

Development of Ecotoxicogenomic Biomarkers on the Freshwater Shrimp (*Neocaridina denticulate*) Following Short-Term Exposure to Dipropyl Phthalate

Yi-Chie Tsai, Hung-Hung Sung*

Department of Microbiology, Soochow University, Taipei
Email: *hhsung@scu.edu.tw

Received: Aug. 5th, 2013; revised: Sep. 10th, 2013; accepted: Sep. 26th, 2013

Copyright © 2013 Yi-Chie Tsai, Hung-Hung Sung. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Phthalate esters (PAEs), which are widely used in industrial chemicals that serve as important additives to impart flexibility to polyvinyl chloride resins and have become widely diffused in the environment, are considered to be endocrine disrupting chemicals (EDCs). In order to assess the toxicity of PAE to aquatic crustacean, after shrimps (*Neocaridina denticulate*) were short-term exposed to a sublethal concentration (50 mg/L) of dipropyl phthalate (DPrP), the differential expression genes were isolated and identified using suppression subtractive hybridization (SSH) on the samples prepared from the whole individual. There were 71 unique expressed sequence tags (ESTs) which were identified by homology with data-based sequences, including 23 ESTs corresponded to known genes and 48 ESTs with unknown function. The known genes could be divided into nine classes on the basis of physiological function: genes related to ribosomal, metabolism, immune and structural molecules, concerning the translation-related molecules, involved respiration and signaling, and responding to signaling and vision. By comparing the level of gene transcription in DPrP-treated group vs. non-treated group using semi-quantitative RT-PCR, we found that six of twelve selected genes were significantly up-regulated following exposure to DPrP at high concentration (50 mg/L), including two immune-related genes, one metabolism-related gene and 3 unknown genes. There were eight genes which are significantly responding to DPrP treatment at 1.0 mg/L, including five up-regulated genes (four known genes and one unknown gene) and three down-regulated unknown genes. After exposure to 0.5 mg/L of DPrP, only four genes (three known genes and one unknown gene) were affected and their mRNA levels increased significantly. These results suggest that *N. denticulate* may be harmed via the change of the globally physiological function following exposure in non-lethal PAE-polluted aquatic environment; in addition, the ESTs derived from *N. denticulate* can be used for studying the ecotoxicological effect of other pollutants in the aquatic environment.

Keywords: Dipropyl Phthalate (Dprp); Endocrine Disrupting Chemical (EDC); *Neocaridina denticulate*; Aquatic Crustacean; Differential Gene Expression; Suppression Subtractive Hybridization (SSH)

以短暂暴露于邻苯二甲酸二丙酯(Dipropyl Phthalate)之淡水多齿新米虾(*Neocaridina denticulata*)建立生态毒理基因组生物标志物

蔡伊茜, 宋宏红*

东吴大学微生物学系, 台北
Email: *hhsung@scu.edu.tw

收稿日期: 2013年8月5日; 修回日期: 2013年9月10日; 录用日期: 2013年9月26日

*通讯作者。

摘要: 邻苯二甲酸酯类化合物(phthalate esters; PAEs)是广泛用于塑料制品之塑化剂和造成环境污染甚为可观的内分泌干扰物质。本研究以多齿新米虾(*Neocaridina denticulata*)暴露于次致死剂量(50 mg/L)之一種 PAE——邻苯二甲酸二丙酯(dipropyl phthalate; DPrP)后 1 天, 利用抑制性扣减杂交法建立一套基因组指标, 探讨其全面基因的表现变化。实验中共筛得 71 个独特的表达序列标签(expressed sequence tags; ESTs), 包括 23 段 ESTs 对应为已知功能基因及 48 段 ESTs 为未知功能。根据生理功能, 已知功能基因分别与 9 类相关, 包括代谢、呼吸、防御、核糖体、染色体、转译、传讯、视觉与结构。虾子暴露于高浓度 DPrP (50 mg/L)时, 3 个免疫及代谢相关的基因和 3 个未知功能基因, 共 6 个基因的 mRNA 表现量明显下降。暴露于非致死剂量 1.0 mg/L 时, 共 8 个基因受到影响, 包括正调节的 4 个已知功能和 1 个未知功能基因, 以及 3 未知功能基因被负调控。虾子暴露于更低剂量 0.5 mg/L 后, 仅 4 个基因受到影响, 包括 3 个已知功能和 1 个未知功能基因之 mRNA 表现量明显上升。综合这些结果暗示, 包括 DPrP 在内之非致死浓度 PAEs 污染的水域可能藉由影响多齿新米虾的生理功能而威胁其存活; 此外, 起源于多齿新米虾的 ESTs 也许可用于水生环境中其他污染物之生态毒性效应的研究。

关键词: 邻苯二甲酸二丙酯(DPrP); 内分泌干扰物质; 多齿新米虾; 水生甲壳类; 差异表现基因; 抑制性扣减杂交法

1. 引言

内分泌干扰物质(Endocrine disrupting chemicals; EDCs)是人造化学物, 常经由食物链进入生物体内形成假性荷尔蒙, 使细胞误以为是化学讯号, 干扰生物体正常荷尔蒙的合成、分泌、传送及作用, 进而影响生物体的代谢、行为、生殖及性别分化等生理作用^[1]。这些外生性物质(xenobiotic compounds)的化学多安定, 在环境中不易被分解, 易造成生物累积、生物浓缩及生物转移; 对暴露于其中的水生动物往往不具急毒性(acute toxicity), 但会导致慢性中毒而造成组织改变。邻苯二甲酸酯类化合物(Phthalate esters; PAEs)为制造塑料制品需添加的塑化剂, 其种类繁多且经常于制造过程、使用和丢弃时释出至环境中^[2], 曾在许多动植物或肉制品中检测出^[3]。在台湾, PAEs 广泛的存在于河水、底泥和土壤中^[4], 并发现其累积在鱼体内^[5]。

许多实验发现, PAEs 因水溶性(solubility)和降解性低, 且亲脂性(hydrophobicity)和吸附性高, 可以在陆地和水域环境的食物链中发生生物累积^[2], 造成不正常的性发育和降低生殖功能而干扰繁殖和族群大小^[6-9]。Autian 研究指出, 当母体内累积过多浓度的 PAE 会造成男性胎儿雌性化现象^[10]。动物毒性试验研究发现, 某些 PAEs 对鼠类和大部份哺乳动物具有肝脏和肾脏毒害性^[11]; PAEs 对鱼类(例如虹鳟、大西洋

鲑鱼等)具强烈之生物浓缩作用, 易累积至生物体内之脂肪层, 长期下来会造成水中生物遗传因子突变、生物体畸形、生理异常等^[12,13]。目前 PAEs 已被多数国家归类是一种非常普遍存在且优先列管控制的污染物和 EDC。

许多无脊椎动物毒性测试议定书常规性地使用在监管毒性测试^[14]。其中淡水甲壳类具有许多优点, 包括在许多水域生态系中它们是主要的无脊椎动物、族群个数经常众多且在实验室容易饲养。因此淡水甲壳类目前被推荐用在监测环境污染状况^[15-17]。多齿新米虾(*Neocaridina denticulata*)简称米虾, 广泛分布在台湾水域中, 具有许多利于作为监测环境污染的优点, 包括体长仅 2 至 3 cm、喜栖息于干净、能自然繁殖、且发育过程缺少变态期(metamorphosis stage)。自 2005 年起, 台湾环境保护署宣布米虾为一种急毒性测定的指标生物, 以评估各种水体或工厂排放水的质量。然而, 目前仅有少数研究是利用米虾以决定农药(如氯化铵, 硫酸铜, 氯化镉, 氯化汞, 硫酸锌)的毒性^[18]和氯丹(Chlordane)及灵丹(Lindane)两种 EDCs 对生长和生殖的影响^[19,20]。本研究室曾将米虾浸泡于邻苯二甲酸二丙酯(Dipropyl phthalate; DPrP)后, 侦测六种不同的生殖及免疫活性和一种免疫相关基因表现的变化, 发现次致死剂量的 DPrP 会提高米虾的易感性(susceptibility)^[21], 推测无致死剂量的 PAEs 仍可能对水域生

