

東海大學畜產與生物科技學系
Department of Animal Science and Biotechnology
Tunghai University

碩士論文
Master Thesis

指導教授：鄭登貴 博士
Advisor: Winston Teng-Kuei Cheng, Ph.D.

共同指導教授：歐柏榮 博士
Co-advisor: Bor-Rung Ou, Ph.D.

豬卵母細胞特異性連接組蛋白 H1Foo 之基因選殖及
其分子特性探討
Cloning and Characterization of Oocyte-Specific
Linker Histone H1 Gene in Pig (*Sus Scrofa*)

研究生：李彥勳
Graduate student: Yan-Shun Lee
中華民國一百零四年一月
January, 2015

目錄

表次.....	II
圖次.....	III
壹、摘要.....	1
貳、文獻回顧.....	2
一、體細胞核轉置.....	2
二、胚胎幹細胞.....	3
三、體細胞核再程序化作用.....	4
四、核小體.....	5
五、組蛋白.....	8
六、連接組蛋白.....	9
七、H1Foo 連接組蛋白.....	10
參、材料與方法.....	13
一、卵母細胞之收集.....	13
二、卵母細胞 mRNA 萃取.....	13
三、5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE).....	14
四、反轉錄聚合酶連鎖反應.....	18
五、膠體上 DNA 純化.....	18
六、接合反應.....	19
七、轉形反應.....	19
八、真核表現質體建構.....	19
九、豬動脈內皮細胞之培養與質體轉染試驗.....	23
肆、結果.....	30
一、選殖豬 H1Foo cDNA 全長序列.....	30
二、豬 H1Foo 基因功能的探討.....	31
伍、討論.....	44
一、選殖豬 H1Foo cDNA 全長序列.....	44
二、H1Foo 蛋白質功能探討.....	46
陸、結論.....	49
柒、參考文獻.....	50
捌、英文摘要.....	55
玖、小傳.....	56

表次

表一、反轉錄聚合酶連鎖反應中之引子序列.....	28
表二、真核載體製備用之引子序列.....	28
表三、Real-Time PCR 試驗中之探針序列.....	29
表四、以 pEGFPH1Foo 質體轉染 PEC 對其細胞週期的影響.....	43

圖次

圖 一、核小體結構圖	6
圖 二、雙股螺旋去氧核糖核酸經折疊後形成染色質	7
圖 三、5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) 試驗流程簡易流程圖	15
圖 四、真核表現載體 pIRES2EGFP	21
圖 五、豬 H1Foo 基因轉錄選擇性切位確認	33
圖 六、豬 H1Foo 基因之 cDNA 全長及其編碼之胺基酸序列	34
圖 七、以 GV 時期之卵母細胞進行反轉錄聚合酶反應分析	35
圖 八、豬 H1Foo cDNA 序列比對	36
圖 九、不同物種 H1Foo 胺基酸序列比對	37
圖 十、豬 H1Foo 蛋白之真核表現載體	38
圖 十一、豬 H1Foo 及 EGFP 融合蛋白真核表現載體	39
圖 十二、於 PECs 內表現 H1Foo 與 EGFP 之融合蛋白	40
圖 十三 A、比較 PECs 及轉染 pEGFP-H1Foo-2 之 PECs 其幹細胞相關基因表現量	41
圖 十三 B、比較 PECs 及轉染 pEGFP-H1Foo-2 之 PECs 其幹細胞相關基因表現量	42

壹、摘要

卵母細胞特異性連接組蛋白 (oocyte-specific linker histone H1, H1Foo), 已知涉及細胞核內染色質正常結構之維持, 且職司基因表現之調控; 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。本研究藉由 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, 首先完成 5'-RACE 作業, 再參考本研究團隊先前已建立豬早期胚表現序列標籤序列庫 (EST data base) 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。最後再依據 pH1Foo 之 5'端及 3'端序列設計引子, 透過 RT-PCR 策略成功獲得長 1107 bp 之 pH1Foo 完整 cDNA。其轉譯框架共編碼 346 個胺基酸序列。後續以真核細胞表現載體將 pH1Foo 蛋白質表現於豬動脈內皮細胞內 (PECs), 並以綠色螢光蛋白為報導基因, 藉此判斷 pH1Foo 蛋白存在於細胞核中。另, Real-time PCR 結果顯示於動脈內皮細胞表現 H1Foo 蛋白質後, 幹細胞等相關基因 (Oct4, Nanog 和 C-myc) 其表現量增加。此外, 表現外來 H1Foo 蛋白質之動脈內皮細胞其細胞週期相較於一般動脈內皮細胞, G0/G1 時期細胞數減少, 而 Sub-G1 之細胞數增加。綜上所述, 於豬內皮細胞中表現 H1Foo 蛋白會導致幹細胞等相關基因表現量增加, 但會導致細胞自然凋亡之比例增加。

關鍵詞：豬、卵母細胞特異性連接組蛋白質、再程序化

貳、文獻回顧

豬體細胞核轉置 (somatic cell nucleus transfer ; SCNT) 及胚幹細胞 (embryo stem cell) 方面等研究，對於畜牧和醫學的發展有相當的助益。藉此可進行優秀個體保種、品種改良、培育抗病豬種、提高肉質、生產轉基因豬或基因組修飾豬、製備人類疾病模型、進行器官移植、生產藥物蛋白、研究發育機制等。但就目前研究進展，豬之體細胞核轉置方面，其成功率偏低 (Prather *et al.*, 2007)。體細胞核轉置及幹細胞產製之過程中，尚有許多機制未明，故探討其中之機制及尋求改善方式為目前重要研究方向。

一、體細胞核轉置

體細胞核轉置試驗流程為收集未受精之卵母細胞於體外培養至 MII 期後，以顯微操作技術去除卵母細胞中之細胞核及極體 (polar body)，另一方面，由供核個體上取某部位之體細胞，並通過降低細胞培養液中血清含量之方式，使供核細胞之細胞週期回歸至 G0 時期，後續將供核體細胞注入去核之卵母細胞中通過電刺激使其進行融合，體細胞核進入去核卵母細胞後開始進行再重組後，並成功進行細胞分裂至桑葚期後，將胚胎移植至代理孕母內，使其成功發育為新的個體。藉此技術於 1997 年成功誕生了複製羊 (Wilmut *et al.*, 1997)，此試驗成果為生物學上重要里程碑，代表已高度分化之體細胞核可經由卵母細胞之孕育而調控至分化前之型態，並可以藉由此技術將優秀或稀少之動物進行保種。後續將體細胞核轉置技術、分子生物與基因工程結合，於體外進行綿羊胎兒纖維母細胞初代培養，再將綿羊 β 乳球蛋白啟動子與人類第九凝血因子和抗新黴素基因構築成的融合基因，轉染送入胎兒成纖維母細胞中，同時在體外培養期間以新黴素 (neomycin) 進行篩選，挑選出帶有外源基因的細胞作為供核細胞，進行體細胞核轉置

試驗，產生了帶有人類凝血因子IX基因之轉基因綿羊，此試驗結果顯示此技術於醫藥應用方面之價值 (Schnlele *et al.*, 1997)。至目前為止，人們已經成功藉由體細胞核轉置之技術順利產生羊、牛、山羊、豬等大型家畜，其中豬之生理結構與人類相近，故其成為人類疾病模型或生產醫藥蛋白之首選，然而 SCNT 技術在高等生物中，目前仍有許多問題存在。例如利用體細胞核轉置所產生之複製動物有先天畸形或壽命減短的現象。

二、 胚幹細胞

身體內的大多數細胞，往往都是已經成熟分化完全之細胞，例如皮膚細胞、肝臟細胞或是口腔細胞，這些細胞在沒有任何的外力刺激或是突變下，不會再分化為其他細胞，這樣的細胞通稱為體細胞 (somatic cell)。胚幹細胞則是和這些已經分化完成的體細胞有顯著的差異性，幹細胞是一群具備有分化能力的細胞，可以在受到特定的刺激下，分化成特定的細胞。幹細胞主要可分為兩大類：發育時期中的幹細胞與成體幹細胞 (adult stem cells)。胚幹細胞 (embryonic stem cells) 即屬於發育時期中的幹細胞，其來自於動物或是人體發育胚胎中具有多能性分化能力之幹細胞，具備能分化成各式各樣組織器官細胞的能力。在胚發育早期，受精卵分裂發育成為八個細胞的階段，此時每一個細胞分開後，均可以發育形成一個完整個體。其稱之為全能性幹細胞 (totipotent)。另外，多能性幹細胞 (pluripotent) 則是可以分化成身體內的各式各樣細胞，但是無法由單一顆細胞就形成個體。目前，有一些從骨髓取出的間葉型幹細胞或是造血幹細胞則可以分化成多種形式的細胞，但其分化能力較有限，將之稱為多潛能幹細胞 (multipotent)。隨著不同分化層階，越後段的幹細胞，分化的能力也越有限 (Alison *et al.*, 2002)。由於胚幹細胞相較於成體幹細胞，更能達到分化為各式各樣細胞的能力，在醫療應用上也較被期待。在早期，便有許多團隊投入體細胞核轉

置之技術，將體細胞內之細胞核注入至捐贈者之去除核的卵子中，來形成全能性幹細胞 (Standley and Gurdon 2002)，後續研究發現將四個與幹細胞特性相關的轉錄因子 Oct4、Sox2、C-myc 及 Klf4，利用反轉錄病毒感染的方式導入小鼠皮膚纖維母細胞後，即可以促使纖維母細胞重新再程序化 (reprogramming)，形成具有多能性幹細胞的分化能力，這樣的細胞稱為誘導式多能性幹細胞 (iPS 細胞；induced pluripotent stem cells)(Takahashi and Yamanaka 2006)。小鼠 iPS 細胞，如同胚胎幹細胞般，可以移植回到囊胚體中，隨著小鼠胚胎進行發育，最後形成嵌合體鼠 (chimera mice)，此成果顯示，小鼠 iPS 細胞具備有小鼠胚胎幹細胞的功能，也就是可以分化成三胚層，也能發育成一整個個體。除在小鼠中成功製作了 iPS 細胞，可以從不同物種的細胞製作 iPS 細胞，例如人類、小鼠、大鼠以及獼猴等。不過目前製作的效率仍偏低。

