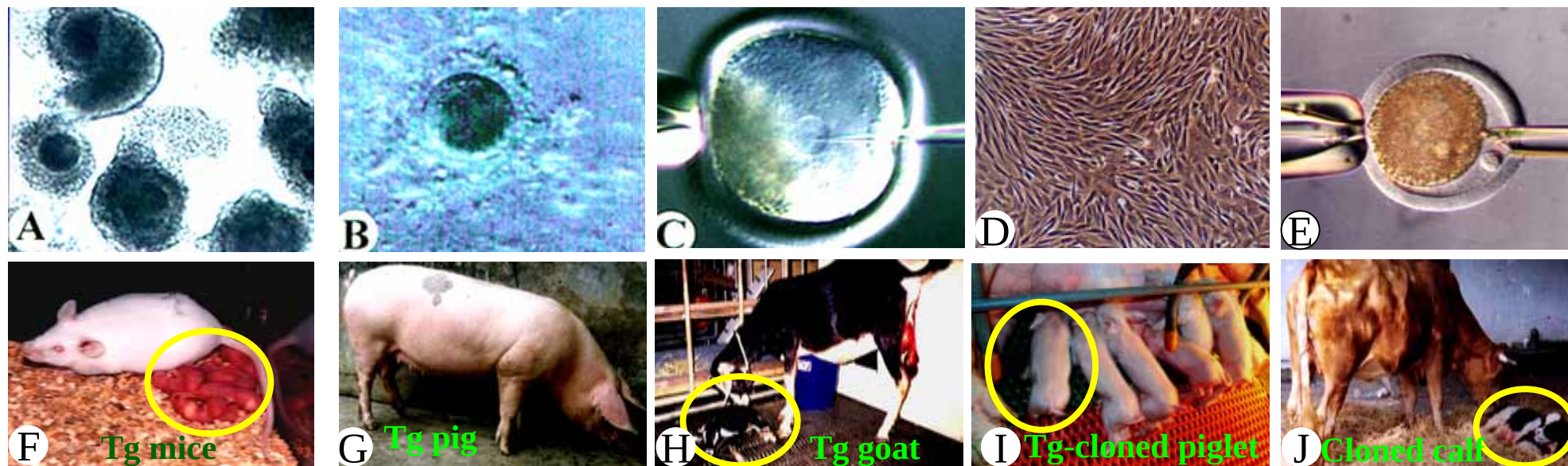


基改動物之現況與前景



—— 吳信志・鄭登貴 ——

國立臺灣大學
畜產學系

什麼是基改動物？

基改動物可被定義為：

- ☆ 動物之**基因體**(genome) 被以人為方式，**加入**(addition) 或**移除**(deletion)一段具功能性之**特定基因序列**；爰此產生之**創始動物**(founder animals)，稱為**轉基因動物**(transgenic animals)，亦即所謂的**基改動物**(gene modified animals)，簡稱**GM動物**。
- ☆ 創始GM基改動物之前述特定基因序列，可經**配種**而傳遞給子代之比例，稱為該**GM動物**之**性腺傳承效率**(germ-line transmitted efficiency)。

為什麼要研發GM動物？

- 改進禽畜之生產性能及禽畜產品之品質

生產性能 (e.g. 乳、肉、蛋及羊毛之產量與禽畜之飼料利用效率 etc.)

生殖性能 (e.g. 產蛋率、受精率、懷孕率、胚存活率、產仔數及育成率 etc.)

健康性能 (e.g. 禽畜對於疾病之易感性及抗病性或免疫力 etc.)

禽畜產品之品質 (e.g. 口感、風味及其營養價值 etc.)

禽畜產品之加工特性 (e.g. 貯存性、保水性及良好之組織結構 etc.)

- 分子牧場 (Molecular pharming ; i.e. molecular farming)

專門飼養基改禽畜做為生物反應器進行生產人醫及獸醫之藥用蛋白質

(e.g. 疫苗、生長因子、凝血因子、抗體…etc.)

專門飼養基改禽畜進行生產民生、環保及國防等工業用之特定蛋白質

(e.g. 各類酵素、膠原蛋白、胎盤素、生物鋼、嬰兒及老人或病人之特定食品…etc.)

- 異體器官移植

生產特定細胞、組織或器官提供進行移植醫療之使用

- 動物模式

提供生物醫學研究之極佳動物模式

(e.g. 發育生物學與癌症、關節炎、心血管循環、肌肉萎縮、愛之海莫及巴金遜氏症… etc.)

(Modified from Brem and Muller, 1994)

為什麼要研發GM動物？

表__、應用不同系統進行生產基因重組蛋白質之比較

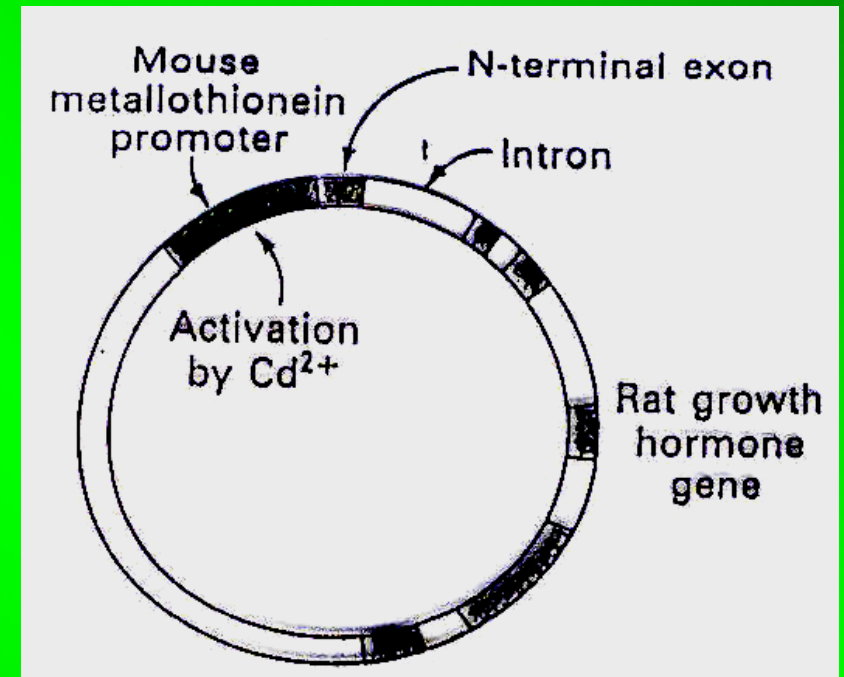
	產 量	可萃取性	生物活性
細菌	++++	++	+
酵母菌	++++	+++	++
真菌	++++	+++	++
基因轉殖植物	++++	++ ?	++
桿狀病毒	++++	+++	+++
哺乳類細胞	+	++++	++++
基因轉殖動物	++++	++++	++++

(Houdebine, 1994)

研發GM動物之重要里程碑

著 者	年 份	重大突破
Lin	1966	首度提出藉由原核基因注射技術進行產製基改小鼠之概念。
Gordon et al.	1980	應用原核注射技術首度獲得基改小鼠之產出。
Brinster et al.	1982	首度將MT-rGH融合基因藉由原核注射技術注入小鼠胚並成功獲得生長快速且體提碩大基改小鼠之出生。
Hammer et al.	1985	藉由原核注射技術首度獲得生長快速基改家畜之成功出生。
Gordon et al.	1987	證明可藉由乳腺特異性表現策略進行藥用重組蛋白之生產。
Simons et al.	1988	產出世界第一頭具備「生物反應器」功能之基改綿羊。
Ebert et al. Wall et al. Krimperfort et al.	1991	第一頭具備「生物反應器」功能之基改乳山羊、基改豬及基改乳牛陸續問世。
	1994	源自基改動物所產生之基改產物開始進入臨床前測試。
	1996	源自基改動物所產生之基改產物開始進入人體臨床測試。
Schneike et al.	1997	第一頭源自動物複製技術產生之基改綿羊問世。
Lee et al.	2003	第一頭源自動物複製技術產生之基改豬問世。
Shen et al.	2004	第一頭源自動物複製技術產生之基改乳牛及基改乳羊問世。

哺乳動物基因轉殖之先驅研究



(Palmiter *et al.*, 1983)



(Pursel *et al.*, 1987)

基改豬攜帶轉殖基因(i.e. *MT-bGH*)之生長性能

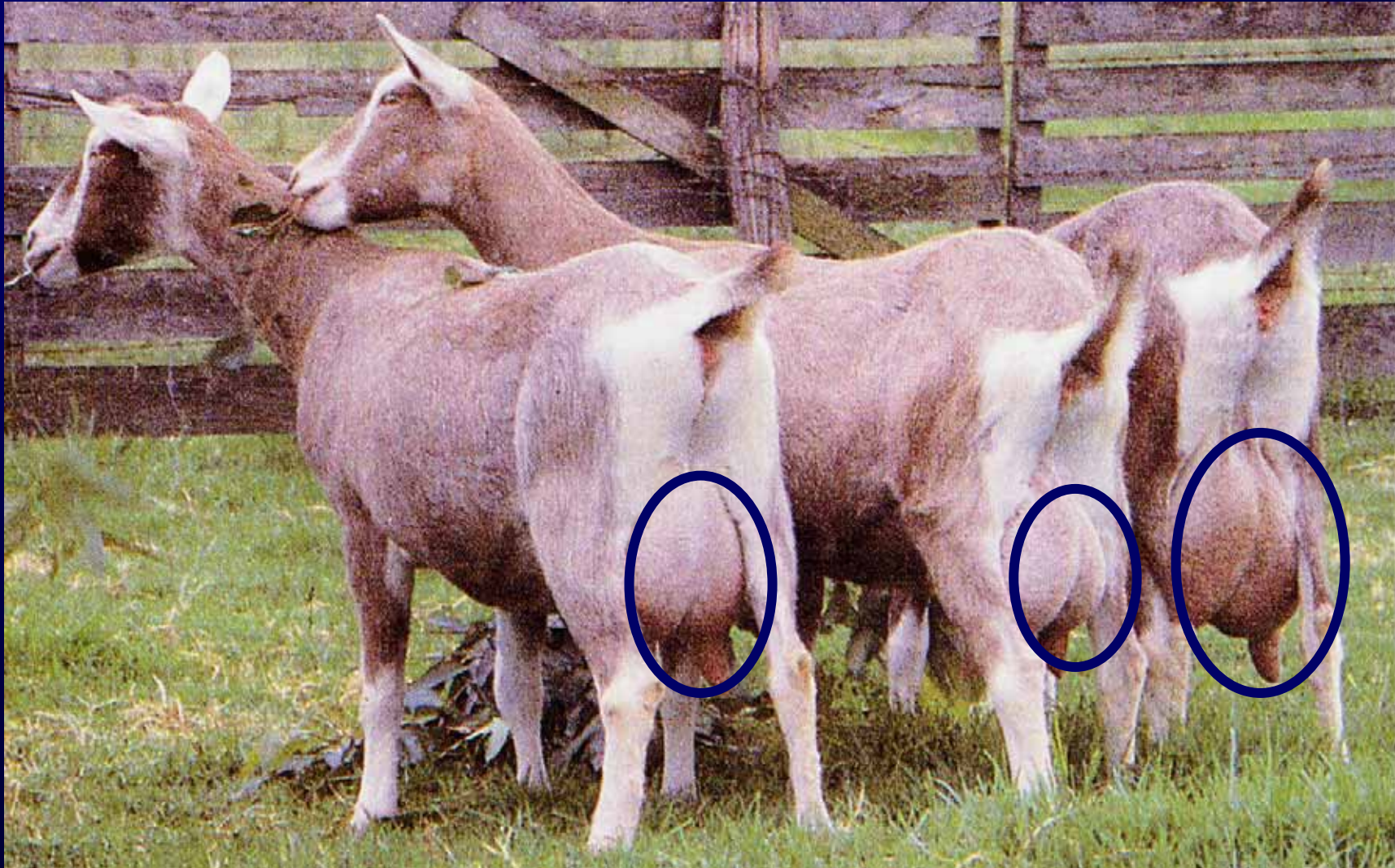
組群	平均隻日增重 (gm)	平均飼料效率 (kg飼料/ kg增重)	備 註
G0			
對照組	743 ± 36	3.12 ± 0.15	1. B.W.=30~60 Kg
轉基因組	690 ± 65	2.62 ± 0.12	2. CP16%
	p = 0.480	p = 0.026	
G2			
對照組	760 ± 24	2.99 ± 0.12	1. B.W.=30~90 Kg
轉基因組	874 ± 30	2.46 ± 0.162	2. CP18% + 0.25% 離胺酸
	p = 0.016	p = 0.026	
G3			
對照組	867 ± 21		1. B.W.=30~90 Kg
轉基因組	933 ± 31	ND	2. CP18% + 0.25% 離胺酸
	p = 0.098		
G4			
對照組	869 ± 44		1. B.W.=30~90 Kg
轉基因組	988 ± 62	ND	2. CP18% + 0.25% 離胺酸
	p = 0.015		

