

# 哺乳動物之基因改造及再程序化應用

講者：吳信志

國立台灣大學生物資源暨農學院

動物科學技術學系暨研究所



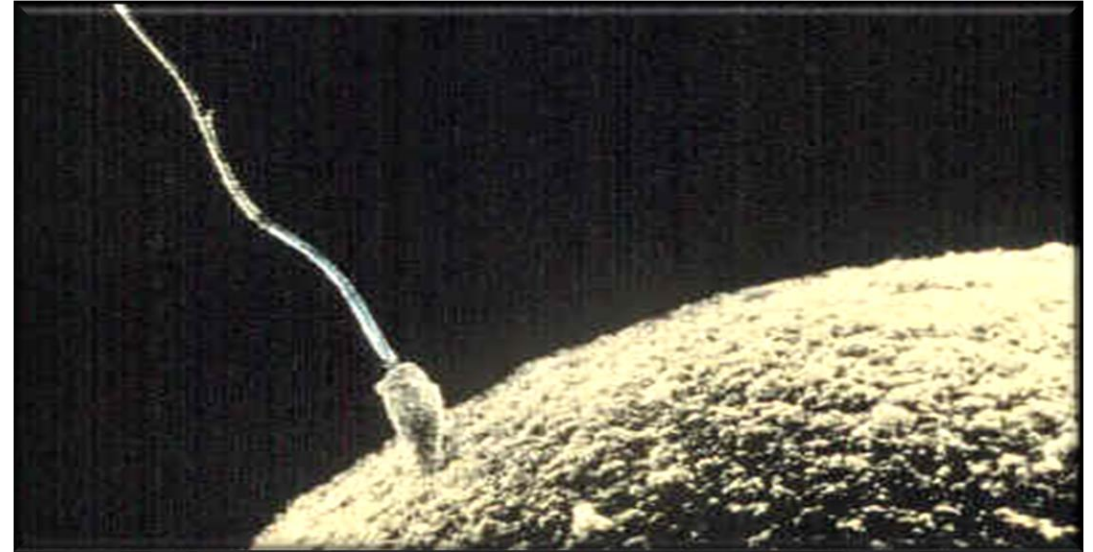
# 內容大綱

- ◆ 哺乳動物生殖
- ◆ 動物生殖科技對人類之貢獻
- ◆ 哺乳動物細胞之基因轉殖
- ◆ 哺乳動物細胞之再程序化
- ◆ 未來展望

# 哺乳動物生殖

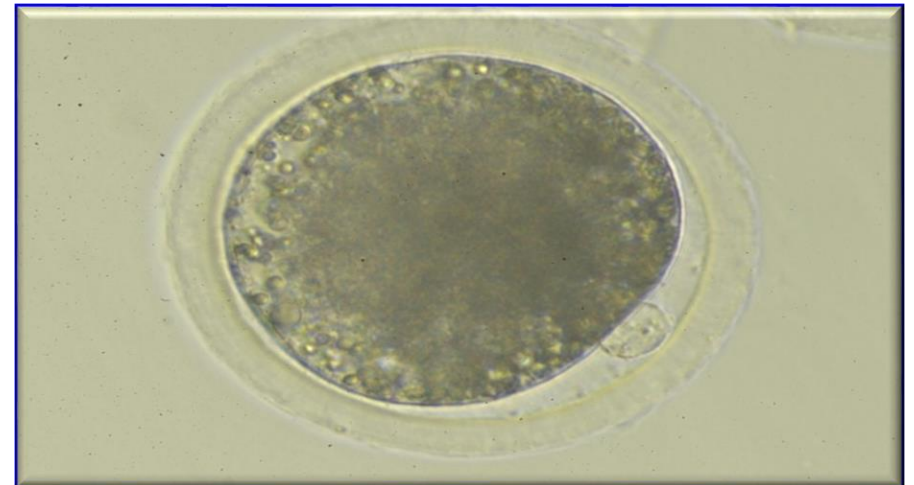
有性生殖：

精子  
卵子

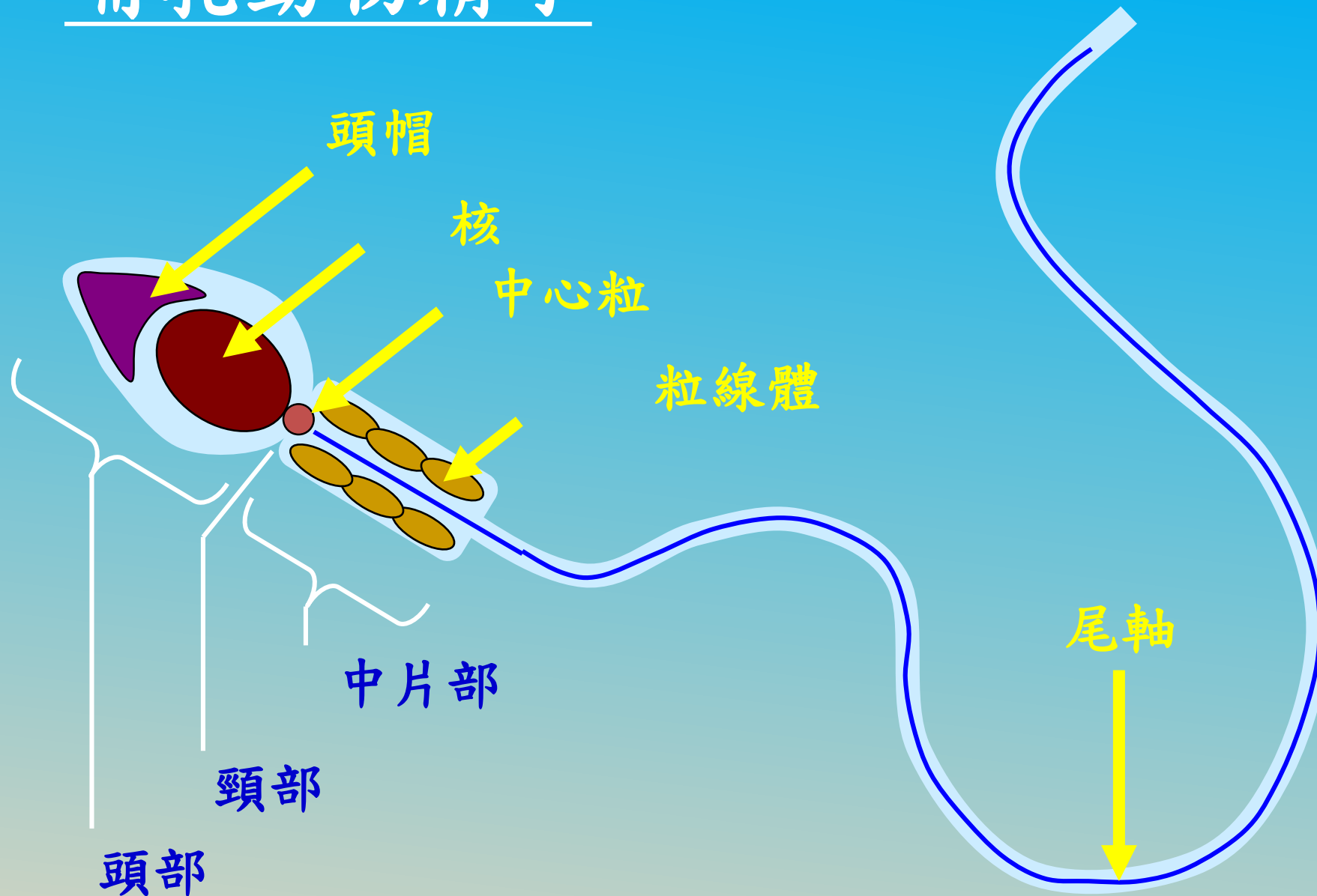


無性生殖：

胚分割  
胚幹細胞結合四倍體胚  
核移置

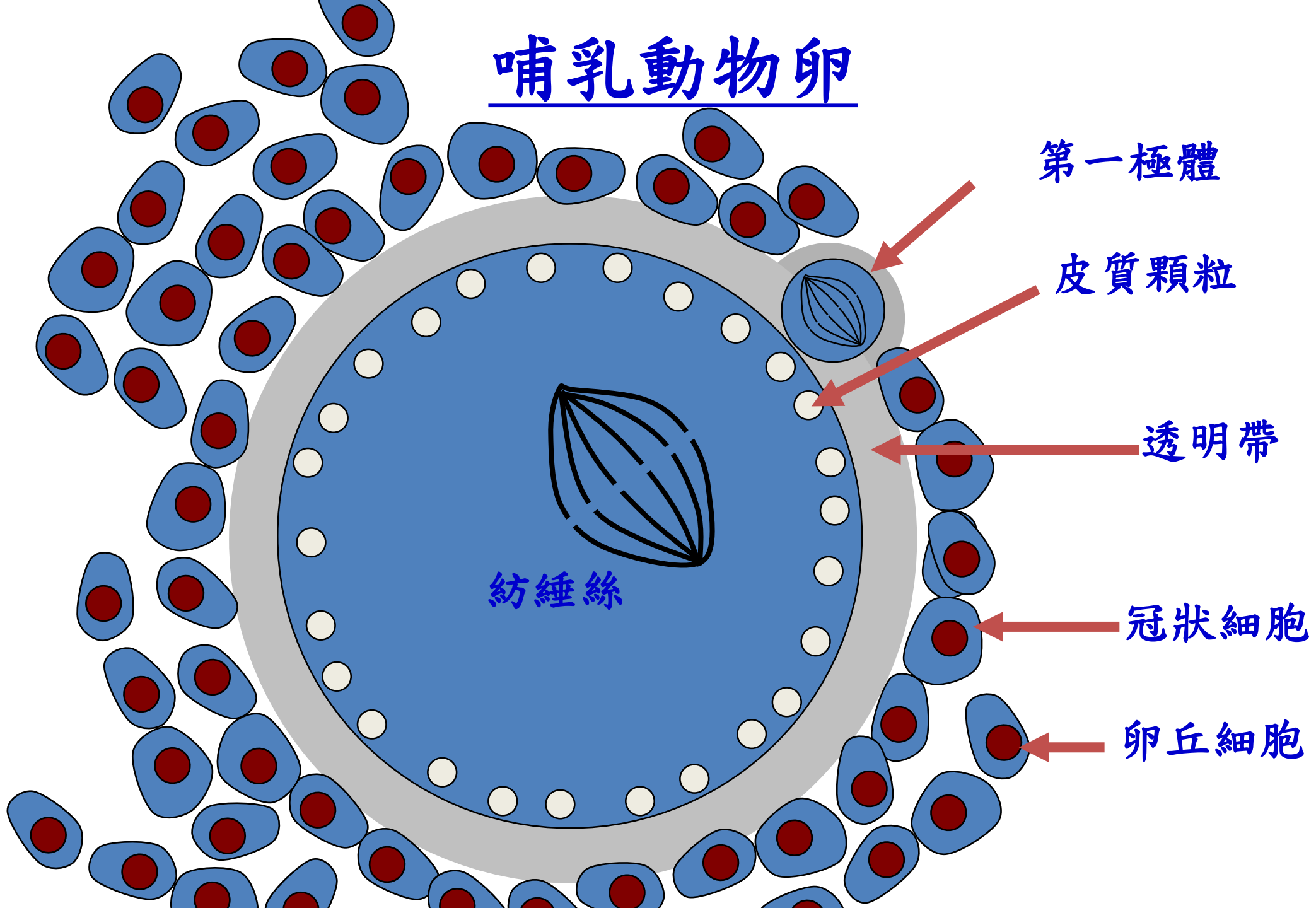


# 哺乳動物精子





# 哺乳動物卵



第一極體

皮質顆粒

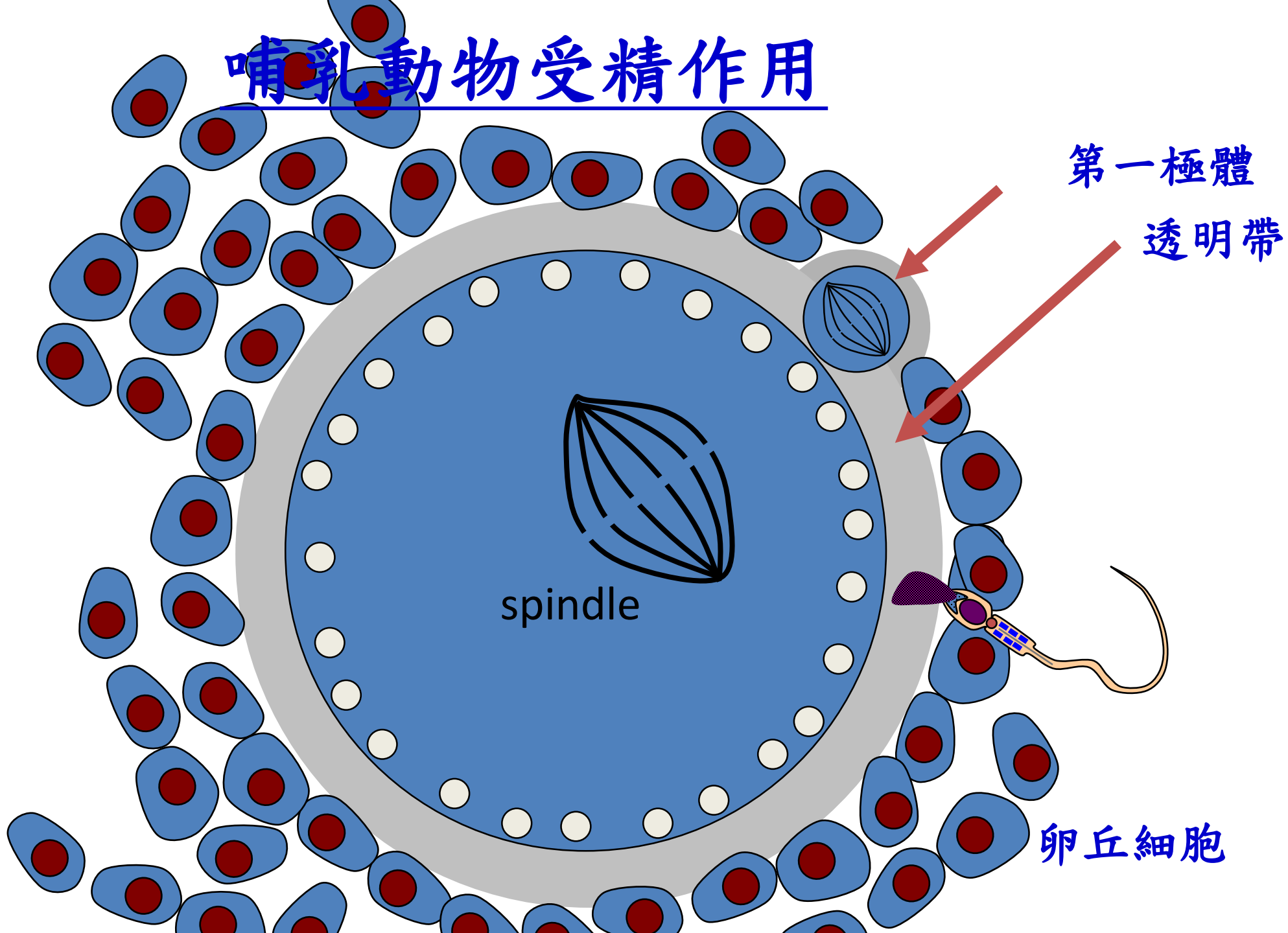
透明帶

冠狀細胞

卵丘細胞

紡錘絲

# 哺乳動物受精作用



第一極體

透明帶

卵丘細胞

# 動物生殖科技對人類有何貢獻？

- ◆ 延續各種動物之遺傳特性
- ◆ 供人類人工輔助生殖及節育技術之參考
- ◆ 在全球人口逐年增加的過程，滿足人類對動物性蛋白質的需求
- ◆ 操作動物之遺傳組成以滿足人類之需求

# 生物技術(Biotechnology)

利用生物程序、**生物細胞**或其代謝物質來製造產品及**改進人類生活品質**之科學技術

\*生物技術——二十一世紀全球重點發展科技。

# 動物生技之範疇

- ◆ 基因轉殖動物
- ◆ 複製動物
- ◆ 疫苗及診斷試劑
- ◆ 動物幹細胞
- ◆ 細胞及基因治療
- ◆ 人類疾病動物模式
- ◆ 其他



# 加速動物生殖與遺傳性能改進效率之新科技

- 人工授精技術
- 發情同期化技術
- 卵之體外成熟與受精技術
- 胚之性別鑑定技術
- 動物之基因轉殖技術
- 基因治療技術
- 基因剔除、嵌入或削弱技術
- 超級排卵技術
- 胚移置技術
- 配子及胚之冷凍保存技術
- 胚之融合與嵌合體動物之產生
- 動物之複製技術
- 基因之定位轉殖技術
- 分子胚胎學相關研究技術  
(i. e. 胚胎之功能性基因體研究)

