

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：歐柏榮博士

Advisor : Bor-Rung Ou, Ph.D.

肌肉生長抑制素對雞隻生長性狀及繁殖性能之影響

Effect of myostatin on growth and reproductive performance in  
chickens

研究生：李孟修

Graduate student : Meng-Shiu Lee

中華民國一十年十一月

November, 2011

# 東海大學碩士班研究生


## 論文口試委員審定書

畜產與生物科技學系 李孟修(學號 G98610021) 君  
所提之論文：

肌肉生長抑制素對雞隻生長性狀及繁殖性能之影響，經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文指導教授  (簽章)

畜產與生物科技學系主任  (簽章)

考試委員  (簽章)


中華民國 100 年 11 月 2 日

## 致 謝

短短的六年多，  
是我人生最大的一個轉折點。

六年前的六月二十七日，透過亞洲大學 葉貞吟班導師的介紹下，我來到了東海大學畜產與生物科技學系 歐柏榮教授的實驗室。完全沒接觸過實驗室的一個大二的小毛頭，初來乍到，在實驗室門口就遇到歐老師，領我進入老師的辦公室，也開始我的實驗室生活。

隨著一次次鍵盤的敲打，回憶一一的浮現，綜觀這六年來，在實驗室裡經歷了大學，當兵，及研究所三個人生重要的過程，而絕大部分時間，就是和歐老師實驗室的夥伴在實驗室裡完成一項項的計劃，學習到實驗技術，態度以及與他人相處的方法。

首先，要先感謝 歐柏榮教授長久以來的照顧，在一次次的實驗失敗，一次次的挫折挫敗，歐老師總是在後面作為最大的支持與指導，以及給了充分的機會及空間，鼓勵勇敢的往前飛，讓我可以透過學習這些實驗，進而學習到更多實驗以外的思考與想法，讓這本論文能夠付梓，這份論文本身並不重要，重要的是 歐柏榮教授能讓我在這實驗過程中學習到的態度以及想法，才是我這一生值得保留及前進的基礎。也要特別感謝師母 亞洲大學生物科技系 葉貞吟老師，也是我大學四年的班導師，感謝能有機會能被葉老師推薦到東海學習，在亞洲大學及東海大學期間都特別受到葉老師的實驗、課業及生活上的指導、照顧與叮嚀。此外也要感謝口試委員 鄭登貴教授與 梁佑全博士在百忙之中撥冗參加，並給與寶貴的建議與指正，使得本論文內容能夠更加地嚴謹完備充實慎密。

學習的過程中，最重要的就是學長姐與實驗室的夥伴們。一剛進實驗室，最早帶我的是梅君學姐，特別要感謝梅君學姐的耐心指導，讓我能盡快的進入實驗室生活的軌道，還有恭豪博士學長、思樺博士學姐、佑全博

士學長、秉華博士學長，柏澧學長、明軒學長，泰元學長，阿德學長、建彬學長、梅君學姐，俊凱學長，維哲學長、國維學長，助理鈞慧學姐、柏樺學長、賴滢如學姐、魏吉宏學長、楓盛學長，謝謝以上的學長姐，在我進到實驗室後，忍受我這小小跟屁蟲在各位身邊飄來飄去，問東問西，以及解決這笨手笨腳學弟的實驗問題。因為各位的無私照顧，讓實驗室真的像個家一樣，溫馨及溫暖。

還有和我大學時在東海一起實習的宜盟(孟宜二人組)，小龜(坤陽)，利儒，以及同期的小太陽(肇翔)、開成，志隆。謝謝各位讓我在東海的時間，各種雜事都有人可以一起幫忙，談天，沒有各位同學的支持，就不會有精彩的學生生涯。此外，在學期間，相互砥礪的同班同學們，兩位陪我練習英文的外籍生 Manir 及 Sultan，實驗室的所有學弟妹，張廖、詩詩、里美、子芳、子恩、韋岑…等，都是在實驗室裡實驗能夠進行的重要關鍵。

另外要特別提出來感謝的，是生科系生醫組的所有老師、研究生、以及實習生們，淑芬博士學姐、成翰博士學長、書槐博士學長、志薇博士學姐，岳峰、小布、祐萱學妹(??!)、大萬學妹、徹堃、麗雯、志豪、心怡、阿罵、怡靜、閔暄、淑閔、柏凱…等，在生科中心實驗生活期間，把我當成自己人，對實驗生活中瑣碎的事有可以傾訴的地方，以及生醫組老師們如此關心小弟的畢業，也提供不少學習英文意見做為參考，小弟感激不盡。

最後，我要感謝我的家人為我提供一個溫暖的窩，讓我可以沉澱忙碌的工作和慌亂的情緒，讓我可以全心專注在自己喜歡的事物上，不必為了生活上繁瑣的事情分心，謹以此文，獻給我摯愛的爸爸媽媽，以及在天上的爺爺與奶奶，我要告訴你們，我做到了。

李孟修 謹誌於  
東海大學畜產與生物科技學系 碩士班  
中華民國一百年十一月

# 目次

目次.....	I
圖表目次.....	III
摘要.....	1
前言.....	2
文獻回顧.....	3
壹、試驗動物介紹 .....	3
一、來亨蛋雞 .....	3
二、來亨蛋雞之生殖系統 .....	3
貳、肌肉生長抑制素基因 .....	6
一、動物肌肉生長抑制素基因與蛋白質結構 .....	7
二、動物肌肉生長抑制素之生理功能 .....	9
三、肌肉生長抑制素與動物生殖之關係 .....	11
參、激活素及抑制素 .....	14
材料與方法.....	20
壹、試驗動物.....	20
貳、主動免疫之多株抗體製備 .....	21
參、RNA 之萃取.....	24
肆、反轉錄聚合酶連鎖反應 .....	25
伍、抑制素 $\alpha$ ，激活素 $\beta A$ 及激活素 $\beta B$ 基因之選殖.....	28
陸、抑制素 $\alpha$ ，激活素 $\beta A$ 及激活素 $\beta B$ 重組蛋白之製備 .....	32
柒、蛋白質定量.....	34
捌、西方點墨法.....	34
玖、雞蛋蛋黃之水溶性 IgY 萃取 .....	37

壹拾、即時定量聚合酶連鎖反應 .....	38
壹拾壹、統計分析 .....	42
結果.....	43
壹、肌肉生長抑制素基因之選殖 .....	43
貳、抑制素 $\alpha$ ，激活素 $\beta A$ 及激活素 $\beta B$ 基因之選殖 .....	43
參、抑制素 $\alpha$ ，激活素 $\beta A$ 及激活素 $\beta B$ 重組蛋白之製備 .....	45
肆、雞隻主動免疫試驗產生之 IgY 與肌肉生長抑制素，抑制素及 激活素之重組蛋白親和性試驗 .....	47
伍、肌肉生長抑制素 I/II，抑制素 $\alpha$ 及激活素 $\beta A$ & $\beta B$ 之雞隻主 動免疫試驗對雞隻增重及各器官重量之影響 .....	50
陸、肌肉生長抑制素 I/II，抑制素 $\alpha$ 及激活素 $\beta A$ & $\beta B$ 之雞隻主 動免疫試驗對雞隻產蛋率之影響 .....	52
柒、肌肉生長抑制素 I/II，抑制素 $\alpha$ 及激活素 $\beta A$ & $\beta B$ 之雞隻主 動免疫試驗對雞隻濾泡發育之影響 .....	53
捌、肌肉生長抑制素 I/II，抑制素 $\alpha$ 及激活素 $\beta A$ & $\beta B$ 之雞隻主 動免疫試驗對雞隻腦下垂體內泌素基因之影響 .....	56
討論.....	87
壹、試驗設計.....	87
貳、肌肉生長抑制素，激活素及抑制素對雞隻生長性狀之影響 .....	89
參、肌肉生長抑制素，激活素及抑制素對雞隻生殖性狀之影響 .....	91
結論.....	97
英文摘要.....	98
參考文獻.....	98
小傳.....	114

## 圖表目錄

表 一、試驗設計之胜肽序列 .....	22
表 二、試驗設計之聚合酶連鎖反應引子 .....	26
表 三、試驗設計之聚合酶連鎖反應引子條件 .....	26
表 四、膠體電泳之成份及比例 .....	35
表 五、反轉錄聚合酶連鎖反應之反應條件 .....	38
表 六、即時定量聚合酶連鎖反應之反應條件 .....	39
表 七、反轉錄聚合酶連鎖反應之反應條件 .....	39
表 八、試驗採用之即時定量引子設計 .....	41
表 九、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體對雞 隻增重及各組織重量之影響 .....	82
表 十、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體對雞 隻卵巢、腹脂重量及濾泡數之影響 .....	83

圖 一、反轉錄聚合酶連鎖反應之反應條件 .....	25
圖 二、從來亨蛋雞卵巢擴增抑制素 $\alpha$ , 激活素 $\beta A$ 及激活素 $\beta B$ 基因 .....	58
圖 三、抑制素 $\alpha$ , 激活素 $\beta A$ 及激活素 $\beta B$ 基因以 T/A Cloning 接合至 pCR <sup>®</sup> 2.1 質體 .....	59
圖 四、肌肉生長抑制素, 抑制素 $\alpha$ , 激活素 $\beta A$ 及激活素 $\beta B$ 基因接合至 pQE80L 質體 .....	60
圖 五、抑制素 $\alpha$ -pQE80L 之建構 .....	61
圖 六、激活素 $\beta A$ -pQE80L 之建構 .....	62
圖 七、激活素 $\beta B$ -pQE80L 之建構.....	63
圖 八、肌肉生長抑制素重組蛋白在不同誘導時間之 SDS-PAGE 膠體電泳分析.....	64
圖 九、抑制素 $\alpha$ 重組蛋白在不同誘導條件之 SDS-PAGE 膠體電泳分析.....	65
圖 十、激活素 $\beta A$ 重組蛋白在不同誘導條件之 SDS-PAGE 膠體電泳分析.....	66
圖 十一、激活素 $\beta B$ 重組蛋白在不同誘導時間之 SDS-PAGE 膠體電泳分析 .....	67
圖 十二、肌肉生長抑制素重組蛋白之純化 .....	68
圖 十三、抑制素 $\alpha$ 重組蛋白之純化 .....	69
圖 十四、激活素 $\beta A$ 重組蛋白之純化 .....	70
圖 十五、激活素 $\beta B$ 重組蛋白之純化 .....	71
圖 十六、肌肉生長抑制素、激活素 $\alpha$ 、抑制素 $\beta A$ 及抑制素 $\beta B$ 重組蛋白之純化測試 .....	72
圖 十七、肌肉生長抑制素 I 組主動免疫所產生之 IgY (1 : 250 稀釋	



倍數) 與肌肉生長抑制素重組蛋白之結合試驗.....	73
圖 十八、肌肉生長抑制素 II 組主動免疫所產生之 IgY (1:250 稀釋 倍數) 與肌肉生長抑制素重組蛋白之結合試驗.....	74
圖 十九、抑制素組主動免疫所產生之 IgY (1:1000 稀釋倍數) 與 抑制素 $\alpha$ 重組蛋白之結合試驗.....	75
圖 二十、激活素組主動免疫所產生之 IgY (1:1000 稀釋倍數) 與 激活素 $\beta A$ 重組蛋白之結合試驗.....	76
圖 二十一、激活素組主動免疫所產生之 IgY (1:1000 稀釋倍數) 與激活素 $\beta B$ 重組蛋白之結合試驗.....	77
圖 二十二、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體 對雞隻每月體重之影響.....	78
圖 二十三、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體 對雞隻總產蛋數之影響.....	79
圖 二十四、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體 對雞隻不同時間內產蛋量之影響.....	80
圖 二十五、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體 對雞隻增重之影響.....	81
圖 二十六、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體 對雞隻大卵黃濾泡 (>12 mm) 發育之影響.....	84
圖 二十七、以即時定量 PCR 分析雞腦垂腺之 <i>GnRH-1</i> 基因表現.....	85
圖 二十八、以即時定量 PCR 分析雞腦垂腺之 <i>FSH-<math>\beta</math></i> 基因表現.....	86

# 摘要

本研究主要目的為探討肌肉生長抑制素，激活素及抑制素對生長性狀及繁殖性能之影響。試驗中選用 25 週齡之 23 隻來亨蛋雞，逢機分成對照組、肌肉生長抑制素 I 組、肌肉生長抑制素 II 組、激活素組、抑制素組等五組。試驗以合成之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素胜肽作為抗原，利用主動免疫方式，誘發產蛋母雞產生抗體，藉此中和動物體內此三種蛋白質之活性。試驗中並詳細記錄各組雞隻每月之體重及每日產蛋率。並於第四次追加免疫注射後，進行雞隻犧牲，記錄各組織重量、並摘取卵巢以計算小卵黃濾泡數量 (small yolk follicles, SYF; 6-12 mm) 及白色濾泡數量 (white follicles, WF; 2-6 mm)。試驗結果顯示，注射肌肉生長抑制素組具有增加雞隻體重之表現，激活素組則有相反之結果；注射肌肉生長抑制素 II 組及激活素組皆顯著抑制產蛋表現；肌肉生長抑制素 II 組及激活素組之小卵黃濾泡及白色濾泡數目皆低於對照組。即時定量 PCR 之結果顯示，肌肉生長抑制素組及激活素組皆有抑制激濾泡素 (*FSH-β*) 及激性腺素釋放素 (*GnRH-1*) 之 mRNA 的趨勢，綜合上述試驗結果發現，肌肉生長抑制素組能增加雞隻體重，激活素組則與肌肉生長抑制素組有相反之結果，此外，肌肉生長抑制素組及激活素組皆會抑制濾泡生成及繁殖性能，因此，結果證明肌肉生長抑制素在雞隻繁殖上扮演非常重要之角色。

(關鍵字：濾泡生成、生長性狀、肌肉生長抑制素、繁殖性能)

# 前言

過去數十年，畜產專家及生產者透過育種的方式選拔出優良品系及高比例肌肉發育之家禽及家畜，包含具有雙倍（double muscle）肌肉表現型的家禽與家畜。在 1997 年由 McPherron 和 Lee（McPherron *et al.*, 1997b）從具有雙倍肌肉表現型的牛（Belgian Blue and Piedmontese）中發現其關鍵基因為肌肉生長抑制素（*myostatin*），近年來鮮少有科學家以生殖生理角度上研究此基因對繁殖力之影響。過去在育種報告上可觀察到雙倍肌肉表現型母牛會導致產仔性能顯著低落之情事；在本研究團隊亦透過主動免疫（active immunization）方式，證明小鼠濾泡之發育可受到肌肉生長抑制素之處理而降低其濾泡發育；就訊息傳導機制而言，肌肉生長抑制素與激活素（activin）二者分別皆透過相同之接受子與訊號傳導機制而達成其生理調控功能，其中激活素最主要之功能為誘發激濾泡素（FSH），俾促使濾泡發育之關鍵因子。基於上述討論，本試驗旨在透過主動免疫策略，藉由人工合成之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素胜肽作為抗原，試圖分別誘發產蛋母雞產生其相對之抗體，俾有效中和或降低動物體內前述三種蛋白質之活性，從而釐清肌肉生長抑制素及激活素對於雞隻繁殖力可能扮演之角色，並證明其作用機制。

# 文獻回顧

## 壹、 試驗動物介紹

### 一、 來亨蛋雞

單冠白色來亨蛋雞 (Leghorn chicken) 係來亨雞之若干變種之一，在市場上最常被用於商業用蛋雞。來亨雞具有黃表皮、白色羽毛、黃色腳脛與產白殼蛋之特徵，其初產日齡為 152 ~ 172 天，約在 22 週齡後開始產蛋。來亨蛋雞初產體重為 1465 ~ 1618 公克，通常在 30 ~ 32 週齡左右到達產蛋高峰 (鍾，2004)。

### 二、 來亨蛋雞之生殖系統

#### 1. 下視丘：

下視丘 (hypothalamus) 在調節卵巢功能方面，扮演非常重要之角色。下視丘透過激性腺素釋放素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 刺激腦垂腺前葉分泌排卵素 (luteinizing hormone, LH) 及激濾泡素 (follicle-stimulating hormone, FSH)，而 GnRH 之分泌，係由其他腦中心控制，特別是光照影響到光受體 (photoreceptor)，再間接影響到下視丘激性腺素釋放素之分泌。暴露於長日照下，可提高激性腺素釋放素之分泌，轉而升高

血漿中激濾泡素及排卵素之濃度，進而支持卵巢生長與卵巢中之濾泡體系。

## 2. 腦垂腺：

腦垂腺(pituitary gland)位於間腦底部，視神經交叉的後方。若將產蛋雞隻腦垂腺前葉除去，則黃色濾泡開始萎縮至消失，若復投與腦垂腺萃取物於雞隻中，黃色濾泡即會開始出現，故濾泡的成長，與腦垂腺有極密切的關係。而腦垂腺前葉可分泌九種內泌素，其中與產蛋相關者，如激濾泡素(FSH)、排卵素(LH)為醣蛋白類(glycoprotein)。激濾泡素與排卵素由 $\alpha$ 及 $\beta$ 兩個次單元所組成，其二者之 $\alpha$ 次單元相同而 $\beta$ 次單元不同(Noce, 1989; Shen, 2002)。此二者內泌素之分泌是經激性腺素釋放素(GnRH)刺激，透過不同的循環路徑，表現出不同的功能。在雌性排卵周期，激濾泡素扮演著誘導濾泡之生成，並可刺激動情素(estrogen)的增加，而排卵素，除了加強膽固醇的可利用性，同時也產生排卵素潮湧(LH surge)，進而誘發濾泡之排出。

## 3. 卵巢：

在成熟之產蛋母雞中，其右側卵巢(ovary)已退化消失，僅剩左側卵巢機能發達及功能正常。雌雞生長至四月齡後可見

其卵巢呈淡黃色、平坦且不規則之形狀，而進入產蛋周期之雌雞卵巢，可概分為數目最多的白色大濾泡(large white follicle, LWF)與白色小濾泡(small white follicle, SWF)，數個直徑 6-12 mm 之小卵黃濾泡(small yolk follicle, SYF)與直徑大於 12 mm 之大卵黃濾泡(large yolk follicle, LYF)。在功能上，具快速生長以及類固醇生成能力(steroidogenesis)之濾泡，在學理上稱為排序濾泡(hierarchical follicle)，在此試驗將直徑大於 12 mm 之大卵黃濾泡歸為此類，並可依直徑大小分為排卵前最大濾泡(F1)、排卵前第二大濾泡(F2)、排卵前第三大濾泡(F3)等，依此類推(Bahr, 1991)

#### 4. 卵巢排卵周期：

排卵周期(ovulatory cycle)為各次連續排卵之間距，蛋雞的產蛋周期約 25-27 小時，於產蛋後 15-45 分鐘繼續排下一顆卵(Johnson and van Tienhoven, 1980)，其排卵機制受排卵前後之內分泌素影響。在產蛋週期中，排卵素分泌量隨著排卵時間之接近而漸增，其排卵素潮湧在排卵前 4~6 小時發生，並刺激卵巢濾泡之排出，而濾泡素之分泌在此階段無明顯變化(Krishman *et al.*, 1993)。直徑小於 9 mm 的排序前濾泡(prehierarchical follicle)，

則主要受到由激濾泡素引發之 protein kinase A (PKA) 訊息傳導路徑所調控，但隨著濾泡進入排序後，受到激濾泡素調控的程度漸減，而對排卵素的刺激反應增加，使助孕素 (progesterone, P4) 分泌量提高，而刺激腦垂腺產生排卵素潮湧並誘發促進排卵之發生 (Johnson and van Tienhoven, 1984)。

## 貳、 肌肉生長抑制素基因

肌肉生長抑制素 (myostatin; GDF-8) 基因被剔除 (knockout) 之小鼠，性狀表現上可以發現骨骼肌肉增加，並可同時發現骨骼纖維細胞有肥大 (hypertrophy) 及細胞數目增加 (hyperplasia) 之情形 (McPherron *et al.*, 1997a)，而此基因在 1997 年由 McPherron 和 Lee 從具有雙倍肌肉表現型 (double muscle phenotype) 的牛 (Belgian Blue and Piedmontese) 中所發現，又名為 Growth/Differentiation Factor-8 (GDF-8)，屬於 TGF- $\beta$  家族成員之一，對於動物骨骼肌肉上扮演負調節的角色 (McPherron *et al.*, 1997a; McPherron and Lee, 1997b)。

## 一、 動物肌肉生長抑制素基因及其蛋白質結構

至今約有超過二十幾種脊椎動物之肌肉生長抑制素基因被發表在各類期刊上 (McPherron and Lee, 1997a; McPherron and Lee, 1997b; Ostbye *et al.*, 2001; Rescan *et al.*, 2001; Roberts and Goetz, 2001; Rodgers and Weber, 2001; Rodgers *et al.*, 2001; Kocabas *et al.*, 2002)，其中有若干報告指稱，在不同品系之魚類間發現有兩種長短不等肌肉生長抑制素基因之存在 (Ostbye *et al.*, 2001; Rescan *et al.*, 2001; Roberts and Goetz, 2001)。透過比對肌肉生長抑制素蛋白質之序列，可發現各物種間，其 C 端區域相似度極高，例如小鼠、大鼠、豬、雞以及火雞之相似度高達 100%；在狒狒、牛及綿羊只有 1~3 個胺基酸不同，而斑馬魚則與前述動物僅有 88% 之相似度 (McPherron and Lee, 1997b)。在演化過程裡，如此高的相似度或許正說明肌肉生長抑制素基因的存在極為重要，也或許具有高度保留的功能性，但這仍需科學家進一步證明之。

與其他 TGF- $\beta$  家族成員一樣，肌肉生長抑制素之前驅 (precursor) 蛋白質以雙硫鍵結合成同合子 (homodimer)，並經過兩次蛋白質水解 (proteolytic)，最後形成分子量約 28 kDa，具有生物活性之肌肉生長抑制素 (Lee and McPherron, 2001; Thies *et*



*al.*, 2001)。第一次蛋白質水解發生在移除 N 端 24 個胺基酸之訊號勝肽 (signal peptide)，而第二次蛋白質水解則發生在第 240~244 個胺基酸之 R-S-R-R (Arg-Ser-Arg-Arg) 位置，由 PACE (paired dibasic amino acid-cleaving enzyme，或稱 furin) 進行水解。具有生物活性之肌肉生長抑制素也會被水解後的 N 端前驅蛋白 (propeptide) 所結合，並阻止肌肉生長抑制素與細胞表面的受體 (receptor) 結合，進而抑制肌肉生長抑制素之作用 (Lee and McPherron, 1999; Thies *et al.*, 2001)。實驗也證明透過基因轉殖技術產生之小鼠大量表現肌肉生長抑制素之 N 端前驅蛋白，能有效增加小鼠的肌肉重量，其與肌肉生長抑制素剔除小鼠有相似之結果 (Lee and McPherron, 2001; Yang *et al.*, 2001)。另外，利用肌肉生長抑制素前驅蛋白 (propeptide form) 製造出多株抗體，注射於授精後肉雞蛋 (broiler egg) 之蛋黃部份後，觀察到此批肉雞於出生 35 天後，顯著抑制體重及肌肉重量 (Kim, *et al.*, 2007)，此多株抗體對 N 端前驅蛋白具有高度親和性，而對具有生物活性之肌肉生長抑制素的親和性則較低。此實驗結果與上述實驗之結論相互印證。

## 二、 動物肌肉生長抑制素之生理功能

追溯歷史，自然界中有許多動物帶有肌肉生長抑制素突變基因，因而出現雙倍肌肉性狀，如比利時藍牛 (Belgian Blues)，被發現其肌肉生長抑制素 DNA 序列中第三個外顯子(exon)上，少了 11 個核苷酸，而造成後續之 DNA 框架平移 (frame-shift)，其突變之位置為肌肉生長抑制素之 C 端序列，進而影響具有生物功能之肌肉生長抑制素蛋白質形成。分析其屠體性狀，發現平均骨骼肌肉重量增加了 20~25%，其腹脂 (intramuscular fat) 及結締組織則相對減少；而另一雙倍肌肉表現之皮特艾蒙牛 (Piedmontese)，則是只有在第三外顯子上發現單一核苷酸的突變 (G to A)，造成其胺基酸序列中的半胱氨酸 (cysteine) 轉變成為酪氨酸 (tyrosine)，此轉變造成肌肉生長抑制素幾乎完全地失去了原有之活性 (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron *et al.*, 1997b; Grobet *et al.*, 1998)。亦有作者利用 C 端肌肉生長抑制素之單株抗體注射至授精後肉雞蛋 (broiler egg) 之蛋黃部份，觀察 35 天後發現注射肌肉生長抑制素單株抗體至蛋黃部份之小雞，可顯著增加體重(4.2%)及肌肉質量(5.5%; Kim *et al.*, 2006)

報告指出，肌肉生長抑制素抑制肌原細胞（myoblast）增生是透過 Rb 蛋白質之磷酸化，進而影響細胞週期中之 G1 期到 S 期之進程（Thomas *et al.*, 2000）。同時，添加肌肉生長抑制素至培養中之 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 肌原細胞，可觀察到 p21 的高度表現及 Cdk2 之表現被抑制（Rios *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001）。除了上述影響細胞周期表現而導致肌肉表現受影響，也有透過活化素二型接受子/活化素受體激酶接受子複合體（ActRII/ALK complex），誘發下游 Smad2/3（small mothers against decapentaplegic 2/3）分子之磷酸化作用，而經磷酸化之 Smad2/3 與 Smad4 形成複合體進入細胞核內，進而調節與肌肉發育相關之基因（如 myoD, myogenin...等）表現。試驗證明利用小片段干擾 RNA（siRNA）抑制 Smad2/3 表現，不僅可以誘發 Akt/mTOR/p70s6 訊息傳遞造成細胞中蛋白質的合成，同時，經活化後之蛋白質激酶 B（protein kinase B; Akt）會透過抑制下游 FoxO 蛋白質去磷酸化路徑轉而有效抑制肌肉中蛋白質之降解（Sartori *et al.*, 2009; Trendelenburg *et al.*, 2009）。綜合上述，肌肉生長抑制素可透過其訊號傳導路徑，影響與肌肉中蛋白質合成及降解之機制，進而影響骨骼肌之發育。

