

出國報告（出國類別：研究）

體細胞複製效率提升及應用

服務機關：行政院農業委員會畜產試驗所

姓名職稱：康定傑助理研究員

派赴國家：美國

出國期間：98 年 10 月 11 日至 98 年 10 月 24 日

報告日期：98 年 12 月 23 日

摘 要

本計畫之目的在加強本所與美國康乃迪克大學間實質的合作關係，藉由派遣研究人員訪美研習相關實驗，建立實質交流，提升我方家畜生物科技研發水準，精進畜試所畜產生物研究的核心技術，並引進國外新興之畜產生物技術。此次研習過程主要於康乃狄克大學再生生物學中心進行，相關試驗係利用 Affymetrix 公司研發的 Microarray 專利分析技術，加上康乃迪克大學畜產系 Carter 教授等人於 2003 年建立的 NIA 22K 60-mer oligo microarray 進行小鼠胚於埋植前所有胚期（未受精卵母細胞、受精後 1 細胞期胚、2 細胞期胚、4 細胞期胚、8 細胞期胚、桑葚胚與囊胚）的全域基因表現分析。希望藉由本次研習，取得相關經驗，將此一技術及研究方法引入，應用於將來牛、羊及鹿之複製胚、體外生產胚基因表現差異之研究中，作為將來試驗改進之參考依據，期改進國內複製動物生產的效率。

目 次

	頁碼
壹、目的	4
貳、過程	5
參、心得	6
肆、建議事項	13

壹、目的

本所於 1980 年代以家畜禽人工授精技術研發為開端，陸續建立了家畜發情同期化、超級排卵、胚外科與非外科胚採集與移置、胚冷凍、胚體外生產系統、胚分切、基因轉殖與動物複製等家畜生殖生物科技研發平台，更於 2002 年開始生產出複製牛與複製山羊家族。國內畜產生物科技在家畜基因轉殖技術與複製動物科技的長足進展下，已逐漸發展成形並越來越接近產業化的階段。本所生理組將所擁有的一系列技術予以整合成為「乳牛體內外胚生產技術」移轉至酪農產業應用，由此達成了畜產生物技術產業化的目標。

體細胞核轉置 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 為一被廣泛研究的生殖操作技術，其應用方向包含：1.複製遺傳背景一致且性狀表現優良之動物 2.經由體細胞外源基因轉殖及核轉置技術生產基因轉殖動物 3.醫療性複製與胚幹細胞的應用 4.瀕臨絕種動物之復育等。迄今利用 SCNT 技術成功產製之哺乳類動物已包括綿羊、牛、山羊、豬、家兔、小鼠、狗、雪貂、紅鹿等 16 種，然而體細胞核轉置胚之發育能力低下是現今進行該類試驗普遍遭遇的問題，本組於體細胞核轉置複製牛及羊之試驗中亦遭遇到此一障礙，然而此一問題被廣泛研究後發現，係因為胎盤不正常發育所致，且此一現象不單發現於體細胞核轉製之牛、羊胚中，亦可在許多不同動物種別內發現。

以小鼠生長中卵母細胞為例，其發育到達雙染色體 (diplotene) 期會發生第一次的靜休現象，此即為第一次減數分裂 (meiotic) 時期，此時轉錄 (transcription) 及轉譯 (translation) 機制被啟動，大量的 mRNA 被合成並儲存以備後續卵母細胞成熟及早期胚埋植前之用 (Bachvarova, 1985; Wassarman and Kinloch, 1992)。卵母細胞發育的第二個停滯期為第二次減數分裂的中期 (metaphase)，此時轉錄作用停止，mRNA 的轉譯作用開始啟動，直到受精後，有絲分裂被觸動，進而使得發育繼續進行到 1 細胞期，亦即是雄雌原核形成的時期，隨後細胞內 DNA 繼續複製與分裂而進入 2 細胞期，此時期母方轉錄作用產生級降現象，取而代之的是合子的基因活化作用 (zygotic genome activation, ZGA) 或是胚的基因活化作用 (embryonic genome activation, EGA)。接著經過兩次的卵裂作用胚的發育進入了 8 細胞期階段，隨後原先鬆散的細胞會產生緊實收縮的現象而進入桑椹胚期。細胞間慢慢的形成可互相聯繫皮膜而使胚之發育進入囊胚期。此時具有分化多能性的內細胞團 (inner cell mass, ICM) 會移動到胚的內層，走另一分化路徑的細胞則分佈於胚的外層，此類細胞稱為滋養層細胞 (trophectoderm, TE)。