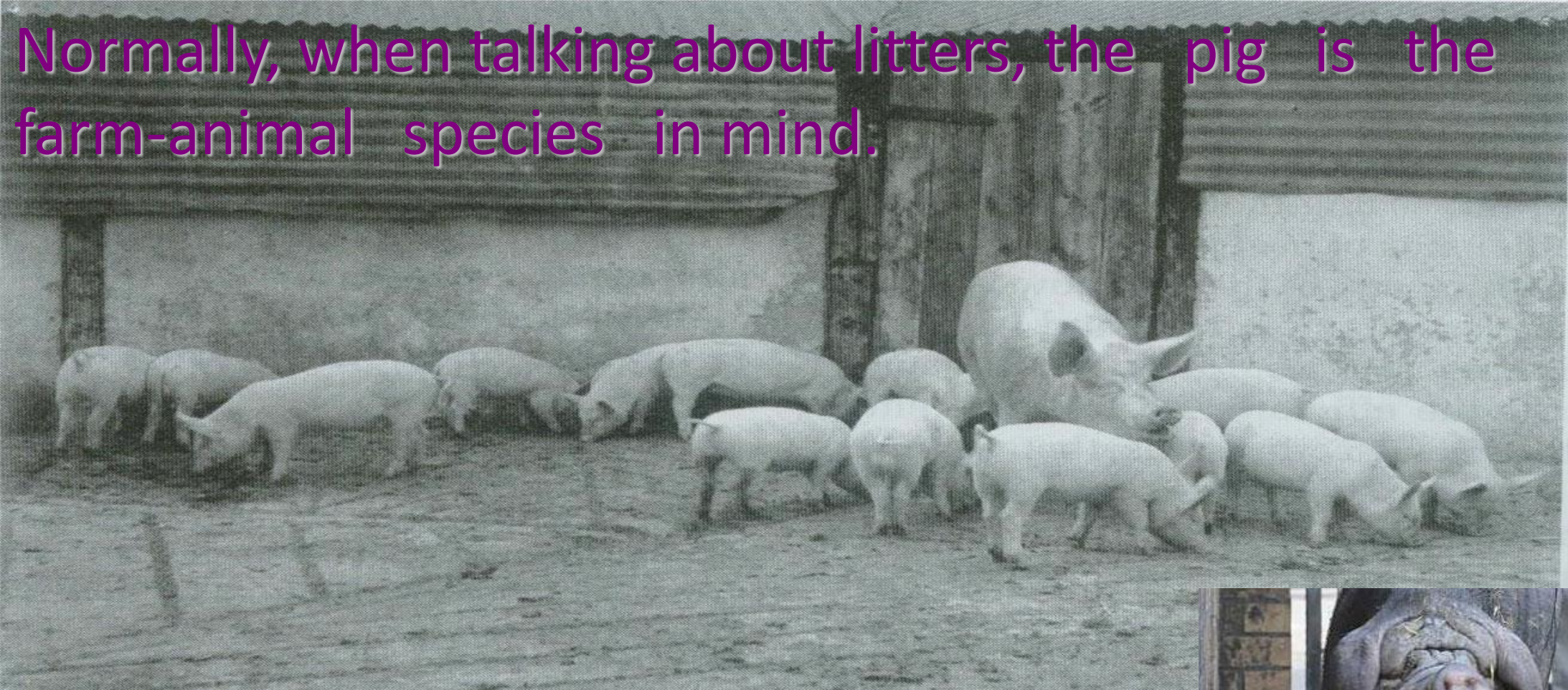
# 改善經濟動物生殖效率3%將導致每年增加:

1. 一百萬頭肉用小牛出生
2. 三百二十萬頭小豬出生
3. 三百七十萬加侖牛乳





Normally, when talking about litters, the pig is the farm-animal species in mind.



提高食用動物繁殖效率





# 目前全球的大挑戰：

1. 控制人口增長速度
2. 提高食用動物繁殖效率
3. 教育大眾如何管理物種之生殖

# 動物生殖科技面面觀

學術研究面：創新突破及解決人類面臨問題

產業應用面：創造就業機會

社會生活面：傳宗接代及解決食、衣、住及行

政治面：出生率、穩定物價與經濟發展

教育面：生態平衡與生殖管控

生命面：創造宇宙繼起之生命

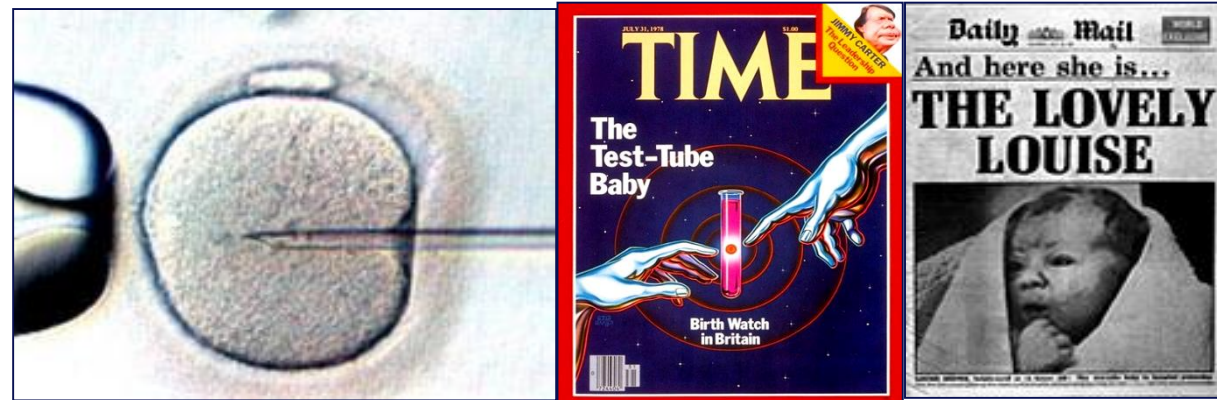
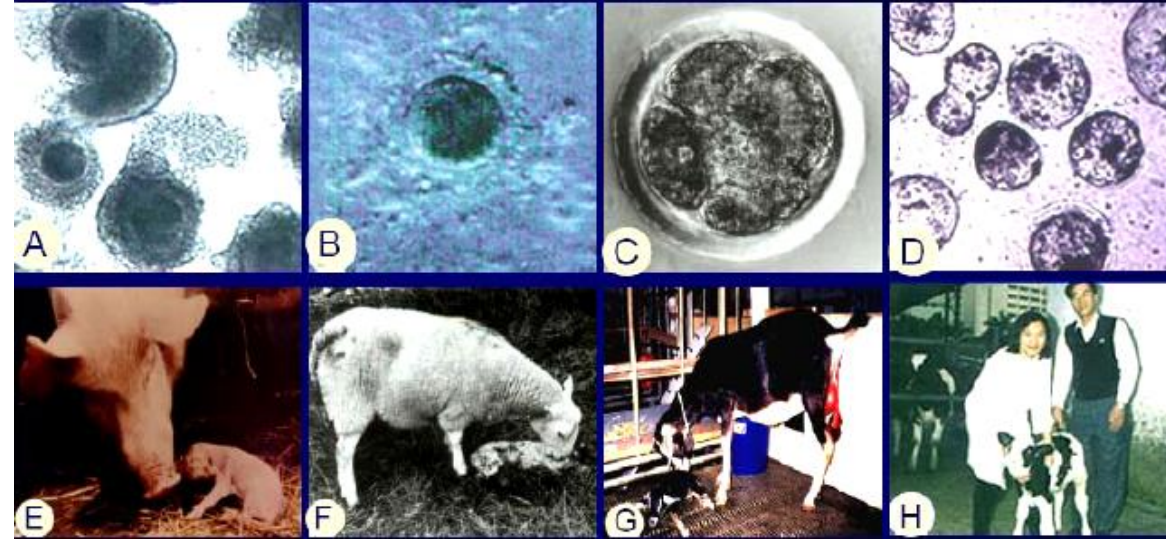
其他面：維持大自然生態之完整性



# 學術研究面： 創新突破及解決人類面臨問題

科學研究核心重點

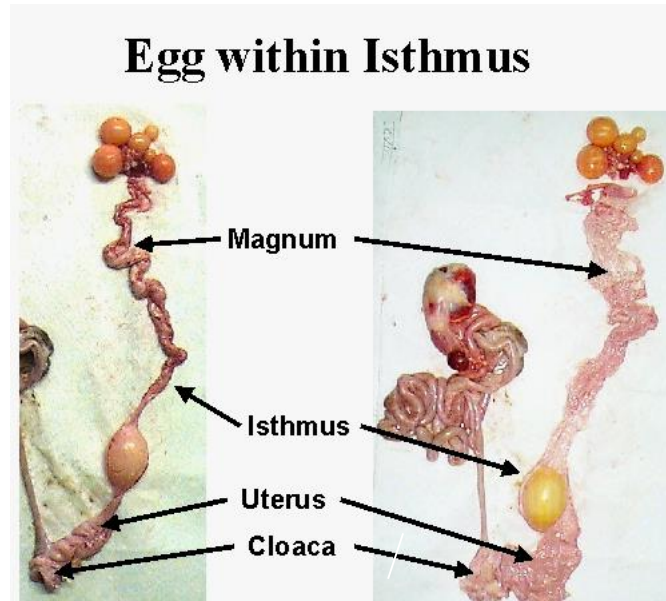
創新性、產業利用性及  
改善人類生活品質



試管動物(小鼠、兔、豬、綿羊、山羊與牛)卵母細胞體外成熟、體外受精及胚移置等技術之成功開發，造就出試管嬰兒的誕生

# 避孕

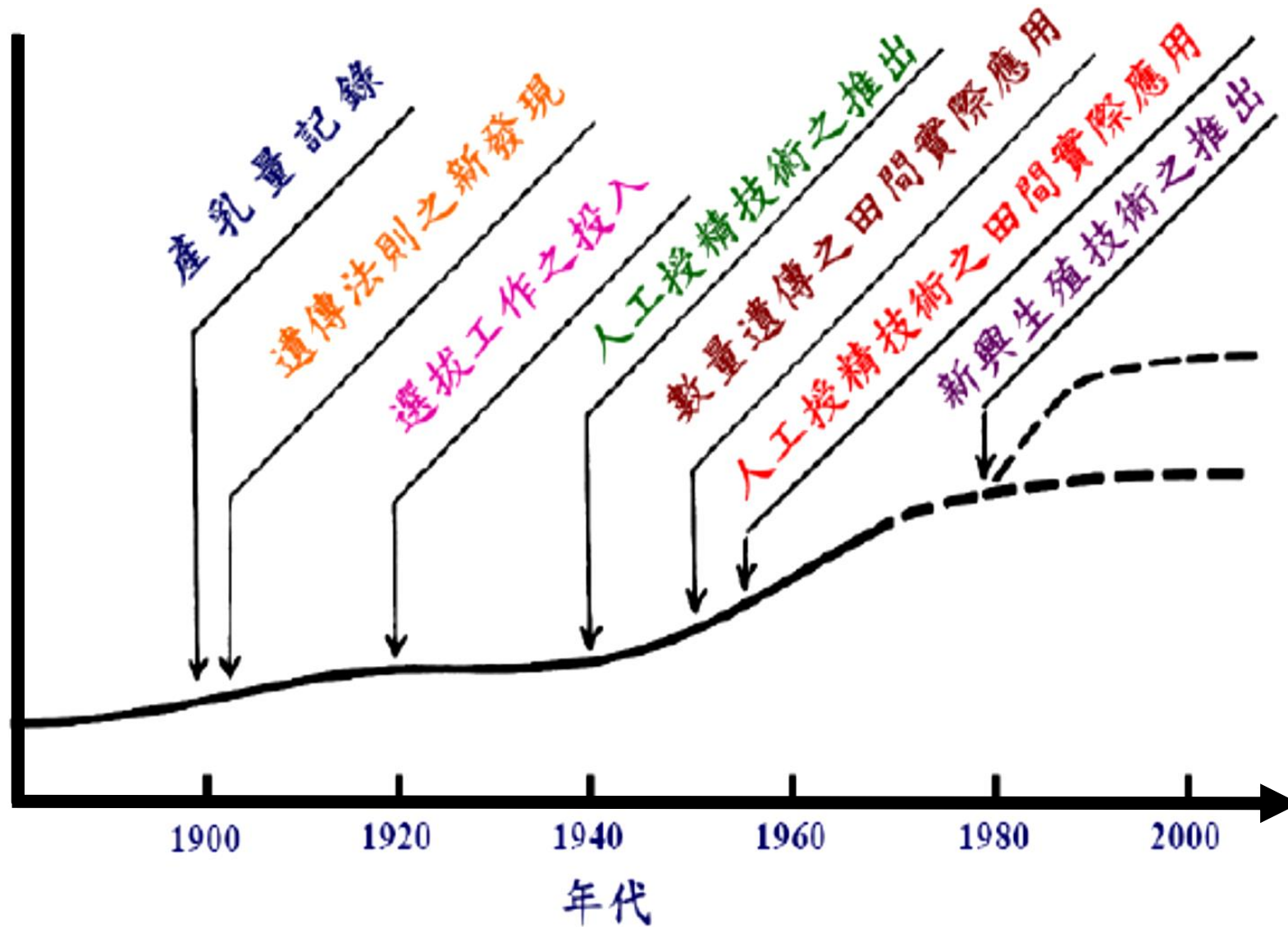
## Contraception



## Intra-Uterine Device



家畜遺傳性能之改進量



過去一世紀來階段性應用不同策略對於家畜遺傳性能改進之貢獻





牽豬哥

摘自：台灣人的懷舊照片；[www.twbbs.net.tw/373070.html](http://www.twbbs.net.tw/373070.html)



人工授精



個體戶養豬

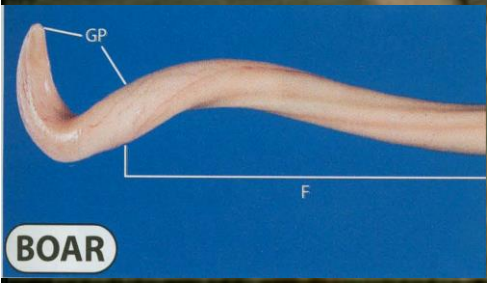
TAIPEI 228 MEMORIAL MUSEUM



企業化養豬



# 手套法採種公豬精液





# 人工授精

# 應用人工授精技術之優點

1. 充分發揮優良種畜之遺傳潛能，加速畜群性能改進
2. 縮短後裔測定所需時程，改進選拔之正確性
3. 降低母畜之配種成本及公畜之維持成本
4. 配合母畜同期化發情、配種及分娩
5. 促進優良種原之國內外交流
6. 減少疾病傳染及確保畜群健康
7. 解決因體型或其它因素所導致之自然配種困難問題
8. 提供學術研究之工具

