

Oct-4 基因於體外受精與體細胞核轉置牛胚之表現⁽¹⁾

蕭振文⁽²⁾ 蔡麗卿⁽²⁾ 陳裕信⁽²⁾ 曲鳳翔⁽²⁾
楊鎮榮⁽²⁾ 李善男⁽³⁾ 陳立人⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：93 年 5 月 7 日；接受日期：93 年 7 月 8 日

摘 要

本研究之主要目的，乃應用反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 分析以不同方式獲得的牛胚於不同發育階段 Octamer-binding transcription factor 4 (*Oct-4*) 與 β -actin mRNA 之表現型式。同時，將此二種基因之 PCR 產物選殖並分析 DNA 序列，以確認 *Oct-4* 與 β -actin 二種基因之正確性。分析之牛胚一是利用體外生產系統 (*in vitro* production, IVP) 與核轉置 (nucleus transfer, NT) 方法生產的 2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、桑椹期及囊胚期牛胚；二是田間牛胚非外科採集所取得之體內桑椹期及囊胚期牛胚，以套組萃取不同胚期牛胚之 mRNA，進行 RT-PCR 獲得互補 DNA (complementary DNA, cDNA)，再利用分析 *Oct-4* 與 β -actin 基因的引子對進行 PCR。試驗結果顯示，利用 IVP 與 NT 所生產的 2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、桑椹期及囊胚期牛胚，以及採集自牛隻體內桑椹期及囊胚期的牛胚樣品，均有 *Oct-4* 與 β -actin 之 mRNA 表現。而 *Oct-4* 與 β -actin 基因經過選殖與 DNA 序列分析後，進入 NCBI 進行 DNA 序列比對，結果 *Oct-4* 基因與 *Bos taurus* 者完全相符。而做為對照的 β -actin 基因亦正確表現，顯示在牛胚不同發育階段，不論是 IVP、NT 或體內胚，均可以見到此兩種基因的 mRNA 表現。本研究結果可供開發檢測牛胚發育潛力之分子標記之用。

關鍵詞：牛胚、基因分析、發育、*Oct-4*。

緒 言

牛胚體外生產 (*in vitro* production, IVP) 與成體細胞核轉置技術 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 是生殖科技研究及商業應用之有力工具。目前，IVP 牛胚的生產效率相當穩定，所生產的囊胚經胚移置後，約有 50% 可建立懷孕。雖然如此，IVP 牛胚在形態上、發育時間及抗緊迫性等性狀仍與體內胚有明顯差異 (Niemann *et al.*, 2002)。至於體細胞核轉置牛胚，生產效率則是明顯偏低。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1239 號

- (2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組
- (3) 行政院農業委員會畜產試驗所副所長室
- (4) 通訊作者

核轉置所產製的可移置囊胚，經胚移置後產仔的比例均在 10%以下 (Tian *et al.*, 2003)。體內牛胚或 IVP 牛胚進行胚移置，早期的懷孕率相近，但到了懷孕末期，約有 25~35% IVP 胚移置胎兒將因為巨仔症 (large offspring syndrome, LOS) 而導致分娩損失；此種異常在 NT 牛胚更形嚴重 (Young *et al.*, 1998; Tian *et al.*, 2003)。與活體內取得之正常牛胚比較，利用體外生產系統生產之 IVP 牛胚或利用核轉置技術生產之 NT 牛胚，在不同的生長發育階段，各種調控生長與發育之重要基因表現量差異極大；這些重要基因，包括各種轉錄因子、生長因子及其受體、細胞骨架、胞外基質蛋白質、細胞表面抗原及胞內之訊息傳導因子等。此種重要基因表現之變異，可能為造成 IVP 牛胚或 NT 牛胚早期發育終止或分娩前後死亡的主因 (Niemann *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2003)。由此得知，在牛胚發育過程中重要基因的表現變異，將顯著影響牛胚能否正常發育及成功分娩。

Oct-4 是屬於 POU 家族的成員，為胚早期發育之重要調節轉錄因子之一。在小鼠，*Oct-4* 是 *Pou5f1* 基因產物，經由結合下游調控基因的啟動子或調節區域中特定核苷酸，調控標的基因的作用 (Herr and Cleary, 1995)。*Oct-4* 只表現在具有發育全能性 (pluripotency) 的細胞與生殖細胞 (Nichols *et al.*, 1998)，以及體外培養的胚幹細胞、胚腫瘤細胞及胚生殖細胞等 (Tanaka *et al.*, 2002; Niwa *et al.*, 2000)。*Oct-4* 與細胞分化全能性之調控具有密切相關，極重要之處乃 *Oct-4* 不表現於 *in vivo* 或 *in vitro* 任何已分化之成體細胞中。因此，由 *Oct-4* 基因的分析，即可判定胚及胚幹細胞等是否具有分化全能性之潛力與能力。

目前分析牛胚基因的方法中，RT-PCR 是可行的技術之一，已廣泛應用在牛胚經不同處理後造成各種重要基因表現之變異，胚早期死亡及仔牛分娩前後致死可能的基因表現異常等研究 (Niemann and Wrenzycki, *et al.*, 2000)。而牛胚重要基因分析技術之建立，將有助於胚發育早期品質及發育潛能檢測技術的開發。