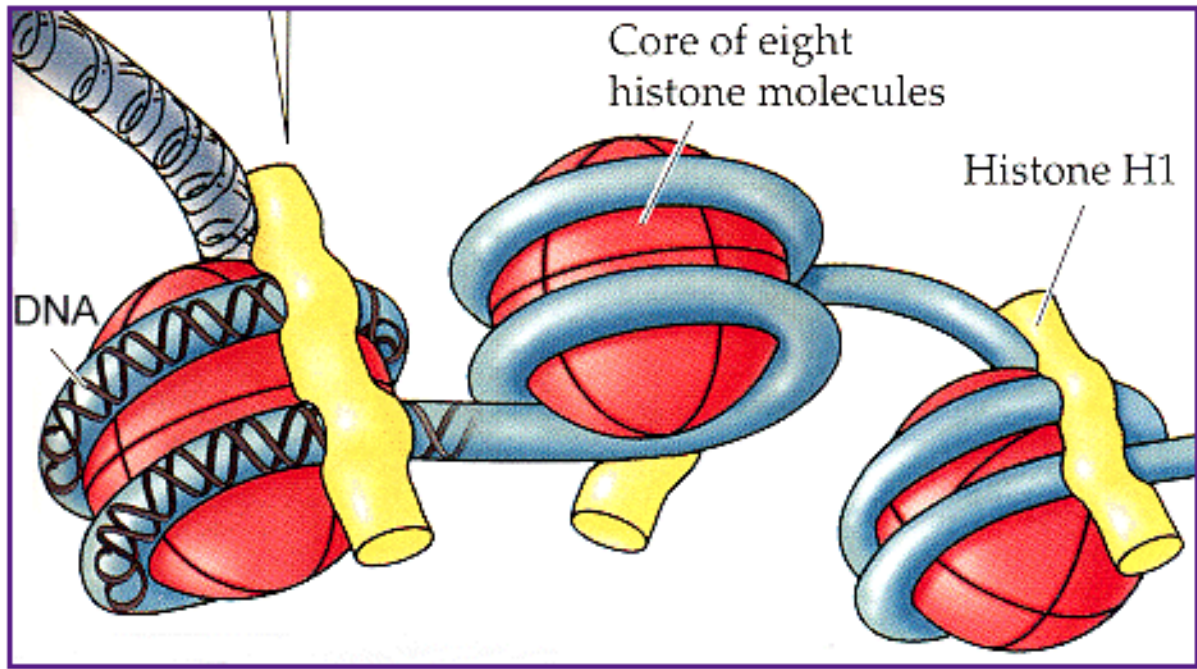
三、體細胞核再程序化作用

不論是體細胞核轉置或是胚胎幹細胞等研究，體細胞核之再程序化皆是其中成功與否之重要環節。體細胞核之再重組是將已經高度分化之體細胞核之型態，透過卵母細胞中環境條件之調節或是特定基因誘導而轉化成胚胎時期之細胞核型態，使其重新具有高度分化功能之細胞狀態。經試驗證實在小鼠體細胞核轉置過程中，體細胞核內體細胞連接性組蛋白 (somatic linker histone) 於60分鐘內被卵母細胞特異性連接組蛋白 (oocyte specific linker histone) 所取代，胚發育到2-細胞到4-細胞期時，卵母細胞特異性連接組蛋白逐漸降解，體細胞連接組蛋白再次表現於細胞核當中 (Gao *et al.*, 2004)。相同情形發生於精子於受精過程中 (fertilization)，精子內之核蛋白被卵母細胞特異性連接組蛋白所取代 (Nakazawa *et al.*, 2002)。故探討組蛋白之轉換對於體細胞再程序化之影響有助於體細胞核轉置或是幹細胞等研

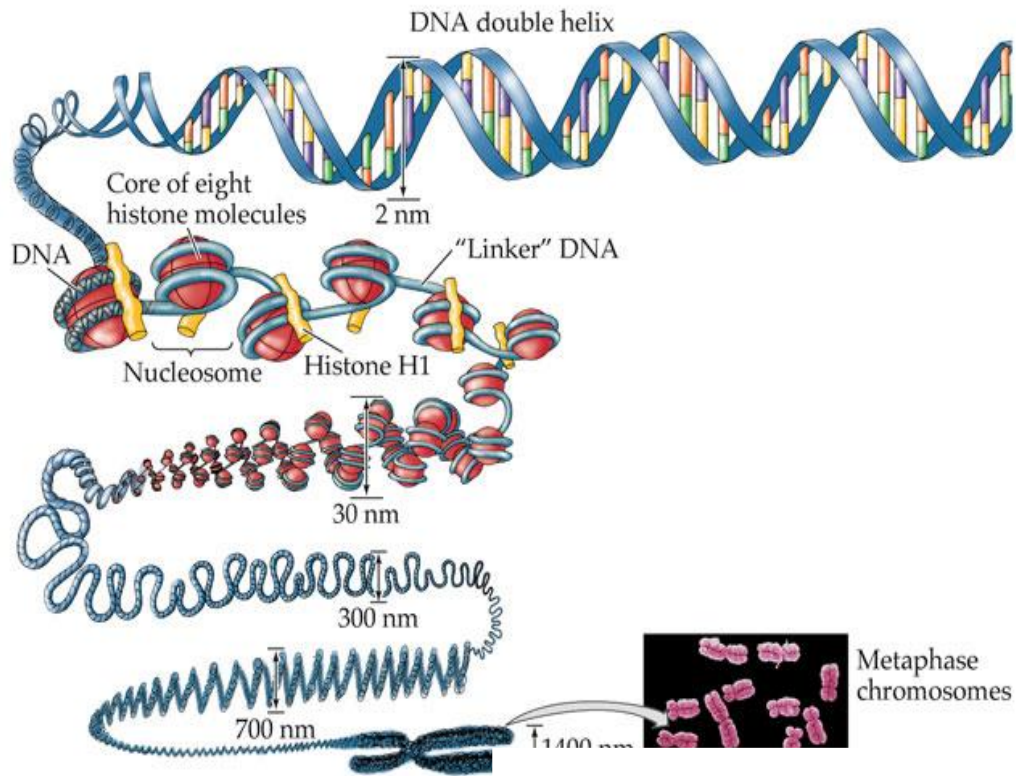
究有相當之助益 (Sutovsky *et al.*, 2004)。

四、核小體

真核生物染色質組成之基本單位為核小體，核小體包含 DNA 與組蛋白 (histone)，其結構部分可以區分為核心顆粒 (core particle)，纏繞於核心顆粒上之 DNA 序列，及位於核心顆粒外側之連接組蛋白 (linker histone) 以及連接各核小體之間的連接 DNA (linker DNA)；核小體其形狀為平盤狀，長寬分別為 11 nm 及 6 nm，其中的核心顆粒乃由 4 種核心組蛋白 (H2A、H2B、H3 和 H4) 各兩個分子以八聚體形式組合而成 (圖一)。並由 146 鹼基對 (base pair ; bp) DNA 纏繞於核心顆粒外圍。連接性組蛋白，又稱之為 H1 組蛋白，並與 DNA 結合於核心顆粒在外側，且其位置是在 DNA 進入/出口 (entry/exit) 於核心顆粒之位置。在核小體之間，則藉由大約 50 個鹼基對 DNA 的稱之為連接 DNA，彼此串聯成珠狀而形成 (Kornberg 1977)，後續再經過一系列之摺疊作用，藉此將帶有遺傳訊息之 DNA，以約萬分之一體積將之存放在細胞核中 (圖二)。



圖一、核小體結構圖 (Purves *et al.*, 1997)。
Fig. 1. The structure of nucleosome (Purves *et al.*, 1997).



© 2004 Sinauer Associates, Inc. and W. H. Freeman & Co.

圖二、雙股螺旋去氧核糖核酸經折疊後形成染色質 (Purves *et al.*, 1997)。

Fig. 2. The deoxyribonucleic acid (DNA) packs into the chromosome (Purves *et al.*, 1997).

五、組蛋白

組蛋白是染色質的主要蛋白質，核心組蛋白是高度保守的蛋白質，意即組蛋白的胺基酸序列在不同的物種間有著非常小的差異。其中 H3 和 H4 在所有真核生物中其胺基酸序列皆高度相似，代表其在各種真核生物中之功能相同且重要；H2A 和 H2B 存在於所有的真核生物中，但其胺基酸序列於不同的物種之間則存在著較大的差異。連接組蛋白相較核心組蛋白其保守程度較低，且其不僅在不同物種之間有明顯的差異性，在同一物種中也有組織特異性 (Kornberg 1977)。連接組蛋白不同於核心組蛋白之處為其與 DNA 結合的緊密程度，相對於核心組蛋白，連接組蛋白只需使用 0.5M 鹽溶液便可將之與 DNA 分離，推測可能原因為連接組蛋白與 DNA 結合於核小體外部，使其與 DNA 之緊密程度遠低於核心八聚體 (Richmond *et al.*, 1984)。H2A 及 H2B 其組成的胺基酸序列中富含離胺酸 (lysine)，H3 和 H4 則有豐富的精胺酸 (arginine)；另，連接性組蛋白其胺基酸序列組成也含有高密度的離胺酸 (lysine)(Baake *et al.*, 2001)；此種胺基酸序列的組成使組蛋白能夠進行數種轉譯後修飾作用，如甲基化 (methylation)、乙基化 (acetylation)、磷酸化 (phosphorylation) 等，改變其胺基酸的特性，進而成為調控基因表現的重要遺傳學機制。