### 三、 肌肉生長抑制素與動物生殖之關係

肌肉生長抑制素在 1997 年被發現以來，皆是以研究其與肌肉發育之關係為主。但遠在 1988 年，當時的數據結果就可窺見，當母牛為”雙倍肌肉性狀”時，與公牛交配所得出的仔畜數量遠低（約少 55%~62%）於正常交配之仔畜量（Arthur *et al.*, 1988a; Arthur *et al.*, 1988b），實驗中也發現小牛出生率顯著的降低，其死胎率（stillbirths）與小牛生產後死亡率（postpartum death）也顯著高於正常性狀交配之牛隻。根據上述結果，可推斷肌肉生長抑制素可能與繁殖性能有相關。本實驗室先前利用主動免疫之方式，以肌肉生長抑制素胜肽做為抗原注入母鼠後，發現其窩仔數顯著的下降，進一步分析注射肌肉生長抑制素胜肽之母鼠，其排卵數與卵巢之濾泡成熟率皆顯著低於對照組，而此濾泡經過培養，皆可順利從單細胞分裂成二細胞，此結果顯示，肌肉生長抑制素會影響母鼠卵巢之濾泡生成，而不影響濾泡成熟後之發育過程（Liang *et al.*, 2007）。先前的研究報告指出，肌肉生長抑制素在雞的各組織分佈上與其他物種略有不同，雞大部份的組織皆可發現肌肉生長抑制素之 mRNA 表現，除了骨骼肌肉，卵巢及睪丸亦有高量之表現（Kubota *et al.*, 2007; Sundaresan *et al.*, 2008）。此

結果顯示肌肉生長抑制素與雞之生殖發育調節有著相當重要之關係。

以肌肉生長抑制素之訊息傳導路徑來看，肌肉生長抑制素透過細胞膜上的激活素二型接受子（activin type II receptor, ActRIIA 或 ActRIIB）連結，其中又與 ActRIIB 連結能力較強（Lee and McPherron, 2001；Rebbapragada *et al.*, 2003）。肌肉生長抑制素與 activin type II receptor 連結後，吸引 activin type I receptor（或稱 activin receptor-like kinase, ALK）中的 ALK 4 及 ALK 5 傳遞肌肉生長抑制素的訊息（Tsuchida *et al.*, 1996；Rebbapragada *et al.*, 2003；Lee *et al.*, 2005）。ActRII 誘發 ALK 4 及 ALK 5 上之絲胺酸/酰胺酸激酶，磷酸化 Smad2/Smad3 蛋白質，並與 Smad4 蛋白質進到細胞核內調節肌肉轉錄因子（如 MyoD, Myf5, MRF4 and myogenin）之表現（Rudnicki *et al.*, 1992; Rudnicki *et al.*, 1993）。Activin type II receptor（ActRIIA 或 ActRIIB）亦是激活素之接受子，激活素透過 ActRIIA 或 ActRIIB 接受子接受激活素之訊息，吸引下游之 ALK4 或 ALK7 磷酸化 Smad2 / Smad3 蛋白質進到細胞核內調節轉錄因子基因表現（Harrison *et al.*, 2004; Tsuchida, 2004; Harrison *et al.*, 2005; Tsuchida *et al.*, 2008）。

近年來的報告顯示，可抑制肌肉生長抑制素表現的因子包含肌肉生長抑制素前驅胜肽 (myostatin propeptide)、濾泡抑制素 (follistatin)、突變激活素二型接受子 B 型 (ActRIIB)，及肌肉生長抑制素抗體，實驗利用骨骼肌特異性啟動子所產生的基因轉殖小鼠，表現高量之肌肉生長抑制素前驅胜肽 (myostatin propeptide)、濾泡抑制素 (follistatin)、突變激活素二型接受體 (ActRIIB)，及利用腹腔注射肌肉生長抑制素抗體於小鼠，來測試其抑制肌肉生長抑制素的影響，並觀察肌肉重量，纖維大小，和纖維數目之改變，其結果顯示肌肉生長抑制素前驅胜肽、卵泡抑制素、突變激活素二型接受體，及肌肉生長抑制素抗體均能有效抑制肌肉生長抑制素的影響，並增加小鼠骨骼肌肉之重量及其纖維大小及數量之改變 (Lee and McPherron, 2001; Bogdanovich *et al.*, 2002; Bogdanovich *et al.*, 2005; Bogdanovich *et al.*, 2005; Lee, 2007; Nakatani *et al.*, 2008; Gilson *et al.*, 2009)。

其中之突變活化素二型接受體與卵泡抑制素皆與激活素有著密切之關係，激活素二型接受體為肌肉生長抑制素與激活素之共同受體，卵泡抑制素在動物體內最早發現與激活素結合，而抑制濾泡素 (FSH) 之分泌，進而抑制濾泡成熟，之後更有研究證實

卵泡抑制素與肌肉生長抑制素具有高度親和性 (Nakatani *et al.*, 2008)。

故根據上述結果可得知肌肉生長抑制素與激活素會藉由一相同之路徑進行訊息傳導 (ActRIIB-ALK4-Smad2/Smad3)，而在生理或內分泌層面上可能有類似之影響，即肌肉生長抑制素及激活素皆會影響生殖及肌肉生長。由先前本實驗團隊的研究結果，可發現肌肉生長抑制素參與生殖生理之調節，而本試驗將以肌肉生長抑制素影響生殖生理為主軸，探討肌肉生長抑制素及激活素在產蛋率、卵巢濾泡之生成、內源性之 *FSH-β* 及 *GnRH-1* mRNA、體重、組織重量之影響，以了解肌肉生長抑制素與激活素在雞隻繁殖力所扮演之角色及其機制。

### 參、 激活素及抑制素

濾泡發育之機制受下視丘—腦垂腺—性腺的軸線所控制，維持內分泌系統中的促性腺激素 (gonadotrophins)，激濾泡素 (FSH)，排卵素 (LH) 及與卵巢發育相關之賀爾蒙與胜肽。透過一系列複雜的神經內分泌，旁泌和自泌信號，驅動濾泡生成、成熟及釋放 (Tilly *et al.*, 1991a, Tilly *et al.*, 1991b)，其中包含激活素及抑制素兩類重要之胜肽 (Lovell *et al.* 2002)。在哺乳類中，激活素及

抑制素被認為與濾泡發育及成熟有極密切之關係(Robertson *et al.*, 1985 ; Ling *et al.*, 1986 ; Robertson *et al.*, 1986 ; Vale *et al.*, 1986; Knight *et al.*, 2005)。激性腺素釋放素為一刺激激濾泡素合成及分泌之重要激素，實驗證明在血清中之激濾泡素約有 50~67%是受到激性腺素釋放素所影響 (Culler and Nagro-Vilar, 1986)。在大鼠注射濾泡抑制素 (follistatin) 實驗中，注射 80  $\mu$ g 濾泡抑制素到大鼠體內可發現血清中之激濾泡素在 4~5 小時即降低 50%。添加濾泡抑制素抑制體內之激活素及骨形成蛋白因子 (bone morphogenetic proteins, BMPs)，其血液中之激濾泡素降低速度遠大於添加激性腺素釋放素拮抗劑，實驗結果可顯示激活素及骨形成蛋白因子對激濾泡素之影響大於激性腺素釋放素。透過上述實驗可觀察到濾泡抑制素在大鼠體內作用之最高量為每隻大鼠 0.8~1 mg，其抑制激濾泡素效率可達 90~95% (DePaolo *et al.* 1991)。

激活素及抑制素是從腦垂腺體分泌的蛋白質激素，其功能為激活或抑制腦垂腺釋放激濾泡素，此類荷爾蒙被分類為轉化生長因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 家族之成員之一。除了激活素及抑制素，在轉化生長因子家族之成員中，亦有報告指



出骨形成蛋白因子 6 與 7 (BMP6 and 7) 也具有誘發激濾泡素之作用 (Huang *et al.*, 2001)。

激活素及抑制素在結構上高度保留但其功能相異，激活素及抑制素皆是由二聚體醣蛋白所組成，激活素是以兩個  $\beta$  次單元 ( $\beta_A$  或  $\beta_B$ ) 以雙硫鍵結合， $\beta_A$ - $\beta_A$  結合成為激活素 A， $\beta_A$ - $\beta_B$  結合成為激活素 AB，而  $\beta_B$ - $\beta_B$  結合成為激活素 B；抑制素是以一個  $\alpha$  次單元與兩個  $\beta$  次單元 ( $\beta_A$  或  $\beta_B$ ) 以雙硫鍵結合， $\alpha$ - $\beta_A$  結合成為抑制素 A，而  $\alpha$ - $\beta_B$  結合成為抑制素 B (Ling *et al.*, 1986)。先前之實驗證明了，激活素 A、激活素 B 及激活素 AB 皆會誘發激濾泡素之分泌 (Ling *et al.*, 1986; Vale *et al.*, 1986)。與其他 TGF- $\beta$  家族成員一樣，激活素之  $\beta$  次單元生合成也有相同之結構，分為前驅 (precursor) 蛋白以及成熟 (mature) 蛋白，在成熟蛋白區具有九個高度保留之半胱胺酸 (cysteine)，可用來形成同合子 (homodimer)、異合子 (heterodimer) 或三級結構 (Mason, 1994)。

激活素 A 是到目前為止研究最廣泛之激活素，包含中胚層之誘導 (McDowell and Gurdon, 1999)、維持多能性胚胎幹細胞功能 (Beattie *et al.*, 2005)、生殖生理 (de Kretser *et al.*, 2002)、紅血

球分化(Maguer-Satta *et al.*, 2003)、全身性發炎(Jones *et al.*, 2004)、細胞死亡之誘導(Chen *et al.*, 2006)、創傷癒合(Munz *et al.*, 1999)、及肝纖維化(Werner and Alzheimer, 2006)。小鼠激活素 $\beta_A$ 次單元剔除實驗發現會影響小鼠之顏面發展及造成出生後立即死亡的缺陷(Matzuk, 1995)，另外，在體外肝臟細胞實驗，發現激活素 A 可抑制 DNA 合成之有絲分裂過程，以及誘發細胞凋亡(Schwall *et al.*, 1993; Yasuda *et al.*, 1993; Hully *et al.*, 1994)。當在進行肝臟重建(regeneration)時，激活素 $\beta_A$ 次單元之基因表現會下降，肝細胞會開始複製直到肝臟重建完成(Gold *et al.*, 2005)。而當部份肝臟切除，激活素 $\beta_A$ 次單元表現量會提高(Zhang *et al.*, 1997; Date *et al.*, 2000)。

在抑制素之研究，到目前為止，科學家一致相信抑制素主要透過卵巢及睪丸所分泌，並經由血液循環到腦下垂體並且作用於此，藉以抑制激濾泡素之分泌。男性之抑制素由賽透力細胞(Sertoli cell)所分泌(Steinberger and Steinberger, 1976; Roberts *et al.*, 1989; Anawalt *et al.*, 1996; Majdic *et al.*, 1997)，女性則由顆粒細胞(Granulosa cell)所分泌(Findlay *et al.*, 2001)。在去勢公羊實驗中發現，當促性腺刺激素(GnRH)之刺激發生在腦下垂體時，

並不會影響抑制素抑制激濾泡素之作用，但若是在低量之促性腺刺激素表現時，會降低排卵生成素之水平(Tilbrook *et al.*, 2001)。  
抑制素之負回饋作用早在胎兒出生後開始進行，並在青春期達到最大敏感度 (Tilbrook *et al.*, 1999)。

抑制素為控制濾泡發育循環中之負回饋調節者，相對於抑制素，腦垂腺上之促性腺激素 (gonadotrophs) 透過刺激激活素  $\beta_A$  及  $\beta_B$  次單元旁泌 (paracrine) 機制激活激濾泡素分泌 (Robert *et al.*, 1989; Corrigan *et al.*, 1991)。注射激活素 A 於猴子之試驗，結果顯示其能誘發激濾泡素之分泌 (McLachlan *et al.*, 1989; Stouffer *et al.*, 1993)。而添加激活素 B 單株抗體至腦垂腺細胞試驗中，也可發現能減少激濾泡素之分泌 (Corrigan *et al.*, 1991; Bilezikjian *et al.*, 1993; Bilezikjian *et al.*, 1996)。在女性生殖過程中，激活素及抑制素尤其重要，在女性促進排卵而體外受精之實驗中發現，抑制素在黃體期 (luteal phase) 達到最高峰，其血液中之抑制素與助孕固酮 (progesterone) 及雌二醇 (estradiol) 有正相關，而與血液中之激濾泡素成負相關 (McLachlan *et al.*, 1987)。實驗證明，在女性月經週期中，抑制素 A 之分泌與月經週期有類似圖譜，而抑制素 B 則與抑制素 A 不同，抑制素 B 在早期至中期之濾泡

期有最高量表現，與排卵素潮湧（LH surge）有著相互呼應之關係，並於排卵後約七天降至最低點（Groome *et al.*, 1994；Groome *et al.*, 1996）。

此次本試驗也透過抑制激活素及抑制素的作用，觀察其對於產蛋率、卵巢濾泡之生成、內源性之 *FSH-β* 及 *GnRH-1* mRNA、體重、組織重量之影響，以了解激活素及抑制素在雞隻繁殖力所扮演之角色及其機制。

# 材料與方法

## 壹、 試驗動物

此試驗所使用之來亨蛋雞共 23 隻，購置於當地雞場，於 18 週齡時轉至成雞舍飼養，飼料為福壽實業股份公司之種雞料（台中沙鹿，臺灣）。餵飼方式採任飼及自由給水，光照時間為每日 14 小時，冬季時併以點燈以達 14 小時光照，並於每週進行雞舍之清潔。來亨蛋雞為人類透過育種方式所得到之極佳產蛋性能之蛋雞，通常在 30~32 周左右到達產蛋高峰（鍾，2004）。若是各處理組中之濾泡發育或濾泡生長受到影響，則雞隻產蛋率亦會產生影響及改變。試驗分成五組，對照組、肌肉生長抑制素 I 組、肌肉生長抑制素 II 組、抑制素  $\alpha$  組及激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組。

試驗結束時以針筒抽取血液樣本，置入含肝素（heparin）之抽血管中以阻止血液凝固，並在 4°C 以 3000 xg 離心 15 分鐘後留取血漿，並放置於 -20°C 保存備用。組織採樣之前，先將雞隻放血犧牲，然後分別摘取其腦垂腺、卵巢、腹脂、腦、肝臟、右腿肌肉、心臟等各部位組織，經秤重後，儘速放入 -80°C 冰箱以待後續試驗之使用。

## 貳、主動免疫之多株抗體製備

### 一、胜肽設計及合成

胜肽之設計，挑選蛋白質之親水端胜肽為候選胜肽，而本研究試驗為謀確保試驗效果，其胜肽設計位置為羧基端蛋白質之疏水端，而針對肌肉生長抑制素、抑制素及激活素，其羧基端需透過雙硫鍵形成雙體（dimer）才能與接受子結合之特性，設計肌肉生長抑制素 II 胜肽、抑制素  $\alpha$  胜肽、激活素  $\beta A$  胜肽及激活素  $\beta B$  胜肽皆接近羧基端雙體雙硫鍵形成之區域。肌肉生長抑制素 I 胜肽則是設計在羧基端 RSRR 活化區（active site），也就是肌肉生長抑制素前驅蛋白之酶切割位，亦是希望能達到遮蔽活化區之功能。另外設計胜肽時，使其結合攜帶蛋白質-KLH (keyhole limpet hemocyanin)，俾以增加其免疫反應效果；攜帶蛋白質具有高分子量以及好的抗原性，這些特性可在免疫系統引起抗原表現細胞 (APC; Antigen-presenting cells) 進行吞噬 (phagocytosis)，因而提高誘發胜肽之免疫反應。試驗設計之胜肽序列表一所示。

表一、試驗設計之胜肽序列：

Peptide name	Catalog No.	Peptide seq.	NCBI Gene Ref.	Design region
Ch_MYOSTATIN_peptide1	162858	<u>C</u> FGLDCDEHST*	AAR18244.1	268~278
Ch_MYOSTATIN_peptide2	158463	CEFVFLQKYP	AAR18244.1	313~322
Ch_Inhibin_alpha	158462	CAEGHGLSHR	AAA92569.1	275~284
Ch_Activin_betaA	158464	<u>C</u> MLYYDDGQNI*	AAA68174.1	399~408
Ch_Activin_betaB	158465	CDGRTNLCCR	AAA92569.1	280~289

\*N 端增加之 C 為連結攜帶蛋白質 KLH 之功能

## 二、 主動免疫

將合成之四組胜肽 (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 各取 150  $\mu\text{L}$  與 150  $\mu\text{L}$  佛氏完全佐劑 (Freund's complete adjuvant; Sigma, MO, USA) 充分混合至乳白色，以多點肌肉注射法注入各組試驗來亨蛋雞，12 天後各組胜肽(1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )取 150  $\mu\text{L}$  與 150  $\mu\text{L}$  佛氏不完全佐劑(Freund's incomplete adjuvant; Sigma, MO, USA) 充分混合至乳白色，以多點肌肉注射法注入各組試驗用來亨蛋雞，其後每隔一星期追加免疫一次，共追加四次。每次追加免疫後 3~4 天取蛋黃萃取 IgY 分析其抗體表現。對照組之雞隻則以不含任何胜肽之磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffered saline; PBS) 為抗原進行主動免疫。



### 參、 RNA 之萃取

抑制素  $\alpha$  (354 bp)、激活素  $\beta A$  (363 bp)、激活素  $\beta B$  (360 bp) 基因在雞卵巢皆有表現，故摘取來亨蛋雞之新鮮卵巢組織，萃取其 mRNA。取出保存於 $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱之來亨蛋雞卵巢組織，切取 0.1 克後放置含 1 mL Trizol<sup>®</sup> 試劑 (Invitrogen, CA, USA) 之均質管中，均質後加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿(choloform; Sigma, MO, USA)，混合均勻後放置冰上 10 分鐘。於  $4^{\circ}\text{C}$  環境下離心 14,000 xg，15 分鐘，取上清液置入新的 1.5-mL 離心管，並加入等量之異丙醇 (isopropanol; Sigma, MO, USA) 混勻後，放置 $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱至隔日 (約 16 小時)。取出 $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中之隔夜 RNA 樣品，於  $4^{\circ}\text{C}$  環境下離心 14,000xg，15 分鐘，去除上清液後。再加入 1 mL 之 75% 酒精，於  $4^{\circ}\text{C}$  下離心 14,000xg，5 分鐘，去除上清液，並放置抽風櫥中使酒精蒸發，蒸發完後加入 50  $\mu\text{L}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  (0.02%; Sigma, MO, USA)，均勻溶解後以分光光度計 (DU530; Beckman Coulter; CA, USA) 在波長 260nm 及 280nm 下，測定 RNA 之純度及濃度，再進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction)，RNA 樣本置於 $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

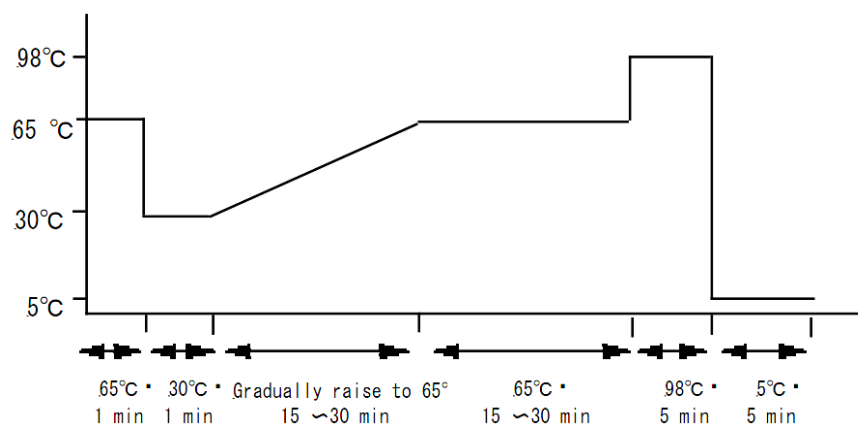
## 肆、反轉錄聚合酶連鎖反應

### 一、反轉錄作用

本試驗採用 Takara *Bca* BEST™ RNA PCR Kit (Takara, CA, USA) 進行反轉錄作用，反應條件如下：

2x Bca 1st Buffer .....	5 μL
25 mM MgSO <sub>4</sub> .....	2 μL
dNTP Mixture(10 mM).....	0.5 μL
Bca BEST™ Polymerase(22 units/μL) .....	0.5 μL
Oligo dT-Primer .....	0.5 μL
Sample RNA(500 ng total RNA).....	0.75 μL
RNase Free distilled H <sub>2</sub> O.....	to 10 μL

將上述反應物置於 ABI 9700 聚合酶連鎖反應器 (Applied Biosystems, CA, USA) 中，反應條件如下圖所示：



圖一、反轉錄聚合酶連鎖反應之反應條件。(摘錄自 Takara *Bca* BEST™ RNA PCR kit 操作手冊)

## 二、 引子之製備及聚合酶連鎖反應條件

本試驗所使用之引子如表二所示：

表二、試驗設計之聚合酶連鎖反應引子

Gene	ID	Sequence	Accession number
<b><math>\beta</math>-actin</b>	$\beta$ -actin-F	5' -GAAGCCCAGAGCAAAAGAG -3'	NM_205518
	$\beta$ -actin-R	5' -ACCAGAGTCCATCACAATACC -3'	
<b>Inhibin <math>\alpha</math></b>	Inhibin $\alpha$ -F	5' -GAGCTCTCCGCCGTGCCCTGGTC -3'	NM_001031257
	Inhibin $\alpha$ -R	5' -AAGCTTCTAGACACAGGTGCAGTCCT CGC -3'	
<b>Activin <math>\beta</math> A</b>	Activin $\beta$ A-F	5' -GAGCTCGGCCTGGAGTGTGATGGCAAA -3'	NM_205396
	Activin $\beta$ A-R	5' -AAGCTTCTATGAACAGCCACACTCCTCCACA -3'	
<b>Activin <math>\beta</math> B</b>	Activin $\beta$ B -F	5' -GAGCTCTCCGCCGTGCCCTGGTC -3'	NM_205206
	Activin $\beta$ B -R	5' -AAGCTTCTAGACACAGGTGCAGTCCTGCGC -3'	

本實驗所使用之四對引子皆委託明欣生物科技公司

(Mission Biotech., 臺北, 臺灣) 所合成, 引子皆稀釋至 10  $\mu$ M

置於-80°C 備用。各組引子其擴增產物及反應條件如表三所示:

表三、試驗設計之聚合酶連鎖反應引子條件

Gene	DNA Fragment (bp)	Reaction conditions
<b><math>\beta</math>-actin</b>	300 bp	94°C, 30 sec; 56°C, 60 sec; 74°C, 30 sec; 25 cycles
<b>Inhibin <math>\alpha</math></b>	354 bp	94°C, 30 sec; 65°C, 60 sec; 74°C, 30 sec; 35 cycles
<b>Activin <math>\beta</math> A</b>	363 bp	94°C, 30 sec; 60°C, 60 sec; 74°C, 30 sec; 35 cycles
<b>Activin <math>\beta</math> B</b>	360 bp	94°C, 30 sec; 65°C, 60 sec; 74°C, 30 sec; 35 cycles

### 三、 DNA 擴增反應 (PCR)

取經過反轉錄酶作用之 cDNA (500 ng) 1  $\mu$ L、上下游之引子各 1  $\mu$ L、Pfu DNA polymerase(5 units/ $\mu$ l; Protech, 臺北, 臺灣) 1  $\mu$ L、dNTP(10 nM)2  $\mu$ L、10X PCR 緩衝溶液(200 mM Tris-HCl, pH 8.8 at 25°C, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 20 mM MgSO<sub>4</sub>) 2  $\mu$ L, 最後添加滅菌水至總體積 20  $\mu$ L, 放入 0.25 mL PCR 反應管後置於 ABI 9700 聚合酶連鎖反應器 (Applied Biosystems, CA, USA) 中, 依據各組基因條件進行反應。

### 四、 1.5%瓊脂膠體電泳

取 1.5 g 之瓊脂糖 (agarose) 粉末 (Ameresco, OH, USA) 加入 100 mL 之 1X TAE 緩衝溶液 [1 L 之 1X TAE 緩衝溶液含 0.484% Tris base; 1.142 mL acetic acid; 2 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)], 以微波爐加熱完全溶解後再冷卻至約 60°C, 再將此溶液倒入膠體形成器, 等候凝固。凝固後之膠體, 放置於含 1X TAE 緩衝溶液之電泳槽中, 取適量之 PCR 產物與 loading dye 混合, 注入膠體孔槽中, 以 100 伏特進行電壓電泳 25 分鐘, 再將此膠體放入含 ethidium bromide (EtBr, 10 mg / ml) 之溶液 (0.5  $\mu$ L/mL EtBr stain solution) 5 分鐘後, 取出後以 UV 光觀察 PCR 產物。

## 伍、 抑制素 $\alpha$ 、激活素 $\beta A$ 、激活素 $\beta B$ 基因之選殖

### 一、 細菌及表現載體

本試驗以大腸桿菌 DH5 $\alpha$  [*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ; 基因型 SupE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 lacZ  $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 ]及大腸桿菌 BL21(DE3)[*Escherichia coli* BL21(DE3); 基因型 F- ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB-)  $\lambda$  (DE3)] 做為宿主，其菌株購自於生物資源保存及研究中心 (BCRC, 臺灣)。實驗中所使用的表現載體為 pQE80L (Qiagen, CA, USA)。

### 二、 細菌質體純化

純化質體使用的套組為 Gene-Spin™ MiniPrep Plasmid Purification Kit - V<sup>2</sup> (Protech, 台北, 臺灣)，將 1 至 5 mL 之菌液以 13,000 xg 離心 1 分鐘，收集菌體沉澱。依序加入套組中之 200  $\mu$ L solution I，以震盪器均勻懸浮菌體；再加入 200  $\mu$ L solution II，小心翻轉試管 5 至 6 次，並放置室溫 5 分鐘後，加入 300  $\mu$ L solution III，小心翻轉試管 5 至 6 次後，以 13,000 xg 離心 5 分鐘；取出上清液，放置於套組所附之離心管柱及收集管柱中，以 13,000 xg 離心 30 秒，去除收集管柱中之廢液，並在離心管柱中加入 700  $\mu$ L washing buffer，以 13,000 xg 離心 1 分鐘，重覆二次

後去除收集管柱中之廢液，並以 13,000 xg 離心 3 分鐘以去除殘留之酒精，此步驟後換去收集管柱並換上新的 1.5 mL 微量離心管，在離心管柱中滴入 50  $\mu$ L 之 elution buffer，以 13,000 xg 離心 1 分鐘即可收集到純化之質體，放置-20 $^{\circ}$ C 冰箱備用。