本研究期能應用 RT-PCR 技術，分析以不同方法所生產的牛胚，在不同發育階段過程 *Oct-4* 及對照長駐 (housekeeping) 基因 β -actin 的表現，同時進行 DNA 序列分析，以確認 *Oct-4* 與 β -actin 的表現，探索不同來源牛胚之發育潛力，做為改善牛胚生產效率之重要參考指標。

材料與方法

I. 不同來源牛胚之產製與取得：供試牛胚樣本係來自體外生產的 IVP 牛胚、核轉置技術生產的 NT 牛胚，以及部份收集自田間牛胚採集及移置操作過程中所取得之體內桑椹期及囊胚期牛胚，以分析其基因表現。

- (i) IVP 牛胚：牛胚之體外生產步驟乃依李等 (1997) 之方法進行。自屠宰場取得牛卵巢，先以裝於 1 ml 針筒之 18 號針頭抽取卵巢表面直徑 2~6 mm 濾泡內之卵丘-卵母細胞複合體 (cumulus-oocyte complexes, COCs)，予以體外成熟 (*in vitro* maturation, IVM) 培養 24-26 h，而後以冷凍解凍之乳用公牛冷凍精液進行 8 小時之體外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 培養，再予洗去多餘精子後置入原已含單層卵丘細胞之培養液滴中進行共培養 (co-culture)，培養條件為 38.5°C、2% CO₂ 及相對濕度 95%。於體外受精後 48 小時開始評估受精卵之分裂率，之後每隔 24 小時觀察胚之各發育期別，並分別將 2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、桑椹期牛胚及囊胚期牛胚收集。胚樣經過磷酸緩衝液 (phosphate-buffer solution, PBS) 清洗三次後，將單一胚置入含 0.5 μ l PBS 及 1.5 μ l 細胞溶解液 (lysis buffer) 含 0.8% Igepal (Sigma, USA.) 及 1U/ μ l Recombinant RNasin ribonuclease inhibitor (Promega, Madison, USA)，放入液

態氮中急速冷凍，再將胚樣貯存於 -70℃ 低溫冷凍櫃中供萃取 mRNA 之用。

- (ii) 核轉置牛胚：體細胞核轉置牛胚之產製係參考相關文獻進行 (Wilmot *et al.*, 1997 ; Wells *et al.* , 1999 ; Kubota *et al.*, 2000)，其操作分述如下：
1. 卵母細胞之取得與體外成熟培養：自屠宰場取得牛卵巢，先以裝於 1 ml 針筒 之 18 號針頭抽取卵巢表面直徑 2~6 mm 濾泡內之 COCs，並予以體外成熟培養 24-26 小時 (李等，1997)。
 2. 供核細胞之製備：取得荷蘭母牛之耳朵組織，經酒精浸泡消毒後剪碎，並以 trypsin 處理予以分離培養成纖維母細胞 (fibroblasts)，供核轉置之用。進行核轉置前，先將成纖維母細胞之含 10% FBS 之 DMEM 培養液移除，更換為僅含 0.5% FBS 之 DMEM 培養液予以飢餓培養 5~10 天，使其細胞週期靜休於 G0 期。
 3. 牛卵母細胞之核轉置：移除體外成熟 COCs 之包覆卵丘細胞後，再進行顯微操作予以去核。去核擠出之細胞質與第一極體置於含 20 µg Hoechst 33342 /ml 之培養液滴中進行螢光染色，並以紫外光檢測去核成功率。確認去核成功之卵母細胞始供作核轉置之受核卵母細胞使用。將單一耳朵纖維母細胞，注入已去核之受核卵母細胞之卵黃囊膜間隙內，進行核轉置之操作。
 4. 核與受核細胞之電融合：將經核轉置操作之重組胚置於含有 0.3 M manitol，0.1 mM MgSO₄ 及 0.1 mM CaCl₂ 之電擊溶液中，並移動重組胚，使其細胞接合處與電擊板相平行。然後以電擊器 (BTX Electro Cell Manipulator 2001, BTX., USA) 予直流電電擊融合，電融合條件為 1.34 kV/cm、維持 10 µs。電融合處理之核轉置胚隨後置入含有 5% FBS 的 TCM-199 培養液中。
 5. 轉置胚之激活處理：將已融合之核轉置胚培養 4 小時後，再培養於含 2 mM 6-DMAP 之激活液中予以 4 小時之激活處理，以獲得核轉置牛胚。核轉置胚後續之體外培養條件及胚樣品製備處理同前述 IVP 胚者之方式操作。
- (iii) 體內牛胚：配合田間之牛胚採集與移置操作，以非外科手術法於人工授精後第六至七天收集的體內桑椹期及囊胚期牛胚，取得之牛胚樣品同前述 (i) 所述製備處理。

II. 牛胚 mRNA 萃取及 RT-PCR 操作：取用前述置於 -70℃ 保存之不同胚源與不同胚期之牛胚樣品供基因表現分析之用。牛胚 mRNA 之萃取係利用 Quick Prep Micro mRNA 萃取套組 (Amersham, UK) 萃取純化牛胚 mRNA，而後進行 RT-PCR。分析時將牛胚樣品置於 80℃ 維持 5 分鐘後，直接置於冰上。進行 RT-PCR 之反應總體積為 10 µl，包括溶解的胚樣、RT 緩衝液、SuperScript II RNase H⁻-Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA)、Oligo (dT)12-18 引子 (Invitrogen, CA)、DTT 及 RNAsin (Promega, USA)。RT-PCR 之條件為 42℃ 維持 1 小時。製備之 cDNA 即可供 PCR 分析基因之表現型式。分析 *Oct-4* 與 *β-actin* 基因的引子序列、PCR 黏合溫度及基因產物長度如表 1 所示。

