

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

應用體細胞核移植技術在家畜育種及生物醫學之研究(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2317-B-002-021-

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學畜產學系暨研究所

計畫主持人：吳信志

共同主持人：杜清富

計畫參與人員：陳建宏、蕭士翔、黃馨儀、黃紹怡、連雯慈

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 30 日

[illegible]

計畫參與人員：陳建宏、蕭士翔、黃馨儀、黃紹怡、連雯慈

中 華 民 國 94 年 05 月 29 日

目錄

一、摘要.....	PP 3-4
二、英文摘要.....	PP 4-5
三、計畫緣由與目的.....	PP 5-7
四、材料與方法.....	PP 7-9
五、結果與討論.....	PP 9-11
六、研究結果自評.....	PP 11-13
七、參考文獻.....	PP 13-14
表 1. 優良種豬體細胞之建立.....	P15
表 2. 以體內成熟豬卵母細胞進行體細胞複製豬產製試驗之結果.....	P16
圖 1. 成年優良種公豬之耳成纖維母細胞複製豬.....	P17
圖 2. 基因轉殖小鼠豬之綠色螢光表現.....	P18
圖 3. 基因轉殖小鼠豬胎兒之骨髓所分離之表現綠色螢光的純系間葉幹細胞株.....	P19
圖 4. 紅色部份為源自骨髓之間葉性幹細胞經誘導分化 6 天(A 圖)及九天(B 圖)後之脂肪細胞.....	P20

農業生物技術國家型科技計畫成果報告

計畫名稱：應用體細胞核移植技術在家畜育種及生物醫學之研究

計畫編號：NSC 93-2317-B-002-021

執行期限：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

主持人：吳信志

執行機構及單位名稱：台灣大學畜產系及台灣動物科技研究所

共同主持人：杜清富

計畫參與人員：陳建宏、蕭士翔、黃馨儀、黃紹怡、連雯慈

執行機構及單位名稱：台灣大學畜產系及台灣動物科技研究所

一、摘要

本計畫第一年目標擬先以基因顯微注射法產製綠色螢光(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因轉殖豬，作為第二年單株骨髓間質幹細胞分離之用。另持續進行優良種豬體細胞株之建立、種源保存、豬胚胎外培養系統之建立和體細胞複製豬試驗。自卵巢表面濾泡(直徑 2~8mm)收集卵丘卵母細胞複合體，培養於 NCSU-23 成熟培養液中 42-44 h，挑選排出第一極體之卵母細胞進行去核，再將單一之成纖維母細胞(fibroblast)或間葉幹細胞細胞(mesenchymal stem cell, MSC)注射至已去核之卵母細胞內，重組胚經不同方式激活，包括(1)單次電擊激活(electroporation, EP, 10 sec at 5 V AC followed by a 1 x 30 μ sec pulse at 2.2 kV/cm DC)後，配合細胞骨架鬆弛劑(cytochalasin B, CB, 10 μ g/mL)合併蛋白質合成抑制劑(cycloheximide, CHX, 10 μ g/mL)處理，或(2)於單次電擊後，以蛋白質轉磷酸酶抑制劑(6-dimethylaminopurine, 6-DMAP, 2mM)處理。結果顯示，以相同方式激活後，成纖維細胞作為供核細胞者囊胚率較高於以間葉幹細胞者(37 vs. 34%, 28 vs. 24%)，而以 EP + 6-DMAP 激活處理之分裂率及囊胚率(88-89%, 34-37%)均較高於以 EP + CB + CHX 處理者(75-80%, 24-28%)，其中以 MSC 為供核細胞進行核轉置，並以 EP + CB + CHX 激活之處理組，其囊胚率(24%)顯著低於以 EP + 6-DMAP 激活處理者(34-37%,

$p < 0.05$)。結果顯示，由 MSC 所形成之重組胚胎外發育能力較低於由成纖維細胞形成者，而電激後添加 6-DMAP 進行化學激活處理可顯著改善重組胚之分裂及囊胚率。以上述試驗結果為基礎，嘗試以電激活配合 6-DMAP 激活條件進行核移置胚之產製，期能提高複製豬之產製效率，試驗係以優良種公豬之耳皮膚成纖維母細胞當作供核細胞進行核移植之試驗，再次成功複製九頭優良種公豬，此結果證實產製效率已由 0.5 % (4/795) 提高至 4 % (9/223)，同窩可分娩九頭複製豬，已接近可產業化程度。此外，以顯微注射 EGFP 基因生產不同品系之綠色螢光小鼠，經基因注射後之原核胚，儘速移置回同期化處理之代理孕母體內，待懷孕期滿，以 PCR 檢測小鼠是否帶有外源基因並觀察其螢光表現。經分別移置 326 及 60 個 FVB 及 ICR 鼠胚至 12 和 2 隻代理孕母體內，並產下 68 及 15 隻小鼠。以 PCR 分析確定有 9 (13 %) 及 4 (27 %) 隻攜帶 EGFP 基因，其中會表現綠色螢光者為 6 (9 %, 2♂/4♀) 及 4 (27 %, 2♂/2♀) 隻。相同轉殖基因亦被以豬胚原核基因顯微注入方式成功獲得二頭 EGFP 基因轉殖豬胎兒，經長波長(365 nm)紫外光偵測後證實均可表現 EGFP。表現 EGFP 之小鼠均具有性腺遺傳能力，其子代有不同比例(25-50 %)可表現 EGFP。結果顯示，小鼠原核胚經注射 EGFP 基因及胚移置後，可成功產下不同品系之基因轉殖小鼠，並可表現綠色螢光且具穩定之性腺遺傳能力。進一步分離綠色螢光轉

基因小鼠純系之骨髓間葉幹細胞。以長波長 (365 nm) 紫外光偵測綠色螢光蛋白質基因在小鼠個體中之表現。結果顯示，各組織器官除脾臟、肺臟與骨組織外，其他器官如：心臟、肌肉、腦、肝、睪丸、腸道、腎、眼球及胰臟等均高度表達綠色螢光。源自股骨與脛骨的骨髓間葉幹細胞，經螢光顯微鏡檢查結果證明此等幹細胞確有表達綠色螢光之事實，進一步將豬及小鼠之骨髓間葉幹細胞於特定培養條件下進行誘導分化之試驗，已確認可分化成脂肪細胞。綜合上述，由 MSC 所形成之重組胚體外發育能力較低於由成纖維細胞形成者，而電激後添加 6-DMAP 處理可顯著改善重組胚之分裂率、囊胚率及產製複製豬之效率。本研究自綠色螢光小鼠骨髓成功分離獲得純系間葉幹細胞，可提供以豬為模式進行臨床前細胞治療、基因治療或組織工程等極具研究應用潛力之細胞來源。

