

行政院農業委員會畜產試驗所主管科技計畫
98年度單一計畫說明書

98農科-1.1.9-畜-L1

種畜禽研究團隊(FABRC)-以體細胞基因重整提升草
食動物複殖技術平台產業化之效能

Food Animal Breeding Research Consortium
(FABRC): Improvement of cloning efficiency by
somatic cell reprogramming



1235106962371 2009/02/20 13:16:02

行政院農業委員會畜產試驗所
中華民國98年1月



執行機構(計畫)識別碼: 010109L100

行政院農業委員會畜產試驗所主管科技計畫 98年度單一計畫說明書

一、計畫序號及名稱

- (一) 中文名稱：種畜禽研究團隊(FABRC)-以體細胞基因重整提升草食動物複製技術平台產業化之效能
- (二) 英文名稱：Food Animal Breeding Research Consortium (FABRC): Improvement of cloning efficiency by somatic cell reprogramming

二、計畫編號

- (一) 國科會審議編號：9821010106-01010109L1
- (二) 本年度計畫編號
 - 中文：98農科-1.1.9-畜-L1
 - 英文：98AS-1.1.9-LI-L1
- (三) 去年度計畫編號
 - 中文：新提計畫
 - 英文：新提計畫

三、計畫依據

農委會施政計畫

四、計畫屬性

科技類

五、研究性質/研究方式

研究性質：技術發展

研究方式：自行研究

六、研究領域/研究目的





研究領域：6L 農-生物技術

研究目的：發展農林漁牧(不含食品加工與包裝)

七、執行機關與執行人

機 關 名 稱	執 行 人	職 稱
行政院農業委員會畜產試驗所	黃英豪	所長

八、協辦（合作）機關

無

九、計畫主持人

機關名稱：農委會畜產試驗所

姓 名：陳立人

職 稱：研究員兼組長 單位名稱：生理組

電 話：06-5911211轉
235~237

傳 真：06-5912581

電子信箱：lrchen@mail.tlri.gov.tw

十、研究人員

序號	機 關 名 稱	單 位 名 稱	研究人員	職 稱
1.	中山大學生物醫學科學研究所		薛佑玲	副教授
2.	農委會畜產試驗所	花蓮種畜繁殖場	林正鏞	副研究員兼場長
3.	農委會畜產試驗所生理組	生理組	蕭振文	副研究員
4.	農委會畜產試驗所	花蓮種畜繁殖場	莊璧華	助理研究員
5.	農委會畜產試驗所生理組	生理組	曲鳳翔	助理研究員
6.	農委會畜產試驗所生理組	生理組	郭廷雍	約聘人員
7.	行政院農業委員會畜產試驗所	生理組	陳裕信	助理研究員





8. 行政院農業委員會畜產
試驗所

康定傑 助理研究員

十一、執行期限

全程計畫： 98 年 1 月 1 日至 100 年 12 月 31 日止
本年度計畫： 98 年 1 月 1 日至 98 年 12 月 31 日止

十二、實施地點

行政院農業委員會畜產試驗所生理組
行政院農業委員會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場

十三、計畫內容

(一) 已完成/相關之重要計畫成果摘要：

發展核轉置科技之目的，在畜牧生產上主要係期能藉此技術大量複製遺傳背景一致且性狀表現優良之畜群，進而提高家畜之經營效率。(1997)利用已分化之乳腺上皮細胞為供核源成功產製複製綿羊”桃麗(Dolly)”所打破；此一創舉除徹底改變過去吾人所認為業已分化之體細胞，無法再回溯並重新開啟其「初始性」之分化作用外，並為核轉置科技及基因轉殖技術之應用性引領入另一新境；此後，應用已分化之體細胞為供核源，並經由核轉置技術成功產製複製動物之實例亦相繼被報導。利用體細胞核轉置技術進行各種複製動物之產製雖已被成功建立，惟其產製效率迄今仍低，且常發生複製胚胎早期死亡、高流產率、新生複製仔畜出生前後高死亡率、器官發育不全以及巨嬰症等現象。此等不正常現象係可能因複製胚於發育過程中無法將置入之供核細胞充分再程序所造成(Kang et al., 2001a；Xue et al., 2002)。因此進一步了解核轉置胚之再程式化(reprogramming)作用及甲基化程序為提升複製動物產製效率的有力基礎。將進行體細胞複製前之供核細胞株進行基因重整，使其基因甲基化程度接近於正常胚，將有助於提升體細胞複製之成功率。