表 1. 牛胚 *Oct-4* 與 *β-actin* 分析的引子序列、黏合溫度及產物長度
Table 1. Primers sequences, annealing temperature and expected PCR products of *Oct-4* and *β-actin* genes from bovine embryos

Genes	Primer sequences	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)
<i>β-actin</i>	5'-GAGAAGCTCTGCTACGTCGC-3' 5'-CAGACAGCACCGTGTTGGC-3'	60	250

Oct-4 5'-CGTTCTCTTTGGAAAGGTGTT-3'
5'-ACACTCGGACCACGTCTTTC-3'

55

314

- III. 牛胚 *Oct-4* 與 β -*actin* 基因表現分析：進行 PCR 之反應總體積為 20 μ l。反應液含不同來源牛胚之 cDNA 模板、200 nM 引子、100 μ M dNTP、2.5 mM $MgCl_2$ 、1 \times PCR 緩衝液及 1U 的 DNA 聚合酶 (Promega, USA)。PCR 條件為 95 $^{\circ}C$ 3 分鐘、50 次循環的 94 $^{\circ}C$ 30 秒、56 $^{\circ}C$ 30 秒、72 $^{\circ}C$ 3 分鐘；72 $^{\circ}C$ 8 分鐘；最後維持於 4 $^{\circ}C$ 。PCR 反應完成後，取 10 μ l 之 PCR 產物加入 2 μ l 的 6 \times Loading buffer，置入 2%瓊脂糖膠片 (agarose gel) 內，於 0.5 \times TAE 液中進行電泳，條件為 100 Volt 30 分鐘。電泳後將膠片置入染液〔0.5 \times 的 TAE，內含 0.1 μ g/ml 的溴化乙錠 (ethidium bromide)〕中染色，並於紫外燈箱上觀察並記錄結果。
- IV. DNA 片段回收與選殖：將分析 *Oct-4* 與 β -*actin* 二基因所獲得之 PCR 產物切下，利用膠體回收套組 (Quiagen, GmbH) 並依套組之方法回收純化 DNA 片段。純化之 DNA 片段利用 pGEN-T Essay Vector system II (Promega, USA) 套組，選殖 *Oct-4* 與 β -*actin* 基因之 PCR 產物，供進行限制酶切割確認插入之基因片段及進行 DNA 序列分析之用。
- V. DNA 序列分析與比對：將選殖之兩基因委請源資國際生物資訊公司利用 DNA 序列分析儀 (ABI 3730) (Applied Biosystems Inc., CA) 並依其方法進行 DNA 之序列分析。選殖並完成 DNA 序列分析的資料，利用 Vector NTI (Infor Max Inc, USA) 進行 DNA 序列之 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比對，以了解 *Oct-4* 與 β -*actin* 基因之正確性及比較網路資料庫中的相似基因序列。

結果與討論

本研究期能應用 RT-PCR 之分子生物技術，分析利用不同方法所生產的不同發育階段牛胚中，對照的常駐基因 β -*actin* 及調控發育全能性的轉錄因子 *Oct-4* mRNA 之表現。利用 IVP、NT 或活體取得之體內桑椹期及囊胚期牛胚，利用 mRNA 萃取套組純化 mRNA 後，進行 RT-PCR 以獲得 cDNA，再利用分析 *Oct-4* 及 β -*actin* 的引子進行 PCR，分析兩種基因在不同發育時期牛胚的表現情形。試驗結果顯示，利用不同方式生產的牛胚於 2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、桑椹期及囊胚期，均可以見到 *Oct-4* 與 β -*actin* 基因的表現 (圖 1)。

牛胚樣品經分析 *Oct-4* 及 β -*actin* 後，得知在不同胚源、不同胚期的牛胚中均可以測得此兩種基因 mRNA 的表現。由於 β -*actin* 為常駐基因，提供本研究所需之正對照，做為胚樣 mRNA 萃取、cDNA 合成及 PCR 整個分析流程是否正確的指標。結果在不同來源、不同胚期的牛胚樣品中均獲得單一且清楚的 250 bp PCR 產物。而 *Oct-4* 的 mRNA 檢測，同樣獲得預期的單一 314 bp 的 PCR 產物，且無其他的 PCR 片段產物存在，顯現分析具有特異性。因此初步證明該兩種基因確實存在於分析的牛胚樣品中。為了進一步確認此二種基因的 PCR 產物是否正確，乃進行 DNA 序列分析。分別將 β -*actin* 與 *Oct-4* 的 PCR 產物自電泳後的瓊脂糖膠片上切下回收，並選殖入 pGEN-T Essay Vector system II 中的多選殖位置 (multiple cloning site, MCS) 中，再轉型入勝任細胞 *E. coli* 內。選殖在載體中的 β -*actin* 與 *Oct-4* 先行以限制酶 *Eco* RI 進行切割，確認載體之內有正確長度的插入片段 (圖 2)。再將此二種基因進行 DNA 序列分析。兩基因進行 DNA 序列分析後所獲得之資料，連接到 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 進行 BLAST 程式及資料庫比對分析，結果如圖 3 所示。*Oct-4* 基因序列與 *Bos taurus* 的 *Oct-4* (*Pou5f1* 基因) mRNA 序列完全相同 (Accession