态系造成潜在危机。因此, 评估环境中 PAEs 的污染及其毒性是非常重要的。然而针对 PAEs 对水生生物全面性生理之影响效应的相关研究极少。

近年来, 以基因组学(genomics)、转录组学(transcriptomics)、蛋白质组学(proteomics)及代谢组学(metabolomics)等藉由大规模方式以观察生物体内整体变化进行研究的观念逐渐成熟, 因为此研究方式能够提供独有的信息。差异性表现基因组的研究适合于观察生物体内所有基因表现量变化的情形, 足以系统性评估生物体所受到的影响。目前常使用的方法之一是抑制性扣减杂交法(suppressive subtractive hybridization; SSH), 主要原理是将两组样本的 mRNA 反转录成 cDNA 后进行杂合, 剩余未杂合的样本即为表现有差异的基因, 接着以 PCR 放大表现有差异的基因且抑制非目标基因的放大, 达到扣减的效果。此方法能筛选出表现量多和极少的基因^[22]。Sung 等以生化指标和基因指标评估不同浓度 DPrP 处理米虾不同时间后的生殖和免疫毒性, 发现基因表现对 DPrP 为短期反应且灵敏度优于生化活性^[21]。因此推测米虾的基因组变化可能具有作为水域环境之评估指标的潜力。

本研究目的在米虾暴露于 DPrP 后, 建立一套基因组指标, 探讨 DPrP 处理后米虾全面基因的表现变化。实验中, 由 DPrP 处理和未处理的两组虾子, 利用抑制性扣减杂交法筛选并鉴定出差表现表现的基因片段, 即表达序列标签(expressed sequence tags; ESTs); 接着, 选出数个目标基因, 利用 RT-PCR 法确认 DPrP 对米虾生理功能的影响效应, 并评估源自米虾的 ESTs 未来作为 PAEs 污染指标的可能性。

2. 材料方法

2.1. 实验用虾及驯养

饲养虾子的玻璃缸(30公分 × 30公分 × 30公分)底部铺设厚约3公分的美细砂, 注入养殖池水并装置外挂式过滤器, 以过滤打气(150 L/小时)。三日后, 放入水草, 并外加定时照明设备, 水草每日照光八小时。一周后, 将购自一般水族馆的健康多齿新米虾(*Neocaridina denticulata*)放至置备完成的池水中, 养殖密度约为每平方公尺150~200尾, 养殖期间每日喂食干燥子了一次, 驯养三天后才进行实验。

2.2. 邻苯二甲酸二丙酯(dipropyl phthalate)的制备

本研究室过去使用八种 PAEs 实验证明, 邻苯二甲酸二丙酯(DPrP)对淡水长脚大虾(*Macrobrachium rosenbergii*)免疫力的影响最为明显^[23]; 米虾连续暴露于不同剂量 DPrP 的10天期间, 于次致死剂量50 mg/L处理后1天的米虾各项免疫及生殖相关活性反应改变最明显^[21]。因此本研究选择将米虾浸泡于50 mg/L之DPrP, 再进行后续实验的探讨。配制药物时, 称取2500 mg的DPrP, 溶于25 mL的丙酮; 再进行十倍稀释, 使浓度成为 10^5 mg/L和 10^4 mg/L, 置于室温下备用。实验前, 以丙酮调整浓度为 2×10^3 mg/L和 10^3 mg/L后, 再以养殖水调整DPrP浓度为50 mg/L、1 mg/L及0.5 mg/L; 接着以三种浓度的池水分别进行后续不同的实验。

2.3. 米虾的浸泡处理

为了得到讯息传导不同时期的差异表现基因, 进行抑制性扣减杂交前, 米虾先浸泡于50 mg/L的DPrP中2小时后, 再转养至不含DPrP养殖池水后12小时, 进行组织RNA的萃取。为决定不同浓度DPrP对米虾生理功能的影响, 米虾分为三组实验组, 分别浸泡于50 mg/L、1 mg/L及0.5 mg/L, 对照组米虾则浸泡于不含DPrP池水。浸泡一天后, 萃取米虾组织RNA。

2.4. RNA 萃取与纯化

由于米虾过小, 一只虾子难以收集足够的组织以进行实验, 所以本实验制备RNA样本时, 取相同处理后的10只米虾为一个样本。以液态氮研磨虾子后, 磨成粉状的组织放入1毫升Trizol (Invitrogen, USA)中, 室温下作用5分钟; 接着, 加入0.2毫升氯仿(chloroform), 剧烈震荡20秒, 于室温下静置10分钟; 再于4°C下, 以转速 $12,000 \times g$, 离心15分钟。取最上层溶液, 加入1毫升异丙醇(isopropanol), 均匀混合; 于室温下静置10分钟, 再以4°C, 离心15分钟。去除上清液后, 加入1毫升75%酒精, 清洗沉淀物, 再于4°C下, 以转速 $7500 \times g$ 离心5分钟。倒掉上清液, 风干10分钟后, 取20 μ L之DEPC处理过的水以溶解沉淀物, 并于55°C水浴10分钟。最后, 以核酸计

算仪(GeneQuant II, Phamacia Biotech, UK)定量 RNA 浓度, 当 OD_{260/280} 为 1.8~2.0 时, 利用 mRNA 纯化试剂(Invitrogen)以纯化 mRNA。

2.5. 抑制性扣减杂交(suppression subtractive hybridization; SSH)

由实验组和控制组虾子得到的 mRNA 样本后, 利用 Clontech PCR-Select™ cDNA 扣减试剂和根据实验手册进行抑制性扣减杂交(SSH)实验, 以建立一个扣减的 cDNA 基因库(library)。主要步骤简述如下。首先进行第一股和第二股 cDNA 的合成, 得到双股 cDNA。接着, 以 *RsaI* 限制酶切割双股 cDNA 两端成钝端(blunt end), 即进行接合子的连结。取 1 μL 切割后的 DPrP 处理之实验组 cDNA, 稀释后分取 2 μL 置于两个微量试管中, 并分别于第一管加入 2 μL 的接合子 adaptor 1, 第二管加入 adaptor 2R。在两管分别加入接合酶(T4 DNA Ligase)溶液并混合均匀后, 在 16 °C 隔夜作用。作用后样本加入 20X EDTA/Glycogen 终止反应, 并于 72 °C 加热 5 分钟, 使 ligase 失去活性。实验组样本制备完成后, 开始进行杂合反应(Hybridization), 过程中共需进行两次杂合反应。首先, 取接合不同接合子的实验组样本各 1.5 μL, 分别加入等体积经 *RsaI* 切割后之对照组 cDNA 样本和 1 μL 之杂合缓冲液后, 以 98 °C 作用 90 秒, 接着于 68 °C 作用 8 小时, 即完成第一次杂合。接着, 取切割后对照组 cDNA 样本以 98 °C 作用 90 秒后, 加入第一次杂合的两种不同接合子样本, 混合均匀和稍做离心后, 以 68 °C 隔夜作用。反应后样本加入 200 μL 的稀释缓冲液(Clontech), 以 68 °C 作用 7 分钟后, 即得到扣减后的 cDNA。