### 三、 PCR 產物純化

擴增出之 PCR 產物，以膠上純化方式將之純化，使用的套組為 QiAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen, CA, USA)。在 UV 照射下，迅速將目標 DNA 片段以乾淨的刀片切下，放置微量天平上測量切下膠體之重量，並放入 1.5-mL 微量離心管，取三倍量的 QG buffer 與膠體混合，放置於 50 $^{\circ}$ C 乾浴器上加熱，直到膠體完全溶解，再加入一倍量之異丙醇 (isopropanol) 混勻後，放入 QiAquick 離心管柱中並搭配 2-mL 收集管柱，以 13,000 xg 離心 1 分鐘，除去廢液並再次套回 QiAquick 離心管柱，加入 0.5 mL 的 QG buffer，以 13,000 xg 離心 1 分鐘；除去廢液，再加入 0.75 mL 之 PE buffer，以 13,000 xg 離心 1 分鐘；丟棄舊收集管柱，裝上新的 1.5-mL 微量離心管，最後加入 50  $\mu$ L 之 EB buffer (10 mM Tris·Cl, pH 8.5)，以 13,000 xg 離心 1 分鐘，以得到純化之目標 DNA，並置於-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存備用。

#### 四、 限制酵素剪切作用

將肌肉生長抑制素，抑制素  $\alpha$ ，激活素  $\beta A$  及激活素  $\beta B$  四段 cDNA 經膠上純化後，與 TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, CA, USA) 之 pCR<sup>®</sup> 2.1 及表現載體 pQE80L 質體 DNA 進行限制酵素剪切作用。取適量之 PCR 純化產物及質體 DNA，分別加入 10X 限制酵素緩衝溶液 3  $\mu L$ ；BSA (10  $\mu g/\mu L$ ) 3  $\mu L$ ；限制酵素 (*Hind* III, *Bam* HI 及 *Sac* I; 1 u/ $\mu L$ ；Promega, WI, USA) 各 1.5  $\mu L$ ，最後以滅菌去離子水將體積調至 30  $\mu L$ ，在 37°C 下進行反應 1.5 小時後，置於 65°C，15 分鐘以終止限制酵素之反應，再以瓊脂糖膠體電泳 (agarose gel electrophoresis) 確認片段位置及反應結果。

#### 五、 接合反應

取限制酵素剪切及膠上純化後之 PCR 產物 (抑制素  $\alpha$ ，激活素  $\beta A$  &  $\beta B$ ) 各 7  $\mu L$ ，加入 1  $\mu L$  pQE80L 載體，及 1  $\mu L$  之 T4 DNA ligase (3 weiss units/ $\mu L$ , Invitrogen, CA, USA) 與 1  $\mu L$  之 10X 緩衝溶液，混合至試管中，以 16°C 進行接合反應 (ligation) 14-16 小時。

## 六、轉形作用

挑取LB培養基上之DH5 $\alpha$ 或BL21勝任細胞 (competent cell) 之菌落，於 37°C 培養在 Luria-Bertani (LB: 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% tryptone, pH 7.5) 液態培養基 14-16 小時後，取 0.5 mL 到 50 mL 新鮮 LB 液態培養基，於 37°C 震盪培養至菌液於 O.D. 600 nm 在 0.4~0.6 之間。於 4°C 下離心 5000 xg，10 分鐘，去除上清液，並以等量之冰冷 0.1M CaCl<sub>2</sub> 將菌體輕輕懸浮，置於冰上 30 分鐘，再於 4°C 下離心 5000 xg，10 分鐘，去除上清液，再以 0.1 倍量之冰冷 0.1M CaCl<sub>2</sub> 將菌體輕輕懸浮，此勝任細胞即可使用。取 50-100 ng 表現質體與 200  $\mu$ L 勝任細胞菌液於 1.5-mL 微量離心管混和均勻後，放置冰上 30 分鐘，之後將此微量離心管放置 42°C 水浴槽中 90 秒進行熱休克 (Heat shock)，之後迅速放置冰上 5 分鐘，並於 5 分鐘後加入 800  $\mu$ L 新鮮 LB 液態培養基，於 37°C 震盪培養 1 小時，再取適量菌液塗於含抗生素 (100  $\mu$ g ampicillin/ mL) 之固態培養基 (於 LB 液態培養基中加入 1.5% 之 Bacto-agar，高溫高壓滅菌，冷卻至 55°C 加入抗生素後倒入培養皿中，等待凝固後放置 4°C 備用。)，於 37°C 隔夜培養，並挑取菌落進行篩選。



## 七、 構築之質體定序及比對

構築之質體委託明欣生物科技公司（台北，台灣）定序後，再以 ExPASy（Expert Protein Analysis System）網站之分析軟體比對序列。

## 陸、 抑制素 $\alpha$ 、激活素 $\beta A$ 、激活素 $\beta B$ 重組蛋白之製備

### 一、 誘導重組蛋白之表現

取單一菌落接種於 2 mL LB（含 100  $\mu\text{g}$  ampicillin/ mL），於 37°C 培養 14-16 小時後，取 0.5 mL 加入到 50 mL 新鮮 LB 液態培養基（含 100  $\mu\text{g}$  ampicillin/ mL）中，於 37°C 震盪培養於菌液 O.D. 600 nm 在 0.5~0.6 之間，加入 1 mM 乳糖類似物- isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導菌體表現蛋白，並於 1~7 小時收集各小時之菌體溶液，再以十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳（SDS-PAGE）分析重組蛋白之表現情形。

### 二、 重組蛋白之萃取分析

利用上一項試驗分析最佳之誘導蛋白表現條件後，以此條件大量培養菌體溶液，菌液以 6000  $\times g$  離心 15 分鐘後，倒去上清液，加入適量之均質緩衝液【Homogenization buffer: 20 mM Tris,

pH7.5; 0.25 M Sucrose; 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) ; 5 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA) ; 1 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) ; 25 µg/mL Leupeptin; 50 mM  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -Me)】震盪懸浮菌體，之後將此離心管放置冰上，以超音波震盪器震破菌體，在 4°C，以 14,000 xg 離心 20 分鐘，分別收集上清液及沉澱部分，以 SDS-PAGE 分析重組蛋白之表現情形。

### 三、 純化重組蛋白

從上述步驟結果可知，重組蛋白大部份皆表現於沉澱部分，故收集沉澱，以 30 mL 之 8M urea 溶液與沉澱混勻，將此離心管放置冰上，以超音波震盪器震破菌體，在 4°C，以 14,000xg 離心 20 分鐘，加入 2 mL 之 Ni-NTA 珠 (Invitrogen, CA, USA) 混合一小時後，注入管柱，以每分鐘 0.5 mL 流速通過管柱，同時收取通過後之液體。之後依序加入 10 mL denaturing wash buffer( 8M urea; 20 mM Sodium Phosphate, pH 6.0; 500 mM NaCl) 以及 denaturing elution buffer ( 8M urea; 20 mM Sodium Phosphate, pH 4.0; 500 mM NaCl) 各洗滌兩次，並同時收集洗滌液以進行 SDS-PAGE 分析蛋白質純化情形。

## 柒、 蛋白質定量

本試驗以 Bradford 蛋白質 (Bradford, 1976) 測定法測定蛋白質含量。試劑中含染料 Coomassie Brilliant Blue G-250 的蛋白質結合試劑；當蛋白質與 Coomassie Brilliant Blue G-250 結合之後，Coomassie Brilliant Blue G-250 由茶色變成藍色，呈色濃淡與蛋白質量成正比，故試驗以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin; BSA) 做為標準品配置一標準品之標準曲線，其有效範圍為 0 至 50  $\mu\text{g}$ 。分析時將 5 倍蛋白質染劑 (Bio-rad, #500-0006, USA) 以 1:4 之比例與滅菌去離子水稀釋後，與標準品及待測樣品充分混合，於室溫下避光反應 5 分鐘，以分光光譜儀測量波長 595 nm 之吸光值，配合標準曲線方程式，以內插法求得蛋白質濃度。

## 捌、 西方點墨法

### 一、 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE)

透過 SDS-PAGE 分離蛋白質，以進行分析。

膠體成分如表四所示：

表四、膠體電泳之成份及比例

	Separating gel		Stacking gel
	12.5%	15%	5%
<b>1.5M Tris. pH8.8</b>	5 mL	5 mL	-
<b>0.5M Tris. pH6.8</b>	-	-	2.5 mL
<b>Acryamide/Bis (37.5:1)</b>	8.27 mL	9.94 mL	1.67 mL
<b>sterilized H<sub>2</sub>O</b>	6.43 mL	4.76 mL	5.68 mL
<b>10% SDS</b>	0.2 mL	0.2 mL	0.1 mL
<b>10% APS</b>	0.1 mL	0.1 mL	55 mL
<b>TEMED</b>	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	5 $\mu$ L

將上列之膠體溶液鑄入形成器後，待其膠體凝固後，與電泳緩衝溶液（electrode buffer；30 mM Tris, 200 mM glycine, 0.1 % SDS）共同放置電泳槽中，樣本與 6X 樣本染劑（62.5 mM Tris-Cl, pH 6.8; 10% Glycerol; 2% SDS, pH 7.2; 5% 2-Mercaptoethanol, 0.125 % bromophenol blue）混合後，放入沸水中煮沸 5 分鐘，並在冰上急速冷卻，將樣本依序注入於每個樣品孔中。每片膠體以 35 mA（2 片 70 mA）電流使樣本跑至膠體底部。取出膠體，以 Comassie stain solution（0.5% comassie Brilliant Blue R-250; 45% methanol; 10% glacial acid; 14.5% ddH<sub>2</sub>O）染色 30 分鐘，並以 destain solution（45% methanol; 10% glacial acid; 15% ddH<sub>2</sub>O）退染至膠體可明顯觀察到蛋白質之藍色條狀即可。

## 二、 西方點墨法 (Western blot analysis)

經過 SDS-PAGE 分離蛋白質後，轉印至 polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜上，利用專一性抗體辨識目標蛋白之表現。將電泳完畢之膠體 (未經 Coomassie blue 染色) 以 30V，16 至 18 小時轉印至 PVDF 膜上後，先以 tris buffered saline (TBS; 10mM Tris pH 7.4; 140 mM NaCl) 緩衝溶液清洗 2 分鐘數次，並以 blocking solution (gelatin-NTE; 0.25% Gelatin, 0.875% Sodium chloride, 0.18% EDTA-2Na, 0.605% Tris，加熱至 gelatin 溶解後，冷卻至室溫後加入 0.5 mL Tween-20，調至 pH 8.0，並以去離子水定量至 1 L) 在室溫中進行 blocking 一小時。以 blocking solution 稀釋一級抗體 (mouse anti-6His, 1:5000, roche: 11922416001; 另外由雞蛋萃取之 IgY 稀釋濃度根據不同抗體而有不同之稀釋濃度)，於室溫下雜交一小時。之後以 1X TTBS (10 mM Tris, pH 7.4; 140 mM NaCl; 0.1 % Tween-20) 清洗膜三次，每次五分鐘。接下來加入以 blocking solution 稀釋之 Horseradish peroxidase (HRP) conjugated 二級抗體 (goat anti-chicken IgY, 1:5000, KPL: 14-24-06; goat anti-mouse IgG, 1:5000, Bio-rad: 170-5047)，於室溫下雜交一

小時。再以 1X TTBS 清洗膜三次，每次五分鐘，以及 1X TBS (10mM Tris pH 7.4; 140 mM NaCl) 清洗膜二次，每次五分鐘，以洗去殘留之 Tween-20。最後在轉漬膜上灑上 ECL Plus Western blotting Detection System (GE Healthcare, CA, USA) 之 substrate 並以冷光反應偵測系統 GeneGenome Bioimaging system (Syngene, MD, USA) 分析之。

## **玖、 雞蛋蛋黃之水溶性 IgY 萃取**

將蛋殼小心打破，分離蛋黃及蛋白，保留蛋黃部分進行試驗。以兩倍蛋黃量之滅菌水與蛋黃均勻混合，加入一倍蛋黃量之氯仿 (chloroform) 均勻混合，以 5400 xg，4°C 離心 5 分鐘，將上清液移至新離心管，並再次加入一倍蛋黃量之氯仿均勻混合，再以 5400 xg 4°C 離心 5 分鐘，將上清液移至新離心管，並放置 -20°C 冰箱備用。

## 壹拾、即時定量聚合酶連鎖反應

### 一、反轉錄反應 (Reverse transcription)

萃取腦下垂體組織 RNA 樣本之後，以 ABI High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, CA, USA) 進行反轉錄作用

10X RT Buffer .....	5 $\mu$ L
25X dNTP Mix (100 mM) .....	2 $\mu$ L
10X RT Random Primer .....	0.5 $\mu$ L
MultiScribe™ Reverse Transcriptase .....	0.5 $\mu$ L
RNase Free distilled H <sub>2</sub> O.....	0.5 $\mu$ L
Sample RNA .....	(2 ug total RNA)
Total per reaction .....	to 20 $\mu$ L

將上述反應物置於 ABI 9700 聚合酶連鎖反應器

中，反應條件如表五所示：

表五、反轉錄聚合酶連鎖反應之反應條件

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperature	25°C	37°C	85°C	4°C
Time	10 min	10 min	10 min	$\infty$

## 二、 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR)

本試驗採用 ABI TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, CA, USA) 進行即時定量聚合酶連鎖反應，引子皆委託金萬林企業股份有限公司向 ABI 公司 (Applied Biosystems, CA, USA) 設計及訂購。將反應物置於 ABI 9700 聚合酶連鎖反應器中，反應條件如表六及表七所示

表六、即時定量聚合酶連鎖反應之反應條件

PCR reaction mix component	Volume per 20 $\mu$ L reaction ( $\mu$ L)
20 X TaqMan® Gene Expression Assays	1 $\mu$ L
2 X TaqMan® Gene Expression Master Mix <sup>‡</sup>	10 $\mu$ L
cDNA template (100 ng)	1 $\mu$ L
RNase-free water	9 $\mu$ L
Total reaction	20 $\mu$ L

<sup>‡</sup> Use TaqMan® Fast Universal Master Mix (2X), No AmpErase® UNG,

表七、反轉錄聚合酶連鎖反應之反應條件

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperature	50°C	95°C	95°C	60°C
Time	2 min	10 min	15 sec	1 min
Cycles				40 cycles



將反應物置於 ABI 9700 聚合酶連鎖反應器中，試驗結果透過相對定量之方法分析，以各雞隻個體 chicken beta-actin 之 threshold cycle (Ct) 做校正 (Normalized) 後利用下列公式分析：

$$\text{Normalized relative ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

試驗採用之即時定量引子設計如表八

表八、試驗採用之即時定量引子設計：

<b>Assay Name</b>	<b>Assay ID</b>	<b>Forward Primer Seq.</b>	<b>Reverse Primer Seq.</b>	<b>NCBI Gene Ref.</b>
ACTB	Gg03815934_s1	Gg03815934_s1_F	Gg03815934_s1_R	NM_205518
FSHB	AIT95E8	CGCAAACGAAATGGAAAGTCTAGGA	CCATGGTTTCCTTCAGATCACTCA	NM_204257
GNRH1	AIVI3LG	GTACCTTCAAGGAGGTTGTGTATGA	GGGTATGAGTAAAAAGATTCAGGATGGT	NM_001080877

## 壹拾壹、 統計分析

使用 STATGRAPHICS Plus (StatPoint, Washington, USA) 軟體之單因子變異數 (One-way ANOVA) 分析各組之變異， $p$  值小於 0.05 即為顯著差異，若有顯著差異，再以多重比較試驗 (multiple range test) 及費雪最小顯著差異 (least significant difference, LSD) 分析各組間變異。

# 結果

## 壹、肌肉生長抑制素基因之選殖

肌肉生長抑制素-pQE80L 為本研究團隊先前建立之質體，可大量表現肌肉生長抑制素重組蛋白，透過與限制酵素 *Hind* III 和 *Bam* HI 剪切後可觀察到有 pQE80L 質體（約 4.8 kb）及目標片段（肌肉生長抑制素：327 bp）產生（圖四）。

## 貳、抑制素 $\alpha$ 、激活素 $\beta$ A、激活素 $\beta$ B 基因之選殖

因抑制素  $\alpha$  (354 bp)、激活素  $\beta$ A (363 bp)、激活素  $\beta$ B (360 bp) 基因在雞卵巢皆有表現，故摘取來亨蛋雞之新鮮卵巢組織，萃取其 mRNA。透過反轉錄作用之 cDNA 進行擴增，得到抑制素  $\alpha$ 、激活素  $\beta$ A、激活素  $\beta$ B 基因選殖片段。此三段基因片段經過 PCR 擴增後再進一步進行膠上純化，使用 Invitrogen 公司之 TA Cloning<sup>®</sup> 套組，將此三段基因片段分別接入此套組中之 pCR<sup>®</sup> 2.1 質體，再與 pQE80L 質體經過限制酵素 *Hind* III、*Sac* I 剪切後，透過 DNA 連接酶 (DNA ligase) 作用，分別將此三基因片段連結至 pQE80L 之多重選殖位 (multiple cloning site, MCS) 上，形成嵌合 (chimera) 載體。建構質體試驗流程圖列於圖五~六。

## 一、 抑制素 $\alpha$ 、激活素 $\beta A$ 、激活素 $\beta B$ 基因之擴增及轉形 確認

此試驗中之三基因片段經 PCR 擴增後 (圖四)，透過 T/A cloning 方式將基因片段置入 pCR<sup>®</sup> 2.1 質體 (3.9 kb)，透過利用氯化鈣法將質體轉形入大腸桿菌 DH5 $\alpha$  細胞中，並大量培養，以分析確認質體是否有接入此三段基因。結果顯示，三段接合至 pCR<sup>®</sup> 2.1 之質體以限制酵素 *Hind* III、*Sac* I 剪切後，可觀察到皆有 pCR<sup>®</sup> 2.1 質體 (約 3.9 kb) 及目標片段 (抑制素  $\alpha$ : 354 bp, 激活素  $\beta A$ : 363 bp, 激活素  $\beta B$ : 360 bp)。顯示此三段基因皆已成功接入於 pCR<sup>®</sup> 2.1 質體上 (圖三)。

此三段接合至 pCR<sup>®</sup> 2.1 之質體及 pQE80L 質體經過限制酵素 *Hind* III、*Sac* I 剪切後，將此三段目標基因片段接入至 pQE80L 之多重選殖位上，透過氯化鈣法將質體放入大腸桿菌 DH5 $\alpha$ ，並大量培養以分析質體是否有接入此三段基因。結果顯示，三段質體以限制酵素 *Hind* III、*Sac* I 剪切後可觀察到皆有 pQE80L 質體 (約 4.8 kb) 及目標片段 (抑制素  $\alpha$ : 354 bp, 激活素  $\beta A$ : 363 bp, 激活素  $\beta B$ : 360 bp) 產生，顯示此三段基因皆能接入於 pQE80L 質體上 (圖四)。

## 二、 抑制素 $\alpha$ 、激活素 $\beta A$ 及激活素 $\beta B$ 基因之序列比對

透過正反引子之定序，分別與抑制素  $\alpha$ 、激活素  $\beta A$ 、激活素  $\beta B$  基因重疊比對，結果顯示此三段基因片段皆已成功構築於 pQE80L 質體上，其序列亦正確無誤。此三段重組蛋白前端皆接有起始密碼子 (ATG) 及 6 個組胺酸之核酸序列

(CATCACCATCACCATCAC)，其後段皆有停止密碼子。進一步利用 ExPASy 網站 (<http://au.expasy.org/tools/>)，分析出各段重組蛋白之開放讀架區 (open reading frame) 之基因大小及蛋白質分子量各為抑制素  $\alpha$ : 390 bp /13.317 kDa、激活素  $\beta A$ : 399 bp /13.959 kDa、激活素  $\beta B$ : 396 bp /13.743 kDa。

## 參、 抑制素 $\alpha$ 、激活素 $\beta A$ 及激活素 $\beta B$ 重組蛋白之製備。

### 一、 誘導重組蛋白之表現

此試驗使用之質體為 pQE80L 載體，而其宿主為大腸桿菌 BL21，此載體上之多重選殖位前具有 lac O 之操作子，可透過乳糖類似物- isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導而產生大量重組蛋白，另外在多重選殖位前也帶有 6 個組胺酸之核酸序列，可形成 6xHis-目標蛋白之融合蛋白，以方便利用親和性層析管柱純化目標蛋白。故抑制素  $\alpha$ -pQE80L、激活素

$\beta$ A-pQE80L 及激活素  $\beta$ B-pQE80L 三段質體轉形至 BL21 菌體後，在不同時間點下以 1 mM 之 IPTG 誘導目標重組蛋白表現，其 SDS-PAGE 結果顯示可觀察到三組目標蛋白隨時間增加而增加其表現，可確定重組蛋白成功被誘導表現於 BL21 菌株（圖七~十）。

## 二、 重組蛋白之純化

透過誘導目標蛋白表現之步驟確認能表現出預期之重組蛋白後，以均質緩衝液（homogenization buffer）萃取菌體蛋白，經過離心，分成菌體上清液蛋白及菌體沉澱蛋白，以 SDS-PAGE 分析可得知三組重組蛋白皆大量存在於菌體沉澱蛋白部分。因此此三組重組蛋白於菌液內主要為不可溶蛋白。此菌體沉澱物依材料與方法中之方法，利用 Ni-NTA 親和性管柱純化重組蛋白。以圖十二之結果為例，第一行結果為未誘導表現之菌體蛋白，第二行為 1 mM 之 IPTG 誘導重組蛋白四小時後之結果，可觀察到有一明顯之泳帶出現；第三行為菌液通過親和性管柱後，大部份之重組蛋白已吸附於管柱內，之後透過洗提步驟，可觀察到部分非專一性之蛋白被洗提出來，而在最後之沖提步驟，以沖提液沖提出重組蛋白部分。以 SDS-PAGE 試驗證明可沖提出目標蛋白（圖

十二~圖十五)。經由西方點墨法之分析，確實能以 6xHis 之單株抗體辨識到各組沖提出之重組蛋白(圖十六)。此次試驗結果，確認已純化出肌肉生長抑制素、抑制素  $\alpha$ 、激活素  $\beta A$  及激活素  $\beta B$  之重組蛋白。

#### **肆、 雞隻主動免疫試驗產生之 IgY 與肌肉生長抑制素、抑制素及激活素重組蛋白親和性試驗**

##### **一、 肌肉生長抑制素 I 組之雞隻主動免疫試驗產生之 IgY 與肌肉生長抑制素重組蛋白親和性試驗**

取各次肌肉生長抑制素 I 組之免疫雞隻產生的 IgY 與肌肉生長抑制素重組蛋白進行西方點墨法之試驗，透過試驗結果可觀察到在第 A, B, E 隻雞所產生之抗體對肌肉生長抑制素重組蛋白有較好之親和性(圖十七)，而此組雞隻產蛋率在個體間並無顯著差異。



## 二、 肌肉生長抑制素 II 組之雞隻主動免疫試驗產生之 IgY 與肌肉生長抑制素重組蛋白親和性試驗

取各次肌肉生長抑制素 II 組之免疫雞隻產生的 IgY 與肌肉生長抑制素重組蛋白進行西方點墨法之試驗，透過試驗結果可觀察到這五隻雞所產生之抗體對肌肉生長抑制素重組蛋白皆有好的親和性（圖十八），而在此組雞隻產蛋在第二、四次追加免疫注射後，比較對照組之統計結果在第二、四次追加免疫注射後產蛋率皆有顯著下降（ $p < 0.05$ ）。

## 三、 抑制素 $\alpha$ 組之雞隻主動免疫試驗產生之 IgY 與抑制素 $\alpha$ 重組蛋白親和性試驗

取各次抑制素  $\alpha$  組之免疫雞隻產生的 IgY 與抑制素  $\alpha$  重組蛋白做西方點墨法試驗，透過試驗結果可觀察到此處理雞隻所產生之抗體對抑制素  $\alpha$  重組蛋白之親和性皆不好，而在犧牲後取各雞隻血漿進行抑制素  $\alpha$  重組蛋白之西方點墨法試驗，觀察到在其中一隻雞隻有較好之親和性表現（圖十九）。在此組雞隻產蛋率在第四次追加免疫後，比較對照組之統計結果後發現產蛋率與對照組無顯著差異。

#### 四、 激活素組之雞隻主動免疫試驗產生之 IgY 與激活素 $\beta$ A 重組蛋白親和性試驗

取各次激活素組之免疫注射雞隻產生的 IgY 與激活素  $\beta$ A 重組蛋白進行西方點墨法試驗，透過試驗結果可觀察到在此處理雞隻產生之抗體對激活素  $\beta$ A 重組蛋白皆有較好之親和性（圖二十），此組雞隻產蛋率在第四次追加免疫注射後，比較對照組之統計結果，產蛋率亦有顯著下降（ $p < 0.05$ ）。

#### 五、 激活素組之雞隻主動免疫試驗產生之 IgY 與激活素 $\beta$ B 重組蛋白親和性試驗

取各次激活素組之免疫雞隻產生的 IgY 與激活素  $\beta$ B 重組蛋白進行西方點墨法分析，試驗結果顯示這五隻雞所產生之抗體，對於激活素  $\beta$ B 重組蛋白皆呈現較佳之親和性（圖二十一），且該組雞隻產蛋在第四次追加免疫注射後，比較對照組之統計結果後產蛋率亦有顯著下降（ $p < 0.05$ ）。

## 伍、 肌肉生長抑制素 I/II、抑制素 $\alpha$ 及激活素組雞隻主動 免疫試驗對雞隻增重及各器官重量之影響

試驗中固定每月進行雞隻稱重得到之數據以 One-Way ANOVA 分析 (圖二十二)，實驗開始之雞隻體重平均為  $1269.38 \pm 32.11$  克。相對於對照組，肌肉生長抑制素 I 組最高可增加雞隻之體重約 3.7% (35 週齡) 及 3.16% (52 週齡)；肌肉生長抑制素 II 組最高可增加雞隻體重約 1.39% (35 週齡)，於 39 週齡至 52 週齡之體重表現為 -1.76% ~ 0.23%，呈緩慢上升狀態；抑制素  $\alpha$  組最高可增加雞隻體重約 2.89% (39 週齡)，而於 39 週齡至 52 週齡之體重表現為 2.89% ~ -0.81%，呈緩慢下降狀態；激活素組最高可減少雞隻體重約 9.44% (44 週齡) 及 8.77% (48 週齡)，於試驗之期間，激活素組之體重皆低於對照組。

一如表三及圖二十五所顯示之各組雞隻增重表現，肌肉生長抑制素 I/II 組之平均增重約高於對照組 40 克 (約增加 22.7%~23.5%)，激活素組雞隻之增重約平均較對照組低約 50 克 (約降低 30.5%)，而抑制素  $\alpha$  組之平均增重約高於對照組 10 克 (約增加 5.8%)。故就結果來看肌肉生長抑制素組及抑制素  $\alpha$  組具有提高雞隻體重上之趨勢，而激活素組

