

行政院國家科學委員會補助專題研究
計畫

期中進度報告
期末報告

豬卵母細胞特異性連接組蛋白基因表現調控及其功能之探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99-2628-B-029-001-MY3

執行期間：99年08月01日至101年07月31日

執行機構及系所：東海大學畜產與生物科技學系

計畫主持人：鄭登貴

共同主持人：歐柏榮

計畫參與人員：李彥勳，林維哲，周峻賢，陳冠彰，王愷雯

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

- 移地研究心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中 華 民 國 103 年 01 月 日

中文摘要

組蛋白(histone)為真核生物體細胞染色質中的基本結構蛋白質，依其所含鹼性胺基酸相對比例可區分為 5 種類型組蛋白(H1、H2A、H2B、H3 和 H4)，其中組蛋白 H1 又稱連接組蛋白(linker histone)，在哺乳動物細胞中存在 11 種亞單元，於發育不同時期能組成不同的結合模式，並在特定階段相互更換。卵母細胞特異性連接組蛋白(oocyte-specific linker histone H1, H1Foo)首先於小鼠中發現，已知職司細胞核內染色質結構之維持，並可能涉及卵母細胞的成熟、受精後精子染色質重構(chromatin remodeling)、胚原性與母源性基因轉換調控，與體細胞核移植時對體細胞核的再程序化(reprogramming)；惟豬卵母細胞之該基因全長核苷酸序列、蛋白質分子特性，及其可能涉及之生理作用機制，則迄未有明。鑑於豬隻繁殖過程中，豬胚存活率決定豬隻繁殖力，且早期胚存活之關鍵為 4-至 8-細胞胚期階段，即母源性基因停止表現，胚原性基因開始轉錄或轉譯之際，在此過程中，除特定轉錄因子的數量、活性外，染色質結構成分的變化也扮演關鍵性的角色。本研究已針對源自生發泡(germinal vesicle, GV)階段之豬卵母細胞之總 RNA 樣品，成功獲得豬 H1Foo(pH1Foo)完整 cDNA。並以此 cDNA 構築重組蛋白表現載體，轉染置豬內皮細胞 (PEC)，探討表現 H1Foo 重組蛋白對基因表現的影響。結果顯示 H1Foo 重組蛋白表現於細胞核中，且對細胞中 oct4, sox2, nanog 及 c-myc 之表現量有影響，此結果顯示 H1Foo 蛋白質對細胞的 remodeling 扮演重要的角色。此外，透過 H1Foo 5'調節區報導基因的分析之研究顯示 H1Foo 5'調節區的 1.5 Kb 及 0.8 Kb 並無法使 HiFoo 基因表現於小鼠 2-8 細胞的胚胎中，此結果顯示豬和小鼠胚胎中 H1Foo 基因表現的調節有很大的差異。

關鍵字：豬、卵母細胞特異性連接組蛋白質、胚胎發育

ABSTRACT

Eukaryotic histone proteins are mainly responsible for the nucleosome structure of the chromosomal fiber through package and order the DNA into nucleosome to provide the first level of chromatin organization. Among them, core histones (histones H2A, H2B, H3 and H4) play an essential role in constraining DNA wrapped around the histone octamer to produce a nucleosome core particle, while linker histones (histone H1 family) locate the exterior of the nucleosome core and associate with linker DNA to keep the chromatin in a helical and compact state to regulate gene expression. The oocyte-specific linker histone H1 (H1Foo) is first found in the mouse oocyte and participates in various steps of embryogenesis including oocyte maturation, sperm chromatin remodeling after fertilization and donor cell reprogramming after somatic nuclear transfer. The sequence of full-length H1Foo cDNA has been identified in mice, human, bovine and other non-mammalian species, but not in porcine. The objectives of this study were to identify and characterize the porcine specific H1Foo gene for explication of the maternal control of germline development following fertilization. Full length porcine H1Foo cDNA was cloned by RT-PCR from oocytes RNA in germinal vesicle. Expression of recombinant H1Foo in porcine endothelium cells showed the recombinant H1Foo protein was

located in nucleus. In addition, expression of H1Foo induced the expression of oct4 , sox2 , nanog and c-myc reprogramming related genes. To investigate the mechanism of regulation of H1FOO gene expression in early stage of embryo development, 5' regulatory region of H1Foo was cloned into a reporter gene containing plasmid. After microinjection, the reporter gene did not expression in mouse early stage of embryo development. This result indicates that expression of H1Foo gene is regulated differently in different species.

Key words: pig, oocyte-specific linker histone H1, embryo development

前言

真核生物染色質的主要化學成分為去氧核糖核酸(DNA)與組蛋白(histone)，其結構單體為核小體(nucleosome)，由 DNA 與組蛋白以特殊方式相連組成，包含核心顆粒(core particle)與連接區 DNA(linker DNA)兩部份(Baake et al., 2001)，在哺乳動物基因組中，組蛋白是調控基因表現的重要遺傳學機制，在保持胚幹細胞的全能性與癌症的病理過程中扮演重要角色，其具有多種修飾形式，包括：甲基化(methylation)、乙醯化(acetylation)、磷酸化(phosphorylation)等，組蛋白藉由這些不同的共價修飾作用，不但可以藉由調控組蛋白與 DNA 雙股的親和性，進而使染色質結構呈現疏鬆或凝集狀態，亦可藉由這些修飾作用影響其他轉錄因子與結構基因啟動子的親和性，調控相關基因表現。