建立扣减 cDNA 基因库前, 扣减后 cDNA 需先进行两次的核酸酶连锁反应的放大(PCR Amplification)。第一次加入 PCR 引子 1、*Taq* DNA polymerase、10 mM dNTP mixes 和 50 mM MgCl₂ 以进行放大。第一次放大的 PCR 产物再以巢式 RCR (nested PCR) 引子 1 和巢式 PCR 引子 2R, 进行第二次 PCR 放大。本实验以 β -actin 为参考基因(GenBank accession no. AY947402)^[24], 作为扣减过程是否完全的依据。接着, 将 PCR 产物接合至 pGEM-T TA 质体后, 加入胜任细胞

Escherichia coli JM109, 于 37 °C, 转速 225 rpm 下, 震荡培养 1.5 小时后, 取 100 μL 菌液涂抹培养于含有 X-gal、IPTG 及氨苄青霉素(ampicillin; 50 μg/mL)的 LB 培养基, 建立扣减 cDNA 基因库(subtracted cDNA library)。为了检视培养基上的菌落内含有的载体具有外来核酸片段, 本实验利用巢式 PCR 引子 1 和巢式 PCR 引子 2R, 经 PCR 后, 放大产物以 2%琼脂胶电泳法做确认。

另外, 藉由限制酶切割图谱分析法以鉴别不同载体是否具有不同外来核酸片段。使用常见三种限制酶 *EcoRI*、*BamHI* 和 *HindIII* (Biolabs) 分别切割质体做, 经 1%琼脂胶电泳即得到的限制酶图谱。图谱片段大小相同者视为同一群。在同一群内随机挑选数个样本, 送至阳明基因组中心进行扣减后核酸片段的定序, 再以 DNASTar 软件将有部分重复的序列进行前后顺序的排列及重组。重组后序列于 NCBI 数据库分别以 BLASTN 和 BLASTX 进行核酸序列及胺基酸序列的比对。比对时, E 值小于或等于 10⁻²⁵ 者, 所得相似序列定义为可信结果。

2.6. 半定量 RT-PCR 分析

为了再次确认扣减后基因片段与 DPrP 处理的相关性, 由比对结果中选出八个已知功能及四个未知功能的 ESTs (表 1) 作为分析的目标基因。根据不同 ESTs 序列, 设计个别的专一性的引子(表 2), 以半定量反转录 PCR 法分析 DPrP 处理后虾子之不同基因的 mRNA 表现量变化。暴露于不同浓度 DPrP 之米虾组织 mRNA 后, 加入合成 cDNA 引子, 70 °C 作用 2 分钟后, 加入 dNTP 和 RNase 抑制剂(Fermentas)于 37 °C 作用 5 分钟; 加入反转录酵素(20 units/μL; Fermentas), 于 42 °C 作用 1 小时, 即完成 cDNA 合成, 即可进行放大。本实验以 β -actin 作为内在控制组。放大后产物进行 1%的 DNA 琼脂胶电泳并照相后, 以软件 Image Quant 5.1 分析产物条带的吸光强度, 以相对吸收单位(relative absorbance units)表示。同一样本中不同目标基因表现量的半定量数值以比值(a ratio)表示, 即某目标基因的吸光单位除以同一样本的 β -actin 的吸光单位。本研究结果的图表数据则以某基因在实验组的比值除以在控制组的比值表示(即 a ratio of control)。

以短暂暴露于邻苯二甲酸二丙酯(Dipropyl Phthalate)之淡水多齿新米虾
(*Neocaridina denticulata*)建立生态毒理基因组生物标志物

Table 1. Characteristics of functional EST identified in subtractive libraries from DPrP-treated shrimp
表 1. DPrP 处理虾子后得到的扣减基因库中已知功能的表达序列标签性质

EST ID	Gene identified (Accession No.)	Function groups	Species	Length of fragment (bp)	E value
Re1	16S rRNA (AY708114.1)	4	<i>Caridina pristi</i> 匙指虾	1425	0
Re2	16S rRNA (DQ463703.2)	4	<i>Chloroflexi bacterium</i> 绿弯菌	312	6.00E-41
Re4	Trypsin (X86369.1)	2	<i>Litopenaeus vannamei</i> 南美白虾	766	2.00E-96
Re5	Trypsin (AY596945.1)	2	<i>Neocaridina denticulata sinensis</i> 玫瑰虾	350	3.00E-77
Re6	Chymotrypsin 1 (X66415.1)	2	<i>L. vannamei</i> 南美白虾	306	8.00E-33
Re9	Hemocyanin (AF431737.1)	3,4	<i>Penaeus monodon</i> 草虾	760	1.00E-63
Re12	Opsin (Rh) gene (DQ852595.1)	5	<i>Neomysis americana</i> 黑褐新糠美洲虾	326	2.00E-92
Re13	Sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP1) (DQ256199.1)	6	<i>Procambarus clarkii</i> 克氏原螯虾	645	1.00E-78
Re14	Calcified cuticle protein (DQ288151.1)	7	<i>Callinectes sapidus</i> 蓝蟹	608	4.00E-27
Re17	Elongation factor 1-alpha (AY117542.1)	8	<i>Litopenaeus stylirostris</i> 西方蓝虾	794	2.00E-59
Re18	Mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit I (AB300187.1)	4	<i>N. denticulata sinensis</i> 玫瑰虾	693	9.00E-73
Re19	Collagenolytic serine protease (AF461035.1)	7	<i>Paralithodes camtschaticus</i> 石蟹	364	2.00E-42
Re20	Cathepsin-L-like cysteine peptidase (AY332270.1)	2	<i>Metapenaeus ensis</i> 刀额新对虾	466	7.00E-36
DPrP1	Chromosome 4 (NW001263854.1)	9	<i>Dictyostelium discoideum</i> 黏菌	846	8.00E-32
DPrP9	QM protein (EU004069.1)	3	<i>Marsupenaeus japonicus</i> 日本对虾	398	1.00E-114
DPrP10	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (AJ132380.1)	2	<i>Nephrops norvegicus</i> 挪威龙虾	259	3.00E-43
DPrP11	Mitochondrion (EF584003.1)	4	<i>L. vannamei</i> 南美白虾	612	1.00E-69
DPrP15	Myosin light chain (HM034314.1)	7	<i>Penaeus monodon</i> 草虾	507	5.00E-37
DPrP16	Mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2 (COII) (AY842663.1)	4	<i>Hemipyrellia ligurriens</i> 瘦叶带绿蝇	270	5.00E-47
DPrP21	Preamylase 1 (X77318.1)	2	<i>L. vannamei</i> 南美白虾	251	8.00E-32
DPrP24	ribosomal protein 4 (AY829788.1)	1	<i>Lonomia oblique</i> 天蚕蛾幼虫	254	4.00E-42
DPrP27	ribosomal protein L8 (DQ316258.1)	1	<i>L. vannamei</i> 南美白虾	236	7.00E-64
DPrP31	S2 ribosomal protein (AY292479.1)	1	<i>Eleginus gracilis</i> 红花鲳鱼	125	5.00E-30

The number in the third column indicates functional groups. 1: Ribosomal, 2: Metabolism, 3: Immune response, 4: Respiration, 5: Vision, 6: Signaling, 7: Structure, 8: Translation, 9: Chromosome.