(Pursel *et al.*, 1987) 7

基改動物由Metallothionein啟動子職司包括rGH, hGH及bGH等轉殖基因表現之可能後遺症

1. 胃潰瘍(30%)
2. 關節炎、關節退化(超過90%)
3. 心血管循環、心肌肥厚症
4. 皮膚角化症
5. 肺炎
6. 腎病症候群
7. 新母豬不發情、公豬缺乏性慾 ➡ 低生育力
8. 高血糖(糖尿病)
9. 高死亡率 ➡ 死產(6%)
離乳前死亡(20%)
上市前死亡(30%)
10. 缺乏食慾、飼料消耗量降低

使用哺乳動物乳腺做為生物反應器 生產高價位蛋白質



嘗試經由應用GM動物進行量產醫藥用蛋白質之研發現況

Development of a selected list of proteins produced by transgenic animals			
Proteins/peptides	Companies	Development status	Therapeutic indications
ABX-EGF mAb	Abgenix	Phase I/II Phase II	Psoriasis Rheumatoid arthritis
ABX-RB2 mAb	Abgenix	Preclinical	EGF-dependent cancer
α -1-antitrypsin	PPL Therapeutics	Phase II Phase I	Cystic fibrosis Emphysema
α -1-proteinase inhibitor	Genzyme Transgenics	R&D	Hereditary deficiency
D2E7 antibody	Genzyme Transgenics	R&D	Arthritis
CTKA4 1G antibody	Genzyme Transgenics	R&D	Psoriasis/Rheumatoid arthritis
PRO 542 antibody	Genzyme Transgenics	R&D	HIV/AIDS
Antegren antibody	Genzyme Transgenics	R&D	Neurological disorder
Beta-interferon	Genzyme Transgenics	R&D	Multiple sclerosis

From BioBusiness p60-64, 2001

嘗試經由應用GM動物進行量產醫藥用蛋白質之研發現況 (續)

Development of a selected list of proteins produced by transgenic animals

Proteins/peptides	Companies	Development status	Therapeutic indications
Bile salt stimulated lipase	PPL Therapeutics	Preclinical	Cystic fibrosis
C-1 esterase inhibitor	Pharming	Preclinical	Cystic fibrosis
Calcitonin (salmon)	PPL Therapeutics	Preclinical	Osteoporosis
Collagen	PPL Therapeutics	R&D	Many as a biosealant
Collagen type I	Pharming	Preclinical	Tissue repair
Collagen type II	Pharming	Preclinical	Rheumatoid arthritis
Extracellular superoxide	PPL Therapeutics	Preclinical	Peferfusion injury
Dismutase	PPL Therapeutics	Preclinical	Acute respiratory stress syndrome
Antithrombin III	Genzyme Transgenics	Phase III	Coronary artery bypass grafting
Factor VII	PPL Therapeutics Pharming	Preclinical Preclinical	Bleeding condition Hemophilia B

嘗試經由應用GM動物進行量產醫藥用蛋白質之研發現況(續)

Development of a selected list of proteins produced by transgenic animals			
Proteins/peptides	Companies	Development status	Therapeutic indications
Factor XI	PPL Therapeutics Pharming	Preclinical Preclinical	Hemophilia B Hemophilia B
Fibrinogen	PPL Therapeutics Pharming	Preclinical Preclinical	Tissue glue for trauma and surgical procedures Tissue glue for trauma and surgical procedures
Glucagon-like peptide-1	PPL Therapeutics	R&D	Type-2 diabetes
Glutamic acid decarboxylase (GAD)	Genzyme Transgenics	R&D	Type-1 diabetes
Human growth hormone	Genzyme Transgenics	R&D	Body growth, fat mobilization
Human serum albumin	Genzyme Transgenics PPL Therapeutics	R&D R&D	Plasma expander and drug excipient Plasma expander and drug excipient
Insulin	Genzyme Transgenics	R&D	Plasma expander and drug excipient
Interferon alpha	Genzyme Transgenics	R&D	Cancer and various other disease
Lactoferrin	Pharming	Preclinical	Prevention of gastrointestinal tract
MSP-1 (malaria vaccine)	Genzyme Transgenics	R&D	Malaria

嘗試經由應用GM動物進行量產醫藥用蛋白質之研發現況(續)

Development of a selected list of proteins produced by transgenic animals			
Proteins/peptides	Companies	Development status	Therapeutic indications
MDX-CD4 mAb	Medarex	Phase I	Rheumatoid arthritis
Protein C	PPL Therapeutics	Preclinical	Prevention of deep vein thrombosis
Tissue plasminogen activator	Genzyme Transgenics	R&D	Myocardial infarction and pulmonary embolism

From BioBusiness p60-64, 2001

專供生產**生物鋼(biosteel)**之基改乳山羊

18 JANUARY 2002 VOL 295 SCIENCE www.sciencemag.org

Spider Silk Fibers Spun from Soluble Recombinant Silk Produced in Mammalian Cells

Anthoula Lazaris,^{1*} Steven Arcidiacono,² Yue Huang,¹ Jiang-Feng Zhou,¹ François Duguay,¹ Nathalie Chretien,¹ Elizabeth A. Welsh,² Jason W. Soares,² Costas N. Karatzas¹

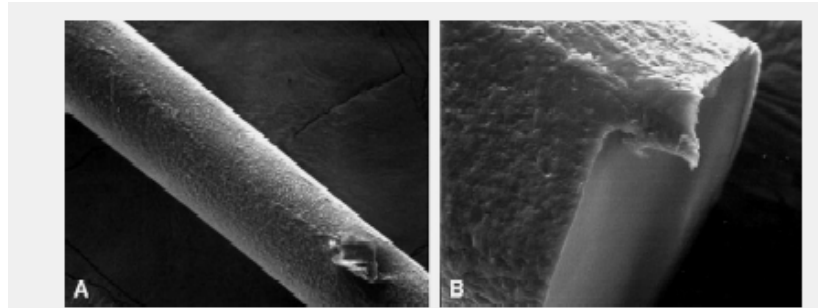


Fig. 7. Scanning electron micrographs of an ADF-3 as-spun fiber. (A) Analysis of fiber surface (magnification, $\times 500$); (B) analysis at a break point to examine the fiber interior core ($\times 2000$).



Contact: Jeffrey Turner, PhD
jturner@nexiabiotech.com

450-424-8910

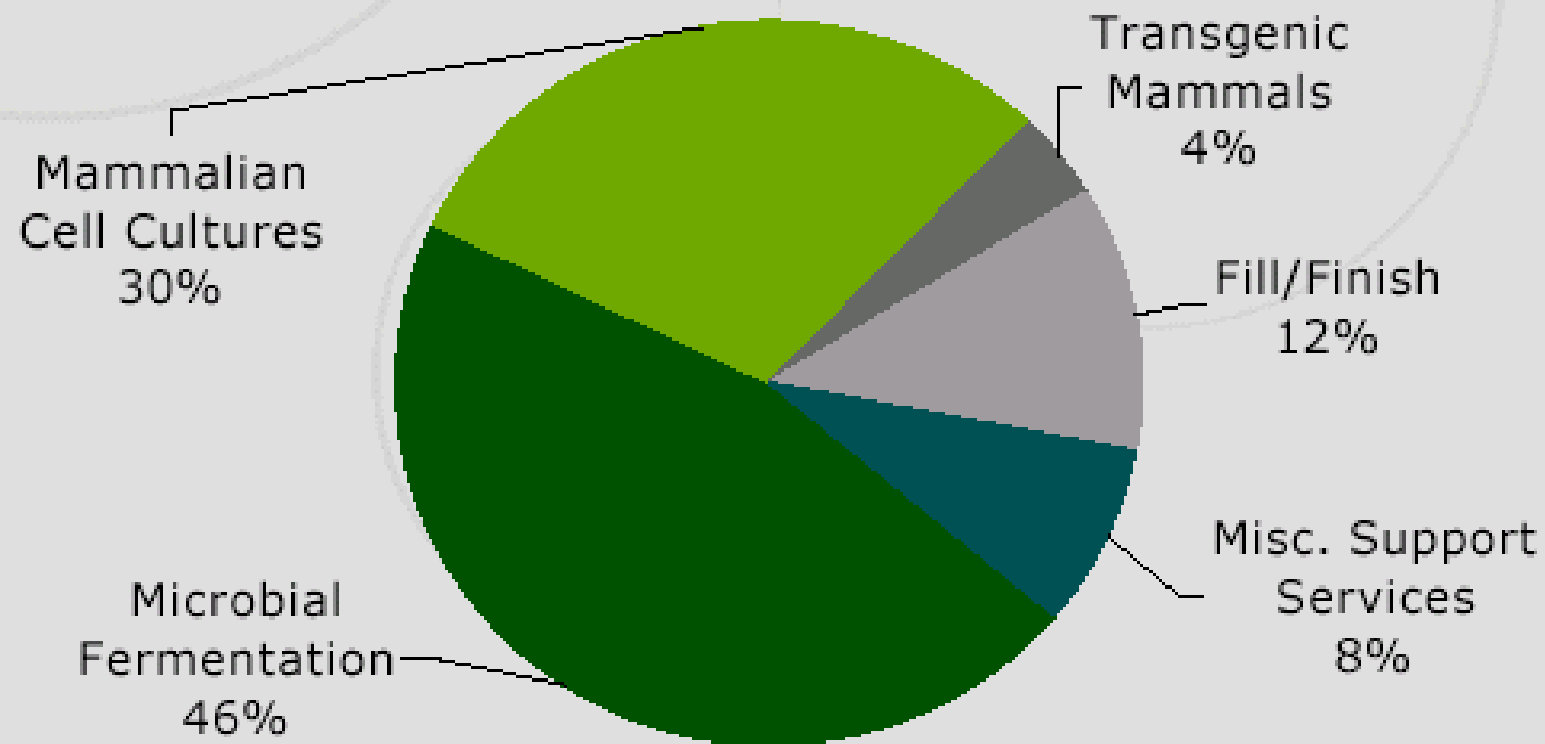
[Nexia Biotechnologies Inc.](http://www.nexiabiotech.com/)

<http://www.nexiabiotech.com/>

Julie Begin checks on goats at a **Nexia farm in Quebec**. The goats' milk contains proteins that are spun into **spider silk** for applications in the medical, military and industrial performance fiber markets.