組蛋白中的連接組蛋白具有種族與組織特異性，於染色質結構與功能皆具重要功能，與調節染色質纖維的濃縮與解濃縮有關，目前已知連接組蛋白不僅依其所在位置而具有連接及穩定兩核心組蛋白的八聚體特性，尚能藉由促進核小體的緊密折疊壓縮，使染色質形成高級結構，且可能涉及染色質之修飾、基因表達模式與發育調控等相關分子機制。與核心組蛋白相比，連接組蛋白具有更多的亞單元，在哺乳動物卵母細胞與早期胚發育過程中，已經鑑定的連接組蛋白共有 11 種亞單元，其中包括 7 種體細胞型連接組蛋白(H1.1 to H1.5, H10, and H1x)、3 種精子特異性型連接組蛋白(H1t, H1T2, and HILS1)與 1 種卵母細胞特異性連接組蛋白(H1Foo)(Wisniewski et al., 2007)，彼等連接組蛋白亞單元在不同的發育時期能夠形成不同的結合模式，並且依照特定方式相互更替。H1Foo 是在卵母細胞中發現的一種特異性連接組蛋白，於卵母細胞的成熟扮演重要的角色，目前已於小鼠(Tanaka et al., 2001)、人(Tanaka et al., 2003)與牛(Mcgraw et al., 2006)等哺乳動物中相繼發現，其與非哺乳動物的 cs-H1(源自海膽)、B4(源自非洲爪蟾)等卵特異性連接組蛋白具有同源性，亦即其蛋白質結構同樣具有 N 末端、C 末端與中央球狀結構區(central globular domain)，在結構上，小鼠、人與牛的 H1Foo 均由 5 個外顯子(exon)與 4 個內含子(intron)組成，此與體細胞型 H1s 不具內含子與多聚腺苷酸(polyadenylation motif)的特性相異。

目前對於 H1Foo 的調控機制仍迄未有明，但諸多試驗已對於 H1Foo 於早期胚發育過程中的表現圖譜提出討論 (Fan et al., 2003) 證明在早期卵母細胞、原核胚、2-與 4-細胞胚期中只有極少量甚至幾乎不存在的體細胞 H1s，但經過兩次卵裂至 4-細胞胚期後，體細胞型 H1s 將再次出現，而與此體細胞型 H1s 呈現相反的時空表現則是 H1Foo，因為其從早期卵母細胞到 2-與 4-細胞胚期將一直存在，至 4-細胞胚期末期才消失 (Tanaka et al., 2001)，證明不同亞單元的連接組蛋白在小鼠胚發育之 2-細胞期發生轉換，但其之間的相聯性則有帶進一步試驗之證明。此外，H1Foo 也被發現可能涉及體細胞核的基因組再程序化(genomic reprogramming)，Teranishi et al.(2004)發現，當體細胞核移置進入小鼠去核卵母細胞 10 分鐘後，H1Foo 即出現在供核體中，並且供核體細胞中的體細胞型 H1s 會被 H1Foo 替換，於 4-細胞胚期後才再度出現，此種 H1Foo 與體細胞型 H1s 之間的消長趨勢與體外受精的合子一致，推論 H1Foo 對於體細胞的基因組再程序化可能是不可或缺的重要因子之一。綜合上述，H1Foo 其表達方式具有一定的時序性，不但可能在母源性與胚原性基因表現轉換過程中發揮功能，於基因組再程序化過程中亦可能扮演關鍵性調控因子，因此分析研究 H1Foo 將有助於更深入了解染色質的重構、基因組再程序化過程以及核移置的分子機制。

早期胚存活或發育為一複雜之調控過程，尤其卵母細胞原本係一種高度分化的生殖細胞，當卵與精子完成受精作用後，受精卵必須在早期胚發育過程中，將其原本處於高度分化之細胞型態轉化為具有多分化潛能之分溝細胞(blastomere)，且此一轉換變化需於胚埋植發生之前完成，而在胚埋植發生之前，其發育已知必須經過三個發育轉換階段始能順利使胚繼續存活並埋植，其中第一個轉換階段主要是母源性與胚源性轉換(maternal to zygoteic transition)，意即在此過程期間，母源性基因將停止表現，而胚源性基因則開始進行轉錄或轉譯以供胚後續發育，第二個轉換階段為細胞緊縮

(compaction)，此階段胚的發育需要藉由細胞與細胞間的相互作用使克進行，第三個轉換階段則位於桑椹胚(morula)期進入囊胚期(trophoblast)；第一階段有別於其他兩個階段，其對於胚能否存活甚具關鍵，因此又稱為哺乳動物早期胚發育得障阻期，其發生階段依物種不同，以豬胚為例，早期胚存活之關鍵為 4-至 8-細胞期間(Telford et al., 1990)，在此過程中，除特定轉錄因子的數量、活性外，染色質結構成分的變化也扮演關鍵性的角色。

鑑於 H1Foo 與體細胞型 H1s 之轉換，於小鼠與牛等物種中洽處於胚原性與母源性基因轉換的時期，且吾等希冀能更深入探討豬胚細胞其基因表現模式於發育過程中產生轉換的調控機制，故藉由本研究室取得之 pH1Foo 之全長序列，成功構築可於豬心血管內皮細胞(procine endothelial cells,PEC)內單獨表現 H1Foo 蛋白質及 H1Foo 與 EGFP 融合蛋白之載體，藉此探討 H1Foo 之表現對於一般體細胞之影響及其於細胞內表現之位置。

