

用新的圓形基因載體產製基因轉殖動物

基因轉殖可分為永久性及暫時性。前者係「線狀(linear)」外源基因「隨機(random)」或「定位(targeting)」嵌入染色體，而產生永久性可以遺傳的效果；因此，外源基因可以表現在分裂上百次以上的細胞，或基因轉殖動物的外源基因可以遺傳十代以上。暫時性基因轉殖係「圓形(circular)」外源基因存於細胞質，因為載體(vector)通常由病毒 DNA 負責表現此外源基因而有致癌風險，及有限自我複製能力；因此，外源基因僅可表現在分裂數次的轉殖細胞，而基因轉殖動物則無從產製。

線狀外源基因「隨機」嵌入細胞染色體，機率相對較高(0.01~10%)，但因為外源基因嵌入染色體位置、數量無法控制；因此，正、反效果不一。線狀外源基因「定位」嵌入細胞染色體，機率相對低許多(數十萬分之一)，但有一致性效果。存於細胞質的「圓形」外源基因，假如可以有效自我複製並遺傳下去、沒有致癌風險，則因為轉殖技術相對最簡單、轉殖效率高(1~50%)、不破壞原有染色體，似可為用來產製基因轉殖動物的另一選擇。

1999 年，Piechaczek 等人發表：「圓形」載體(pEPI-1) — 仍然含 SV40 ori (origin of replication)，但原來可使細胞永生惟可能致癌的 SV40 large T-antigen 基因，換成人的 scaffold/matrix attachment region (S/MAR；係染色體特殊結構 DNA，和 DNA 複製有關)；此載體因此仍具有自我複製能力，但無致癌風險，在轉殖細胞(CHO)細胞質內，自我複製套數(copy number)約為 5-10，並可穩定維持到超過 100 代(generation)仍有表現所攜帶外源基因的效果；此等結果暗示，此種形式載體似可用來產製基因轉殖動物。

義大利羅馬 La Sapienza 大學 Marialuisa Lavitrano 教授於 1989 年報告，利用特殊處理過精子與 DNA 共同培養後，精子會帶有 DNA，然後將此精子直接人工授精，可以得到基因轉殖小鼠。該方法(sperm-mediated gene transfer, SMGT)不須任何特殊儀器、設備及技術，即可產製基因轉殖動物。魚卵數量多、體外受精，目前魚的基因轉殖幾乎全部使用本法；基因轉殖哺乳動物，則因效率及效果不穩定使用者較少。

2006 年，Lavitrano 教授將上述二概念用於豬，結果相當理想。首先將 pEPI-1 載體概念加上綠色螢光基因得到 pEPI-EGFP 載體，然後以處理過精子帶此圓形載體(1 億精子和 5 μ g DNA 在 17°C 共同培養約 1 小時)，並以腹腔鏡做子宮角授精(每一子宮角注入 5 毫升含 5 億帶有 pEPI-EGFP 載體精子)；懷孕 70 天剖腹產取出胎豬。結果顯示，18 頭胎豬中有 12 頭可檢測到 pEPI-EGFP 載體，12 頭中有 9 頭表現綠

色螢光；9 頭綠色螢光胎豬所分析的所有組織，都表現綠色螢光，平均有 79%細胞表現綠色螢光。此報告結果較目前使用最普遍的胚原核顯微注射法(1-10%基因轉殖哺乳動物表現外源基因)明顯好非常多，惟尚無法確定以之所得基因轉殖豬，是否具正常生殖遺傳能力；未來假如確認之，則可為用來產製基因轉殖動物的另一選擇。

(李坤雄編譯/莊景凱審 Cell 57:717-23, 1989、Nucleic Acids Res 27:426-8, 1999、Proc Natl Acad Sci USA, 103:17672-7, 2006)