2.7. 统计分析

由于米虾非纯品系(outbred)动物, 个体之间表现型背景的差异性大, 所以每一相对数值至少进行 5 重复, 每一重复至少使用 5 只虾子。以 one-way ANOVA 和 Duncan 进行不同浓度处理组之间的比较, 分析后有显著差异者($P < 0.05$)。

3. 结果

3.1. 差异表现片段的扣减基因库(subtracted cDNA library)的建立

为了得到 DPrP 处理前后具有差异异性表现之基

因, 本研究由实验组及控制组的虾子, 利用抑制性扣减杂交法后, 针对所有转型株, 利用巢式 PCR 确认后, 筛选获得 431 个转型株。进一步确认插入之基因片段是否相同, 以三种限制酶 *EcoRI*、*BamHI* 和 *HindIII* 进行切割, 以分析各 cDNA 的限制图谱后, 共挑选得 226 个转型株, 即得到一个扣减后 cDNA 基因库。

3.2. 基因片段的比对

基因库所有基因片段定经序后, 以 DNASTar 软件将不同片段序列上重复的部分进行前后顺序的排列及重组, 完成后得到共获得 71 个独特的表达序列标签(expressed sequence tags; ESTs)。接着, 利用 NCBI

以短暂暴露于邻苯二甲酸二丙酯(Dipropyl Phthalate)之淡水多齿新米虾
(*Neocaridina denticulata*)建立生态毒理基因组生物标志物

Table 2. The specific primers of ESTs used in this study
表 2. 使用在本研究之表达序列标签的专一性引子序列

EST ID	Sequence for primers (5'→3')	Size (bp)
Re9	L:CAGCCCAAATGTCCGTTACT R:CCTTGAAGCTTGGCACATC	600
Re17	L:CGTGAGCACGCTCTTGGCTTT R:TGAGCAGTGTGGCAGTCAA	701
Re18	L:GGCTCGTGTGTCAACATCC R:CCCCATTAGCAAGAGGAA	522
R20	L:CTTCAACCCAGCCAATGTG R:GGTAGCAATGCCGAGTTA	337
DPrP9	L:GCC TTGTTACGGTCGTGAGT R:GGGAAGAAAGAAGGCTGACG	330
DPrP10	L:CTCATGTCCCAGAAACCAA R:CCCAGGTAAGAAGGAGTCA	248
DPrP11	L:CACACCTCGCGGTAGTAGT R:ACCAAGCTGCTGCTTCAAA	510
DPrP15	L:CCTCCAGGTCTTCTGGTGAG R:GAAGCGCTTGAGTGTACAG	375
uDPrP4	L:ATGTCGAGTGCCAGCTCAG R:GTGTTGGCAGTGACGACTCA	315
uDPrP12	L:CTTCAGCAACTGCAAGTCCA R:GCATGACTGTGAGGGCTTTT	356
uDPrP13	L:CACTAGCGGAGTTAAGGATG R:GTTTCCTTATGGTGCGAGT	254
uDPrP14	L:GCCGATGTCACGGATAAGTC R:GGAGTCTGT GCCAAGTCAT	304

EST, expressed sequence tag; uDPrP denotes ESTs had not been identified in the public databases and are regarded as function unknown genes.

的 BLASTN 和 BLASTX 分别进行核酸序列及氨基酸序列的比对,将其中核酸序列比对所得之 E 值低于(或等于) 10^{-25} 且比对到的物种为无脊椎动物之基因片段,定义为已知生理功能;比对后得到 23 段 ESTs 对应为已知功能基因(表 1)及 48 段 ESTs 为未知功能。已知功能 ESTs 大致可分与九类生理功能相关,包括:核糖体组成的核糖体蛋白(ribosomal proteins; DPrP24, DPrP27 及 DPrP31);代谢相关基因的胰蛋白酶(trypsin; Re4 及 Re5)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin; Re6)、淀粉酶原(preamylase; DPrP21)、溶酶体组织蛋白酶(cathepsin-L-like cysteine peptidase; Re20)和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(Phosphoenolpyruvate carboxykinase; DPrP10);防御相关的血青素(hemocyanin; Re9)、QM 蛋白(QM protein; DPrP9);呼吸相关的粒线体基因(DPrP11)、粒线体 16S rRNA (Re1 及 Re2)、血青素(Re9)、细胞氧化酵素 COI (cytochrome oxidase subunit I; Re18)及 COII (cytochrome oxidase subunit II; DPrP16);视觉相关的视紫蛋白(opsin; Re12);讯号传

递相关的携钙蛋白(sarcoplasmic calcium-binding protein; Re13); 细胞和组织结构相关的胶原溶解丝氨酸蛋白酶(Collagenolytic serine protease; Re19)和肌球蛋白轻链(Myosin light chain; DPrP15); 转译相关的延长因子(elongation factor 1-alpha; Re17)与染色体相关基因(Chromosome 4; DPrP1)等(表 1)。

3.3. 不同浓度 DPrP 对目标基因的影响

确认上述得到的 ESTs 是否因 DPrP 处理而表现确有差异,实验中选取不同已知功能的 ESTs 和四个未知功能 ESTs,以 RT-PCR 半定量法,对暴露于不同浓度 DPrP 的米虾,进行这些目标基因之 mRNA 合成量的分析。DPrP 影响免疫相关基因的结果如图 1 所示,浓度为 0.5~1.0 mg/L 会明显增进血青素基因(*hc*) mRNA 量,对 MQ 基因(*mq*)则无明显影响;DPrP 浓度提高至 50 mg/L 明显抑制两个基因的转录。对于代谢相关基因,DPrP 于 0.5 和 1.0 mg/L 时会促进溶酶体组织蛋白酶基因 *catl* 的表现,浓度为 50 mg/L 的 DPrP 对此基因无影响;然而,基因磷酸烯醇式丙酮酸羧激

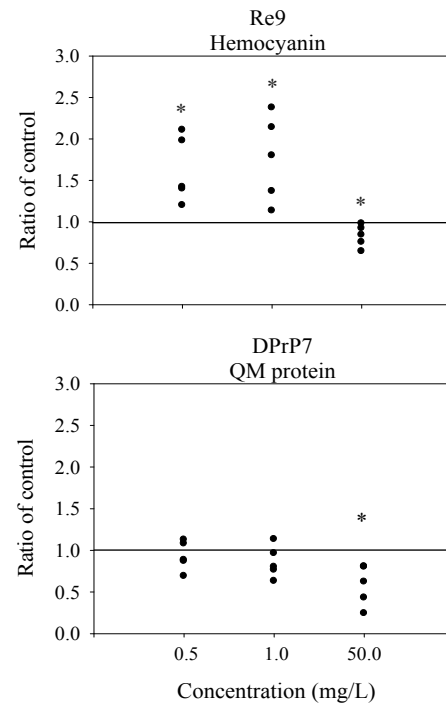


Figure 1. Messenger RNA expression of immunity-related genes of *Neocaridina denticulata* treated with various concentrations of dipropyl phthalate (DPrP) for one day
图 1. 米虾暴露于不同浓度之邻苯二甲酸二丙酯一天后免疫相关基因的讯息 RNA 表现量