Worldwide Contract Manufacturing Market

2000 Market USD 1.0 billion



Projected to be over USD 1.3 billion by 2002

From Lonza com. (2002)

源自基改家畜生產重組藥用蛋白之潛在商機

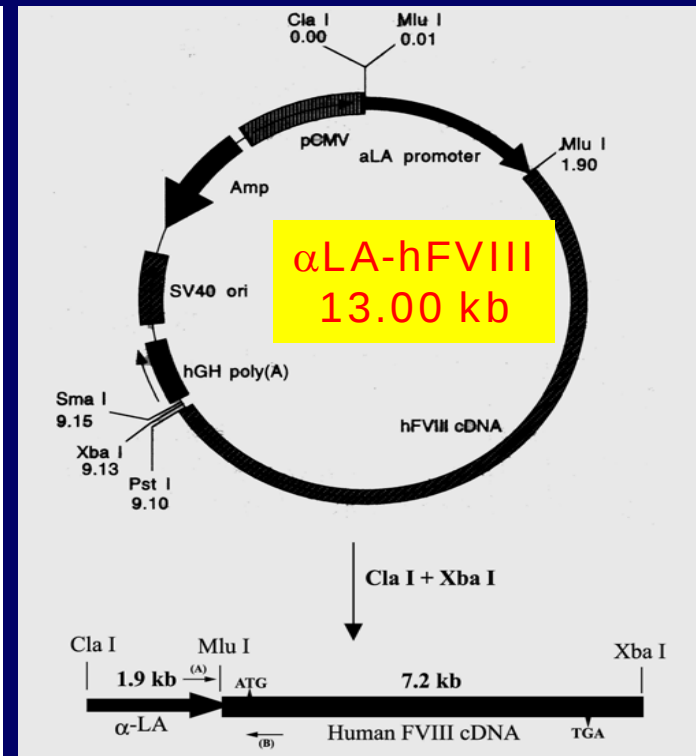
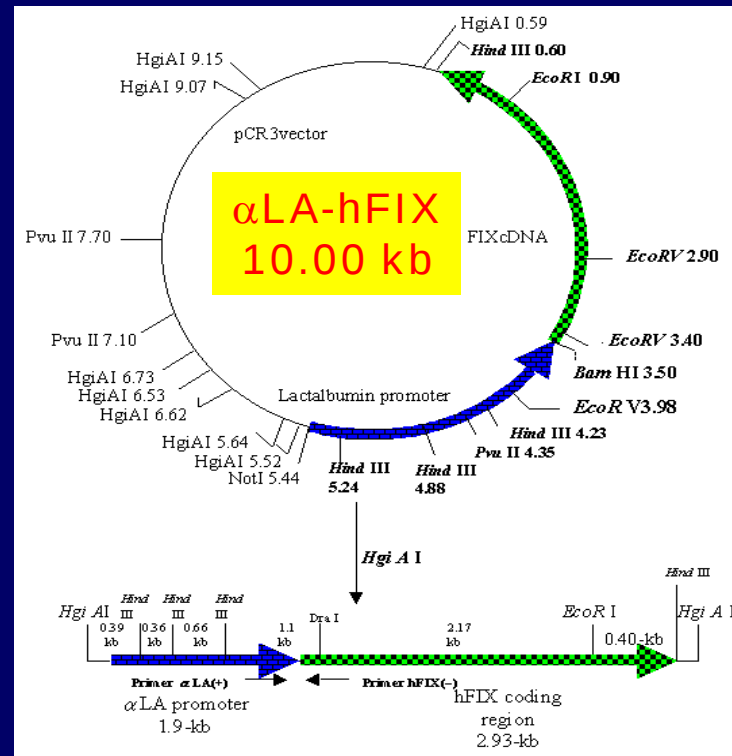
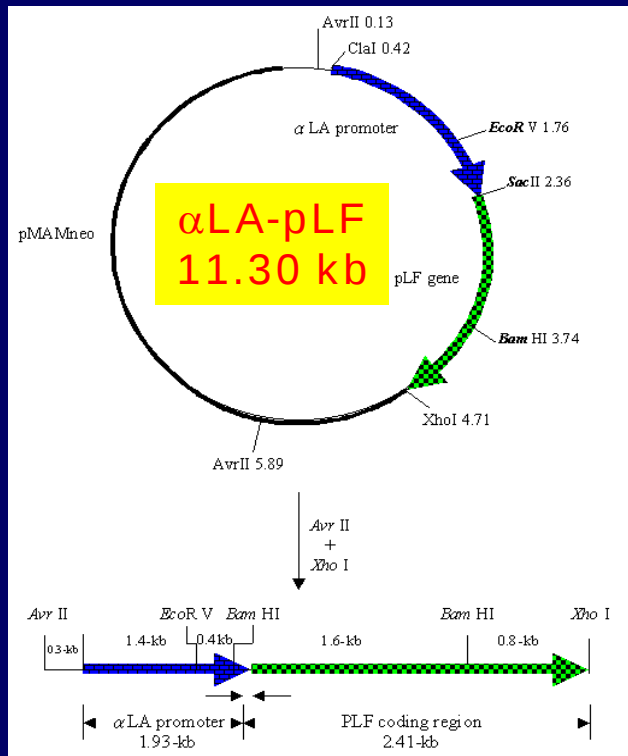
類別	藥用蛋白						
	F-	F	GC	蛋白質C	抗凝血素	血纖維蛋白	血漿蛋白
需求量估計 (kg/year)	0.3	4	10	10	21	150	315×10 ³
目前市價 (US\$/gram)	2.9 × 10 ⁶	40,000	100,000	100,000	7,000	1,000	3.56
估計全球, 市場價值 (10 ⁶ ×US\$/year)	870	160	1,000	100	150	150	1,120

Wall, 1996

國內對GM家畜研究之目標：

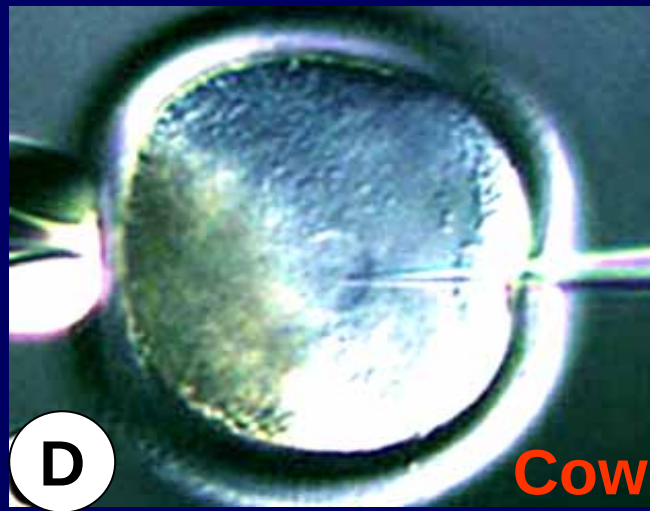
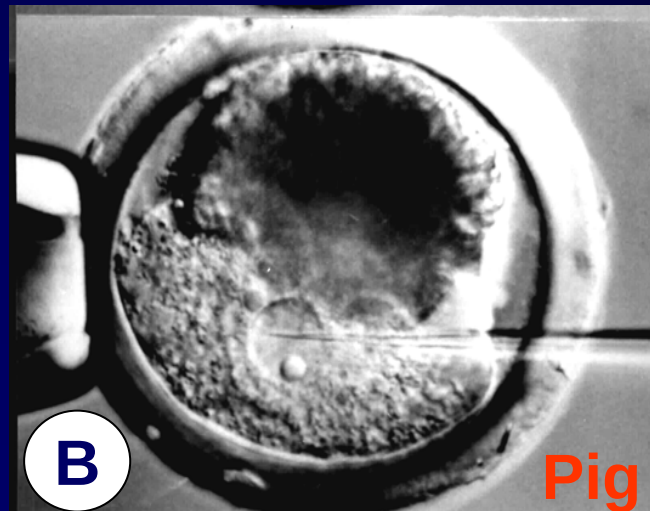
1. 藉由基因轉殖技術，提高母豬乳中豬乳鐵蛋白之含有濃度，從而增強哺乳仔豬之抗病能力，達成有效預防仔豬下痢之目的。
2. 建立醫藥分子牧場(molecular pharming)，進行量產醫藥用蛋白(例如：人類凝血第八、第九因子及過敏原等蛋白)，俾使我國畜牧產業，得以順利轉型成為生物科技產業。
3. 產製帶有人類重要抗原(如白血球表面抗原、補體活化抑制因子)等基因之基改豬，俾提供異體器官移植之使用。

轉殖基因構築具有乳腺組織特異性表現之啟動子序列

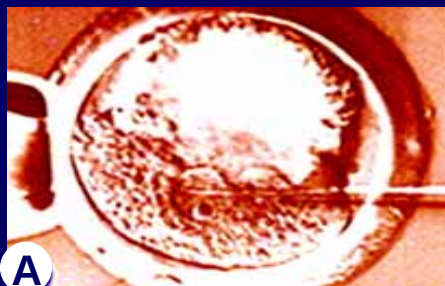


目前用以產製GM動物之有效方法

- ☆ DNA 顯微注射法 (DNA microinjection method)
- ☆ 體細胞核移植法 (Somatic nuclear transfer method)
- ☆ 反轉錄病毒載體感染法 (Retrovirus vector infection method)
- ☆ 胚幹細胞媒介法 (Embryonic stem cell mediated method)
- ☆ 精子媒介法 (Sperm mediated method)
- ☆ 電穿孔法 (Electroporation method)
- ☆ 微脂體轉染法 (Liposome transfection method)
- ☆ 慢病毒載體感染法 (Lentiviral vector infection method)



經由基因顯微注射技術將轉殖基因逕行注入新鮮受精卵之原核內



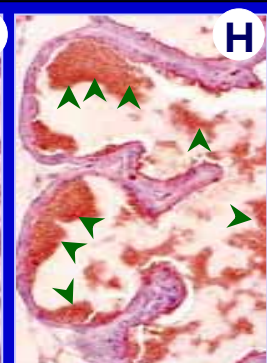
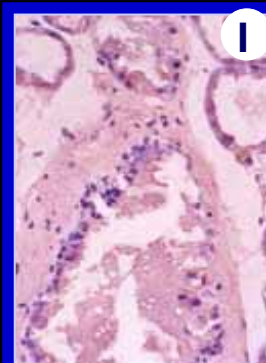
A 應用顯微注射法將外源基因注入豬胚之原核內