材料與方法

生發泡(germinal vesicle, GV)階段之豬卵母細胞之 mRNA 萃取

將數目約 50 顆 GV 階段之豬卵母細胞以 mRNA 萃取套組處理(Dynabeads mRNA DIRECT kit Invitrogen)；首先將卵母細胞置於 50 μ L lysis/binding buffer 中 2 分鐘，65°C，後續將含有細胞之 lysis/binding buffer 轉移至乾淨之微量離心管中，並加入 20 μ L Dynabeads Oligo(dT)25 magnetic particles 溶液，於室溫下均勻混合約 5 分鐘後，依序已 washing buffer A 及 washing buffer B 處理後，以 100 μ L 10mM Tris-HCL 回溶 mRNA-bound magnetic particles。

cDNA 末端快速擴增技術 (rapid amplification of cDNA end, RACE)

將上一步驟所得之 mRNA-bound magnetic particles 經由 calf intestinal phosphatase 及 tobacco acid pyrophosphatase 處理後，使 mRNA 可藉由 T4 RNA ligase 與 GeneRacer kit(Invitrogen)中之 GeneRacer RNA Oligo 做連結後，利用 GeneRacer oligo dT primer 及藉由已知的基因序列所設計的 5'端 (5'-CCTGATCAAGAGCAGCATCC)和 3'端(5'-GGGTCTTGTTGCCTTTTTGA)之引子進行實驗，藉此獲得基因全長序列之 5'端和 3'端之序列，以利後續獲得基因全長序列。

利用 RT-PCR 選殖豬 H1Foo cDNA

以 RACE 所得之實驗結果，設計出預測可夾出全長 H1Foo 引子，Forward, 5'-CTGGCAGCTTCAAATTGGTT；Reverse, 5'-CTAGTTCTTGGCCTCAGCCTCC，並以 GV-階段之卵母細胞萃取其 RNA，以此 RNA 為模板進行 RT-PCR，藉此得到全長之 H1Foo 基因序列。

豬心血管內皮細胞(porcine endothelial cells, PEC)

PEC 細胞為豬心臟主動脈內皮細胞，係由本實驗室早期經由初級培養而得。豬主動脈內皮細胞以手術刀輕輕刮起，置於含有 collagenase 的 PBS 中，置於 37°C 培養 5 分鐘，離心後收取細胞，將細胞培養於含 10% FBS M199 培養基，置於 5% CO₂ 37°C 培養箱培養，每隔一天繼代培養一次。

細胞轉染

將 PEC 培養於 6 公分培養皿中至八分滿，以適量體積之 M199 與 PolyJet 細胞轉染試劑混合均勻；另，同樣以適量體積之 M199 與預轉染之質體混合均勻，再將已混合好之 PolyJet 細胞轉染試劑與質體混合均勻，於室溫下靜置 15 分鐘後，加入細胞培養液中，於 37°C 恆溫培養箱中作用 6 個小時，將培養液更換為含有 10%FBS、P/S 與 G418 之 M199 培養液，以利後續可篩選轉染成功之細胞。

RNA 萃取

分別萃取一般 PEC 及已轉染 pEGFPH1Foo 之 PEC 的 RNA。首先取 1ml 的 Trizol 加入 10 公分培養皿中，以細胞刮杓將貼盤之細胞刮起，收集至 1.5ml 微量離心管中，加入 200 μ l 的氯仿並劇烈搖晃混合後，

於冰上靜置 10 分鐘，於 4°C 以 12000xg 離心 15 分鐘，取上清液另置於 1.5ml 微量離心管中，添加 500 μ l 之異丙醇並於 -20°C 靜置 30 分鐘後，於 4°C 以 15000xg 離心 15 分鐘，去除上清液後，加入 1ml 75% 酒精，於 4°C 以 7500xg 離心 5 分鐘，去除上清液後，留沉澱物並將其乾燥，加入 25 μ l 去核酸水回溶後，放入 -80°C 備用。

Real time RT-PCR

於微管中加入 10X RT Buffer 2 μ l、dNTP Mix 0.8 μ l(10mM)、10X RT Random Primer、MultiScribe Reverse Transcriptase 1.0 μ l、dd water 6.2 μ l 及 RNA 10 μ l。於 25°C 10 分鐘，37°C 120 分鐘及 85°C 5 秒鐘。

於微管中加入 TaqMan Fast Universal PCR Master Mix(2X) 10 μ l、前端引子 1 μ l、後端引子 1 μ l、模板 2 μ l 及 dd water。於 95°C 10 分鐘、95°C 15 秒及 60°C 60 秒鐘進行 40 次循環。(Step one Real time PCR system, AB Applied Biosystem)

H1Foo 基因 5'端調節區報導基因之質體建構

豬隻 H1Foo 基因 5'端調節區的 DNA 經 PCR 擴增之產物為 1500 bp，DNA 定序後以電腦分析軟體分析 cis acting elements 的位置，並根據所得重要 cis acting elements 的位置設計引子，進行 PCR 反應，以得到 1500 及 888 bp 長短不等之豬隻 H1Foo 5'調節區 DNA 片段，再將此片段構築於報導質體。構築報導質體方法簡述如下：將商業用表現載體 pGL3-basic 原有之 luciferase 報導基因置換成綠色螢光蛋白報導基因 (GFP)，取經限制酵素處理過之 5'端調節區的 DNA 與載體，加入 5 μ l 之 2 X ligase buffer，1 μ l T4 DNA ligase (3 U/ μ l)，加入滅菌水至 10 μ l，均勻混合後，置於 4°C 反應過夜；第 2 天轉形至 DH5- α 勝任細胞，抽出質體，並加以定序，以確定片段是否正確。