(二) 擬解決問題：

自1997年桃莉羊發表以後，因此等技術畜產與生物醫藥產業均具有相當大的利基，因此全世界約有20個國家超過130個實驗室投入動物複製的研究。然而，動物複製的成功率迄今均還是3到5%左右(Oback and Wells, 2003)，其效率並不高且複製動物亦多出現發育異常的現象(Chavatte-Palmer et al., 2004)，顯示複製動物技術平台在產業化之前，尚有很大的改進空間。動物複製的低效能與發育異常，一般認為是做為複製胚細胞核來源的體細胞已經特化之基因組，無法完整、正確地





進行基因重整所致 (Campbell et al., 2007)。本計畫研究的目的，即利用對轉基因體細胞預先於體外進行細胞基因重整，再供為乳用山羊複殖操作之細胞核來源，企以提高轉基因複殖山羊產製的成功率，改善轉基因複殖動物技術平台產業化的效能。

(三) 前人研究概況：

發展核轉置科技之目的，在畜牧生產上主要係期能藉此技術大量複製遺傳背景一致且性狀表現優良之畜群，進而提高家畜之經營效率。(1997)利用已分化之乳腺上皮細胞為供核源成功產製複製綿羊”桃麗 (Dolly)”所打破；此一創舉除徹底改變過去吾人所認為業已分化之體細胞，無法再回溯並重新開啟其「初始性」之分化作用外，並為核轉置科技及基因轉殖技術之應用性引領入另一新境；此後，應用已分化之體細胞為供核源，並經由核轉置技術成功產製複製動物之實例亦相繼被報導。利用體細胞核轉置技術進行各種複製動物之產製雖已被成功建立，惟其產製效率迄今仍低，且常發生複製胚胎早期死亡、高流產率、新生複製仔畜出生前後高死亡率、器官發育不全以及巨嬰症等現象。此等不正常現象係可能因複製胚於發育過程中無法將置入之供核細胞充分再程序所造成(Kang et al., 2001a；Xue et al., 2002)。因此進一步了解核轉置胚之再程式化(reprogramming)作用及甲基化程序為提升複製動物產製效率的有力基礎。將進行體細胞複製前之供核細胞株進行基因重整，使其基因甲基化程度接近於正常胚，將有助於提升體細胞複製之成功率。

(四) 計畫目標：

1. 全程目標：

(1)總目標：

利用體細胞基因重整提升轉基因複製動物產製技術平台效能

(2)分年度工作目標：

98年度：

- 1.建立轉基因羊體細胞基因重整技術
- 2.完成基因重整後羊體細胞之細胞表型和基因特性分析
- 3.建立基因重整羊體細胞株以供產製複殖動物之需

99年度：

- 1.產製100個體細胞基因重整複殖羊胚。
- 2.完成複殖胚之基因表現分析。
- 3.完成10頭次以上之體細胞基因重整複殖羊胚移置。

100年度：

- 1.完成複殖動物外源性基因表現分析。
- 2.完成複殖動物體細胞基因組甲基化程度狀況分析。





3.完成複殖動物配種與乳汁成份分析。

2. 本年度目標：

- 1.建立轉基因羊體細胞基因重整技術
- 2.完成基因重整後羊體細胞之細胞表型和基因特性分析
- 3.建立基因重整羊體細胞株以供產製複殖動物之需

(五) 重要工作項目及實施方法：

將山羊轉基因體細胞以取自胚幹細胞之細胞萃取物進行細胞核重整，然後做為細胞核轉置的細胞核來源，以進行山羊轉基因複殖胚之產製與基因分析。

1.培養分讓自食品工業研究所的小鼠胚幹細胞（D3 cells, CRL-11632, ATCC），做為提供細胞萃取液的細胞來源。並利用Nuclear/Cytosol fractionation kit（Biovision），製備小鼠胚幹細胞的細胞萃取液。