NM_174580) (van Eijk *et al.*, 1999)。此結果顯示這些不同時期、不同方式生產的牛胚中確有 *Oct-4*

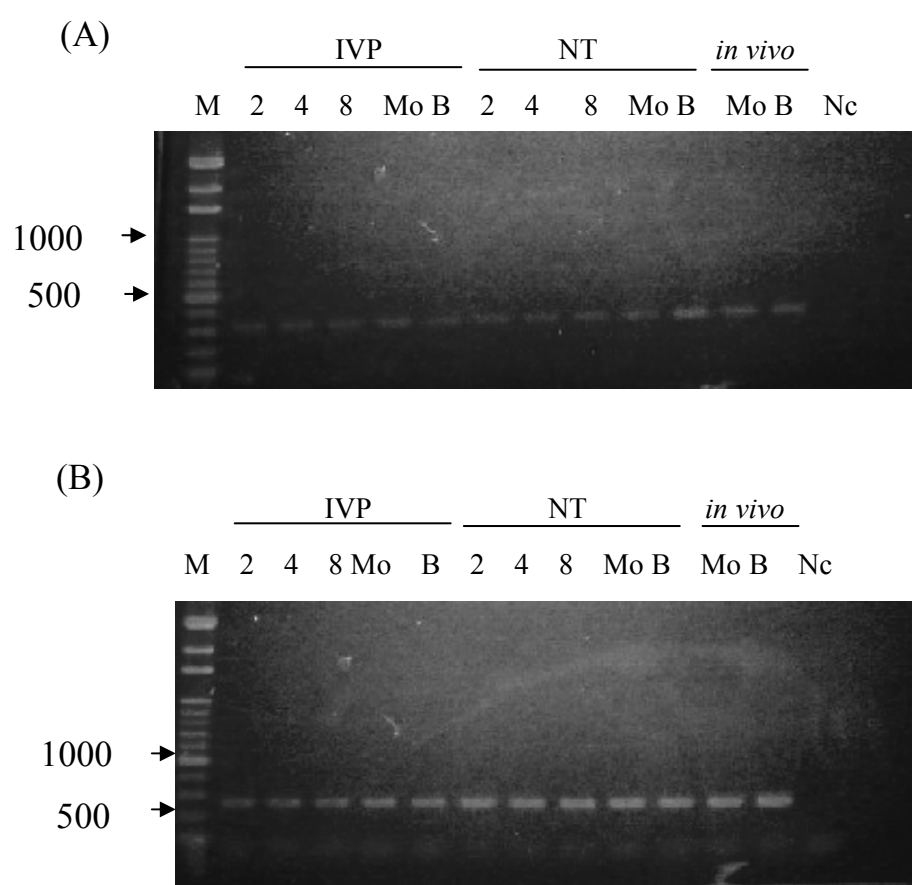


圖 1. 以不同方式生產的特定階段牛胚樣品中 *Oct-4* (A)與 β -actin (B) mRNA 的表現分析。mRNA 樣品自特定階段之牛胚萃取，進行 RT-PCR 後獲得預期之 *Oct-4* 與 β -actin 產物。2、4、8、Mo 與 B 分別為 2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、桑椹期與囊胚期牛胚。Nc 為陰性對照，M: 100 bp 標記。

Fig. 1. *Oct-4* (A) and β -actin (B) mRNA expression in bovine embryos produced from IVP, NT and *in vivo*. Samples of mRNA extracted from the specific stage of bovine embryos were subjected to reverse transcription-PCR using primer sets designed to amplify fragments of *Oct-4* and β -actin. Amplification reactions resulted in the product size expected for *Oct-4* (314 bp) and β -actin (250 bp). Lanes 2, 4, 8, Mo and B were 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula and blastocyst stage of bovine embryos, respectively. Nc: negative control. M: 100 bp ladder marker.

的表現。而做為對照的常駐基因 β -actin 亦證實與 Accession NM_174580 的 β -actin 基因具有最高之相似性 (圖 3)。Ponsuksili *et al.* (2002) 曾研究著床前牛胚的重要基因表現型式。而體外生產的牛胚使用的共培養系統及血清，會影響到牛胚的發育、代謝及基因表現形式 (Rief *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2003)。而進行牛胚核轉置試驗之步驟，亦影響 mRNA 的表現形式 (Wrenzycki *et al.*, 2001)。而本實驗結果顯示，利用 RT-PCR 進行早期牛胚基因表現研究相當可行，也顯示開發牛胚分子檢測標幟，以判定牛胚發育潛力的可行性。

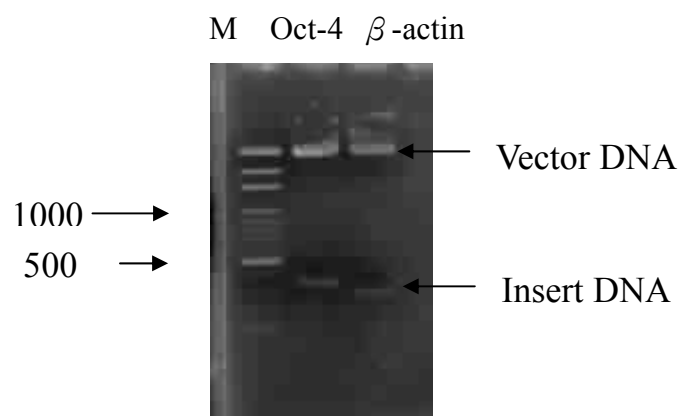


圖 2. 含有 *Oct-4* 與 *β-actin* 二種基因之載體經限制酶切割後之電泳圖。自 pGEN-T Easy 載體純化之質體 DNA 經 *Eco* RI 切割後進行 100 volts、30 分鐘之電泳。M 為 100 bp 標記。

Fig. 2. Electrophoresis analysis of vector DNA that contained *Oct-4* and *β-actin*, respectively. Plasmid DNA were purified from pGEN-T Easy vector and digested with restriction enzyme *Eco* RI and subjected to 100 volts, 30 min of electrophoresis analysis. M: 100 bp ladder marker.

