

應用電穿孔法處理雞精子作為基因載體產生 基因轉殖雞之可行性⁽¹⁾

劉振發^{(2) (3)} 劉瑞珍⁽²⁾ 戴謙⁽⁴⁾ 蕭振文⁽²⁾ 黃木秋⁽⁵⁾
陳立人^{(2) (6)}

收件日期：96年8月30日；接受日期97年2月14日

摘要

將採集的新鮮精液(精液品質：活精子數 90%以上、精子活動力 3+ 以上)加入含有蔗糖 (sucrose) 等成分之電擊液及外源抗胰蛋白酶基因混合，經電融合處理後的精子立即至現場進行人工授精測試，結果顯示其受精率為 50%、孵化率 85%，孵出雛雞於 3 週齡採血，以 PCR 檢測有 55%呈現陽性。

經檢測呈現陽性反應者每間隔 2 週持續採血一次，以追蹤外源抗胰蛋白酶基因呈現陽性反應的持續性。合計獲得 8 隻約 5 月齡之 G0 代基因轉殖雞，其基因組 DNA 經 PCR 檢測後之產物進一步進行基因定序分析，結果與 $\alpha 1$ - 抗胰蛋白酶基因序列比對有 99%的相似性，此結果顯示基因轉殖雞帶有 $\alpha 1$ - 抗胰蛋白酶基因，但在這些基因轉殖雞達 10 月齡左右之後，則外源基因無法再被檢出。

關鍵詞：精子載體、基因轉殖雞、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶。

緒言

利用禽蛋作為人類藥用蛋白之來源有其特殊的優勢，包括家禽之世代間距短，繁殖力強，禽蛋中蛋白質含量高及純化方法已建立等。然而，家禽為卵生動物，與豬、牛等哺乳動物有異，若要同豬、牛等哺乳動物以受精卵原核顯微注射法來進行基因轉殖有其困難性；家禽基因轉殖技術在世界各國尚屬開發階段，目前研究的方法包括：利用 retroviruses 來轉染、採用基因的直接注射法、利

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1419號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 國立成功大學生物科技研究所。

(4) 南台科技大學。

(5) 國立中興大學動物科學系。

(6) 通訊作者，E-mail：lrchen@mail.tlri.gov.tw。

用 lipofection 方法轉染胚葉細胞或始基生殖細胞後再注入宿主胚或個體及精子載體法等；其中以精子載體法最具方便性及實用性，惟應用上必須考慮如何將外源性基因與精子表面結合，以及如何使外源性基因進入其細胞核內並嵌入精子原有之基因中，這些相關技術有待逐一克服。

一般利用精子為載體的方法可分為（1）精子與外源 DNA 共同培養法：為藉由精子本身可攜帶外源 DNA 之特性，直接將精子與外源 DNA 共同培養後，再將攜帶外源 DNA 之精子進行人工授精，產製基因轉殖動物。（2）物理或生物媒介協助外源 DNA 進入精子法：為精子本身具攜帶外源 DNA 之特性，但若藉由電穿孔、微脂粒轉染或反轉錄酶感染等某些物理或生理媒介方式處理，可協助外源 DNA 穿過細胞膜，則可提高其進入精子核內之效率，且外源 DNA 若藉由濃縮方式受到額外保護更可促使其在精子核內呈現較穩定狀態，防止遭受細胞內酵素的破壞。（3）卵細胞質內單一精子顯微注射法（intracytoplasmic sperm injection, ICSI）：本法目前廣泛用於人類男性不孕症的治療，其方法將單一精子自尾部吸進特製的顯微注射管內，藉由針管穿過透明帶與卵之細胞質，直接將精子注射至卵細胞質內進行受精作用，利用此法可將帶有外源 DNA 的精子直接注入卵子內來進行轉基因動物的生產。（4）睪丸內生殖細胞轉染法（intratesticular transfection of germ cells）：精子的發生為睪丸內生精細管基膜上之精原細胞分裂及分化變態而成，故若直接將外源 DNA 送入睪丸內，並促使其進入生精細管嵌入精原細胞基因組 DNA（genomic DNA；gDNA）內，則預期往後所生產之精子的 gDNA 理論上應含有外源 DNA，藉此來產製轉基因動物。

在上述的四種方法中，以精子與外源 DNA 共同培養法及物理或生物媒介協助外源 DNA 進入精子法在操作上不需有顯微注射及活體外科手術等特殊技術。因此，本研究以電穿孔法，將外源性基因導入家禽的精子內，嘗試建立一套簡便及有效率的家禽基因轉殖方法。

材料與方法

I. 公雞的精液採集及品質檢查

利用畜產試驗所飼養的來亨公雞，以按摩法採集公雞精液 (Lake, 1957)，平均每隻公雞每次所採集的精液量約 0.3 ml，精液濃度約為 $4.5-5 \times 10^9$ sperms/ml。每隻公雞每次所採集的精液先以顯微鏡檢查，主要檢查項目包括精子的活動力及活精子率。

精子的活動力檢查是精子的運動方式評估，精子運動方式可分為振擺圓圈運動（vibratory circular）、前進運動（darting）及旋轉運動（rotating）三種，並將精子活動力的評估分為 5 級，分別為+++：最活潑前進的精蟲、++：活潑前進的精蟲、+：緩慢前進的精蟲、±：擺動迴旋後退的精蟲及－：停止運動的精蟲；將+++與++相加以百分比表示精子的活力比（Verstegen *et al.*, 2002）。