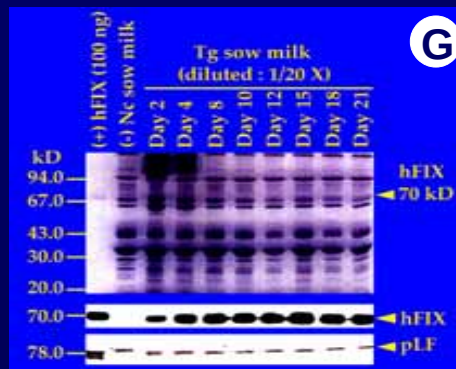
B 將基因注射後之豬胚移置於適當之受胚豬



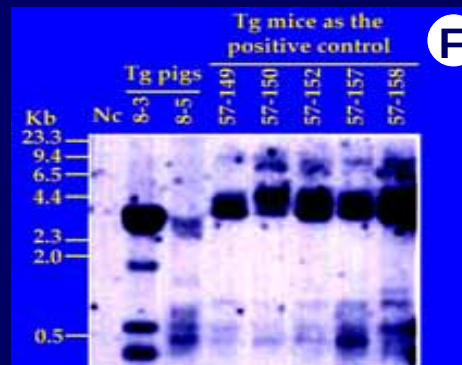
源自原核基因注射產生之基改豬



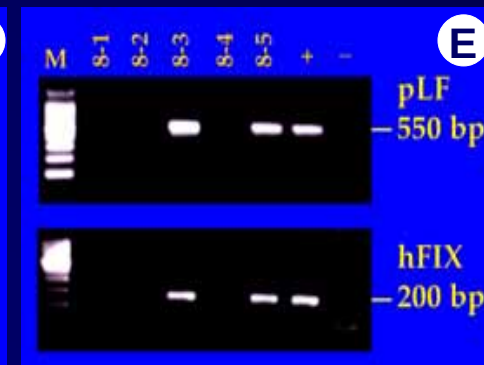
免疫組織化學鑑定



西方雜合分析結果



南方雜合分析結果

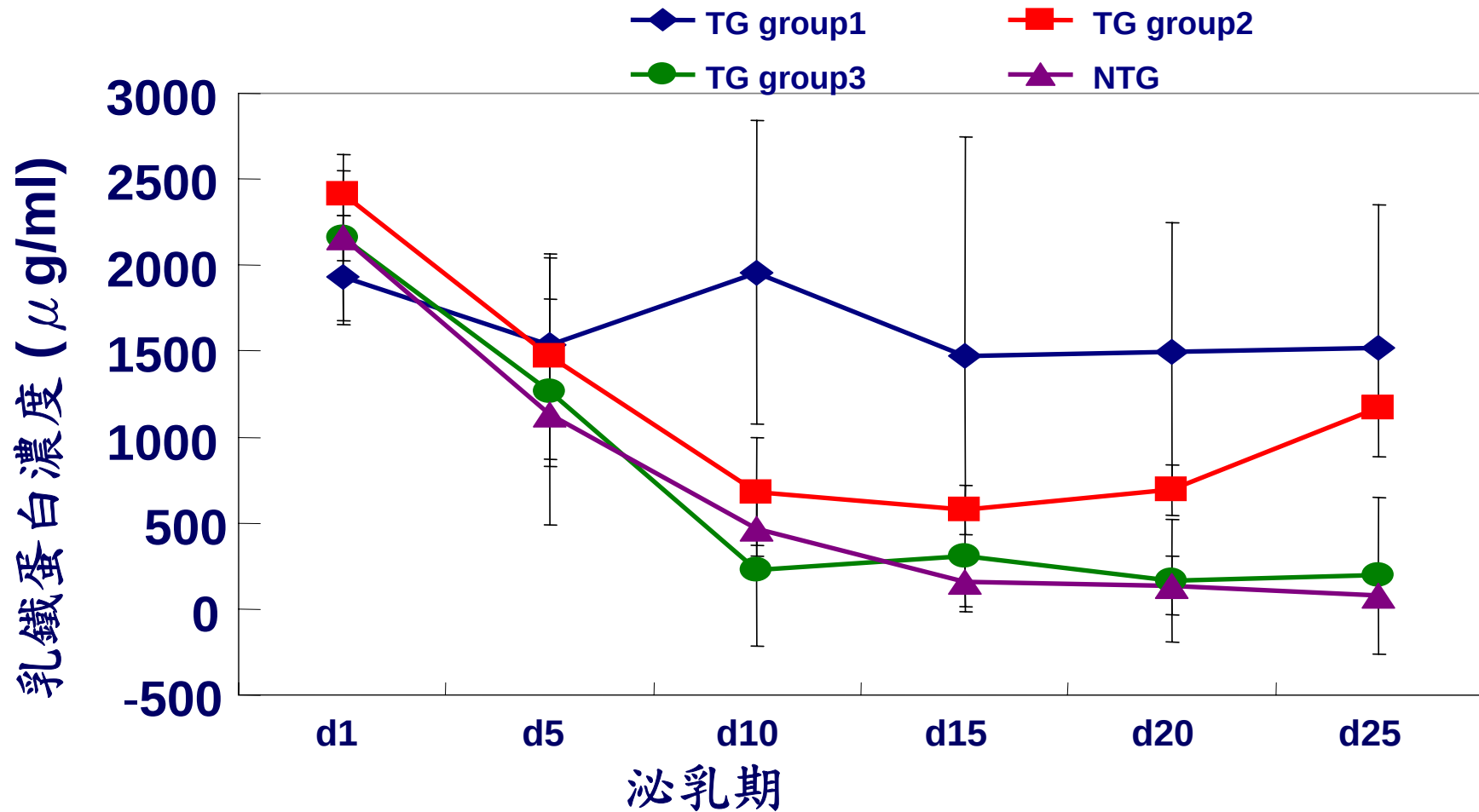


PCR分析結果

應用基因顯微注射技術產生同時攜帶有人類凝血第九因子(α LA-hFIX)及豬乳鐵蛋白(α LA-pLF)之雙基因之基改豬

源自轉基因小鼠及轉基因豬所分泌乳汁中含有人類 凝血第九因子(rhFIX)之濃度及其凝血活性

凝血第九因子 來源	受檢之 動物數(n)	乳中之rhFIX濃度 ($\mu\text{g/ml}$, mean $\pm$ SD)	凝血活性 (%, mean $\pm$ SD)
Tg 小鼠乳 (No.61)	4	45.64 $\pm$ 16.32	9.15 $\pm$ 0.21
對照組小鼠乳	3	0	0
Tg母豬乳 (No.8-3)	16	408.34 $\pm$ 55.0	14.18 $\pm$ 2.45
對照組母豬乳	3	0	0



攜帶 $\alpha\text{LA-pLF}$ 之基改母豬在全程二十五日泌乳期間
乳中含有乳鐵蛋白濃度之變化

攜帶乳鐵蛋白基因第一代基改豬之繁殖性能

母豬耳號	分娩窩數	分娩活仔總數	性腺傳承率(%)	育成率(%)
Y064-11	4	35	11.4	100
Y078-11	4	33	63.6	87.9
Y076-12	4	40	55.0	100
Y111-14	4	41	48.8	100
Y111-16	2	12	66.7	100
Y064-10	3	29	55.2	100
Y090-15	4	41	68.3	100
Y144-11	3	28	60.7	100
合計或	28	269/28	136/269	265/269
平均		9.6/窩	50.6	98.5

轉殖基因 α LA-hFIX 在基改豬性腺之傳承效率

由ATIT自攜帶 α LA-hFIX之原有基改豬擴增而來

F0

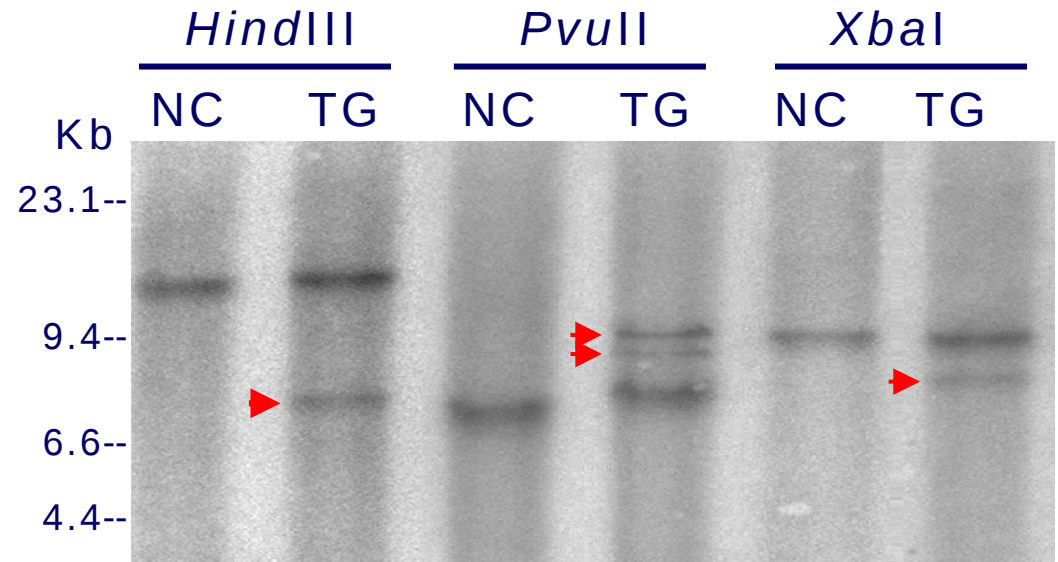
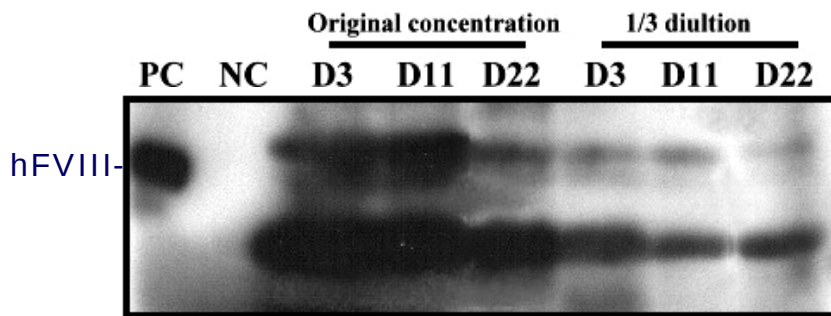
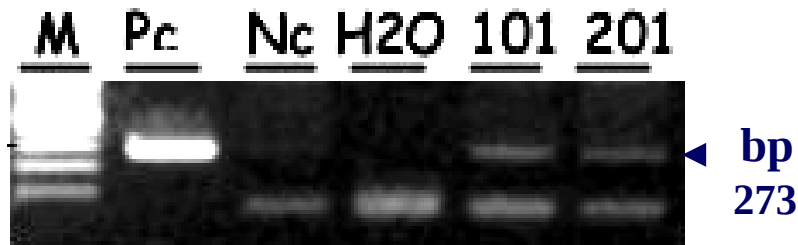
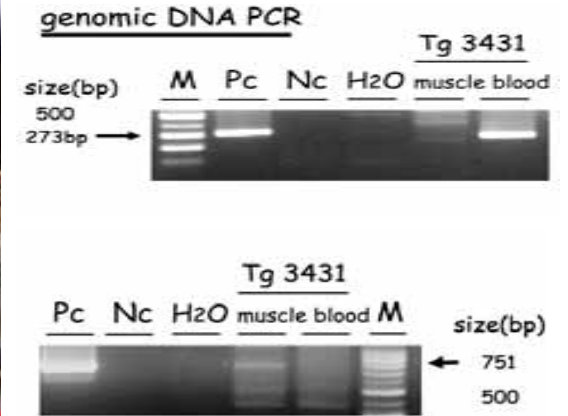


F0



代數 項目	F0	F1	F2	F3	F4	F5
生產 畜群	0	0	8	36	21	8
性腺 傳承 (含基 因豬 比例)			+	+	+	+
			(54%)	(54%)	(57%)	(43%)

α LA-hFIX基改公豬冷凍精液庫存650劑



圖一. 源自基因顯微注射技術產生帶有人類凝血第八因子(α LA- hFVIII)之基改乳山羊

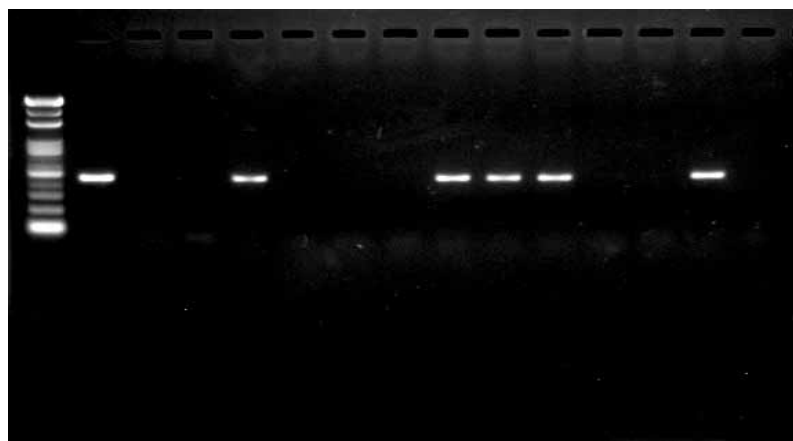
表__。 α LA-hFVIII 基改小鼠乳汁中之hFVIII含量及其凝血活性

Tg小鼠 編號	泌乳期別及 泌乳階段(L/D)	凝血活性 (U/ml)*	hFVIII濃度 (μ g/ml)
aLAF15 (Fo) (n=1)	L1/D7	4.82 $\pm$ 0.43	22.84 $\pm$ 1.65
	L1/D12	7.11 $\pm$ 0.76	30.58 $\pm$ 1.37
	L1/D19	3.60 $\pm$ 0.51	19.87 $\pm$ 0.96
aLAF36 (F1) (n=4)	L1/D7	6.38 $\pm$ 1.85	29.26 $\pm$ 3.58
	L1/D17	5.64 $\pm$ 2.66	24.92 $\pm$ 3.04
	L2/D7	13.41 $\pm$ 2.87	50.21 $\pm$ 5.73
	L2/D17	9.46 $\pm$ 2.04	40.84 $\pm$ 4.91
aLAF25 (F1) (n=3)	L1/D8	11.28 $\pm$ 2.33	46.33 $\pm$ 4.57
	L1/D15	8.72 $\pm$ 1.79	32.92 $\pm$ 3.97
	L1/D21	1.56 $\pm$ 0.24	15.08 $\pm$ 4.84