則具相反之趨勢，其結果無顯著差異 ( $p=0.765$ )。

就各器官之增重而言 (表三及表四)，對照組與各處理組包括在腦、心臟、肝臟及右腿 (整個腿部至軀幹部位，將外表皮卸去後之重量) 之重量皆無顯著性之差異可言，在肝臟試驗組中之肌肉生長抑制素 II 組與激活素組 ( $p<0.01$ ) 在統計分析上有顯著差異。比較對照組，發現肌肉生長抑制素 I 組具顯著抑制卵巢重量之結果 ( $p<0.05$ )，而試驗組間肌肉生長抑制素 I 與肌肉生長抑制素 II 在統計上相互具顯著差異 ( $p<0.05$ )。在腹脂重部分，比較對照組，激活素組具顯著抑制腹脂重量之結果 ( $p<0.05$ )，而試驗各組肌肉生長抑制素 I、肌肉生長抑制素 II、抑制素  $\alpha$  組及激活素組之抑制程度分別為 13.1%，19.1%，41.9% 及 42.5%。

## 陸、 肌肉生長抑制素 I/II、抑制素 $\alpha$ 、激活素 $\beta A \& \beta B$ 雞隻 主動免疫試驗對雞隻產蛋率之影響

試驗中固定收集每天雞隻產蛋數據並進行統計分析(圖二十二),以約兩個月之試驗期間各組雞隻平均產量結果,可觀察到肌肉生長抑制素 II 組之產蛋率顯著少於對照組 ( $p < 0.01$ )。

各次免疫注射後雞隻產蛋數據分析結果顯示(圖二十四),相對於對照組,於第一次免疫注射(1<sup>st</sup> Immunization)後之試驗組產蛋率皆無顯著差異 ( $p = 0.371$ ),而試驗組中之抑制素  $\alpha$  組、激活素組經統計分析有顯著差異 ( $p = 0.032$ )。第一次追加免疫注射(1<sup>st</sup> boosted)之試驗組雞隻之產蛋率,相對於對照組並無顯著差異可言 ( $p = 0.764$ )。第二次追加免疫(2<sup>nd</sup> boosted)後,肌肉生長抑制素 II 處理組雞隻之產蛋率經統計分析顯著少於對照組 ( $p > 0.01$ ),而肌肉生長抑制素 II 組與對照組、肌肉生長抑制素 I 組、抑制素  $\alpha$  組、激活素組經統計上有顯著差異 ( $p > 0.01$ )。第三次追加免疫注射(3<sup>rd</sup> boosted)後之產蛋率,試驗中各組經統計分析與對照組無顯著差異 ( $p = 0.055$ ),而試驗組中之肌肉生長抑制素 I 組與肌肉生長抑制素 II 組、激活素組經統計上有顯著差異

( $p < 0.05$ )。第四次追加免疫 (4<sup>th</sup> boosted) 後之產蛋率，肌肉生長抑制素 II 組 ( $p < 0.05$ ) 及激活素組 ( $p < 0.05$ ) 經統計上與對照組有顯著差異，試驗組中之肌肉生長抑制素 I 組與激活素組經統計分析有顯著差異 ( $p < 0.01$ )。就統計分析結果看來，相對於對照組，顯示肌肉生長抑制素 II 組及激活素組分別皆顯著抑制產蛋表現 (圖二十四)。

## 柒、 肌肉生長抑制素 I/II、抑制素 $\alpha$ 、激活素雞隻主動免疫試驗對雞隻濾泡發育之影響

### 一、 卵巢重量

透過分析卵巢重量，可概略得知主動免疫試驗對濾泡發育之影響。相對於對照組，肌肉生長抑制素 I 組顯著抑制卵巢重量之結果 ( $p < 0.05$ )，其抑制比例為 24.3% (表五)。試驗組間肌肉生長抑制素 I 組與肌肉生長抑制素 II 組在統計分析上具顯著差異 ( $p < 0.05$ )，而肌肉生長抑制素 II 組 ( $p = 0.44$ )、抑制素  $\alpha$  組 ( $p = 0.12$ ) 及激活素組 ( $p = 0.10$ ) 在統計分析上與對照組並無顯著差異。

## 二、 濾泡數目

透過分析濾泡數量，可間接得知主動免疫試驗對濾泡發育之影響。

### 1. 白色濾泡 (White follicle ; 直徑 2-6 mm)

試驗以游標卡尺測量濾泡大小，將直徑 2-6 mm 之白色濾泡列為此區，並分析白色濾泡數之結果 (表四)，相對於對照組，肌肉生長抑制素 I 組、肌肉生長抑制素 II 組、抑制素  $\alpha$  組、激活素組皆顯著抑制白色濾泡之數量 ( $p < 0.01$ )，其抑制程度分別為 65.9%，33.2%，38.6% 及 30.9%。

### 2. 小卵黃濾泡 (Small yolk follicle ; 直徑 6-12 mm)

試驗以游標卡尺測量濾泡大小，將直徑 6-12 mm 之卵黃濾泡列為此區，並分析小卵黃濾泡數之結果 (表四)，相對於對照組，肌肉生長抑制素 I 組、肌肉生長抑制素 II 組、抑制素  $\alpha$  組、激活素組之小卵黃濾泡數量在統計上未達顯著差異 ( $p = 0.749$ )，但結果仍窺見肌肉生長抑制素 II 組及激活素組其抑制程度分別為 18.8% 及 28.4%，具有抑制濾泡發育之趨勢。

### 三、大卵黃濾泡 (Small yolk follicle ; 直徑>12 mm)

試驗以游標卡尺測量濾泡大小，將大於直徑 12 mm 之卵黃濾泡列為此區，並分析大卵黃濾泡數及直徑之結果 (表四和圖二十六)。對照組平均有 5.5 顆大卵黃濾泡，而肌肉生長抑制素 I 組、肌肉生長抑制素 II 組、抑制素  $\alpha$  組、激活素組之大卵黃濾泡之平均數量分別為 4.2 顆、4.8 顆、4.75 顆及 4.0 顆，在統計上未達顯著之差異 ( $p=0.392$ )，但結果仍顯示肌肉生長抑制素 I 組及激活素組之大卵黃濾泡之平均數量仍有低於對照組約 23.6% ~ 27.2% 之趨勢。

大卵黃濾泡直徑之結果顯示 (圖二十六)，F1 濾泡平均大小在肌肉生長抑制素 I 組、抑制素  $\alpha$  組、激活素組皆低於對照組，而上述三組 F2 ~ F4 濾泡平均大小亦低於對照組，而在 F4 濾泡圖可發現此三組濾泡大小平均皆顯著低於平均 ( $p<0.05$ )；而觀察肌肉生長抑制素 II 組，雖在 F1 及 F2 濾泡平均大小高於對照組，但於 F3 及 F4 濾泡平均大小趨向低於對照組，而此趨勢亦同於其他三組，但在 F4 濾泡平均大小未達顯著差異 ( $p=0.149$ )。



## 捌、 肌肉生長抑制素 I/II、抑制素 $\alpha$ 、激活素雞隻主動免疫試驗對雞隻腦下垂體內泌素基因之影響。

動物濾泡發育成熟主要是受到內泌素及多種細胞激素透過血液在下視丘，腦垂腺，卵巢等與生殖相關之器官中傳遞訊息及作用，相互協助調控濾泡發育成熟，如激性腺素釋放素，刺激腦垂腺前葉分泌排卵素及激濾泡素，本研究利用即時定量聚合酶連鎖反應分析腦垂腺中 *GnRH-1* 及 *FSH- $\beta$*  之基因表現。

### 一、 *GnRH-1* 之基因表現

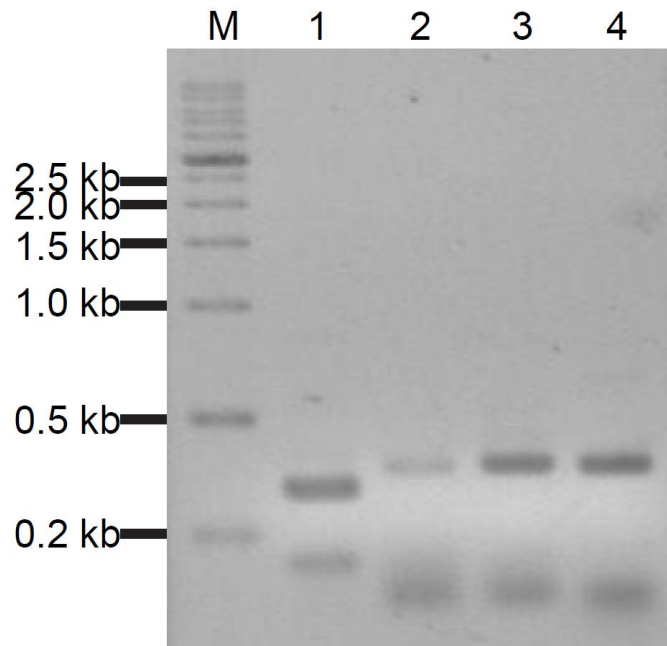
即時定量聚合酶連鎖反應分析結果顯示，相對於對照組，肌肉生長抑制素 I 組、肌肉生長抑制素 II 組、抑制素  $\alpha$  組、激活素組皆有抑制 *GnRH-1* 之基因表現之趨勢，但統計上並無顯著差異 ( $p=0.66$ )，而各組抑制程度為 26.0%、22.2%、14.1% 及 50.7% (圖二十六)。

### 二、 *FSH- $\beta$* 之基因表現

即時定量聚合酶連鎖反應分析結果顯示，相對於對照組，肌肉生長抑制素 I 組、肌肉生長抑制素 II 組、激活素組皆有抑制 *FSH- $\beta$*  之基因表現之趨勢，但統計上並無顯著差異 ( $p=0.54$ )，而各組抑制程度為 22.0%、20.4% 及 51.0% (圖

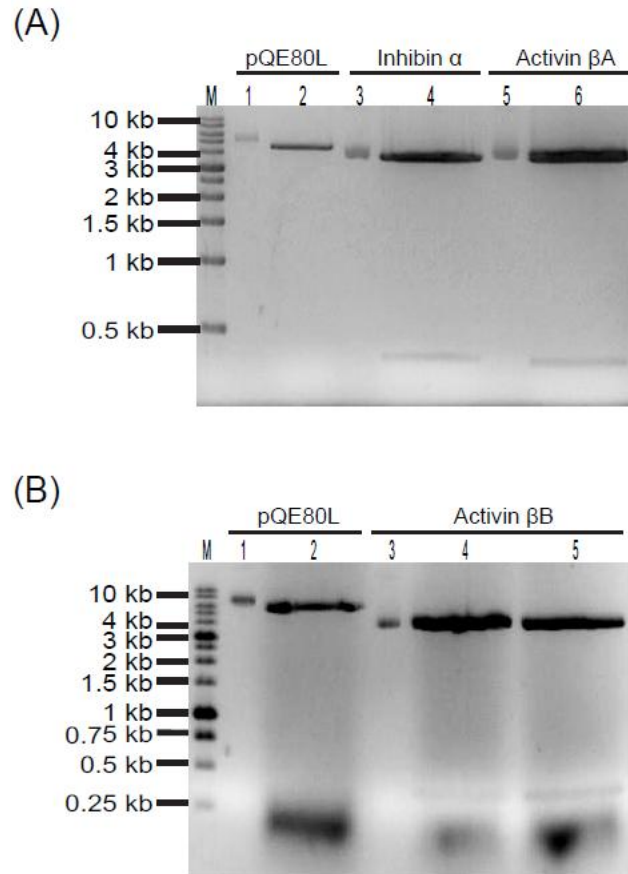
二十六)。

*GnRH-1* 及 *FSH-β* 基因在腦垂腺中之表現情形，雖然在統計上並無顯著差異，但肌肉生長抑制素 I 組、肌肉生長抑制素 II 組、激活素組皆有抑制 *GnRH-1* 及 *FSH*-之基因表現之趨勢。



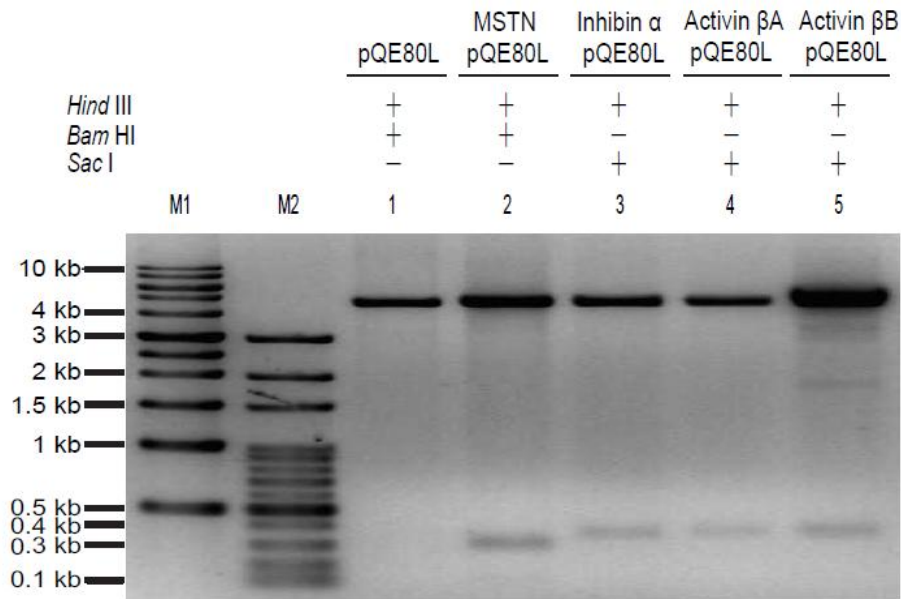
圖二、來亨蛋雞卵巢中抑制素  $\alpha$ ，激活素  $\beta A$ ，激活素  $\beta B$  之基因表現。M：1-Kbp marker；1：卵巢  $\beta$ -actin 基因擴增產物（300 bp）；2：卵巢抑制素  $\alpha$  基因擴增產物（354 bp）；3：卵巢激活素  $\beta A$  基因擴增產物（363 bp）；4：卵巢激活素  $\beta B$  基因擴增產物（360 bp）。

Fig. 2 The gene expression of inhibin  $\alpha$ , activin  $\beta A$  and activin  $\beta B$  in the ovary of Leghorn chicken. M: 1-Kbp marker; Lane 1: The PCR product of  $\beta$ -actin(300 bp); Lane 2: The inhibin  $\alpha$  (354 bp); Lane 3: The activin  $\beta A$ (363 bp); Lane 4: The activin  $\beta B$ (360 bp).



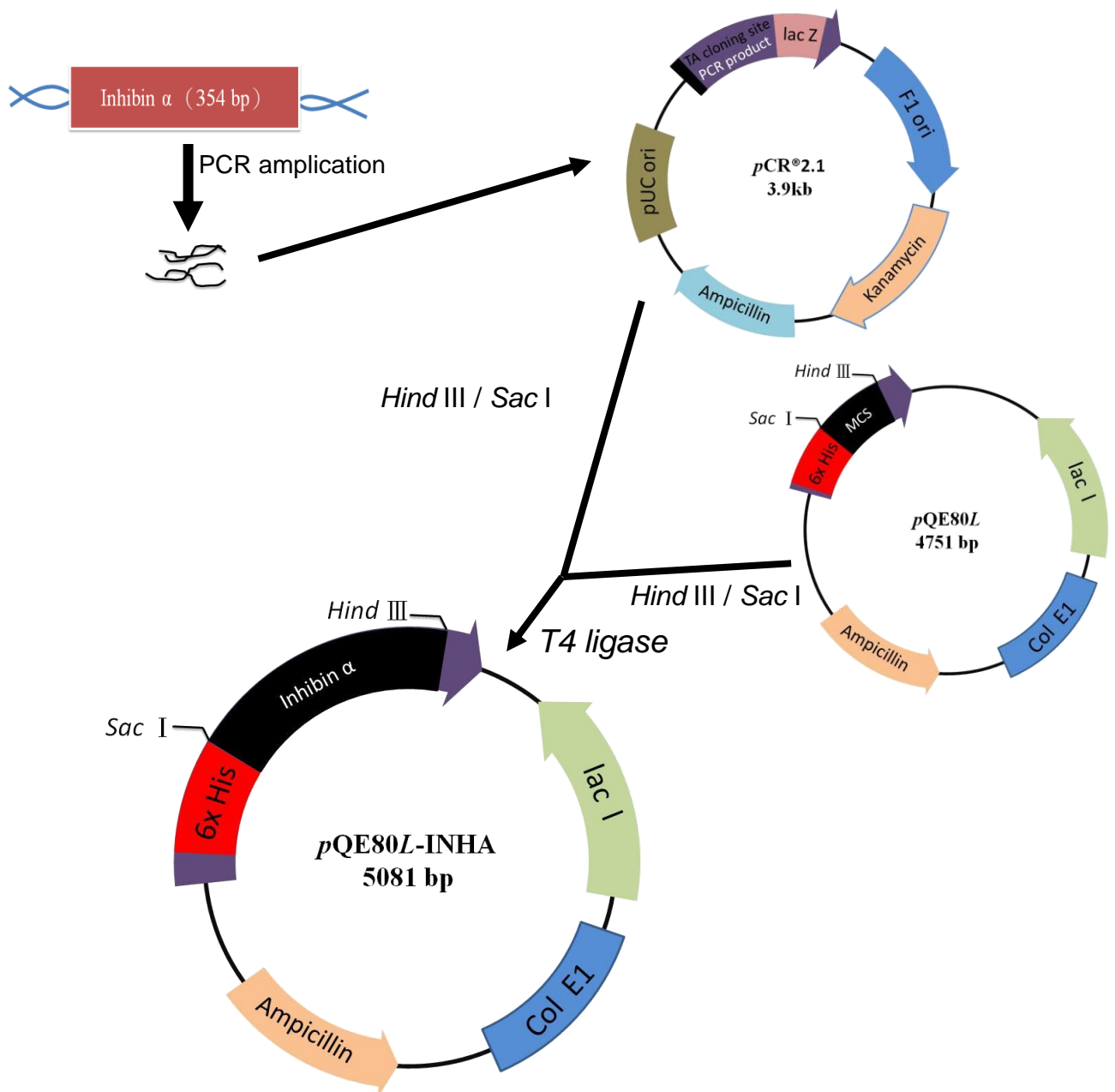
圖三、抑制素  $\alpha$ ，激活素  $\beta A$  及激活素  $\beta B$  基因以 T/A cloning 接合至 pCR<sup>®</sup> 2.1 質體上，後經限制酵素 *Hind* III, *Sac* I 剪切之結果。M: 1-Kb marker; (A) 1, (B) 1: pQE80L 質體; (A) 2, (B) 2: pQE80L 質體與限制酵素 *Hind* III, *Sac* I 剪切之結果; (A) 3: 抑制素  $\alpha$ -TA cloning 質體; (A) 4: 抑制素  $\alpha$ -TA cloning 質體與限制酵素 *Hind* III, *Sac* I 剪切之結果; (A) 5: 激活素  $\beta A$ -TA cloning 質體; (A) 6: 激活素  $\beta A$ -TA cloning 質體與限制酵素 *Hind* III, *Sac* I 剪切之結果; (B) 3: 激活素  $\beta B$ -TA cloning 質體; (B) 4、5: 激活素  $\beta B$ -TA cloning 質體與限制酵素 *Hind* III, *Sac* I 剪切之結果。

Fig. 3 The results of *Hind* III and *Sac* I digestion on pCR<sup>®</sup> 2.1 plasmid inserted with inhibin  $\alpha$ , activin  $\beta A$  or activin  $\beta B$  gene. M: 1-Kb marker; Lanes (A)1, (B)1: pQE80L plasmid; Lanes (A)2, (B)2: pQE80L plasmid digested with *Hind* III and *Sac* I; Lane (A)3: Inhibin  $\alpha$ -TA cloning plasmid; Lane (A)4: Inhibin  $\alpha$ -TA cloning plasmid digested with *Hind* III and *Sac* I; Lane (A)5: Activin  $\beta A$ -TA cloning plasmid; Lane (A)6: Activin  $\beta A$ -TA cloning plasmid digested with *Hind* III and *Sac* I; Lane (B)3: Activin  $\beta B$ -TA cloning plasmid; Lane (B)4,5: Activin  $\beta B$ -TA cloning plasmid digested with *Hind* III and *Sac* I.



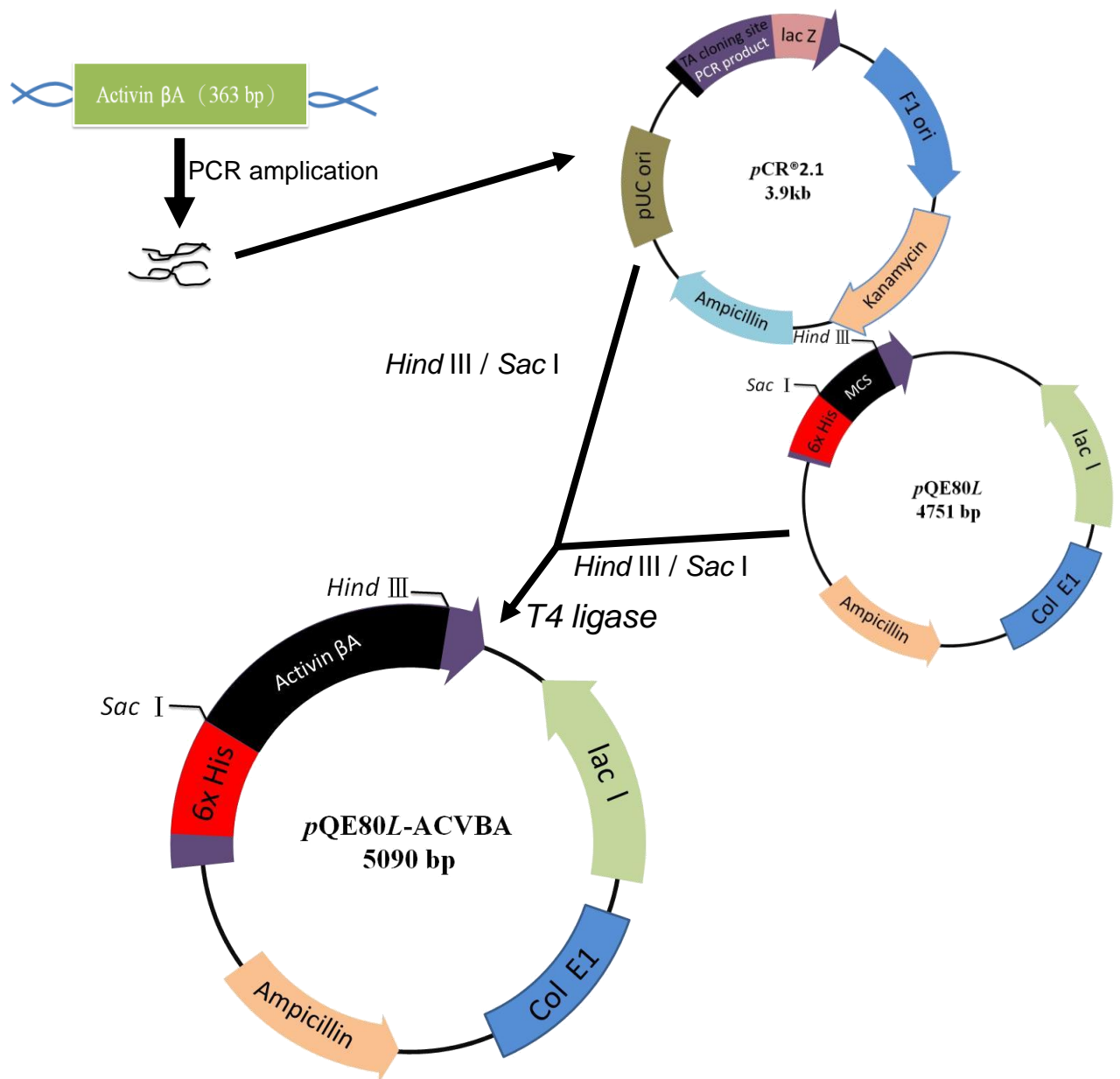
圖四、肌肉生長抑制素，抑制素  $\alpha$ ，激活素  $\beta$ A 及激活素  $\beta$ B 基因接合至 pQE80L 質體上，後經限制酵素 *Hind* III，*Sac* I 及 *Bam* HI 剪切之結果。M1：1-Kb marker；M2：100-bp marker；1：pQE80L 質體與限制酵素 *Hind* III 和 *Bam* HI 剪切之結果；2：肌肉生長抑制素-pQE80L 質體與限制酵素 *Hind* III 和 *Bam* HI 剪切之結果；3：抑制素  $\alpha$ -pQE80L 質體與限制酵素 *Hind* III 和 *Sac* I 剪切之結果；4：激活素  $\beta$ A -pQE80L 質體與限制酵素 *Hind* III 和 *Sac* I 剪切之結果；5：激活素  $\beta$ B -pQE80L 質體與限制酵素 *Hind* III 和 *Sac* I 剪切之結果。

Fig. 4 The results of *Hind* III, *Sac* I and *Bam* HI digestion on pQE80L plasmid inserted with myostatin, inhibin  $\alpha$ , activin  $\beta$ A, activin  $\beta$ B. M1: 1-Kb marker; M2: 100-bp marker; Lane 1: pQE80L plasmid digested with *Hind* III and *Bam* HI; Lane 2: Myostatin-pQE80L plasmid digested with *Hind* III and *Bam* HI; Lane 3: Inhibin  $\alpha$ -pQE80L plasmid digested with *Hind* III and *Sac* I; Lane 4: Activin  $\beta$ A-pQE80L plasmid digested with *Hind* III and *Sac* I; Lane 5: Activin  $\beta$ B-pQE80L plasmid digested with *Hind* III and *Sac* I



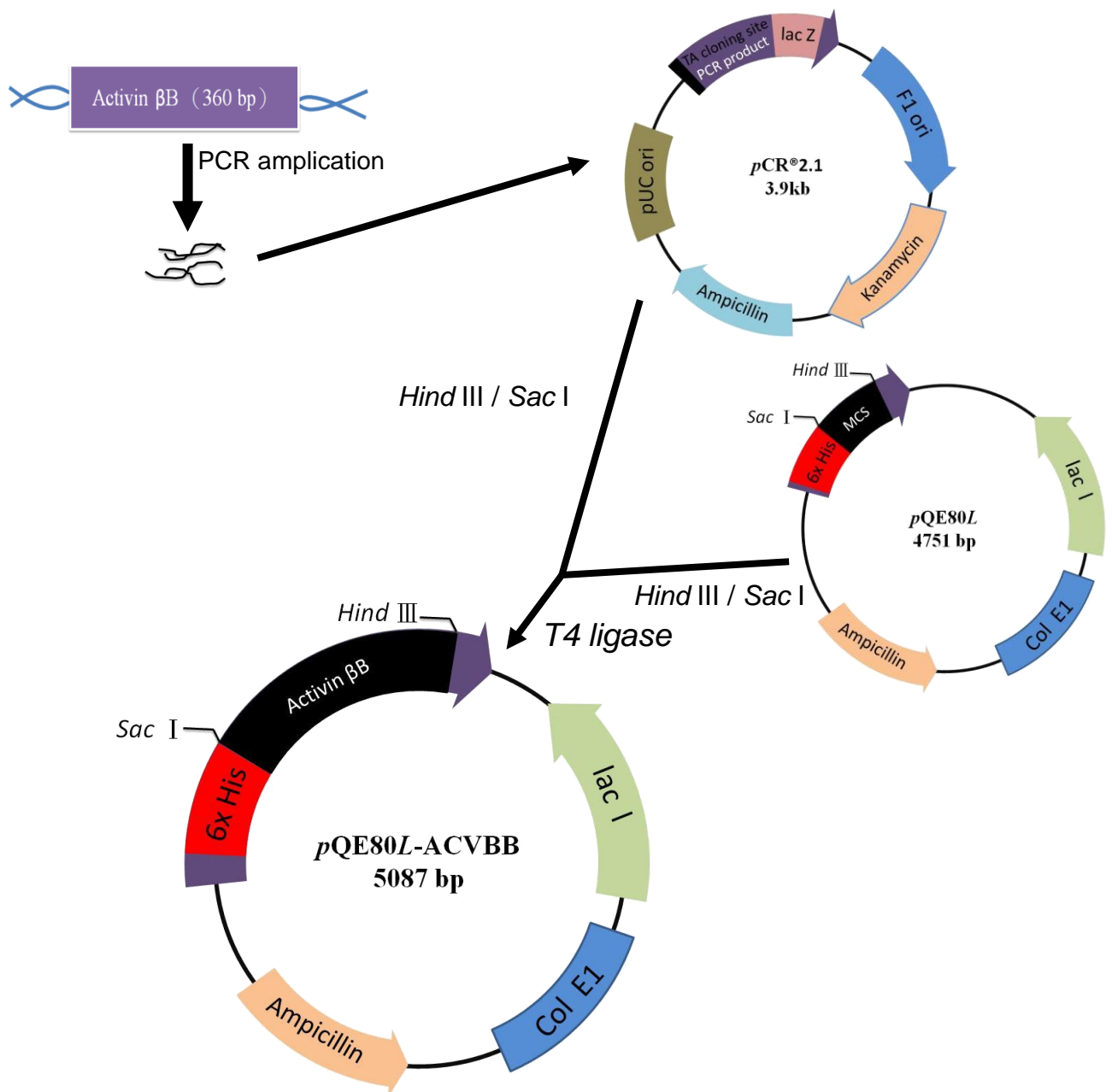
圖五、抑制素  $\alpha$ -pQE80L 之構築。

Fig. 5 Construction of inhibin  $\alpha$ -pQE80L plasmid.