# 基因改造 (基因轉殖)

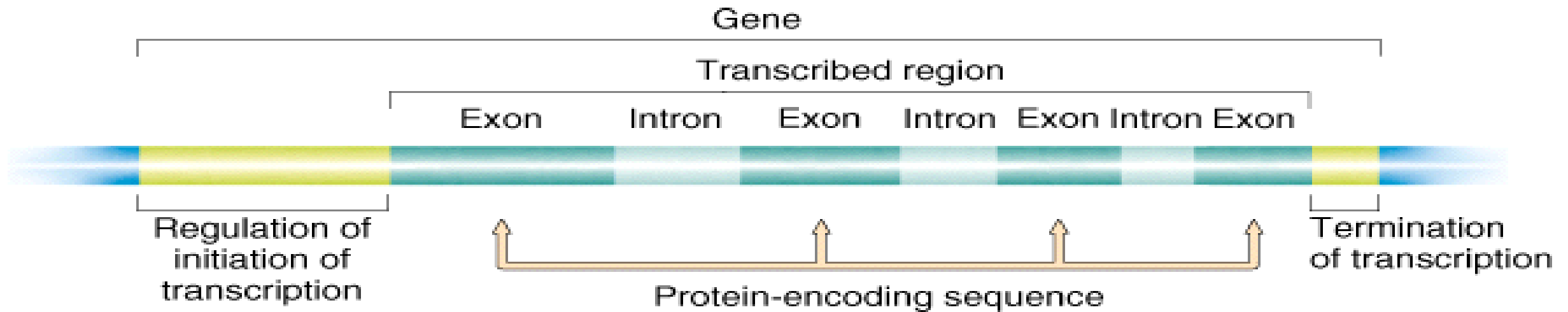
以人為方式將外源基因  
嵌入生物體或將生物體之內  
源基因剔除稱之。



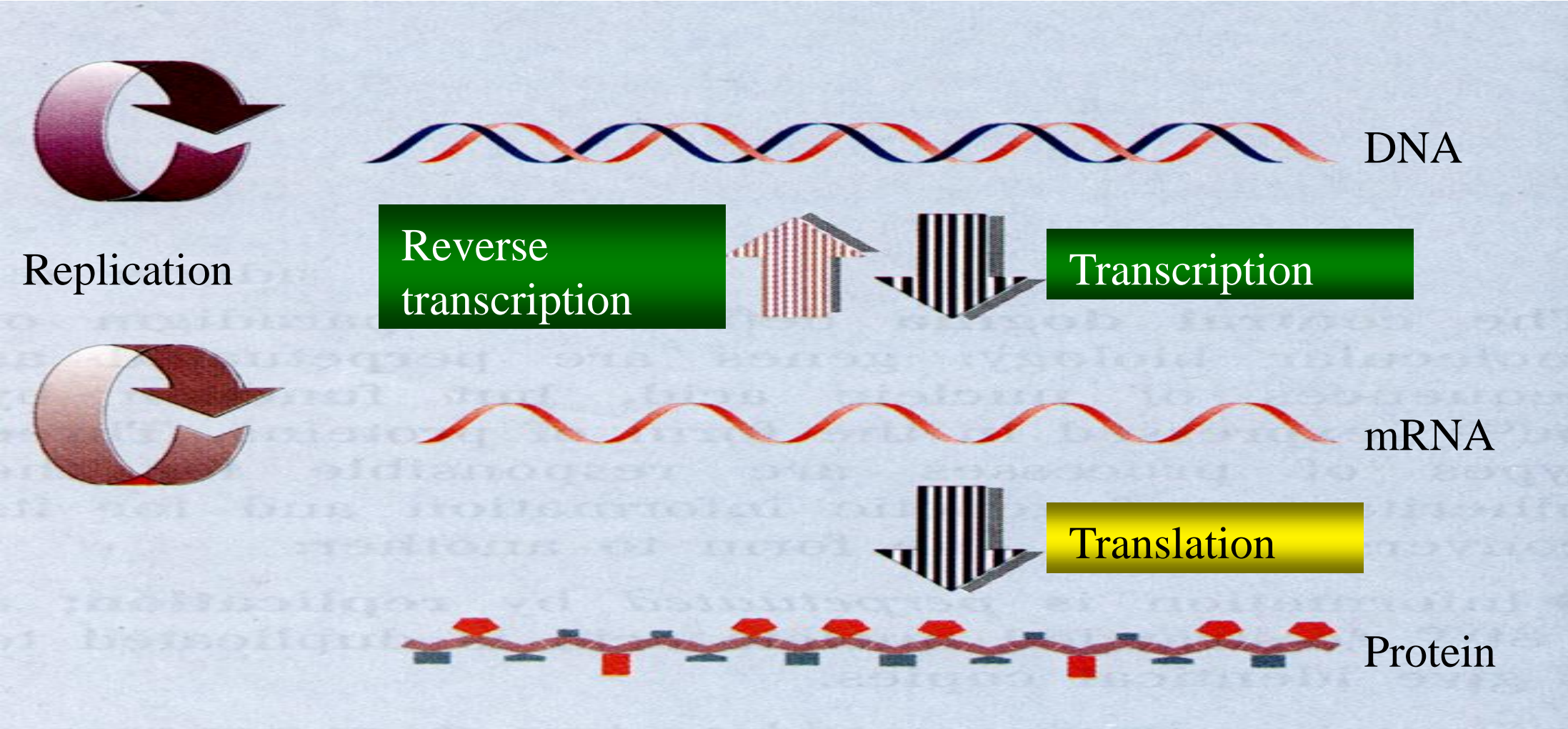
- ◆ 動物之遺傳性能歷經數十年甚或百年之嚴格選拔後，其能獲得的遺傳改進量，往往可因經由基因轉殖技術之巧妙運用，在短短單一世代中，達成與之相同之改進效果。
- ◆ 基因轉殖技術—為動物之遺傳改進提供一項嶄新可行之方法。



# 真核生物之基因構造



# 分子生物學之中心法則



# 功能性基因構築技術

## Promoter

- 1- 組織專一性 (**brain, liver, muscle ...**)
- 2- 全身性
- 3- 誘導性 (**tetracyclin, interferon...**)

## cDNA

### 功能增加

- **wild-type gene**
- **mutant**

### 功能喪失

- **dominant negative**
- **antisense**
- **ribozyme**

# 哺乳動物基因轉殖方法

- ◆ 基因顯微注射
- ◆ 胚幹細胞載體
- ◆ 反轉錄病毒載體
- ◆ 精子載體
- ◆ 核移植（複製動物）



# 動物基因轉殖目的：

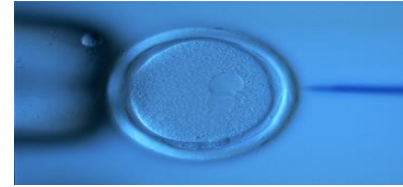
1. 改善家畜生產效率-產肉、乳、毛
2. 增強動物對環境抵抗力-抗病、抗熱...等
3. 環保-減少糞磷量
4. 生產高價位醫藥用蛋白質
5. 動物模式研究
6. 生產醫療用細胞、組織、器官

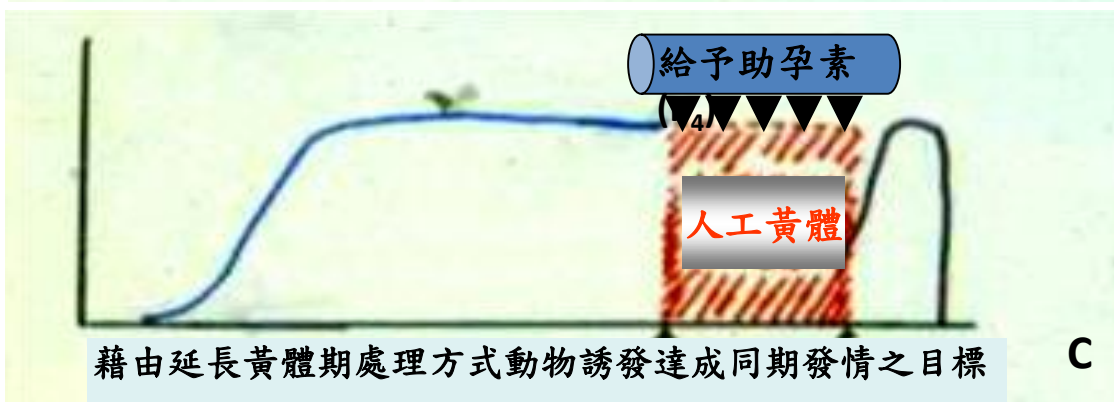
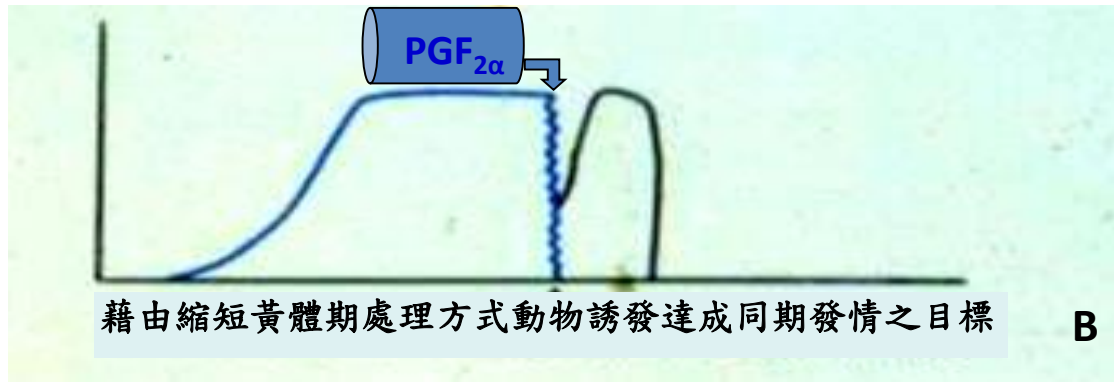
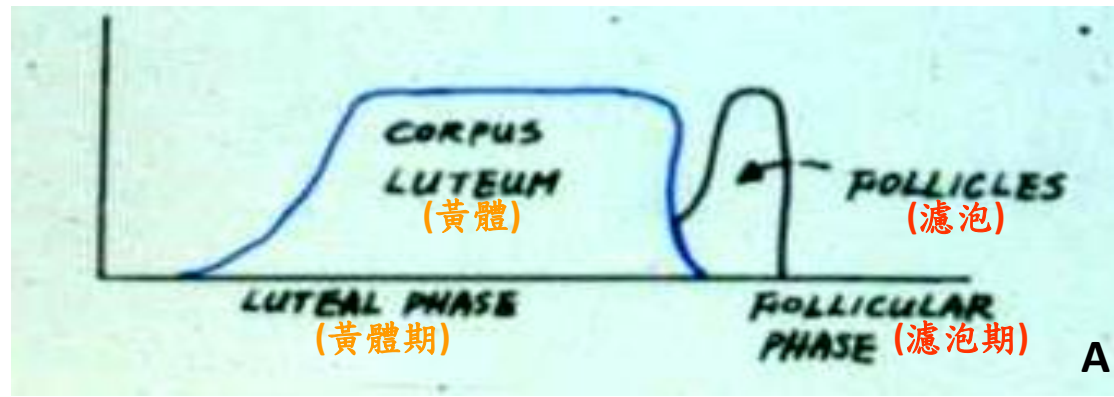
# 基因轉殖技術

調節基因



構造基因

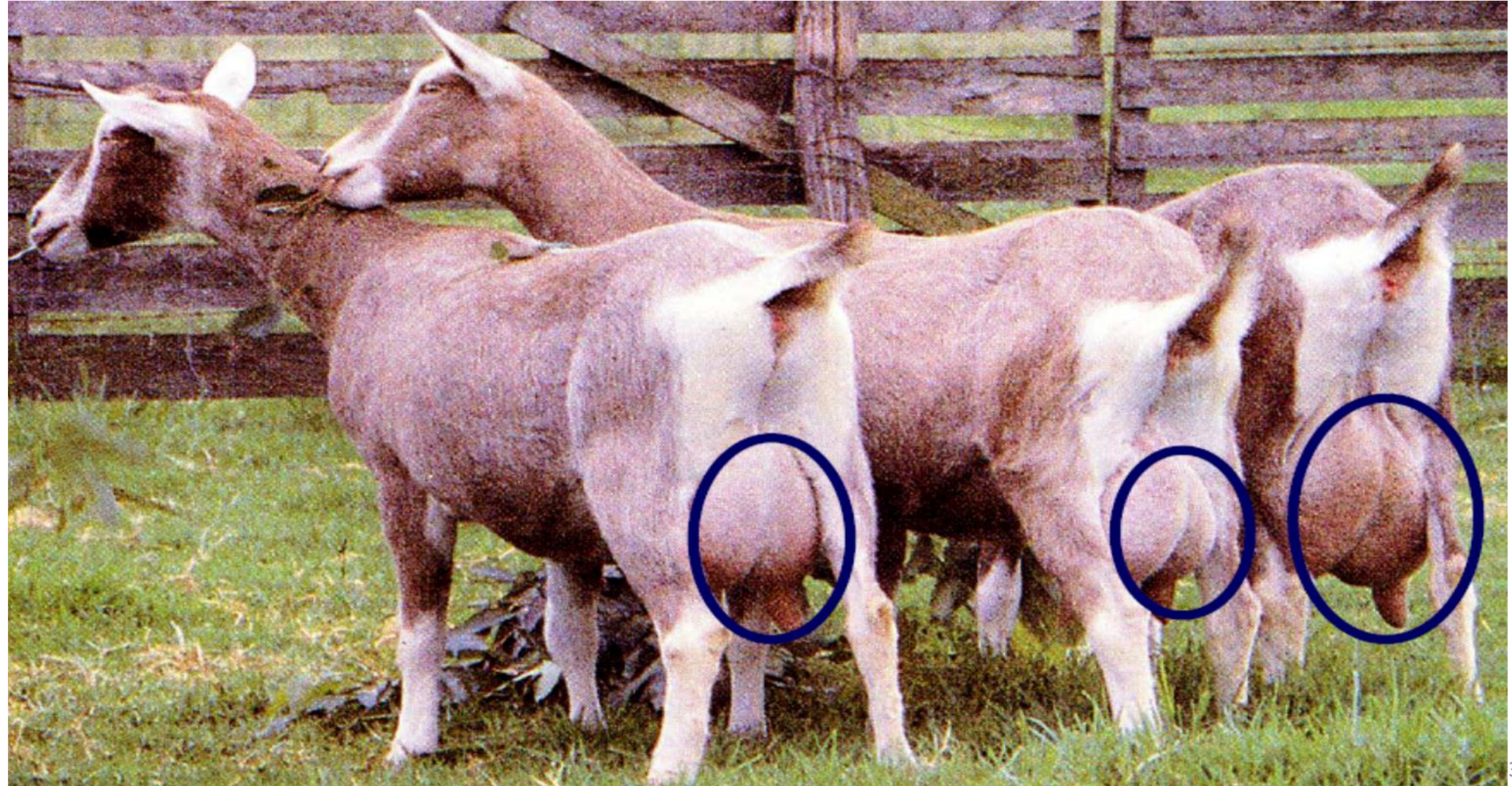




## 誘發動物產生同期化發情的兩大基本策略



# 使用哺乳動物乳腺做為生物反應器生產高價位蛋白質





# 生物鋼-biosteel



Julie Begin checks on goats at a Nexia farm in Quebec. The goats' milk contains proteins that are spun into spider silk.

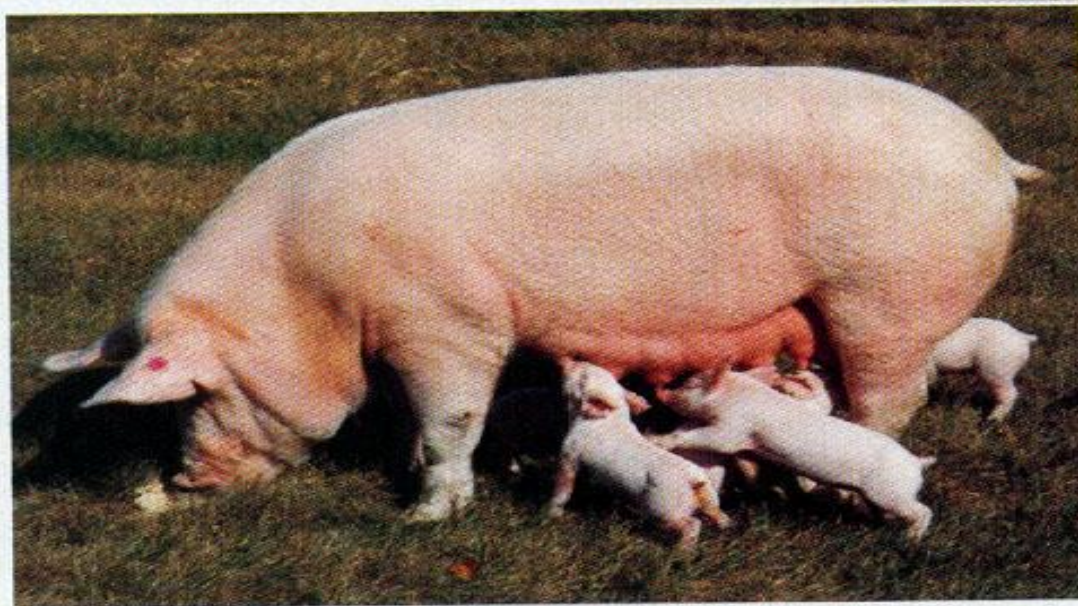


# Transgenic Livestock as Drug Factories

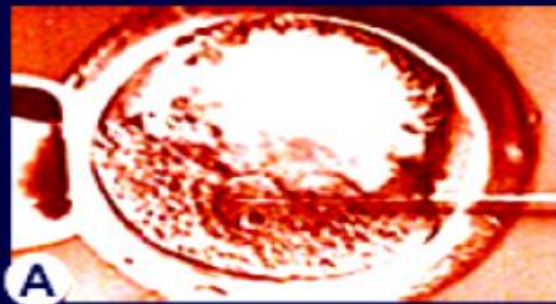
## 以基因轉殖豬當醫藥工廠

*therapeutic proteins in their milk*

by William H. Velander, Henryk Lubon and William N. Drohan







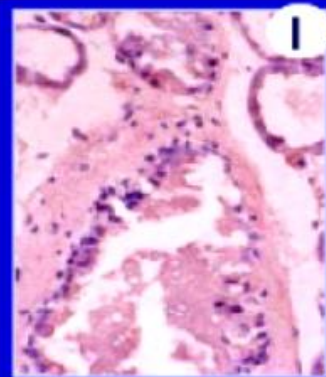
**A**  
Injection of transgene(s)  
into the pronucleus