本次赴美國康乃迪克大學研習是以小鼠為試驗動物，利用 Affymetrix 公司研發的 Microarray 專利技術，加上康乃迪克大學畜產系 Carter 教授等人於 2003 年建立的 NIA 22K 60-mer oligo microarray 進行小鼠埋植前 (preimplantation) 所有胚期，包括未受精卵母細胞 (unfertilized egg)、受精後 1 細胞期胚 (1-cell embryo)、2 細胞期胚 (2-cell embryo)、4 細胞期胚 (4-cell embryo)、8 細胞期胚 (8-cell embryo)、桑椹胚 (morula embryo) 與囊胚 (blastocyst) 的全域基因表現 (global gene expression) 分析。埋植前胚的定義為卵母細胞受精 (fertilization) 後至埋植 (implantation) 的這一段時間稱之，為了完整的達成此一過程，需要許多不可或確的事件連續或同時發生才可完成 (Edwards, 2003)，而此些事件發生與否皆受到基因的調控，而藉由瞭解同一基因在不同胚期表現量的差異便可推敲胚在該時期發生了哪些變化。

貳、過程

日 期	行 程	備 註	指導教授
10/11-10/12	去程	10/12 日下午 5:20 抵達 Hartford	
10/13	康乃狄克州立大學動物科學系簡報。 實驗室設備儀器介紹及環境參觀。	10 分鐘 PPT 檔簡報	
10/14-10/20	康乃狄克州立大學動物科學系研習應用 Microarray 進行基因差異分析之技術		Mark G.. Carter (Assistant research professor)
10/22-10/24	回程	10/24 上午 6:15 分抵達桃園中正機場	