在基因調控方面，組成染色質之 DNA，其中帶有功能性之序列，稱為基因 (gene)，其表現與否最直接的影響因素是基因之啟動子序列 (promoter sequences) 是否可以與轉錄因子 (transcription factors) 或 RNA 聚合酶 (RNA polymerase)，亦或是抑制子 (repressor) 等順利結合。染色質的結構變化可進行單一基因啟動子的調控；此外，也可同時調控多個基因之啟動子，導致數個基因被活化 (activated) 或是抑制 (inactivated)。不論哪一種調控，組蛋白的修飾作用都是影響這些調控的重要因子；四種核心組蛋白其胺基酸序列中的 N 端 (N-terminal) 以及 H2A 組蛋白之胺基酸序列 C 端

(C-terminal) 之 15-30 個胺基酸中，包含了數種可以進行甲基化 (methylation)、乙醯化 (acetylation)、磷酸化 (phosphorylation) 等化學修飾作用的胺基酸，此外，還有進行泛素化 (ubiquitination) 與 ADP-核糖基化 (ADP-ribosylation) 等其它修飾作用 (Jenuwein *et al.*, 2001)，組蛋白藉由這些不同的共價鍵修飾作用，不但可以調控組蛋白與 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基因啟動子的親和性，調控相關基因表現，因此，目前科學家認為組蛋白修飾對於基因表現之調控有重要之影響 (Bártová *et al.*, 2008)。

六、 連接組蛋白

不同連接組蛋白亞單元 (variant) 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。組蛋白中的連接組蛋白具有物種與組織特異性，在染色質結構與功能皆具重要功能。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顆粒特性，且尚能藉由促進核小體的緊密折疊壓縮，使染色質形成高度緊密結構，其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。在哺乳動物卵母細胞與早期胚發育過程中，已經確認的連接組蛋白共有 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 和 H1x)、3 種精子特異性型連接組蛋白 (H1t, H1T2 和 H1LS1) 與 1 種卵母細胞特異性連接組蛋白 (H1Foo) (Wiśniewski *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。

七、 H1Foo 連接組蛋白

(一)、 H1Foo 連接組蛋白基因

H1Foo連接組蛋白是在卵母細胞中發現的一種特異性連接組蛋白；Tanaka等人在2001年，於老鼠卵巢的基因庫中 (cDNA library) 獲得一段長1115 bp之序列，其序列內部編碼304個胺基酸，分子量約34 kDa，稱為卵母特異性連接組蛋白H1Foo (oocyte specific linker histone)；之後在人類及牛等哺乳類，此基因序列亦相繼被定序完成。人類方面，此基因序列編碼347個胺基酸，分子量約為35.8 kDa (Tanaka *et al.*, 2003)；牛的H1Foo基因則是有344個胺基酸，分子量約為35.4 kDa (Mcgraw *et al.*, 2006)；此基因與非哺乳動物的cs-H1 (源自 *sea urchin*)、B4 (源自 *Xenopus*) 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之主區 (central globular domain)，而中央球狀結構主區是與DNA結合的區域，在各物種之間具有高度的保守性。以哺乳動物為例，牛的卵母特異性連接組蛋白H1Foo蛋白質全長胺基酸序列與小鼠及人類比較，相似性分別為41.1% 及42.3%，但是若只比較中央球狀結構主區，則相似性分別可提高到74.3% 與82.9%；在基因結構上，小鼠、人與牛的卵母特異性連接組蛋白H1Foo基因均由5個外顯子 (exon) 與4個內含子 (intron) 組成，此與大部分體細胞型H1s不具有內含子之基因結構相異 (Mcgraw *et al.*, 2006)。

(二)、 H1Foo 基因表現時期

不論是在messenger RNA (mRNA) 及蛋白質層面，小鼠卵母特異性連接組蛋白H1Foo最初可在生發泡 (germinal vesicle；GV) 期的卵母細胞發現，持續表現於metaphase II (MII) 期、1-細胞期、2-細胞期、4-及8-細胞期；但其表現量於2-細胞期開始減弱，8-細胞期之表現量降至極低，取而代之則是體細胞型H1s (Takahide *et al.*, 2004)。牛的H1Foo 蛋白質同樣被發現於生發

泡期的卵母細胞，後續MII期一直到4-細胞期可在細胞質及細胞核觀察到卵母特異性連接組蛋白H1Foo蛋白質的存在，至8-和16-細胞期則只在細胞核觀察到H1Foo蛋白質，囊胚期不論是細胞質或細胞核皆無觀察到卵母特異性連接組蛋白H1Foo蛋白質存在 (Mcgraw *et al.*, 2006)。

(三)、 H1Foo 蛋白質功能

在許多物種中，卵發育 (oogenesis) 及胚發育 (embryogenesis) 時期，連接組蛋白不同的亞單元表現形態及表現量為一重要調控因子。在早期研究中發現，海膽之未受精的卵母細胞及胚早期發育期間分別可觀察到一種稱之為cleavage-stage histone H1 (cs-H1) 的蛋白質，大量存在於卵母細胞及早期胚中 (Childs *et al.*, 1982)。此種現象且存在於*Xenopus*中，其蛋白質被稱之為B4蛋白質，此蛋白質亦同樣見之於成熟之卵母細胞中，直到囊胚中期才逐漸由體細胞之連接組蛋白 (somatic linker histone) 所取代 (Dimitrov *et al.*, 1994)。在哺乳動物之早期卵母細胞、原核胚及2-與4-細胞胚期中，只有極少量甚至幾乎不存在的體細胞型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 (Fan *et al.*, 2003)，而與此等體細胞型H1s表現呈現相反的時空表現，是為卵母特異性連接組蛋白H1Foo。其從早期卵母細胞到2-至4-細胞胚期即一直存在，且至4-細胞胚期末期才消失 (Tanaka *et al.*, 2001)。

卵母特異性連接組H1Foo蛋白質與體細胞核的基因組再程序化 (genomic reprogramming) 的研究中發現，當體細胞核轉置進入小鼠去核卵母細胞10分鐘後，卵母特異性連接組H1Foo即出現在供核體中，並且供核體細胞中的原有的體細胞型H1s會被卵母特異性連接組H1Foo替換，於4-細胞胚期後才再度出現，此種卵母特異性連接組H1Foo與體細胞型H1s之間的消長趨勢與體外受精後的合子相一致 (Terakihi *et al.*, 2004)；另一核轉置試驗結果顯示，將哺乳動物之體細胞核放入*Xenopus*之卵母細胞中後，其體細胞

核又重新表現Sox2、Oct4、Nanog等幹細胞標的基因 (Jullien *et al.*, 2010)，而*Xenopus*之卵母細胞中所表現之B4蛋白質與卵母特異性連接組H1Foo蛋白質具有同源性；另一試驗則是在胚幹細胞 (embryonic stem cell) 中分別額外表現卵母特異性連接組蛋白H1Foo及其它亞種連接組蛋白，其試驗結果顯示表現不同連接組蛋白之胚幹細胞經過七天培養後，表現卵母特異性連接組蛋白H1Foo之胚胎幹細胞持續表現幹細胞標的基因Oct4及Nanog；此外，表現其他亞種連接組蛋白之胚胎幹細胞，經七天培養後，已表現出Gata4等細胞分化標的基因，反之，表現卵母特異性連接組蛋白H1Foo之胚幹細胞則沒有偵測到其相關基因 (Hayakawa *et al.*, 2012)。

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，且在基因組之再程序化過程及防止細胞走向分化路徑中，亦可能分別扮演關鍵性之調控作用，因此，分析研究H1Foo將有助於更深入瞭解染色質的重構、基因組再程序化等過程以及核轉置的分子機制。豬卵母細胞特異性連接組蛋白H1Foo之功能探討對於胚發育及體細胞核轉等研究有相當的助益，但有關於豬卵母細胞特異性連接組蛋白H1Foo之基因全長序列目前尚未被確認，本研究目的在於確認豬卵母細胞特異性連接組蛋白之基因全長序列及其蛋白質功能之初步探討。

參、材料與方法

一、卵母細胞之收集

于屠宰廠內收集死亡豬隻身上之卵巢，浸泡於 37°C 之 Dulbecco-磷酸緩衝溶液 (Dulbecco's phosphate buffered saline, D-PBS) 中，於 3 個小時內運送至實驗室，以 D-PBS 沖洗卵巢 2 次，沖洗掉附著於上面的血跡。後續以 18 號針頭吸取卵巢表面濾泡 (2~6 mL 直徑) 內含物，此內含物為卵丘-卵母細胞複合體 (cumulus-oocyte complexes, COCs)，將此內含物放進裝有 5 mL 添加 0.57 mM cysteine (Sigma, St. Louis, MO, USA.) 及 1% 抗生素-抗真菌混合劑 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.)，但未含胎牛血清之 NSCU23 培養液中 (108.73 mM NaCl, 4.78 mM KCl, 1.7 mM CaCl₂•2H₂O, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄, 25.07 mM NaHCO₃, 5.55 mM D-glucose, 1.0 mM L-glutamine, 7.0 mM taurine, 5.0 mM hypotaurine)，於 39°C 環境中靜置 10 分鐘後，於沈澱物中挑選細胞質均勻及具有完整卵丘結構之生發泡 (germinal vesicle, GV) 時期，卵母細胞並以 D-PBS 沖洗 2 次，後續將此浸泡於含有 0.1% (w/v) 透明質酸酶 (Sigma, St. Louis, MO, USA.) 之 D-PBS 中，藉由 mouth-controlled pipette 反覆抽吸，將卵丘與卵母細胞進行分離，將裸露之卵母細胞以 PBS 沖洗兩次後，放置於液態氮或 -80°C 冰箱備用。

二、卵母細胞 mRNA 萃取

本試驗之生發泡時期卵母細胞之 message RNA (mRNA) 萃取是使用 Dynabeads mRNA DIRECT kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.)；首先將細胞加入 50 μ L 之 lysis/binding 溶液 (100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS, 5 mM DTT) 靜置於 65°C，2 分鐘後，將管內所有溶液