由於 *Oct-4* 在調控細胞之分化全能性上扮演關鍵角色，故缺乏 *Oct-4* 表現的小鼠胚，因缺乏分化全能性的胚細胞，所以多數利用體細胞所生產的核轉置小鼠胚雖可發育至囊胚期，但在著床之後死亡。此種異常，推論可能是利用體細胞所生產的核轉置胚無法順利再啟動 *Oct-4* 等重要基因，導致無法建立真正具有發育全能性胚細胞。為了驗證此假設，Bortvin *et al.* (2003) 曾確認 10 種與 *Oct-4* 具相關性的重要基因，並分析以卵丘細胞做為供核源所生產的小鼠核轉置胚中 *Oct-4* 相關基因的表現情形，結果顯示僅 62% 的核轉置胚能正確表現這些基因。而利用胚幹細胞為供核者生產的囊胚則全數正常表現 *Oct-4* 相關的基因。這些重要基因的表現型式，與不同來源胚能否正常懷孕生產具有高度的相關性。而 *Oct-4* 相關基因無法正確的全面啟動，與體細胞核轉置胚的早期致死具有關連性 (Bortvin *et al.*, 2003)。

本研究分析的 *Oct-4*，是 POU 家族轉錄因子的成員，為胚早期發育之重要調節轉錄因子之一。*Oct-4* 是 *Pou5f1* 基因的表現產物，其作用乃經由結合下游調控基因的啟動子或調節區域中 ATGCAAAT 八核苷酸區，調控標的基因的作用 (Herr and Cleary, 1995)。由於 *Oct-4* 只表現在未受精的卵母細胞、發育早期胚、囊胚的內細胞群 (inner cell mass, ICM) 等具有分化全能性或多能性潛能 (pluripotent) 的細胞與始基生殖細胞 (primordial germ cells, PGC)。此外，*Oct-4* 也表現在體外培養的胚幹細胞、畸胎瘤細胞及胚生殖細胞等 (Tanaka *et al.*, 2002; Niwa *et al.*, 2000)。*Oct-4* 在懷孕 8.5 天後的雄或雌性鼠胚的始基生殖細胞可以測得，然而在雄性睪丸或精子中無法測到，顯示在生殖細胞發育之後期 *Oct-4* 的表現僅存在於雌性的生殖腺上 (Scholer *et al.*, 1989)。

(A)

Consensus	(1)	GTTCTCTTTGGAAAGGTGTTTCAGCCAAACGACTATCTGCCGTTTTGAGGC
Query sequence	(51)	GTTCTCTTTGGAAAGGTGTTTCAGCCAAACGACTATCTGCCGTTTTGAGGC
gi 27807048 ref NM_1	(817)	GTTCTCTTTGGAAAGGTGTTTCAGCCAAACGACTATCTGCCGTTTTGAGGC
	51	100
Consensus	(51)	TTTGCAGCTCAGTTTCAAGAACATGTGTAAGCTGCGGCCCTGCTGCAGA
Query sequence	(101)	TTTGCAGCTCAGTTTCAAGAACATGTGTAAGCTGCGGCCCTGCTGCAGA
gi 27807048 ref NM_1	(867)	TTTGCAGCTCAGTTTCAAGAACATGTGTAAGCTGCGGCCCTGCTGCAGA
	101	150
Consensus	(101)	AGTGGGTGGAGGAAGCTGACAACAACGAGAATCTGCAGGAGATATGCAAG
Query sequence	(151)	AGTGGGTGGAGGAAGCTGACAACAACGAGAATCTGCAGGAGATATGCAAG
gi 27807048 ref NM_1	(917)	AGTGGGTGGAGGAAGCTGACAACAACGAGAATCTGCAGGAGATATGCAAG
	151	200
Consensus	(151)	GCAGAGACCCTTGTGCAGGCCCGAAAGAGAAAGCGGACGAGTATCGAGAA
Query sequence	(201)	GCAGAGACCCTTGTGCAGGCCCGAAAGAGAAAGCGGACGAGTATCGAGAA
gi 27807048 ref NM_1	(967)	GCAGAGACCCTTGTGCAGGCCCGAAAGAGAAAGCGGACGAGTATCGAGAA
	201	250
Consensus	(201)	CCGAGTGAGAGGCAACCTGGAGAGCATGTTCCCTGCAGTGCCCGAAGCCCA
Query sequence	(251)	CCGAGTGAGAGGCAACCTGGAGAGCATGTTCCCTGCAGTGCCCGAAGCCCA
gi 27807048 ref NM_1	(1017)	CCGAGTGAGAGGCAACCTGGAGAGCATGTTCCCTGCAGTGCCCGAAGCCCA
	251	300
Consensus	(251)	CCCTGCAGCAAATTAGCCACATCGCCCAGCAGCTCGGGCTGGAGAAAGAC
Query sequence	(301)	CCCTGCAGCAAATTAGCCACATCGCCCAGCAGCTCGGGCTGGAGAAAGAC
gi 27807048 ref NM_1	(1067)	CCCTGCAGCAAATTAGCCACATCGCCCAGCAGCTCGGGCTGGAGAAAGAC
	301	312
Consensus	(301)	GTGGTCCGAGTG
Query sequence	(351)	GTGGTCCGAGTG
gi 27807048 ref NM_1	(1117)	GTGGTCCGAGTG

