

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

豬胚及小鼠胚之基因轉殖

Gene Transfer in The Porcine and mouse Embryos

計畫編號： NSC 87 - 2313 - B002 - 078

執行期間： 86年8月1日至87年7月31日

計畫主持人：鄭登貴 國立台灣大學 畜產學系

一、中英文摘要

本研究計畫旨在於應用顯微注射技術，將含有牛 β -乳白蛋白基因(β -lactalbumin; LA)調節序列與人類凝血第九因子(human blood coagulation factor IX; hFIX)基因構造成cDNA序列，長度為4.93 kb之LA-hFIX轉殖基因片段，注入小鼠與豬之早期胚原核中，並將完成基因注射後之小鼠胚與豬胚，分別移置於受胚小鼠與受胚豬之生殖道內，冀能從而產生帶有LA-hFIX之基因轉殖小鼠與基因轉殖豬。試驗結果證實已成功獲得14隻(2/9 +3?)基因轉殖小鼠及2頭(1/1)基因轉殖豬。進一步將此等基因轉殖小鼠及豬分別與非基因轉殖者進行配種後，不僅證明其中9隻(9)小鼠及2頭(1/1)基因轉殖豬係具有生殖能力者，且均可將轉殖之LA-hFIX基因分別遺傳至其子代。于哺乳期間分別收集基因轉殖小鼠及豬之乳汁樣品，並進行Western blot及凝血活性分析，結果已證明五個家族之基因轉殖小鼠及一個家族之基因轉殖豬之乳汁中均含有LA-hFIX基因之轉譯物，依酵素免疫分析法定量之結果顯示濃度分別約為50-200 μ g/ml及200-500 μ g/ml，並證實均具促使缺

hFIX血漿凝血之活性。此外，將性成熟之第0代基因轉殖公豬，採新鮮精液或製備冷凍精液，並以人工授精方式與非基因轉殖藍瑞斯(L)種母豬配種亦可獲得攜轉殖基因之後代。顯示，基因轉殖公豬精液可採用冷凍保存精液方式進行保種。此結果提示，基因轉殖小鼠及豬之乳腺可表現具生物活性之醫藥蛋白，未來將考慮及評估以豬乳腺量產hFIX之可行性及經濟性。

Abstract

The purpose of this study was to generate transgenic mice and piglets by method of microinjection the LA-hFIX gene, a 4.93 kb fragment contained the regulatory sequences of bovine β -lactalbumin and the structure sequence of cDNA from human factor IX, into the pronucleus of newly fertilized mouse and porcine eggs, respectively. Experimental results showed eleven (2/9) newborn mice and two (1/1) of the newborn piglets were confirmed to be as transgenics, according the results from PCR and Southern-blot analysis which had been

subjected to PCR and Southern-blot analysis were confirmed to be successfully integrated with the transgene. The transgenic founders mated with nontransgenic mice and pigs, respectively, found the transgene stably integrated in the germ line. Detecting by Western-blot analysis confirmed that expression of LA-hFIX transgene with hFIX concentration between 50-200 μ g/ml and 200-500 μ g/ml contained in the milk from lactating transgenic mice and sow, respectively. The hFIX APTT clotting activity was assayed directly on milk collected from transgenic mice and pig, the data showed that the hFIX synthesized by transgenic mice and pig is active. Furthermore, frozen semen of L-8-5 were prepared and inseminated to nontransgenic sow, could transmit the transgene to progenies, demonstrating that the transgenic line can be preserved by frozen semen. In the future, focusing our attention on economic consequences and product safety may be important.

二、前言及目的

人類凝血第九因子為分子量 54-72kd 之單鏈醣蛋白質，該蛋白質係於肝臟中被合成，經轉譯修飾後，再被分泌至血流中。在正常人血漿中之 hFIX 含量約 5 μ g / ml；惟 B 型血友病(hemophilia B)患者之血漿中，則因缺乏 hFIX，遂導致凝血功能之異常。hFIX 基因已知係落於 X 染色體之長臂中，此 B 型血友病不但係性連遺傳之疾病，且以男性患者居多，其平均發生率為 1/30,000(Thompson,1986)。目前 B 型血友病之患者所使用之凝血第九因子一般均源自人類血漿所純化者，其中存在疾病 (如肝炎、