圖六、激活素  $\beta$ A-pQE80L 之構築。

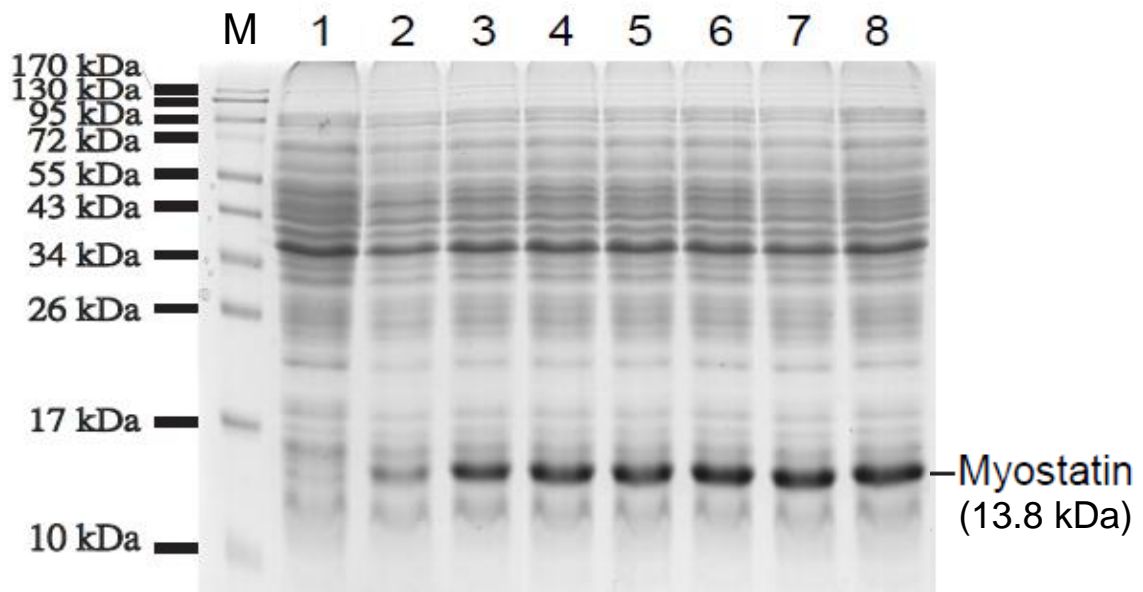
Fig. 6 Construction of activin  $\beta$ A-pQE80L plasmid.



圖七、激活素  $\beta$ -pQE80L 之構築。

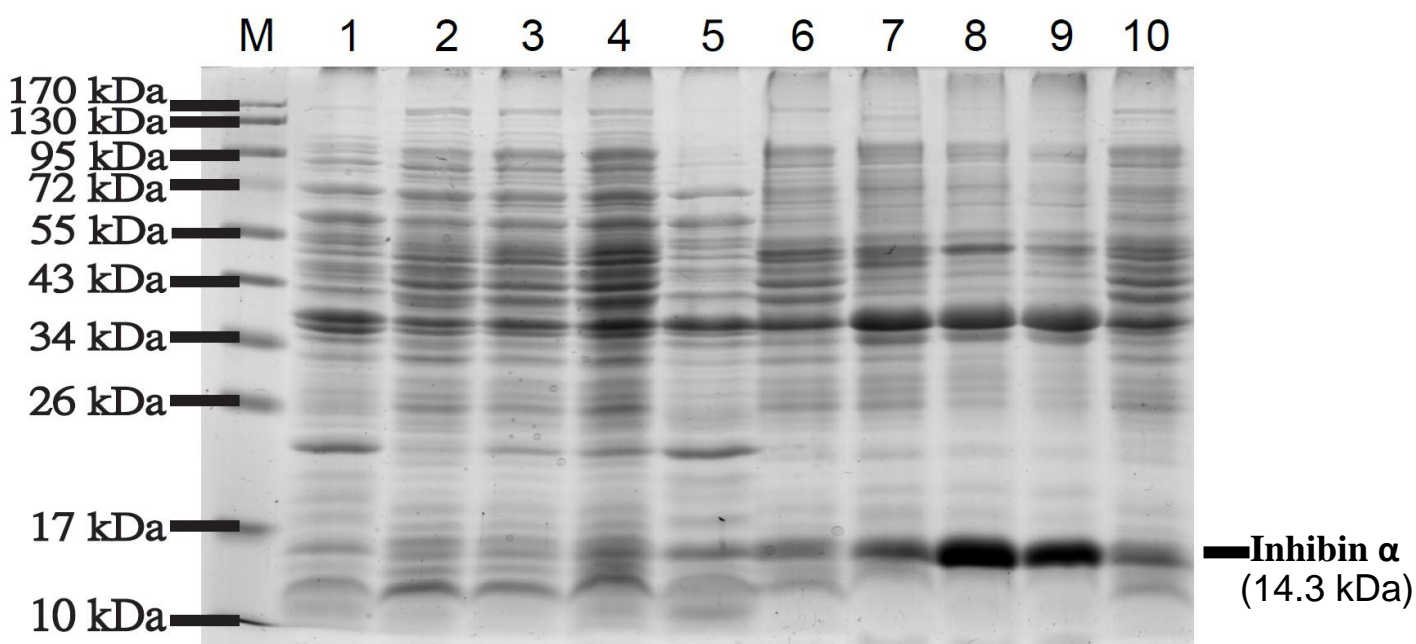
Fig. 7 Construction of activin  $\beta$ -pQE80L plasmid.





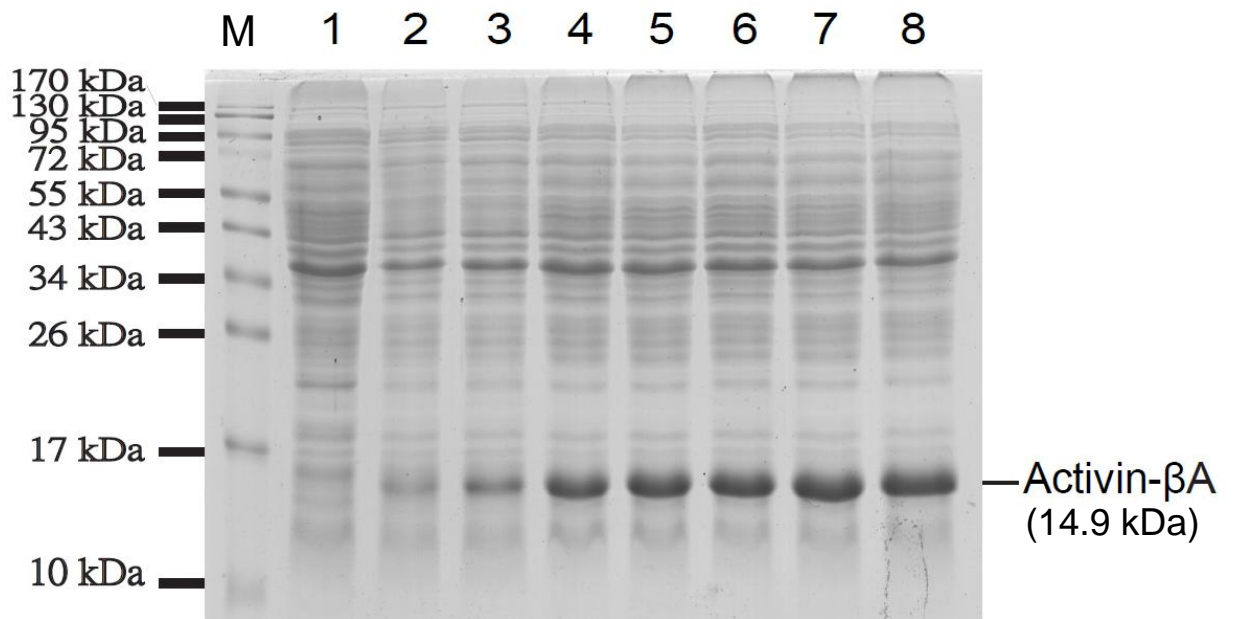
圖八、以 SDS-PAGE 膠體電泳分析菌體中經 IPTG 誘導的肌肉生長抑制素重組蛋白之表現。M：protein marker (kDa)；1：未經誘導之菌體蛋白；2~8：經 IPTG 誘導 1 小時 (2)，2 小時 (3)，3 小時 (4)，4 小時 (5)，5 小時 (6)，6 小時 (7)，7 小時 (8) 之菌體蛋白。

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of recombinant myostatin expression induced by IPTG in *E.coli*. M: protein marker(kDa); Lane 1: Cell lysate without IPTG induction; Lanes 2~8: Cell lysate induced by 1mM IPTG for 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 hrs, respectively.



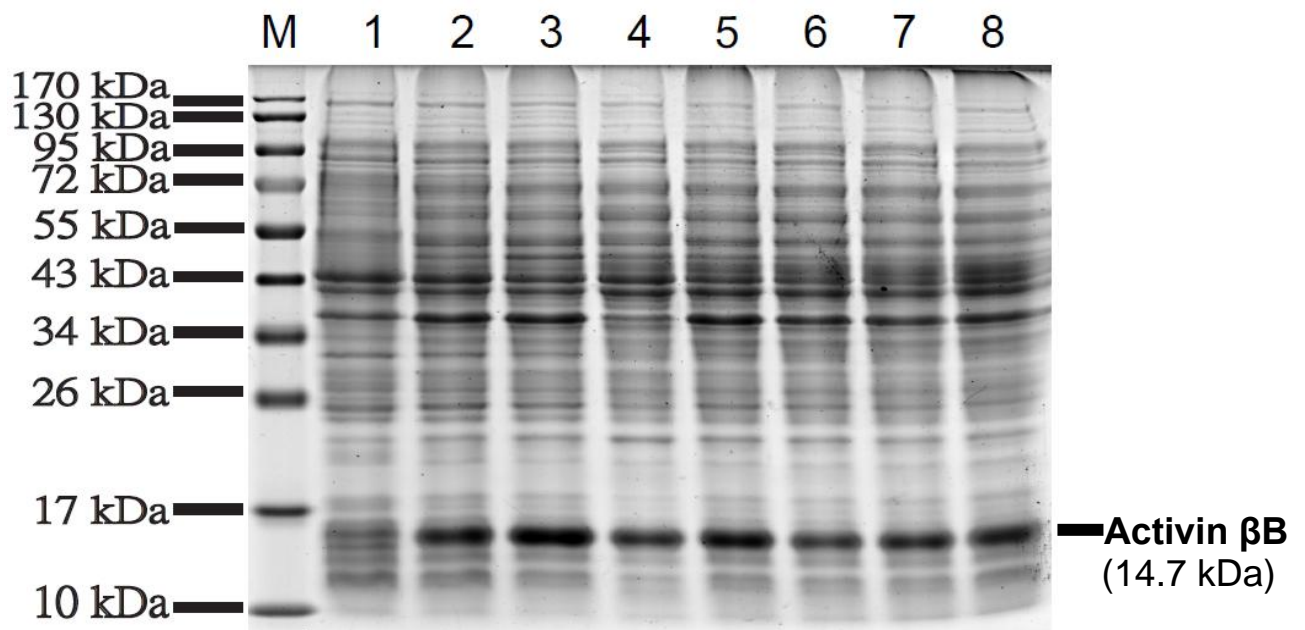
圖九、以 SDS-PAGE 膠體電泳分析菌體中經 IPTG 誘導的抑制素  $\alpha$  重組蛋白之表現。M：protein marker (kDa)；1：未經誘導之上清液菌體蛋白；2：經 IPTG 於 25 度誘導 4 小時之上清液菌體蛋白；3~5：經 IPTG 於 37 度誘導 4 小時之上清液菌體蛋白；6：未經誘導之菌體蛋白沉澱物；7：經 IPTG 於 25 度誘導 4 小時之菌體蛋白沉澱物；8~10：經 IPTG 於 37 度誘導 4 小時之菌體蛋白沉澱物。

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of recombinant inhibin  $\alpha$  expression induced by IPTG in *E.coli*. M: protein marker (kDa); Lane 1: Cell supernatant without IPTG induction; Lanes 2: *E.coil* supernatant induced by 1mM IPTG for 4 hrs in 25°C; 3~5: *E.coli* supernatant induced by 1mM IPTG for 4 hrs in 37°C; 6: Non-induced protein in *E.coli* pellet; 7: *E.coil* pellet induced by 1mM IPTG for 4 hrs in 25°C; 8~10: *E.coli* pellet induced by 1mM IPTG for 4 hrs in 37°C.



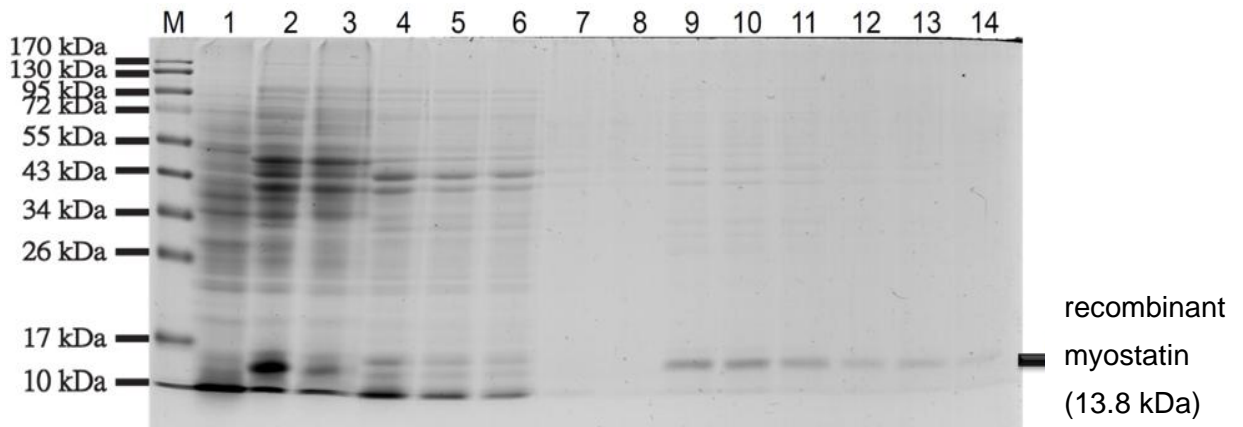
圖十、激活素  $\beta A$  以 SDS-PAGE 膠體電泳分析菌體中經 IPTG 誘導的肌肉生長抑制素重組蛋白之表現。M：protein marker (kDa)；1：未經誘導之菌體蛋白；2~8：經 IPTG 誘導 1 小時(2)，2 小時(3)，3 小時(4)，4 小時(5)，5 小時(6)，6 小時(7)，7 小時(8) 之菌體蛋白。

Fig. 10 SDS-PAGE analysis of recombinant activin  $\beta A$  expression induced by IPTG in *E.coli*. M: protein marker (kDa); Lane 1: Cell lysate without IPTG induction; Lanes 2~8: Cell lysate induced by 1mM IPTG for 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 hrs, respectively.



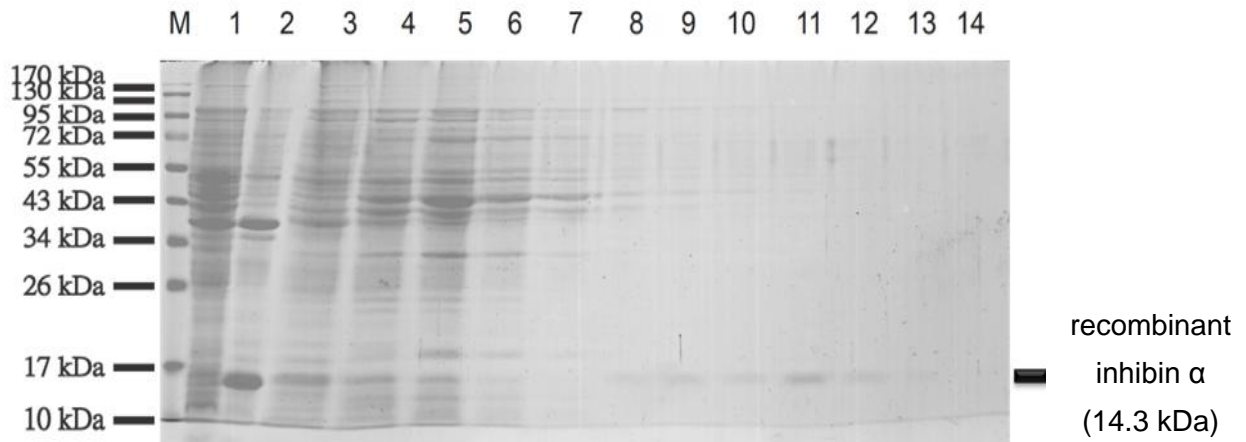
圖十一、以 SDS-PAGE 膠體電泳分析菌體中經 IPTG 誘導的激活素  $\beta$ B 重組蛋白之表現。M：protein marker (kDa)；1：未經誘導之菌體蛋白；2~8：經 IPTG 誘導 1 小時 (2)，2 小時 (3)，3 小時 (4)，4 小時 (5)，5 小時 (6)，6 小時 (7)，7 小時 (8) 之菌體蛋白。

Fig 11. SDS-PAGE analysis of recombinant activin  $\beta$ B expression induced by IPTG in *E.coli*. M: protein marker (kDa); Lane 1: Cell lysate without IPTG induction; Lanes 2~8: Cell lysate induced by 1mM IPTG for 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 hrs, respectively.



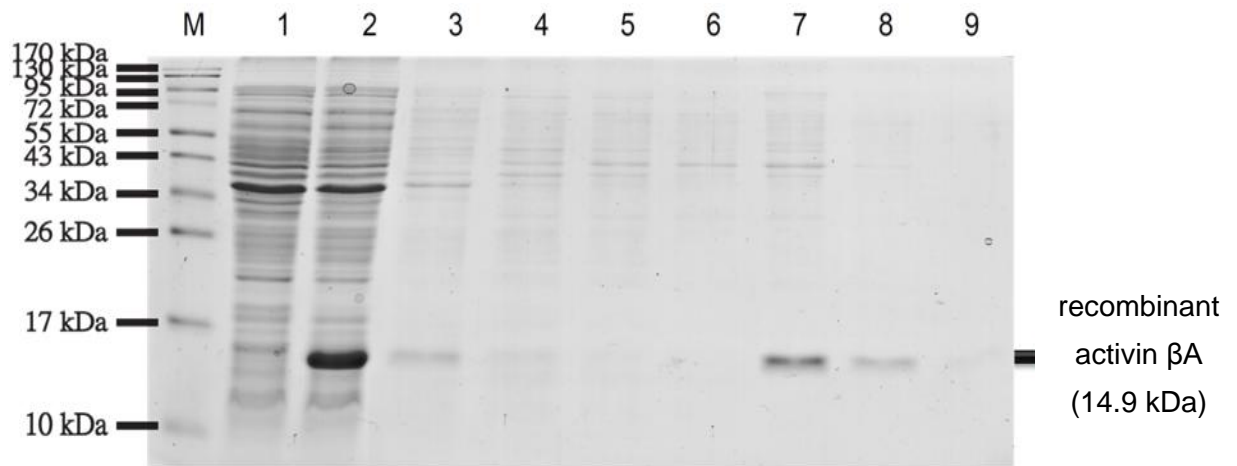
圖十二、肌肉生長抑制素重組蛋白之純化。M：protein marker (kDa)；1：未誘導之菌液沉澱物；2：以 1 mM IPTG 誘導 4 小時之菌體蛋白；3：菌液與 Ni-NTA 結合後之上清液；4-8：依序以 40 mM imidazole 進行洗滌；9-14：依序以 250 mM imidazole 進行沖提。

Fig. 12 Purification of myostatin recombinant protein by Ni-NTA affinity column. M: protein marker (kDa); Lane 1: cell lysate without IPTG induction; Lane 2: cell lysate induced by 1mM IPTG for 4 hrs; Lane 3: flow-through; Lanes 4-8: 40mM imidazole wash sequentially; Lanes 9-14: elution by 250mM imidazole sequentially.



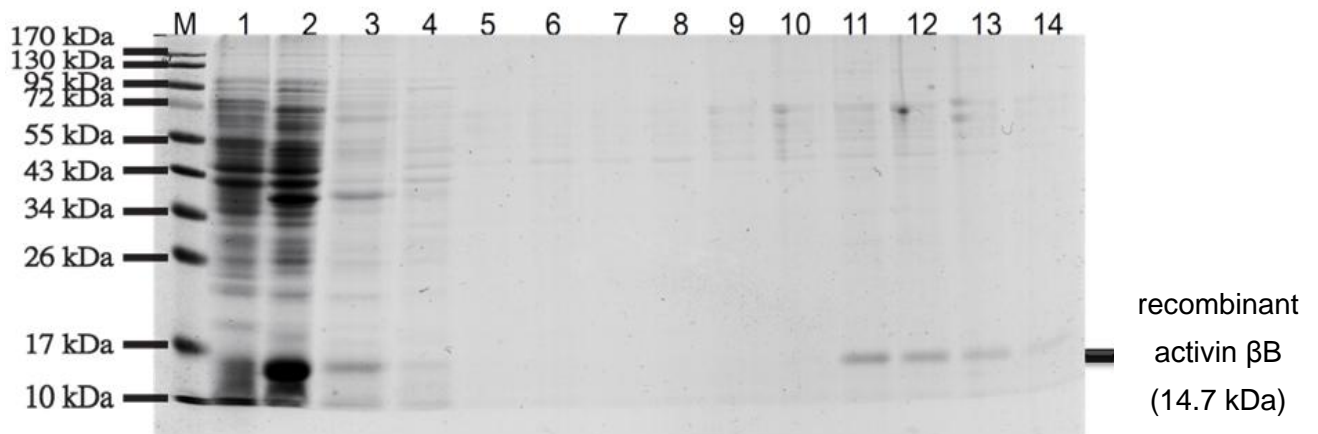
圖十三、抑制素  $\alpha$  重組蛋白之純化。M：protein marker (kDa)；1：未誘導之菌液沉澱物；2：以 1 mM IPTG 誘導 4 小時之菌體蛋白；3：菌液與 Ni-NTA 結合後之上清液；4-10：依序以尿素緩衝液 (pH 6.0) 進行洗滌；11-14：依序以尿素緩衝液 (pH 4.0) 進行沖提。

Fig. 13 Purification of inhibin  $\alpha$  recombinant protein by Ni-NTA affinity column. M: protein marker (kDa); Lane 1: cell lysate without IPTG induction; Lane 2: cell lysate induced by 1mM IPTG for 4 hrs; Lane 3: flow-through; Lanes 4-10: urea buffer (pH 6.0) wash sequentially; Lanes 11-14: elution by urea buffer (pH 4.0) sequentially.