置換到含有 20 μL 附有 Oligo (dT)₂₅ 之磁珠溶液，於室溫均勻混合 5 分鐘後，先以 100 μL washing buffer A (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1 % LiDS) 清洗 2 次，再以 100 μL washing buffer B (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA) 清洗，最後以 100 μL Tris-HCl (10 mM) 回溶 mRNA 備用。

三、5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)

5'-rapid amplification of cDNA ends 試驗使用 GeneRacer kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.)，試驗簡易流程圖如圖三。

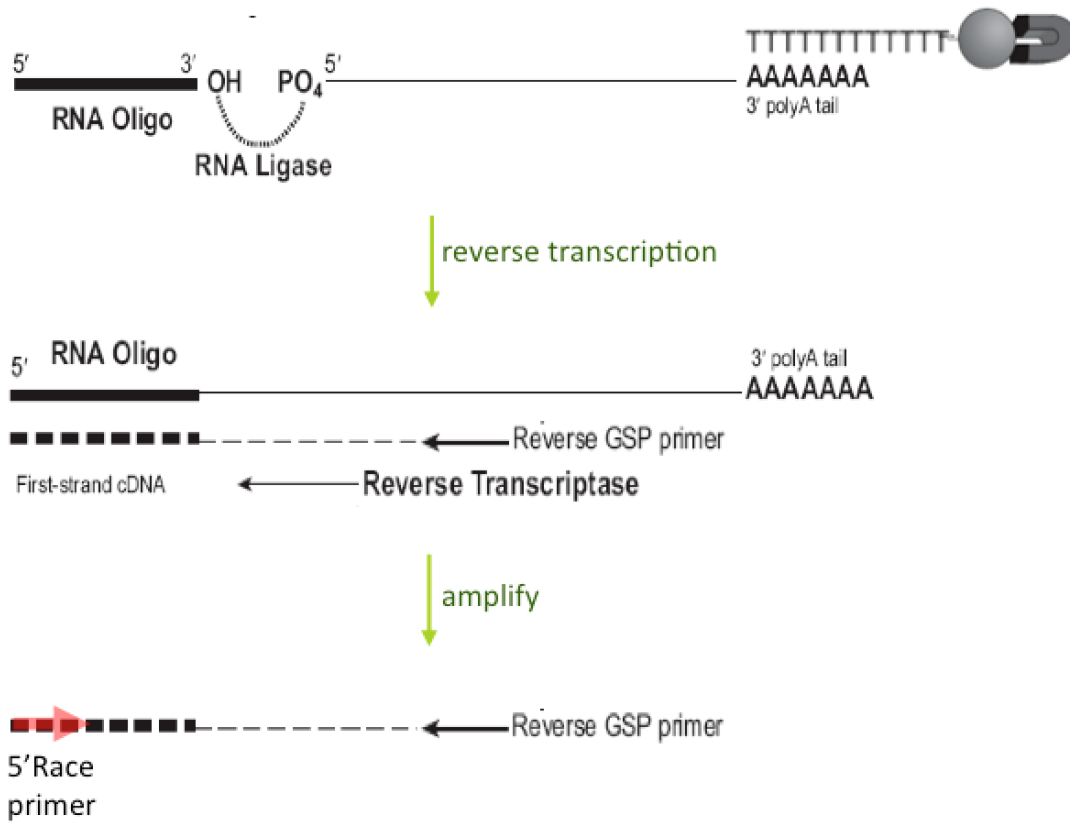


圖 三、5' rapid amplification of cDNA ends (RACE)試驗簡易流程圖。
 Fig. 3. The protocol of the 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE).

(一)、 脫磷酸根反應 (dephosphorylation)

首先，利用小牛腸磷酸酶 (calf intestinal phosphatase, CIP) 進行脫磷酸根之反應，其劑量與步驟如下：將總量約 250 ng 之 mRNA 回溶於 7 μ L diethylpyrocarbonate (DEPC)-水，加入 1 μ L 10X CIP Buffer、1 μ L RNaseOut (40 U/ μ L) 與 1 μ L CIP，最後達總體積 10 μ L，將其放置於 50°C 之恆溫器內 1 個小時後靜置於冰上。

(二)、 RNA 沉澱

加入 90 μ L DEPC-水及 100 μ L phenol:chloroform，劇烈搖晃 30 秒後，離心 13,000xg，5 分鐘，離心後將水層取出至新的離心管，加入 2 μ L mussel glycogen (10 mg/mL) 和 10 μ L 3 M sodium acetate, pH 5.2，混合均勻，加入 200 μ L 95% 酒精，置於冰上 10 分鐘後於 4°C 下離心 13,000xg，20 分鐘，使 RNA 沉澱，去除上清液後，加入 500 μ L 70% 酒精，適度翻轉微量離心管以清洗 RNA 沉澱物，於 4°C 下離心 13,000xg，2 分鐘，去除上清液後將離心管蓋子打開，於室溫下風乾 5 分鐘後，加入適量 DEPC-水回溶 RNA 沉澱物。

(三)、 mRNA 去頭端作用

以菸草酸焦磷酸酶 (tobacco acid pyrophosphatase) 進行 mRNA 5' 端脫帽作用，其劑量與步驟如下：取 7 μ L 已脫磷酸根之 mRNA 溶液，加入 1 μ L 10X TAP buffer、1 μ L RNaseOut (40 U/ μ L) 與 1 μ L TAP (0.5 U/ μ L)，最後體積達 10 μ L 後將其混合均勻，放置於 37°C 恆溫器內 1 個小時後，置於冰上備用，後續進行如 (二) RNA 沉澱。

(四)、 RNA 接合反應

取 7 μL 去磷酸脫帽之 mRNA 加入含凍乾 GeneRacer RNA Oligo (0.25 μg)之微量離心管，GeneRacer RNA Oligo 其序列為 5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAA A，放置於 65°C 恆溫器內 5 分鐘後，靜置於冰上 2 分鐘後，加入以下藥劑：1 μL 10X Ligase Buffer、1 μL 10 Mm ATP RNaseOut (40 U/ μL) 與 1 μL T4 RNA ligase (5 U/ μL)，總體積約為 10 μL ，後續放置於 37°C 恆溫器內 1 個小時後，放置於冰上。最終得到與 GeneRacer RNA Oligo 序列連結之 mRNA。

(五)、 反轉錄反應

將與 GeneRacer RNA Oligo 序列連結之 mRNA 立即以 GeneRacer oligo dT 引子及 SuperScript III 反轉錄酶依序進行反轉錄反應，藉此產生 First-strand cDNA，其反應條件為：1 μL GeneRacer oligo dT 引子、1 μL dNTP Mix、1 μL 無菌水與經處理之 10 μL mRNA 樣品，將其加溫至 65°C、5 分鐘後放置於冰上至少 1 分鐘，後續再加入以藥劑：4 μL 5X First Strand Buffer、1 μL 0.1 M DTT、1 μL RNaseOut (40 U/ μL) 與 1 μL SuperScript III (200 U/ μL)，最後體積為 20 μL 後以 50°C、60 分鐘，70°C、15 分鐘，冰浴 2 分鐘後再加入下列酵素 1 μL RNase H (2 U) 於 37°C 反應 20 分鐘後，續將此產物質進行 PCR 反應或儲存於 -20°C 備用。

(六)、 聚合酶連鎖反應

以 GeneRacer kit 內所附之引子 GeneRacer RNA Oligo Seq 及基因特定序列 H1Foo R3 為 3'端引子，使用 TaKaRa Ex Taq (TaKaRa Bio, Kyoto, Japan)，以 RACE 試驗所得之 cDNA 為模板，進行 94 °C， 5 分鐘加熱後；進行 94 °C， 30 秒，58°C， 30 秒及 72°C， 2 分鐘共 3 個步驟 40 個循環；最後

於 72°C 反應 10 分鐘為條件之聚合酶連鎖反應試驗；後續其產物經膠上純化後接入商用質體 pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA.) 內，並經由熱休克 (heat shock) 方式，將質體放入大腸桿菌內，塗盤後挑選菌落以進行後續之序列分析。

四、反轉錄聚合酶連鎖反應

以 one cell and one step RT-PCR (Tanaka *et al.*, 2003) 試驗方法測試是否可於生發泡時期之卵母細胞得到完整得基因開放閱讀框架 (open reading frame)。取一個的已清洗的卵母細胞溶於 0.2% sarcosyl 溶液，以此為 RNA 模版並使用 one cell and one step 反轉錄聚合酶連鎖反應之試驗方式進行之，試驗中所使用之引子列於表一。

反轉錄試驗 (SuperScript® III Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.) 中取 1 µL 含有 1 GV oocyte 之溶液及正向已反向引子各 1 µL，補加水至 20 µL 後加熱至 65°C，5 分鐘後加入聚合酶連鎖反應所需之藥劑，1 µL RNase OUT、25 µL 2X Reaction buffer 與 2 µL SuperScript III/Taq mix 後，補水至總體積達 50 µL，聚合酶連鎖反應條件則是先以 57°C，35 min；94°C，2 min 進行反應後；再進行 40 個循環之 94°C，30 sec，60°C，30 sec 及 72°C，1 min；最後 72°C，5 min。聚合酶連鎖反應試驗結束後，以瓊脂電泳確認其擴增 DNA 片段大小，藉以得知是否符合預期之片段長度。

五、膠體上 DNA 純化

本研究採用 QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany.)，首先將核酸色帶自瓊脂膠體取下，放入微量離心管中後加入約膠體重量 3 倍之 QC 溶液，於 65°C 中加熱至膠體完全溶解，加入與膠體同體積之異丙醇 (isopropanol) 均勻混合，將混合液取至 QIA quick spin column，離心 13,000

rpm，1 分鐘後，去除濾出液後，加入 0.5 ml QG 溶液，離心 13,000 rpm，1 分鐘，濾出液去除，加入 0.75 ml PE 溶液，同樣離心 13,000 rpm，1 分鐘，將濾出液除去後，加入適量滅菌水回溶附著於管柱上之聚合酶連鎖反應產物，利用離心將之收集於微量離心管中。