關鍵詞：體細胞，複製豬，核移植，體外成熟，豬卵母細胞，間葉幹細胞

二、英文摘要

The purposes of this study in the first year was to proceed with the cryopreservation of ear skin fibroblast cells derived from elite pigs' herds are able to march forward continuously for cloning of elite pigs as well as to generate of EGFP (enhanced green fluorescent protein) transgenic pigs harboring EGFP marker gene by pronuclear microinjection for isolation of mesenchymal stem cells (MSC) of single clone derived from their bone marrow. In our results, primary fibroblast cells of top-performance individuals were established from skin samples taken from ear tissues. So far, derived somatic cells from over 50 elite pigs containing golden couples had been cryopreserved in liquid nitrogen tank. In addition, pig oocytes derived from ovaries of sow, cumulus-oocyte complexes were matured *in vitro* for 42–44 h, and oocytes with 1st polar body were selected for enucleation and reconstructed embryos could successfully activated by electrical activation and the electrical pulse combined with CB+ CHX or 6-DMAP would greatly improve the rates of cleavage to 80-90% and blastocyst formation

rate to 30-40%. To study the effects of different donor cell types and activation methods on the subsequent development of porcine reconstructed embryos produced by somatic cell nuclear transfer (SCNT). A single suspended fibroblast or mesenchymal stem cell (MSC) was injected into enucleated ooplasm, and reconstructed embryos were activated by one of following methods: (1) electrical pulse (EP, 10 sec at 5 V AC followed by a 1 x 30 μ sec pulse at 2.2 kV/cm DC) combined with 10 μ g/mL cytochalasin B and 10 μ g/mL cycloheximide for 4 h (EP+ CB+ CHX), or (2) EP combined with 2 mM 6-DMAP for 4 h (EP+ 6-DMAP). After activation treatments, the reconstructed embryos were thoroughly washed and cultured for 4 days in NCSU-23 medium. Results showed that the percentage of blastocyst formation in these treatments using the same activation method were greater in Fibroblast groups than in MSC groups (37 vs. 34%, 28 vs. 24%). The rates of cleavage and blastocyst formation were better in the groups treated with EP+ 6-DMAP (88-89%, 34-37%) than EP+ CB+ CHX (75-80%, 24-28%). Based on upper result, we generated successfully 9 cloned piglets in one litter by nuclear transfer of somatic cell derived from ear tissue of top-performance boar from core of artificial insemination. The efficiency of generating cloned piglet is elevated to 4 % (9/223) from 0.5 % (4/795). This result indicated the probability of this cloning technique for commercialization. Additionally, enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene was introduced into mouse genome of FVB and ICR strain embryos by pronuclear microinjection. A total of 326 FVB and 60 ICR survival embryos were transferred into 12 and 2 recipient mice, respectively, and 68 FVB and 15 ICR pups were born. Nine (13 %) FVB and four (27 %) ICR mice were confirmed to be transgenic mice by PCR and Southern blotting analysis. Among them, six FVB (9 %, 2 ♂ / 4 ♀) and four ICR (27 %, 2 ♂ / 2 ♀) TG mice could express EGFP fluorescent and exhibit stable integration of the transgene in their germ line. As the experiments of EGFP transgenic mice, two transgenic fetuses of pig were produced and the EGFP expression pattern is similar to the transgenic mouse.

The EGFP expression pattern of transgenic mice and pig fetuses was analysis by 365 nm UV light. Exclusion of spleen, lung and bone tissue, other organs (heart, muscle, brain, liver, testis, gut, kidney, eyes and pancreas etc.) highly expressed EGFP in transgenic mice and pig fetuses. Bone marrow was flushed out from femurs and tibias of transgenic candidates, the near-to confluence fibroblastic colony were obtained under the conditions of $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ of the starting culture and the incubation time of 72 hours. Expression of EGFP in isolated MSCs of transgenic pig fetuses and mice were detected by using fluorescent microscope. The EGFP MSCs derived from transgenic pig fetuses and mice were preliminary isolated from the transgenics in this study. Progressively, the MSCs were successfully conducted to give rise to adipocyte under defined culture conditions. In conclusions, our results indicates that the porcine reconstructed embryos using MSC as donor cell exhibit the poorer developmental potential *in vitro*, and the activation method of EP+ 6-DAMP was sufficient for cloned embryos to develop to term in our studies. The cell populations will be available in preclinical studies including cell therapy, gene therapy, tissue engineering fields and application in pig model.

Keywords: Somatic Cells, Nuclear Transfer, Cloned pigs, In Vitro Maturation, Porcine Oocytes, Mesenchymal stem cells

三、計畫緣由與目的

家畜核移植技術未來將展望於複製遺傳背景一致性的動物、表現性能優越之基因轉殖動物，生產單一性別家畜及高生產性能之優良種畜，甚至瀕臨絕種野生哺乳動物之復育，以及將來哺乳動物之基因定位轉殖或基因剔除之研究。基因轉殖技術與複製動物技術為現今家畜基因工程之關鍵性平台技術，胚原核基因顯微注射技術在國內已發展十年，並已成熟至可例行性產製基因轉殖家畜之階段，進而發展以基因轉殖家畜為分子牧場，生產珍貴蛋白質

醫藥。在複製技術方面，因應用此技術將成功轉染外源基因之細胞核移植於受核卵後，發育成基因轉殖動物之效率近乎100%，其技術價值可凌駕胚原核基因顯微注射，複製技術可將高生產性能之家畜、基因轉殖動物之體細胞、基因剔除之細胞進行大量的複製，惟複製技術尚處於發展階段，在國外1997年起才有體細胞複製綿羊報告，2000年才有複製豬的報告，甚且其成功獲得複製豬之效率僅1-2%，家畜基因顯微注射技術成功將基因引入基因組之效率達10-20%，相較之下複製動物技術仍有很大之發展空間。

複製(clone)之定義一般指遺傳物質完全相同之個體或產生遺傳物質完全相同個體之過程。其中之個體，可以是特定之去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid; DNA) 片段、單一細胞、或為完整之多細胞生物 (Smith and Wilmut, 1989)。研究脊椎動物複製之來龍去脈，首推美國科學家Briggs & King(1952)成功地自青蛙的胚(2n)細胞成功複製青蛙，開啟脊椎動物複製之門。而1962至1975年Gurdon嘗試將已分化之腸道上皮細胞核及成蛙之角化皮膚細胞進行核移植，並探討其發育潛能，結果發現在經紫外線照射後之卵細胞質的影響下，得到發育正長之成蛙，此結果更震撼全球生命科學界。從此觸發無數研究人員探討複製哺乳動物之企圖心，試驗之初係以哺乳動物為對象，重複Gurdon之試驗，但均未能獲得具體之成果，直至1986年Willadsen首次將綿羊八細胞階段之胚葉細胞核轉殖入另一去核卵細胞，成功複製綿羊，創造了以哺乳動物早期胚細胞複製成功之首例。在複製豬研究方面，于1989年Prather 等以4-細胞期豬胚經核移植過程獲得一頭仔豬，此乃最早複製豬隻成功之例；至1990年以早期胚細胞當供核細胞成功產製核移植之動物包括兔子(Collas and Robl, 1990)及牛(Bondioli et al., 1990)。直至Wilmut et al.(1997)進一步培養成年綿羊之初代乳腺上皮細胞，以逐漸降低培養液中血清含量之方式，將其細胞周期回歸至G0期後作為供核細胞，成功獲得核移植綿羊-Dolly，此結果提示，分化後之細胞核可透過人為之處理方式，促使回復(reprogram)至分化前之狀態，同時突破了家畜核移植及基因剔除技術之研究瓶頸。隨後，Schnieke et al.,