Microinjection DNA 制備

將 1500 及 888 bp 長短不等之豬隻 H1Foo 5'調節區報導基因載體以適當限制酶酵素剪切後，將其產物以洋菜膠電泳方式將目標核酸片段與載體上其他核酸片段分離後，將目標核酸片段連同洋菜膠一同截切，以膠上純化之套組回收洋菜膠內目標 DNA 片段。後續將此片段進行氯化鈉密度梯度超高速離心，以提高目標核酸之純度。純化後之目標 DNA 回溶於 microinjection buffer 中，放於 -20°C 冰箱備用。

小鼠胚之收集

取約 6 周齡的 ICR 母鼠注射孕馬血清激性腺素 (pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG)，42~48 小時後注射人類絨毛膜激性腺素 (human chorionic gonadotropin, HCG)，並將其與公鼠進行配種。配種後隔天早上，若在母鼠陰道內發現由公鼠精液之膠質所形成之陰道栓，即可判定母鼠已被公鼠配上；此時將配上之母鼠犧牲後，即可由其輸卵管得到顯微注射時須用到之原核期的胚胎。

基因顯微注射

將溶於 injection buffer 中之目標核酸片段注射入原核期的胚胎中，使其有機會鑲嵌進胚胎中原有的基因體序列中。

結果與討論

pH1Foo 基因結構

藉由 5'-cDNA 末端快速擴增(rapid amplification of cDNA end, 5'-RACE)技術，針對源自生發泡(germinal vesicle, GV) 階段之豬卵母細胞之總 RNA 樣品，透過 RNA 連接酶仲介(RNA ligase-mediate, RLM)策略，再參考本研究團隊先前業經建立豬早期胚表現序列標籤序列庫之資訊，完成設計豬之 H1Foo (pH1Foo)序列之反向引子，並依其 RNA 寡核苷酸序列設計正向引子，經由反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)初步獲得 pH1Foo 之 cDNA 產物，再經 TA cloning 及定序，成功選殖獲得 pH1Foo 之 5'端序列(圖一、圖二)，最後在依據 pH1Foo 之 5'-及 3'-端序列設計引子，透過 RT-PCR 成功獲得兩種不同長度(1170 bp 及 1215 bp)之 pH1Foo 完整 cDNA，經基因結構分析與定序結果，證明該二不同長度之 pH1Foo cDNA 產物，乃基因轉錄後不同選擇性剪接(alternative splicing)所使然(圖三)。此外，pH1Foo 的胺基酸長度與已發表之 pH1Foo 相比顯示本研究中之所得之胺基酸序列較原已知之序列多五個胺基酸，此五個胺基酸位於蛋白質 N 端，與其他動物 H1Foo 胺基酸序列相比顯示豬 pH1Foo 和其他物種(人、鼠、牛)的 H1Foo 有很大的差異性(表一)。

pH1Foo 蛋白質在細胞的表現

將在研究計畫中所得之 H1Foo cDNA 基因片段以 PCR 之方式放大並將其放入可在真核生物中表現外來蛋白質的 pEGFP 質體中(圖四)，其中具有 H1Foo 基因片段並含有終止密碼的在質體建構完成後，稱為 pEGFPH1Foo，此質體於宿主細胞中僅可表現 H1Foo 蛋白質。另一質體建構則是將 H1Foo 基因片段的終止密碼去除，質體建構完成後稱為 pEGFPH1Foo-2，此質體可在細胞中表現出 H1Foo 蛋白與綠色螢光蛋白之融合蛋白(圖五)。將 pEGFPH1Foo-2 轉染至 PEC 中，以螢光顯微鏡觀察，結果顯示 H1Foo 蛋白與綠色螢光蛋白之融合蛋白出現在細胞核中，反之，轉染 pEGFP 之 PEC 不僅可在細胞核內且細胞質也可觀察到綠色螢光蛋白。此結果顯示 pH1Foo 蛋白和其他組蛋白(histone)一樣只存在於細胞核(圖七)，與細胞核中 DNA 結合。此外，進一步以共軛焦顯微鏡觀察，顯示代表 H1Foo 蛋白質的綠色螢光在細胞核的分布與 DAPI 染色分布完全一致(圖八)，顯示 H1Foo 蛋白質在細胞核中直接與 DNA 結合。

表現 pH1Foo 蛋白質對豬內皮細胞(PEC)基因表現的影響

以未轉染 PEC 為對照組，轉染 pEGFPH1Foo 並經過 G418 抗生素篩選過後之 PEC 為處理組，以 Real-time PCR 分析 oct4, sox2, nanog, c-myc 等基因的表現量。分析結果顯示，處理組其 oct4 表現量約為對照組的 1.5 倍，sox2 為 7 倍，nanog 將近 30 倍，c-myc 則為 4 倍(圖六)。前人研究報告指出轉染此四個

基因於成熟體細胞可誘發細胞 reprogramming 而成為誘發性多能幹細胞 (iPSC)，因此 H1foo 蛋白質基因的表現可能和 DNA remodeling 有關進而影響到細胞的 reprogramming。

pH1Foo 基因 5'端調節區報導基因在小鼠胚之表現

分別以 1500 bp 及 888 bp pH1Foo 基因 5'端調節區報導基因以顯微注射的方式打入一細胞期的小鼠胚，探討 H1Foo 基因在不同胚時期的表現。實驗結果顯示不論是 1500 bp 或 888 bp pH1Foo 基因 5'端調節區均無法在鼠胚中誘發報導基因的表現 (圖九)，此結果顯示 H1Foo 基因調節在不同物種中有很大的不同。