參、心得

(一) 康迺迪克大學再生生物學中心簡介

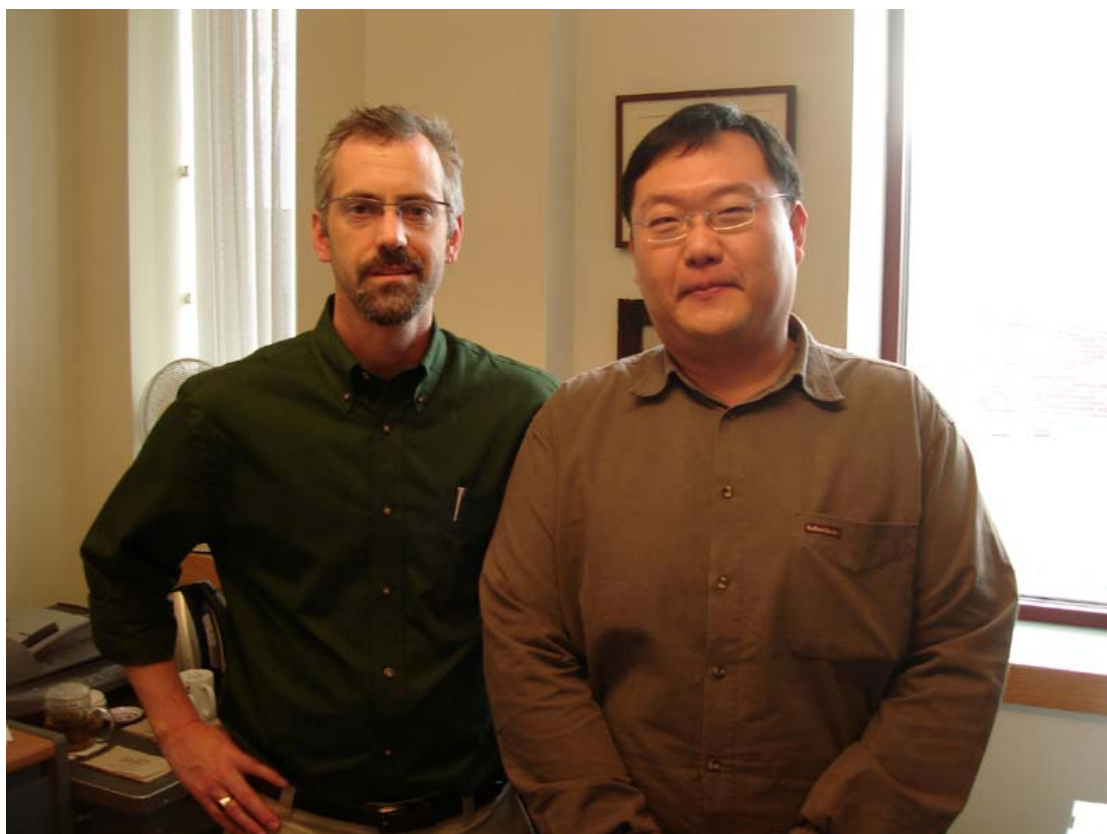
此次前往美國康迺迪克大學(The University of Connecticut)再生生物學中心研習微陣列(microarray)分析技術，前任中心主任為先前辭世的國際知名學者楊向中教授，楊向中教授於 1997 年成功複製出美國第一頭複製牛 Amy，Amy 是由一頭老牛耳朵的皮膚細胞做為供核細胞源而複製的，證實了生命可以通過複製技術而誕生。這是科學上的突破，也為再生醫學開啓一扇大門。楊向中教授在康州大學服務了四年即獲得終身教授的榮譽，之前曾打算離開康州大學，正當與另一所大學簽約的前一天，康州大學為了留住楊教授，竟於一日內決定撥款二千萬美元，為楊教授設立一所「再生生物學中心」(Center for Regenerative Biology) (圖一)，集中研究醫療性複製技術(therapeutic cloning)，傳為一時佳話。此次有幸至國際知名的研究室進行短期研習，向國際級的學者學習，可提昇研究人員的國際視野與學術素養，感謝行政院農委會與本所提供此難得的機會。