活精子率檢查是以 SYBR-14 和 PI (propidium iodide) 兩種螢光染料來執行，SYBR-14 是一種專染精子核內 DNA 的非致死性螢光染色劑，可輕易地滲透過精子的細胞膜並與存活細胞的 DNA 結合，使精子呈現綠色螢光。而 PI 則染已失去活性的精子，使精子呈現紅色螢光。SYBR-14 原液濃度為 1 mM，以 DMSO (dimethyl sulfoxide) 稀釋 100 倍後使用；PI 原液濃度為 2.4 mM。取 PI 原液及已稀釋的 SYBR-14 溶液各 1 μ l，再加入 10 μ l 的精液混合，然後以螢光顯微鏡於 488 nm 波長條件下進行精子存活率的檢測（劉等，2003）。活精子率的計算為：活精子數 / （活精子數 + 死精子數） \times 100。

鏡檢後精子活力需在 90% 以上，死精率 < 10%，達此標準的精液才將其混合，並進行電穿孔的基因轉殖測試。在進行電穿孔的基因轉殖測試後，精子亦使用上述方法進行活動力及活精子率的檢查。

II. 精漿移除處理

經過品質檢查後的精液隨即加入原精液體積 1~2 倍的生理食鹽水混合後，以離心 ($130\times g$ ，10分鐘) 方式移除精漿的部分。移除精漿後加入電穿孔液 (內含有 sucrose、 $MgSO_4$ 、Tris-HCl 等成分)，加入的量為回復原有精液 1 倍體積的量，如原精液為 0.3 mL，則在去除精漿後加入 0.3 mL 的電穿孔液及外源 DNA 混合後再進行電穿孔處理。

III. 精子的電穿孔基因轉殖

本試驗使用 BTX Electro Cell Manipulator ECM2001 型 (美國製) 的電穿孔儀進行精子的基因轉殖。取 290 μL 的精液，放入電擊用小瓶再加入的 DNA 混合後進行電穿孔處理。分別以 30 μs ，60 V，3 pulse、30 μs ，60 V，4 pulse 和 30 μs ，60 V，5 pulse 等三種不同的電穿孔條件，來探討精子經電穿孔處理後的存活率。

IV. 外源基因的處理

本實驗選用中興大學畜產系黃木秋老師提供之 α -1 抗胰蛋白酶 (human α -1 antitrypsin；hAT) 基因 (pCMV hAT) (圖1) 做為基因轉殖的外源基因。本重組載體含有 CMV/hAT 融合基因。其中 CMV (0.85 kb) 是一種很強的 promoter，其後接的 coding sequence 為人類 α -1 抗胰蛋白酶 (1.3kb) 基因。基因轉殖前以 *Bgl* II 和 *Pme* I 兩種核酸限制酶剪切，可切出 2,352 bp 和 4,440 bp，2 個片段；回收 2,352 bp 片段 (含 CMVhAT 至終止碼整個片段) 進行基因轉殖用。本試驗分別以 0 $\mu g/\mu L$ 、10 $\mu g/\mu L$ 、20 $\mu g/\mu L$ 、30 $\mu g/\mu L$ 和 40 $\mu g/\mu L$ 等不同濃度的 DNA 進行精子的轉染，以探討不同 DNA 濃度的轉染對精子結合外源 DNA 的影響。

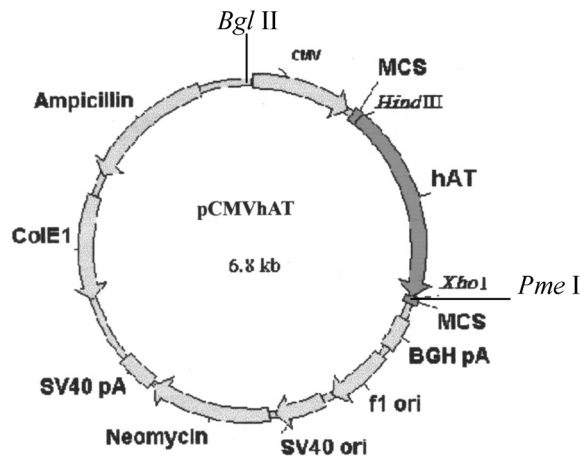


圖 1. 人類 α -1 抗胰蛋白酶基因 (pCMV hAT) 的圖譜。

Fig. 1. Map of human α -1 antitrypsin (pCMV hAT).

V. 精子經電穿孔基因轉殖處理後的受精率與孵化率

完成電穿孔基因轉殖處理的精液，以人工授精方式進行配種，共進行 20 隻母雞的配種，並

於配種後的第 2 天開始收集受精蛋，持續收集 5 天。受精蛋先暫存貯蛋室（溫度 15℃，相對溼度 70%），待所有的受精蛋收集完畢後才統一孵化，並進行受精率與孵化率的統計。受精率檢測是於孵蛋後的第 7 天進行照蛋檢查，並於孵蛋後的第 21 天計算受精蛋的孵化率（孵出雛雞數/受精蛋×100）。

VI. 外源基因的檢測

G0代的小雞孵出後，待其達三週齡時再從其翼下進行血樣採集，以 PCR 方式測試 G0 代小雞之血球中是否帶有外源性 DNA。PCR 檢測所使用 primer 的序列為：hAT-P1 (F) 5'-GAATCGACA ATGCCGTCTTCTG-3' 及 hAT-P2 (R) 5'-AATTTTCCCTTGAGTACCCTTCTCC-3'。反應條件為：98℃，15 分鐘；94℃，30秒、56℃，45秒、72℃，1 分鐘持續 40 個循環；72℃，10分鐘。PCR 反應後呈陽性反應者，經電泳分析可得到一條 588bp 的產物。