六、接合反應

將膠體純化所得之 DNA 產物接入 pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA.) 之步驟為取適量之膠上純化產物回溶於 1 μ L 無菌水，加入 1 μ L pGEM-T Easy Vector (50 ng/ μ L)、5 μ L 2x ligase buffer 與 1 μ L T4 DNA ligase，補水至 10 μ L 均勻混合後，放置於 15°C 中反應 18~24 小時後，進行轉形至勝任細胞中。

七、轉形反應

取勝任細胞放於冰箱退冰，加入接合作用後之產物均勻混合，放至於冰置上 30 分鐘後，於 42°C 乾浴器上 90 秒鐘以進行熱休克處理，之後加入 400 μ L LB 培養液，於 37°C 培養箱中進行震盪培養 60 分鐘後，將此菌液進行塗盤。固態 LB 培養基含有 100 μ g/ml ampicillin、40 μ L X-gal (80 μ g/ml；5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside 溶於 N,N'-dimethylformamide) 以利後續進行藍白篩選。塗盤後放入 37°C 培養 12~16 個小時，待菌落生成後挑選白色菌落內含之質體進行聚合酶連鎖反應及核酸定序等分析。

八、真核表現質體建構

(一)、引子設計

以 H1Foo 完整基因序列為依據，設計帶有 *Hind*III 限制酶切割位之正向引子 H1Foo FS1，反向引子則分別為 H1Foo RS1 與 H1Foo RS2，兩者皆

帶有 *Sal* I 限制酶切位，相異處為引子 RS1 帶有終止密碼，RS2 其引子序列不包含終止密碼。其序列列於表二。

(二)、 pEGFP 質體製備

本研究所使用之質體為 pEGFP 為先前本研究室將原商用真核表現質體 pIRES2EGFP (圖四)，將原本質體內所帶有之 IRES 序列以限制酶 *Acl* I 剷除，改命名為 pEGFP，藉此產生可以與綠色螢光蛋白 (Enhanced Green Fluorescent Protein) 結合之融合蛋白。

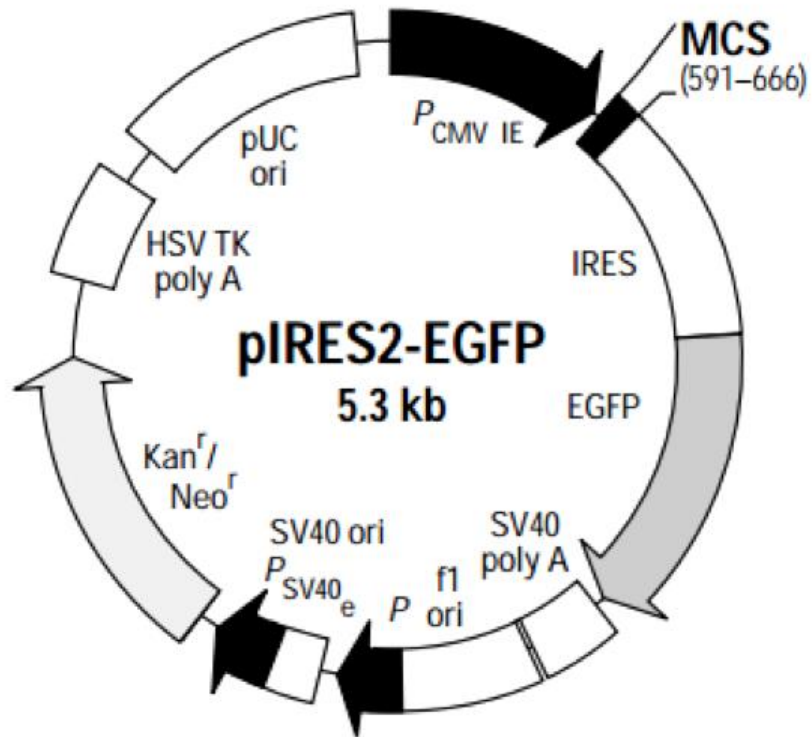


圖 四、真核表現載體 pIRES2EGFP。

Fig. 4. The plasmid map of eukaryotic expression vector pIRES2EGFP.

(三)、 聚合酶連鎖反應

分別以 H1Foo FS1 及 H1Foo RS1、H1Foo FS1 及 H1Foo RS2 兩組正反向引子，再以帶有完整 H1Foo 完整基因序列 pGEM-T Easy Vector 為模版，進行聚合酶連鎖反應，其反應條件為 94°C，30 秒、60°C，30 秒、72°C，1 分鐘，共 35 個循環。

(四)、 Phenol/chloroform 萃取

加入與樣品等量之 phenol，劇烈搖晃 30 秒後，以 13000g 離心 5 分鐘，離心後將水層取出至新的離心管，重覆此動作一次；加入與樣品等量之 chloroform，劇烈搖晃 30 秒後，以 13000g 離心 5 分鐘，離心後將水層取出至新的離心管，重覆此動作一次；加入 1/10 3 M Sodium Acetate 及樣品 2 倍體積的 100% 酒精，置於-20°C 30 分鐘，以 13000g 離心 5 分鐘，使 DNA 沉澱，取出上清液後，加入 500 μ L 70%酒精，適度翻轉微量離心管以沖洗 DNA 沉澱物，於 4°C 下 13000g 離心 2 分鐘，取出上清液後將離心管蓋子打開，於室溫下風乾 5 分鐘後，加入適量無菌水回溶 DNA 沉澱物。

(五)、 限制酶剪切

選用限制酶 *Hind*III (10 U/ μ L) 及 *Sal* I (10 U/ μ L) 處理經 Phenol/Chloroform 沈澱後之聚合酶連鎖反應產物及 pEGFP 質體，於 37°C 下切割 3 個小時；限制酶作用過後，再次進行 Phenol/chloroform 萃取。

(六)、 接合作用

取適量經限制酶作用及沈澱過後之聚合酶連鎖反應產物及 pEGFP 質

體，使用 T4 DNA ligase (Promega, Madison, WI, USA.) 進行接合反應，放置於 15°C 中反應 18~24 小時後，進行轉形作用至勝任細胞中。

九、豬動脈內皮細胞之培養與質體轉染試驗

使用本研究室原有之豬動脈內皮細胞 (porcine aortic endothelial cells ; PECs) 為體細胞來源，使用細胞轉染技術將豬卵母細胞特異性連接組蛋白放進入體細胞內，並藉由綠色螢光蛋白當作報導基因觀察豬卵母細胞特性連接組蛋白於體細胞內存在位置，及後續對已轉染之豬動脈內皮細胞分析。

(一)、豬動脈內皮細胞

本試驗所使用之細胞 PECs 為本研究室先前由豬心臟主動脈內皮細胞進行初級培養 (primary culture) 後，持續繼代而得；其培養及繼代條件如下：PEC 細胞培養於含有 1% P/S (penicillin-streptomycin) 與 10% FBS (fetal bovine serum ; Hyclone, Logan, UT, USA.) 之 M199 培養液中；並於細胞成長到約九成滿時，進行繼代培養。

(二)、細胞轉染用之質體萃取

本研究之細胞轉染用之質體萃取是使用 EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany.)，其使用方式如下：將含有目標質體之大腸桿菌經二次活化培養至 OD₆₀₀ 超過 0.6 後，收集菌液至離心管中，離心 6000 rpm 15 分鐘，去除上清液後，以 10 ml P1 溶液將沈澱之菌體完全懸浮，加入 10 ml P2 溶液後，上下輕微搖晃數次後，靜置於室溫下 10 分鐘，再加入 10 ml 冰鎮過後之 P3 溶液，混合均勻後將此混合液轉移至含有濾膜之針筒內，靜置 10 分鐘後以擠壓方式使混合液通過濾膜，將過濾後之液體加入 5 ml ER 溶液，放置於冰上 30 分鐘後，將溶液轉換至經過 QBT 溶液處理過之

QIAGEN-tip 50，待溶液自然流過 QIAGEN-tip 500 管柱後，使用 30 ml QC 溶液清洗管柱兩次後，使用 15 ml QN 溶液沖提管柱，將附著於管柱上之質體沖提下來，加入 10.5 ml 異丙醇至沖提管柱後之 QN 溶液，混合均勻後靜置於室溫下 10 分鐘，在 4°C 下離心 15000xg，30 分鐘，去除上清液後以 70 % 酒精沖洗沈澱物後，再次於 4°C 下離心 15000xg，10 分鐘，去除上清液後，於抽氣櫃中風乾約 5 分鐘，將酒精完全去除後加入適量之無菌水回溶質體，後續將之保存於-20°C 備用。

(三)、細胞轉染

將 6 cm 培養皿內細胞培養至約九成滿後，於轉染試驗前 20 分鐘將一般培養液轉換為 Opti-MEM 培養液，將 Lipofectmine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.) 15 μ L 與目標質體 8 μ g (2 μ g/ μ L) 分別與適量 Opti-MEM 培養液混合，靜置於室溫 5 分鐘，將兩種混合液再進行混合，混合均勻後靜於室溫 20 分鐘後，逐滴加入細胞培養皿中，後續於 37°C、5 % CO₂ 培養箱中培養 4 個小時後更換為一般培養用之培養液。

(四)、DAPI 染色

將經 pEGFPH1Foo-2 轉染 24 小時之 PEC，去除培養液後，以 HBSS 沖洗培養皿後，加入適量 Trypsin-EDTA 使細胞從培養皿上脫落，在室溫下離心 1500 rpm，5 分鐘，去除上清液後，將細胞敲散後回溶於 500 μ L 含有 1 % P/S 與 10% FBS 之 M199 培養液中，並將此含有經 pEGFPH1Foo-2 轉染後之細胞液放入 Lab-Tek™ II Chamber Slide™ (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, USA.)，於 37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 2 個小時後，去除其培養液後，以冰鎮過之 PBS 沖洗玻片 2 次，加入 200 μ L 甲醇 (methanol) 均勻覆蓋於玻片上，放入-20°C 靜置 5 分鐘後，將甲醇去除並放至於室溫中