1997即以攜人類第九凝血因子基因之綿羊成纖維母細胞作為供核者，結果獲得人類第九凝血因子基因轉殖綿羊-Polly，可謂集核移置及基因轉殖技術研究之大成。再者Wakayama *et al.*(1998)使用已分化之成年母小鼠之自然排出卵丘細胞(cumulus cells)、賽托力氏細胞(sertoli cells)及腦神經細胞(brain neuronal cells)，以預先製備之不同直徑大小玻璃針，將細胞質去除後所得之細胞核當作供核者，經注射於去核卵母細胞質後證實均具有發育成胎兒之潛能，尤其以卵丘細胞核當供核者之試驗結果更進一步證明可發育成完整個體，再次證實體細胞再程序化後之發育潛能。以綿羊體細胞核移植配合指定位置基因轉殖技術亦於2000年被McCreath等人研發成功；以體細胞當供核者進行複製豬研究之三個團隊，幾乎同時發表複製成功之結果，其中體內成熟 (Polejaeva *et al.*, 2000; Onishi *et al.*, 2000)與體外成熟 (Bethauser *et al.*, 2000)之卵母細胞當受核，均成功地獲得複製豬，全球首度成功複製哺乳動物「桃莉羊」之英國羅斯林學院(Roslin Institute)PPL's公司亦在其列，于西元2000年三月五日再以成年動物體細胞複製米莉(Millie)、克莉絲塔(Christa)、愛力克絲(Alexis)、卡蕊爾(Carrel)及達克肯(Doccom)—五胞胎小豬，他們皆健康活潑，且攜帶相同之遺傳物質。更可貴者，係同時攜帶源自人類抗豬器官移植於人之抗排斥有關的基因，此特性在家畜基因轉殖之研究及應用領域上，極具發展潛力及經濟價值。依專家對其器官移植於人體之臨床試驗所需時間評估指稱，未來四至六年內可能完成豬器官移植於人體之試驗目標，這項成果可在解決全世界器官短缺危機問題上，提供近期解決之道。而以豬之 α -1,3-半乳糖基因轉移酵素基因剔除豬胎兒成纖維母細胞當供核者進行核移植試驗，成功獲得基因剔除複製豬之消息，于2002年相繼由密蘇里大學Lai 等及PPL公司Dai 等所發表，甚至基因座上的成對 α -1,3-半乳糖基因轉移酵素基因剔除豬亦被Phelps *et al.*(2003)成功獲得。以成年體細胞(adult cells)成功複製優良遺傳性能之種公豬于2002年3月首由Infigen 和 Genmark公司共同發表。之後，複製貓(Shin *et al.*, 2002)、兔(Chesne *et al.*, 2002)、驃(Woods *et al.*,

2003)、馬(Galli *et al.*, 2003)及大鼠(Zhou *et al.*, 2003)等均陸續被成功複製，上述結果提示，複製動物技術已逐漸成熟，幾乎達可例行化產製之境界，惟複製胚之產製效率及胚移置後發育成完整個體之百分率仍低，其原因有待進一步試驗之結果謀求解決。

依Park 等人2001年所發表之攜綠色螢光蛋白基因複製豬及Lai 等人2002年獲得之 α -1,3-半乳糖基因轉移酵素基因剔除複製豬，均以體外成熟卵母細胞為受核卵質之來源，然其健康狀況均未及PPL公司以去核之體內成熟卵母細胞所獲得之複製豬，雖複製豬之產製方法及豬隻品系並未完全相似，然就孤雌激活後之發育率及顯微操作後之耐受性及存活率而言，體內成熟卵母細胞之品質仍較體外成熟者為佳。此結果提示，目前之豬卵母細胞體外成熟培養條件尚未臻完善，未來仍有改善之空間。在複製豬研究方面，1989年Prather *et al.*以4-細胞期豬胚經NT獲得一頭仔豬；有關台灣複製豬之研究有二個成功之例曾被報導者，畜產試驗所1992年發表小耳種迷你豬4細胞期胚葉細胞核移植於雜種豬之去核卵質中，結果成功獲得8頭核移植仔豬，其中存活6頭，2頭死產，最後育成5頭，此核移植小耳種迷你豬之出生體重為小耳種豬之145.45%。離乳體重為純小耳豬之199.36%，顯示此等操作策略對豬隻之出生及離乳體重有改進之效果，惟其遺傳背景並非完全相同。

收集自屠宰場卵巢之卵丘卵母細胞複合體，于38.5°C、5% CO₂、相對濕度100%條件下，體外成熟培養36小時後，經去卵丘細胞及離心處理，約60-80%卵母細胞排出第一極體，成熟培養時間延長至44-48小時，則第一極體排出率可提高至80-90%。排出第一極體之卵母細胞，經機械式壓擠方式去核處理後，其去核率約50-80%，去核率在批次間之差異甚巨，究其原因，發現可能與各批次間卵母細胞之品質及新鮮度有關，且卵細胞質品質鬆散及老化之卵母細胞經去核處理後之去核率有偏低現象。以表現豬乳鐵蛋白及人類凝血第九因子之雙基因轉殖母豬體細胞作為供核細胞進行核移植之結果已證實可育成複製豬，合計產製795個外觀形態完整之複製胚，經胚移置於11

頭同期發情處理之受胚豬，其懷孕率可達55% (6/11)，其中三頭受胚豬發生早期流產，合計流出6個已成形之複製豬胎兒，另3頭受胚豬則順利懷孕至預產期，以剖腹產方式共獲得4頭雙基因轉殖複製豬，產製效率為0.5% (4/795)，其中第一頭複製豬於91年2月15日誕生，為全球第一頭攜雙轉殖基因之複製豬。

本計畫目標擬先以基因顯微注射法產製綠色螢光基因轉殖小鼠及豬，作為第二年單株骨髓間質幹細胞分離之用。另持續進行優良種豬體細胞株之建立、種源保存、豬胚胎外培養系統之建立和體細胞複製豬試驗。

四、材料與方法

(一)、優良種豬體細胞之來源

經與國內多家種豬場接洽後，其中願景金來、暉煌、及福昌種豬場參與本計畫之意願，並擇期進行優良種豬耳組織之採樣，且簽署優良種豬保種協議書。

(二)、採樣及體細胞初代培養

清潔及消毒耳組織後，以滅菌之耳刻鉗剪下耳組織，經清潔及酒精浸泡後，置於D-PBS中，再以剪刀剪碎處理後，置於含5% CO₂，95%相對濕度之37℃培養箱中，以添加10%胎牛血清之DMEM培養液培養10-14天後，即可開始繼代及冷凍保存。

(三)、豬卵丘卵母細胞之收集

以磷酸緩衝液(Dulbecco's Phosphate Buffer Saline; D-PBS, GIBCO 11500-030)或生理食鹽水(Saline)配合保溫(25-39℃)容器方式，自地方屠宰場取得性成熟或接近性成熟母豬之卵巢，以回溫蒸餾水清洗後置於D-PBS中備用。使用18G之注射針吸取直徑3-6 mm濾泡之卵丘卵母細胞複合體(cumulus oocyte complexes; COCS)或將卵巢置於含緩衝液之培養皿中，以解剖刀片逐一劃破及刮擠之，將此懸浮液集中於15ml離心管中靜置10分鐘使沉澱，並將COCS重新懸浮於D-PBS中備用。於立體顯微鏡下篩選卵丘細胞包被完整之COCS進行體外成熟培養。

作為供體內成熟卵母細胞用之雜交品系母豬，係選用已屆性成熟者為佳。為獲得較多卵母細胞進行試驗及提高受胚豬之懷孕率，試驗用之供卵與受胚用新母豬，先後均將其經律期媒(Regumate)、孕馬血清激性腺素(pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG)