VII. PCR 產物序列分析與比對

除了以 PCR 的方式進行外源基因的檢測外，並將 PCR 的產物回收進行定序分析與比對以作為進一步確認。利用 DNA 序列分析儀 (ABI 3730) (Applied Biosystems Inc., CA) 並依其方法進行 PCR 產物之序列分析。完成序列分析的資料利用 Vector NTI (Infor Max Inc., USA) 連接到 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 進行 DNA 序列 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比對。

VIII. 統計分析

本試驗不同 DNA 濃度與電場強度對精子活力的影響所得資料，是使用完全逢機區集 (RCBD) 模式進行變方分析，並以鄧肯氏多變域測定法 (Duncan's multiple range test) 比較處理間平均值之差異顯著性。

結果與討論

I. 不同 DNA 濃度與電場強度對精子活力的影響

電穿孔法將外源 DNA 導入精細胞，讓精子帶有外源 DNA 其主要原理，乃將精子置於瞬間高電場之環境中，使細胞膜產生暫時性之孔洞，從而允許膜外之 DNA 進入細胞內。在前人研究中指出利用電穿孔進行精子的基因轉殖時，電場強度與外源 DNA 添加的濃度與精子活力有關。因此，本試驗也嘗試探討不同 DNA 濃度與電擊強度對精子活力的關係；將 DNA 濃度分別調整為 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，再搭配 30 μs ，60 V，3 pulse、30 μs ，60 V，4 pulse 和 30 μs ，60 V，5 pulse 等三種不同電穿孔條件處理來觀察其對精子存活力與活動力的影響，經以不同條件處理後的精子以 SYBR-14 和 PI 螢光染劑進行檢測。結果顯示精子的存活率與活動力會隨著電擊強度與 DNA 濃度的提升而下降（表1、表2）。

表 1. 不同 DNA 濃度與電擊強度對精子活動力的影響

Table 1. Effects of DNA concentration and electrical conditions on mobility of spermatozoa

Electrical conditions	DNA concentration ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$)					Mean
	40	30	20	10	0	
	----- Mobility (%) -----					
30 μs , 60 V, 3 pulse	73	78	78	80	90	79.8 ^A
30 μs , 60 V, 4 pulse	70	75	76	80	90	78.2 ^A
30 μs , 60 V, 5 pulse	65	70	72	78	90	75 ^B
Mean	69.3 ^d	74.3 ^c	75.3 ^c	79.3 ^b	90 ^a	

^{abc} Means on the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

^{AB} Means on the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

表 2. 不同 DNA 濃度與電擊強度對精子存活力的影響

Table 2. Effects of DNA concentration and electrical conditions on survival rate of spermatozoa

Electrical conditions	DNA concentration ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$)					Mean
	40	30	20	10	0	
	----- survival rate (%) -----					
30 μs , 60 V, 3 pulse	81	84	84	85	90	84.8 ^A
30 μs , 60 V, 4 pulse	75	79	80	83	85	80.4 ^B
30 μs , 60 V, 5 pulse	67	70	75	80	82	74.8 ^C
Mean	74.3 ^d	77.6 ^{dc}	79.6 ^{bc}	82.6 ^{ba}	85.6 ^a	

^{abcd} Means on the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

^{ABC} Means on the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

應用精子載體法來產製基因轉殖動物，首先必須將精子與外源 DNA 進行混合共培養，在 1971 年 Brackett *et al.* 將兔子精子與經過 H^3 -thymidine 標定的 DNA 進行混合共培養的試驗中觀察到約有 30~35 % 的精子頭部可被偵測到有放射線物質的存在，證明了哺乳動物的精子具有與外源基因結合的能力。精子與外源 DNA 的結合位置並非隨機發生，Atkinson *et al.* (1991) 以自動放射顯影技術，利用牛的精子與經 ^{32}P 標示的外源 DNA 結合試驗，指出大部分的 DNA 與精子結合的位置是在精子頭巾的後區 (postacrosome region)，類似的結果也呈現在其他動物如兔子 (Brackett *et al.*, 1971)、小鼠 (Lavitrano *et al.*, 1989)、雞 (Cook *et al.*, 1990)、牛、水牛、豬、羊、綿羊 (Castro *et al.*, 1990)。Lavitrano *et al.* (1992) 以等電點 (isoelectric point, PI) 小於 7.0 的蛋白質、肝素 (heparin) 或 dextran sulphate 等負電荷的大分子，與精子混合共培養測試，結果這些負電荷的大分子其與精子結合的位置亦與外源 DNA 相似，此等結果推測可能係 DNA 分子帶負電荷的關係，導致與精子頭巾後區有較好的結合能力。有關精子電荷分佈情形 Veres *et al.* (1976) 曾以源自公牛副睪尾部的精子，利用電泳技術進行研究，證明在精子尾部及頭巾前區具有較高的負電荷分子。已知 DNA 分子是帶負電荷，而在上述諸多的文獻指出外源 DNA 與精子結合的位置是