酶 *pepck* 仅在米虾暴露于 50 mg/L 时受到影响, mRNA 量明显下降(图 2)。DPrP 除了在 1 mg/L 会增加粒线体基因 *mit* 的表现外, 其他浓度对两个呼吸相关基因 *mit* 和 *cosI* 无明显影响(图 3)。此外, DPrP 于 0.5 和 1.0 mg/L 能明显增加细胞骨架相关基因 *mlc* 之 mRNA 量; 三个不同浓度都不会影响转录相关基因 *efl- α* 的表现(图 4)。

至于四个未知功能基因的表现结果如图 5 所示, 米虾暴露于 0.5 和 1.0 mg/L 的 DPrP 一天后, 其中一个未知基因(uDPrP4)的 mRNA 表现量明显增加; 至于其他三个基因(uDPrP12、uDPrP13 及 uDPrP14), 当米虾暴露于低浓度(0.5 mg/L)DPrP 时的 mRNA 量与控制组没有显著差异, 但暴露于 1.0 和 50 mg/L 的 DPrP 后, mRNA 表现量明显下降。

4. 讨论

研究已知水环境中 PAEs 的含量虽不会直接造成生物体立即性的毒性效应, 但是经由生物累积作用

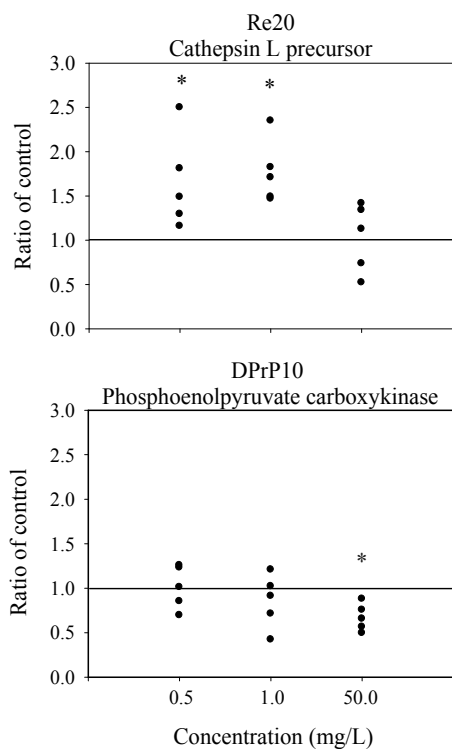


Figure 2. Messenger RNA expression of metabolism-related genes of *Neocaridina denticulata* treated with various concentrations of dipropyl phthalate (DPrP) for one day
图 2. 米虾暴露于不同浓度之邻苯二甲酸二丙酯一天后代谢相关基因的讯息 RNA 表现量

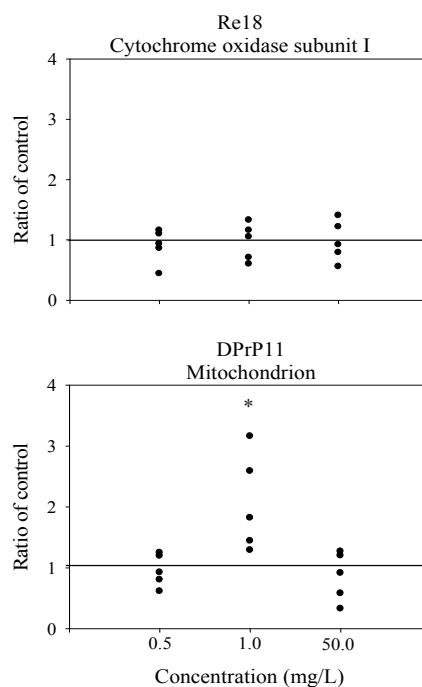


Figure 3. Messenger RNA expression of respiration-related genes of *Neocaridina denticulata* treated with various concentrations of dipropyl phthalate (DPrP) for one day
图 3. 米虾暴露于不同浓度之邻苯二甲酸二丙一天后呼吸相关基因的讯息 RNA 表现量

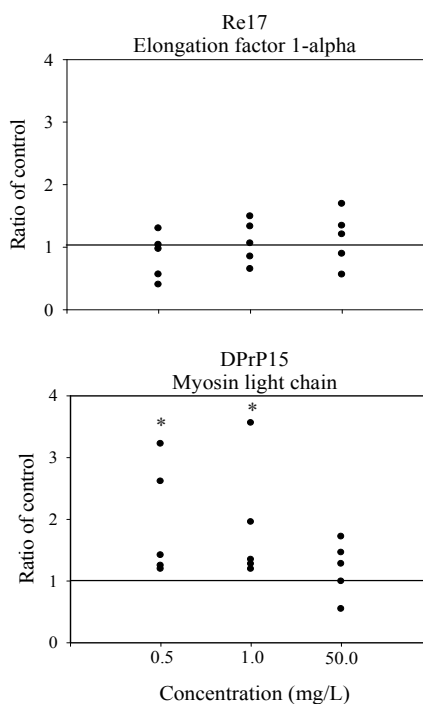


Figure 4. Messenger RNA expression of transcription- and cytoskeleton-related genes of *Neocaridina denticulata* treated with various concentrations of dipropyl phthalate (DPrP) for one day
图 4. 米虾暴露于不同浓度之邻苯二甲酸二丙一天后转录(上)和细胞骨架(下)相关基因的讯息 RNA 表现量

以短暂暴露于邻苯二甲酸二丙酯(Dipropyl Phthalate)之淡水多齿新米虾
(*Neocaridina denticulata*)建立生态毒理基因组生物标志物

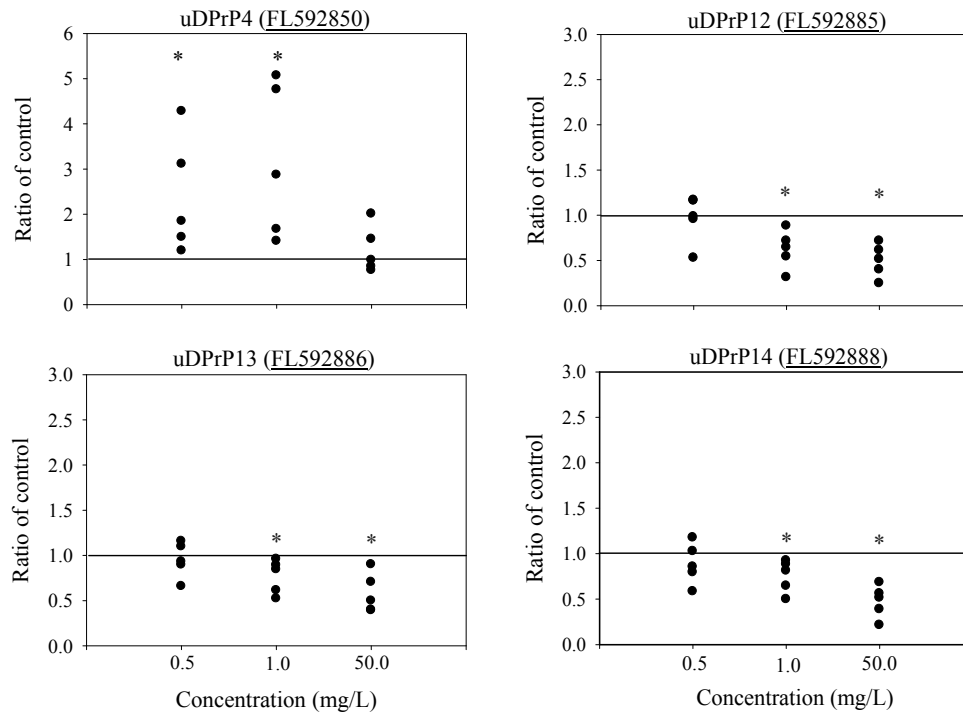


Figure 5. Messenger RNA expression of unknown genes of *Neocaridina denticulata* treated with various concentrations of dipropyl phthalate (DPrP) for one day