及人類絨毛膜激性腺素(human chorionic gonadotropin, hCG)處理，促使豬隻發情同期化及發生超數排卵反應；一般而言，豬隻將於hCG注射後之翌日呈現穩定之發情反應。估計此等供卵豬在hCG注射後36-42小時期間排卵；源自上述體內成熟之豬卵母細胞，可直接將其外為包覆之卵丘細胞以玻尿酸酵素配合機械方式移除之，經去除卵丘細胞及核移除之卵母細胞可作為受核卵母細胞之來源，或未經去核之卵母細胞直接進行孤雌激活條件及豬胚胎外培養條件之系統測試。截至目前為止，以早期豬胚胎培養液體外培養144小時後，可促使50%體內成熟豬卵孤雌發育至囊胚期。相同培養液培養孤雌激活之體外成熟卵母細胞，亦可促使10% - 30%豬卵發育至囊胚期。

(四)、豬卵丘卵母細胞複合體之體外成熟培養

以NCSU-23為基礎培養液，添加10%豬濾泡液、0.1mg/ml半胱氨酸(Sigma C-8152)，1%之非必需氨基酸(Sigma, M-7145)，上皮細胞生長因子(epidermal growth factor; EGF, Sigma E-4127)及激性腺素(2.5 g/ml FSH 或 LH 1ug/ml; Sigma F-2293)，將成熟培養液作成100 ul液滴並覆概礦物油後，使用前先置於含5% CO₂培養箱中平衡2-10小時。將COCS分成20-25個一組，將其分配於覆概礦物油之個別液滴中，再置於38.5℃，相對濕度100%，5% CO₂培養箱中培養36-48小時。上述成熟培養條件，可促使卵母細胞成熟分裂至第二次減數分裂中期，即排出第一極體，此成熟卵母細胞可作為複製豬試驗之受核細胞質來源。

(五)、去卵丘細胞及離心處理:

玻尿酸酵素(Sigma H-2126)溶液(300 I.U./ml in D-PBS)配合適當口徑之mouth pipett將卵母細胞周圍之卵丘細胞移除。因豬卵之脂質含量較高致較不易透光，需將去卵丘細胞之卵母細胞離心(12000rpm 5-10分鐘)後，使卵細胞質分層(stratified)，此處理有利於含極體卵母細胞及卵母細胞品級之判定。于立體顯微鏡篩選含極體卵母細胞。收集含極體卵母細胞並置於NCSU23胚培養液中。

(六)、卵子去核:

將holding pipette(外徑120-150 μm；內

徑 15-20 μm)及去核針於實驗操作之前預先製備完成，並架設於顯微操作器上。備妥體外操作液滴(D-PBS)覆以礦物油(Sigma M-3516)。將含極體卵母細胞置入顯微操作液滴中(20顆/批)，即可開始去核。控制每批卵於30分鐘內去核(吸除或壓擠法)完成。

(七)、篩選去核成功者:

準備去核物染色體檢查液(Hoechst33342 10 $\mu\text{g/ml}$)，於35mm培養皿上依序製作所需之微滴(tiny drops)並蓋礦物油。以 mouth pipett 吸吐方式，將去核物與卵子粘連處分離，並依序將去核物放入35mm培養皿檢查液之微滴中(1 to 1)，而卵子則置入另一35mm培養皿相對位置液滴(NCSU23)內。將去核物浸入染色體檢查液中 37°C 作用 10-15 分鐘。於螢光顯微鏡下觀查去核情形並記錄之。挑出相對位置中去核成功之卵子，並集中於NCSU23液滴。

(八)、供核體細胞之處理:

選用繼代且長滿後 2-5 天之體細胞(成纖維母細胞)。以 PBS (Sigma 1000-3)清洗之，並吸除PBS。加入 0.25 % trypsin-EDTA 於 37°C 作用 5-10 min，將細胞消化後，加入與 trypsin-EDTA 等體積之細胞培養液(DMEM, Sigma-5648 + 10% 胎牛血清)終止作用，將細胞液移至離心管中以 173g，離心 3 分鐘。去上層液。以適量細胞培養液溶解細胞 pellet，並作成細胞懸浮液。

(九)、供核細胞之注入:

將 holding(外徑 120-150 μm ；內徑 10-15 μm)及細胞注射針(外徑 20 μm ；斜角 40 度)於實驗之前製備完成。備妥體外操作液滴(D-PBS)覆以礦物油(light oil)。打開加熱板於 37°，並將去核卵(20 為限)與細胞懸浮液分別移入不同液滴中將細胞注射針移入細胞懸浮液滴吸取細胞 (直徑 $\leq 10\mu\text{m}$ ，細胞膜平滑者)，每次可以裝載約 10 個細胞。於去核卵液滴中將供核細胞逐一循原去核開口注入卵質中。將完成細胞注入者，移入 37°C 培養箱中培養 2-3 小時後，即可進行激活處理。

(十)、電激活及化學激活處理:

以不同方式激活 (activation) 體外成熟豬卵母細胞，建立良好之激活及其後續發育之培養系統，用於改善體細胞核轉置 (somatic cell

nuclear transfer, SCNT) 試驗之效率。自卵巢之表面濾泡 (2~8mm) 收集卵丘卵母細胞複合體 (cumulus-oocyte complexes, COCs)，培養於 NCSU-23 成熟培養液中 42-44 h，成熟之卵母細胞以單次電擊激活 (10 sec at 5 V AC followed by a 1 x 30 μsec pulse at 2.2 kV/cm DC)，之後再配合不同藥劑進行化學激活，包括以 10 $\mu\text{g/ml}$ 細胞骨架鬆弛劑 (cytochalasin B, CB) 合併 10 $\mu\text{g/ml}$ 蛋白質合成抑制劑 (cycloheximide, CHX) 處理 4 小時、單獨以 5 μM 鈣離子提昇劑 (calcium ionophore, A23187) 處理 5 分鐘、以 5 μM A23187 合併 2 mM 蛋白質轉磷酸酶抑制劑 (6-dimethylaminopurine, 6-DMAP) 處理 4 小時或單獨以 2 mM 6-DMAP 處理 4 小時，所有激活卵均以 NCSU23 清洗及體外培養之，令其發育至胚移置之時期或于體外培養 6-8 天，記錄其發育至囊胚期之百分率，進一步細胞核染色後評估其細胞數。以體內成熟豬卵進行體細胞核移植試驗所產製之複製豬胚，以電激活配合 2 mM 6-DMAP 化學激活處理 4 小時，經體外培養 12-16 小時後，將其移置於發情同期化處理之受胚母豬輸卵管，移製過程以外科手術為之。

(十一)、試驗動物之內分泌處理

1. 試驗小鼠之內分泌處理

本研究中做為供胚(embryo donor)及受胚(embryo recipient)用之 ICR 母小鼠 (購自台大動物中心)，均係選用 8 週齡以上已屆性成熟者。全體試驗用小鼠係飼養於 14 L : 10 D 之計畫光照下，每天光照時間訂為 05:00 至 19:00；並隨時提供商用飼料 (#5001, PMI Feeds, Inc., USA) 與飲水，供其任食。供胚母小鼠之超級排卵處理，係在擬進行基因注射試驗前三日之上午 08:30，經由腹腔予以注射 10 IU 之孕馬血清激性腺素(pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG；中國化學製藥)，並於 PMSG 注射後 48 小時再經由腹腔注射 10 IU 之人類絨毛膜激性腺素(human chorionic gonadotropin, hCG；中國化學製藥)。此等供胚母小鼠均於 HCG 注射後，立即被放入性成熟且具生育能力之雄性小鼠籠內完成配種，再於翌日上午 08:30 檢查並選取具有陰道栓者，自其輸卵管中沖洗收取處於原核 (pronucleus) 階段之小鼠胚，