結論

本研究成功藉 cDNA 末端快速擴增技術獲得正確之豬 H1Foo 基因序列，並發現 H1Foo 蛋白質比其他文獻報導多五個胺基酸。在 PEC 內表現 H1Foo 蛋白質顯示可影響 oct4，sox2，nanog 及 c-myc 等幹細胞 reprogramming 相關基因之表現量。而以 H1Foo 及綠色螢光蛋白之融合蛋白顯示 H1Foo 蛋白質表現於細胞核中；另，利用胚顯微注射技術，注入有 H1Foo 不同片段長度之啟動子序列報導基因之小鼠胚，觀察報導基因在早期小鼠胚胎發育期的調控，結果顯示不同物種此基因調控機制不同。

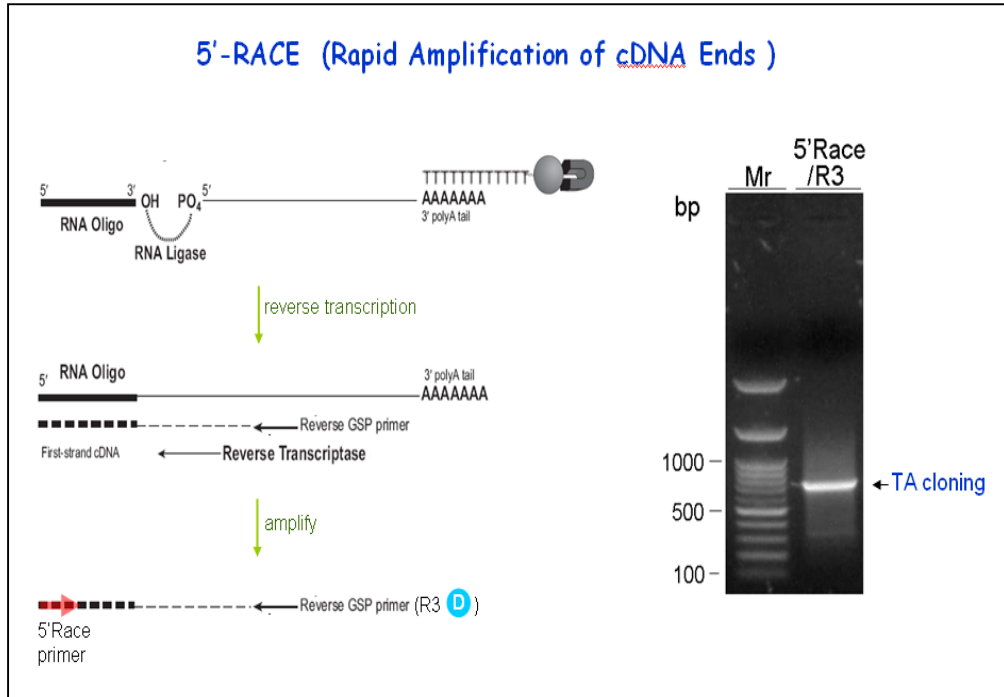
計畫成果自評

本研究順利完成豬隻 H1Foo 基因的選殖及功能探討，將有助於了解豬胚中此基因表現調節及功能的，符合預期。

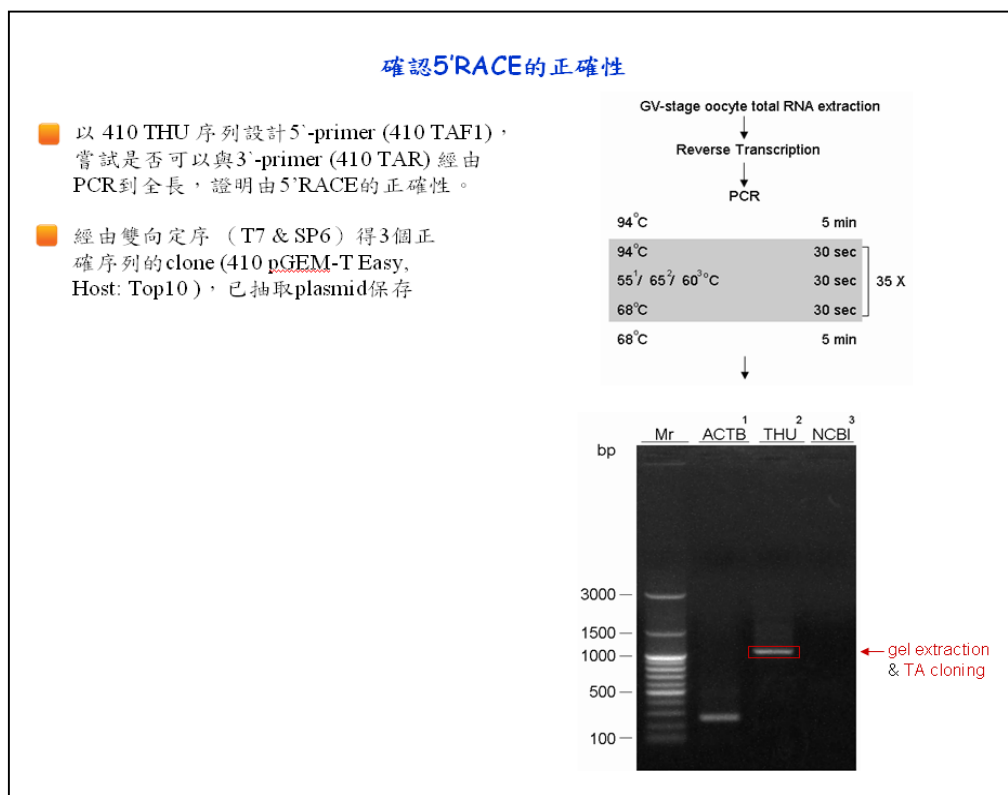
參考文獻

- [1] Baake, M, M Bäuerle, D Doenecke, and W Albig. 2001. Core histones and linker histones are imported into the nucleus by different pathways. *Eur. J. Cell Biol.* 80: 669–677.
- [2] Wiśniewski, JR, A Zougman, S Krüger, and M Mann. 2007. Mass spectrometric mapping of linker histone H1 variants reveals multiple acetylations, methylations, and phosphorylation as well as differences between cell culture and tissue. *Mol. Cell Proteomics* 6: 72–87.
- [3] Tanaka, M, JD Hennebold, J Macfarlane, and EY Adashi. 2001. A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development* 128: 655–664.
- [4] Tanaka, Y, S Kato, M Tanaka, N Kuji, and Y Yoshimura. 2003. Structure and expression of the human oocyte-specific histone H1 gene elucidated by direct RT-nested PCR of a single oocyte. *Biochem Biophys Res. Commun.* 304: 351–357.