图 5. 米虾暴露于不同浓度之邻苯二甲酸二丙一天后未知功能基因的讯息 RNA 表现量

后, 对生物体所造成的危害是不可忽视的^[12,13]。台湾许多的水域受到 PAEs 污染^[4], 监测水域生态的完整性, 以观察并评估生物受到环境中化学物质影响的情形是非常重要的。许多无脊椎动物毒性测试议定书常规性地使用在监管毒性测试^[14], 常见的水质指标生物为底栖无脊椎动物, 其与水域底泥及悬浮物质交互作用, 因而可以充分反应此生态系的污染情形, 例如多齿新米虾(*Neocaridina denticulata*)^[19,20], 简称米虾。在台湾, 米虾为急毒性测定的指标生物之一, 用以评估各种水体或工厂排放水的质量。本研究室曾将米虾暴露于壬基酚(nonylphenol; NP)后, 建立一套差异性表现基因模式(differentially expression gene pattern)的 NP 侦测系统, 发现无致死剂量的 NP 仍会影响米虾的许多生理功能, 对米虾族群具有潜在的危机^[25]。由于米虾暴露于无致死剂量邻苯二甲酸二丙酯(Dipropyl phthalate; DPrP)后对致病原的易感性(susceptibility)增加^[21], 暗示无致死剂量的 PAEs 可能对水域生态系造成潜在危机。因此, 本研究在实验室控制的情况下, 建立一个以基因组讯号为基础之初步的 DPrP 检测系统。

由于米虾于 NCBI 核酸数据库中序列极有限, 已知基因数目非常少, 不适合利用基因晶片(gene array)来观察毒物处理米虾后的基因变化情形。目前已有许多研究将抑制性扣减杂交法(简称 SSH)所得到的基因, 以基因数组方式来检测, 以减少烦杂的步骤与实验时间^[26]。因此本研究选用 SSH 以获得受到 DPrP 影响后表现量会增加或下降的基因片段, 即表达序列标签(简称 ESTs)。由于目前甲壳类已完成定序的基因不多, 在序列比对和分析时, 须注意 E 值以及相同性(Identities), 以协助已知功能基因的判断。本研究将 E 值小于 10^{-25} 且比对基因的物种为无脊椎动物者认定为已知基因。本研究共筛选并鉴定出 23 个已知功能的差异性 ESTs, 对应之基因分属九类生理功能, 包括: 核糖体组成的核糖体蛋白、代谢相关、防御相关、呼吸相关、视觉相关、讯号传递相关、细胞和组织结构相关、转译相关与染色体相关的基因(表 1)。这些结果证明, DPrP 调控的大多数基因参与的是非雌激素作用(non-estrogenic action)的生理过程。实验中选出 12 个目标基因进行 DPrP 影响效应的测定, 发现次致死剂量(50 mg/L)的 DPrP 虽影响 50%的目标基因, 但都为

向下调节效应(down-regulation effect), 显示对米虾生理作用产生相当的压迫。当暴露剂量降低至无致死剂量的 1 mg/L 时, 67%目标基因受到 DPrP 的上调或下调, 显示影响米虾的生理层面广; 若暴露于更低浓度 0.5 mg/L 时, 仅 33%目标基因受到影响, 且均为上调效应(up-regulation effect)。这些无致死剂量 DPrP 对米虾基因的影响结果无法判断是否对米虾的生理功能具有压迫性, 需进一步探讨。此外, 米虾暴露在本实验使用的三种次致死或无致死浓度之 DPrP 后, 在 12 个选定的目标基因中, 讯号传递相关的 *efl-α*和呼吸相关的 *cosI* 两个基因完全不受影响; 但其他主要参与免疫(*hc*、*qm* 和 *catl*)和代谢(*catl* 和 *pepck*)相关的基因则对不同浓度 DPrP 有不同反应(表 3)。已知米虾暴露于无致死剂量邻 DPrP 后的易感性(susceptibility)增加^[21], 结合本研究结果推测, 水体出现无致死剂量的 PAEs 可能主要经由防御或代谢路径影响米虾族群的存活。

对大多数的甲壳类而言, 污染物造成的环境压力似乎是引起免疫力下降及患病率增加的重要因子之一^[27,28]。先前的研究显示, PAEs 会降低米虾和淡水长脚大虾的免疫活性和增加易感性^[21,23]; 本研究证明 *hc* 及 *qm* 的表现确实会受 DPrP 调节, 尤其高浓度 DPrP 会降低两个基因的表现。在节肢动物, 血清素(hemocyanin; Hc)是在肝胰脏合成^[29,30], 且为六聚合体(hexamer)的氧气载体(oxygen carrier)。除了携带氧气的功能外, 许多研究也证明 Hc 具有防御功能, 例如蜘蛛(*Eurypelma californicum*)^[31-34]和蜃(*Tachypleus tridentatus*)^[35]的 Hc 经特定蛋白质水解后具有酚氧化酵素(phenoloxidase)活性, 且甲壳类的 Hc 经蛋白酶分解后, 产生具抗微生物活性的抗微生物胜肽(antimicrobial peptides)^[36,37]。另一个免疫相关基因 *qm* 的产物 QM 蛋白质, 其在哺乳类和酵母菌细胞是一种核糖体蛋白质^[38,39]; 更多证据发现, QM 类蛋白(QM-like protein)在细胞生长和分化等时期具有核糖体蛋白质以外的功能^[40,41]。Xu 等人以 SSH 方法分析得知, 白点病毒感染之日本对虾(*Penaeus japonicas*)体内的 QM 表现大量增加, 且能够与 Hc 和肌球蛋白(myosin)形成复合物而参与原酚氧化酵素系统(简称 proPO 系统)和调节 Hc 的酚氧化酵素活性, 显示 QM 在节肢动物免疫系统具有特殊功能^[42]。本研究室先前

Table 3. The summary of the effect of dipropyl phthalate (DPrP) on the EST expression of *Neocaridina denticulata*

表 3. 不同浓度邻苯二甲酸二丙酯基对米虾表达序列标签表现的影响效应之摘要

EST ID	Target genes	DPrP (mg/L)		
		0.5	1.0	50
Immunity				
Re9	Hemocyanin (<i>hc</i>)	E	E	D
DPrP9	QM protein (<i>qm</i>)	N	N	D
Metabolism				
R20	Cathepsin-L-like cysteine peptidase (<i>catl</i>)	E	E	N
DPrP10	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (<i>pepck</i>)	N	N	D
Translation				
Re17	Elongation factor 1-alpha (<i>efl-α</i>)	N	N	N
Respiration				
Re18	Mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (<i>cos I</i>)	N	N	N
DPrP11	Mitochondrion (<i>mit</i>)	N	E	N
Cytoskeleton				
DPrP15	Myosin light chain (<i>mlc</i>)	E	E	N
Unknown function				
uDPrP4		E	E	N
uDPrP12		N	D	D
uDPrP13		N	D	D
uDPrP14		N	D	D

Abbreviations are as follows: E = an enhancement effect of NP on gene expression; D = a reduction effect of NP gene expression; and N = no difference of gene expression in DPrP-treated individuals from that in corresponding control.