AIDS) 感染之風險，若能藉由基因轉殖家畜之乳腺進行量產，則對於 B 型血友病患者，將是一大福音。

自 Simon *et al.*(1987)首次將綿羊之 β -乳球蛋白基因成功轉殖於小鼠，並由基因轉殖小鼠乳汁中成功回收綿羊之 β -乳球蛋白後，家畜之乳腺被認為是生產人類所需醫藥蛋白最具潛力之目標組織。此後，哺乳動物乳汁中主要乳蛋白(酪蛋白、 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白)之基因及其專一性表現之調控序列陸續被選殖，及配合醫療蛋白之結構性基因(structure gene)應用於家畜之基因轉殖。直至 1990 年代初期，乳腺專一表現基因轉殖豬、綿羊、山羊及牛均相繼被獲得。至今已完成抗凝血素 III (Antithrombin III)及 α -1-抗胰蛋白酶(α -1-Antitrypsin)二種重組人類醫藥蛋白之臨床試驗(Ziomek, 1998)，並逐漸向商業化之腳步邁進。

為生產高價位之遺傳工程蛋白質，乳腺成為基因轉殖家畜研究者之主要目標組織，因其生理上較具獨力性，當外源基因在乳腺表現時，對動物正常生理之影響可降至最低。此外，自乳汁中回收基因產物亦較為簡便。因此乳腺專一表現基因之轉殖，成為藉由基因轉殖家畜生產醫藥蛋白質之熱門研究主題，其中包括以牛、綿羊、山羊及豬等大型家畜之乳腺量產者，量產之醫藥蛋白質種類繁多，目前之研究大多集中於凝血或抗凝血因子上。截至目前為止，利用基因轉殖豬之乳腺生產醫藥蛋白質，以人類抗凝血因子 C、凝血第九因子及凝血第八因子三種最具代表性，近期內即可陸續進入量產及臨床試驗階段。

依 Wall (1997) 之報告資料指出，目前全世界每年凝血第九因子之需求量約 4 kg，市場價值為一億六千萬美元，以一頭泌乳母豬每年之乳產量為 520 公升而言，只需要 15 頭人類凝血第九因子基因轉殖母豬即

可滿足人類之需求。因此，本研究承榮總朱廣邦研究員之協助，由英國牛津大學 Brownlee 教授引入人類凝血第九因子 cDNA，經與本土選殖乳腺高專一性表現之牛-乳白蛋白啟動子構築後，即開始著手人類凝血第九因子基因轉殖小鼠及豬之研究，以探討 LA-hFIX 基因在小鼠及豬乳腺之表現情形。

三、結果與討論

本研究合計注射及移置 549 個 ICR 小鼠胚與完成 212 個豬胚之基因注射，經基因注射後進行胚移置所獲得之 89 隻仔小鼠與 14 頭仔豬，經採尾巴組織抽取其基因組 DNA，分別進行聚合酵素連鎖反應(PCR)及南方吸漬(Southern-blot)分析，結果證明其中有 14 隻(2 /9 +3?)仔小鼠與 2 頭(1 /1)仔豬，分別均帶有轉殖之 LA-hFIX 基因。就出生之仔小鼠與仔豬而言，約有 12~14% 係被基因轉殖成功者(表 1)；此一結果頗類似 Wall *et al.* (1990)與 Pursel and Rexroad (1993)之所述，牛、山羊、綿羊、豬、與小鼠等，其基因轉殖效率分別為 4.9、6.9、8.3、9.2、與 10%。惟就注射之總胚數而言，本研究在基因轉殖小鼠與基因轉殖豬之產製效率，則分別僅為 2.0%與 0.9%，略低於 Wall *et al.* (1990)指稱之 2.5%。全世界第一例基因轉殖豬被 Hammer *et al.*(1985) 首次以基因顯微注射法將 MT/hGH 基因成功引入豬原核胚而成功產製，惟效率約只有出生動物之 1.3 及 11.0%。由新近 Kupriyanov *et al.*(1998)之基因轉殖試驗結果顯示，同時將基因注入雌及雄原核中與傳統之注射單一原核者比較，可將基因轉殖小鼠產製效率由出生仔小鼠之 23% 提高至 46%，此法應用於家畜之基因轉殖，將可能大幅改進基因轉殖家畜之產製效率。目前以供核體細胞株為載體進行家畜之基因

轉殖，雖已可將產製效率提升為出生動物之 100%，且可進行指定位置基因轉殖及剔除，然在核移植後胚之發育潛能上，仍將面臨極大之挑戰。

將性成熟之第 0 代基因轉殖公豬，採新鮮精液或製備冷凍精液，並以人工授精方式與非基因轉殖藍瑞斯(L)種母豬配種；另一頭基因轉殖母豬則以非基因轉殖種公豬之新鮮精液授精懷孕。外源基因是否傳承於子代，均以聚合酵素連鎖反應配合南方吸漬分析進行確任(結果示於圖 1 及圖 2)。試驗之結果顯示，基因轉殖公豬分別繁殖 68 頭仔豬，外源基因傳承為 13.2% (9/68)；母豬 L-8-3 分娩 2 胎次，合計 23 頭仔豬中亦有 13 頭(56.5%) 攜帶外源基因(結果如表 2 所示)。在所有的配種中，有三頭 L 母豬分別授予 L-8-5 之解凍後之冷凍精液，分別產下 35 頭仔豬，其外源基因傳承之百分率為 14.3%。前述結果顯示，以胚原核基因顯微注射技術所獲得之 2 頭基因轉殖豬隻，不論公母，均可將外源基因傳承至後代；此外，基因轉殖公豬亦可使用冷凍保存精液方式進行保種。