在頭巾後區，推測可能在精子頭巾的後區存在有帶正電荷的分子，以致該部位能結合較多的外源 DNA。

精子本身雖具有與外源 DNA 結合的能力，但為求讓精子能結合更多量的外源 DNA 分子，常輔以其他物理或生物媒介來協助外源 DNA 進入精細胞內，常用的方法有電穿孔法 (Horan *et al.*, 1992)、微脂粒法 (Bachiller *et al.*, 1991)、反轉錄病毒感染法等方式協助外源 DNA 穿透細胞膜，藉以提高其進入精子核內的效率，且外源 DNA 若藉由濃縮方式受到額外的保護，如此更可使外源 DNA 在精子的核內呈現較穩定的狀態，以減少遭受細胞內酵素的破壞 (Rottmann *et al.*, 1992; Kircheis and Wagner, 2000)。然而，以電穿孔方式雖可提升外源 DNA 進入精細胞內的比率，但在處理過程中不論電脈衝次數的多寡，精子的活動力都將隨著電場強度的增加而減弱，且頭巾的受損率也會隨著電場強度的增加而提升 (鄭及陳, 1995)，在本實驗也呈現相同的結果。除了電穿孔條件會影響處理後精子的活力外，外源 DNA 的濃度亦會對精子的活力造成影響，當外源 DNA 進入精子細胞後，此時細胞核內的內生性核酸酵素 (endogenous nucleases) 會活化，這些酵素會將進入精子細胞內的外源 DNA 截切 (digestion) 成小片段的 DNA，使外源 DNA 的結構改變；細胞核內的內生性核酸酵素的活性與外源 DNA 是呈現劑量效應 (dose-dependent) 的關係 (Maione *et al.*, 1997)。本實驗利用電穿孔法將外源 DNA 轉染到精子，雖然在處理後精子的存活率及活動力結果顯示，以 $10 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ DNA 經 $30 \mu\text{s}$, 60 V , 3 pulse 最佳， $40 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ DNA 經 $30 \mu\text{s}$, 60 V , 5 pulse 最差。然而，為了考量精子攜帶外源 DNA 的效率及人工受精的受精率，本實驗選擇以 $30 \mu\text{s}$, 60 V , 5 pulse 的電穿孔條件及 $30 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ 的 DNA 濃度來進行精子外源基因轉殖處理。

II. 電穿孔處理後精子的受精率與孵化率

精子在經鏡檢及去精漿處理後，以 $30 \mu\text{s}$, 60 V , 5pulse 的電穿孔條件及 $30 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ 的 DNA 濃度來進行基因轉殖處理，處理後的精液以 SYBR-14 和 PI 兩種螢光染劑進行精子存活率檢查其存活率約為 70%，處理後的精液立即攜至現場進行人工授精測試，每隻母雞的受精量為 0.1 ml，本試驗共進行 20 隻來亨母雞的授精，並於第 2 天開始持續收集受精蛋 5 天。共收集 132 顆受精蛋，經進行孵化後其受精率為 50.7%、孵化率 85.7% (表 3)，共孵出 57 隻 G0 代的雛雞。

表 3. 精子與外源基因 (hAT) 混合經電穿孔處理，再行 AI 後之受精率、孵化率

Table 3. Fertility and hatchability of artificial insemination after sperm gene transfer by electroporation

No. of hen	No. of eggs collected	Fertilized rate (%)	Hatching rate (%)
20	132	50.7 (67/132)	85.7 (57/67)

III. 基因轉殖雞 α -1 抗胰蛋白 (hAT) 基因檢測

結果顯示有 54.4% (31/57) 的雛雞呈陽性反應 (表 4)，進一步針對基因轉殖雞分別於孵出後 96、150 日齡和 300 日齡進行外源基因的檢測。於 21 日齡檢測呈陽性反應的雛雞有 31 隻，在飼養過程有部分雛雞死亡，於 96 日齡和 150 日齡時存活受檢測的雛雞分別為 29 隻和 14 隻，這些存活的雛雞再以 PCR 檢測，呈現陽性反應者在 96 日齡為 38% (11/29)、150 日齡為 67% (8/14) (表 4 與圖 2)。

表 4. 以 PCR 檢測 21 日齡~300 日齡 G0 代的基因轉殖雞外源基因 (hAT) 的檢出率

Table 4. PCR analysis of 21~300-day-old G0 chicken containing the α 1-antitrypsin gene

	Age at detection period			
	21-day-old	96-day-old	150-day-old	300-day-old
PCR of %	54.4%	38%	67%	0%
positive	(31/57)	(11/29)	(8/14)	(0/8)

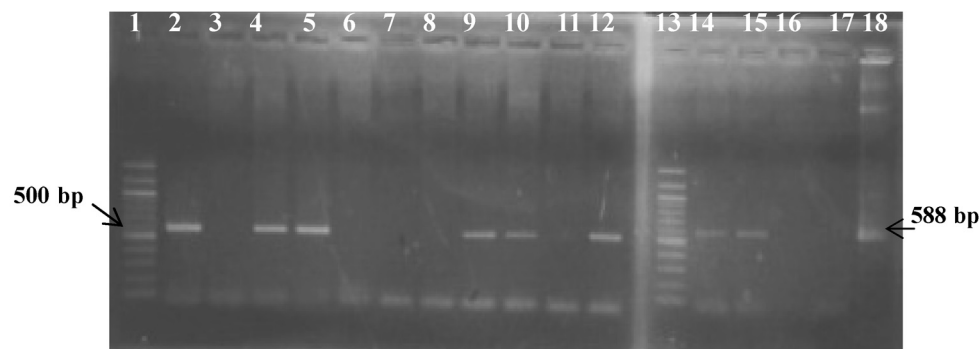


圖 2. 以 PCR 反應檢測基因轉殖雞 (150 日齡) 外源基因的表現。Lane 1 和 lane 13 為 100 bp ladder marker；lane 2 至 lane 12 和 lane 14 至 lane 15 為基因轉殖雞；lane 16 為非基因轉殖雞（- 對照組）；lane 17 為水（空白組）；lane 18 為 hAT DNA（+ 對照組）。