研究指出, DPrP 会影响米虾的超氧歧化酵素(super-oxide dismutase; SOD)和原酚氧化酵素(prophenoloxidase)等免疫酵素活性^[21]。本研究结果推测, DPrP 也可能透过影响 *hc* 和 *qm* 的表现而参与 proPO 系统以调控米虾的免疫力。

细胞自溶酵素(cathepsin L; CatL)属于硫醇型蛋白质分解酵素(cysteine protease)家族, 多存在于胞内溶体(lysosome)中, 广泛的分布于正常组织, 在发育过程扮演重要角色, 主要参与分化、原肠型成、脱皮及卵黄利用等作用^[43-49]。在无脊椎动物, 硫醇型蛋白质分解酵素与细胞内蛋白质的分解有关^[50]。在甲壳类,

CatL 主要存在于肝胰脏,参与食物的分解,例如南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[51]和刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)^[52]。近年研究证明, CatL 参与无脊椎动物的先天性免疫力,包括南美白对虾^[53]、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[54]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[55]和合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)^[56]等。根据这些研究推测, DPrP 对米虾的防御反应或代谢活性具有多重调节效应(multi-modulating effect)。相同的现象也发生在 NP 对米虾的影响,但是调节效应相反^[25]。

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(Phosphoenolpyruvate carboxykinase)是糖质新生(gluconeogenesis)过程的重要酵素,负责将草醋酸(oxaloacetate)转换成磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate)和二氧化碳,以供后续转换为葡萄糖。在某些特定的组织或细胞中相当重要,例如大脑、肾脏髓质等皆以葡萄糖作为唯一能量来源,当葡萄糖量不足时,就必须以糖质新生合成葡萄糖来维持正常生理。本研究发现此酵素基因 *pepck* 的表现仅在高浓度时会受到抑制,推测次致死剂量可能影响葡萄糖的恒定而对米虾造成一定程度的压迫。

综合以上暴露于 DPrP 后差异性表现基因的表现结果证明, DPrP 主要经由多重生理功能的改变对米虾产生外生毒力(ectotoxigenicity),推测无致死剂量 PAE 的污染仍可能危害到米虾族群的生存。由于台湾的环境保护署使用米虾以监测水体的急毒性,结合本研究的结果建议,米虾确实可作为水域指针系统(aquatic indicator system)以评估水体污染对水生环境或生物的风险,且发展自米虾的差异性表现 ESTs 未来应具有作为基因组生物标志(genomic biomarkers)的潜力。由于本研究获得的有效 ESTs 种类有限,因此未来仍须搜集和鉴定更多污染相关的专一性基因,并整合更多针对不同毒物的差异反应信息,以建立一套更具灵敏度及可信度的监测模式组。

5. 致谢

本研究感谢台湾的国家科学委员会之计划经费支持(NSC96-2745-B-031-003-URD)。

参考文献 (References)

[1] Holmes, P., Harrison, P., Bergman, A., Brouwer, I., Brouwer, B.,

- Keiding, N., Randall, G., Sharpe, R., Skakkebaek, N., Ashby, J., Barlow, S., Dickerson, R., Humfrey, C. and Smith, L.M. (1997) European workshop on the impact of endocrine disrupters on human and wildlife. *Proceedings of a Workshop*, Weybridge, UK, Report NO. EUR 17549.
- [2] Staples, C.A., Peterson, D.R., Parkerton, T.F. and Adams, W.J. (1997) The environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere*, **35**, 667-749.
- [3] Yin, M.C. and Su, K.H. (1996) Investigation on risk of phthalate ester in drinking water and marketed foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, **4**, 313-318.
- [4] Liu, C., Wang, S.K. and Lu, Y.B. (2000) Chemical characterization of Tamshui River sediment in northern Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, **76**, 205-218.
- [5] Chang, B.V., Liao, C.S., Huang, B.B. and Lee, C.C. (2004) Occurrence of phthalate esters in Taiwan. *Proceeding of the Third Conference on Environmental Hormones and POPs*, Taipei, 12 November 2004, 63-66.
- [6] Eckardt, R.E. (1973) Recent developments in industrial carcinogens. *Journal of Occupational Medicine*, **15**, 904-907.
- [7] Tavares, I.A. and Vine, N.D. (1985) Phthalic acid esters inhibit arachidonate metabolism by rat peritoneal leucocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **37**, 67-68.
- [8] Carozzi, S., Nasini, M.G., Schelotto, C., Caviglia, P.M., Santoni, O. and Pietrucci, A. (1993) A biocompatibility study on peritoneal dialysis solution bags for CAPD. *Advances in Peritoneal Dialysis*, **9**, 138-142.
- [9] Jha, A.M., Singh, A.C. and Bharti, M. (1998) Germ cell mutagenicity of phthalic acid in mice. *Mutation Research*, **422**, 207-212.
- [10] Autian, J. (1973) Toxicity and health threats of phthalate esters: Review of the literature. *Environmental Health Perspectives*, **4**, 3-26.
- [11] Thomas, J. and William, L. (1975) Biodegradation of di-n-butyl phthalate and di-2-ethylhexyl phthalate in freshwater hydrosol. *Journal of Fisheries Science and Technology*, **32**, 333-339.
- [12] Capacchietti, M., Sabbieti, M.G., Materazzi, S., Materazzi, G., Menghi, G. and Marchetti, L. (2007) Phthalate esters immunolocalized in the gastrointestinal tract of shi drum, *Umbrina cirrosa* (L.) and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (W.). *Histology and Histopathology*, **22**, 15-21.
- [13] Norman, A., Borjeson, H., David, F., Tienpont, B. and Norrgren, L. (2007) Studies of uptake, elimination, and late effects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) dietary exposed to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) during early life. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **52**, 235-242.
- [14] Schweer, L.G. (2002) Draft detailed review paper on mysid life cycle toxicity test. US Environmental Protection Agency, Washington DC.
- [15] Shigehisa, H. and Shiraiishi, H. (1998) Biomonitoring with shrimp to detect seasonal change in river water toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**, 687-694.
- [16] Fossi, M.C., Marsili, L., Neri, G., Casini, S., Bearzi, G., Politi, F., Zanardelli, M. and Panigada, S. (2000) Skin biopsy of mediterranean cetaceans for the investigation of interspecies susceptibility to xenobiotic contaminants. *Marine Environmental Research*, **50**, 517-521.
- [17] Kirkpatrick, A.J., Gerhardt, A., Dick, J.T.A., McKenna, M. and Berges, J.A. (2006) Use of the multispecies freshwater biomonitor to assess behavioral changes of *Corophium volutator* (Pallas, 1766) (Crustacea, Amphipoda) in response to toxicant exposure in sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **64**, 298-303.
- [18] Kitamura, H. (1990) Relation between the toxicity of some toxicants to the aquatic animals (*Tanichthys albonubes* and *Neocaridina denticulata*) and the hardness of the test. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Nagasaki University*, **67**, 13-19.
- [19] Huang, D.J. and Chen, H.C. (2004) Effects of chlordane and lindane on testosterone and vitellogenin levels in green neon

以短暂暴露于邻苯二甲酸二丙酯(Dipropyl Phthalate)之淡水多齿新米虾
(*Neocaridina denticulata*)建立生态毒理基因组生物标志物