針對各基因轉殖家族所繁殖之母小鼠進行配種，並分別收集獲得之乳汁樣品，且進一步以西方吸漬(western blot)法分析之結果證明其中源自編號 61 ; 57 ; 47 ; 46 ; 40 等五個家族之基因轉殖母小鼠，其乳汁中均含有 LA-hFIX 基因之轉譯物，濃度約為 50-200 μ g/ml，並證實具促使缺 hFIX 血漿凝血之活性。此外，第 0 代基因轉殖母豬于分娩後，每天收集泌乳期間之乳樣，乳樣經西方吸漬法分析結果(圖 3)確認其不同泌乳期之乳汁中均含 hFIX，且泌乳後期乳汁中之 hFIX 含量有較泌乳早期為高之趨勢。依酵素免疫分析法定量之結果顯示，hFIX 在乳汁中之含量約 200-500 μ g。乳樣經凝血活性分析之結果亦證實亦具有促使缺 hFIX 血漿凝集之活性。進一步採泌乳期第 28 天之乳腺組織

進行組織切片免疫染色，結果顯示，乳腺之上皮細胞及乳汁中均呈現抗體結合及呈色之反應(圖 4)。上述結果提示，基因轉殖小鼠及豬之乳腺可表現具生物活性之重組人類凝血第九因子，且可世代相傳。

近年來，國內外分子生物學、基因工程及基因轉殖技術之研發，均已達純熟之階段，在生物科技被列為台灣邁向二十一世紀的重點科技的同時，若能在不嚴重影響家畜正常生理之條件下，改變家畜之遺傳背景，將家畜之體組織進一步提升為生產人類所需醫藥產品之工廠，以生產高價位之產品，將可為畜牧產業開創另一商機。

參考文獻

- Hammer, R.E., V.G. Pursel, C.E. Rexroad Jr., R.J. Wall, D.J. Bolt, K.M. Ebert, R.D. Palmiter, and R.L. Brinster. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315, 680-683.
- Kupriyanov, S., K. Zeh and H. Baribault. 1998. Double pronuclei injection of DNA into zygotes increase yields of transgenic mouse lines. *Transgenic Res.* 7 : 223-226.
- Pursel, V.G., and C.E. Rexroad, Jr. 1993. Status of research with transgenic farm animals. *J. Anim. Sci.* 71 (Suppl. 3), 10-19.
- Simons, J. P., M. McClenaghan, and A. J. Clark. 1987. Alteration of the quality of milk by expression of sheep α -lactoglobulin in transgenic mice. *Nature* 328 : 530-532.
- Thompson, R. 1986. Structure, function, and molecular defects of factor IX. *Blood* 67: (3) 565-572.
- Wall, R.J., D.J. Bolt, W.I. Frels, H.W. Hawk, D. King, V.G. Pursel, C.E. Rexroad, Jr., and

R.M. Rohan. 1990. Transgenic farm animals: Current state of the art. *AgBiotech News and Information* 2, 391-395.

Wall, R. J., D. E. Kerr and K. R. Bondioli. 1997. Transgenic dairy cattle : Genetic engineering on a large scale. *J. Dairy Sci.* 80 : 2213-2224.

Ziomek, C. A. 1998. Commercialization of proteins produced in the mammary gland. *Theriogenology* 49 : 139-144.