俾供進行基因注入之用。受胚用之母小鼠雖未經內泌素進行超級排卵處理，但在進行供胚母小鼠配種之同時，亦均使用業經輸精管結紮後之雄性小鼠進行配種刺激，並於翌日上午 08:30 檢查具有陰道栓者，以確認該小鼠已處於偽懷孕狀態，可提供做為受胚母小鼠之用。

2. 試驗豬之內泌素處理及原核胚收集

本研究作為供胚用之母豬，係使用核心豬場北場提供之性成熟雜交品系女豬為之，試驗豬隻均選用 7 月齡以上已屆性成熟者。全體試驗用之供胚用新母豬，均經如材料方法 (三) 所述之超級排卵，發情同期化處理及人工授精。估計此等供胚豬在 hCG 注射後 56~62 小時，其受精卵將發育至原核階段；因此選擇此一時段進行腹中線外科手術，並經由沖洗輸卵管將豬胚悉數收集，俾供進行基因注入之用。

(十二)、注射用基因之製備

本試驗供小鼠及豬胚顯微注射用之轉殖基因為 beta-actin-EGFP，基因載體源自 Dr. Okabe 實驗室，經限制酵素 *Apal* I 及 *Bam* HI 截切 3.43 kb 之轉殖基因片段，進一步以二次 banding 純化，純化後之基因以注射用之 TE 緩衝液稀釋到濃度 1 ng/ μ l，即可分裝及冷凍保存備用。

(十三)、小鼠及豬胚之基因注射與胚移置

小鼠胚因含有之脂肪球滴較少，可逕置於顯微鏡下觀察確認雌原核及雄原核之位置，俾進行基因注射之顯微操作。全體小鼠胚及豬胚之基因注射，均於分光干擾 (differential interference contrast) 倒立顯微鏡 (Diaphot TMD microscope, Nikon, Japan 200 x) 下進行，並以 Narishige NT-8 (Japan) 之顯微操作器為之；其操作步驟係先於業經滅菌處理過之凹槽玻片 (depression microscope slide) 中心處置放一小滴 (5~10 μ l) 之 M2 緩衝液，並於緩衝液上方覆蓋重級礦物油 (heavy mineral oil, Sigma, USA)，再將 10~20 個處於原核階段之小鼠胚置入 M2 小滴中。供固定胚用之平口固定針管 (holding pipette) 及供注射基因用之微注射管 (injection pipette)，其製備方法悉依照 Wu *et al.* (1995) 之所述。顯微注射之進行，係以平口固定針管先吸住原核清晰之單細胞小鼠胚或豬胚，並調整焦距至可清楚見及原核膜之程度，再移動預先吸

有轉殖基因 (濃度為 1 ng/ μ l) 之注射針，且將其針尖焦距調整使之與核膜同焦，經由油壓調整將注射針令其穿入小鼠胚或豬胚之透明帶及原核內，同時將基因注入原核內，直至原核體積明顯膨大時再迅速將注射針拔出。基因之注入量，以令原核脹至約原來之 1.5 倍為原則，其注入之體積量約 2 pl。全體業經 DNA 注射後之小鼠胚，其仍保有緻密卵黃質且外觀形態完整者，移置於自然發情並經偽懷孕處理之受胚母小鼠兩側輸卵管中；每側輸卵管被移置之胚數，平均為 10~20 個。

豬胚之細胞質中因含有大量之脂肪球滴，致未能逕自顯微鏡觀察下明確分辨其原核之所處位置，遂均先於 25 °C 溫度下進行高速 (12,000 $\times$ g) 離心 10 分鐘，令其顯露原核後，始克方便基因之注入。基因之注入量，仍以令原核脹至約原來之 1.5 倍為原則，其注入之體積量約 2 pl。全體業經 DNA 注射後之豬胚，移置於受胚豬兩側輸卵管中；每側輸卵管被移置之胚數，平均為 10~20 個。

(十四)、基因轉殖動物之分析

源自移置業經注入 beta-actin-EGFP 基因之小鼠及豬胚所產生之幼仔，經剪取其尾巴之組織抽取其中之基因組 DNA，俾供分析該外源基因在基因組 DNA 中之嵌插情形，分析方法將以聚合酵素連鎖反應及南方吸漬法確認轉殖基因之嵌入，綠色螢光蛋白質之表現，則採用長波長 (365 nm) 紫外光偵測法配合黃色濾光片直接觀察記錄之。

(十五)、間葉性幹細胞之誘導分化

間葉性幹細胞經體外培養至完全長滿後，以脂肪細胞誘導生成之培養液 (a-MEM with 20% FBS, 2mM L-glutamine, 10 μ g/ml insulin, 1 μ M dexamethasone, 0.5mM IBMX and 100 μ M indomethacin) 進一步培養 6 及 9 天後，其間每隔三天換培養液一次，脂肪細胞生成之確認係以 Oil Red-O 染色為之。

五、結果與討論

(一)、綠色螢光小鼠之產製及性腺傳承效率

源自水母 (jellyfish) 之綠螢光蛋白質為一種自發性螢光蛋白質，不需添加受質即可於活體細胞中觀察，因此為極佳之報導基因。

本研究之目的係以胚原核基因顯微注射方式，將 EGFP 基因引入不同品系之綠色螢光小鼠之基因組中，並觀察其性腺傳承效率。試驗使用 4-6 週齡之 FVB 或 ICR 小鼠 (mouse)，經超級排卵及配種後收集原核時期受精卵，經基因注射後之原核胚，儘速移置回同期化處理之代理孕母體內，待懷孕期滿，以 PCR 檢測小鼠是否嵌入外源基因並觀察其螢光表現。經分別移置 326 及 60 個 FVB 及 ICR 鼠胚至 12 及 2 隻代理孕母體內，並產下 68 及 15 隻小鼠。以 PCR 分析確定有 9 (13 %) 及 4 (27 %) 隻攜帶 EGFP 基因，其中表現綠色螢光者為 6 (9 %, 2♂/4♀) 及 4 (27 %, 2♂/2♀) 隻。而表現 EGFP 之小鼠均具有性腺遺傳能力，其子代有不同比例 (25-50 %) 可表現 EGFP。由上述結果顯示，小鼠原核胚經注射 EGFP 基因及胚移置後，可成功產下不同品系之基因轉殖小鼠，並可表現綠色螢光(圖 2A)且具穩定之性腺遺傳能力。相同之技術及方法亦被應用於產製 EGFP 基因轉殖豬胎兒，合計 109 個原核時期之豬胚，經 EGFP 基因注入及胚移置於四頭同期化處理之受胚豬後，目前已成功產製二頭表現 EGFP 之基因轉殖豬胎兒(圖 2B)，