Fig. 2. PCR analysis of 150-day-old G0 chickens containing the α 1-antitrypsin gene. Lane 1: 100bp marker, lane 2-15: G0 chicken, lane 16: non-transgenic (negative control), lane 17: H₂O (blank), lane 18: α 1- antitrypsin DNA (positive control).

將 150 日齡 PCR 分析產物樣品進行定序比對，結果與 α 1- 抗胰蛋白酶基因序列比對有 99% 的相似性（圖3），此結果顯示 G0 代的基因轉殖雞帶有 α 1- 抗胰蛋白酶基因，但這些基因轉殖雞飼養到 10 月齡之後，外源基因無法再被檢出。外源基因的檢測比率會隨著雞隻的成熟而逐漸減少，這種現象是否表示利用電穿孔法並無法將外源 DNA 有效的插入到精子染色體中，而只是以游離體（episome）形式存在於精細胞內。

在先前報告中亦有學者利用精子與 DNA 共培養的方法來進行家禽基因轉殖的研究，結果顯示應用此方法確實可讓精子帶有外源 DNA，但經此法所產製的 G0 子代其外源基因均為短暫性的存在（Gavora *et al.*, 1991）；另外 Nakanishi and Iritanu（1993）以電穿孔進行雞精子的基因轉殖，結果指出經過電穿孔處理的精子有 88 % 在頭巾部位可偵測出外源 DNA，經人工授精後，孵出 31 隻雛雞，經檢測有 23% 的小雞帶有外源 DNA，但也是短暫性的存在；在同一試驗中電穿孔法的效率與微脂粒轉染法及共培養法相比較，其效率偏低，此種現象作者的推論可能是精子在經歷電穿孔處理後頭巾受到傷害，導致無法參與受精作用所致。在本試驗中 57 隻雛雞檢測的結果有 54.4%（31/57）呈陽性反應，雖然較 Nakanishi and Iritanu（1993）報告中的 23.0% 高，但外源基因的表現也是屬短暫存在（僅持續表現約 150 天）。在其他研究雞之基因轉殖報告中，都曾先後以精子作為外源基因之轉殖途徑而成功地以 PCR 或 Southern blot 證明外源性基因之存在（Druenbaum *et al.*, 1991；Rottmann *et al.*, 1992；1996）。不過以精子帶入之外源基因常會快速地被分解，顯示動物在防止外源基因之嵌入上設有一些生理性的防禦措施（Aguirre *et al.*, 1995）。

```

Query: 13  ctgctggcaggcctgtgctgcctgggtccctgtctccctggctgaggatccccagggagat 72
          |||
Sbjct: 50  ctgctggcaggcctgtgctgcctgggtccctgtctccctggctgaggatccccagggagat 109

Query: 73  gctgccagaagacagatacatcccacatgatcaggatcacccaaccttcaacaagatc 132
          |||
Sbjct: 110 gctgccagaagacagatacatcccacatgatcaggatcacccaaccttcaacaagatc 169

Query: 133  accccaacctggctgagttcgcttcagcctataccgccagctggcacaccagtccaac 192
          |||
Sbjct: 170 accccaacctggctgagttcgcttcagcctataccgccagctggcacaccagtccaac 229

Query: 193  agcaccaatatcttcttctccccagtgagcatcgctacagcctttgcaatgctctccctg 252
          |||
Sbjct: 230 agcaccaatatcttcttctccccagtgagcatcgctacagcctttgcaatgctctccctg 289

Query: 253  gggaccaaggctgacactcacgatgaaatcctggagggcctgaatttcaacctcacggag 312
          |||
Sbjct: 290 gggaccaaggctgacactcacgatgaaatcctggagggcctgaatttcaacctcacggag 349

Query: 313  attccggaggctcagatccatgaaggcttccaggaactcctccgtaccctcaaccagcca 372
          |||
Sbjct: 350 attccggaggctcagatccatgaaggcttccaggaactcctccgtaccctcaaccagcca 409

Query: 373  gacagccagctccagctgaccaccggcaatggcctgttccctcagcgagggcctgaagcta 432
          |||
Sbjct: 410 gacagccagctccagctgaccaccggcaatggcctgttccctcagcgagggcctgaagcta 469

Query: 433  gtggataagtttttggaggatgttaaaaagttgcaccactcagaagccttcaactgtcaac 492
          |||
Sbjct: 470 gtggataagtttttggaggatgttaaaaagttgtaccactcagaagccttcaactgtcaac 529

Query: 493  ttcggggacaccgaagaggccaagaacagatcaacgattacgtggagaagggtactcaa 552
          |||
Sbjct: 530 ttcggggacaccgaagaggccaagaacagatcaacgattacgtggagaagggtactcaa 589

Query: 553  gggaaa 558
          |||
Sbjct: 590 gggaaa 595

```

圖 3. G0代基因轉殖雞 α -1抗胰蛋白酶基因的序列比對。

Fig. 3. Alignment and comparison of the α 1-antitrypsin gene transgenic chicken (G0) DNA sequences with its human orthologs.