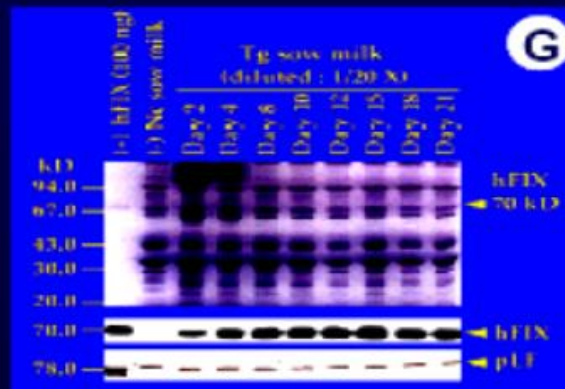
**B**  
Reimplantation of  
Gene-injected embryos



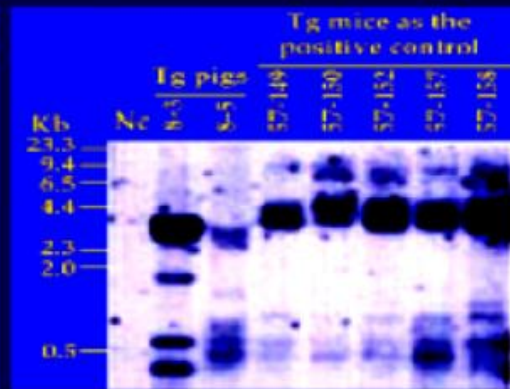
**C** **D**  
Tg pigs born after gene injection



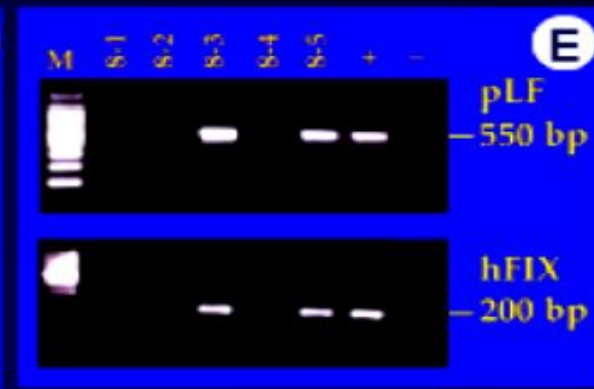
**I** **H**  
Immunohistochemical stain



**G**  
Western-blot



**F**  
Southern-blot



**E**  
PCR

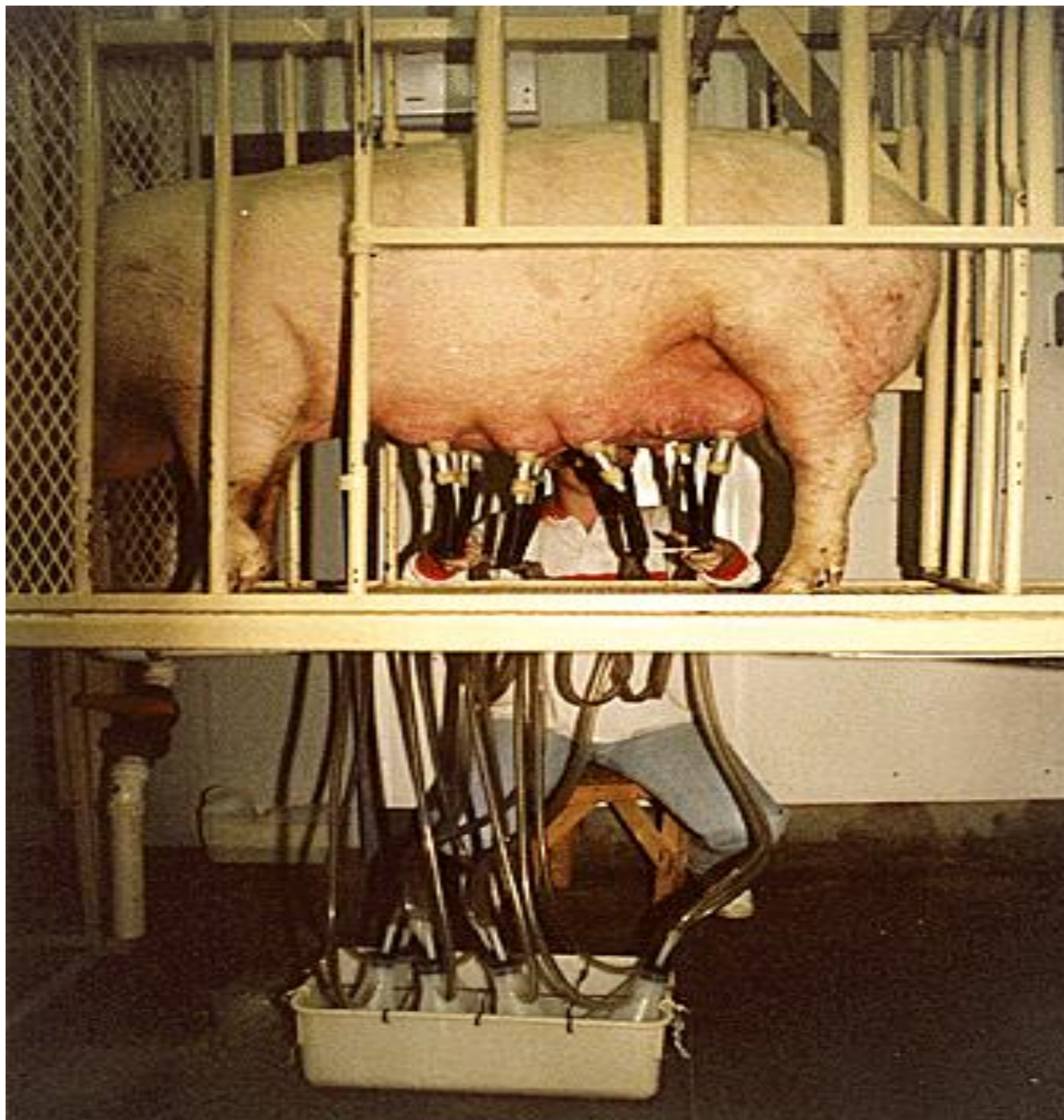
應用基因顯微注射技術產生同時攜帶有人類凝血第九因子( $\alpha LA-hFIX$ )  
及豬乳鐵蛋白( $\alpha LA-pLF$ )之雙基因之基改豬

# 源自轉基因家畜生產重組藥用蛋白之潛在商機

類別	藥用蛋白						
	F-VIII	FIX	GC	蛋白質C	抗凝血素 III	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 <sup>3</sup>
目前市價 (US\$/gram)	2.9 × 10 <sup>6</sup>	40,000	100,000	100,000	7,000	1,000	3.56
估計全球, 市場價值 (10 <sup>6</sup> ×US\$/year)	870	160	1,000	100	150	150	1,120

Wall, 1996





**(Carst et al., 1999;  
Picture from  
F. C. Gwazdauskas)**

如何從動物生殖科技研究成果衍生至幹細胞  
與再生醫學之研究領域？

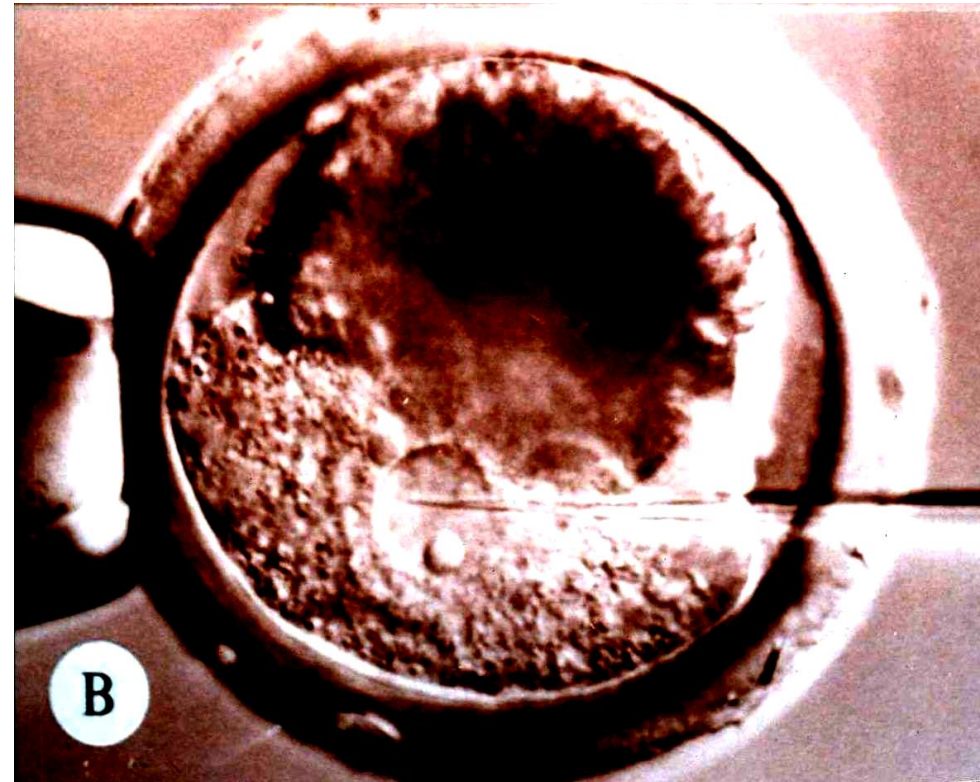
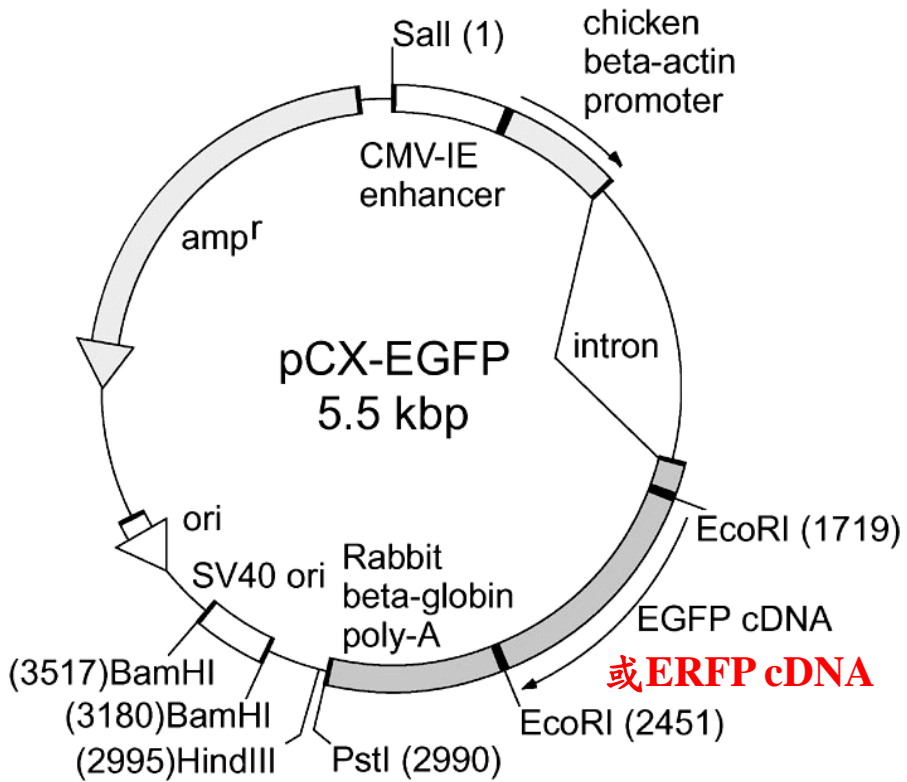
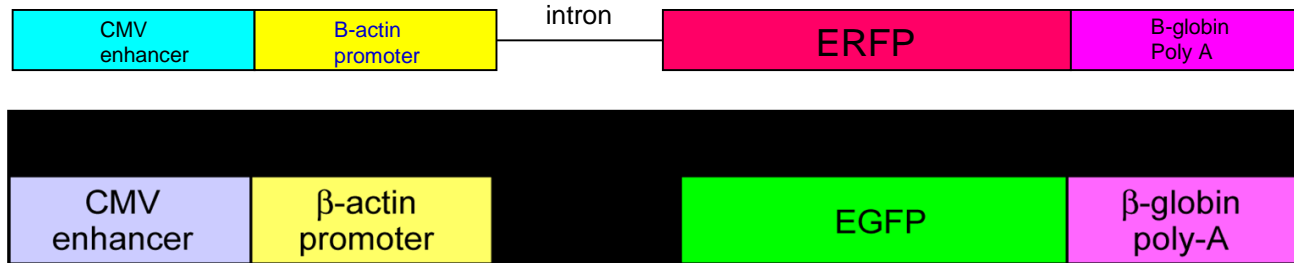
如何在過程中創造高衝擊性之創新研究成果？

# 螢光基因轉殖小鼠及豬

研究動機：

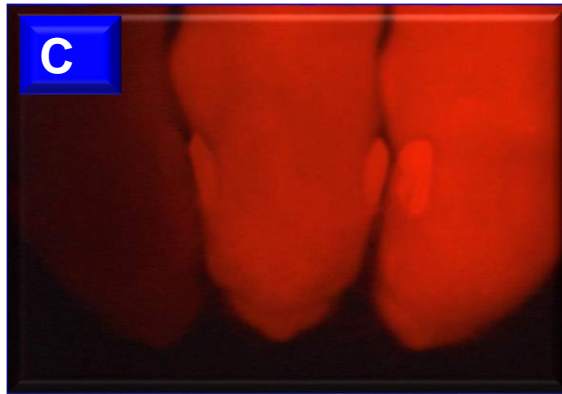
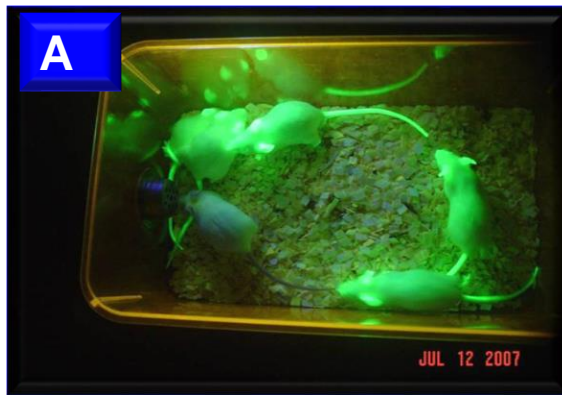
1. 產製全身性表現螢光蛋白質報導基因之轉基因小鼠及豬
2. 自表現螢光蛋白質之個體組織分離成體幹細胞
3. 配合細胞治療及組織工程技術進行再生醫學之動物模式研究

# 螢光蛋白質基因轉殖動物之產製



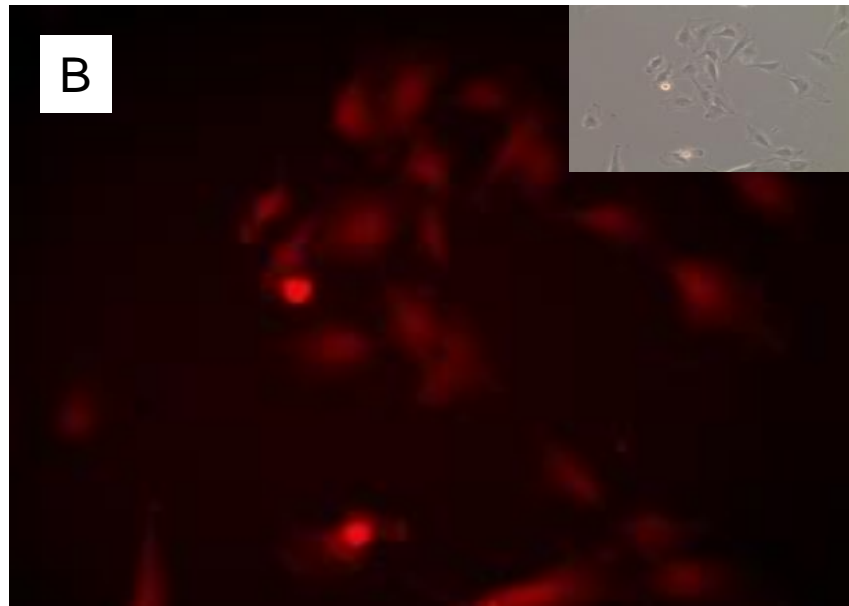
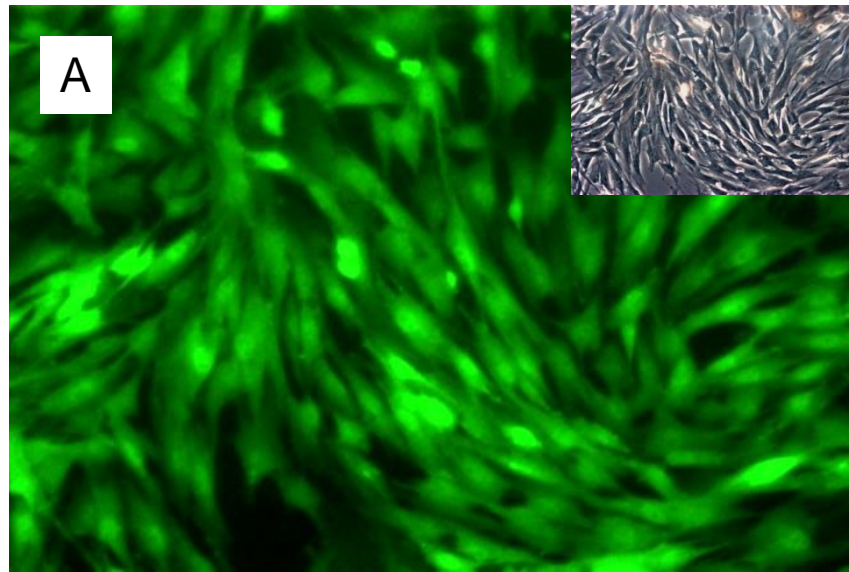


