

微試管共同培養產製具性腺遺傳嵌合小鼠

特定 DNA 序列或基因的選殖水準已經相當程度成熟，體外培養系統可以初步了解其功能；惟該等 DNA 於生命過程扮演何種角色，目前概以基因轉殖小鼠為探討主流，可見未來亦不易被取代。

DNA 胚原核顯微注射(pronucleus microinjection)以得到基因轉殖小鼠是目前普遍的做法，缺點是外源構築 DNA 序列係以隨機多點或單點方式插入染色體 DNA，因此同一 DNA 序列通常必須有 3~5 種以上基因轉殖小鼠系才較有把握確定其功能。此方法產製相對較簡單，惟後續配種、維持及研究，勞心又勞力，因此部分此等研究逐漸轉成以胚幹細胞(embryonic stem, ES, cell)做基因定位(gene targeting)，經選殖確認後做轉殖小鼠。

基因定位法只要有一頭具性腺遺傳(germline transmission)基因定位轉殖公小鼠，即可在配種後充分做後續相關研究，此在大多數 DNA 序列於活體(in vivo)、分時(temporal)及分區(spatial)生理意義的瞭解，及作用機制的探討極有效率，未來亦不易被取代。本法在選殖及確認 DNA 染色體同源互換(homologous recombination)的胚幹細胞純群(subclone)雖然耗時，但技術已相當成熟，以之所產製的嵌合小鼠(chimeric mouse)也不難得到。目前最大的瓶頸反而是嵌合小鼠性腺遺傳機率高低不一，或者為零(通常花半年左右時間確定)，此問題所造成的時間落後性，一直困擾全世界所有研究人員；顯然具性腺遺傳能力嵌合小鼠的獲得最具關鍵。新近，RNAi (RNA interference) 技術發展快速，有部分取代以胚幹細胞做基因定位趨勢。

嵌合胚(chimeric embryo，胚含有非本身細胞者稱之)和嵌合小鼠的獲得，目前普遍以顯微注射法(microinjection)及聚合法(aggregation)為主要產製技術，共同培養法(coculture)採用者較少。

顯微注射法以直接將「新鮮」胚幹細胞打入 3.5 天囊胚腔為主流。此法發展成熟，產製嵌合小鼠結果穩定；惟需要昂貴顯微操作系統及設備，且操作者需長時間訓練。使用此法，技術純熟者平均每小時僅能完成 20~40 個囊胚注射，施打速率有系統侷限，因此通常付費委由專門單位執行。此法雖可有效得到嵌合小鼠，惟具性腺遺傳能力嵌合小鼠比率變異極大，需花時間配種確認。另一種作法係直接將新鮮胚幹細胞打入 2.5 天 8-細胞期胚，此法效果不一；或與 3.5 天囊胚顯微注射相當，或可提高具性腺遺傳能力嵌合小鼠比率，或使原來不具性腺遺傳能力胚幹細胞所得嵌合小鼠具性腺遺傳能力。本法顯微注射技術面相對較囊胚者困難，採用者極少；利用 Piezo-driving 或雷射在透明帶做切口後打入細胞，雖可解決損傷胚葉細胞

(blastomere)的困擾，惟必須額外昂貴儀器及技術訓練，使用者極少。

聚合法及共同培養法相對簡單，原理係利用去除透明帶胚及胚幹細胞極粘特性，使之互粘後一起發育成嵌合胚。不需要昂貴儀器及設備，操作者也不需要長時間訓練，主要缺點是後續嵌合小鼠及性腺遺傳能力重複性變異較大。

聚合法主要做法：配種後去除透明帶 2.5 天 8-細胞~桑椹胚二個一組或單獨一個胚，在細菌用培養皿上凹洞與「新鮮」胚幹細胞聚合培養 1~4 小時，洗出嵌合胚、隔夜培養後，胚移置。本法前者最主要的缺點是必須使用兩個胚(XX 或 XY)為一組，此於近交品系小鼠(超數排卵配種後，每頭平均所得有效胚數少於 10 個)明顯不利；本法後者(一個胚)效果明顯較差。

共同培養法以去除透明帶 2.5 天 8-細胞~桑椹胚直接在細菌用培養皿或微滴凹洞內與胚幹細胞隨機共同培養 1~5 小時，洗出嵌合胚、隔夜培養後，胚移置。本法最主要的缺點是結果明顯較上述其他方法差，採用者極少。共同培養法技術面及儀器、設備面最簡單，假如能改良方法，使得到具性腺遺傳能力嵌合小鼠成功率，和其他方法相當或更好，則本法有機會取代上述其他產製嵌合小鼠方法。

2007 年，台灣動物科技研究所李坤雄實驗室發表了新方法，似可滿足此需求。本技術利用去除透明帶 2.5 天 8-細胞~桑椹胚，直接在隨手可得且非常便宜的 1.7 mL 尖底、廣口微試管(micro-test tube, Eppendorf vial)與新鮮或「剛解凍」(可以避開例行昂貴且花時間培養)並表現綠色螢光蛋白之小鼠胚幹細胞，隨機共同培養數小時後，胚粘合細胞聚合體(aggregate)隔夜培養、移置入子宮角，自然分娩具性腺遺傳能力嵌合小鼠。本法以極有效率、可大規模單人操作(一次可處理 100~200 個胚)、最便宜、技術及儀器設備最簡單之方式，產製嵌合胚。本技術係綜合既有技術優點且避開缺點所發展出來，將成為產製嵌合小鼠技術面某種程度之最佳化結果，並預期可部分取代上述產製嵌合小鼠方法。

(李坤雄撰/莊景凱審)