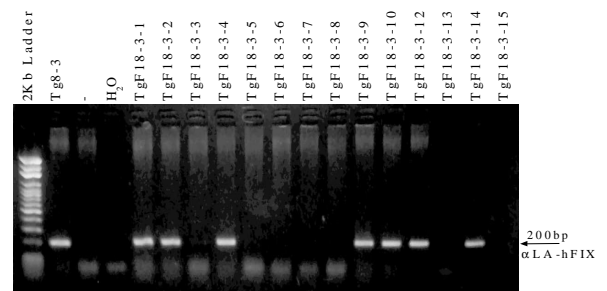


圖 1.人類凝血第九因子基因轉殖豬後裔 PCR 分析結果。左側為 2kb 之分子量指標。所使用之引子即含啟動子及構造基因接合點之鹼基序列，產物之長度約 200bp。

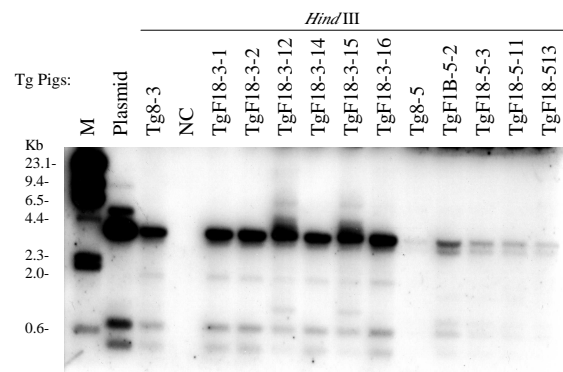


圖 2.人類凝血第九因子基因轉殖豬及其後裔之基因組 DNA 經 HindIII 消化後之南方吸漬法分析結果。左側為 λ HindIII 之分子量指標。

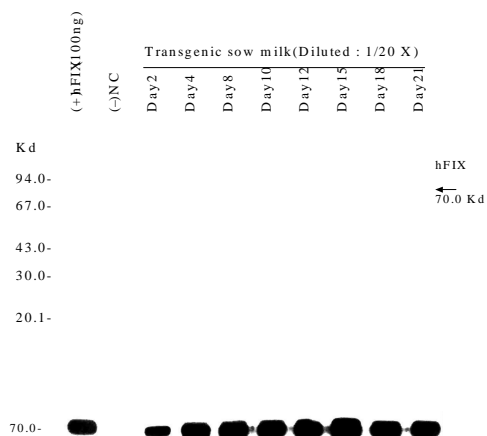


圖 3.人類凝血第九因子基因轉殖豬之不同泌乳期乳樣跑 SDS-PAGE 及西方吸漬法分析結果。上圖為 SDS-PAGE 經 Coomassie blue 染色之結果，左側為分子量指標。下圖為經人類凝血第九因子抗體結合後之 ECL 分析結果。

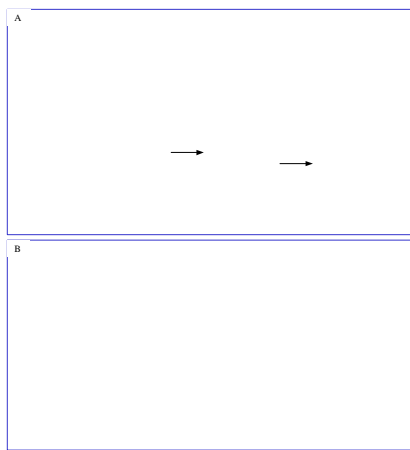


圖 4.人類凝血第九因子基因轉殖豬之第 28 天乳樣之組織切片免疫染色結果。箭頭“→”指示者為人類凝血第九因子抗體結合及 DAB 呈色後之結果。

表 1. LA-hFIX基因經應用顯微注射法分別注入原核階段之小鼠胚與豬胚後產生基因轉殖小鼠與基因轉殖豬之效率

Table 1 Efficiency of production the transgenic mice and piglets by method of microinjection of the LA-hFIX gene into mouse and porcine embryos at pronuclear stage.

動物別 Animal	顯微注射之胚數 No. of embryos microinjected	移置之胚數 No. of embryos transferred	出生之仔 小鼠及仔豬數 No. of pups and piglets born	帶有轉殖基因之 仔小鼠及仔豬數 No. of pups and piglets transgenic			基因轉殖效率 Transgenic efficiency(%)
				合計Total			
小鼠 Mouse	699	549	89	2	9	11	12.3
豬 Pig	212	212	14	1	1	2	14.2

表. 2 LA-hFIX 基因轉殖豬與非基因轉殖豬配種後代之外源基因性腺傳承分析結果

Table. 2. Germline transmission of LA-hFIX transgene in the transgenic pig assessed by analysis of genomic DNA samples from F1 progenies had been generated by breeding each of transgenic founders with the nontransgenic pig.

第 0 代基因轉殖豬 G0 Transgenic pigs		分娩窩數 No. of litters paturited	出生仔豬數 No. of F1 piglets born	攜轉殖基因之 F1 仔豬數目 No. of F1 piglets			
耳號 Ear No.	性別 Sex			Female	Male	合計 Total	百分率 %
8-3		2	23	7	6	13	56.5
8-5		6	68	5	4	9	13.2
合計或 平均 Total or average	1 /1	8	91	12	10	22	24.2