- shrimp (*Neocaridina denticulata*). *International Journal of Toxicology*, **23**, 91-95.
- [20] Huang, D.J., Chen, H.C., Wu, J.P. and Wang, S.Y. (2006) Reproduction obstacles for the female green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*) after exposure to chlordane and lindane. *Chemosphere*, **64**, 11-16.
- [21] Sung, H.H., Lin, Y.H. and Hsiao, C.Y. (2011) Potential toxicity of dipropyl phthalate to physiological functions of the green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*). *Fish & Shellfish Immunology*, **31**, 511-515.
- [22] Larkin, P., Knoebel, I. and Denslow, N.D. (2003) Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **136**, 149-161.
- [23] Sung, H.H., Kao, W.Y. and Su, Y.J. (2003) Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic Toxicology*, **64**, 25-37.
- [24] Lu, K.Y., Huang, Y.T., Lee, H.H. and Sung, H.H. (2006) Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated in vivo by CpG oligodeoxynucleotides. *Fish & Shellfish Immunology*, **20**, 274-284.
- [25] Liu, C.L. and Sung, H.H. (2011) Genes are differentially expressed at transcriptional level of *Neocaridina denticulata* following short-term exposure to nonylphenol. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **87**, 220-225.
- [26] Feng, L., Miao, W. and Wu, Y. (2007) Differentially expressed genes of *Tetrahymena thermophila* in response to tributyltin (TBT) identified by suppression subtractive hybridization and real time quantitative PCR. *Aquatic Toxicology*, **81**, 99-105.
- [27] Victor, B., Narayanan, M. and Jones-Nelson, D. (1990) Gill pathology and hemocyte response in mercury exposed *Macrobrachium idae* (Heller). *Journal of Environmental Biology*, **11**, 61-65.
- [28] Sindermann, C.J. (1979) Pollution-associated diseases and abnormalities of fish and shellfish: A review. *Fishery Bulletin*, **76**, 717-749.
- [29] Van Holde, K., Miller, K.I. and Decker, H. (2001) Hemocyanin and invertebrate evolution. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 15563-15566.
- [30] Rainer, J. and Brouwer, M. (1993) Hemocyanin synthesis in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **104**, 69-73.
- [31] Decker, H. and Rimk, T. (1998) Two different functions of one active site: Binding oxygen and phenoloxidase activity of hemocyanin of tarantula hemocyanin. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 25889-25892.
- [32] Decker, H. and Tuczek, F. (2000) Phenoloxidase activity of hemocyanins: Activation, substrate orientation and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 392-397.
- [33] Decker, H. and Terwilliger, N. (2000) Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*, **203**, 1777-1782.
- [34] Decker, H., Ryan, M., Jaenicke, E. and Terwilliger, N. (2001) SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 17796-17799.
- [35] Nagai, T. and Kawabata, S.I. (2000) A Link between blood coagulation and prophenoloxidase activation in arthropod host defense. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 29264-29267.
- [36] Nagai, T., Osaki, T. and Kawabata, S. (2001) Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 27166-27170.
- [37] Destoumieux-Garzon, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffery, C., Bulet, P. and Bachère, E. (2001) Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 47070-47077.
- [38] Loftus, T.M., Nguyen, Y.H. and Stanbridge, E.J. (1997) The QM protein associates with ribosomes in the rough endoplasmic reticulum. *Biochemistry*, **36**, 8224-8230.
- [39] Dick, F.A., Karamanou, S. and Trumpower, B.L. (1997) QSR1, an essential yeast gene with a genetic relationship to a subunit of the mitochondrial cytochrome bcl complex, codes for a 60 S ribosomal subunit protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 13372-13379.
- [40] Marty, I., Brugidou, C., Chartier, Y. and Meyer, Y. (1993) Growth-related gene expression in *Nicotiana tabacum* mesophyll protoplasts. *The Plant Journal*, **4**, 265-278.
- [41] Green, H., Canfield, A.E., Hillarby, M.C., Grant, M.E., Boot-Handford, R.P., et al. (2000) The ribosomal protein QM is expressed differentially during vertebrate endochondral bone development. *Journal of Bone and Mineral Research*, **5**, 1066-1075.
- [42] Xu, J., Wu, S. and Zhang, X. (2008) Novel function of QM protein of shrimp (*Penaeus japonicus*) in regulation of phenoloxidase activity by interaction with hemocyanin. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **21**, 473-480.
- [43] Fagotto, F. (1990) Yolk degradation in tick eggs. II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **14**, 237-252.
- [44] Homma, K., Kurata, S. and Natori, S. (1994) Purification, characterization, and cDNA cloning of procathepsin L from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly), and its involvement in the differentiation of imaginal discs. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 15258-15264.
- [45] Matsumoto, I., Watanabe, H., Abe, K., Arai, S. and Emori, Y. (1995) A putative digestive cysteine proteinase from *Drosophila melanogaster* is predominantly expressed in the embryonic and larval midgut. *European Journal of Biochemistry*, **227**, 582-587.
- [46] Warner, A.H. and Matheson, C. (1998) Release of proteases from larvae of the brine shrimp *Artemia franciscana* and their potential role during the molting process. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **119**, 255-263.
- [47] Hashmi, S., Britton, C., Lie, J., Guiliano, D.B., Oksov, Y. and Lustigman, S. (2002) Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 3477-3486.
- [48] Tobin, D.J., Foitzik, K., Reinbeckel, T., Mecklenburg, L., Botchkarev, F.A., Peters, C. and Paus, R. (2002) The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *The American Journal of Pathology*, **16**, 1807-1821.
- [49] Wood, A.W. and Van Der Kraat, G. (2003) Yolk proteolysis in rainbow trout oocytes after serum-free culture: Evidence for a novel biochemical mechanism of atresia in oviparous vertebrates. *Molecular Reproduction and Development*, **65**, 219-227.
- [50] Knop, M., Schiffer, H.H., Rupp, S. and Wolf, D.H. (1993) vacuolar/lysosomal proteolysis: Protease, substrates mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*, **5**, 990-996.
- [51] Le Boulay, C., Sellos, D. and Van Wormhoudt, A. (1998) Cathepsin L gene organization in crustaceans. *Gene*, **218**, 77-84.
- [52] Hu, K.J. and Leung, P.C. (2004) Shrimp cathepsin L encoded by an intronless gene has predominant expression in hepatopancreas, and occurs in the nucleus of oocyte. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **137**, 21-33.
- [53] Zhao, Z.Y., Yin, Z.X., Weng, S.P., Guan, H.J., Li, S.D., Ke, X., Chan, S.M. and He, J.G. (2007) Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization. *Fish & Shellfish Immunology*, **22**, 520-534.

以短暂暴露于邻苯二甲酸二丙酯(Dipropyl Phthalate)之淡水多齿新米虾
(*Neocaridina denticulata*)建立生态毒理基因组生物标志物

- [54] Ren, Q., Zhang, X.W., Sun, Y.D., Sun, S.S., Zhou, J., Wang, Z.H., Zhao, X.F. and Wang, J.X. (2010) Two cysteine proteinases respond to bacterial and WSSV challenge in Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, **29**, 551-556.
- [55] Li, W.W., Jin, X.K., He, L., Jiang, H., Gong, Y.N., Xie, Y.N. and Wang, Q. (2010) Molecular cloning, characterization, expression and activity analysis of cathepsin L in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, **29**, 1010-1018.
- [56] Ma, J., Zhang, D., Jiang, J., Cui, S., Pu, H. and Jiang, S. (2010) Molecular characterization and expression analysis of cathepsin L1 cysteine protease from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish & Shellfish Immunology*, **29**, 501-507.