# 螢光基因轉殖小鼠及豬之產製



表現綠色螢光或紅色螢光蛋白質基因之小鼠及豬。

A:綠色螢光蛋白質基因轉殖小鼠；B:綠色螢光蛋白質基因轉殖豬  
C:紅色螢光蛋白質基因轉殖小鼠；D:紅色螢光蛋白質基因轉殖豬



自螢光豬骨髓分離之表現螢光蛋白質間葉幹細胞。A 分離自綠色螢光豬之骨髓間葉幹細胞；B 分離自紅色螢光豬之骨髓間葉幹細胞。

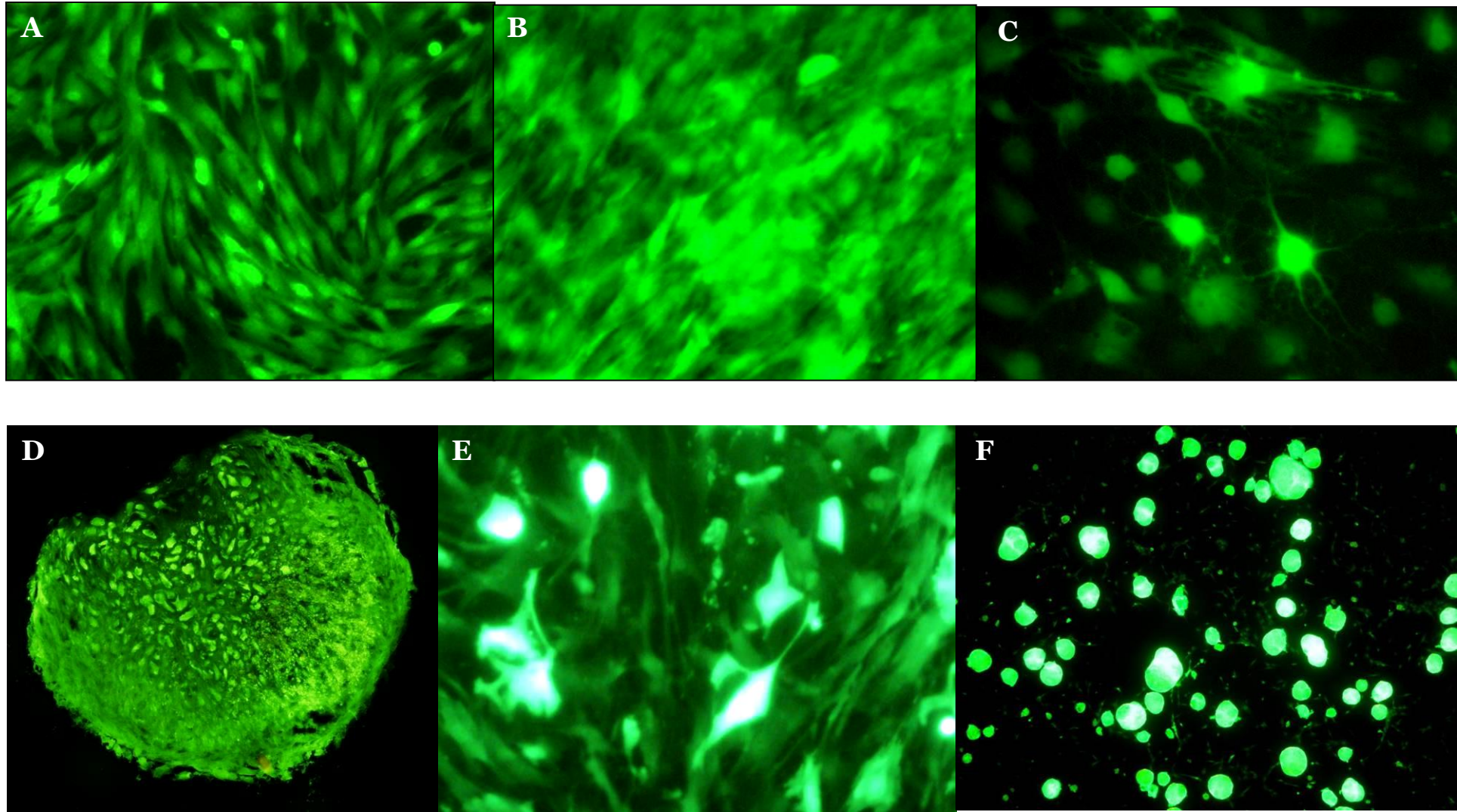
# 幹細胞之定義及分類

幹細胞(stem cells)：指具有自我更新能力，同時亦可分化成特定細胞及組織者。

依幹細胞之可分化能力限制，可分為：

1. 全能性幹細胞(totipotent stem cells)
2. 多能性幹細胞(pluripotent stem cells)
3. 複能性幹細胞(multipotent stem cells)
4. 單能性幹細胞(unipotent stem cells)

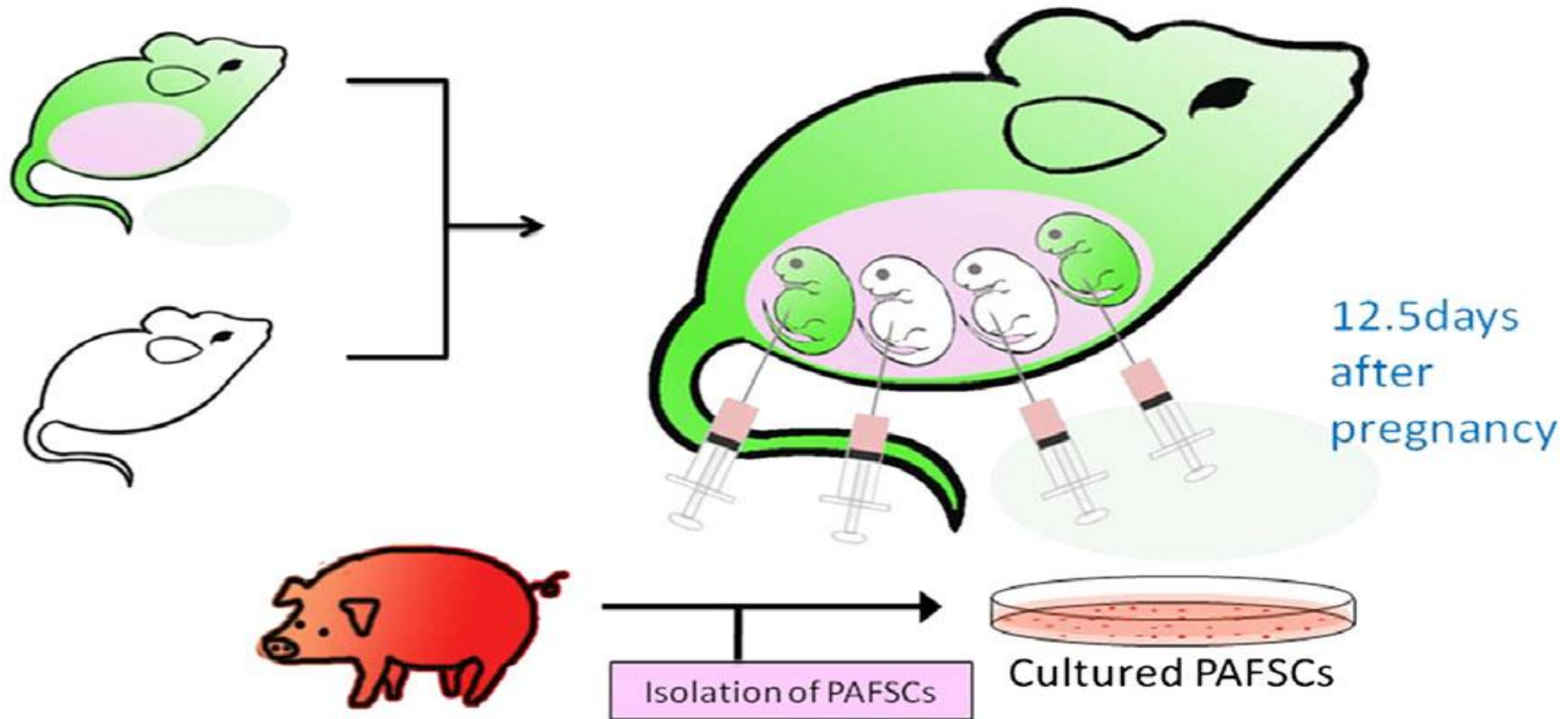




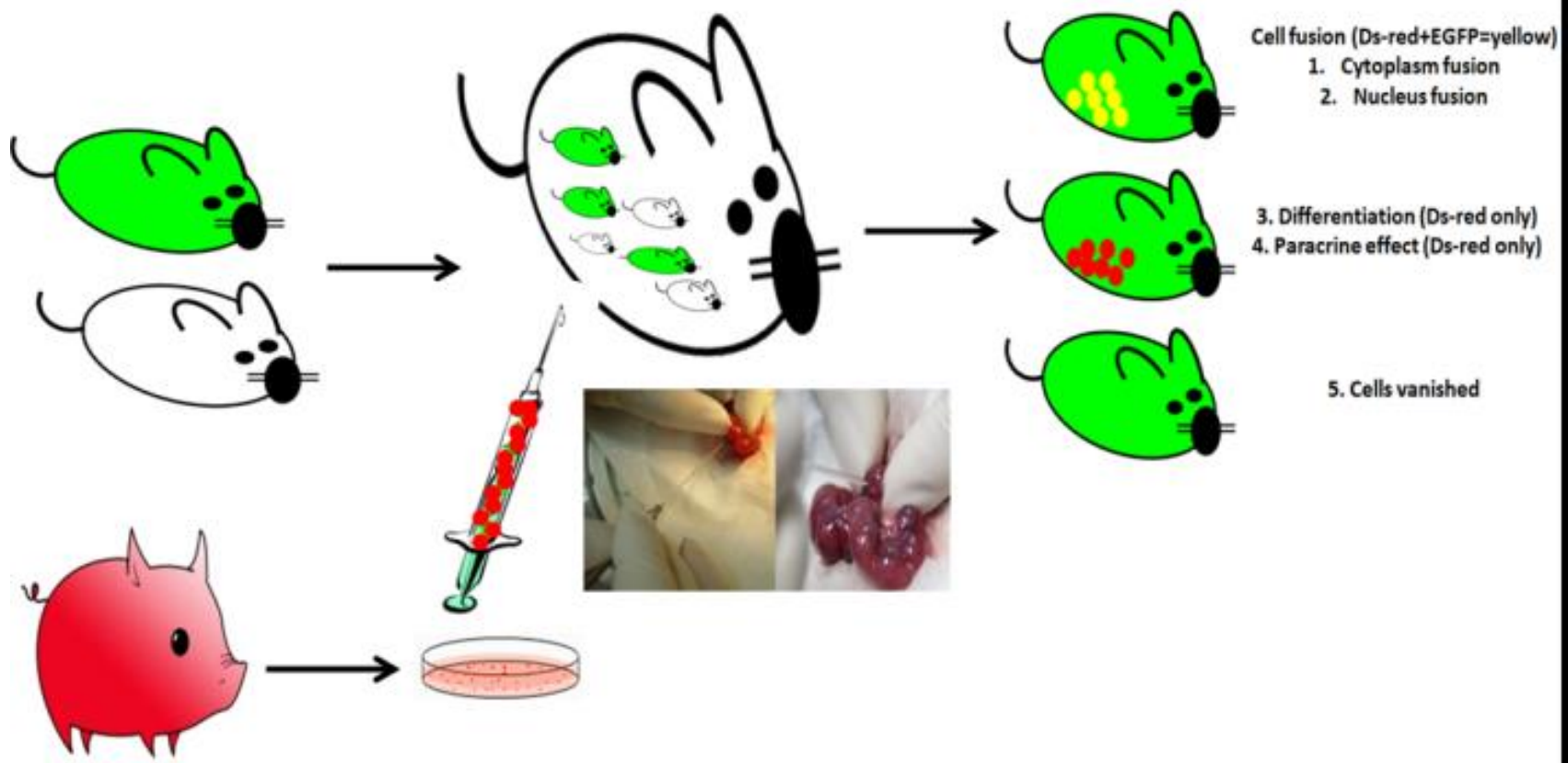
綠色螢光豬骨髓分離之間葉幹細胞(A)及經體外誘導分化後之成骨細胞(B)、神經細胞(C)、軟骨細胞(D)、脂肪細胞(E)及產生胰島素細胞(F)之外觀形態及綠色螢光蛋白質之一致性表現。