圖十四、激活素  $\beta A$  重組蛋白之純化。M：protein marker (kDa)；1：未誘導之菌液沉澱物；2：以 1 mM IPTG 誘導 4 小時之菌體蛋白；3：菌液與 Ni-NTA 結合後之上清液；4-6：依序以尿素緩衝液 (pH 6.0) 進行洗滌；7-9：依序以尿素緩衝液 (pH 4.0) 進行沖提。

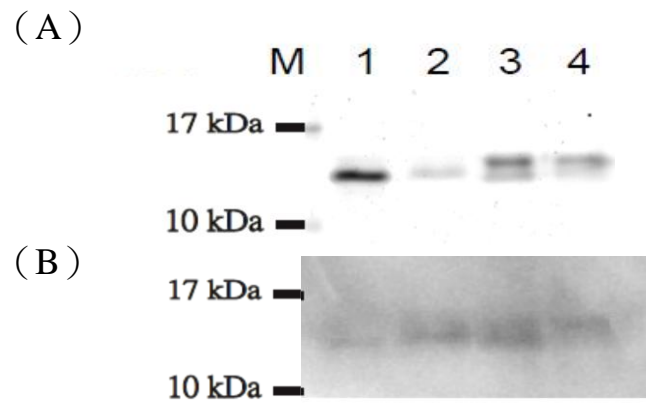
Fig.14 Purification of activin  $\beta A$  recombinant protein by Ni-NTA affinity column. M: protein marker (kDa); Lane 1: cell lysate without IPTG induction; Lane 2: cell lysate induced by 1mM IPTG for 4 hrs; Lane 3: flow-through; Lanes 4-6: urea buffer (pH 6.0) wash sequentially; Lanes 7-9: elution by urea buffer (pH 4.0) sequentially.



圖十五、激活素  $\beta$ B 重組蛋白之純化。M：protein marker (kDa)；1：未誘導之菌液沉澱物；2：以 1 mM IPTG 誘導 4 小時之菌體蛋白；3：菌液與 Ni-NTA 結合後之上清液；4-10：以尿素緩衝液 (pH 6.0) 進行洗滌；11-14：以尿素緩衝液 (pH 4.0) 進行沖提。

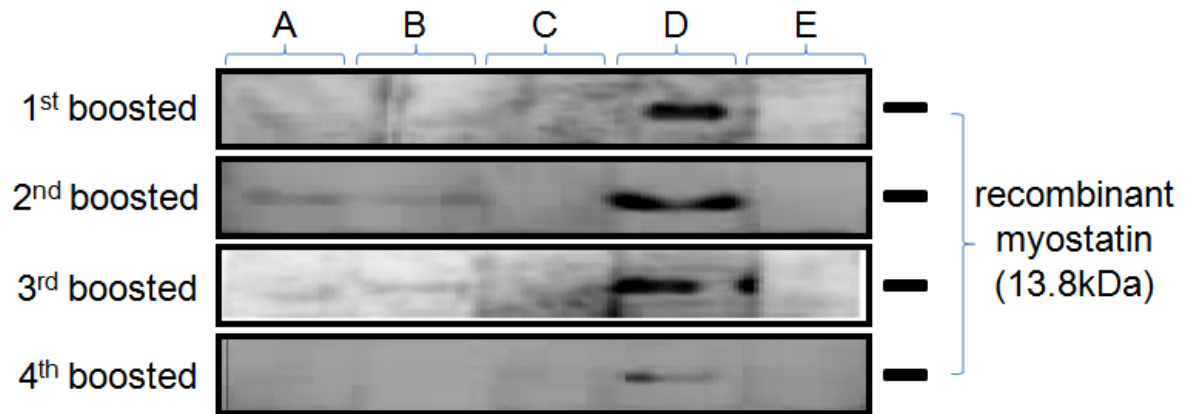
Fig.15 Purification of activin  $\beta$ B recombinant protein by Ni-NTA affinity column. M: protein marker (kDa); Lane 1: cell lysate without IPTG induction; Lane 2: cell lysate induced by 1mM IPTG for 4 hrs; Lane 3: flow-through; Lanes 4-10: urea buffer (pH 6.0) wash sequentially; Lanes 11-14: elution by urea buffer (pH 4.0) sequentially.





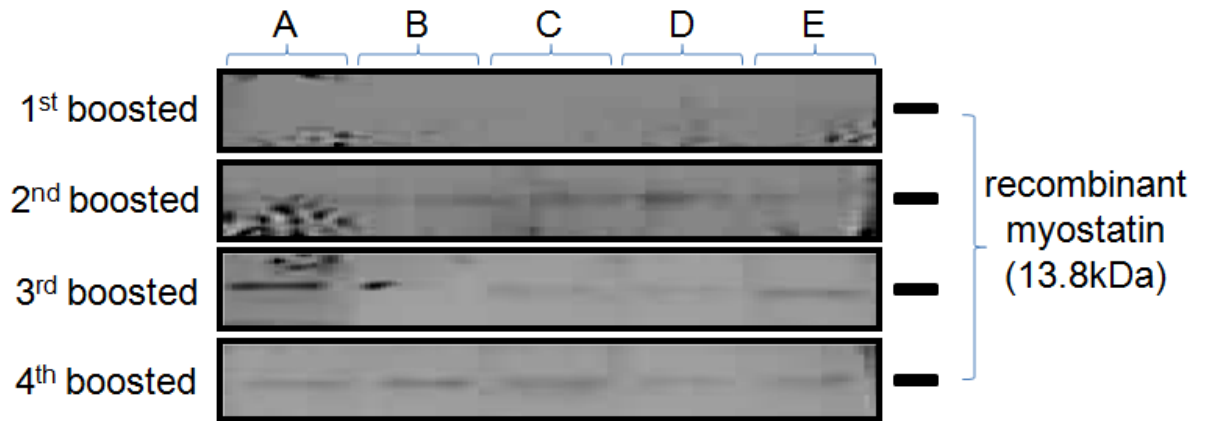
圖十六、肌肉生長抑制素、激活素  $\alpha$ 、抑制素  $\beta A$  及抑制素  $\beta B$  重組蛋白之純化測試。(A) 12.5% SDS-PAGE, (B) 西方點墨法分析, 以 6xHis 單株抗體雜交辨識。M: protein marker (kDa); 1: 肌肉生長抑制素重組蛋白; 2: 激活素  $\alpha$  重組蛋白; 3: 抑制素  $\beta A$  重組蛋白; 4: 抑制素  $\beta B$  重組蛋白。

Fig.16 Detection of recombinant myostatin, inhibin  $\alpha$ , activin  $\beta A$  and activin  $\beta B$  by SDS-PAGE and Western blot analysis. (A) 12.5% SDS-PAGE, (B) Western blot analysis hybridized with 6xHis monoclonal antibody. M: protein marker (kDa); Lane 1: recombinant myostatin; Lane 2: recombinant inhibin  $\alpha$ ; Lane 3: recombinant activin  $\beta A$ ; Lane 4: recombinant activin  $\beta B$ .



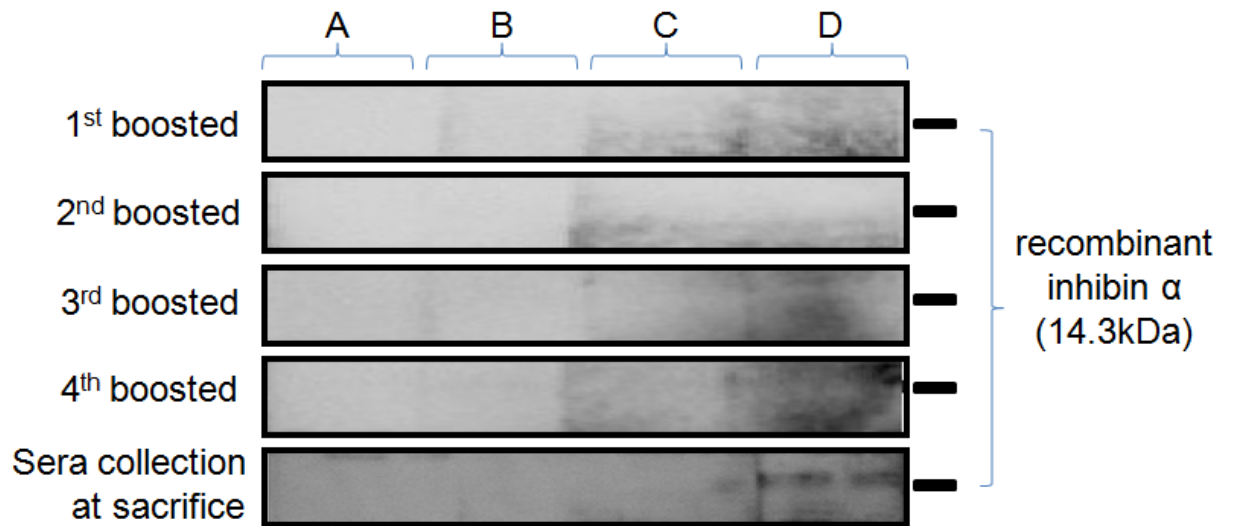
圖十七、肌肉生長抑制素 I 組主動免疫所產生之 IgY (1 : 250 稀釋倍數) 與肌肉生長抑制素重組蛋白之結合試驗。雞 (A-E) 分別注射肌肉生長抑制素 I 組胜肽，於不同次追加注射後收集雞蛋，純化蛋中之 IgY，再與肌肉生長抑制素重組蛋白以西方點墨法進行結合試驗。

Fig.17 Western blot analysis of recombinant myostatin using purified IgY from eggs (1 : 250). chickens (A-E) were immunized by myostatin I peptide.



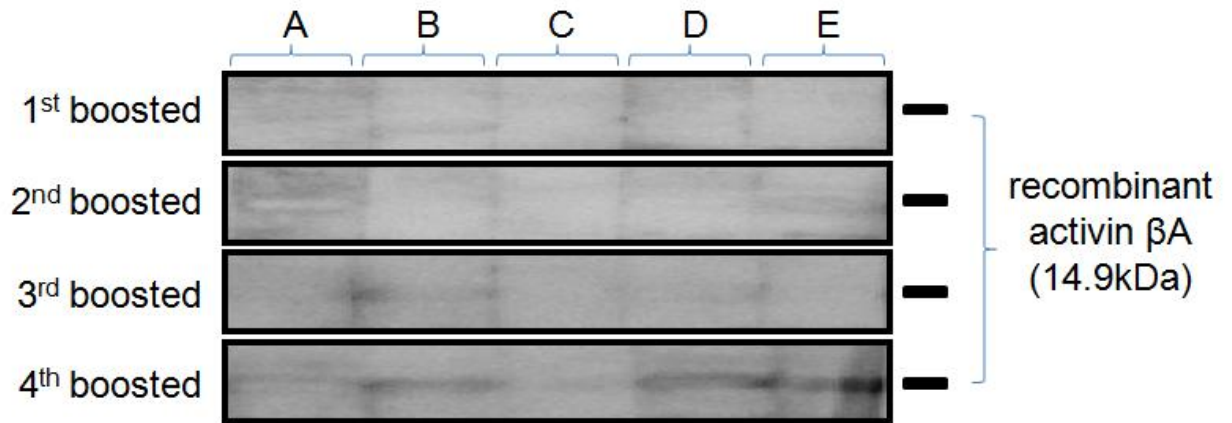
圖十八、肌肉生長抑制素 II 組主動免疫所產生之 IgY (1 : 250 稀釋倍數) 與肌肉生長抑制素重組蛋白之結合試驗。雞 (A-E) 分別注射肌肉生長抑制素 II 組胜肽，於不同次追加注射後收集雞蛋，純化蛋中之 IgY，再與肌肉生長抑制素重組蛋白以西方點墨法進行結合試驗。

Fig.18 Western blot analysis of recombinant myostatin using purified IgY from eggs (1 : 250). chickens (A-E) were immunized by myostatin II peptide.



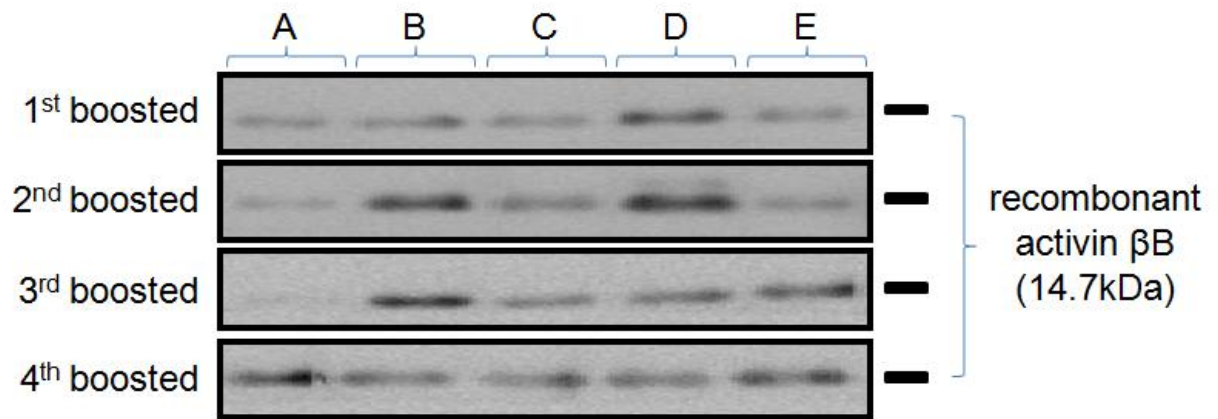
圖十九、抑制素組主動免疫所產生之 IgY (1 : 1000 稀釋倍數) 與抑制素  $\alpha$  重組蛋白之結合試驗。雞 (A-D) 分別注射抑制素  $\alpha$  組胜肽，於不同次追加注射後收集雞蛋，純化蛋中之 IgY，再與抑制素  $\alpha$  重組蛋白以西方點墨法進行結合試驗。

Fig.19 Western blot analysis of recombinant inhibin  $\alpha$  using purified IgY from eggs (1 : 1000). chickens (A-D) were immunized by inhibin  $\alpha$  peptide.



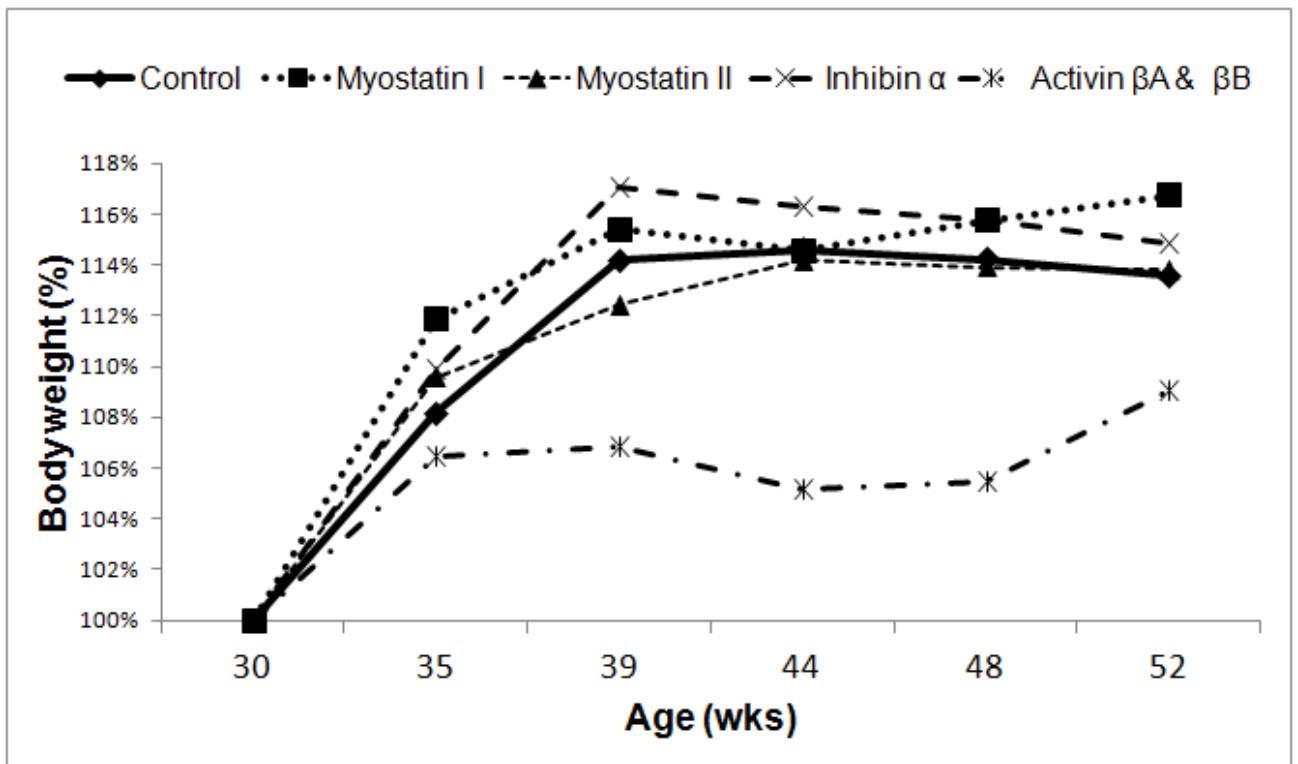
圖二十、激活素組主動免疫所產生之 IgY (1 : 1000 稀釋倍數) 與激活素 βA 重組蛋白之結合試驗。雞 (A-E) 分別注射激活素 βA 及激活素 βB 胜肽，於不同次追加注射後收集雞蛋，純化蛋中之 IgY，再與激活素 βA 重組蛋白以西方點墨法進行結合試驗。

Fig.20 Western blot analysis of recombinant activin βA using purified IgY from eggs (1 : 1000). chickens (A-E) were immunized by activin βA and activin βB peptides.



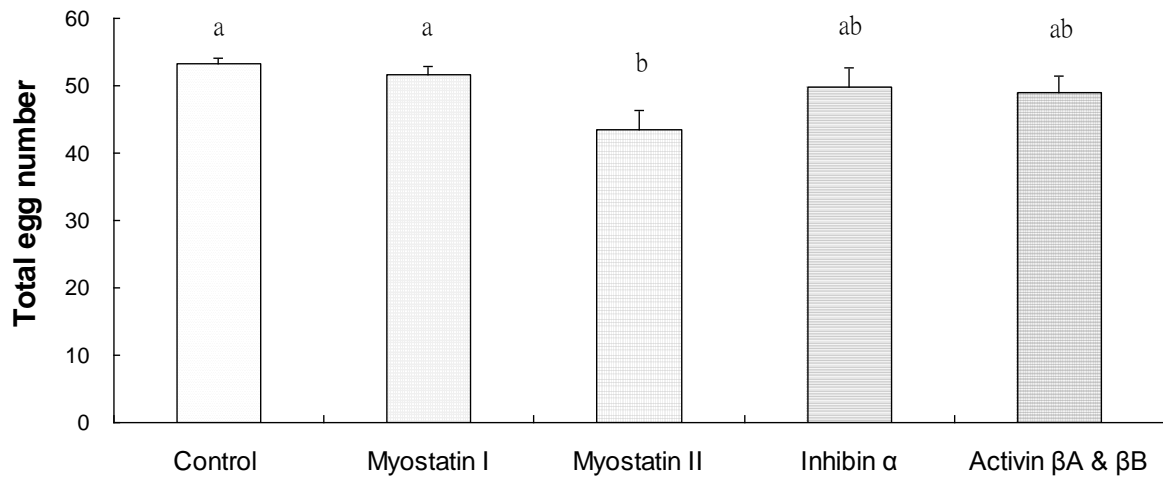
圖二十一、激活素組主動免疫所產生之 IgY (1:1000 稀釋倍數) 與激活素  $\beta$ B 重組蛋白之結合試驗。雞 (A-E) 分別注射激活素  $\beta$ A 及激活素  $\beta$ B 胜肽，於不同次追加注射後收集雞蛋，純化蛋中之 IgY，再與激活素  $\beta$ B 重組蛋白以西方點墨法進行結合試驗。

Fig.21 Western blot analysis of recombinant activin  $\beta$ B using purified IgY from eggs (1:1000). chickens (A-E) were immunized by activin  $\beta$ A and activin  $\beta$ B peptides.



圖二十二、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體對雞隻每月體重之影響。(對照組及抑制素組 n=4；肌肉生長抑制素及激活素組 n=5)。

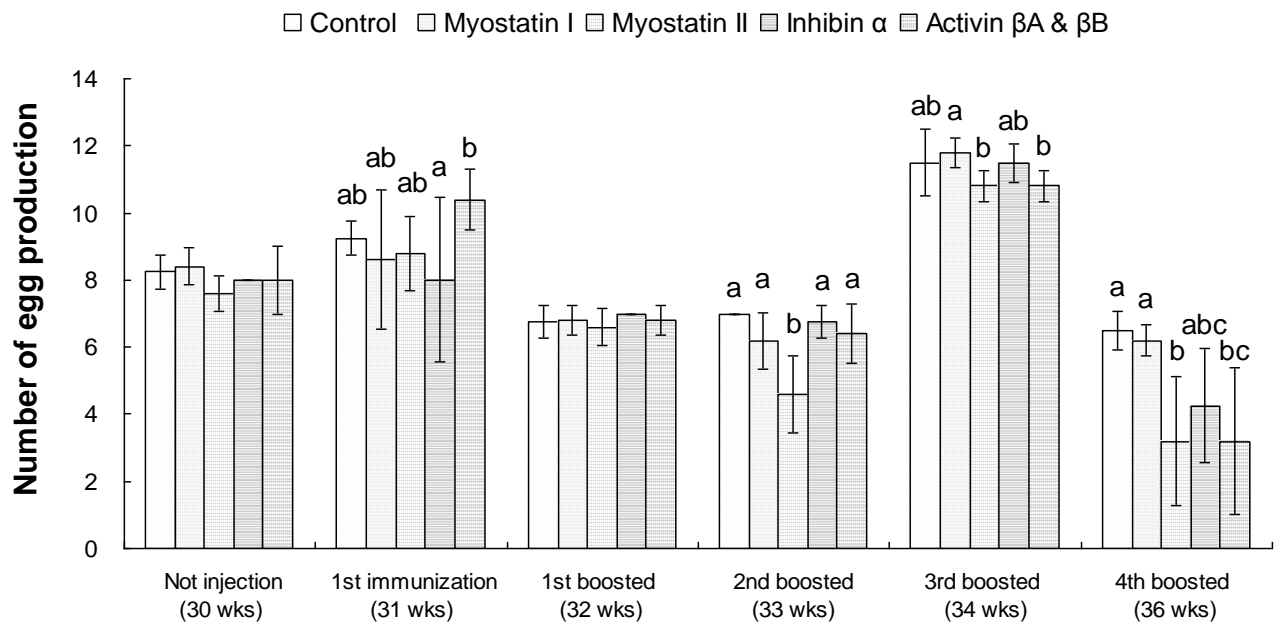
Fig.22 Effect of internal myostatin, activin and inhibin antibodies on chicken body weight during experiment period. (Control and inhibin group n=4; myostatin and activin group n=5) .



圖二十三、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體對雞隻總產蛋數之影響。(對照組及抑制素組 n=4；肌肉生長抑制素及激活素組 n=5)。不同字母表示具顯著差異 (p<0.05)。

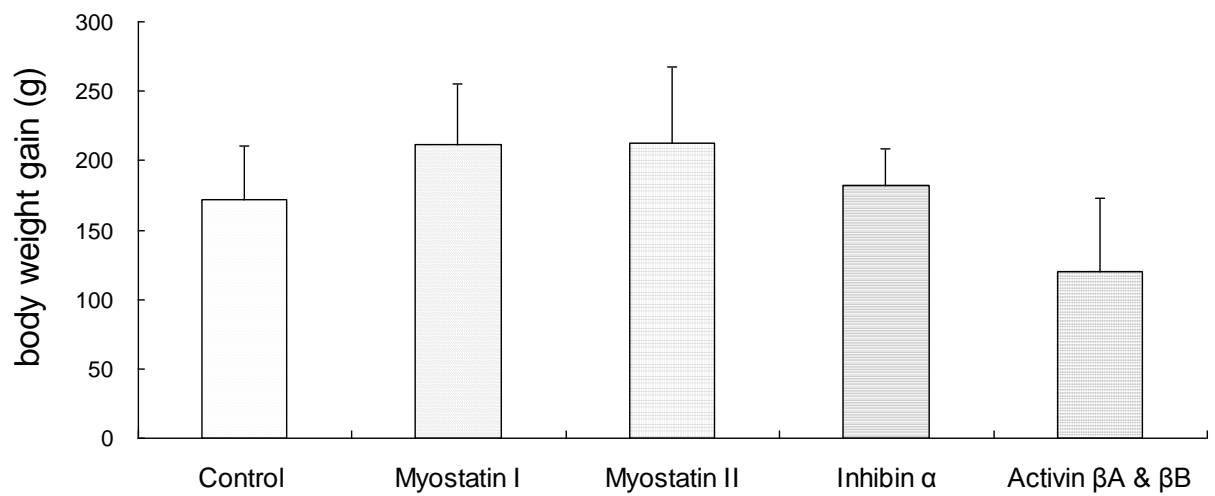
Fig.23 Effect of internal myostatin, activin and inhibin antibodies on egg production in chickens. Values are means  $\pm$  SE. [Control and inhibin group n=4; myostatin and activin group n =5; Different letters indicate significantly different (p<0.05)].





圖二十四、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體對雞隻不同時間內產蛋量之影響。(Means ± SE；對照組及抑制素組 n=4；肌肉生長抑制素及激活素組 n=5)。

Fig.24. Effect of internal myostatin, activin and inhibin antibodies on egg production in chickens during various boosted periods. Values are means ± SE. [Control and inhibin group n=4; myostatin and activin group n=5; Different letters indicate significantly different (p<0.05)].



圖二十五、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體對雞隻增重之影響。(Means  $\pm$  SE; 對照組及抑制素組 n=4; 肌肉生長抑制素及激活素組 n=5)。

Fig.25 Effect of internal myostatin, activin and inhibin antibodies on total body weight gain in chickens. Values are means  $\pm$  SE. (Control and inhibin group n=4; myostatin and activin group n=5).

表九、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體對雞隻增重及各組織重量之影響

Table 9. Effect of internal myostatin, activin and inhibin antibodies on total body weight gain and organ/tissue weight in chickens

Treatment group	Body weight gain (g)	Brain weight (g)	Liver weight (g)	Right leg weight (g)	Heart weight (g)
Control	172.25 ± 38.67	1.70 ± 0.05	38.25 ± 3.39	109.23 ± 1.69	5.93 ± 0.13 <sup>ab</sup>
Myostatin I	211.40 ± 43.79	1.64 ± 0.02	35.80 ± 1.29	110.41 ± 4.77	5.87 ± 0.35 <sup>ab</sup>
Myostatin II	212.75 ± 54.66	1.64 ± 0.05	34.63 ± 2.16	120.07 ± 6.47	6.66 ± 0.34 <sup>a</sup>
Inhibin α	182.25 ± 26.69	1.61 ± 0.02	35.99 ± 1.64	110.35 ± 3.67	5.94 ± 0.37 <sup>ab</sup>
Activin βA & βB	119.80 ± 23.82	1.68 ± 0.03	37.66 ± 3.69	114.01 ± 6.59	5.25 ± 0.20 <sup>b</sup>

Values are mean±standard error.