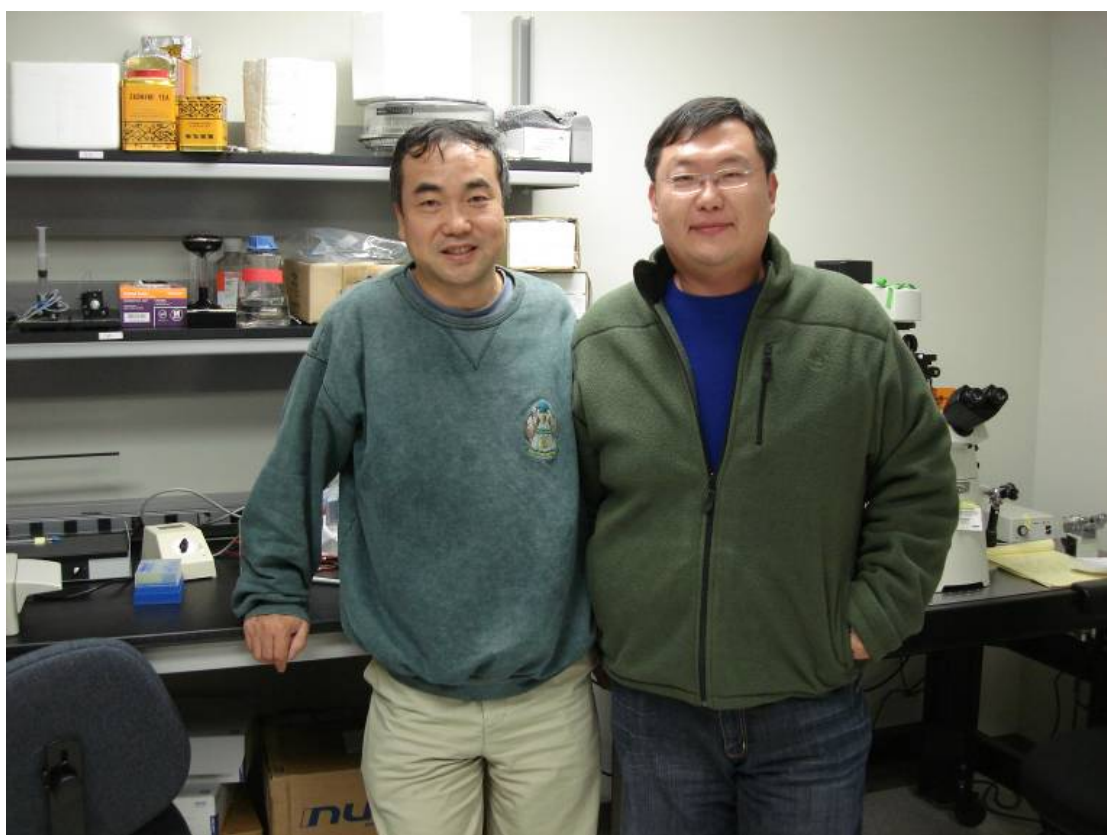
圖一、美國康迺迪克大學再生生物學中心。



圖二、再生生物學中心的農業生物技術實驗室大門



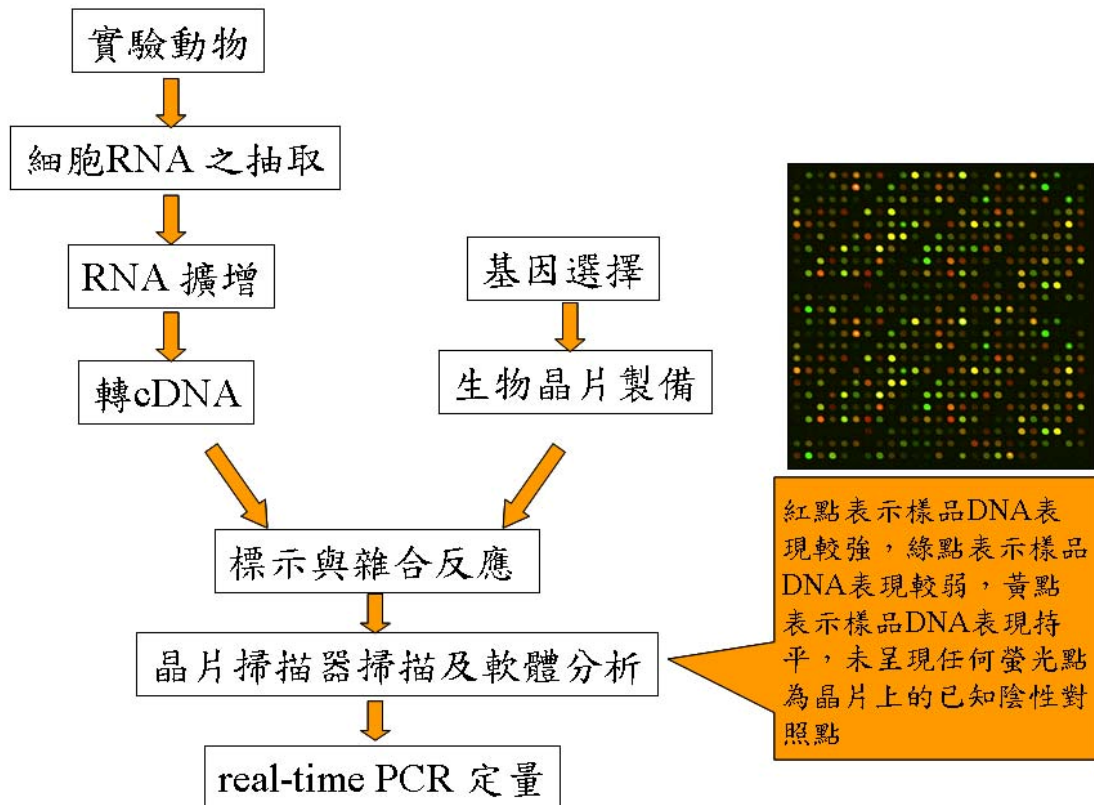
圖三、與本次研習之實驗室負責人 Carter 教授在其辦公室合影。



圖四、與杜福良博士於 Evergen 公司之實驗室合影

(二) 研習利用微陣列 (microarray) 分析技術研究小鼠埋植前各胚期的基因表現差異

研習過程主要於康乃狄克大學再生生物學中心進行，相關試驗係利用Affymetrix公司研發的Microarray 專利分析技術，加上康乃狄克大學畜產系Carter教授 (圖三) 等人於2003 年建立的NIA 22K 60-mer oligo microarray 進行小鼠埋植前所有胚期胚 (未受精卵母細胞、受精後1 細胞期胚、2 細胞期胚、4細胞期胚、8 細胞期胚、桑葚胚與囊胚) 的全域基因表現分析。



圖五、試驗流程示意圖。

(三) 試驗材料與方法

1. 基因選擇：
欲觀察之基因是由 Sharov 教授等人在 2003 年所建立之 NIA cDNA collection 中選得。
2. 實驗動物：
CD-1 小鼠，由 Charles River Breeding Laboratories 提供。經過 PMSG 及 hCG 處理後放入公鼠進行配種後依照各胚期發育時間犧牲懷孕母鼠，由輸卵管或子宮中沖洗取得各發育時期的胚作為試驗材料。
3. 細胞 RNA 之抽取與擴增：
豬胚幹細胞之 RNA 抽取係依照 Trizol® 方法 (Invitrogen 15596-018) 進行，首先將細胞離心得到的沈澱後加入 1 ml 的 Trizol® 試劑，於是溫下反應 10 分鐘，之後加入 0.2 ml 的 chloroform，搖晃 