# *In vivo*

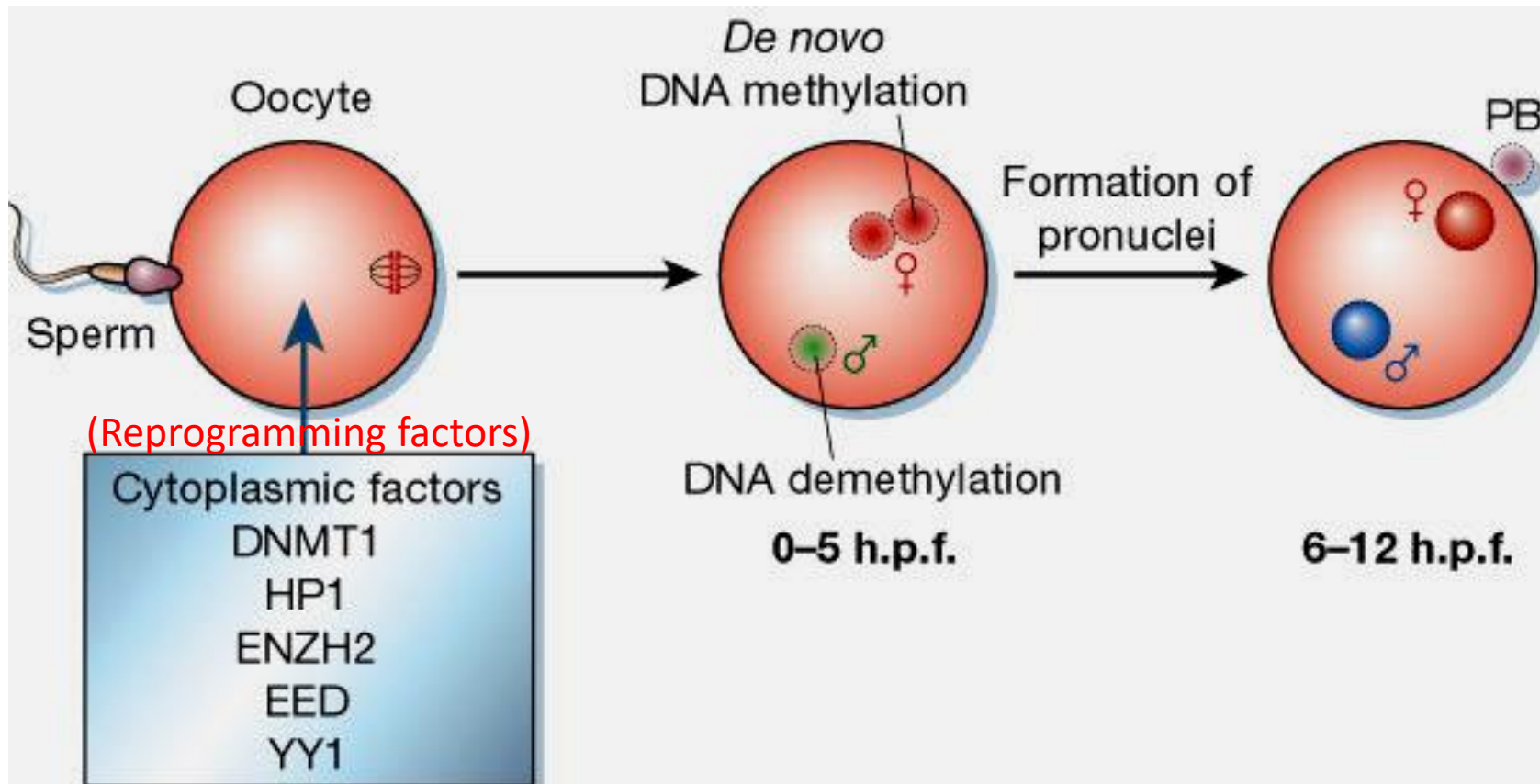


**Xeno genic Hypothesis**



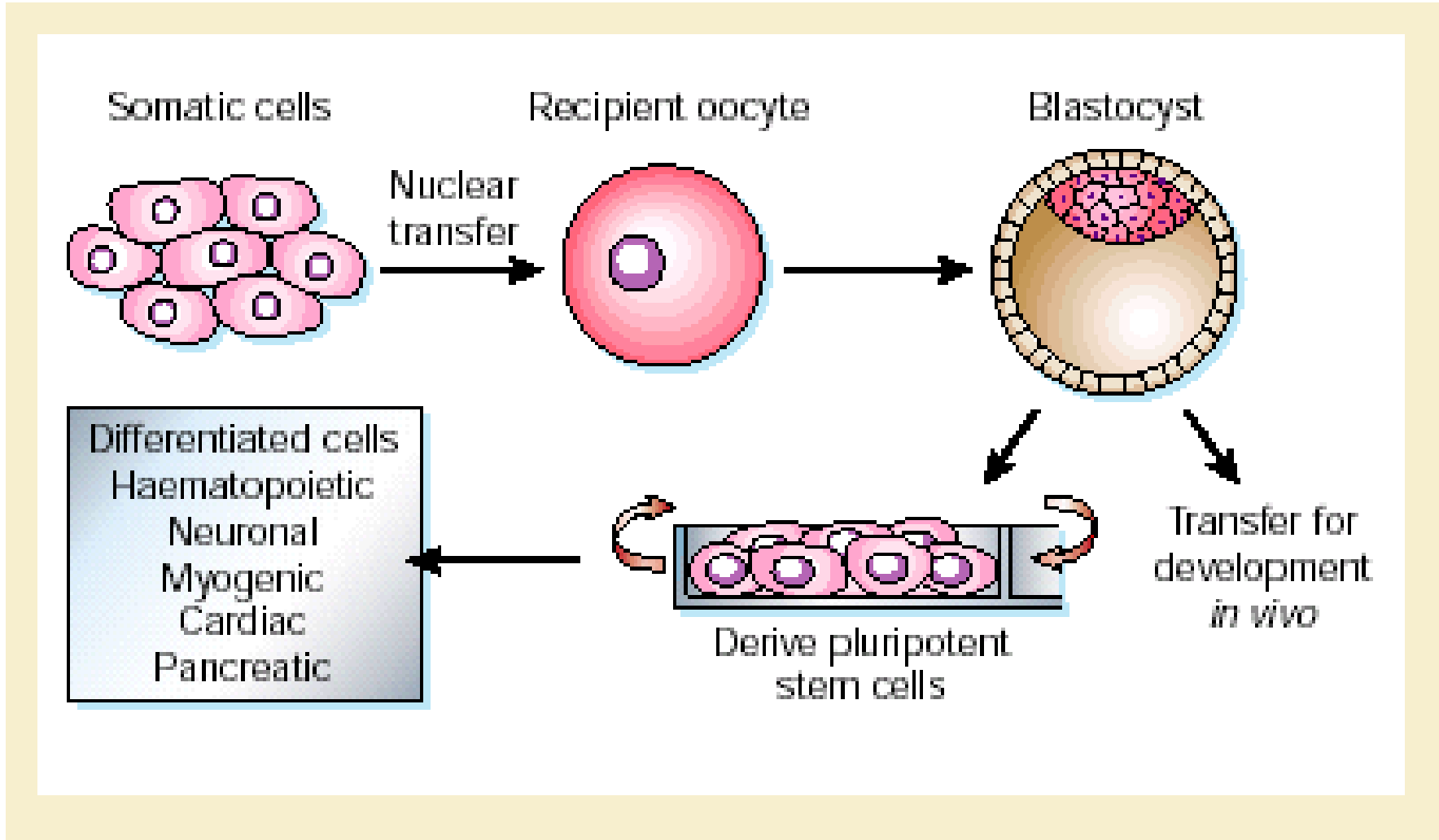
# 哺乳動物細胞之再程序化

## Reprogramming



**Reprogramming** in the zygote. Cytoplasm factors stored in the oocyte commence interactions with parental genomes after fertilization. Between 0 and 5 hours post fertilization (h.p.f.), the parental genomes display marked differences in epigenetic modifications, with the paternal genome undergoing demethylation and the maternal genome showing *de novo* methylation. This accentuates the epigenetic asymmetry between parental genomes. After the formation of pronuclei at approximately 6 h.p.f., further epigenetic modifications are regulated by the entry of cytoplasmic factors into the nuclei. For example, DNMT1 is excluded from entry into the nuclei. These cytoplasmic factors and others have the potential to modify the epigenetic state of somatic nuclei transplanted into the oocyte. PB, polar body.

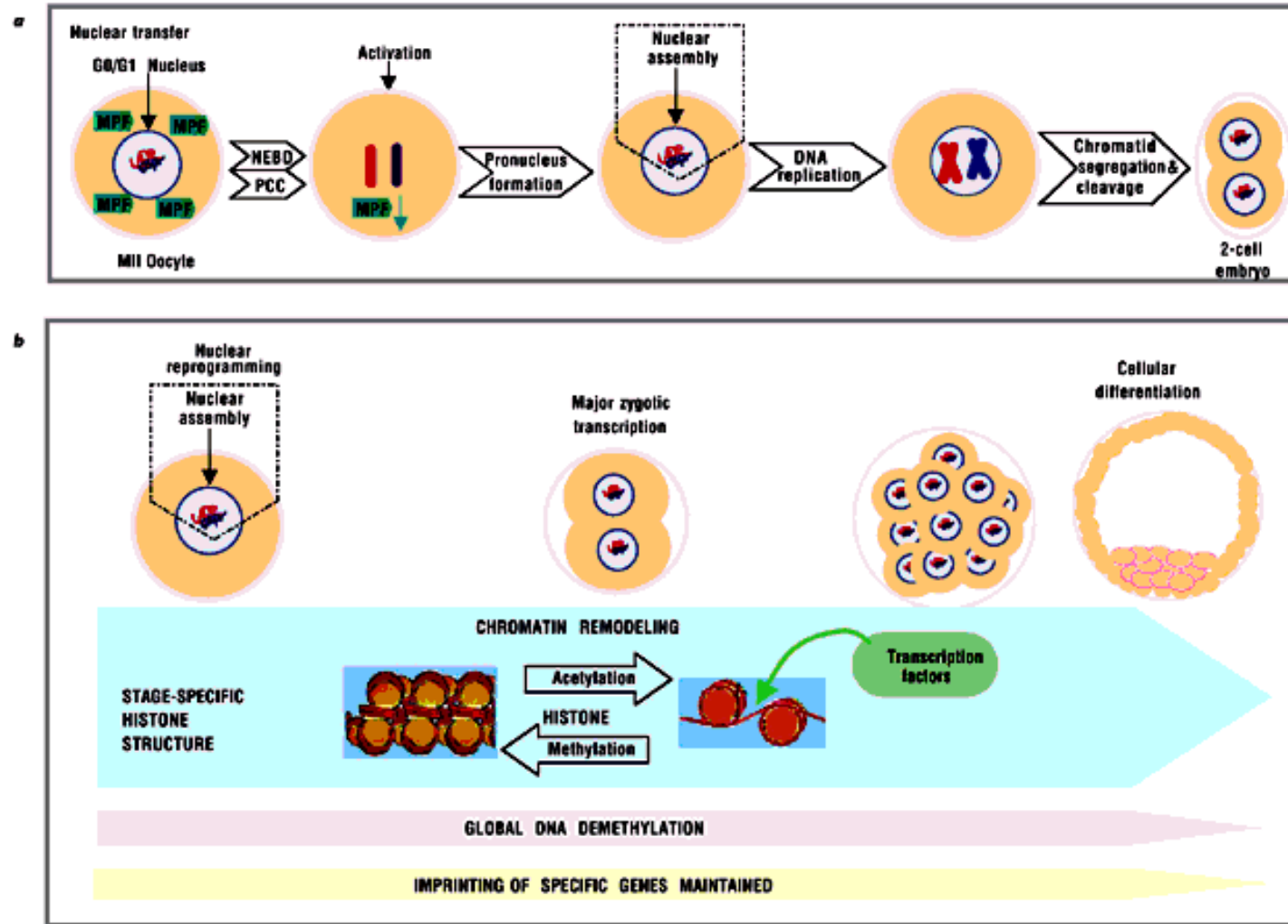


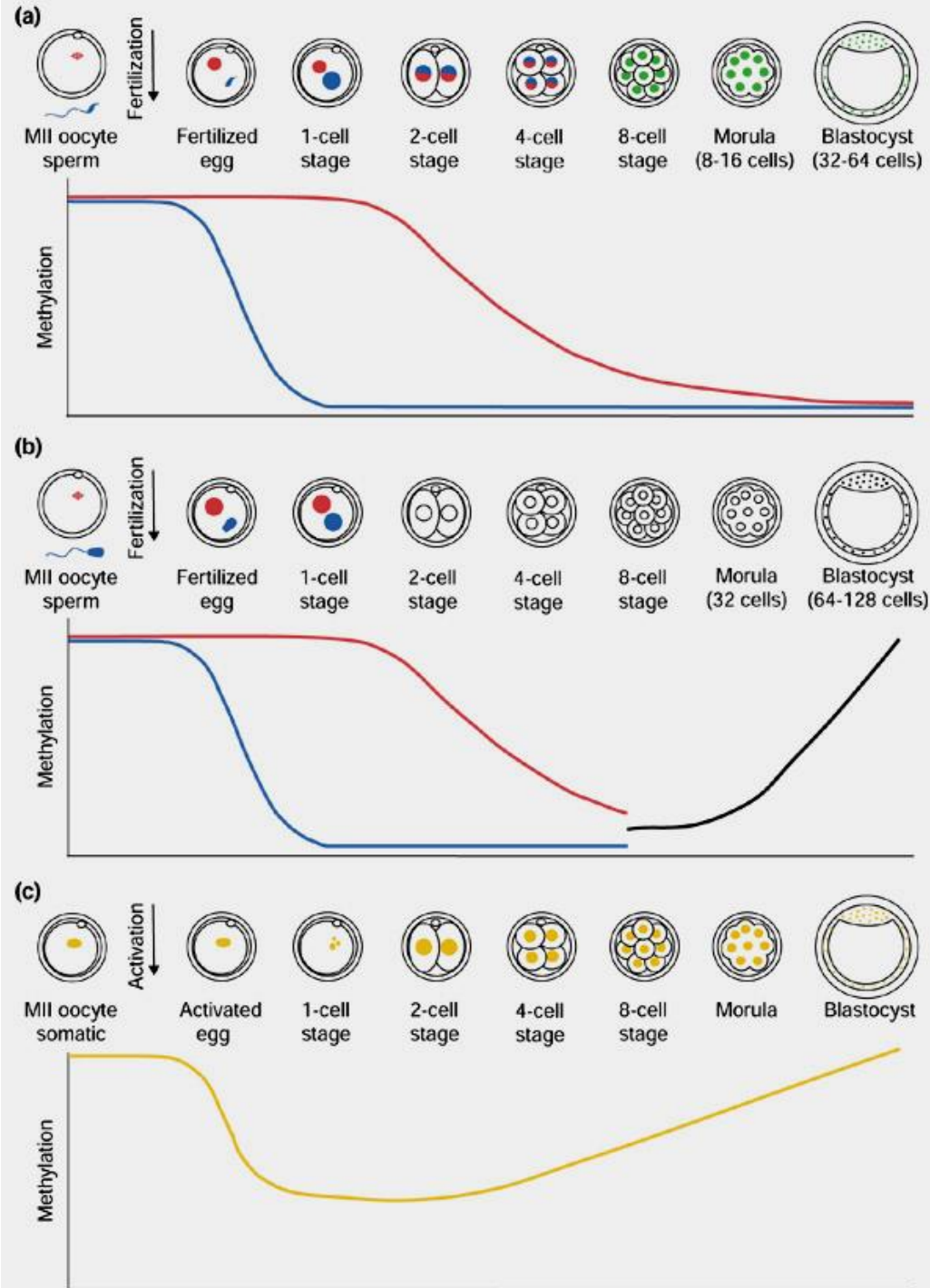


# Are There Any Normal Cloned Mammals?

Ian Wilmut Nature Medicine 8: 215-216 (2002)

## Molecular epigenetic change alternating development of cloned embryos





Reprogramming of global methylation in normal and cloned preimplantation embryos. **(a)** The mouse paternal genome (blue) (in the mouse distinguishable as the larger pronucleus at the 1-cell stage) undergoes active demethylation while the maternal genome (red) is passively demethylated. Differential demethylation and topological separation of the maternal and paternal genomes continues through to at least the 4-cell stage, after which the two parental genomes attain roughly the same levels of global hypomethylation (green). **(b)** Bovine embryos exhibit the same active and passive demethylation as the mouse up to the 8- to 16-cell stage, after which *de novo* methylation is observed (black line on the graph; the parental genomes cannot be distinguished to determine whether methylation is acquired at the same rate in the maternal and paternal chromosomes). **(c)** Cloned bovine embryos (with somatic nuclei in orange) have active but not passive demethylation activity. Precocious *de novo* methylation is observed in all nuclei beginning at the 4-cell stage. MII, meiotic metaphase II.



什麼是“克隆”？

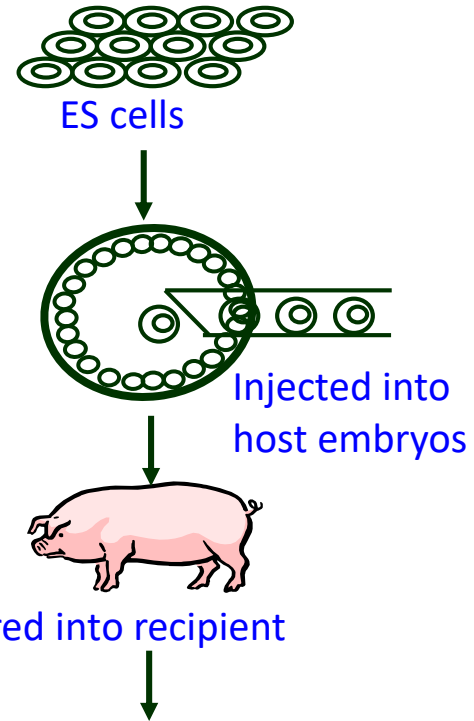
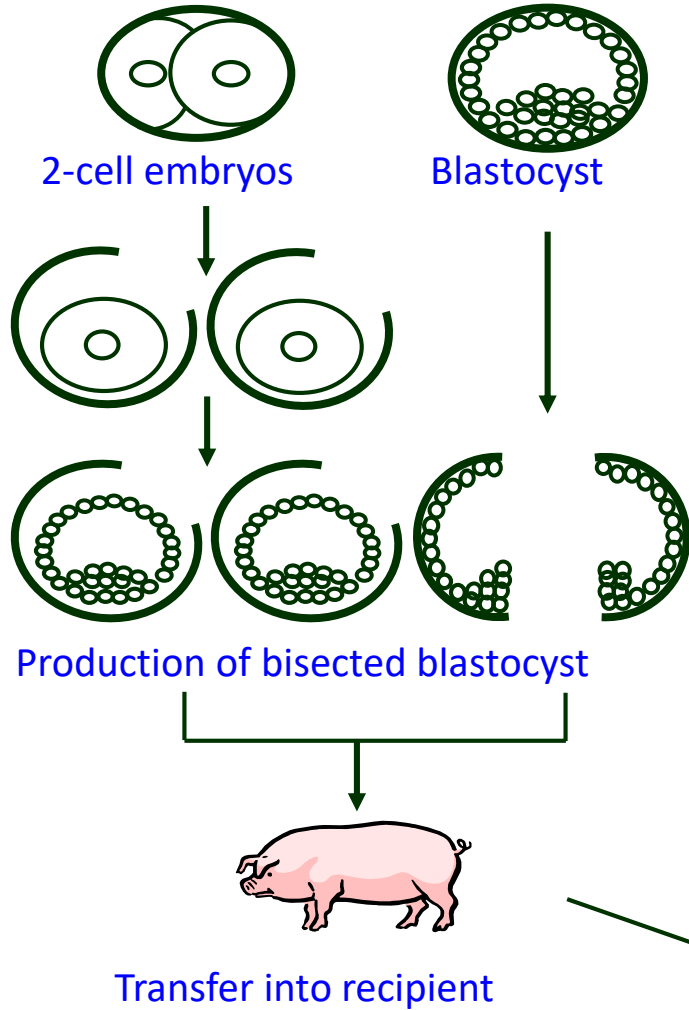
“clone” - “無性繁殖”