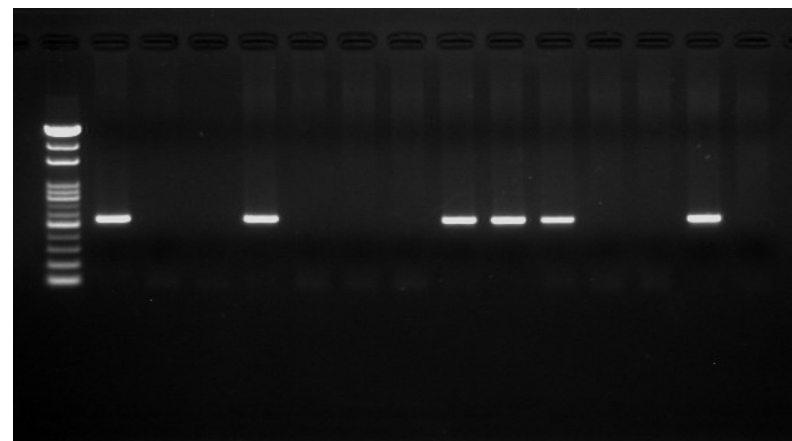
* 每個“U”相當於正常人每毫升血漿中含有之凝血第八因子濃度(約200 ng)；
表中數據各為二次獨立測試所獲得之平均值。



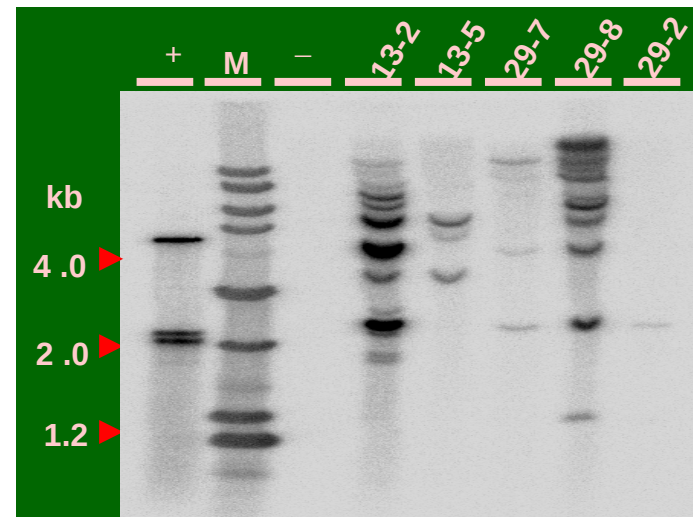
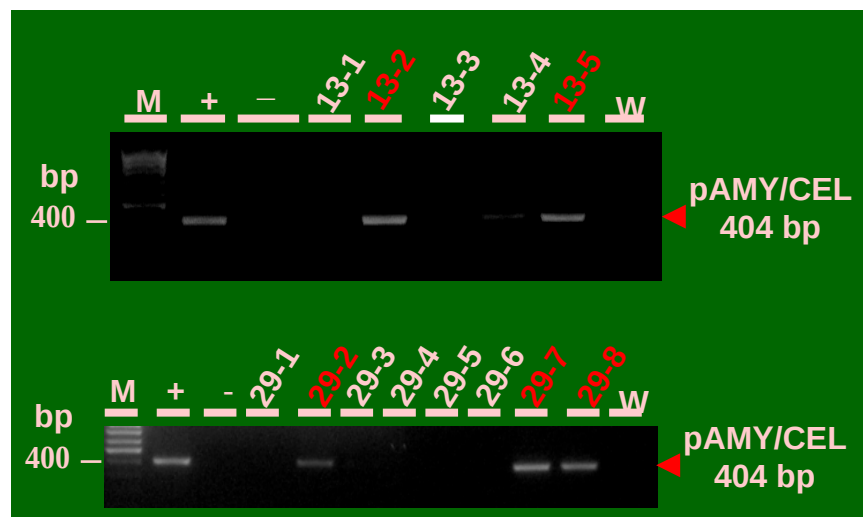
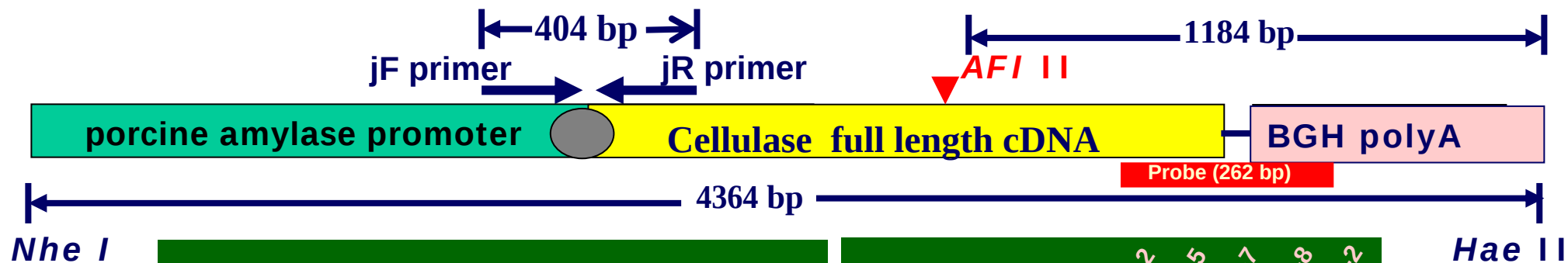
M + - H₂O 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



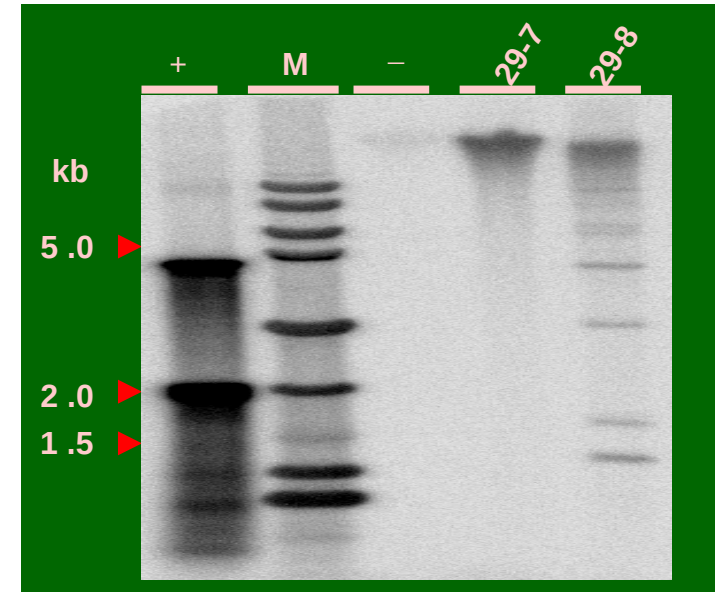
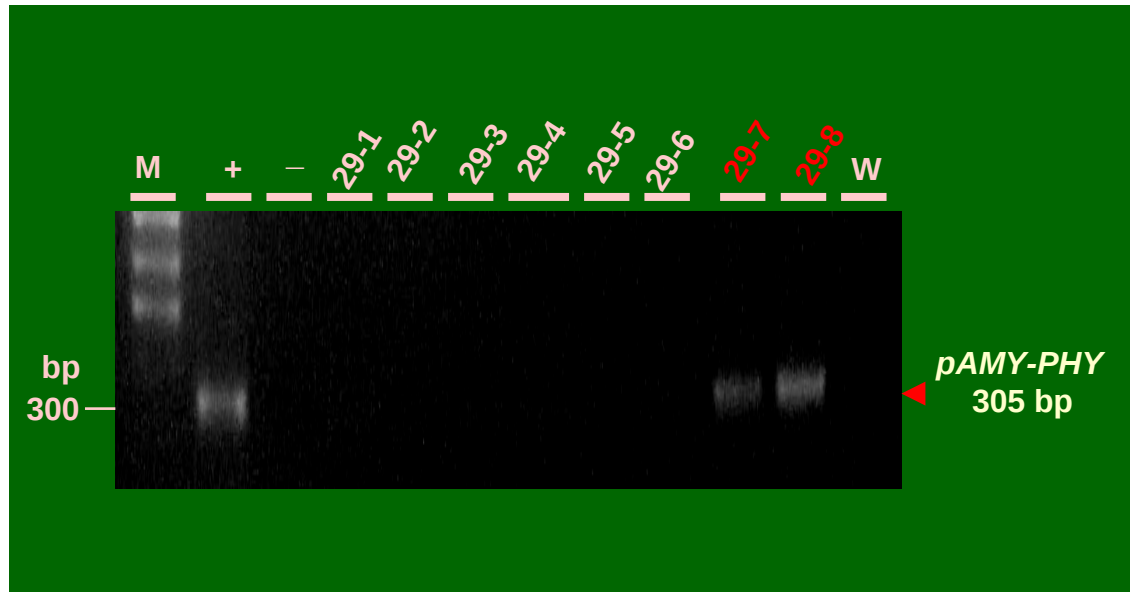
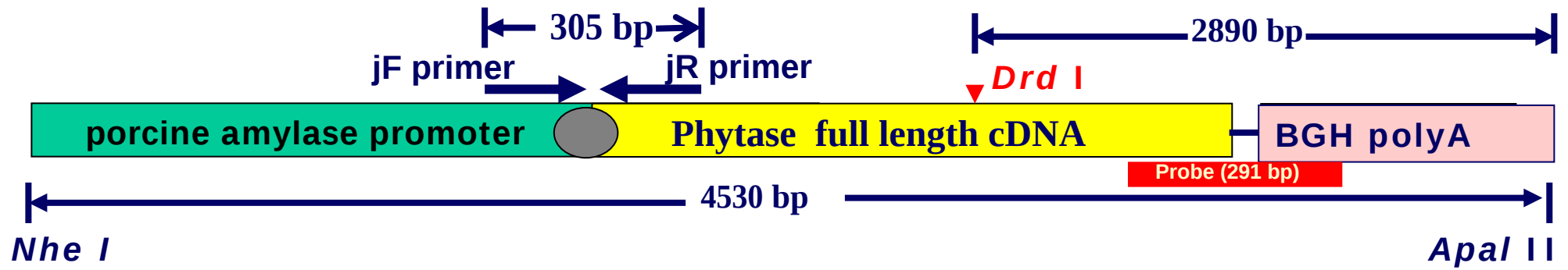
M + - H₂O 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



圖__。豬乳鐵蛋白及人類凝血第八因子基改豬(No. 121-02A)後代之PCR分析結果。



圖__。攜帶纖維素酶(*pAMY-CEL*)及植酸酶(*pAMY-PHY*)基因之基改豬



圖__．攜帶纖維素酶(*pAMY-CEL*)及植酸酶(*pAMY-PHY*)基因之基改豬

供異體器官移植(Xenotrsplantation)用之基改豬

1. 試圖產製帶有 **hDAF** 之基改豬，俾克服異體器官移植後經常面臨之**超級性排斥(hyperacute rejection)**問題；
2. 試圖產製帶有 **HLA-II**之基改豬，俾獲得更具人性化之豬器官，可提供異體器官移植之使用。