15 秒後反應 2-3 分鐘，之後使用 0.5 mL 的 isopropyl alcohol 反應 10 分鐘，最後使用 1 mL of 75% 酒精混合後，以超過 7,500 x g 速度離心 5 分鐘以得到 RNA 沈澱，最後將 RNA 溶

解於 RNase-free 的水，並測定濃度。

4. RNA 擴增：

RNA 之擴增是利用 TargetAmp™ 1-Round aRNA Amplification Kit 103 (Epicentre)，方法如下：使用 500 ng 之 RNA，加入 TargetAmp T7-Oligo (dT) Primer A 後，於 65oC 反應 5 分鐘後再冰浴 1 分鐘。加入 2 ul 之 1st-Strand cDNA Synthesis Master Mix 於 50oC 反應 30 分鐘，然後再加入 5 ul 之 2nd-Strand cDNA Synthesis Master Mix 於 65oC 反應 10 分鐘，最後在於 42oC 反應 4 小時，即可得到擴增之 RNA。

5. RNA 品質檢測：

(1) RNA 純度測試：(OD260/280 measurement)

● RNA Purity test:

1. Protein contamination:

OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio: (1.8-2.1 recommended)

2. Organic solvent contamination:

OD₂₆₀/OD₂₃₀ ratio: (>1.8 recommended)

OD₂₆₀/OD₂₇₀ ratio: (>1.2 recommended)

(2) RNA 完整性測試：(Electrophoresis or Bioanalyzer test)