(B)

	1	50
Consensus	(1)	CAGACAGCACCGTGTTGGC TACAGGTCCTT CGGATGTCCACGTCACAC
Query sequence	(52)	CAGACAGCACCGTGTTGGC TACAGGTCCTT CGGATGTCCACGTCACAC
gi 8809715 gb AF1292	(637)	CAGACAGCACCGTGTTGGC TACAGGTCCTT CGGATGTCCACGTCACAC
	51	100
Consensus	(51)	TTCATGATGGA TTGAAGGTGGTCTC TG ATGCC CAGGACTCCATACC
Query sequence	(102)	TTCATGATGGA TTGAAGGTGGTCTC ATG ATGCC CAGGACTCCATACC
gi 8809715 gb AF1292	(687)	TTCATGATGGA TTGAAGGTGGTCTC ATG ATGCC CAGGACTCCATACC
	101	150
Consensus	(101)	CAGGAAGGACGGCTGGAAGAG GCCTCGGGACACCGGAACCGCTC TTGC
Query sequence	(152)	CAGGAAGGACGGCTGGAAGAG GCCTCGGGACACCGGAACCGCTC ATGTC
gi 8809715 gb AF1292	(737)	CAGGAAGGACGGCTGGAAGAG GCCTCGGGACACCGGAACCGCTC GTTGC
	151	200
Consensus	(151)	C ATGGTGATCACCTGACCATCGGGCAGCTCATAGCTCTTCTCCAAGGAG
Query sequence	(202)	CAATGGTGATCACCTGACCATCGGGCAGCTCATAGCTCTTCTCCAAGGAG
gi 8809715 gb AF1292	(787)	CGATGGTGATCACCTGACCATCGGGCAGCTCATAGCTCTTCTCCAAGGAG
	201	250
Consensus	(201)	GAGGA GA GC GC GT GCCATCTCCTGCTCGAAGTCCAGGGC ACGTA
Query sequence	(252)	GAGGA GAT GC AGC GT AGCCATCTCCTGCTCGAAGTCCAGGGC ACGTA
gi 8809715 gb AF1292	(837)	GAGGA CGA GCC GC AGT GCCATCTCCTGCTCGAAGTCCAGGGC ACGTA
	251	262
Consensus	(251)	GCAGAGCTTCTC
Query sequence	(302)	GCAGAGCTTCTC
gi 8809715 gb AF1292	(887)	GCAGAGCTTCTC

圖 3. *Oct-4* (A)與 β -actin (B)二種基因之 DNA 序列分析與比對

Fig. 3. DNA sequences of *Oct-4* (A) and β -actin (A) gene obtained from bovine embryos and sequence comparison by BLAST.

有關牛 *Oct-4* (*Pou5f1* 基因) 的分子選殖、基因圖譜建立及其在發育過程中的表現已有學者探討 (van Eijk *et al.*, 1999)。牛的 *Pou5f1* 基因 (*bPou5f1*) 與人類及小鼠在基因結構及 DNA 序列之相似性高，在蛋白質層次之胺基酸相似性分別為 90.6 及 81.7% (Scholer *et al.*, 1989; Wang and Schultz, 1996)。因此推測小鼠、人與牛的 *Oct-4* 基因具有相似之功能與角色。而人類的 *Oct-4* 與小鼠者之胺基酸相似性達 87% (Takeda *et al.*, 1992)。若將選殖之牛 *bPou5f1* 基因啟動子接上螢光素酶報告基因並轉殖入小鼠 P19 畸胎瘤細胞，證明具有功能且可以有效表現。牛的 *bPou5f1* 基因經定位存在於第 23 號染色體的組織相容複合體 (MHC) 的位置上。牛的 *Oct-4* 利用 RT-PCR 及間接免疫螢光染色分析，在未成熟的牛卵母細胞、體外生產的著床前牛胚均可以見到 *Oct-4* 的表現。利用共軛焦雷射掃描顯微鏡分析，顯示在受精後著床前的早期牛囊胚 ICM 及滋養層細胞 (trophoblast cells) 均顯示 *Oct-4* 的表現 (van Eijk *et al.*, 1999)。此一特點，顯示牛胚 *Oct-4* 之表現異於小鼠與或人類者。在小鼠胚，*Oct-4* 的表現最早出現在 4~8 細胞的胚中，而後在桑椹胚強烈表現。到了囊胚期其內細胞群可見到 *Oct-4* 強烈表現，然滋養層中的 *Oct-4* 則減少。著床後，*Oct-4* 僅表現於外胚層 (epiblast)。到了原腸期，*Oct-4* 僅表現在在始基生殖細胞中 (Palmieri *et al.*, 1994; Boiani *et al.*, 2002)。而在 2-4 細胞期的小鼠胚並未測得 *Oct-4* 的表現。此應是牛胚與鼠胚間極大的差異處。而本研究結果利用不同方式生產的牛胚，自 2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、桑椹期牛胚及囊胚期牛胚收集，均可以測得 *Oct-4* 的表現，與上述文獻比較小鼠與牛 *Oct-4* 差異性相符合。