(二)、綠色螢光轉基因小鼠及豬骨髓間葉幹細胞之建立及誘導分化潛能之探討

間葉幹細胞可分離自骨髓中擁有自我更新及分化為數種細胞形式能力的幹細胞群體，該等細胞具有易於分離培養與體外增生快速等特性，逐年受研究者重視。本研究嘗試以原核胚顯微注射技術產製綠色螢光轉基因小鼠及豬胎兒，繼而分離其純系之骨髓間葉幹細胞。以長波長(365 nm)紫外光偵測綠色螢光蛋白質基因在小鼠個體中之表現。結果顯示，各組織器官除脾臟、肺臟與骨組織外，其他器官如：心臟、肌肉、腦、肝、睪丸、腸道、腎、眼球及胰臟等均高度表達綠色螢光。源自股骨與脛骨的骨髓細胞，在接種密度 $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ 與 72 小時的培養條件下，呈現緊密的成纖維細胞群落。初代培養的骨髓細胞包含高度異質性的細胞群體，包括：球形、紡錘形與扁平狀等各類型細胞；惟隨著培養時間之進展，紡錘形細胞群體乃呈對數曲線方式逐漸取得生長優勢。此等細胞外徑約 80-90 μm ，細胞質呈現許多顆粒狀分佈，

並具直徑約 30 μm 之細胞核，屬典型的間葉幹細胞型態。螢光顯微鏡檢查結果且證明此等骨髓間葉幹細胞確有表達綠色螢光及經體外誘導分化成脂肪細胞(圖 4AB)潛能之事實。綜合上述，本研究自綠色螢光小鼠及豬骨髓成功分離獲得純系間葉幹細胞(圖 3AB)，可提供以豬為模式進行臨床前細胞治療、基因治療或組織工程等極佳研究之用途。

(三)、不同型態之供核細胞與激活方式對豬胚體細胞核轉置效率之影響

本研究之目的在於利用不同型態之供核細胞 (donor cell) 及激活方式 (activation) 進行豬胚之體細胞核轉置 (somatic cell nuclear transfer, SCNT)，係以觀察並改善重組胚 (reconstructed embryos) 之激活及後續發育效率。自卵巢之表面濾泡 (2~8mm) 收集卵丘卵母細胞複合體 (cumulus-oocyte complexes, COCs)，培養於 NCSU-23 成熟培養液中 42-44 h，挑選排出第一極體之卵母細胞進行去核 (enucleation)，再將單一之成纖維母細胞 (fibroblast) 或間葉幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 注射至已去核之卵母細胞內，重組胚經不同方式激活，包括 (1) 單次電擊激活 (electroporation, EP, 10 sec at 5 V AC followed by a 1 x 30 μsec pulse at 2.2 kV/cm DC) 後，配合細胞骨架鬆弛劑 (cytochalasin B, CB, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 合併蛋白質合成抑制劑 (cycloheximide, CHX, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 處理，或 (2) 於單次電擊後，以蛋白質轉磷酸酶抑制劑 (6-dimethylaminopurine, 6-DMAP, 2mM) 處理。經激活之重組胚於體外培養 168 h，期間觀察各處理組之分裂率、囊胚率及囊胚細胞數。由結果得知，以相同方式激活後，成纖維細胞作為供核細胞者囊胚率較高於以間葉幹細胞者 (37 vs. 34%, 28 vs. 24%)，而以 EP + 6-DMAP 激活處理之分裂率及囊胚率 (88-89%, 34-37%) 均較高於以 EP + CB + CHX 處理者 (75-80%, 24-28%)，其中以 MSC 為供核細胞進行核轉置，並以 EP + CB + CHX 激活之處理組，其囊胚率 (24%) 顯著低於以 EP + 6-DMAP 激活處理者 (34-37%, $p < 0.05$)。結果顯示，由 MSC 所形成之重組胚體外發育能力較低於由成纖維細胞形成者，而電激後進一步以 6-DMAP 進行化學激活處理，證實可顯著改善重組胚之分裂及囊

胚率。

(四)、黃金組合優良種公豬之體細胞種源庫之建立

目前已完成三家(願景金來、暉煌及福昌)種豬場優良種豬完整體細胞之種原保存工作，合計保存源自十五頭優良種豬之 298 管初代耳成纖維母細胞(表 1)，包括杜洛克種公豬五頭及種母豬五頭、藍瑞斯種公豬二頭及種母豬三頭，其後裔之檢定合格率、性能指數及體重達 110 公斤之日齡均為各該種豬場之精英之選，其中七對屬黃金組合種豬，優良種豬體細胞初代培養之成功率 100%，顯示該技術已成熟並可將技術。尚有順安(預計採藍瑞斯種豬之黃金組合)及大統畜牧(預計採約克夏種豬之黃金組合)二種豬場之採樣及細胞培養工作仍進行中。

(五)、優良種豬體細胞複製豬之產製試驗

收集自性成熟雜交女豬之體內成熟卵母細胞，經去核後做為受核卵質，進一步以優良種公豬之耳成纖維母細胞當供核者，合計移置 342 個核移植胚於三頭受胚母豬，其中一頭懷孕，並以剖腹產方式成功獲得一頭複製豬。另以迷你豬之骨髓幹細胞作為供核者，總計胚移置 178 個核移植胚於三頭受胚豬，然未獲得任何受胚豬之懷孕訊息。已成功產製之優良種源複製豬，目前以發育達 150 公斤體重，正進行採精(圖 1A)及繁衍後代之試驗中，待其後代成功繁衍後即可與供核之本尊進行優良種豬複製之表現性能比對。

依目前國際上已發表之複製豬資料顯示，複製豬之產製效率約移置胚數之 0.5-0.9%，單窩分娩頭數均低於五頭。本研究另進行二批複製豬試驗之結果(表 2)顯示，以外科手術方式回收 11 頭供卵豬之體內成熟卵母細胞，合計收集 287 個豬卵，其中 264 個含極體之卵母細胞經壓擠方法去核，該去核卵進一步以完整體細胞注入方式完成核移植，細胞注入後之 224 個形態完整者被用於電激活及化學激活，激活處理後之核移植胚培養於含牛血清白蛋白之體外培養液 NCSU-23 中培養 12-16 小時，體外培養後之 223 核移植胚被移置於同期化處理之二頭受胚母豬輸卵管中，其中一頭懷孕並自然分娩九頭仔豬(圖 1B)，創下產製效率及單窩分娩複製豬頭數最高之世界記錄，亦將複製豬之產製效率由雙基因轉殖複製之酷比豬 0.5%(4/795)提

升至 4%(9/223)(表 2)之複製優良種公豬。

家畜之完整體細胞種源保存及體細胞核移植技術之進展，未來將有助於優良種源及瀕臨絕種動物之種源保存及復育之應用，透過之前執行之核移植、激活條件及體細胞核移植之再程序化過程的改善，可將動物種源保存、復育之技術逐漸邁向例行化之境界，未來在農業生物技術、生物醫藥及動物育種等相關研究之應用極具潛力。

六、計畫成果自評

本研究之目的係應用已建立之基因轉殖及複製動物之技術平台，建立豬胚體外培養系統，並將核移植豬胚發育至囊胚之百分率提高約 10%。目前已成功產製表現綠色螢光之基因轉殖小鼠及豬胎兒，並自其體組織及骨髓採樣，個別分離體細胞及骨髓間葉幹細胞，並進行表面抗原特性及體外誘導分化能力試驗，確認其複能性(multipotent)。另以體內及體外成熟豬卵母細胞進行體細胞之核移植試驗，除探討及比較不同供核源及激活條件對核移植豬胚之體外發育能力影響，並獲得複製豬胚產製之較佳激活條件，以該條件進行優良種豬複製之結果證實，合計獲得 9 頭成年體細胞複製豬，複製豬之產製效率已由 0.5%(4/795)提高至 4%(9/223)，同窩可分娩九頭複製豬，已接近可產業化程度。其中一頭複製之優良種公豬，已進行採精分析中。試驗期間持續進行優良種豬體細胞種源保存之例行工作，目前已完成 50 頭台灣優良種豬之體細胞建立及保存工作。