讓甲醇完全揮發，再以冰鎮過之 PBS 沖洗玻片三次後，以含有 2 μ g/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma, St. Louis, MO, USA.) 之 PBS 進行染色 10 分鐘後，以 PBS 溶液清洗 3 次，每次 15 分鐘，清洗結束後，將玻片上之間隔器取下，以封片膠進行封片後後續以共軛焦顯微鏡進行觀察。

(五)、 共軛焦顯微鏡

本研究所使用之共軛交顯微鏡 Leica TCS SP5 II 機型，其中以 351 nm 之波長觀察 DAPI 染色，另以 488 nm 之波長觀察綠色螢光蛋白。

(六)、 Real time PCR 分析

將經過 pEGFP^{H1Foo} 轉染之 PEC 細胞 24 小時後，收集細胞並進行 RNA 之萃取，後續將 RNA 樣品進行反轉錄及 Real time PCR 之試驗分析，藉此得知 H1Foo 蛋白對於幹細胞標的基因 Oct4， Sox2， Nanog 及 C-myc，的表現是否造成影響。

RNA 萃取

使用 Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.) 進行 RNA 萃取試驗，其使用流程如下：將細胞培養皿中原本的培養液去除後，以冰鎮過之 PBS 小心沖洗培養皿兩次，將培養皿中之 PBS 完全清除乾淨後，加入適量之 Trizol Reagent 於培養皿中，以細胞刮勺將細胞集中後連同 Trizol 一同轉移至微量離心管中，加入 200 μ L 氯仿並劇烈搖晃 15 秒後，靜置約 3 分鐘後，在 4 $^{\circ}$ C 下離心 12000xg，15 分鐘；取出水層至新的微量離心管中，加入 500 μ L 異丙醇並均勻混合後，靜置於室溫下 10 分鐘，在 4 $^{\circ}$ C 下離心 12000xg，10 分鐘，將上清液去除後以 70 % 酒精沖洗 RNA 沈澱物，清洗後在 4 $^{\circ}$ C 下離心 7500xg，10 分鐘，後續將上清液去除後於抽氣櫃靜置 5 分

鐘，將酒精成分完全去除後，以適量之 DEPC-水回溶。

反轉錄試驗

此部分之反轉錄試驗使用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)，其步驟為先取 10 μ L RNA (200 ng/ μ L) 樣品於微量離心管內，加入 2 μ L 10X RT Buffer、0.8 μ L 25X dNTP Mix (100 mM)、2.0 μ L 10X RT Random Primers 與 1.0 μ L MultiScribe reverse transcriptase，最後補加水至 20 μ L，後續反應條件為 25 $^{\circ}$ C、10 分鐘，37 $^{\circ}$ C、120 分鐘、85 $^{\circ}$ C、5 分鐘，後續存放於-20 $^{\circ}$ C 備用。

Real Time PCR

上述反轉錄試驗產物為cDNA (100 ng/ μ L)，以此為模板進行後續試驗，取 1 μ L cDNA(100 ng/ μ L) 樣品，1 μ L Gene specific primer/probe、10 μ L 2X Master Mix，最終補加水至20 μ L，後續將之放置於即時聚合酵素反應儀 (StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems Life Science)，反應條件為50 $^{\circ}$ C 維持2分鐘，95 $^{\circ}$ C，10分鐘；後續95 $^{\circ}$ C，15秒、15 $^{\circ}$ C，1分鐘兩個步驟進行40個循環。結束後以StepOne software v2.1 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) 軟體，分析各基因之表現。步驟有問題。

Gene specific probe

使用Primer Express軟體 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) 設計本試驗所使用之相關基因序列，由ABI公司合成試驗中所使用之引子和探針 (probe)，其探針序列列於表三。

(七)、 細胞週期

分別將pEGFP^{H1}Foo和pEGFP^{H1}Foo-2兩種質體轉染至PEC，24小時

後，去除培養液後，以HBSS沖洗培養皿後，加入適量Trypsin-EDTA使細胞從培養皿上脫落，在室溫下離心1500 rpm，5分鐘，去除上清液後，將細胞敲散後回溶於300 μ L PBS，並於震盪器上逐滴加入100 %酒精700 μ L，藉此將細胞固定。之後於室溫下離心1500 rpm、5分鐘，將上清液去除後，加入1 ml PBS及100 μ L RNase A (200 μ g/ml) 並於37°C 中靜置30分鐘，後續加入100 μ L Propidium Iodide (PI) 染劑，並以流式細胞儀Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA.) 進行細胞週期之分析。

表一、反轉錄聚合酶連鎖反應中之引子序列

Table 1. The primer sequences for RT-PCR

Primer name	Primer sequence
H1Foo F1'	5'-ATGGCTCCTGGGAGCATTGC
H1Foo R1	5'-CTAGTTCTTGGCCTCAGCCTTCTTA

表二、真核載體製備用之引子序列

Table 2. The primers sequences for the construction of H1Foo eukaryotic expression vector

Primer name	Primer Sequence
H1Foo FS1	5'-ATATA <u>AAGCTT</u> GCCACCATGGCTCCTGGGAG CATT
H1Foo RS1	5'-ATAT <u>GTCGAC</u> CCTAGTGTTCTTGGCCTCAGC CTTCTTA
H1Foo RS2	5'-ATAT <u>GTCGAC</u> GTGTTCTTGGCCTCAGCCTT CTTA

表三、 Real-Time PCR 試驗中之探針序列

Table 3. The gene specific probe sequence for Real-Time PCR

Gene	Probe sequence
ACTB	AATACCCTGTGCATATCTTTGATTT
Oct4	TAGAGAAGGATGTGGTCCGCGTGTG
Sox2	TCCCCGGCGCTGAGGTGCCAGAGCC
Nanog	GTTTCAGCAAATTCTATCA
C-myc	ACCCAGCGGATTCTAA

肆、結果

一、選殖豬 H1Foo cDNA 全長序列

(一)、豬 H1Foo cDNA 全長序列

H1Foo 基因全長約 28 kb，其中包括 5 個外顯子 (exon) 4 個內含子 (intron)，其位於豬基因組上第十三條染色體上，其中外顯子 1 及外顯子 2 中間之內含子長度約 24 kb。由 GV 時期之卵母細胞中所得之 H1Foo 基因之轉錄模版 (transcript variant) 具有兩種不同長度 (H1Foo α 及 H1Foo β) (圖五)，造成此長度之差異為外顯子 4 上之切位不同 (圖五)，H1Foo α cDNA 長度為 1086 bp 編碼 361 個胺基酸，其蛋白分子量為 38 kDa，其等電點為 11.5，帶有 58 之淨正點荷；H1Foo β 之 cDNA 長度為 1041 bp 編碼 346 個胺基酸，估算其分子量為 36.5 kDa，其等電點為 11.5，帶有 58 之淨正點荷。兩種 cDNA 皆有 37 bp 未轉譯序列之 5' 端及 113 bp 未轉譯序列之 3' 端，其中 3' 端包含多聚腺核苷酸信號序列 (polyadenylation signal sequence, HEX, AAUAAA) 及細胞質多聚腺核苷酸蛋白質結合區 (cytoplasmic polyadenylation element, CPE, UUUUUAU)，還有兩段 AU-rich 區域 (圖六)。

(二)、比對本研究所得與 GenBank 豬 H1Foo cDNA 序

以 GV 時期卵母細胞之 mRNA 為模版之 RT-PCR 結果顯示，以 GenBank (XM_001926895) 基因轉錄框架為依據所設計之引子無法順利得到預期之 PCR 產物 (圖七)，另外將本研所得知之基因閱讀框架 (H1Foo α 及 H1Foo β) 與 XM_001926895 作比對後，結果顯示外顯子 1 及外顯子 4 之序列具有差異。另外，經軟體分析後顯示內含子 1 含有數種 cis-regulatory element (CREs)，例如：AML-1a、SRY、CdxA、Nkx-2 及 Pbx-1 (圖八)。

(三)、 豬與其他物種之 H1Foo 胺基酸序列比對

將豬 H1Foo 胺基酸全長序列與其他 3 種物種之 H1Foo 胺基酸全長序列作比對後，結果顯示與人類 (NM_153833) 之相似度 66%，牛 (NM_001035372) 為 54%與小鼠 (NM_138311) 相似度則是 40%，但若單獨比較中央球狀功能區 (Central globular domain) 有較高之相似度 (圖九)。

二、 豬 H1Foo 基因功能的探討

(一)、 H1Foo 蛋白於細胞中之表現位置

在共軛焦顯微鏡的觀察中，pEGFP-H1Foo-2 質體轉染的細胞其綠色螢光位於細胞核中，細胞質中則完全沒有綠色螢光 (圖十二) pEGFP 組別中包括細胞質及細胞核於 UV 光下皆可以觀察到有綠色螢光蛋白存在。

(二)、 表現 pH1Foo 蛋白質對豬內皮細胞 (PEC) 基因表現的影響

以 Real-time PCR 分析 Oct4，Sox2，Nanog，C-myc 等幹細胞相關基因的表現量。分析結果顯示，PEC 細胞轉染 pEGFPH1Foo 後，其 Oct4 表現量約為對照組的 14 倍，Sox2 為 7 倍 (圖十三 A 和 B)，Nanog 將近 7 倍，C-myc 則為 2 倍 (圖十三 C 和 D)。統計分析結果顯示 Oct4，Nanog，C-myc 基因表現均有顯著增加的現象。

(三)、 細胞週期

將動脈內皮細胞分別以水，lipofectmine 2000，lipofectamine 2000 和 pEGFPH1Foo 質體進行細胞轉染 24hr 後，經由 Propidium Iodide (PI) 染色後，以流式細胞儀分析其對細胞週期之影響。試驗結果顯示，以水和

lipofectmine 2000 處理之控制組，其 G0/G1 時期分別為 85.35% 及 83.52%，而 lipofectminec 2000 加 pEGFPH1Foo 轉染組則為 69.73%。此外，Sub-G1 時期，水和 lipofectmine 2000 控制組其數值分別為，0.83% 和 1.05%，lipofectminec 2000 加 pEGFPH1Foo 組別則增加到 6.81%，代表其細胞凋亡比例增加（表四）。