- [5] McGraw, S, C Vigneault, K Tremblay, and MA Sirard. 2006. Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 692–699.

- [6] Fan, Y., T. Nikitina, E.M. Morin-Kensicki, J. Zhao, T.R. Magnuson, C.L. Woodcock, and A.I. Skoultchi. 2003. H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 23:4559-4572.
- [7] Teranishi, T, M Tanaka, S Kimoto, Y Ono, K Miyakoshi, T Kono, and Y Yoshimura. 2004. Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo. *Dev. Biol.* 266: 76–86.
- [8] Telford, N.A., A.J. Watson, and G.A. Schultz. 1990. Transition frommaternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.* 26:90-100..



圖一、5'-cDNA 末端快速擴增 H1Foo 結果。



圖二、5'-cDNA 末端快速擴增之正確性確認。

Genomic regions, transcripts, and products

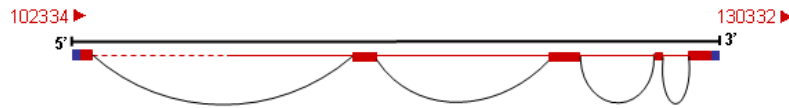
NCBI Map Viewer

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?TAXID=9623&CHR=13&MAPS=cntg%2Cug%2Cgenes&BEG=17184835&END=17217557>

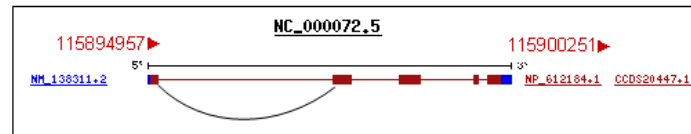
NCBI 410 gene http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=100153445

NCBI RHO gene http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=397437

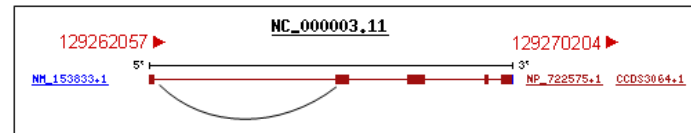
THU predict



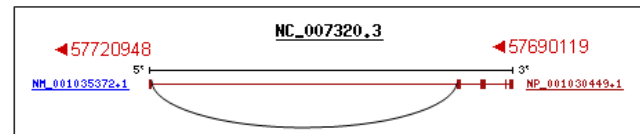
[*Mus musculus*]



[*Homo sapiens*]



[*Bos taurus*]