雖然精子具有與外源基因結合的能力，若能使精子在結合外源基因的狀態下進行人工授精配種，理當可以透過此途徑來生產基因轉殖動物。Lavitrano *et al.* (1989) 利用此一方法成功產製了基因轉殖小鼠。另外，Gandolfi *et al.* (1989) 也利用相同方法產出基因轉殖豬，且轉殖效率達 21%，顯著的高於利用顯微注射法者 (0.1%)。然而，Brinster *et al.* (1989) 統計世界各地重複利用 Lavitrano *et al.* (1989) 所發表的方式，在 1300 餘隻的小鼠試驗中，沒有任何一隻小鼠是攜帶外源基因的轉殖小鼠。故精子載體法的應用目前仍有許多問題有待克服。但是由於此一途徑之方便性高及應用潛力大，所以迄今仍是科學家鎖定的研發重點。目前研究精子載體法的各實驗室均有能力將外源基因結合並併入精細胞內，然而僅有少數的研究報告被發表，顯然仍有一些關鍵技術尚未被克服。現今利用精子載體法來進行基因轉殖畜禽所面臨的困難包括：外源基因是否能夠確

實進入精細胞而不被精細胞內的酵素等防禦因子所破壞、外源基因不容易嵌入發育胚胎的染色質 (chromatin)、轉殖的基因發生重組或消失、及基因轉殖動物常為鑲嵌體 (mosaicism)。故利用精子載體法進行基因轉殖動物生產時，除了要增加外源基因進入精細胞的基因組中，更要提高嵌入精細胞之外源基因的穩定性，進而使外源基因能在胚胎發育的早期被完整的嵌入基因組中，如此才能使精子載體法的應用具可行性。

目前蛋白質藥物的生產大多是由細菌（如大腸桿菌）、酵母菌發酵或哺乳動物細胞（如 CHO cell）培養而得，由於此種生產方式的操作成本、原料、專業人力與品質控制等均相當昂貴，使得製造成本相當高，且生產線的設立須耗費較長的時間。因此在成本及產值效率的考量，目前世界各國的科學家多將焦點著重在如何研發基因轉殖動物來做為生物反應器 (bioreactors) 來生產這些醫療用蛋白質，近年來許多生技公司相繼投入以各種基因轉殖動物（如牛、綿羊、山羊、兔、小鼠或豬）的乳腺或血液作為生產醫用蛋白質的表現系統，期望能大幅降低藥用蛋白質的生產成本。然而，若以家禽做為基因轉殖的對象，其相較於其他哺乳類的家畜是更具優勢，包括世代間距短、繁殖力強、飼養成本低、禽蛋中蛋白質含量高及純化方法已建立、另外一些不適合以哺乳類來產製（對哺乳類細胞有害的蛋白質）蛋白質則可利用家禽來生產等 (Lillico *et al.*, 2007)。

利用精子載體法來從事家禽的基因轉殖研究迄今並無成功的案例，但利用其他的轉染法已有成功的例子如 McGrew *et al.* (2004) 以慢病毒載體 (lentiviral vectors) 為媒介注入到新鮮的受精蛋 (stage X) 的胚盤內成功產製了帶有報導基因 (eGFP 及 *LacZ*) 的基因轉殖雞，其 G0 代到 G1 代外源基因的性腺傳承 (Germ line transmission) 為 4-45 %，且這些外源基因能穩定的傳遞到 G2 代，證實了慢病毒載體是一種有效執行基因轉殖家禽產製的方法。

一般要利用基因轉殖動物做為生物反應器來生產醫療用蛋白，多會期望能讓這些外源的重組蛋白 (recombinant protein) 能夠表現在特定的組織，以利後續重組蛋白的回收及純化，在哺乳動物而言優先選擇是乳腺組織，因為乳腺組織先天就是一個具有合成蛋白質（乳汁）功能的組織。然而要讓重組蛋白在特定的組織表現，啟動子是扮演關鍵性角色；因此選殖一個具有組織表現特異性的「啟動子 (promoter)」，是在開發基因轉殖動物做為生物反應器的技術平台之過程中不可忽略的一項工作。

雞蛋中含有豐富的蛋白質在，因此大多數從事家禽的基因轉殖研究的科學家多希望能把重組蛋白在雞蛋中表現。而雞蛋中卵白蛋白 (Ovalbumin) 是構成蛋白部分的主要組成（佔蛋白部分 1/2 以上），禽類在產蛋過程中，整個產道只有在蛋白分泌部的管狀腺細胞 (tubular gland cells) 能夠表現 ovalbumin gene 分泌卵白蛋白，形成雞蛋中蛋白的主要組成。Lillico *et al.* (2007) 將源自卵管所選殖出來的卵白蛋白的啟動子構築到慢病毒載體期望藉以調控醫療用蛋白質能在卵管中表現，進而分泌到雞蛋的蛋白組成中，氏等在進行基因轉殖試驗後成功產製了基因轉殖雞，這些外源基因也能順利傳遞到 G2 代，並可從這些基因轉殖雞所產的雞蛋中得到 miR24 和 hIFN β 1a 兩種醫療用蛋白質，且具有生物活性。另外 Scott and Lois (2005) 也利用慢病毒載體成功產製具有組織表現特異性的基因轉殖鵝。Koo *et al.* (2006) 以 Moloney 應用 MoMLV- 反轉錄病毒 (Moloney murine leukemia virus, MoMLV) 載體系統成功產製一株能高效率表現「增強綠螢光蛋白」(enhanced green fluorescent protein, eGFP) 之基因轉殖雞品系，在性腺傳承後保留之 eGFP 表現水準高達 100 μ g/1mg 之組織蛋白質。經 DNA 序列分析，顯示外源基因插入第一代與第二代基因轉殖雞之第 26 號染色體。由於轉基因穩定嵌入染色體，使第三代純合型 eGFP 基因轉殖雞之生產可行性大增，提供 100 % 基因轉殖雞蛋之用。