● Electrophoresis gel of the RNA sample

Please paste your gel image here

Please refer to the image at the right for the layout of the gel

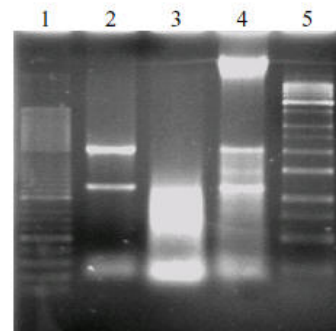
Lane 1: 100 bp DNA ladder

Lane 2: acceptable quality

Lane 3: heavily degraded total RNA

Lane 4: slightly degraded and DNA- contaminated sample

Lane 5: 1 Kb DNA ladder



6. 生物晶片製備：

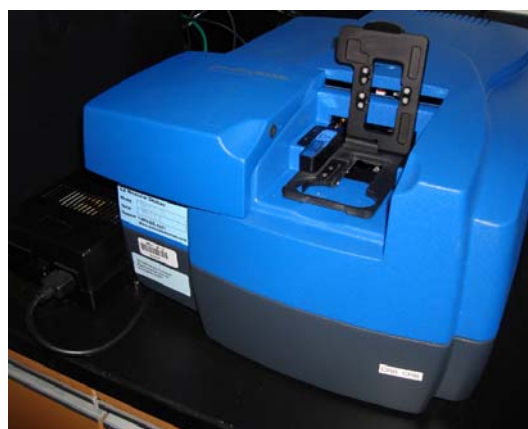
Carter教授等人於2003年建立的NIA 22K 60-mer oligo microarray，經由商業公司Agilent提供的非接觸式噴墨（non-contact inkjet）技術所生產。此種技術於生產過程中沒有直接接觸晶片的玻璃表面，降低探針分子因物理性接觸而導致的異常，因此本平台較為敏感與可靠。

7. 晶片掃描判讀儀器及晶片：

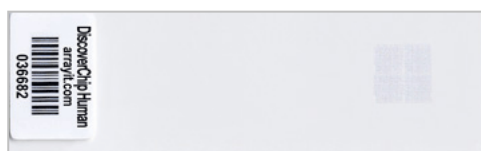
係使用molecular device公司的GenePix 4000B進行晶片之掃描。



圖六、GenePix 4000B晶片掃描器，正視角度。



圖七、GenePix 4000B晶片掃描器，晶片艙蓋開起。



圖八、基因晶片

（四）分析結果與心得

1. 本次研習交流派遣一位研究人員，於 10 月 11 日至 10 月 24 日間，赴美國康乃狄克州立大學再生醫學研究中心 Mark G. Carter 教授之實驗室進行小鼠埋植前各胚期胚全域基因分析實際上機示範。
2. 全域基因分析無法提供某一單獨基因隨著時間變化之表現量資訊，若要針對單獨基因隨時間變化之表現量資訊，需以 **real time PCR** 連續採樣分析方可得知。試驗共分析 12179 個基因，此些基因共分成 9 群，又依照表現的態樣可以分成三個組，第一組為與合子形成、2 細胞期、4 細胞期發育有關之基因，此基因亦會隨著胚的發育而逐漸增加。第二組基因則是在卵母細胞時期存在，但隨著卵母細胞發育，此類型基因會漸漸消失。第三組則是與母方 RNA 變化有關的基因。最後結論發現基因在胚發育的四個時期會產生較大的變化，第一個變化為 **ZGA**，此發生在 2-4 細胞期；第二個則為 **MGA**，其主要發生在 8 細胞期；第三個變化發生於桑葚胚期；第四個變化點則在囊胚期。大部分基因表現量在升高後皆快速下降，此現象顯示不止原先已活化的基因被關閉，甚至基因的轉錄作用也中止。
3. 該實驗室以往皆以牛胚為試驗材料做相關的調查研究，唯因狂牛症之影響（**Creutzfeldt-Jakob disease, CJD**），牛卵母細胞之取得不若過去從屠宰場取得之方便，在受核卵母細胞取得數量不足之情況下，牛核轉置技術之產製效率受到很大的限制。故在已故楊向中教授之實驗室早已將原本的牛 NT 方向轉移至小鼠 NT，並且由繁殖性複製（**reproductive cloning**）之方