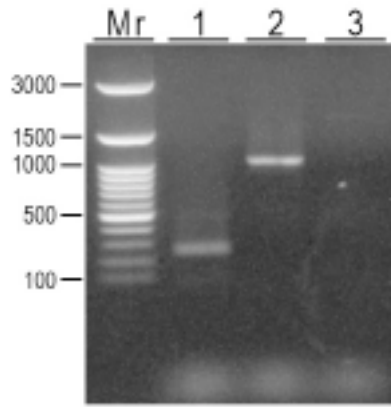
圖三、H1Foo 於不同物種之基因組分佈圖。

表一、pH1Foo 蛋白質以二序列比對(pairwise sequence alignment)所得之結果。

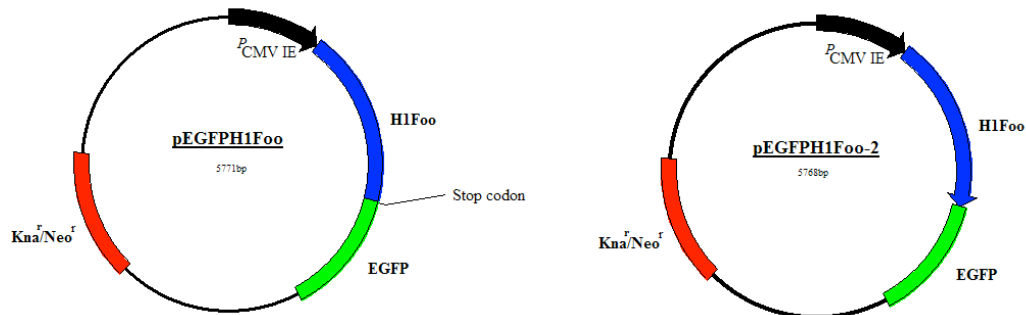
Pairwise sequence alignment

Species	Reference Protein	Length (aa)	Identity (%)	Number of residues overlap	Position of the best local alignment
Sus scrofa	THU Laboratory	346			
Sus scrofa	vs. NCBI XM_001926895.1	341	95.0	319	40-346 : 23-341
Homo sapiens	vs. NP_722575.1	346	54.4	351	1-344 : 1-346
Bos Taurus	vs. NP_001030449.1	343	66.0	353	1-345 : 1-342
Gallus gallus	vs. XP_001235137.1	295	33.0	276	55-317 : 22-294
Mus musculus	vs. NP_612184.1	304	39.9	313	13-321 : 2-300
Rattus norvegicus	vs. XP_578376.1	332	40.8	341	12-346 : 4-332
Pan troglodytes	vs. XP_001144407.1	346	53.6	351	1-344 : 1-346
Canis familiaris	vs. XP_852262.1	323	66.7	303	51-346 : 21-323
Danio rerio	vs. NP_898894.2	257	31.7	208	47-251 : 36-243

Calculate by LALIGN program (Huang & Miller, 1991; http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html), published in Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357

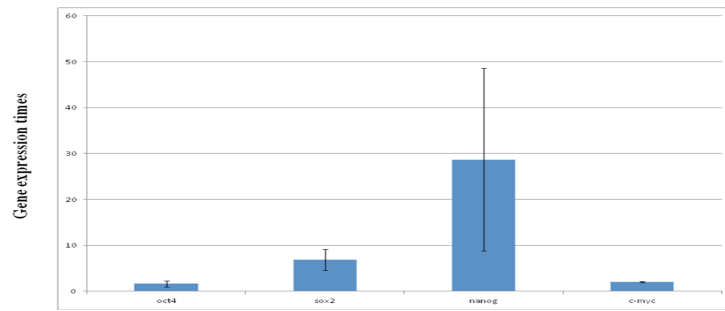


圖四、分別以本實驗與 GeneBank 所預測之 pig H1Foo 全長序列所設計之引子測試 GV 階段卵母細胞所表現之 H1Foo 基因，Mr, 100 bp DNA marker；1， pig β -actin；2，本實驗所預測之 H1Foo 全長序列；3，GenBank (XM_001926895)所預測之全長序列。

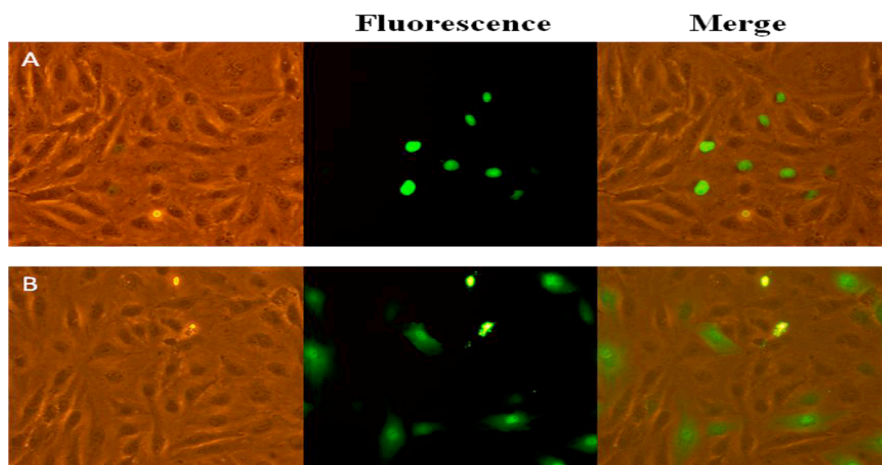


圖五、pEGFPH1Foo與pEGFPH1Foo-2之質體構圖。

(A) pEGFPH1Foo，其可於真核細胞內表現 H1Foo 蛋白質，(B) pEGFPH1Foo-2，其可於真核細胞內表現 H1Foo 與 EGFP 融合蛋白。