除了直接將慢病毒載體注入到新鮮的受精蛋 (stage X) 的胚盤內成功產製了基因轉殖家禽外；也有許多科學家 (Naito *et al.*, 2007; Lavoie *et al.*, 2006) 也利用始基生殖細胞 (primordial germ cells; PGCs) 為媒介來進行雞之基因轉殖，結果僅能在胚胎階段偵測到外源基因 (eGFP) 的表現，迄今還沒有基因轉殖雞個體的產出。儘管如此，以始基生殖細胞為媒介仍是被公認具有產製基因轉殖雞的途徑之一，因為利用始基生殖細胞移植已有成功產出性腺嵌合的後代 (Lavoie *et*

al., 2006)。

家禽基因轉殖技術在世界各國尚屬開發階段，目前雖有成功產製基因轉殖雞的報告發表 (McGrew *et al.*, 2004 ; Koo *et al.*, 2006 ; Lillico *et al.*, 2007)，這些報告均是利用反轉錄病毒為媒介把外源基因轉染到胚胎，而成功將外源基因順利傳遞到下一代；然而，在一些以非病毒轉染法迄今並無成功的案例。在諸多基因轉殖法中以精子載體法最容易操作，惟至今以此法所轉入的外源基因均無法有效的嵌入染色體中，造成外源基因只能短暫表現，無法傳遞到下一代。若利用反轉錄病毒為媒介把外源基因轉染到精細胞或許是可以克服外源基因無法有效嵌入染色體之問題，進而讓外源基因穩定表現並傳承。利用基因轉殖動物為生物反應器來做為醫療用蛋白生產的技術平台，是科學家極力想達成的目標。然而，如何讓基因轉殖動物能長時間且穩定的表現外源基因，是這個技術平台能否走向商業化生產的主要關鍵。

參考文獻

- 鄭登貴、陳銘正。1995。豬精子與外源DNA之結合特性。中畜會誌 24 :289-300。
- 劉振發、吳明哲、劉曉龍、劉瑞珍、黃祥吉。2003。台灣土雞精子冷凍保存後之存活率、受精率及其受精卵之孵化率。畜產研究 36(4):369-375。
- Aguirre, A., M. Duenas, V. Falcon, N., Baranovsky, J. Gavulondo, J. De la Fuente and F. O. Castro. 1995. Fate of the heterologous DNA transferred by spermatozoa to murine myeloma-spermatozoa hybrids, and mouse embryos. *Transgenics* 1:541-552.
- Atkinson, P. W., E. R. Hines, S. Beaton, K. I. Mathaei, K. C. Read and M. P. Bradley. 1991. Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 29:1-5.
- Bachiller, D., K. Schellander, J. Peli and U. Ruther. 1991. Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol. Reprod. Dev.* 30:194-200.
- Brackett, B. G., W. Baranska, W. Sawicki and H. Koprowski. 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:353-357.
- Brinster, R. L., E. P. Sandgren, R. R. Behringer and R. D. Palmiter. 1989. No simple solution for making transgenic. *Cell* 59:239-241.
- Castro, F. O., O. Hernandez, C. Uliver, R. Solano, C. Milanese, A. Aguilar, A. Perez, R. de Arms, L. Herrera and J. dela Fuente. 1990. Introduction of foreign DNA into the spermatozoa of farm animals. *Theriogenology* 34:1099-1110.
- Cook, R. F., S. J. Cook and C. P. Hodgson. 1990. Uptake and deoxyribonuclease 1 susceptibility of foreign deoxyribonucleic acid by chicken sperm cells. *Poult. Sci.* 69:856-859.
- Dyck M. K., D. Lacroix, F. Pothier and M. A. Sirard. 2003. Making recombinant proteins in animals different systems, different applications. *Trends Biotech.* 21:394-399.
- Gandolfi, F., M. Lavitrano, A. Camaioni, C. Spadafora, G. Siracusa and A. Lauria. 1989. The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs. *J. Reprod. Fertil. Abstr.* 4:10.
- Gavora, J. S., B. Benkel, H. Sasada, W. J. P. Fiser, R. M. Teather, J. Nagai and M. P. Sabour. 1991. An attempt at sperm-mediated gene transfer in mice and chickens. *Can. J. Anim. Sci.* 71:287-292.
- Horan, R., R. Powell, S. McQuaid, F. Gannon and J. A. Houghton, 1991. Association of foreign DNA with porcine spermatozoa. *Arch. Androl.* 26:83-92.
- Horan, R., R. Powell, J. M. Bird, F. Gannon and J. A. Houghton. 1992. Effects of electroporation on