2.山羊體細胞之細胞核基因重整：

將山羊轉基因體細胞以streptolysin-O- HBSS培養以提高細胞膜通透性後，隨即移除streptolysin-O。並於培養基中加入胚幹細胞之細胞萃取物進行共培養，然後於培養基中加入含CaCl₂培養基，以恢復細胞膜之正常通透性。

3.與重整後山羊體細胞細胞表型和基因特性分析：

- 1)以經磁珠篩選儀將經成功細胞核重整處理後的山羊體細胞分選後供試。
- 2)以鏡檢觀察細胞型態、細胞之核質比、是否形成colony；並以anti-SSEA1, anti-SSEA3/4等胚幹細胞特異抗體, alkaline phosphatase staining test等進行分化多能性細胞標誌檢測分析。

3)將經細胞核重整處理後的山羊體細胞，以Quick Prep Micro mRNA萃取套組（Amersham, UK）萃取並純化mRNA，進行RT-PCR以分析其Oct-4，PECAM-1, Rex-1，Sax-2與nanog等幹細胞特異性表現基因的表現情形，並以house-keeping 基因 -actin做為對照。同時，亦分析處理前後體細胞基因組甲基化程度與銘印基因的CpG之去銘印狀況。

4.以經細胞核基因重整之山羊體細胞產製轉基因複殖動物：

- 1)卵母細胞之去核操作
- 2)核轉置操作
- 3)供核與受核細胞之電融合操作
- 4)複殖胚之激活處理
- 4)複殖胚之激活處理
- 5)轉基因複殖胚體外培養及胚冷凍
- 6)轉基因複殖胚錄之基因表現分析
- 7)胚移置：將部分發育至囊胚期之羊胚進行胚移置或冷凍保存備用。
- 8)外源基因檢測

(六) 預定進度：

重要工作項目	工作比重 %	預定進度	98 年				備註
			1-3月	4-6月	7-9月	10-12月	





胚幹細胞之細胞萃取物收集	30	工作量或內容	幹細胞培養	幹細胞培養	細胞萃取液收集	細胞萃取液收集	
		累計百分比	30	60	80	100	
山羊體細胞之細胞核基因重整	20	工作量或內容	山羊體細胞之細胞核基因重整	山羊體細胞之細胞核基因重整	山羊體細胞之細胞核基因重整	山羊體細胞之細胞核基因重整	
		累計百分比	0	50	75	100	
重整後山羊體細胞細胞表型特性分析	20	工作量或內容	重整後山羊體細胞細胞表型和基因特性分析	重整後山羊體細胞細胞表型和基因特性分析	以經磁珠篩選儀將經成功細胞核重整處理山羊體細胞	鏡檢觀察細胞型態、細胞之核質比	
		累計百分比	10	40	80	100	
細胞核重整處理後的山羊體細胞基因分析	20	工作量或內容	萃取並純化 mRNA	進行 RT-PCR 以分析其 Oct-4, PECAM-1, Rex-1, Sax-2 與 nanog 等幹細胞特異性表現基因的表現情形	以 house-keeping 基因 -actin 做為對照比較	分析處理前後體細胞基因組甲基化程度與銘印基因的 CpG 之去銘印狀況	
		累計百分比	20	50	75	100	
以經細胞核基因重整之山羊體細胞產製轉基因複製動物	10	工作量或內容	以經細胞核基因重整之山羊體細胞產製轉基因複製動物	以經細胞核基因重整之山羊體細胞產製轉基因複製動物	以經細胞核基因重整之山羊體細胞產製轉基因複製動物	以經細胞核基因重整之山羊體細胞產製轉基因複製動物	
		累計百分比	0	10	50	100	
期中期末報告撰寫	0	工作量或內容		期中報告撰寫		期末報告撰寫	
		累計百分比	0	50	50	100	
累計總進度	百分比		15	47	75	100	