Means within the same column with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ )

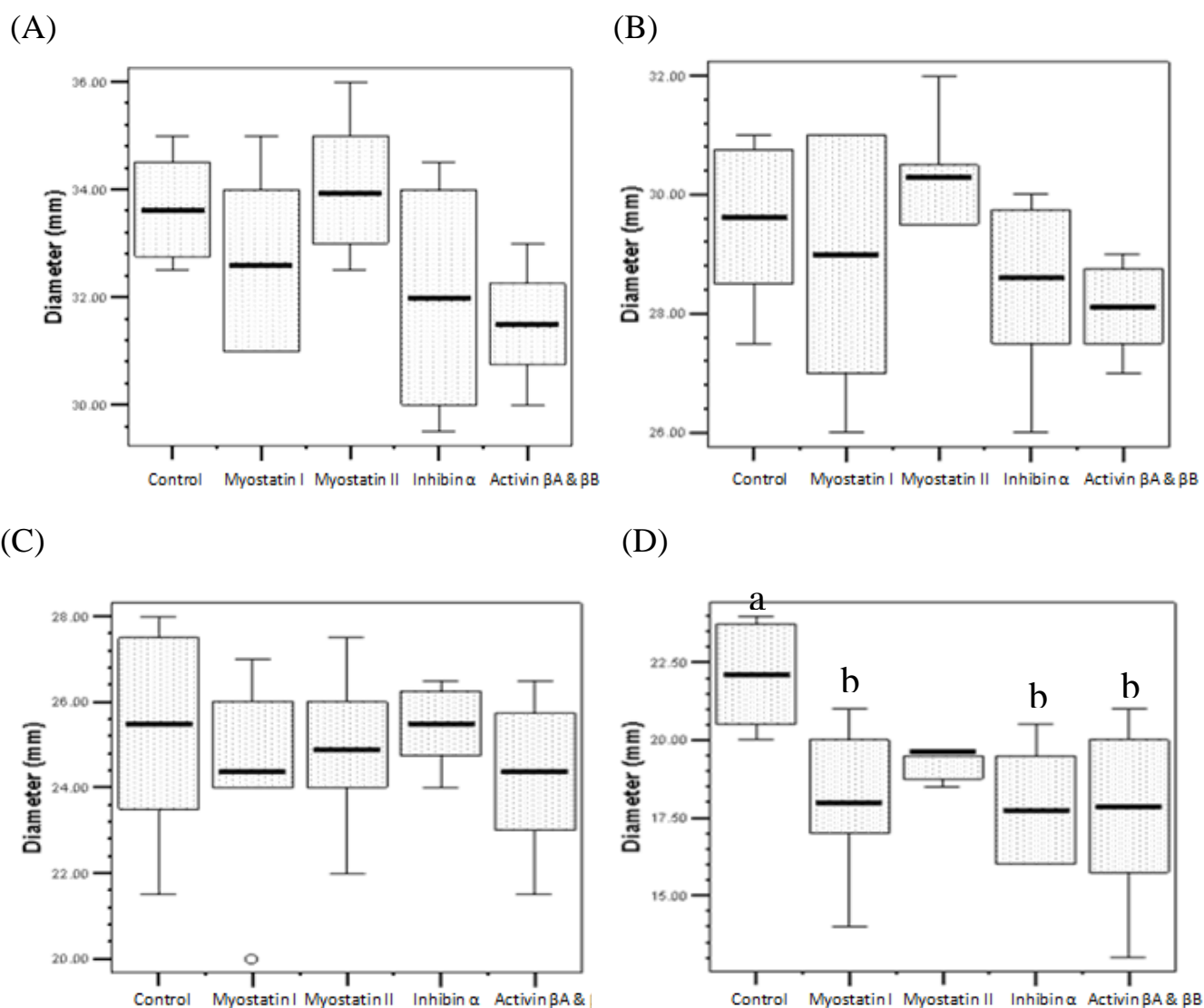
表十、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體對雞隻卵巢、腹脂重量及濾泡數之影響

Table 10. Effect of internal myostatin, activin and inhibin antibodies on the weights of ovary and intra-abdominal fat, and follicle number in chickens

Treatment group	Ovary weight (g)	Intra-abdominal fat weight (g)	Small yolk follicle number (6-12 mm)	White follicle number (2-6 mm)	Large yolk follicle number (>12 mm)
Control	49.63 ± 1.85 <sup>ac</sup>	24.28 ± 3.01 <sup>a</sup>	16.75 ± 1.11	147.00 ± 26.88 <sup>a</sup>	5.50 ± 0.29
Myostatin I	37.60 ± 3.58 <sup>b</sup>	21.11 ± 1.84 <sup>ab</sup>	16.80 ± 1.46	50.20 ± 7.25 <sup>b</sup>	4.20 ± 0.20
Myostatin II	46.30 ± 2.53 <sup>c</sup>	19.64 ± 4.42 <sup>ab</sup>	13.60 ± 1.94	98.20 ± 7.58 <sup>c</sup>	4.80 ± 0.20
Inhibin α	42.39 ± 3.44 <sup>abc</sup>	14.12 ± 5.39 <sup>ab</sup>	16.50 ± 0.65	90.23 ± 1.25 <sup>c</sup>	4.75 ± 0.48
Activin βA & βB	41.94 ± 2.64 <sup>abc</sup>	13.97 ± 1.62 <sup>b</sup>	12.00 ± 3.21	101.60 ± 21.1 <sup>c</sup>	4.00 ± 1.00

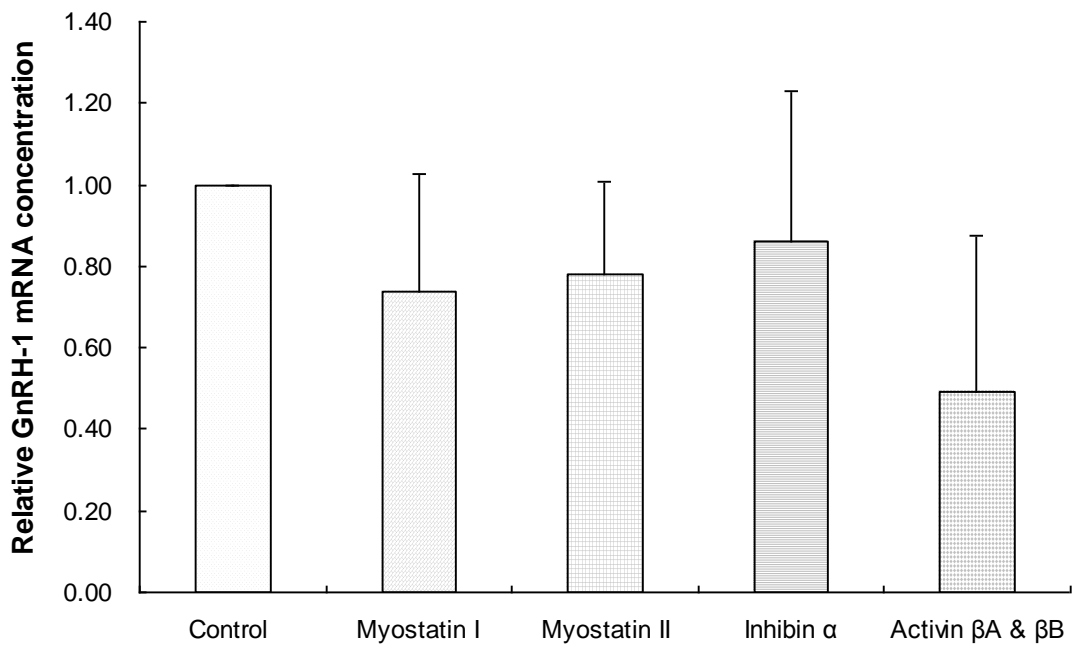
Values are mean±S.E.

Means within the same column with different letters are significantly different (p<0.05)



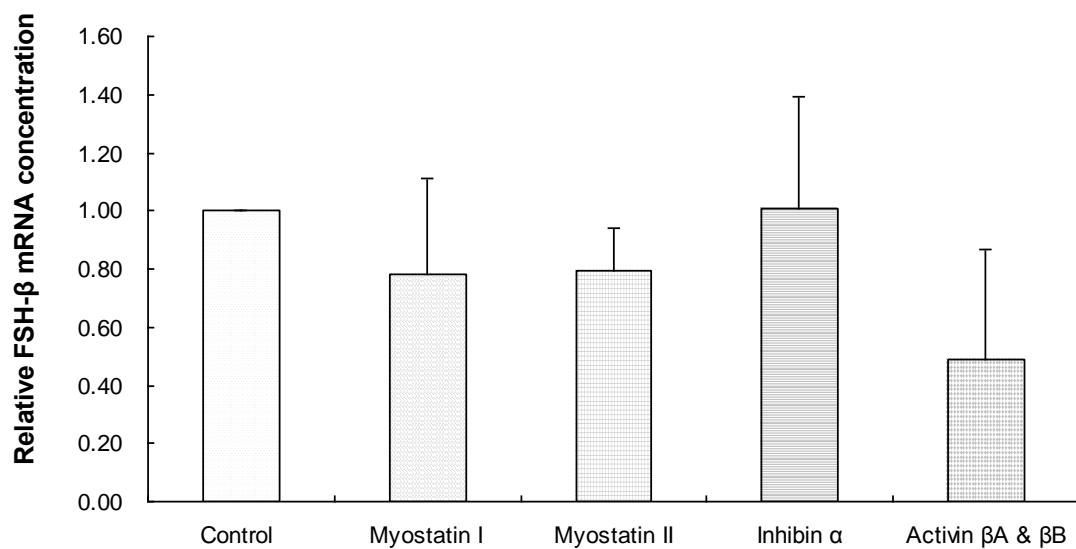
圖二十六、雞體內所產生之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素抗體對雞隻大卵黃濾泡 (>12 mm) 發育之影響。各組大卵黃濾泡 (A) F1; (B) F2; (C) F3; (D) F4。(對照組及抑制素組 n=4; 肌肉生長抑制素及激活素組 n=5; 黑色粗線條為濾泡直徑平均值; 不同字母表示具顯著差異, p<0.05)。

Fig.26 Effect of internal myostatin, activin and inhibin antibodies on follicular development in chickens. Diameters of various large yolk follicle (>12 mm) (A)F1; (B)F2; (C)F3; (D)F4. (Control and inhibin group n=4; myostatin and activin group n=5; The black thick line is the average diameter of follicles; Different letters indicate significantly different; p<0.05) .



圖二十七、以即時定量 PCR 分析雞腦垂腺之 *GnRH-1* 基因表現 (Means ± SE; 對照組及抑制素組 n=4; 肌肉生長抑制素及激活素組 n=5)。

Fig.27 Real-time PCR analysis of *GnRH-1* gene expression in chicken pituitary gland. Values are means ± SE. (Control and inhibin group n=4; myostatin and activin group n=5).



圖二十八、以即時定量 PCR 分析雞腦垂腺之 *FSH-β* 基因表現 (Means ± SE; 對照組及抑制素組 n=4; 肌肉生長抑制素及激活素組 n=5)。

Fig.28 Real-time PCR analysis of *FSH-β* gene expression in chicken pituitary gland. Values are means ± SE. (Control and inhibin group n=4; myostatin and activin group n=5).

# 討論

## 壹、 試驗設計

肌肉生長抑制素在 1997 年被確認為扮演負調節動物骨骼肌肉之生長與發育之角色 (McPherron *et al.*, 1997a; McPherron and Lee, 1997b), 其相關調節之訊息傳導路徑亦被詳細研究 (Tsuchida *et al.*, 1996; Rebbapragada *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005), 故科學家嚐試透過各種方式抑制肌肉生長抑制素蛋白質, 以提高畜產動物之生長速度。近年之報告顯示, 抑制肌肉生長抑制素表現的因子包含肌肉生長抑制素前驅胜肽、濾泡抑制素、突變激活素二型接受體, 及肌肉生長抑制素抗體 (Lee and McPherron, 2001; Bogdanovich *et al.*, 2002; Bogdanovich *et al.*, 2005; Lee, 2007; Nakatani *et al.*, 2008; Gilson *et al.*, 2009)。而實驗證實抑制肌肉生長抑制素確實能提高小鼠骨骼肌肉之重量與纖維大小及數量, 透過肌肉生長抑制素之基因剔除, 亦能增加小鼠骨骼肌肉重量 (McPherron *et al.*, 1997a)。

先前的報告中指出, 雞之肌肉生長抑制素在各組織中之表現情形與哺乳類有所不同, 報告中指出肌肉生長抑制素 mRNA 雞之於各組織皆有表現, 尤以骨骼肌、砂囊、小腸、睪丸及卵巢表現量高於其他組織, 實驗亦發現肌肉生長抑制素在雞胚胎發育過程中, 以卵巢組織具高量之表現 (Kubota *et al.*, 2007; Sundaresan *et al.*, 2008), 故肌肉生長抑制素或許除了影響骨骼肌肉發育, 亦可能與雞之生殖發育調節有相當重要之關係。在 1988 年報告中的數據結果就可窺見, 當母牛為”雙倍肌肉性狀”時, 與公牛交配



所得出的仔畜數量除了遠低於正常性狀交配之仔畜量（約少 55%~62%；Arthur *et al.*, 1988; Arthur *et al.*, 1989），也發現小牛出生率顯著的降低，作者之結論為主要受到死胎率（still births）與小牛生產後死亡率（postpartum death）遠高於正常性狀交配之牛隻所致。在二十多年後，本研究團隊亦透過主動免疫之方式，誘發母鼠產生抑制肌肉生長抑制素蛋白質之抗體，而其窩仔數亦顯著下降。透過卵巢切片染色後觀察，其成熟濾泡亦顯著少於對照組，另以肌肉生長抑制素處理之母鼠受精卵亦顯著少於對照組（Liang *et al.*, 2007）。

上述兩份關鍵報告指出，牛及小鼠會受到肌肉生長抑制素之負調節而減少仔畜量。透過訊息傳導機制，可以了解到肌肉生長抑制素是以 ActRIIB 做為訊息之接受子，這個關鍵的接受子觸發我們深入了解到 ActRIIB 原為激活素之接受子，而激活素之主要功能即為激活腦下垂體釋放激濾泡素，扮演著誘導卵泡生成之角色，因此，肌肉生長抑制素可能亦參與動物生殖生理之調節，故本研究利用主動免疫方式，注射合成之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素之胜肽作為抗原，誘發產蛋母雞產生抗體，藉此中和動物體內此三種蛋白質活性，以探討其對雞之生殖生理及生長性狀之影響。

試驗分成五組，對照組（PBS）、肌肉生長抑制素 I 組、肌肉生長抑制素 II 組、抑制素  $\alpha$  組及激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組，試驗選擇以來亨蛋雞為試驗模式動物，其原因為來亨蛋雞為人類透過育種方式，所得到之極佳產蛋性能之蛋雞，其初產日齡為 152~172 天，約在 22 周後開始產蛋，通常在 30~32 周左右到達產蛋高峰（鍾，2004）。在產蛋高峰期，其每日產蛋率可達 92%~97%，即

是約一天產一蛋。若是各處理組中之濾泡發育或濾泡生長受到影響，則雞隻產蛋率亦會產生影響及改變。

## 貳、 肌肉生長抑制素、激活素及抑制素對雞隻生長性狀之影響

肌肉生長抑制素 I/II 組及抑制素  $\alpha$  組對於每月雞隻體重有增加之趨勢，尤以肌肉生長抑制素 I 組優於肌肉生長抑制素 II 組，最高可增加約 3.7% (35 週齡；肌肉生長抑制素 I 組)，而抑制素  $\alpha$  組最高可增加雞隻體重約 2.89% (39 週齡)。相對於肌肉生長抑制素 I/II 組及抑制素  $\alpha$  組，激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組最高可抑制雞隻體重約 9.44% (44 週齡) 及 8.77% (48 週齡)，在 30~52 週齡之增重部分，激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組約低於對照組 50 克重 (約降低 30.5%)，而此組與肌肉生長抑制素 I 組之間最大差距為 10.30% (48 週齡)，與肌肉生長抑制素 II 之間最大差距為 9.00% (44 週齡) 及與抑制素  $\alpha$  組之間最大差距為 11.10% (44 週齡)。在各組對個體內各器官增重之影響情形，在腦，肝臟及心臟重量皆無顯著差異，由於本試驗並未針對骨骼肌各部份肌肉影響進行詳細之分析，所以無法得知各組對骨骼各部份肌肉生長之影響。

另外值得討論的是，為何雞隻經由本試驗抑制肌肉生長抑制素後，無法得到較佳之生長性能？其可能性為：一，本試驗選擇之試驗動物為來亨蛋雞，其在市場上主要提供產物為雞蛋，而非食用屠體，而其能量以供給產蛋為主，在體重增加上皆劣於市售肉雞，故本試驗未能發現其體重顯著增加，二，透過人為養育或育種的過程中，來亨蛋雞保留了較好之生長性狀與產蛋性能，而其肌肉之表現可能已達極限，故經由人為操控影響肌肉生長抑制

素的表現，並不能顯著提高肌肉之表現，但在非食用動物中（如小鼠），未經過人為育種之過程，故相對於其它育種動物的表現上，操控肌肉生長抑制素的表現或許較能顯著增加骨骼肌肉發育情形。如先天肌肉生長抑制素缺陷之比利時藍牛，其平均骨骼肌肉重量增加 20-25% (McPherron *et al.*, 1997b)。杜興氏肌肉營養不良症 (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) 模式之四周齡 *mdx* 小鼠，以腹腔注射 (dose 60 mg kg<sup>-1</sup>) 注入抗肌肉生長抑制素蛋白質之專一性抗體，亦發現其平均骨骼肌肉重量增加約 34% (Bogdanovich *et al.*, 2002)。肌肉生長抑制素基因剔除小鼠，其平均骨骼肌肉重量增加約 2-3 倍 (McPherron *et al.*, 1997b)。

一篇研究激活素 A 影響骨骼肌肉細胞表現之報告，指出在每毫升培養液中加入 5 ng 之激活素，其結果為肌原細胞 (myocytes; single nucleus) 數量未改變，但小肌管細胞 (Small myotubes; 2-4 nuclei) 及大肌管細胞 (Large myotubes; >5 nuclei) 之數量皆顯著被抑制 (Link and Nishi, 1997)。本研究為抑制激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  之蛋白表現，雖未檢測肌肉細胞數量，抑制激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組的腿重部分並無顯著改變，但仍是具有抑制體重增加之趨勢。

綜合本研究結果可發現肌肉生長抑制素 I/II 組及抑制素  $\alpha$  組有增加雞隻體重及增重之趨勢，而激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組則有抑制雞隻體重及增重之趨勢。

### 參、 肌肉生長抑制素、激活素及抑制素對雞隻生殖性狀之影響

各組雞隻主動免疫注射試驗產生之 IgY 與重組蛋白親和性試驗顯示，肌肉生長抑制素 I 組（胜肽設計靠近 RSRR 活化區）之其中三隻免疫注射雞隻產生之抗體較佳，但在產蛋表現並未發現因產生抗體較佳而顯著抑制產蛋表現之影響，而相對於肌肉生長抑制素 II 組（胜肽設計靠近雙體雙硫鍵形成位置）之試驗，所有雞隻產生之抗體對肌肉生長抑制素重組蛋白皆有好之親和性，此組試驗之產蛋率也確實在第二、四次追加免疫注射後產蛋率個體間皆有顯著性之下降。本研究抑制肌肉生長抑制素 II 組試驗亦統計在 30 到 36 週期間之產蛋率（圖二十二），就試驗結果而言，利用肌肉生長抑制素 II 胜肽所產生之抗原確實可以有效抑制雞隻產蛋之表現，再仔細對照各個體間來看，第二次追加免疫注射後，其中兩隻雞產蛋較少，而在第五次追加免疫後，其中三隻雞產蛋較少。而與對照組之統計結果在第二、四次追加免疫後產蛋率有顯著下降（ $p < 0.05$ ），在第四次追加免疫注射後觀察各個體每日產蛋，約 5~8 天產蛋即會恢復。故就結果而論，因此肌肉生長抑制素 II 組之處理能有效的誘發雞隻產生抗肌肉生長抑制素之抗體並抑制產蛋率，由原先推論來看，肌肉生長抑制素與直接影響濾泡發育的激活素，具有相同之細胞訊號傳導途徑，本研究中亦觀察到腦下垂體內泌素之表現，皆有因抑制肌肉生長抑制素及激活素而被抑制之趨勢（圖二十六），此結果明確的指出肌肉生長抑制素確實會影響到雞之生殖生理表現。在此親和性試驗中亦發現，並非透過此親和性試驗即可以相對觀察到抑制肌肉生長抑制素後對產蛋率影響之多寡，各雞隻個體間需要達到肌

肉生長抑制素影響雞隻產蛋而所需之抗體量並不相同。在激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組，透過產生激活素  $\beta A$  及  $\beta B$  之抗體而抑制激活素 A、激活素 B 及激活素 AB 這三種蛋白質之表現，在各雞隻個體激活素  $\beta A$  抗體與其重組蛋白隻親和性表現結果，第四次追加免疫注射後可在轉漬膜上觀察到激活素  $\beta A$  之訊號出現。而各雞隻個體激活素  $\beta B$  抗體與其重組蛋白之親和性表現結果，在第一至四次追加免疫注射後皆可於轉漬膜上觀察到激活素  $\beta B$  之訊號出現，在此組雞隻產蛋在第四次追加免疫注射後產蛋率，其中四隻雞隻個體間皆有顯著性之下降。對照對照組之統計結果發現產蛋率亦有顯著下降 ( $p=0.023$ )，其產蛋下降趨勢亦約在 5~8 天後恢復。在抑制素  $\alpha$  組，透過產生抑制素  $\alpha$  之抗體而抑制抑制素 A 及抑制素 B 之表現，抑制素在生理功能上與激活素相互拮抗，故抑制素  $\alpha$  在本研究可當作激活素組的負對照組。抑制素  $\alpha$  組第四次追加免疫注射後各雞隻個體產蛋狀態以其中兩隻雞之產蛋較同組顯著下降，其產蛋下降趨勢約為 3~7 天後恢復，但在統計上與對照組並無顯著差異。另外，透過試驗觀察，並不是每隻雞接受相同的抗原注射，皆能誘發出相等程度親和性之抗體表現，故透過此試驗可發現以相同條件測試雞蛋抗體之親和性表現在各雞隻個體間並不一致，其原因可能是以胜肽做為抗原，可辨識 B 細胞抗原之抗原決定位太少或抗原性不穩定，故部分抗原誘發的程度不盡相同。

先前有報告提到利用主動免疫方式，注射以大腸桿菌表現之 MBP-抑制素  $\alpha$  mature region 之融合蛋白到日本鵪鶉 (Japanese quail hens) 可提早日本鵪鶉之初產蛋日及在 30 週間之產蛋率 (Moreau *et al.*, 1998)，本試驗亦是透過注射抑制素  $\alpha$  mature

regIon 之一部份胜肽做為抗原來引起免疫反應，本試驗並無法觀察初產蛋日之不同，但經過五次的抗原注射，在最後一次注射後，可觀察到抑制素  $\alpha$  組各雞隻個體產蛋狀態以其中兩隻雞隻產蛋較同組顯著下降，其產蛋下降趨勢約為 3~7 天後恢復，但在統計上與對照組並無顯著差異。抑制抑制素  $\alpha$  組統計 30 到 36 週期間之產蛋率（圖二十二），根據試驗結果，抑制抑制素  $\alpha$  蛋白質並沒有顯著提高或降低產蛋之趨勢，且本試驗之 FSH- $\beta$  之 mRNA 表現並無顯著不同，原因可能為本試驗使用動物為來亨蛋雞，而試驗作用期間為來亨蛋雞產蛋高峰時期，因此較不適合探討抑制抑制素  $\alpha$  對增加產蛋之影響。而此篇報告作者認為會提高產蛋之可能性為抑制素在腦下垂體之功能為抑制 FSH 分泌及透過旁分泌而競爭 FSH 之結合位 (Woodruff *et al.*, 1990; Findlay, 1993)，故透過抑制抑制素可減少其與 FSH 結合位之競爭，而達到提高產蛋的想法。但作者也提到，抑制素-FSH 之關係並不是固定比例的，儘管透過各種方式抑制抑制素，可得到提高產蛋之結果，亦不代表抑制素能完全調控 FSH 之表現，可能有更複雜機制調控著濾泡發育及繁殖性能。

哺乳類中激活素及抑制素被認為與濾泡發育及成熟有極密切之關係，其功能為激活或抑制腦下垂體釋放 FSH，而 FSH 扮演著誘導卵泡之生成，並且刺激雌激素 (estrogen) 的增加。故透過此主動免疫試驗，應可觀察到激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組抑制了濾泡發育，若肌肉生長抑制素的生理功能與激活素功能類似或相同，應也可以得到相同之結果，故首先觀察各組主動免疫試驗對濾泡發育之情形。在白色濾泡部分，肌肉生長抑制素 I/II 組及激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組之處理，確實能有效的抑制白色濾泡之數量，肌肉生

長抑制素 I 組之結果也較各組來的顯著 ( $p < 0.05$ )，仔細比較此組各個體之卵巢發育情形，發現其中一隻雞之卵巢完全地萎縮，沒有大卵黃濾泡 (F1~F5) 及小卵黃濾泡，幾乎只剩下白色濾泡群，試驗過程此母雞亦能觀察到後期完全沒有產蛋，如果剔除此個體後，其抑制比例亦達 45.1%，亦有顯著差異。故肌肉生長抑制素 I/II 組及激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組處理後，皆有抑制白色濾泡之情形。在小卵黃濾泡部分，亦可觀察到肌肉生長抑制素 II 組及激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組皆傾向抑制小卵黃濾泡之數量，而在肌肉生長抑制素 I 組，在白色濾泡部分顯著被抑制，卻未觀察到其連續性的影響小卵黃濾泡數量，而大卵黃濾泡數量亦趨向減少及直徑亦小於對照組，此結果明確指出肌肉生長抑制素組及激活素組皆會影響到各階段濾泡發育。