Kirchhof *et al.* (2000) 的研究顯示，牛與豬二種家畜之體內胚或是體外胚，在擴張囊胚期利用免疫化學分析法，得知 *Oct-4* 可以同時表現在內細胞群與滋養層，而不似小鼠者僅能在表現於內細胞群。此外，在人類具有分化全能性的生殖細胞中也曾有研究未測得 *Oct-4* 表現的結果 (Onyango *et al.*, 2002)，可見因為動物種別不同，*Oct-4* 在不同時期胚的表現型式亦不同。而此種差異性，也使 *Oct-4* 在哺乳動物間調控細胞發育全能性之獨特調控者的角色受到深入研究。除了人類之外，*Oct-4* 在恆河猴胚之表現已被探討 (Mitalipov *et al.*, 2002; 2003)。利用 RT-PCR 方法測定恆河猴的核轉置擴張囊胚及胚幹細胞 *Oct-4* 的表現，獲得與人類 *Oct-4* 基因相似的 697 bp 片段，序列相似性達 98.6%，僅 11 個核苷酸有差異。而在已分化的胚幹細胞或胎兒成纖維母細胞，則未見任何 PCR 產物。而作為對照的常駐基因 GAPDH，經過檢測其 mRNA 則存在所有之樣品 (Mitalipov *et al.*, 2003)。恆河猴核轉置胚之表現形式與小鼠者相類似；其 *Oct-4* 首先在 16 細胞期的胚中測得其表現，之後大量表現在桑椹期及緊實桑椹期之猿猴胚。到了早期囊胚，內細胞群與滋養層的細胞核均可見到 *Oct-4* 的表現，而到了擴張囊胚期滋養層細胞表現下降，到了孵化囊胚則完全消失。受精後 8 細胞期之前並未測得 *Oct-4* 的表現 (Mitalipov *et al.*, 2003)。由於 *Oct-4* 的表現與否，是研究及追蹤細胞核再程式化的重要基因指標，所以可做為核轉置胚基因再程式化的遺傳標記。

研究 *Oct-4* 維持分化全能性的角色，可利用標的阻斷及標的剔除 (knock out) 小鼠，來干擾內源基因的作用而獲得了解。缺乏 *Oct-4* 的小鼠胚，將無法形成內細胞群 (Scholer *et al.*, 1989)。而 *Oct-4* 基因剔除的體外培養小鼠胚，雖具有類囊胚之外觀結構，卻僅具有滋養層細胞而無法形成內細胞群，這種類囊胚在胚移置後無法著床。經由表現型式分析得知 *Oct-4* 參與分化全能性細胞最初形成、自我更新 (self renewal) 及分化全能性的維持。

由於上述的文獻及本研究所得結果，了解哺乳動物胚在發育早期之分化全能性，與 *Oct-4* 的分子調控具有密切相關。目前已知，參與哺乳動物胚及胚幹細胞的重要轉錄調控因子除了 *Oct-4* 之外，尚有 Sox2、FoxD3、Stat3 與 Nanog 等，這些轉錄調控因子可以獨立作用，或彼此相互協調而調控細胞之分化全能性或多能性 (Cavaleri and Scholer, 2003)。

本試驗源自不同生產方法所獲得的牛胚樣品，將 2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、桑椹期、及囊胚期等不同發育階段的牛胚各 10 個分別混合在一起，萃取 mRNA 之後，進行反轉錄為 cDNA，供 β -actin 及 *Oct-4* 二種基因的表現分析之用。利用更敏感精確的同步 PCR 分析單一胚的基因表

現，應能提升檢測之準確性，降低個別胚間的干擾差異 (Steuerwarl *et al.*, 1999)。未來也期能應用同步 PCR，與免疫化學螢光染色技術，將能有效確認轉錄因子調控胚的基因表現，此外，對胚及胚幹細胞發育調控因子之研究，將有助於進一步對胚發育全能性之了解。

參考文獻

- 李善男、劉振發、許義明。1997。經體外成熟和體外受精之牛卵母細胞與卵丘細胞共培養之發育率。中畜會誌 24 (4)：429~438。
- Boiani, M., S. Eckardt, H. R. Scholer and K. J. McLaughlin. 2002. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 16: 1209~1219.
- Bortvin, A., K. Eggan, H. Skaletsky, H. Akutsu, D. L. Berry, R. Yanagimachi, D. C. Page and R. Jaenisch. 2003. Incomplete reactivation of Oct-4 related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130 : 1673~1680.
- Cavaleri, F. and H. R. Scholer. 2003. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell* 113 : 551~557.
- Herr, W. and M. A. Cleary. 1995. The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9 : 1679~1693.
- Kirchhof, N., J. W. Carnwath, E. Lemme, K. Anastassiadis, H. Scholer and J. Niemann. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol. Reprod.* 63 : 1698~1705.
- Kubota, C., H. Yamakuchi, J. Todoroki, K. Mizoshita, N. Tabara, M. Barber and X. Yang. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 : 990~995.
- Mitalipov, S. M., H. C. Cho, J. D. Hennebold and D. P. Wolf. 2003. Oct-4 expression in pluripotent cells of the Rhesus monkey. *Biol. Reprod.* 69 : 1785~1792.
- Mitalipov, S. M., R. R. Yeoman, K. D. Nusser and D. P. Wolf. 2002. Rhesus monkey embryos produced by nuclear transfer from embryonic blastomeres or somatic cells. *Biol. Reprod.* 66 : 1367~1373.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer and A. Smith. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95 : 379~391.
- Niemann, H. and C. Wrenzycki. 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryo *in vitro* culture conditions, implications for subsequent development. *Theriogenology* 53 : 21~24.
- Niemann, H., C. Wrenzycki, A. Lucas-Hahn, T. Brambrink, W. A. Kues and J. W. Carnwath. 2002. Gene expression patterns in bovine *in vitro* produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning and Stem Cells* 4 : 29~38.
- Niwa, H., J. Miyazaki and A. G. Smith. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation, or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24 : 372~376.
- Onyango, P., S. Jiang, H. Uejima, M. J. Shambolt, J. D. Gearhart, H. Cui and A. P. Feinberg. 2002. Monoallelic expression and methylation of imprinted genes in human and mouse embryonic germ cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 : 10599~10604.
- Palmieri, S. L., W. Peter, H. Hess and H. R. Scholer. 1994. Oct-4 transcription factor is differentially

- expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* 166 : 259~267.
- Ponsuksili, S. K., Wimmers, J. Adjaye and K. Schellander. 2002. A source for expression profiling in single preimplantation bovine embryos. *Theriogenology* 57 : 1611~1624.
- Rief, S., F. Sinowatz, M. Stojkovic, R. Einspanier, E. Wolf and K. PELLE. 2002. Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 124 : 543~556.
- Rizos, D., A. Gutierrez-Adan, S. Perez-Garnelo, J. De La Fuente, M. P. Boland and P. Lonergan. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68 : 236~243.
- Scholer, H., R. Balling, A. K. Hatzopoulos, N. Suzuki and P. Gruss. 1989. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. *EMBO J.* 8 : 2551~2557.
- Steuerwarl, N., J. Cohen, R. J. Herrera and C. Brenner. 1999. Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol. Human Reprod.* 5 : 1034~1039.
- Takeda, J., S. Seino and G. I. Bell. 1992. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res.* 20 : 4613~4620.
- Tanaka, T. S., T. Kunath, W. L. Kimber, S. A. Jaradat, C. A. Stagg, M. Usuda, T. Yokota, H. Niwa, J. Rossant and M. S. Ko. 2002. Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res.* 12 : 1921~1928.
- Tian, X. C., C. Kubota, B. Enright and X. Yang. 2003. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer-biological factors. *Reprod. Biol. Endocrin.* 1 : 98.
- van Eijk, M. J., M. A. van Rooijen, S. Modina, L. Scesi, G. Folkers, H. T. van Tol, M. M. Bevers, S. R. Fisher, H. A. Lewin, D. Rakacolli, C. Galli, C. de Vaureix, A. O. Trounson, C. L. Mummery and F. Gandolfi. 1999. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. *Biol. Reprod.* 60 : 1093~1103.
- Wang, L. S. and G. A. Schultz. 1996. Expression of Oct-4 during differentiation of murine F9 cells. *Biochem. Cell. Biol.* 74 : 579~584.
- Wells, D. N., P. M. Misica and H. R. Tervit. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 60 : 996~1005.
- Wilmut, I., A. E. S., J. McWhir, A. J. Kind and K. H. S. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cell. *Nature* 385 : 810~813.
- Wrenzycki, C., D. Wells, D. Herrmann, A. Miller, J. Oliver, R. Tervit and H. Niemann. 2001. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 65 : 309~317.
- Young, L. E., K. D. Sinclair and I. Wilmut. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* 3 : 155~163.

The *Oct-4* gene expression at different stages of bovine embryos produced by *in vitro* and nuclear transfer⁽¹⁾

Jen-Wen Shiau⁽²⁾, Lee-Ching Tsai⁽²⁾, Yu-Hsin Chen⁽²⁾, Feng-Hsiang Chu⁽²⁾, Jenn-Rong Yang⁽²⁾, San-Nan Lee⁽³⁾ and Lih-Ren Chen^{(2) (4)}

Received : May 7, 2004 ; Accepted : July 8, 2004

Abstract

The purpose of this study was to investigate the expression of *Oct-4* and housekeeping gene *β-actin* in specific developmental stages of bovine embryos. Those embryos were produced by *in vitro* production (IVP) and nucleus transfer (NT), and developed *in vivo*. The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to measure the gene expression. In order to further identify these genes' amplification, the PCR products specific to *Oct-4* and *β-actin* were subcloned and DNA sequences were determined. Messenger RNA was isolated from bovine embryos produced by IVP, NT and *in vivo* at 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula, and blastocyst stage. The cDNA was obtained by RT-PCR and used as a source for PCR analysis of *Oct-4* and *β-actin* gene expression. Results showed that the expression of *Oct-4* and *β-actin* housekeeping gene could be detected at different stages of embryos from IVP, NT and *in vivo*. The results demonstrated that RT-PCR technique was a valuable tool for the analysis of important genes in bovine embryos. This system could be used in the development of molecular markers for early screening and quality determination of bovine embryos during the early stage of development.

Key words : Bovine embryo, Gene analysis, Development, Octamer-binding transcription factor 4 (*Oct-4*).

(1) Contribution No. 1239 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.
(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
(3) Deputy Director Office, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
(4) Corresponding Author.