(七) 預期效益及評估指標：

1. 預期效益：

利用體細胞核轉置技術進行各種複製動物之產製雖已被成功建立，惟其產製效率迄今仍低，且常發生複製胚胎早期死亡、高流產率、新生複製仔畜出生前後高死亡率、或器官發育不全以及巨嬰症等現象。此等不正常現象係可能因複製胚於發育過程中無法將置入之供核細胞充分再程序化所造成。正常受精卵於精卵融合後，將迅速發生基因組 DNA 之全面性的去甲基化作用，並持續至囊胚期；而核轉置胚者則未依循此模式降低其甲基化程度。此或許是造成核轉置動物產製效率低落





之重要原因。利用體外基因重整技術，對做為複殖操作之細胞核來源之體細胞預先進行基因重整，以提高轉基因複殖動物產製的成功率，改善轉基因複殖動物技術平台產業化的效能。

2. 評估指標：

(1)期中審查標準：

細胞基因重整模式之建立

(2)期末審查標準：

重整細胞之體細胞核轉置胚生產，胚移置與基因分析

十四、計畫經費分類

(單位：千元)

經費類別	經常門	資本門	合計
自辦費	4,402	0	4,402

十五、預算細目

機關名稱： 行政院農業委員會畜產試驗所--生理組

(單位：千元)

預算科目代號	預算科目	經費來源					合計	說明
		農委會畜產試驗所			其他			
		經常門	資本門	小計	金額	配合款單位		
02-00	業務費	3,402	0	3,402	0		3,402	
02-02	水電費	250	0	250	0		250	水費電費及其他電力費
02-03	通訊費	20	0	20	0		20	電話通訊費
02-15	資訊服務費	10	0	10	0		10	資訊設備相關費用
02-71	物品	2,502	0	2,502	0		2,502	試驗分析用藥品、耗材與非消耗品
02-79	一般事務費	600	0	600	0		600	公務用品、影印裝訂、研討會海報輸出、勞務外包、誤餐費及保全
02-82	房屋建築修繕費	20	0	20	0		20	房屋建築修繕
合計		3,402	0	3,402	0		3,402	

會計人員簽章：





機關名稱： 行政院農業委員會畜產試驗所--花蓮種畜繁殖場

(單位：千元)

預算科目代號	預算科目	經費來源					合計	說明
		農委會畜產試驗所			其他			
		經常門	資本門	小計	金額	配合款單位		
02-00	業務費	1,000	0	1,000	0		1,000	
02-71	物品	800	0	800	0		800	試驗分析用藥品、耗材與非消耗品
02-84	設施及機械設備養護費	100	0	100	0		100	畜舍設施及試驗室設備保養維護費用
02-91	國內旅費	100	0	100	0		100	國內差旅費
合計		1,000	0	1,000	0		1,000	

會計人員簽章：

十六、關鍵詞

再程式化;reprograming;體細胞複製;somatic cell nuclear transfer;山羊;goat;

十七、主要參考文獻





附表一

參與計畫人力資料表

	參與計畫 人員姓名	英文姓名	身份證 字 號	出生 年 民 國	專長 領域	職級	學歷	性別	參與 人月	參與 性質
1	陳立人	Chen Lih-Ren	C12002****	50	6L	1	1	1	2	1
2	薛佑玲	Shiue Yow-Ling	B22033****	51	15	2	1	0	1	3
3	林正鏞	Lin Cheng Yung	N12151****	55	59	2	1	1	2	4
4	蕭振文	Shiau Jen-Wen	S12175****	51	59	2	1	1	2	4
5	莊璧華	Chuang Pi-Hwa	T22008****	58	59	3	2	0	3	4
6	曲鳳翔	Chu Feng-Hsiang	A12000****	61	59	3	3	1	3	4
7	郭廷雍	Kuo Ting-Yung	D12101****	61	6L	3	5	1	2	4
8	陳裕信	Chen Yu-Hsin	S12487****	58	59	3	2	1	2	4
9	康定傑	Kang Ting-Chieh	R12213****	63	59	3	6	1	2	4