(Dr. Chin-fu Tu, ATIT)

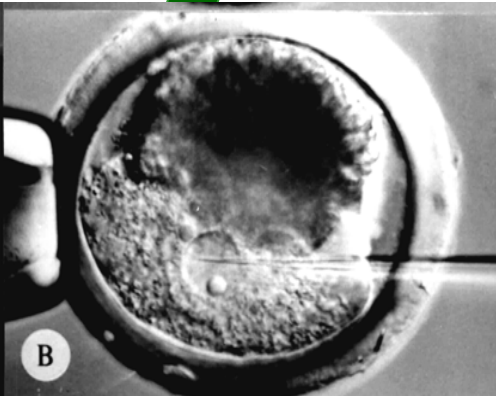
表__。攜帶人類重要抗原包括白血球表面抗原(*HAL*)及補體活化抑制因子(*hDAF*)等基因之基改豬，可提供進行異體器官移植之使用

轉殖基因	親代GM豬 編號	GM 豬之 出生日期	性別	轉殖基因之性腺傳承情形
補體活化抑制因子(<i>hDAF</i>)：				
<i>CMV-hDAF</i>	Y116-12A	4/15/99	♀	已確認具有性腺傳承(F1)
	Y167-10A	5/28/99	♀	已確認具有性腺傳承(F1)
白血球表面抗原(<i>HAL</i>)：				
<i>HAL-DP A1+B1</i>	Y113-7&-8	10/18/96	♂ / ♀	已確認具有性腺傳承(F3)
<i>HAL-DQ A1+B1</i>	Y122-02A	4/21/99	♂	已確認具有性腺傳承(F1)
<i>HAL-DQ A1</i>	Y215-10A	6/30/00	♀	性腺傳承待確認
<i>HAL-DR B1</i>	L218-12A	7/8/99	♀	已確認具有性腺傳承(F1)
<i>HAL-DR A1+B1</i>	D146-13A	4/30/00	♀	性腺傳承待確認

(Dr. Chin-fu Tu, ATIT)

雖然我們務必立法禁止複製人類，惟亦宜立法允許應用複製技術進行細胞、組織及器官工程等相關研究，俾因應器官移植之所需

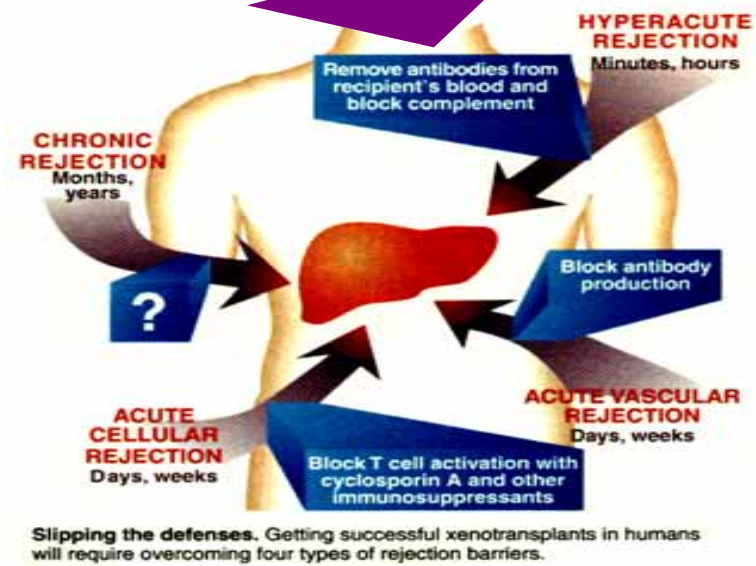
產製帶有免疫排斥等
相關基因之基改豬

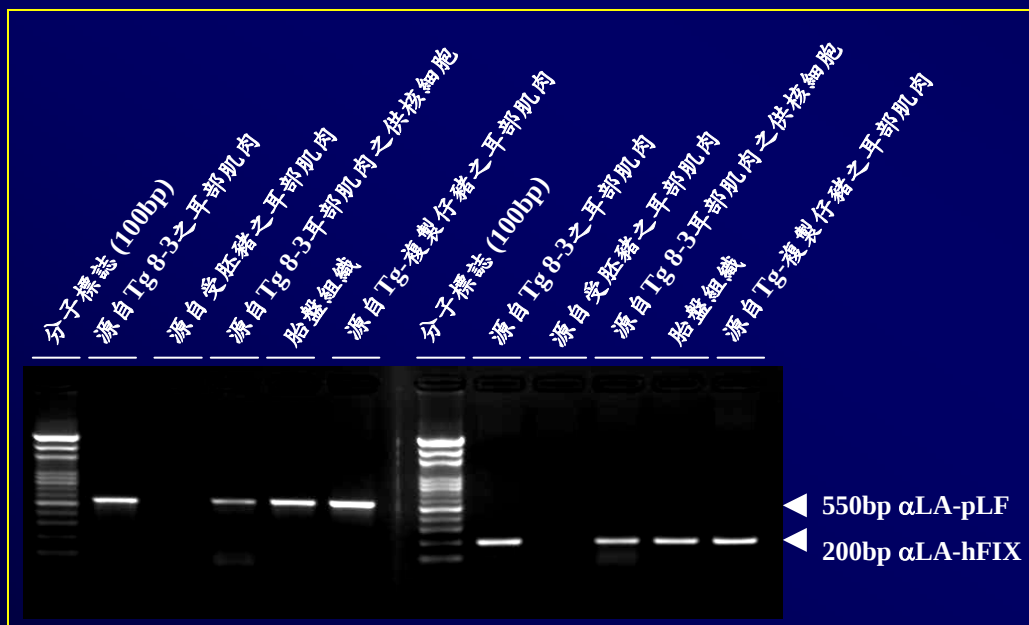
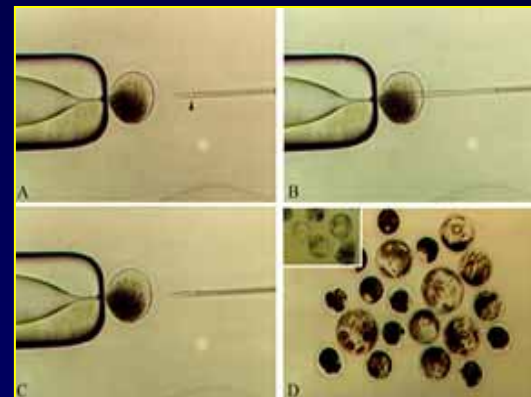
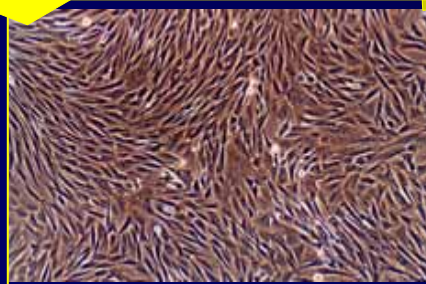


產生擬人化之細胞
、組織或器官提供人類
進行異體移植之使用



攜帶人類HLA-DP基因之基改豬



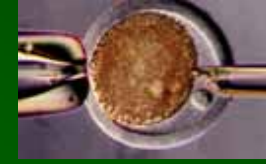
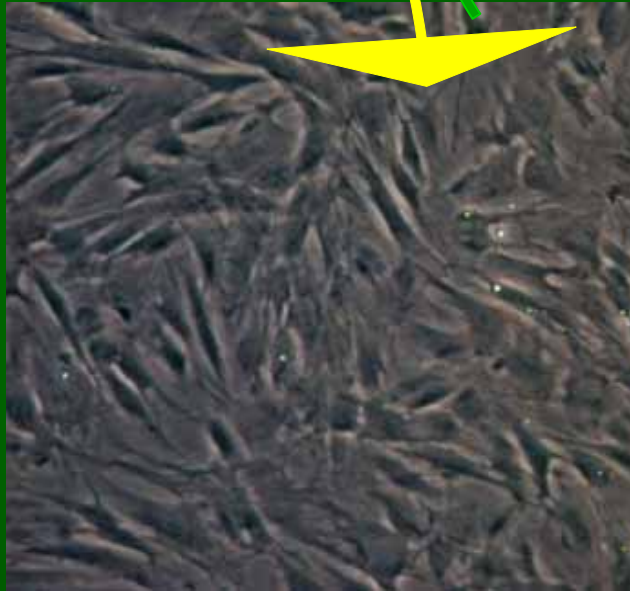


圖_ 源自攜帶有 $\alpha LA-pLF$ 及 $\alpha LA-hFIX$ 基改豬 Tg 8-3 耳部肌肉纖維母細胞經核移置陸續獲得基改複製仔豬之出生

源自成年母牛耳部肌肉
之纖維母細胞先於體外
轉染 α LA-FVIII後再提
供做為供核細胞

核移殖

源自核移殖胚
所產生之複製
活仔牛



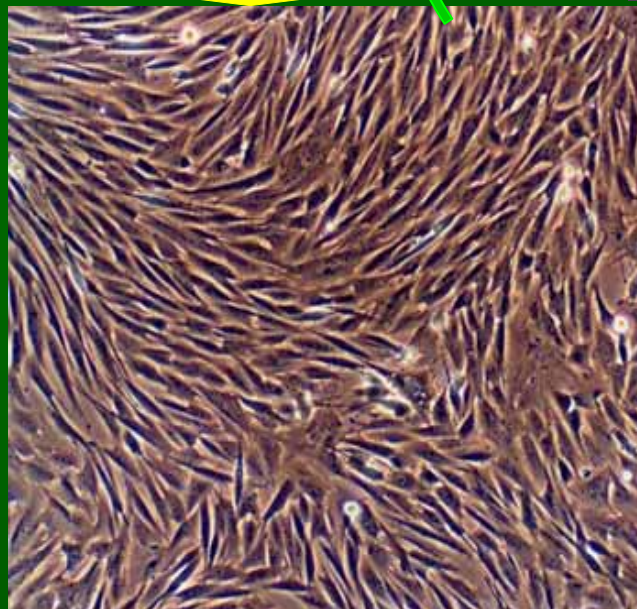
圖__。應用源自成年荷蘭種乳牛耳部肌肉纖維母細胞業經轉染人類凝血第
八因子之基因後再提供進行核移殖所獲得之基改乳牛。

(Shen et al., 2003)

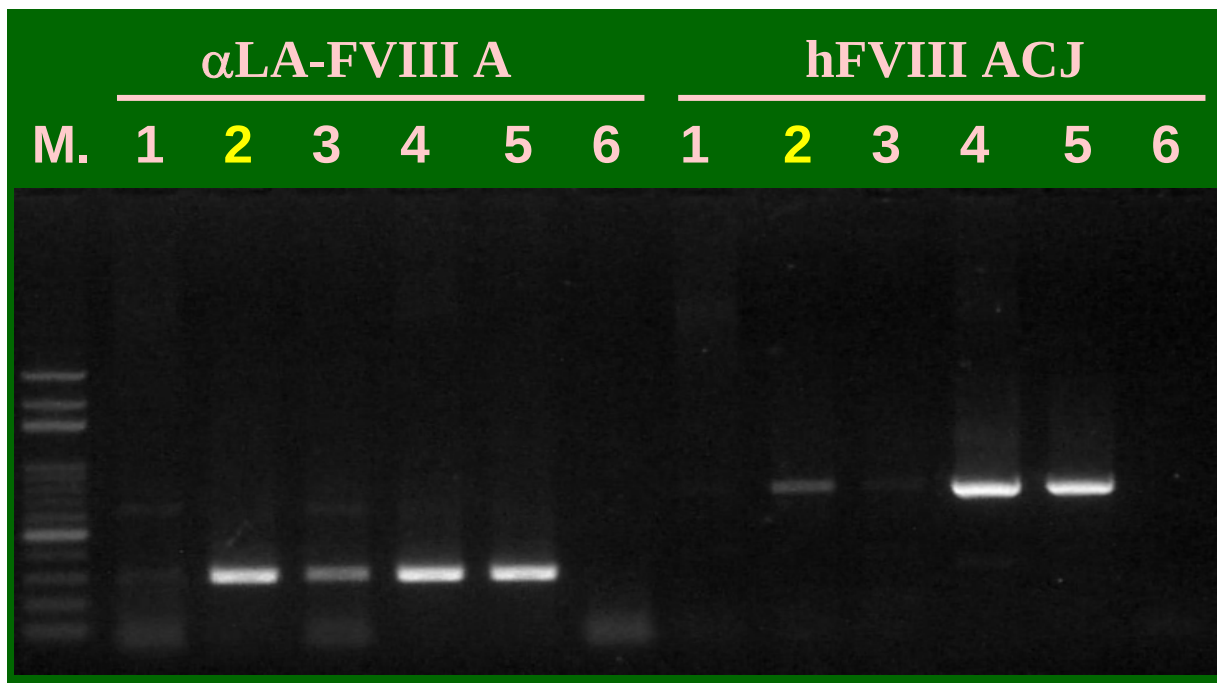
源自成年乳山羊耳部肌肉之纖維母細胞先於體外轉染 α LA-FVIII後再提供做為供核細胞