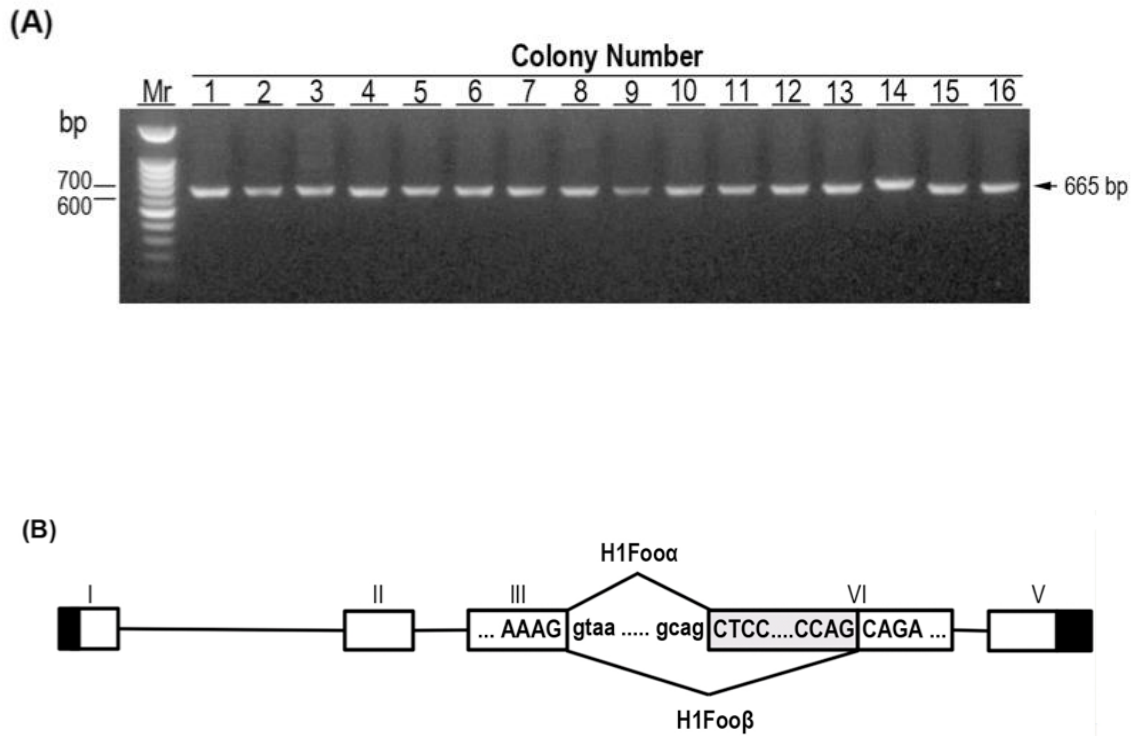


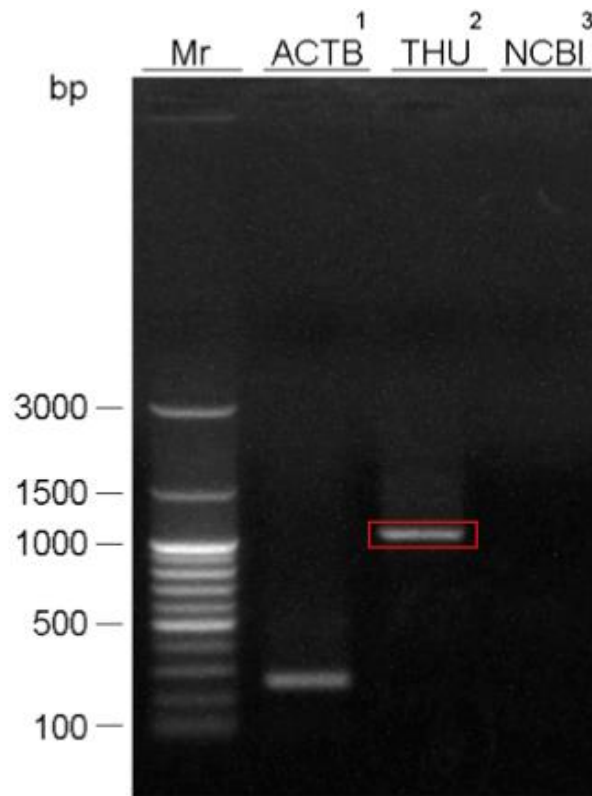
圖 五、豬H1Foo基因轉錄選擇性切位確認。(A)含有豬H1Foo cDNA片段之質體經轉型作用及篩選過之菌落，經PCR試驗結果顯示，除了lane 14其位置偏高，其餘PCR產物皆為665 bp。(B)豬H1Foo 基因之兩種型態之示意圖，黑色區域分別為3'端及5'端未轉錄區域，白色區塊則為外顯子，灰色區塊則是選擇性切位所造成兩種型態轉錄型態之區域。

Fig. 5. Identification of alternative splicing transcripts from the pig H1Foo gene. (A) Screening of transformants harboring the H1Foo cDNA insertion. All colonies PCR bands showed the expected PCR amplification size (665 bp) except for colony 14. (B) The organization of the H1Foo α and H1Foo β transcripts. The black boxes are 5'- and 3'-UTR regions, and the white boxes are the exons. The alternatively spliced region is shaded in light grey.

1	ATGCCCTGGCAAGGGGGTCACTGCATCTGCCTGCGTG												ATG	GCT	CCT	46
													M	A	P	3
47	GGG	AGC	ATT	GCA	TCC	AGT	GAC	ACC	TCC	TCG	ACT	TCC	TCA	GCC	TCC	91
4	G	S	I	A	S	S	D	T	S	S	T	S	S	A	S	18
92	AAA	GCC	TCG	TCA	GCC	TCC	TTG	GCC	TCC	TTG	ACT	TCC	ACC	CTG	GGG	136
19	K	A	S	S	A	S	L	A	S	L	T	S	T	L	G	33
137	TCG	TCC	AAG	TCA	TCT	GGG	TGT	GAA	CGG	CCA	GGC	CTG	ATC	AAG	AGC	181
34	S	S	K	S	S	G	C	E	R	P	G	L	I	K	S	48
182	AGC	ATC	CGA	GAG	CCG	CGC	CGA	CAT	CCT	CCG	GTG	CTG	CGC	ATG	GTG	226
49	S	I	R	E	P	R	R	H	P	P	V	L	R	M	V	63
227	CTG	GAG	GCG	CTG	CAG	GCG	GGA	GAG	CAG	CGC	CGG	GGC	ACC	TCG	GTG	271
64	L	E	A	L	Q	A	G	E	Q	R	R	G	T	S	V	78
272	GCG	GCC	ATC	AAG	GTT	TAC	ATC	CTG	CAG	AAG	TAC	CCA	ACA	GTG	GAT	316
79	A	A	I	K	V	Y	I	L	Q	K	Y	P	T	V	D	93
317	GTC	TTT	CGG	CTC	AAG	TAC	TTG	CTA	AAG	CAG	GCT	CTG	GCC	ACG	GGC	361
94	V	F	R	L	K	Y	L	L	K	Q	A	L	A	T	G	108
362	ATG	CAC	CGT	GGC	CTC	CTT	GTC	AGG	CCC	GTC	AAC	TCC	AAG	GCC	AAG	406
109	M	H	R	G	L	L	V	R	P	V	N	S	K	A	K	123
407	GGG	GCC	ACT	GGC	AGC	TTC	AAA	TTG	GTT	CCT	AAG	CAC	AAA	AGG	AAA	451
124	G	A	T	G	S	F	K	L	V	P	K	H	K	R	K	138
452	ATC	CAG	TCC	AGG	AAG	ACG	TCC	ACC	CTG	AAG	GCC	TCC	AGG	AGG	CCG	496
139	I	Q	S	R	K	T	S	T	L	K	A	S	R	R	P	153
497	GGT	CAA	GCC	AAG	GAA	AAG	GAC	CCC	AAG	AAA	GCG	AAG	AAG	GCC	AAG	541
154	G	Q	A	K	E	K	D	P	K	K	A	K	K	A	K	168
542	AAG	GAC	CCT	CCC	AAC	CCA	GCC	GAG	GTG	AAA	AAG	GGA	TCC	AGG	AAG	586
169	K	D	P	P	N	P	G	E	V	K	K	G	S	R	K	183
587	CCA	GCC	CAG	GGG	AGG	TCA	GCC	CCC	GCC	AAA	ACT	GGT	GAA	GGA	ATG	631
184	P	G	Q	G	R	S	G	P	A	K	T	G	E	G	M	198
632	AAG	GCC	CCT	CAA	AAA	GCC	AAC	AAG	ACC	CTG	GAC	CAA	GAG	GCA	AGA	676
199	K	A	P	Q	K	G	N	K	T	L	D	Q	E	A	R	213
677	CTG	GGT	GAG	GCC	AGG	AAG	TGC	TCC	CAA	CAG	CCA	GAC	AGG	CCC	ACG	721
214	L	G	E	A	R	K	C	S	Q	Q	P	D	R	P	T	228
722	CAG	TCA	CCT	CCC	AGA	ACC	ACT	GGG	CCT	GGT	AGG	AAG	GCA	AAG	GTC	766
229	Q	S	P	P	R	T	T	G	P	G	R	K	A	K	V	243
767	AAA	GCT	CCT	CTG	GAA	AGG	GGT	CCT	TCT	CAC	ACA	ACA	CCC	CCT	CTT	811
244	K	A	P	L	E	R	G	P	S	H	T	T	P	P	L	258
812	CCA	GCA	GAG	GCT	GAG	GCC	CCC	GGG	AAG	ACC	AAT	CCT	GGG	AGT	CGG	856
259	P	A	E	A	E	A	P	G	K	T	N	P	G	S	R	273
857	AAT	TCA	AAA	TCC	ACG	GAC	ACC	AAG	GGT	GAG	AAT	GGT	ACA	GCC	AAA	901
274	N	S	K	S	T	D	T	K	G	E	N	G	T	A	K	288
902	ACG	AAG	ATG	GGG	AAC	AAG	ATC	CCT	AAA	GAG	GCT	GTC	ACC	CAG	GGG	946
289	T	K	M	G	N	K	I	P	K	E	A	V	T	Q	G	303
947	ACT	CAG	GAG	GCC	CCC	AAC	GCC	AAG	GCC	CCT	CCT	CCT	GCC	AAG	GCC	991
304	T	Q	E	A	P	N	A	K	A	P	P	P	A	K	G	318
992	AGT	GGG	TCC	AAA	ATG	GAG	CCC	AAA	CCA	CCA	GCC	AGG	AAG	GTA	GAG	1036
319	S	G	S	K	M	E	P	K	P	P	A	R	K	V	E	333
1037	GCC	CCC	AAG	GGC	CTG	AGA	AAG	CCT	GGC	ATT	CCC	ACC	ACA	GCC	TCC	1081
334	A	P	K	G	L	R	K	P	G	I	P	T	T	A	S	348
1082	TCT	TCC	AAG	GTG	GCC	AGT	AAG	AAG	GCT	GAG	GCC	AAG	AAC	TAG	AGG	1126
349	S	S	K	V	A	S	K	K	A	E	A	K	N	*		
1127	TGGGGTGGTGAGAGACTGAGATTCTACTTTTTTATTC CCTTAAAAAATCACTGTATTTTATTTCACCTGTAA														1219	
1200	CCTATTTATCAATAAAGACTTTTTTTC CCTGCCATAAA														1136	