附表二

本研究計畫主持人及共同主持人本年度及以往三年之研究計畫名稱

年度	計畫名稱	委託機關	備註			
			主持	非主持	申請中	核定
98	種畜禽研究團隊(FABRC)-以體細胞基因重整提升草食動物複製技術平台產業化之效能	農委會畜產試驗所	√		√	
97	以基因轉殖動物複製技術平台生產人類血漿白蛋白(二) 利用體外成熟卵子作為受核源產製核轉置胚	農委會畜產試驗所		√		√
97	飼料中添加乳酸菌提升雞蛋中IgY含量之探討	農委會畜產試驗所		√		√
97	分子牧場商品化虛擬平台的營運規劃 I：利用母雞為生物工廠來生產抗腸病毒71型IgY	農委會畜產試驗所		√		√
97	體細胞複製效率提升及應用	農委會畜產試驗所	√			√
97	醫療性複製豬模式之建立 (III)	農委會畜產試驗所	√			√
96	以雞蛋黃免疫球蛋白(IgY)減少仔豬下痢效果之探討:田間試驗	農委會畜產試驗所		√		√
96	研習複製胚之基因表現及衍生胚幹細胞之技術	農委會畜產試驗所		√		√
96	以基因轉殖動物複製技術平台生產人類血漿白蛋白	農委會畜產試驗所	√			√
96	醫療性複製豬模式之建立	農委會畜產試驗所	√			√
95	醫療性複製豬模式之建立	農委會畜產試驗所		√		√
95	體外成熟卵母細胞品質對基因轉殖複製牛胚發育能力之影響	農委會畜產試驗所	√			√
95	家畜選性繁殖與單一性別生產體系之建立	農委會畜產試驗所	√			√





附表八

計畫摘要

計畫名稱：種畜禽研究團隊(FABRC)-以體細胞基因重整提升草食動物複殖技術平台產業化之效能

計畫編號：98農科-1.1.9-畜-L1

審議編號：9821010106-01010109L1

主管機關：行政院農業委員會畜產試驗所

執行單位：行政院農業委員會畜產試驗所

計畫主持人：陳立人

聯絡人：陳立人

聯絡電話：06-5911211轉235~237

傳真號碼：06-5912581

期程：98年1月1日至100年12月31日

經費：(全程) 17,608 仟元

98(年度)：4,402 仟元

人力預估：(全程) 6.32 人年

98(年度)：1.58 人年

執行內容(中文摘要)：

利用體細胞核轉置技術進行各種複製動物之產製雖已被成功建立，惟其產製效率迄今仍低，且常發生複製胚胎早期死亡、高流產率、新生複製仔畜出生前後高死亡率、或器官發育不全以及巨嬰症等現象。此等不正常現象係可能因複製胚於發育過程中無法將置入之供核細胞充分再程序化所造成。正常受精卵於精卵融合後，將迅速發生基因組DNA之全面性的去甲基化作用，並持續至囊胚期；而核轉置胚者則未依循此模式降低其甲基化程度。此或許是造成核轉置動物產製效率低落之重要原因。利用體外基因重整技術，對做為複殖操作之細胞核來源之體細胞預先進行基因重整，以提高轉基因複殖動物產製的成功率，改善轉基因複殖動物技術平台產業化的效能。

英文摘要：

Successful cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT) is thought to require reprogramming the somatic nucleus to a state of restored totipotentiality. Though SCNT-induced reprogramming is reminiscent of the reprogramming that occurs after fertilization, reprogramming a differentiated nucleus to an embryonic state is delayed and incomplete in comparison. This is likely due to the existence of an epigenetic-based cellular memory, or program that serves to regulate global patterns of gene expression, and is the basis of a genome defense mechanism that silences viruses and transposons. The mechanisms of this memory include CpG methylation and modification of histones. DNA methylation supports intrinsic epigenetic memory in mammalian cells. Using a transgenic experimental system indicates that these marks may be acquired in more than one order and thus, silent heterochromatic structure can be initiated by either methylation of CpG dinucleotides or by histone modifications. In this system, however, CpG methylation appears to differ from histone modifications because it bestows a persistent epigenetic, or cellular, memory. In other words, CpG methylation can independently confer cellular memory, whereas histone modifications appear to be limited in this capacity. Therefore, in the context of genomic reprogramming induced by SCNT, efficient demethylation is likely a key (if not the only) rate-limiting step to improving the efficiency and outcomes of SCNT cloning. The purpose of this study is to improve the efficiency of SCNT by using somatic cell reprogramming procedure toward the somatic cells directly before nuclear transfer.