亦稱“生命複製”

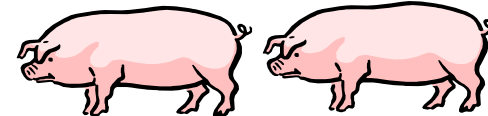
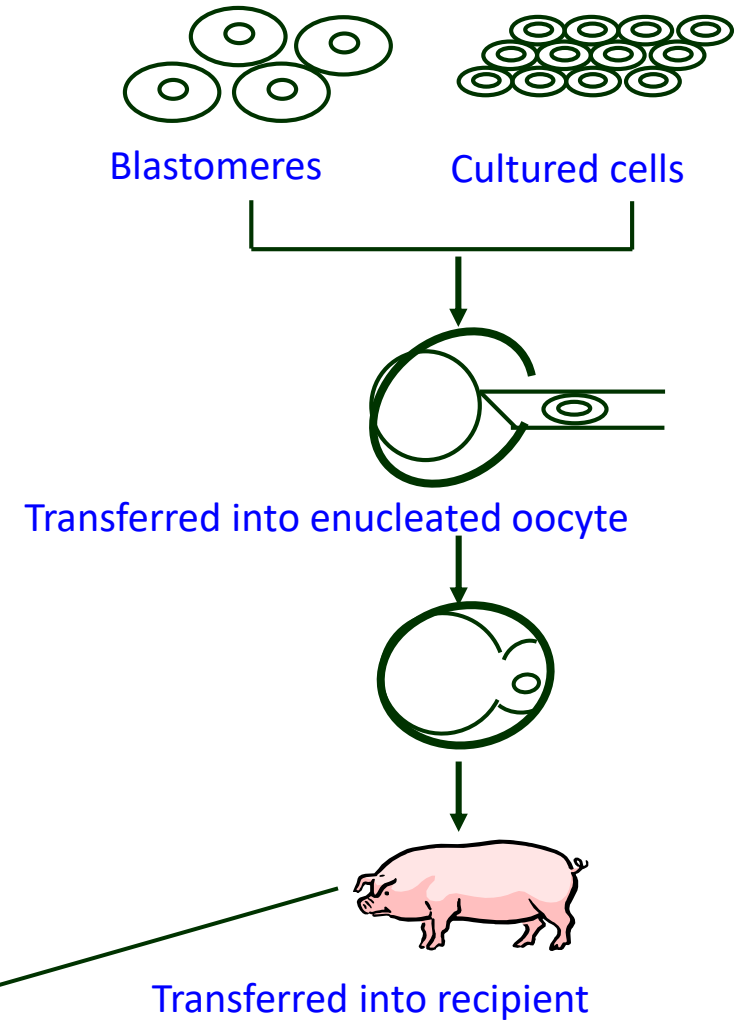
略過精卵受精過程

# ANIMAL CLONING PROCEDURE

Blastocyst(4N) with ES cells



Nuclear transfer



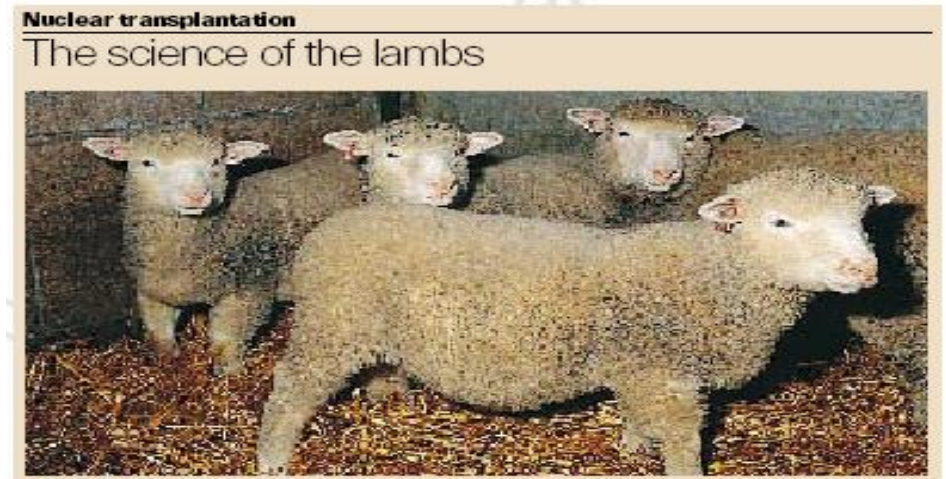
# 體細胞複製家畜之首例



**Professor Ian Wilmut**



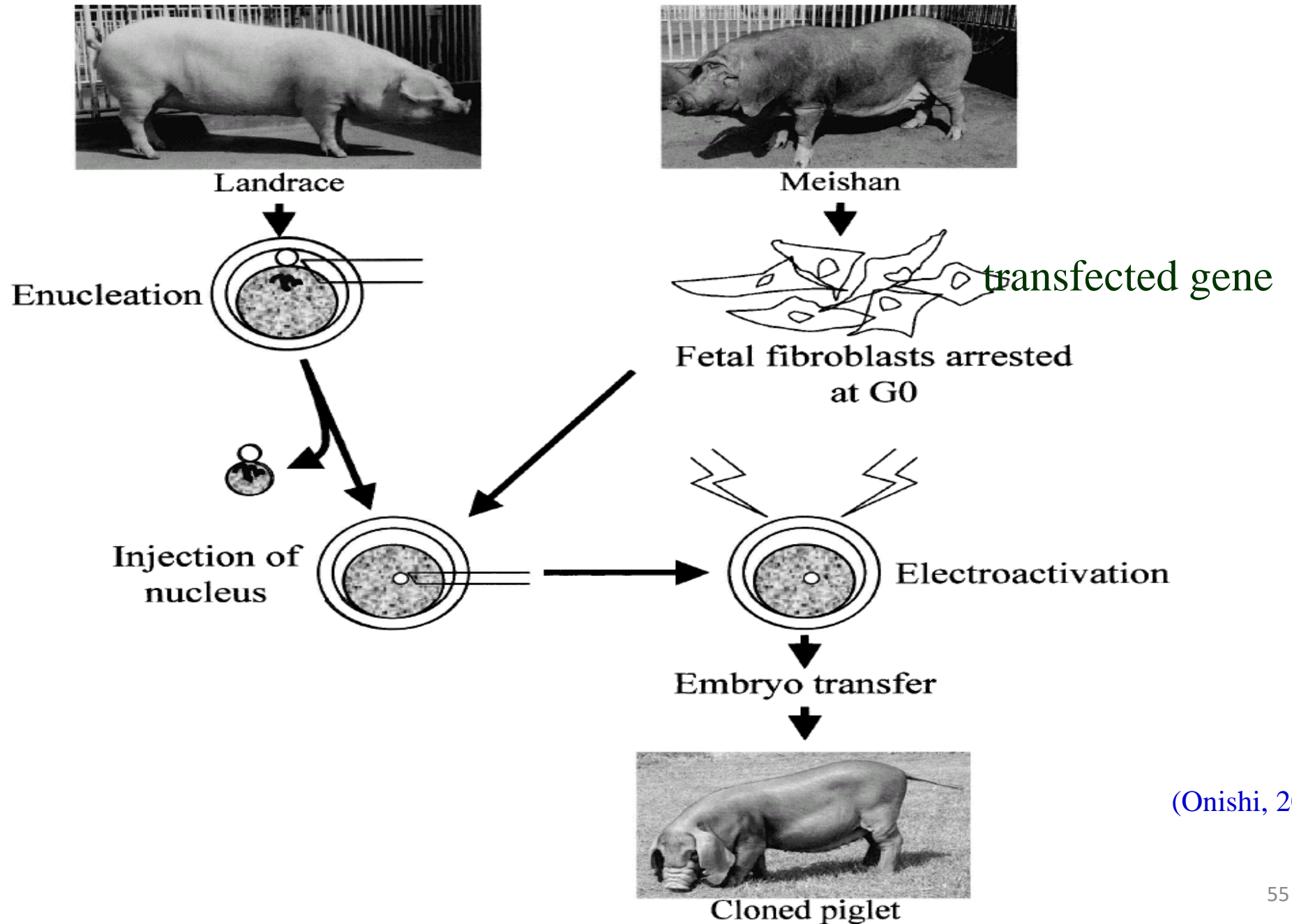
**體細胞複製綿羊-Dolly**



**基因轉殖複製綿羊-Polly**

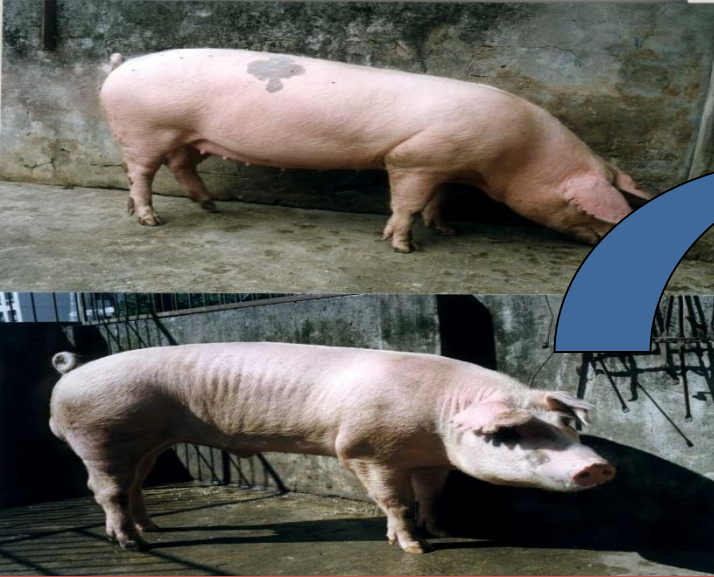


# Somatic cell nuclear transfer for transgenic pig cloning



(Onishi, 2002)

# 酷比豬之血緣



我才是真正的酷比之父，因酷比姊妹都是我女兒的分身，我們的血脈始終是相連著。

攜帶豬乳鐵蛋白及人類凝血第九因子之雙基因轉殖豬

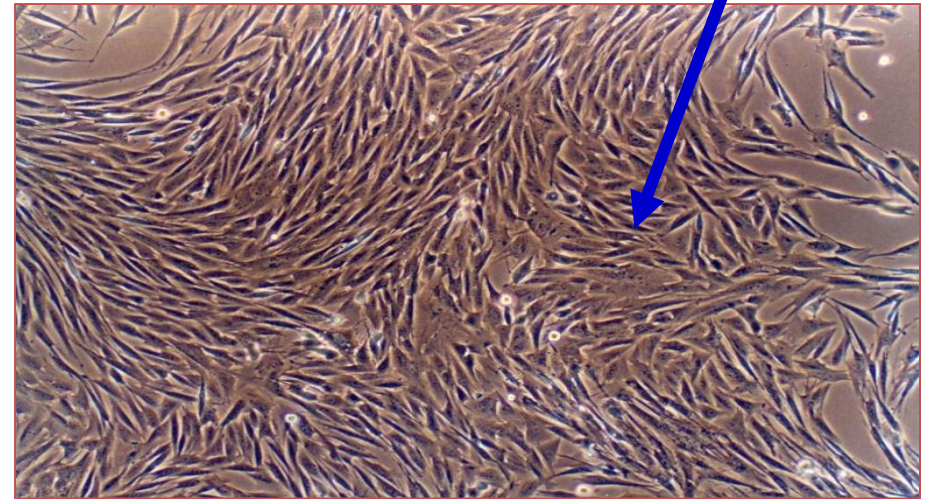


供核母豬

我是“本尊”，出生在台灣動物科技研究所，某天傍晚主人從我耳朵上取了一點皮膚，後來.... 後來.... 就有了酷比姊妹



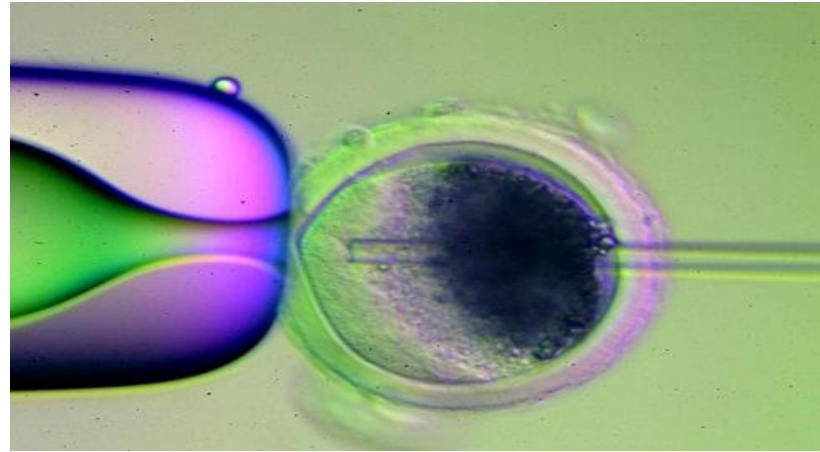
核移植



她們既不是我的孩子，也不是我的姊妹，她們是本尊生命之延續.....