透過量測直徑大於 12 mm 之大卵黃濾泡數，發現對照組之個體皆可觀察到最小 F5~F6 的濾泡，而試驗各組皆只能觀察到最小 F4~F5 的濾泡，各試驗組之平均大卵黃濾泡數相對於對照組有偏少之趨勢，統計上未達顯著之差異 ( $p = 0.392$ )，結果仍顯示肌肉生長抑制素 I 組及激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組之大卵黃濾泡之平均數量低於對照組約 23.6%~27.2%。以各級大卵黃濾泡 (F1~F4) 之平均直徑皆在對照組之下 (肌肉生長抑制素 II 組除外)，而觀察其在各級濾泡大小之趨勢，各試驗組皆可發現濾泡在越早期，越易受到試驗處理之影響，尤其肌肉生長抑制素 I 組、抑制素  $\alpha$  組及激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組三組在 F4 濾泡群可發現到顯著抑制濾泡大小，故肌肉生長抑制素 I/II 組及激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  組之結果亦有抑制大卵黃濾泡發育之趨勢。

先前的研究指出，利用主動免疫方式，注射抑制素  $\alpha$  mature

region 至母雞之結果，可發現在 29 週時，顯著提高兩倍之直徑 8~9.9 mm 濾泡數 (Lovell *et al.* 2001)，此濾泡大小相對於本試驗分類為小卵黃濾泡 (直徑 6~12 mm) 部分，但在本試驗之結果並無顯著差異。此報告亦提到相對於注射抑制素  $\alpha$  mature region 組，直徑小於 6 mm 濾泡數量及直徑大於 12 mm 之濾泡直徑並無差異，但在本試驗之抑制素  $\alpha$  組結果可觀察到直徑小於 6 mm 之濾泡數量顯著低於對照組，而 F4 濾泡直徑顯著小於對照組。故本試驗之抑制素  $\alpha$  組處理亦對濾泡發育有著極大之影響。

另一篇研究，利用肌肉注射激活素  $\beta$ A 之質體到小鼠體內，大量表現激活素  $\beta$ A 以觀察成年母小鼠對繁殖性能之影響 (Kim *et al.*, 2008)，結果發現，注射激活素  $\beta$ A 質體組，其卵巢重量有些許增加，而黃體之數量亦隨之增加，作者認為黃體之數量增多，間接證明了增加排卵速率；另外，透過注射激活素  $\beta$ A 質體，發現在 E15.5 天時之胚胎，與對照組比較則顯著增加胚胎之大小，但約有 10% 之 E15.5 天胚胎死亡，仔細觀察死亡之胚胎，皆可觀察到嚴重的組織退化，而此組存活下來之胚胎體重約比對照組重 1.5 倍，但此差異只維持在出生後約三週間，而在六週後體重即恢復與對照組相似。

濾泡發育與其相關內分泌素表現極為密切，本試驗透過收集各組個體之腦下垂體，分析 *GnRH-1* 及 *FSH- $\beta$*  之 mRNA 表現。下視丘透過激性腺素釋放素刺激腦垂體前葉分泌激濾泡素，在血清中之激濾泡素約有 50~67% 是受到激性腺素釋放素所影響 (Culler and Nagro-Vilar, 1986)。經由實驗證明，激性腺素釋放素直接影響 *FSH- $\beta$*  的轉錄作用，而 *FSH- $\beta$*  之表現直接影響激濾泡素蛋白質之表現 (Dalkin *et al.*, 2001; Haisenleder *et al.*, 1991)，故本試驗以即



時定量聚合酶連鎖反應偵測 *GnRH-1* 及 *FSH-β* 之 mRNA 表現。其結果發現肌肉生長抑制素 I/II 組及激活素 βA & βB 組之處理，皆有抑制 *GnRH-1* 及 *FSH-β* 之 mRNA 表現之趨勢，或許在結果上並無法觀察到顯著差異，其原因應是各個體內泌素的表現並不容易表現一致，不同個體在表現內泌素的狀態亦不相同；且各處理個體數不足所致。若能增加試驗之個體數，猜測應可得到較佳之試驗數據。儘管本試驗數據並無顯著之差異，但其結果卻符合原先試驗設計之假設。肌肉生長抑制素 I/II 組抑制 *GnRH-1* mRNA 表現約為 24%，抑制 *FSH-β* 之 mRNA 表現約為 21%；而激活素 βA & βB 組抑制 *GnRH-1* mRNA 表現約為 50.7%，抑制 *FSH-β* 之 mRNA 表現約為 51%，綜合本研究結果，抑制 *GnRH-1* mRNA 表現似乎亦同時抑制 *FSH-β* 之 mRNA 表現，而先前研究指出若 *FSH-β* 之 mRNA 表現被抑制，其激濾泡素之蛋白質表現亦會被限制 (Dalkin *et al.*, 2001; Haisenleder *et al.*, 1991)。故本研究發現為抑制肌肉生長抑制素表現，亦能抑制激濾泡數之蛋白質表現，其結果與抑制激活素之表現有相同趨勢。

總合上述試驗結果，可以發現到抑制肌肉生長抑制素後，無論在外在的產蛋率表現，體內卵巢濾泡數量之表現，以及在生殖生理最重要之中樞-腦垂腺，觀察到 *GnRH-1* 及 *FSH-β* 之 mRNA 表現下降，這些結果皆可以證明在生殖生理方面，抑制肌肉生長抑制素與抑制激活素具有相同之影響，此試驗結果證明了肌肉生長抑制素在雞隻繁殖力的表現中，扮演非常重要之角色。

## 結 論

本研究以合成之肌肉生長抑制素、激活素及抑制素胜肽作為抗原，利用主動免疫方式，誘發產蛋母雞產生抗體，藉此中和動物體內此三種蛋白質之活性，以探討其對雞隻生長及生殖的影響。試驗結果顯示，抑制肌肉生長抑制素及抑制素  $\alpha$  蛋白質趨向提高雞隻增重及生長，而抑制激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  蛋白質則傾向抑制雞隻增重及生長；注射肌肉生長抑制素 II 組及激活素組皆顯著抑制產蛋表現；抑制肌肉生長抑制素及激活素  $\beta A$  &  $\beta B$  之蛋白質表現皆抑制白色濾泡（2-6 mm）發育及數量，小卵黃濾泡（6-12 mm）之數量，以及大卵黃濾泡數量與 F4 濾泡（>12 mm）濾泡直徑大小之趨勢。即時定量 PCR 之結果顯示，肌肉生長抑制素組及激活素組皆有抑制激濾泡素（*FSH- $\beta$* ）及激性腺素釋放素（*GnRH-1*）之 mRNA 的趨勢。綜合上述試驗結果發現，肌肉生長抑制素組能增加雞隻體重，激活素組則與肌肉生長抑制素組有相反之結果，此外，肌肉生長抑制素組及激活素組皆會抑制濾泡生成及繁殖性能。此結果證明肌肉生長抑制素在雞隻繁殖上扮演非常重要之角色。

## 英文摘要

The objective of this study was to investigate the effect of myostatin, activin and inhibin on growth and reproductive performance in chickens. Twenty-three chickens (25 weeks) were randomly assigned to five groups, control, myostatin-I, myostatin-II, activin, and inhibin. Through active immunization, laying hens were induced to produce myostatin, activin and inhibin antibodies by immunization with specifically synthetic peptides to neutralize the activities of these proteins in chicken body. The body weights were measured monthly and the daily egg production was monitored. The chickens were sacrificed after the fourth boosted to record the tissue weights, and the numbers of small yolk follicles (SYF; 6-12 mm) and white follicles (WF; 2-6 mm) from the ovaries. These results showed that myostatin-treated group tended to increase the chicken body weight. However, the activin-treated group gave opposite result. Injection of the myostatin- II peptide and activin peptide showed lower egg production rate. Moreover, both the myostatin-II-treated group and activin-treated group had the lower number of SYF and WF compared to the control group. The result from real-time PCR analysis showed that follicle stimulating hormone beta (*FSH-β*) and gonadotropin releasing hormone-1 (*GnRH-1*) mRNAs tended to be inhibited in the myostatin- and activin-treated groups. It is concluded that the myostatin-treated group tended to increase chicken body weight, whereas activin-treated group gave the opposite result. And both myostatin- and activin-treated groups reduced the follicle formation and reproductive performance. This results implied that myostatin play an important role in reproductivity in chickens.

(Key Words: Follicle formation, Growth performance, Myostatin, Reproductive performance)

## 參考文獻

- 鍾秀枝。2004。雞。行政院農業委員會畜產試驗所專輯第 89 號:46-47。
- Anawalt, B. D., R. A. Bebb, A. M. Matsumoto, N. P. Groome, P. J. Illingworth, A. S. McNeilly and W. J. Bremner. 1996. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:3341-3345.
- Arthur, P. F., M. Makarechian and M. A. Price. 1988. incidence of Dystocia and Perinatal Calf Mortality Resulting from Reciprocal Crossing of Double-muscled and Normal Cattle. *Can. Vet. J.* 29:163-167.
- Arthur, P. F., M. Makarechian, M. A. Price and R. T. Berg. 1989. Heterosis, maternal and direct effects in double-muscled and normal cattle: I. Reproduction and growth traits. *J. Anim. Sci.* 67:902-910.
- Beattie, G. M., A. D. Lopez, N. Bucay, A. Hinton, M. T. Firpo, C. C. King and A. Hayek. 2005. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* 23:489-495.
- Bilezikjian, L. M., A. Z. Corrigan, A. L. Blount and W. W. Vale. 1996. Pituitary follistatin and inhibin subunit messenger ribonucleic acid levels are differentially regulated by local and hormonal factors. *Endocrinology* 137:4277-4284.

- Bilezikjian, L. M., A. Z. Corrigan, J. M. Vaughan and W. M. Vale. 1993. Activin-A regulates follistatin secretion from cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 133:2554-2560.
- Bogdanovich, S., T. O. Krag, E. R. Barton, L. D. Morris, L. A. Whittemore, R. S. Ahima and T. S. Khurana. 2002. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420:418-421.
- Bogdanovich, S., K. J. Perkins, T. O. Krag, L. A. Whittemore and T. S. Khurana. 2005. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J.* 19:543-549.
- Bahr, J. M. 1991. The chicken ovary as a model of follicular development. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 9:352-359.
- Chen, Y. G., Q. Wang, S. L. Lin, C. D. Chang, J. Chuang and S. Y. Ying. 2006. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 231:534-544.
- Corrigan, A. Z., L. M. Bilezikjian, R. S. Carroll, L. N. Bald, C. H. Schmelzer, B. M. Fendly, A. J. Mason, W. W. Chin, R. H. Schwall and W. Vale. 1991. Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology* 128:1682-1684.
- Culler, M. D. and A. Negro-Vilar. 1986. Evidence that pulsatile follicle-stimulating hormone secretion is independent of endogenous luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 118:609-612.

- Dalkin, A. C., L. L. Burger, K. W. Aylor, D. J. Haisenleder, L. J. Workman, S. Cho and J. C. Marshall. 2001. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription by gonadotropin-releasing hormone: measurement of primary transcript ribonucleic acids by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Endocrinology* 142:139-146.
- Date, M., K. Matsuzaki, M. Matsushita, Y. Tahashi, K. Sakitani and K. inoue. 2000. Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. *J. Hepatol.* 32:251-260.
- de Kretser, D. M., M. P. Hedger, K. L. Loveland and D. J. Phillips. 2002. inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum. Reprod. Update* 8:529-541.
- DePaolo, L. V., M. Shimonaka, R. H. Schwall and N. Ling. 1991. in vivo comparison of the follicle-stimulating hormone-suppressing activity of follistatin and inhibin in ovariectomized rats. *Endocrinology* 128:668-674.
- Findlay, J. K. 1993. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.* 48:15-23.
- Findlay, J. K., A. E. Drummond, M. Dyson, A. J. Baillie, D. M. Robertson and J. F. Ethier. 2001. Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 180:139-144.

- Gilson, H., O. Schakman, S. Kalista, P. Lause, K. Tsuchida and J. P. Thissen. 2009. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297:E157-164.
- Gold, E. J., X. Zhang, A. M. Wheatley, S. L. Mellor, M. Cranfield, G. P. Risbridger, N. P. Groome and J. S. Fleming. 2005. betaA- and betaC-activin, follistatin, activin receptor mRNA and betaC-activin peptide expression during rat liver regeneration. *J. Mol. Endocrinol.* 34:505-515.
- Grobet, L., L. J. Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Menissier, J. Massabanda, R. Fries, R. Hanset and M. Georges. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17:71-74.
- Grobet, L., D. Poncelet, L. J. Royo, B. Brouwers, D. Pirottin, C. Michaux, F. Menissier, M. Zanotti, S. Dunner and M. Georges. 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm. Genome.* 9:210-213.
- Groome, N. P., P. J. Illingworth, M. O'Brien, I. Cooke, T. S. Ganesan, D. T. Baird and A. S. McNeilly. 1994. Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 40:717-723.

- Groome, N. P., P. J. Illingworth, M. O'Brien, R. Pai, F. E. Rodger, J. P. Mather and A. S. McNeilly. 1996. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:1401-1405.
- Haisenleder, D. J., A. C. Dalkin, G. A. Ortolano, J. C. Marshall and M. A. Shupnik. 1991. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology* 128:509-517.
- Harrison, C. A., P. C. Gray, W. H. Fischer, C. Donaldson, S. Choe and W. Vale. 2004. An activin mutant with disrupted ALK4 binding blocks signaling via type II receptors. *J. Biol. Chem.* 279:28036-28044.
- Harrison, C. A., P. C. Gray, W. W. Vale and D. M. Robertson. 2005. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends. Endocrinol. Metab.* 16:73-78.
- Huang, H. J., J. C. Wu, P. Su, O. Zhirnov and W. L. Miller. 2001. A novel role for bone morphogenetic proteins in the synthesis of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 142:2275-2283.
- Hully, J. R., L. Chang, R. H. Schwall, H. R. Widmer, T. G. Terrell and N. A. Gillett. 1994. Induction of apoptosis in the murine liver with recombinant human activin A. *Hepatology* 20:854-862.
- Johnson, A. L. and A. van Tienhoven. 1980. Plasma concentrations of six steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *Biol. Reprod.* 23:386-393.



- Johnson, A. L. and A. van Tienhoven. 1984. Effects of aminoglutethimide on luteinizing hormone and steroid secretion and ovulation in the hen. *Endocrinology* 114:2276-2283.
- Jones, K. L., D. M. de Kretser, S. Patella and D. J. Phillips. 2004. Activin A and follistatin in systemic inflammation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 225: 119-125.
- Krishnan, K. A., J. A. Proudman, D. J. Bolt and J. M. Bahr. 1993. Development of an homologous radioimmunoassay for chicken follicle-stimulating hormone and measurement of plasma FSH during the ovulatory cycle. *Comp. Biochem. Physiol. A* 105:729-734.
- Kambadur, R., M. Sharma, T. P. Smith and J. J. Bass. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7:910-916.
- Kim, M. N., M. N. Park, H. K. Jung, C. Cho, K. E. Mayo and B. N. Cho. 2008. Changes in the reproductive function and developmental phenotypes in mice following intramuscular injection of an activin betaA-expressing plasmid. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6:63.
- Kim, Y. S., N. K. Bobbili, Y. K. Lee, H. J. Jin and M. A. Dunn. 2007. Production of a polyclonal anti-myostatin antibody and the effects of in ovo administration of the antibody on posthatch broiler growth and muscle mass. *Poult. Sci.* 86:1196-1205.
- Kim, Y. S., N. K. Bobbili, K. S. Paek and H. J. Jin. 2006. Production of a monoclonal anti-myostatin antibody and the effects of in ovo administration of the antibody on posthatch broiler growth and muscle mass. *Poult. Sci.* 85:1062-1071.

- Kocabas, A. M., H. Kucuktas, R. A. Dunham and Z. Liu. 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochim. Biophys. Acta.* 1575:99-107.
- Kubota, K., F. Sato, S. Aramaki, T. Soh, N. Yamauchi and M. A. Hattori. 2007. Ubiquitous expression of myostatin in chicken embryonic tissues: its high expression in testis and ovary. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. integr. Physiol.* 148:550-555.
- Lee, S. J. 2007. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PLoS One* 2:e789.
- Lee, S. J. and A. C. McPherron. 1999. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:604-607.
- Lee, S. J. and A. C. McPherron. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9306-9311.
- Lee, S. J., L. A. Reed, M. V. Davies, S. Girgenrath, M. E. Goad, K. N. Tomkinson, J. F. Wright, C. Barker, G. Ehrmantraut, J. Holmstrom, B. Trowell, B. Gertz, M. S. Jiang, S. M. Sebald, M. Matzuk, E. Li, L. F. Liang, E. Quattlebaum, R. L. Stotish and N. M. Wolfman. 2005. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:18117-18122.
- Liang, Y. C., J. Y. Yeh and B. R. Ou. 2007. Effect of maternal myostatin antibody on offspring growth performance and body composition in mice. *J. Exp. Biol.* 210:477-483.

- Ling, N., S. Y. Ying, N. Ueno, S. Shimasaki, F. Esch, M. Hotta and R. Guillemin. 1986. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321:779-782.
- Link, B. A. and R. Nishi. 1997. Opposing effects of activin A and follistatin on developing skeletal muscle cells. *Exp. Cell. Res.* 233:350-362.
- Lovell, T. M., R. T. Gladwell, N. P. Groome and P. G. Knight. 2002. Differential effects of activin A on basal and gonadotrophin-induced secretion of inhibin A and progesterone by granulosa cells from preovulatory (F1-F3) chicken follicles. *Reproduction* 124:649-657.
- Lovell, T. M., P. G. Knight, N. P. Groome and R. T. Gladwell. 2001. Changes in plasma inhibin A levels during sexual maturation in the female chicken and the effects of active immunization against inhibin alpha-subunit on reproductive hormone profiles and ovarian function. *Biol. Reprod.* 64:188-196.
- Maguer-Satta, V., L. Bartholin, S. Jeanpierre, M. Ffrench, S. Martel, J. P. Magaud and R. Rimokh. 2003. Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGFbeta family. *Exp. Cell. Res.* 282:110-120.
- Majdic, G., A. S. McNeilly, R. M. Sharpe, L. R. Evans, N. P. Groome and P. T. Saunders. 1997. Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human fetus and neonate and during postnatal development in the rat. *Endocrinology* 138:2136-2147.

- Mason, A. J. 1994. Functional analysis of the cysteine residues of activin A. *Mol. Endocrinol.* 8:325-332.
- Matzuk, M. M. 1995. Functional analysis of mammalian members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Trends. Endocrinol. Metab.* 6:120-127.
- McDowell, N. and J. B. Gurdon. 1999. Activin as a morphogen in *Xenopus* mesoderm induction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10:311-317.
- McLachlan, R. i., K. D. Dahl, W. J. Bremner, R. Schwall, C. H. Schmelzer, A. J. Mason and R. A. Steiner. 1989. Recombinant human activin-A stimulates basal FSH and GnRH-stimulated FSH and LH release in the adult male macaque, *Macaca fascicularis*. *Endocrinology* 125:2787-2789.
- McLachlan, R. i., D. L. Healy, D. M. Robertson, H. G. Burger and D. M. de Kretser. 1987. Circulating immunoactive inhibin in the luteal phase and early gestation of women undergoing ovulation induction. *Fertil. Steril.* 48:1001-1005.
- McPherron, A. C., A. M. Lawler and S. J. Lee. 1997a Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387:83-90.
- McPherron, A. C. and S. J. Lee. 1997b Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:12457-12461.
- Moreau, J. D., D. G. Satterlee, J. J. Rejman, G. G. Cadd, K. G. Kousoulas and W. C. Fioretti. 1998. Active immunization of Japanese quail hens with a recombinant chicken inhibin fusion protein enhances production performance. *Poult. Sci.* 77:894-901.

- Munz, B., H. Smola, F. Engelhardt, K. Bleuel, M. Brauchle, i. Lein, L. W. Evans, D. Huylebroeck, R. Balling and S. Werner. 1999. Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair. *EMBO J.* 18:5205-5215.
- Nakatani, M., Y. Takehara, H. Sugino, M. Matsumoto, O. Hashimoto, Y. Hasegawa, T. Murakami, A. Uezumi, S. Takeda, S. Noji, Y. Sunada and K. Tsuchida. 2008. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J.* 22:477-487.
- Noce T, H. Ando, T. Ueda, K. Kubokawa, T. Higashinakagawa, S. Ishii. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the putative cDNA for the precursor molecule of the chicken LH-beta subunit. *J. Mol. Endocrinol.* 3:129-37.
- Ostbye, T. K., T. F. Galloway, C. Nielsen, i. Gabestad, T. Bardal and O. Andersen. 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem.* 268:5249-5257.
- Rebbapragada, A., H. Benchabane, J. L. Wrana, A. J. Celeste and L. Attisano. 2003. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol. Cell Biol.* 23:7230-7242.
- Rescan, P. Y., I. Jutel and C. Ralliere. 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204:3523-3529.

- Rios, R., I. Carneiro, V. M. Arce and J. Devesa. 2001. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:561-566.
- Roberts, S. B. and F. W. Goetz. 2001. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS Lett.* 491:212-216.
- Roberts, V., H. Meunier, P. E. Sawchenko and W. Vale. 1989. Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinology* 125:2350-2359.
- Robertson, D. M., L. M. Foulds, L. Leversha, F. J. Morgan, M. T. Hearn, H. G. Burger, R. E. Wettenhall and D. M. de Kretser. 1985. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126:220-226.
- Robertson, D. M., M. S. Giacometti and D. M. de Kretser. 1986. The effects of inhibin purified from bovine follicular fluid in several in vitro pituitary cell culture systems. *Mol. Cell Endocrinol.* 46:29-36.
- Rodgers, B. D. and G. M. Weber. 2001. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 129:597-603.

- Rodgers, B. D., G. M. Weber, C. V. Sullivan and M. A. Levine. 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* 142:1412-1418.
- Rudnicki, M. A., T. Braun, S. Hinuma and R. Jaenisch. 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71:383-390.
- Rudnicki, M. A., P. N. Schnegelsberg, R. H. Stead, T. Braun, H. H. Arnold and R. Jaenisch. 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75:1351-1359.
- Sartori, R., G. Milan, M. Patron, C. Mammucari, B. Blaauw, R. Abraham and M. Sandri. 2009. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296:C1248-1257.
- Schwall, R. H., K. Robbins, P. Jardieu, L. Chang, C. Lai and T. G. Terrell. 1993. Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. *Hepatology* 18:347-356.
- Shen ST, J. Y. Yu. 2002. Cloning and gene expression of a cDNA for the chicken follicle-stimulation hormone (FSH)-beta-subunit. *Gen Comp. Endocrinol.* 125:375-86.
- Steinberger, A. and E. Steinberger. 1976. Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 99:918-921.

- Stouffer, R. L., T. K. Woodruff, K. D. Dahl, D. L. Hess, J. P. Mather and T. A. Molskness. 1993. Human recombinant activin-A alters pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion, follicular development, and steroidogenesis, during the menstrual cycle in rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77:241-248.
- Sundaresan, N. R., V. K. Saxena, R. Singh, P. Jain, K. P. Singh, D. Anish, N. Singh, M. Saxena and K. A. Ahmed. 2008. Expression profile of myostatin mRNA during the embryonic organogenesis of domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Res. Vet. Sci.* 85:86-91.
- Thies, R. S., T. Chen, M. V. Davies, K. N. Tomkinson, A. A. Pearson, Q. A. Shakey and N. M. Wolfman. 2001. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* 18:251-259.
- Thomas, M., B. Langley, C. Berry, M. Sharma, S. Kirk, J. Bass and R. Kambadur. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* 275:40235-40243.
- Tilbrook, A. J., D. M. de Kretser and I. J. Clarke. 1999. Changes in the suppressive effects of recombinant inhibin A on FSH secretion in ram lambs during sexual maturation: evidence for alterations in the clearance rate of inhibin. *J. Endocrinol.* 161:219-229.



- Tilbrook, A. J., D. M. de Kretser and I. J. Clarke. 2001. influence of the degree of stimulation of the pituitary by gonadotropin-releasing hormone on the action of inhibin and testosterone to suppress the secretion of the gonadotropins in rams. *Biol. Reprod.* 64:473-481.
- Tilly, J. L., K. I. Kowalski and A. L. Johnson. 1991a. Cytochrome P450 side-chain cleavage (P450<sub>scc</sub>) in the hen ovary. ii. P450<sub>scc</sub> messenger RNA, immunoreactive protein, and enzyme activity in developing granulosa cells. *Biol. Reprod.* 45:967-974.
- Tilly, J. L., K. I. Kowalski and A. L. Johnson. 1991b. Stage of ovarian follicular development associated with the initiation of steroidogenic competence in avian granulosa cells. *Biol. Reprod.* 44:305-314.
- Trendelenburg, A. U., A. Meyer, D. Rohner, J. Boyle, S. Hatakeyama and D. J. Glass. 2009. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296:C1258-1270.
- Tsuchida, K. 2004. Activins, myostatin and related TGF-beta family members as novel therapeutic targets for endocrine, metabolic and immune disorders. *Curr. Drug. Targets. immune. Endocr. Metabol. Disord.* 4:157-166.
- Tsuchida, K., M. Nakatani, A. Uezumi, T. Murakami and X. Cui. 2008. Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. *Endocr. J.* 55:11-21.

- Tsuchida, K., P. E. Sawchenko, S. Nishikawa and W. W. Vale. 1996. Molecular cloning of a novel type I receptor serine/threonine kinase for the TGF beta superfamily from rat brain. *Mol. Cell Neurosci.* 7:467-478.
- Vale, W., J. Rivier, J. Vaughan, R. McClintock, A. Corrigan, W. Woo, D. Karr and J. Spiess. 1986. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321:776-779.
- Werner, S. and C. Alzheimer. 2006. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:157-171.
- Woodruff, T. K., R. J. Lyon, S. E. Hansen, G. C. Rice and J. P. Mather. 1990. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology* 127:3196-3205.
- Yang, J., T. Ratovitski, J. P. Brady, M. B. Solomon, K. D. Wells and R. J. Wall. 2001. Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.* 60:351-361.
- Yasuda, H., T. Mine, H. Shibata, Y. Eto, Y. Hasegawa, T. Takeuchi, S. Asano and I. Kojima. 1993. Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 92:1491-1496.
- Zhang, Y. Q., H. Shibata, H. Schrewe and I. Kojima. 1997. Reciprocal expression of mRNA for inhibin betaC and betaA subunits in hepatocytes. *Endocr. J.* 44:759-764.

## 小 傳

作者係中華民國-台灣台中市清水區人，生於民國七十四年四月二十四日。先後畢業於三田國小、清泉國中、縣立中港高中、私立亞洲大學。民國九十六於亞洲大學畢業，同年十月十七日進入陸軍及行政院海岸巡防署，盡人民應盡之義務。民國九十七年九月二十六日服役完畢，並於同年以甄選入學方式，考取私立東海大學畜產與生物科技學系碩士班，師從 歐柏榮博士研習分子生物領域至今。