肉內麩醯胺酸分解反應(*gls*)的基因表現量都有增加(圖四十九)。

我們推測在酸性環境下，鰓部位糖解作用效率提升，可能代表著在鰓部位需要消耗能量供鰓部位的離子細胞排酸。而鰓部位內糖質新生中 *pck* 的基因表現量有下降的趨勢，推測是青鱗魚演化出了效率較高的排酸方式，在產生大量 ATP 的同時，抑制了糖質新生的進行。

在肝臟及肌肉內，我們發現在肝醣合成及分解、糖解作用、糖質新生的酵素基因表現量均沒有差異，可能表示著肝臟及肌肉的醣類代謝過程不受酸性環境影響，也間接反映出青鱗魚所演化出的優勢。

麩醯胺酸分解反應在各部位中都有上升的趨勢，推測是因為在酸性環境下需要排出體內的氫離子，故驅使反應進行將氫離子轉換為銨離子，並運往鰓部位排出。

Medaka



圖四十九、青鱗魚各部位各酵素基因表現量變化示意圖，—表示無顯著差異，↑表示在酸性環境下表表現量顯著提升，↓表示在酸性環境下表表現量顯著提升，×表示不表現。

透過免疫螢光染色，我們觀察到斑馬魚鰓部位的細胞在酸性及中性環境中能量利用分工有改變的傾向。在中性環境下，CS 與 NKA 共同坐落在同一個細胞，但經過酸化環境處理後，除了和 NKA 共同座落同一細胞中的 CS 外，也出現了獨立表現 CS 的細胞，可能表示在酸性環境下，離子細胞需要投入更多能量於排酸，而離子細胞的粒線體為了解決急需的龐大能量需求而分化出了 CS 獨立存在的細胞，以應對更大量的能量需求。

而在青鱗魚鰓部位，CS 酵素在酸性環境下有明顯減少的傾向，代表由丙酮酸進入克氏循環減少，而由文獻可知哺乳類在酸性環境下麩醯胺酸提升進入 α -KG 參與克氏循環，我們推測青鱗魚可能有相同的現象，因此造成 CS 酵素減少與糖質新生下降。

肆、結論與應用

一、結論

- (一) 在酸性環境下，斑馬魚肝臟透過提升麩醯胺酸分解反應以推動糖質新生進行，並同步分解肝醣，以產生足夠的葡萄糖並提供給鰓部位進行排酸代謝使用。
- (二) 在酸性環境下，青鱗魚鰓部位透過肝醣分解提供更多的葡萄糖進行糖解作用，同時抑制了糖質新生反應效率，推測其演化出了高效率的排酸方法。
- (三) 在酸性環境下，青鱗魚各部位的麩醯胺酸反應效率皆上升，將氫離子轉換成銨離子，並運往鰓部位排出。

二、應用

頻繁的人類活動造成了氣候變遷，對地球環境造成了許多負面的影響，淡水環境的酸化是其中之一。水質酸化衝擊著水中的生物，導致牠們必須因應水質的酸化，在內在的生理上進行改變嘗試適應如此逆境。本研究初步探討斑馬魚以及青鱗魚在酸性環境下醣類代謝所產生的改變，可能有助於理解未來全球暖化的環境下，魚類可能的代謝策略。

伍、參考文獻

- 一、Fumiya Furukawa, Yung-Che Tseng, Sian-Tai Liu, Yi-Ling Chou, Ching-Chun Lin, Po-Hsuan Sung, Katsuhisa Uchida, Li-Yih Lin, Pung-Pung Hwang (2015). Induction of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) during Acute Acidosis and Its Role in Acid Secretion by V-ATPase-Expressing Ionocytes. *International Journal of Biological Sciences*
- 二、Yung-Che Tseng, Jia-Jiun Yan, Fumiya Furukawa, and Pung-Pung Hwang (2020). Did Acidic Stress Resistance in Vertebrates Evolve as Na^+/H^+ Exchanger-Mediated Ammonia Excretion in Fish? *BioEssays*
- 三、Yung-Che Tseng, Ruo-Dong Chen, Jay-Ron Lee, Sian-Tai Liu, Shyh-Jye Lee, and Pung-Pung Hwang (2009). Specific expression and regulation of glucose transporters in zebrafish ionocytes. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.

【評語】 050015

1. 本作品探討魚類在面對酸逆境時醣類代謝的差異。作者取用酸處理的斑馬魚與青鱈魚組織，探討 RNA 的表現。發現斑馬魚醣類代謝提升，而青鱈魚較無影響。
2. 作者的結論並沒有嚴謹的統計比較，作者對此項回答也不清楚，至為可惜。
3. 因受限法規限制，皆由他人完成，作者的工作顯得較為零散。