# 體細胞核移植技術在農業及生物醫學之應用

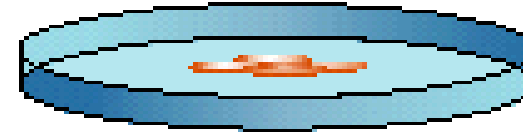


複製家畜



- ◆ 基因轉殖複製
- ◆ 指定位置基因轉殖
- ◆ 產製性別及遺傳組成一致性家畜
- ◆ 複製優良種畜
- ◆ 瀕臨絕種動物之複製
- ◆ 異種器官移植

建立胚幹細胞



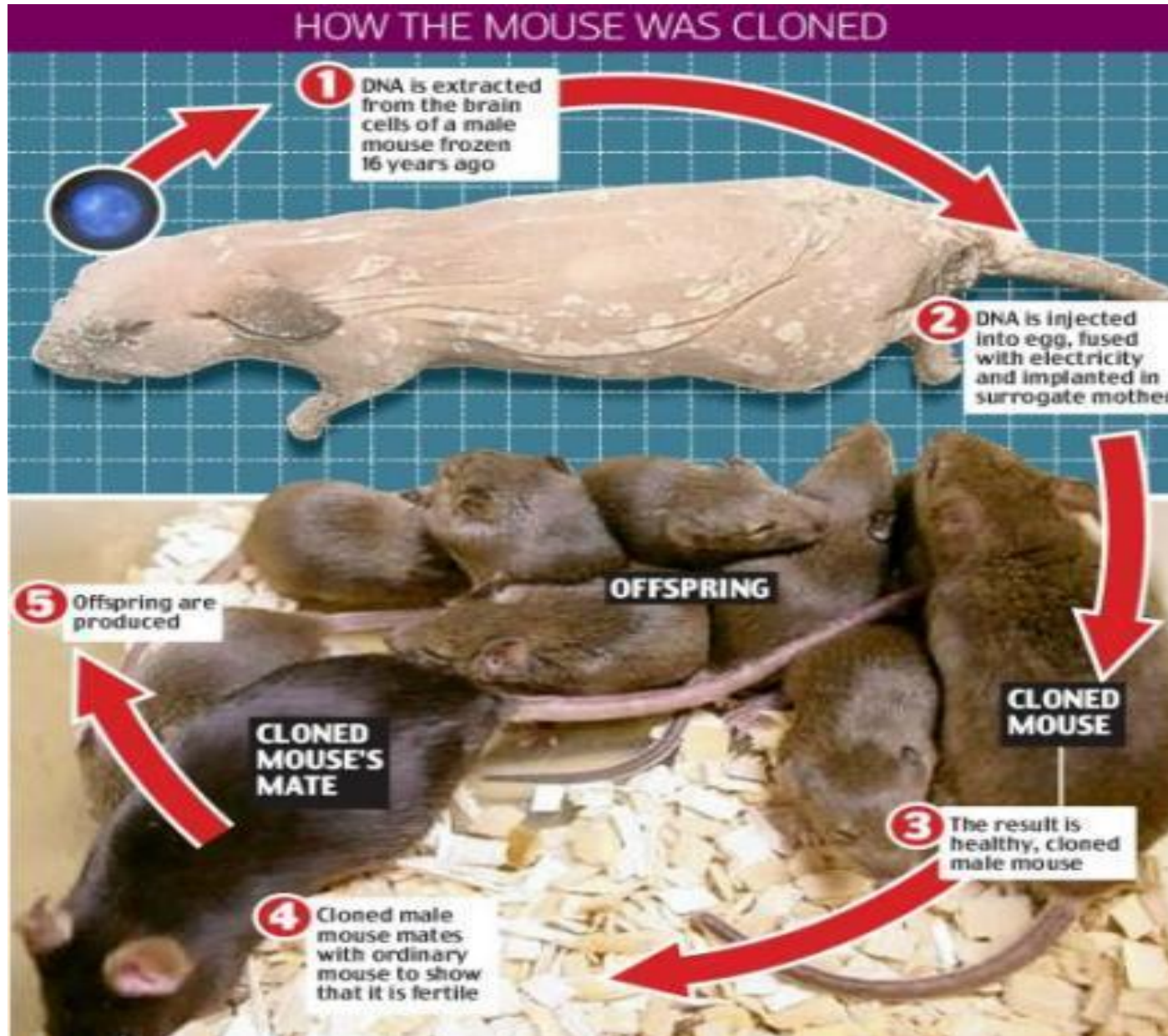
- ◆ 提供自體細胞移植
- ◆ 治療用複製
- ◆ 藥物篩檢



# 完整細胞之冷凍保存



# 冷凍16年的小鼠細胞可以被克隆



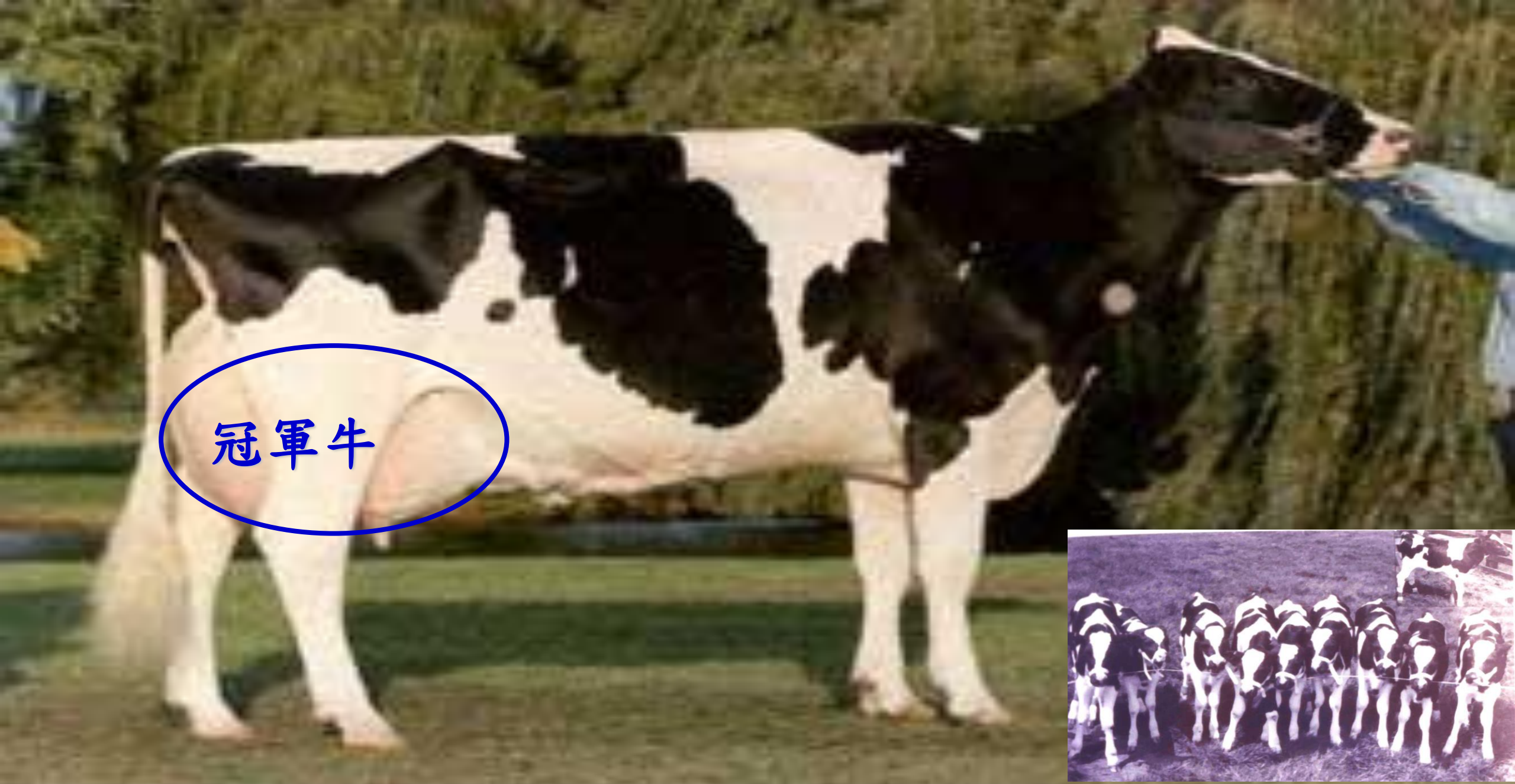


# 長毛象重現地球？





產業應用面：  
創造就業機會



冠軍牛



provided by Hoard's Dairyman





優良種公豬之複製





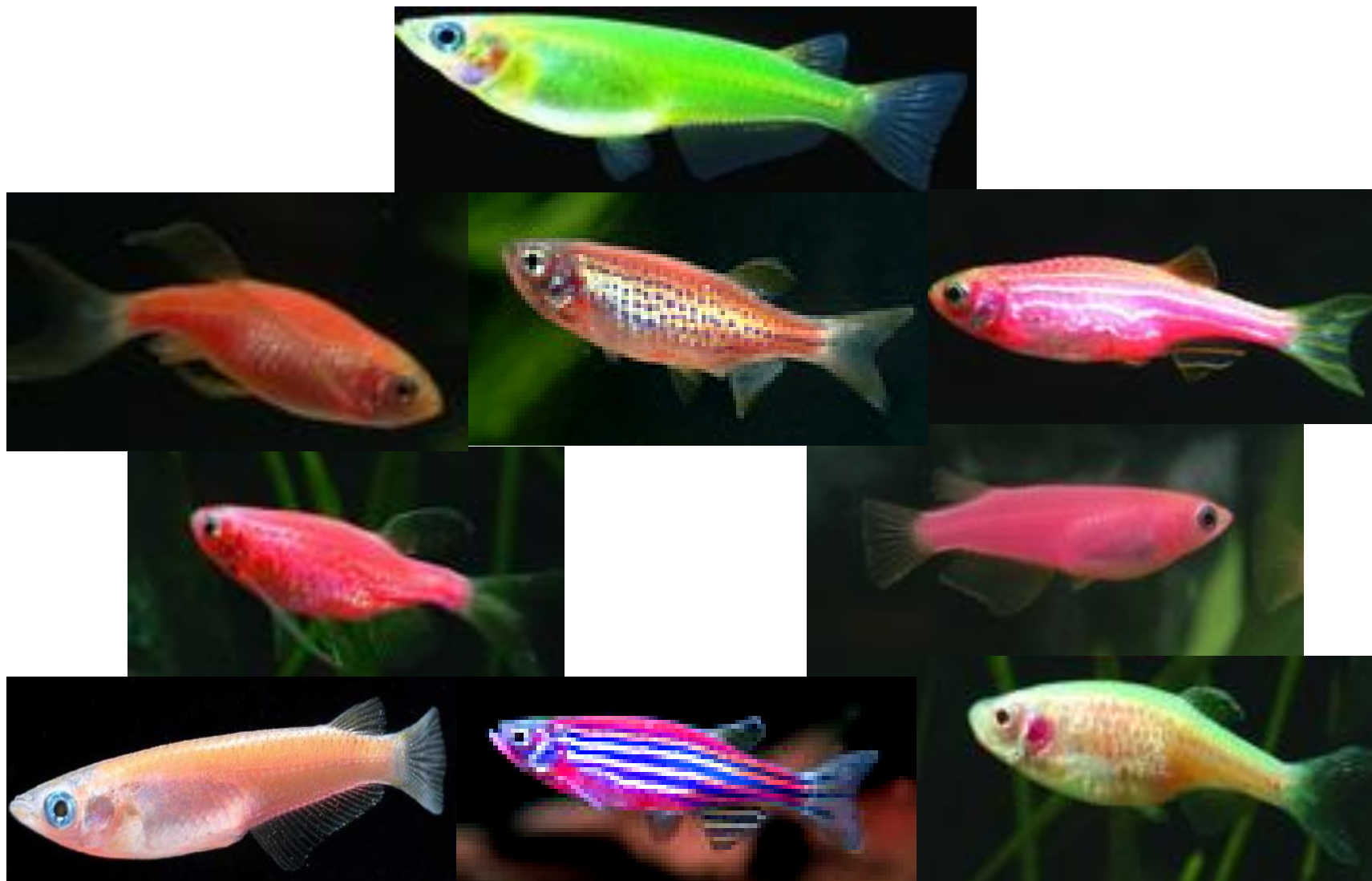


瀕臨絕種亞洲野牛  
Endangered Asian gaur



複製亞洲野牛諾亞- Noah

# 漁業生技-觀賞用螢光魚







# 寵物複製



商品：  
技術、專利及其衍  
生產品



## 表現紅螢光蛋白質之複製狗

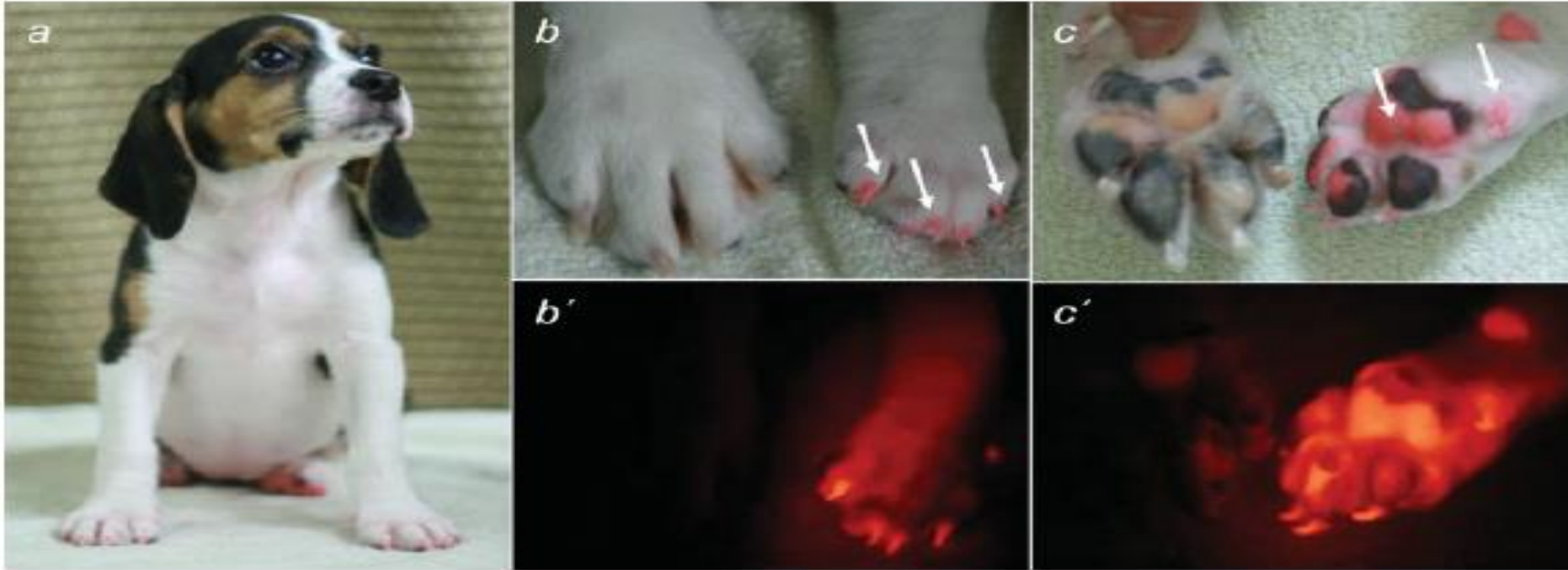
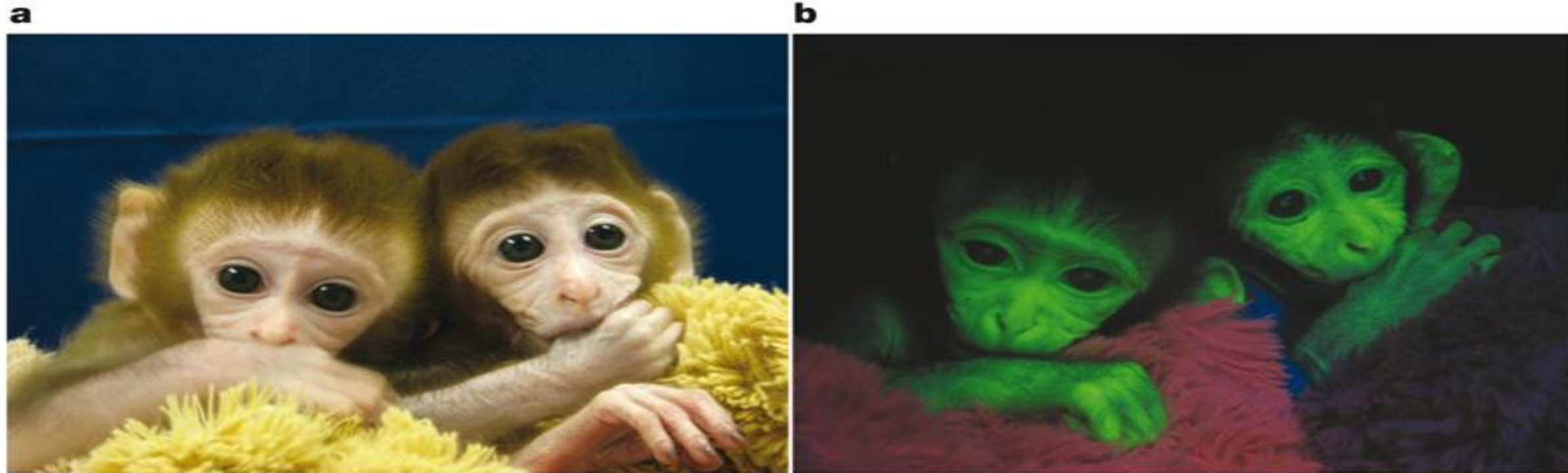


FIG. 3. (a) The first transgenic cloned beagle with the *RFP* gene at 2 months old (R1, also named Ruppy, for Ruby-puppy). (b, c) Dorsum (b and b') and plantar (c and c') part of the forepaw of Ruppy and a nontransgenic beagle (control). Expression was observed in Ruppy (right) but not in the control (left). Notice that the claws and pads of Ruppy were tinged with red even in bright field illumination. (a-c) Visible light image. (b', c') Fluorescence image.

# 研究人類Huntington's disease模式用之綠色螢光猴

Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate



a: 明視野光源條件下之表現綠色螢光猴

b: 藍光照射及黃色濾片條件下之表現綠色螢光猴

# 醫學治療用複製模式—避免排斥

病人 → 體細胞分離 → 卵母細胞去核



體細胞核移植



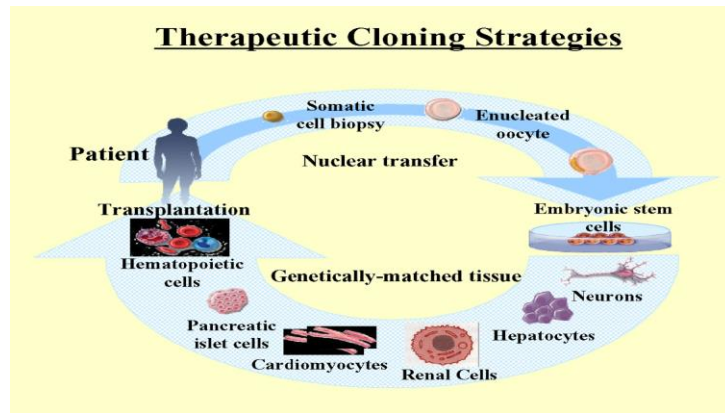
複製囊胚



胚幹細胞分離



體外誘導分化



病人自體細胞移植



國家地理頻道錄製一年(2007~2008)之螢光豬研發歷程  
 ——超級豬同時向全球八十個國家播放，持續三年。



# 台灣亮起來——創新及國際觀





# 未來展望

1. 產、官、學、研緊密結合
2. 建立再生醫學用途之人類相關疾病臨床動物模式。
3. 整合幹細胞、組織工程及再生醫學之國內外研究團隊，加速幹細胞生物學之研究發展及臨床應用。
4. 幹細胞銀行之成立
5. 加強動物生殖管控以穩定物價及平衡生態