本研究另成功產製表現綠色螢光之基因轉殖小鼠及豬胎兒，並進一步自其骨髓分離間葉性幹細胞，證實悉數表現綠色螢光，彼等表現綠色螢光之幹細胞亦經體外誘導分化試驗證實具複能性。綠色螢光之基因轉殖豬之試驗持續進行中。

本計畫主旨係將九十一及九十二年度執行期間所建立之基因轉殖及複製動物相關技術平台，進一步應用於農業及生物醫學之領域。應用於農業上之主要執行成果包括：a. 優良種畜體細胞銀行之建立；b. 優良種豬之保種及複製；c. 培育數十位國內基因轉殖及複製相關技術之生殖科技人才。在生物醫學上之應用包含：a. 表現綠色螢光基因轉殖小鼠及豬之產製；b. 表現綠色螢光

之純系體細胞及源自骨髓幹細胞之建立。該等細胞株在幹細胞之分化、組織工程及細胞治療等生物醫學領域極具應用價值，若配合綠色螢光之活體偵測儀器，將可加速幹細胞分化能力研究之進展及促進幹細胞產業之發展。

在體細胞種原保存、基因轉殖及複製豬之技術平台發展已臻成熟，基因轉殖動物之技術平台已技轉予台岳生技股份有限公司，體細胞種原保存及核移植之相關技術轉移，亦曾與生技公司洽談。

本年度共發表四篇期刊論文(其中二篇 SCI)、六篇研討會論文、一篇技術報告、申請四件專利及一項技術轉移。參考資料如下：

期刊論文、專利申請及技轉

吳信志 鄭登貴 陳全木 林劭品 顏重河 楊平政，泌乳期間穩定性表現人類凝血第九因子及抗病蛋白基因於非人之多基因轉殖哺乳動物【台灣專利申請案號 092132541】

杜清富 楊淇凱 林志生 顏重河 陳逸仲 吳信志 孫玉苓 劉明薰 楊平政，水蛭素表現載體及含該載體之轉型體【美國專利申請案號 10/053,641】

Chen, WK, NC Chang, YH Chang, KL Chang, SC Wu, TS Yang, SM Wu and AC Chang. 2004. Characterization of the regulatory region of adra2c, the gene encoding murine 2C adrenoceptor subtype. J. Biomed. Sci. 11: 886-901. (SCI)

Cheng, WTK, SC Wu, and CJ Lin. 2005. Transgenic animal system in mammary gland-specific expression platform. 技術平台轉移至台岳生物科技股份有限公司 (合約日期 2005/01).

Huang, CJ, SC Wu, and KB Choo. 2005. Transcriptional modulation of the preimplantation embryo-specific Rnf35 gene by a Y-box protein NF-Y/CBF. Biochem. J. 387: 367-375. (SCI)

Lin, CJ, Chen, CM, CH Wang, SC Wu, SH Lin, and WTK Cheng. 2004. Transgenic animals producing biologically active human factor VIII in their milk driven by mammary-specific expression cassette with intact or B domain-deleted recombinant hFVIII gene constructs.

(ROC and USA Patents Pended, Pending No. 93102866 and No. 20040054, respectively)

Tu, CF, KF Huang, IC Chen, CJ Lin, SC Wu, PC Yang. 2004. Application of real time PCR to rapidly screen hirudin transgenic piglets. J. Chinese Soc. Anim. Sci. 33(4): 289-300.

Wu, SC and WTK Cheng. 2004. The adoptive strategies based on research and development of transgenic animals for competitive advantages of agriculture industry in Taiwan. National Policy Quarterly. 3: 59-76.

Wu, SC, WTK Cheng, CM Chen, SP Lin, CH Yen, PC Yang. 2004. Method for Expressing Multiple Recombinant Proteins in the Milk of Transgenic Non-Human Mammals. (ROC and USA Patents Pended, Pending No. 92132541 and No. 20030311, respectively)

研討會論文

Tu, CF, KF Huang, IC Chen, CJ Lin, and SC Wu. 2004. Application of real time PCR to rapidly screen Hirudin transgenic piglets. Proceedings of the 11th Animal Science Congress, The Asian-Australasian Association of Animal production Societies. PP 175-177. (AAAP Sep. 2: 175-177). Proc. 11 AAAP Congress 2004 Vol. II

Hsiao, SH, CH Chen, SY Huang, CC Kao, WT Lien, KH Lee and SC Wu. 2004. Establishment of mesenchymal stem cells isolated from bone marrow of harboring the EGFP gene transgenic mice. J. Chin. Soc. Anim. Sci. (suppl.): P132.

Chen, CH, WT Lien, SY Huang, CC Kao and SC Wu. 2004. Effects of donor cell type and activation method on the efficiency of porcine somatic cell cloning. J. Chin. Soc. Anim. Sci. (suppl.): PP192.

Chen, CH, WT Lien, SY Huang, CC Kao, KH Lee and SC Wu. 2004. Production and germ-line transmission of EGFP transgenic mice. J. Chin. Soc. Anim. Sci. (suppl.): P193.

Wu, SC, EC Lin, SY Huang, CC Kao, SW Li, Winston TK Cheng, and PC Yang. 2004. Germ-line transmission of

human factor IX transgenic pigs derived offspring. J. Chin. Soc. Anim. Sci. (suppl.): P70.

Lin, ML, SC Wu, WTK Cheng, and CH Yen. 2004. Storage of recombinant factor IX in whey of transgenic animals. J. Chin. Soc. Anim. Sci. (suppl.): P285

技術報告

吳信志。2004。成年豬幹細胞及其應用潛力，
養豬新知 12(9): PP.7-1

七、參考文獻

Betthausen, J., E. Forsberg, M. Augenstein, L. Childs, K. Eilertsen, J. Enos, et al., 2000. Production of cloned pigs from in vitro systems. Nature Biotechnol. 18: 1055-1059.

Briggs, R. and T. J. King. 1952. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into nucleated frog eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 38: 455-463.

Chen LR, Wu MC, Shiue YL. The cytoplasmic effect of enucleated Landrace oocyte on the expression of small ear nucleus in nuclear transplanted pigs. Proc 12th ICAR 1992; Short Communication No. 375.

Chesne P, P.G. Adenot, C. Viglietta, M. Baratte, L. Boulanger, J. P. Renard. 2002 Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nat. Biotechnol. 20(4): 366-369.

Collas, P. and J. M. Robl. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol. Reprod. 43:877-884.

Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G. 2003. A cloned horse born to its dam twin. Nature 2003 424: 635-636.

Gurdon, J. B. 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal

epithelium cells of feeding tadpoles. J. Embryol. Exp. Morphol. 10:622-640.

Gurdon, J. B., R. A. Laskey and O. R. Reeves. 1975. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cell of adult frogs. J. Embryol. Exp. Morph. 34: 93-112.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418: 41-49.

Kubota, C., H. Yamakuchi, J. Todoroki, K. Mizoshida, N. Tabara, M. Barber, and X. Yang. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 990-995.