向，修正為醫療性複製（therapeutic cloning），目標在於衍生出用 NT 技術建立核轉置胚幹細胞株（NT-ES cells derivation）。我前往該實驗室時，是由杜福良博士引薦下，進入 Carter 教授實驗室進行實際研習。

4. 本次赴美國康乃狄克州立大學再生醫學研究中心 Carter 教授實驗室，進行小鼠埋植前所有胚期胚全域基因表現分析研習。過程中對於研習單位提供之詳細解說與照顧，覺得十分感謝。另外在此要特別感謝杜福良博士的引見與照顧。研習過程中收穫良多，但礙於時間非常有限，對於試驗之結果無法完全窺視，但期望能於返國後，將此些技術以及試驗設計方法套用於本組複製胚及體外生產胚與正常胚之基因比較應用上，由基因之差異尋求改善與提升體複製胚與體外生產胚之生產效率。

（五）參考文獻

- Bachvarova, R., 1985. Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Dev. Biol.* 1:453–524.
- Carter, M.G., Hamatani, T., Sharov, A.A., Carmack, C.E., Qian, Y., Aiba, K., Ko, N.T., Dudekula, D.B., Brzoska, P.M., Hwang, S.S., and Ko, M.S.H., 2003. In situ-synthesized novel microarray optimized for mouse stem cell and early developmental expression profiling. *Genome Res.* 13:1011–1021.
- Edwards, R.G., 2003. Aspects of the molecular regulation of early mammalian development. *Reprod. Biomed. Online* 6: 97–113.
- Hamatani, T., G. Falco, M. G. Carter, H. Akutsu, C. A. Stagg, A. A. Sharov, D. B. Dudekula, V. VanBuren and M.S.H. Ko. 2004. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Human Mol. Genetic.* 14:2263-2278.
- Fuliang D., J. Xu, J. Zhang, S. Gao, M. G. Carter, C. He, L. Y. Sung, S. Chaubal, R. A. Fissore, C. Tian, X. g. Yang and Y. E. Chen. 2009. Beneficial Effect of Young Oocytes for Rabbit Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cloning Stem Cells* 11:131-140.
- Sharov, A.A., Piao, Y., Matoba, R., Dudekula, D.B., Qian, Y., Van-Buren, V., Falco, G., Martin, P.R., Stagg, C.A., Bassey, U.C., et al. 2003. Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. *Plos. Biol.*, 1(3): e74. doi:10.1371/journal.pbio.0000074.
- Toshio H., T. Daikoku, H. Wang, H. Matsumoto, M. G. Carter, M. S. H. Ko and S. K. Dey. 2004. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *PNAS* 28:10326-10331.
- Wassarman, P.M., and Kinloch, R.A., 1992. Gene expression during oogenesis in mice. *Mutat. Res.* 296:3–15.

Z. Chen, Z. Liu, J. Huang, T. Amano, C. Li, S. Cao, C. Wu, B. Liu, L. Zhou, M. G. Cater, D. L. Keefe, X. Z. Yang and L. Liu. 2009. Birth of Parthenote Mice Directly from Parthenogenetic Embryonic Stem Cells. Stem cell 27:2136–2145.

肆、建議事項

- 一、迄今動物基因庫的建立以小鼠及人類的完整度較高，而台灣則有中興大學動物科學系黃木秋教授建立之豬及雞的基因庫。然而其他畜產動物之基因庫尚未完整建立，若要實際應用於本組牛、羊及鹿，則需要先行建立基因庫較佳。
- 二、目前台灣基因晶片製作已幾家民間公司進行商業化生產，未來希望可與之合作開發相關物種的晶片。