核移植

源自核移植所產生之複製活羔羊



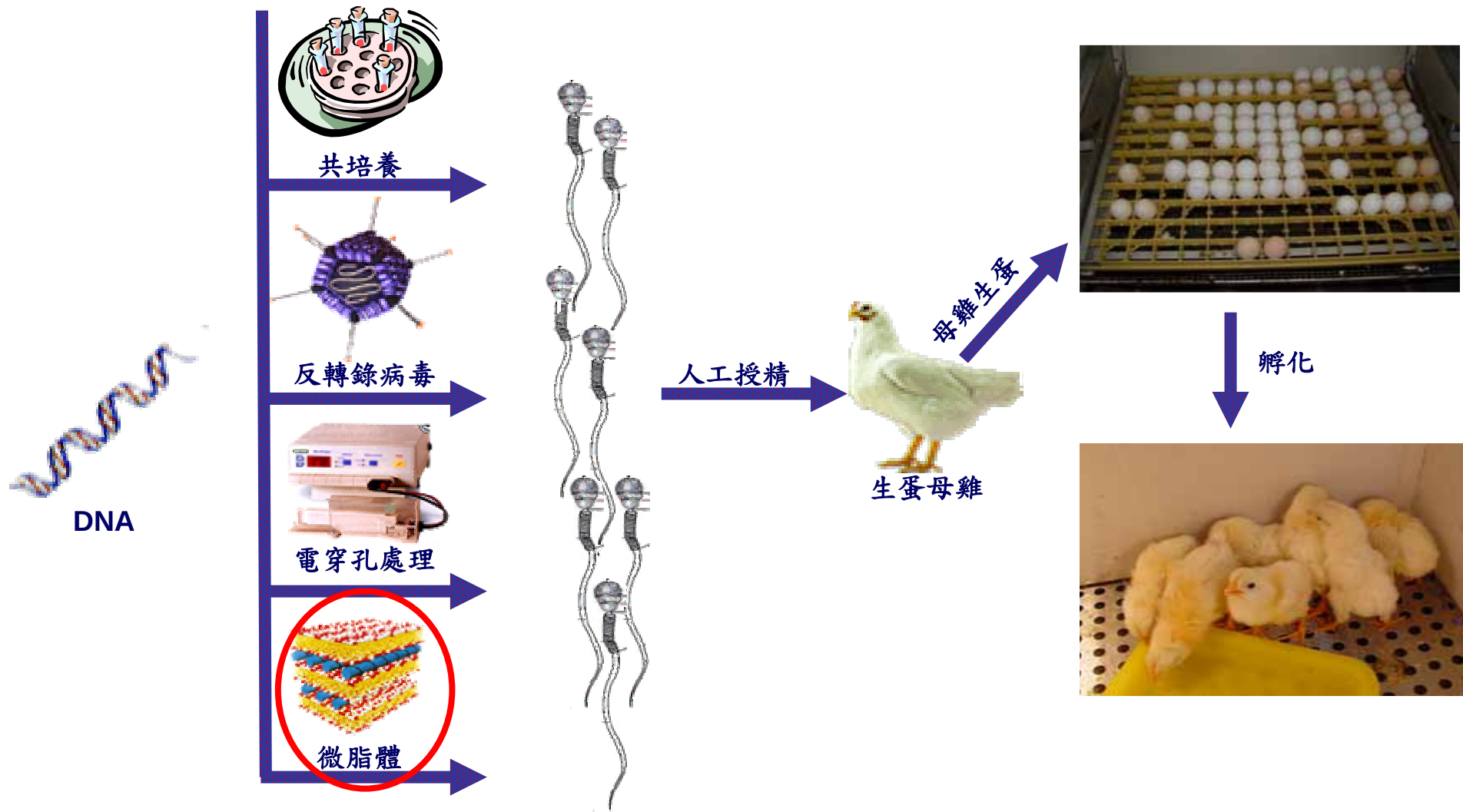
圖__。應用源自成年乳山羊耳部肌肉業經轉染人類凝血第八因子之基因後再提供進行核移植所獲得之基改乳羔羊。



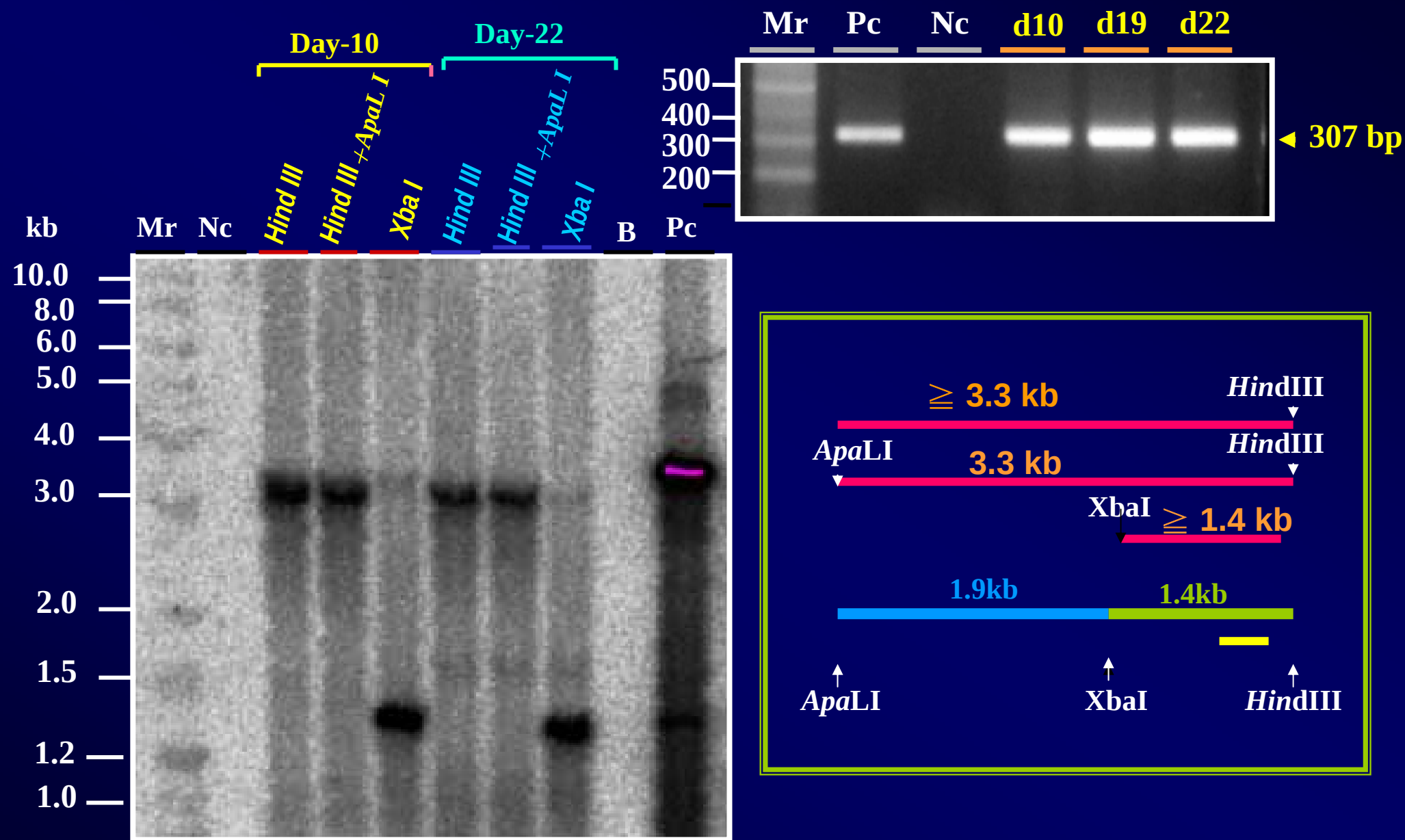
Mr. 100-bp DNA ladder

- 1: Cloned cow (NTG-3) 500ng DNA
- 2: Cloned cow (NTG-4) 600ng DNA
- 3: Cloned cow (NTG-6) 500ng DNA
- 4: Donor cells mixture 100ng DNA
- 5: Cloned goat (NTG-1) 500ng DNA
- 6: Recipient cow 620ng DNA

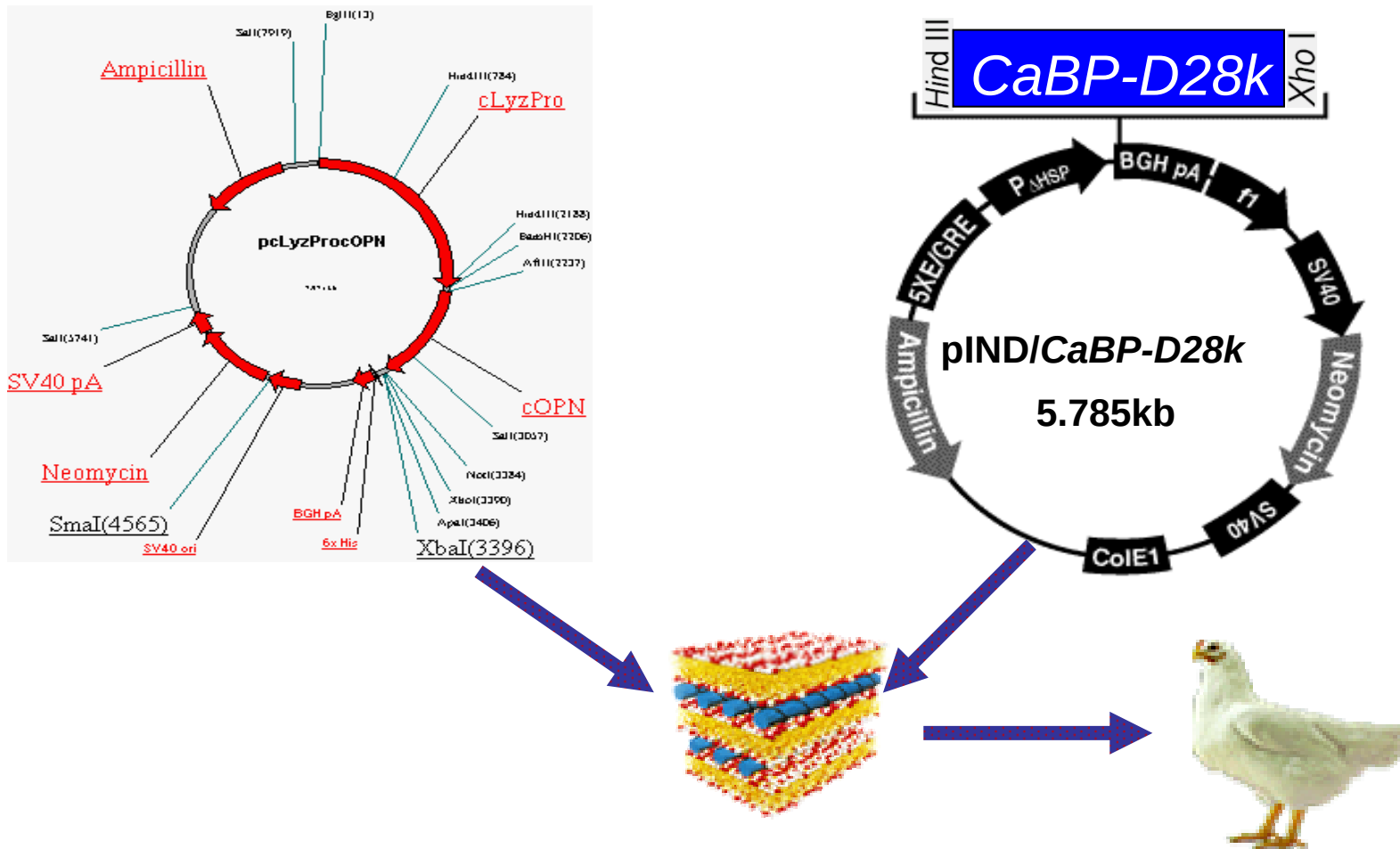
圖__。複製之基改乳牛及基改乳山羊經PCR分析結果初步證明確實帶有人類凝血第八因子之基因。