- the association of foreign DNA with pig sperm. *Arch. Androl.* 28:105-114.
- Hunter, C. V., L. S. Tiley and H. M. Sang. 2005. Developments in transgenic technology: applications for medicine. *Trends Mol. Med.* 11:293-298.
- Kirchheis, R. and Z. Wanger. 2000. Polycation / DNA complexes for in vivo gene delivery. *Gene Ther. Regul.* 1:95-114.
- Koo, B. C., M. S. Kwon, B. R. Choi, J. Kim, S. Cho, S. H. Sohn, E. J. Cho, H. T. Lee, W. Chang, I. Jeon, J. Park, J. B. Park and T. Kim. 2006. Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J.* 20:2251-2260.
- Lake, P. E. 1957. Fowl semen as collected by the Massage method. *J. Agric. Sci.* 49:120-126.
- Lavitrano, M., A. camaioni, V. M. Fazio, S. Dolci, M. G. Farace and C. Spadafora. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs : Genetic transformation of mice. *Cell* 57:717-723.
- Lavitrano, M., D. French, M. Zani, L. Frati and C. Spadafora. 1992. The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Mol. Reprod. Dev.* 31:161-169.
- Lavoir, M. Ce., J. H. Diamond, P. A. Leighton, C. Mather-Love, B. S. Heyer, R. Bradshaw, A. Kerchner, L. T. Hooi, T. M. Gessaro, S. E. Swanberg, M. E. Delany and R. J. Etches. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441 (8):766-769.
- Lillico, S. G., A. Sherman, M. J. McGrew, C. D. Robertson, J. Smith, C. Haslam, P. Barnard, P. A. Radcliffe, K. A. Mitrophanous, E. A. Elliot and H. M. Sang. 2007. Wviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 140 (6):1771-6.
- Maione, B., C. Pittoggi, L. Achene, R. Lorenzini and C. Spadafora. 1997. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol.* 16:1087-1097.
- McGrew, M. J., A. Sherman, F. M. Ellard, S. G. Lillico, H. J. Gilhooley, A. J. Kingsman, K. A. Mitrophanous and H. Sang. 2004. Efficient production of germline transgenic cickens using lentiviral vectors. *EMBO reports.* 5 (7):728-733.
- Natio, M., T. Minematsu, T. Harumi and T. Kuwana. 2007. Intense expression of GFP gene in gonads of chicken embryos by transfecting circulating primordial germ cells in vitro and in vivo. *J. Poult. Sci.* 44:416-425.
- Nakanishio, A. and A. Iritani. 1993. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. *Mol. Repod. Dev.* 36:258-261.
- Rapp, J. C., A. J. Harvey, G. L. Speksnijder, W. Hu and R. Ivarie. 2003. Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens. *Trans. Res.* 12:569-575.
- Rottman, O. J., R. Antes, P. Hofer, B. Sommer, G. Wanner, A. Gorlach, F. Grummt and F. Pirchner. 1996. Lipososome-mediated gene transfer via sperm cells and murine amplification element. *J. Anim. Breed Genet.* 113:401-411.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS/STAT user's Guide : Version 6. 12th Ed. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- Scott, B. B. and C. Lois. 2005. Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:16443-16447.
- Vers, I., E. Muller, A. Ocsenyi, J. Turanyi, F. Szasz, G. Bernroider and A. J. Kronroif. 1976. VIII Congr. Int. Reprod. Anim. Insemin. Artif. Krao, Vol IV pp. 857-858.
- Verstegen, J., M. Iguer-Ouada and K. Onclin. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research andveterinary practice. *Theriogenology* 57:149-179.
- Zhu, L., M. C. van de Lavoir, J. Albanese, D. O. Beenhouwer, P. M. Cardarelli, D. F. Deng, S. Deshpande, J. H. Diamond, L. Green and Z. L. Nikolov. 2005. Production of human monoclonal antibodies in eggs of chimeric chickens. *Nat. Biotech.* 23:1159-1169.

The feasibility of producing transgenic chicken by electroporated sperm as gene vector ⁽¹⁾

Jenn-Fa Liou⁽²⁾⁽³⁾ Jui-Jane Tai Liu⁽²⁾ Chein Tai⁽⁴⁾ Jen-Wen Shiau⁽²⁾

M. C. Hung⁽⁵⁾ and Lih-Ren Chen⁽²⁾⁽⁶⁾

Received : Aug. 30, 2007 ; Accepted : Feb. 14, 2008

Abstract

Rooster semen with good qualities were transfected with human α -1 antitrypsin gene (hAT2f) by electroporation, under the addition of special electroporation solution. These transfected spermatozoa were used for the artificial insemination of hens, and we obtained 50% of fertility and 85% of hatchability. DNA extracted from the blood cells of 3-week old chicks were analyzed for the insertion of hAT2f gene, and we found 55% of the chicks exhibited positive reaction. For the continuous detection of foreign DNA in these positive chicks, blood samples were analyzed every 2 weeks, and 8 birds showed positive reaction of PCR at 5-month of age. The sequencing of PCR amplified fragment showed a 99% identity with human α -1 antitrypsin gene, indicating a successful insertion of transgene among positive chickens. We were puzzled that the exogenous DNA could not be detected after 300-day of age.

Key words : Sperm vector, Transgenic chicken, α 1-Antitrypsin.

(1) Contribution No. 1419 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan. R. O. C.

(3) Institution of Biotechnology, National Cheng Kung University, Tainan 701, Taiwan, R. O. C.

(4) Southern Taiwan University of Technology, Tainan, Taiwan. R. O. C.

(5) Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan. R. O. C.

(6) Corresponding author, E-mail : lrchen@mail.tlri.gov.tw.