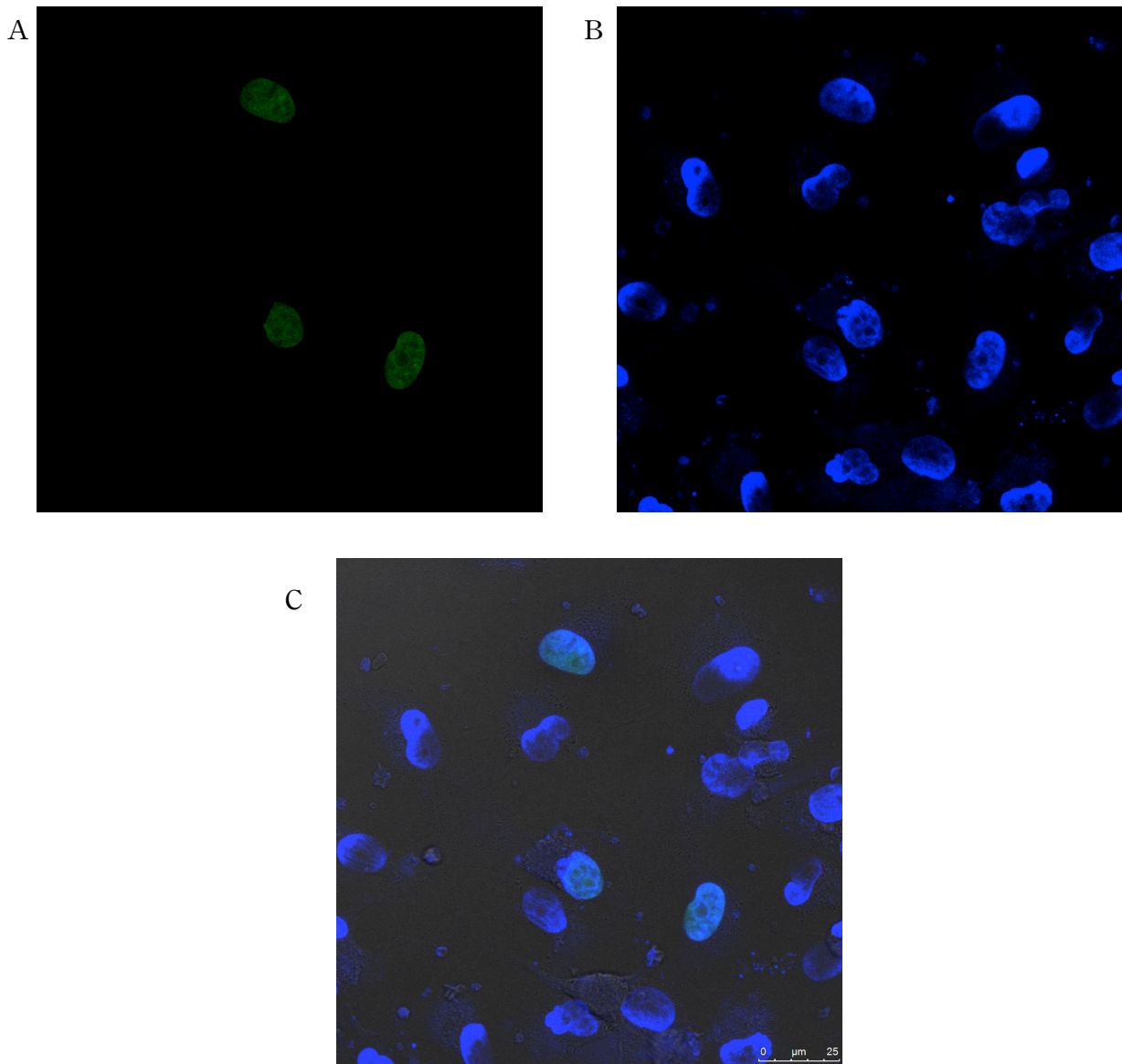


圖六、PEC 與轉染 pEGFPH1Foo 後 PEC 其 oct4、sox2、nanog 及 c-myc 等基因之表現量比較。

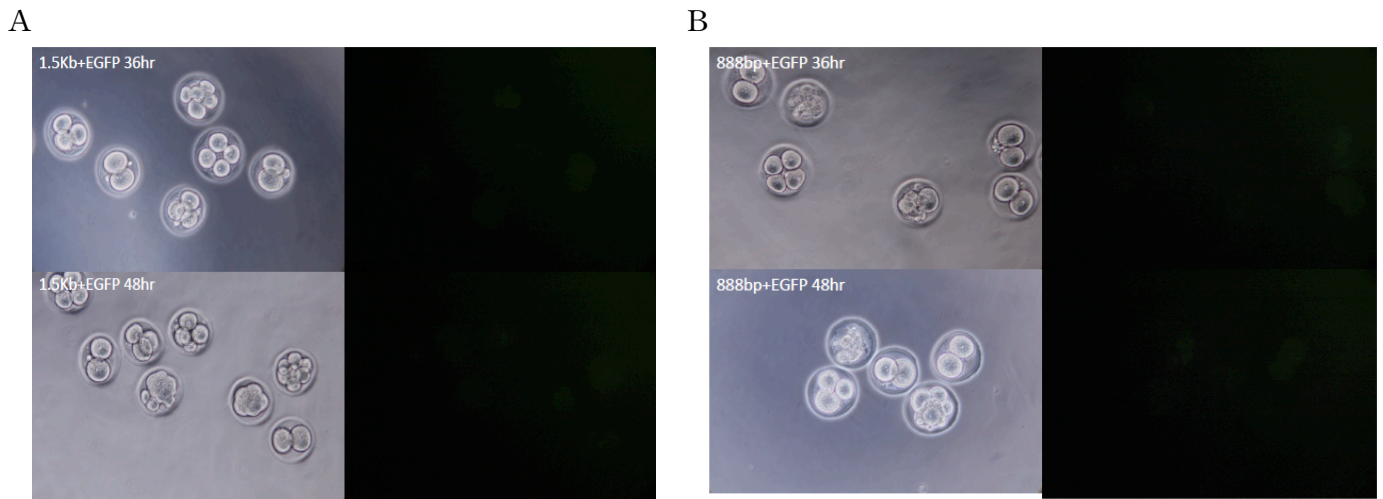


圖七、pEGFPH1Foo-2及pEGFP分別轉染至PEC內並於UV顯微鏡光下觀察。

(A)PEC 轉染 pEGFPH1Foo-2，(B) PEC 轉染 pEGFP。



圖八、pEGFPH1Foo-2 轉染至 PEC 內並以共軛焦顯微鏡觀察。
A: pEGFPH1Foo-2 轉染至 PEC；B: DAPI 染色圖；C: A 圖及 B 圖重疊照



圖九、pH1Foo 基因 5'端調節區 GFP 報導基因在小鼠胚之表現

A: 含 1500 bp pH1Foo 基因 5'端調節區 GFP 報導基因在小鼠胚之表現。左圖：明視鏡；右圖：螢光鏡。

B: 含 800 bp pH1Foo 基因 5'端調節區 GFP 報導基因在小鼠胚之表現。左圖：明視鏡；右圖：螢光鏡。