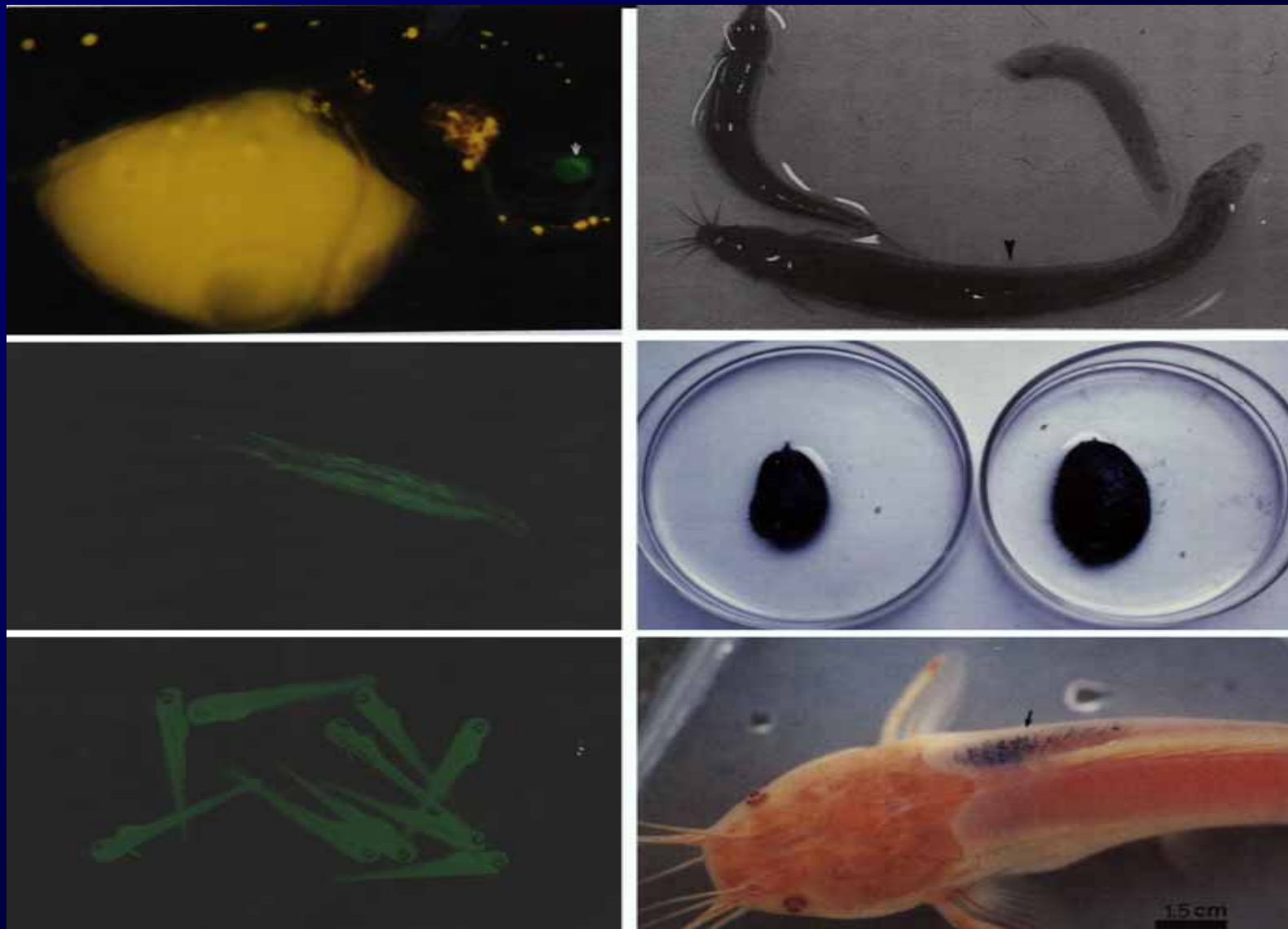
圖__．藉由**微脂體**攜帶轉殖基因之策略進行產製基改雞



圖__．經由PCR及Southern blot 證實藉由微脂體轉染策略將轉殖基因EGFP注入公雞睪丸後在取其精子進行人工授精確可從而產生攜帶該基因之基改雞



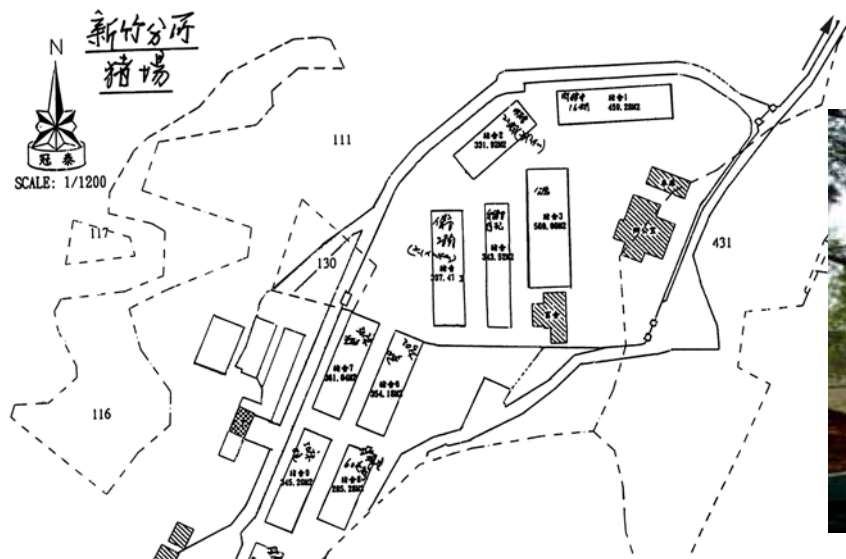
圖__。 將蛋殼強度有關之基因 *calcium binding protein* 與 *Osteopontin* 藉由微脂體之協助，冀能順利獲得轉基因雞之產生。



圖__．國內藉由精子載體法與(或)顯微注射法成功產製之基改水產動物

(台大生科院分子與細胞生物所蔡懷楨教授提供) 41

基改家畜禽隔離田間試驗場



場區入口



場區鳥瞰



SPF雞舍



豬舍參觀走道



分娩舍



公豬及待配舍



保育舍



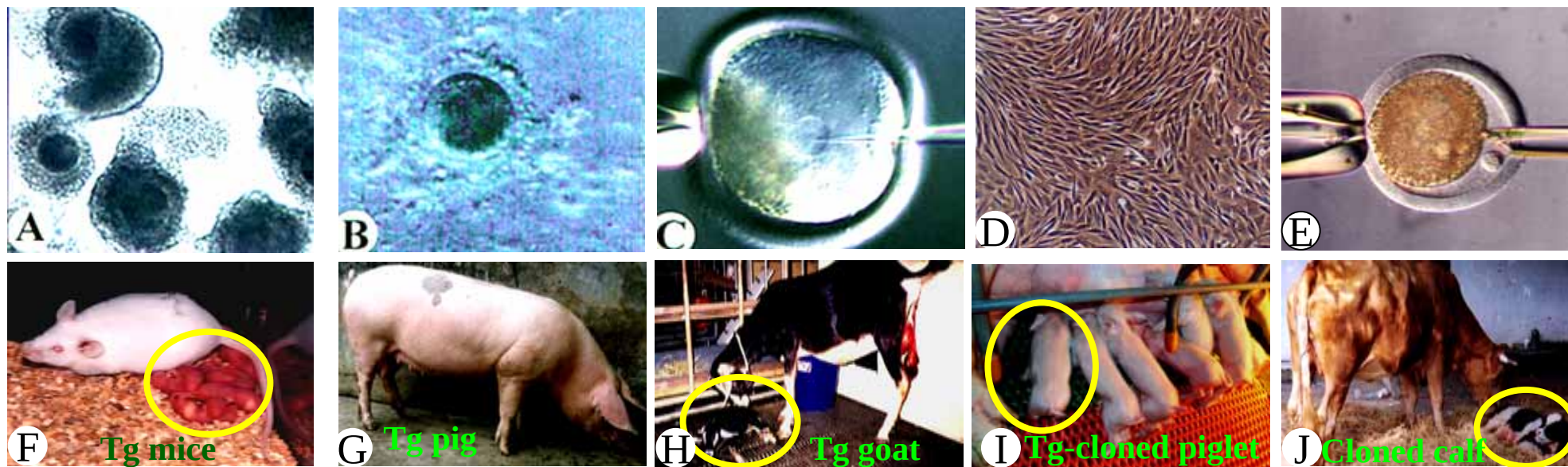
基改豬、雞之屠宰取樣場所



結 論

- ☆ 應用基因顯微注射技術將外源基因逕行注入處於原核階段之新鮮受精卵，已成功獲得帶有 $\alpha LA-hFIX$ 與(或) $\alpha LA-hFVIII$ 等轉基因小鼠、轉基因豬及(或)轉基因乳山羊之出生。
- ☆ 由出生仔畜(仔小鼠)之分析結果證明，其基因轉殖效率平均可達 20% 之譜；另外試驗結果亦證明，外源基因在親代轉基因動物性腺中被成功傳承之百分率，一般介於 30-40% 之間。
- ☆ 使用牛之乳白蛋白(αLA)啟動子序列所構築之轉殖基因，經基因轉殖後產生之轉基因動物，確能獲得高水平之基因表現效果，且其表現具有乳腺組織特異性。
- ☆ 源自轉基因小鼠、轉基因豬及轉基因乳山羊等乳汁中含有之重組 hF 及(或)重組 hFVIII 分別業經證明具有如同正常人類血漿之凝血活性。
- ☆ 國內已成功建立豬、牛及羊等家畜之複製科技平台，未來可望經由種間核移植技術之應用嘗試產製人類胚幹細胞，從而進行人類之細胞工程、組織工程、甚或器官工程等，俾提供進行特定細胞、組織甚或器官移植等醫療之使用。

THANKS FOR YOUR ATTENTION



Shinn-Chih Wu (ATIT)

Chin-Fu Tu (ATIT)

Shau-Ping Lin (NTU)

Chih-Jen Lin (NTU)

Shu-Wha Lin (NTU)

Chuan-Mu Chen (NCHU)

Huai-Jen Tsai (NTU)

Acknowledgment

Co-workers

China-Hong Wang (NCHU)

Kong-Bung Choo (VGH)

Shang-Hsun Yang (NLABRC)

Shan-Nan Lee (TLRI)

Perng-Chi Shen (TLRI)

Cho-Chen Yang

Jerry Xiang-Zhong Yang (UCON)