McCreath, K.J., J. Howcroft, K.H.S. Campbell, A. Colman, A.E. Schnieke, and A.J. Kind. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nature 405:1066-1069.

Onishi, A., M. Iwamoto, T. Akita, S. Mikawa, K. Takeda, T. Awata, H. Hanada, A.C.F. Perry. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. Science 289: 1188-1190.

Park K. W., H. T. Cheong, L. Lai, G. S. Im, B. Kuhholzer, A. Bonk, M. Samuel, A. Rieke, B. N. Day, C. N. Murphy, D. B. Carter, and R. S. Prather. 2001. Production of nuclear transfer-derived swine that expressed the enhanced green fluorescent protein. Anim. Biotechnol. 12(2): 173-181.

Phelps, C. J., C. Koike, T. D. Vaught, J. Boone, K. D. Well, S. H. Chen, S. Ball, S. M. Specht, I. A. Polejaeva, J. A. Monahan, P. M. Jobst, S. B. Sharma, A. E. Lamborn, A. S. Garst, M. Moore, A. J. Demetis, W.

- A. Rudert, R. Bottino, S. Bertera, M. Trucco, T. E. Starzl, Y. Dai, D. L. Ayares. 2003. Production of α -1,3-Galactosyltransferase-Deficient Pigs. *Science* 299: 411-414.
- Polejaeva, I.A., S.-H. Chen, T.D. Vaught, R.L. Page, J. Mullins, S. Ball, Y. Dai, J. Boone, S. Walker, D.L. Ayares, A. Colman, and K.H.S. Campbell. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407: 86-90
- Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod* 1989; 41:414-418.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KHS. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 278:2130-2133.
- Smith, L. C., and I. Wilmut. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40 : 1027-1035.
- Shin T, D. Kraemer, J. Pryor, L. Liu, J. Rugila, L. Howe, S. Buck, K. Murphy, L. Lyons, M. Westhusin. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415:859
- Wakayama, T., A.C. Perry, M. Zuccotti, K.R. Johnson, and R. Yanagimachi. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374.
- Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 320:63-65.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385:810-813.
- Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301:1063-1064.
- Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*. 302: 1179.

表 1.優良種豬體細胞之建立

序號	耳號及性別	冷凍細胞代數	冷凍細胞管數	登錄號 (種號)	種豬場
1	D611-1 ♂	P2	15	162841	願景金來
2	D974-12 ♀	P2	17	169477	願景金來
3	D1213-1	P2	24	166615	願景金來
4	D1127-11	P2	18	147528	願景金來
5	L1885-2	P2	27	162852	願景金來
6	L4001-11	P2	12	149848	願景金來
7	L413-13	P2	21	148991	願景金來
8	D1477-3	P2	18	157226	暉煌
9	D131-11	P2	27	167911	暉煌
10	L400-14	P2	20	159612	暉煌
11	L461-4	P2	18	159626	暉煌
12	D377-1	P2	23	160983	福昌
13	D1665-15	P2	14	171022	福昌
14	D1420-2	P2	23	150884	福昌
15	D720-15	P2	21	163364	福昌
Total			298		

表 2. 以體內成熟豬卵母細胞進行體細胞複製豬產製試驗之結果

Table 2. Trial of somatic cell nuclear transfer using in vivo matured porcine oocytes

Donor cell derived(供核細胞來源)	Landrace boar (L277-10)
No. of oocyte recovered(回收卵母細胞數)	287
No. of enucleated oocytes(去核卵母細胞數)	264
No. of cell injected ooplasm(核移植卵數)	238
No. of activated cloned embryos(激活之複製胚數)	224
No. of cultured cloned embryos(培養之複製胚數)	224
No. of cloned embryos transferred(移置之複製胚數)	223
No. of recipients(受胚豬數)	2
No. of cloned piglets born(出生之複製豬數)	9 (效率：9/223 = 4.0%)

A

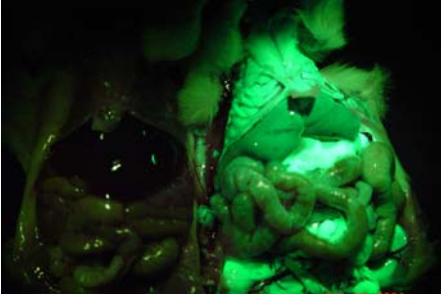


B



圖 1. A 圖為成年優良種公豬之耳成纖維母細胞所複製之成年公豬；
B 圖為成年優良種公豬之耳成纖維母細胞所複製之八頭複製小豬

A



B

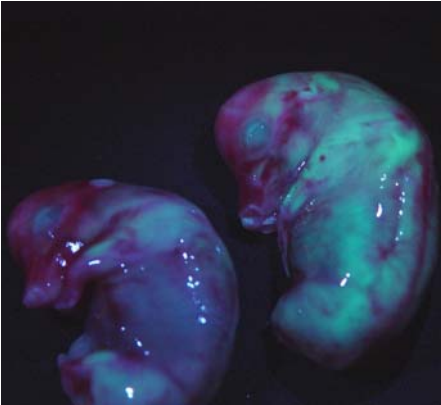
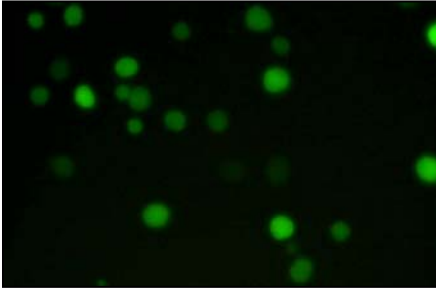


圖 2.綠色螢光基因轉殖小鼠之表現，A 圖左：對照組小鼠；右：表現綠色螢光之基因轉殖小鼠；
B 圖為表現綠色螢光之豬胎兒

A



B

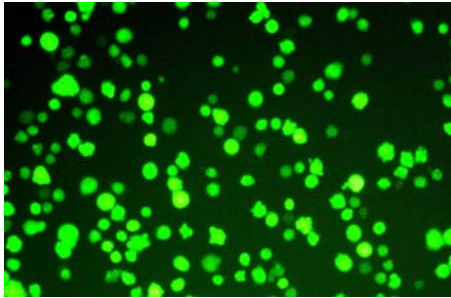
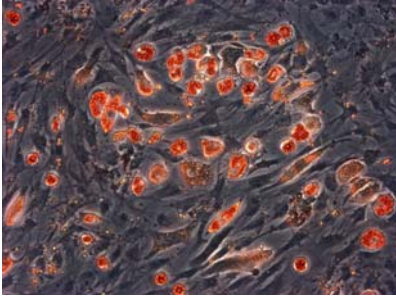


圖 3. A 圖由綠色螢光基因轉殖小鼠之骨髓所分離之純系間葉幹細胞株
B 圖源自 EGFP 基因轉殖豬胎兒之骨髓間葉性幹細胞，每一細胞均表現綠色螢光。

A



B

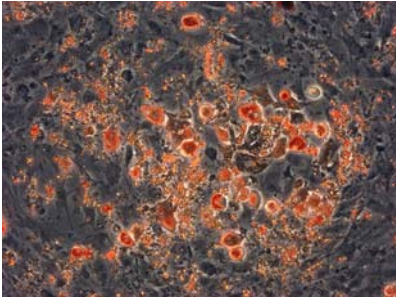


圖 4. 紅色部份為源自骨髓之間葉性幹細胞經誘導分化 6 天(A 圖)及九天(B 圖)後之脂肪細胞