圖六、豬H1Foo基因之cDNA全長及其編碼胺基酸序列。灰色區塊為H1Fooβ所缺少之片段，後段3'端未轉錄區域上，HEX區域底部標單線，CPE底部標雙線，另ARE則標虛線。

Fig. 6. Nucleotide and amino acid sequences of pig H1Foo. The nucleotide and deduced amino acid sequences specific for H1Fooβ are indicated in light grey. The 3' UTR sequences contain Putative HEX (single underline), CPE (double underline), and class I ARE (broken line).



圖七、以GV時期之卵母細胞進行反轉錄聚合酶反應分析。1. ACTB: 豬 β -actin基因。2. THU: 由本研所得之豬卵母細胞特異性連接組蛋白全長序列。3. NCBI: 由NCBI所預測之豬卵母細胞特異性連接組蛋白全長序列(XM_001926895)。

Fig. 7 RT-PCR analysis of H1Foo from the GV-stage mRNA. Lane 1: pig β -Actin ; Lane 2: pig H1Foo cDNA amplified using primers from this study ; Lane 3: pig H1Foo cDNA amplified using primers from GenBank (XM_001926895).

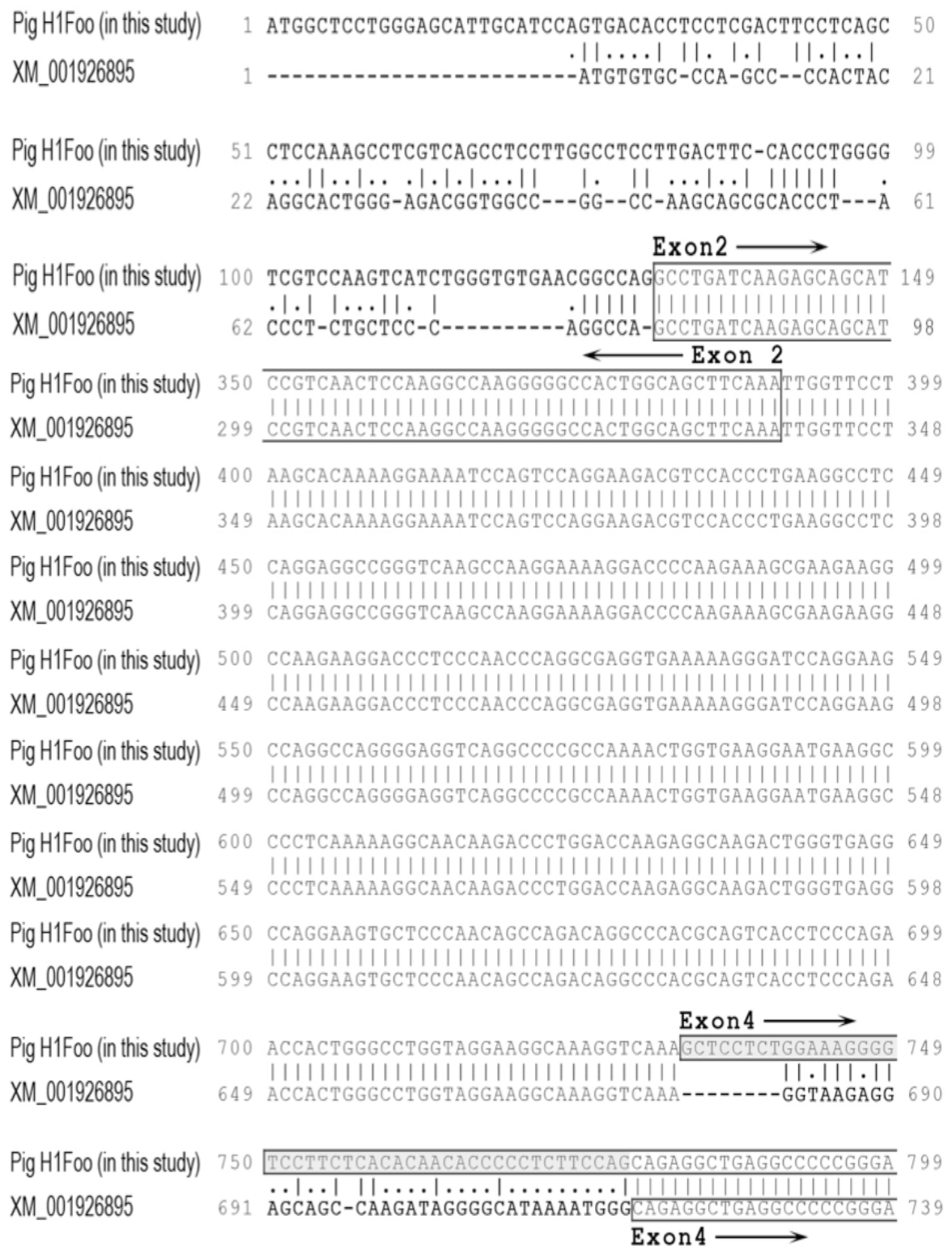


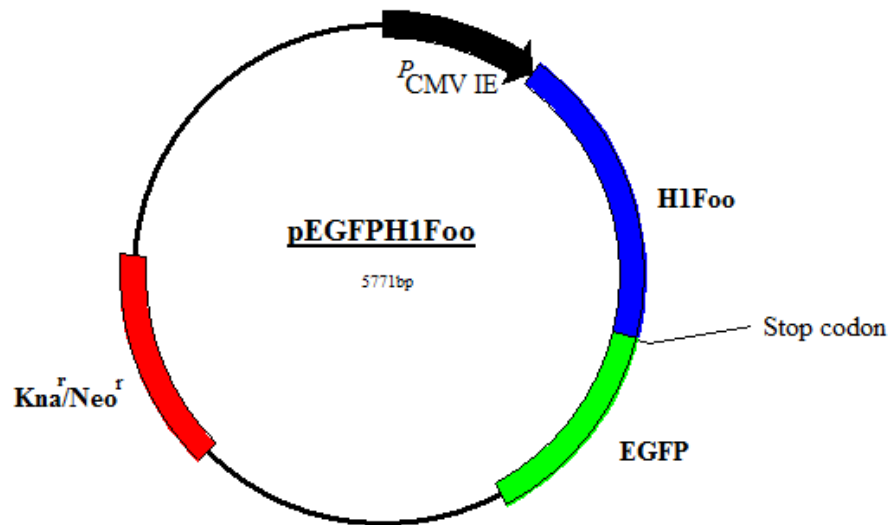
圖 八、豬H1Foo cDNA序列比對。兩組基因差異為外顯子1及4之核苷酸序列。

Fig. 8. Comparison of H1Foo cDNA sequences in GenBank XM_001926895 and this study. Different nucleotides between these two sequences are highlighted in bold black letters. The difference between pig H1Foo α and H1Foo β is shaded in light grey.

	N-Terminus1 Domain →	
Pig (α form)	MAPGSIASSDTSSTSSASKASSASLASLTSTLGSSKSSGCERPGLIKSSIREPRRHPPVL	60
Pig (β form)	MAPGSIASSDTSSTSSASKASSASLASLTSTLGSSKSSGCERPGLIKSSIREPRRHPPVL	60
Bovine	MAPGSIASSDTSSTSSSTSSSTSSASSASAE---GSSRPLGSEKPGRLARGAVRAPRRHPPVL	57
Human	MAPGSVTS-DISPSSTSTAGSSRSPESEKP--GPSHG-GVPPGGPSHSSLPVGRRHPPVL	56
Mouse	MAPGSVSS--VSSSSFPSSRDTSPS-----GSCGLPGADKPGPSCRRIQAGQRNPTML	50
	*****:* * *::: .: :* * * .. * * : :*:*:*	
	Globular Domain →	
Pig (α form)	RMVLEALQAGEQRRGTSVAAIKVYILQKYPTVDVFRLLKYLKQALATGMHRGLLVRPVNS	120
Pig (β form)	RMVLEALQAGEQRRGTSVAAIKVYILQKYPTVDVFRLLKYLKQALATGMHRGLLVRPVNS	120
Bovine	RMVLEALQAGERRRGTSVAAIKVYILQKYPTVDALRLNLHLLKQALATGLHRGLLIRPVNS	117
Human	RMVLEALQAGEQRRGTSVAAIKLYILHXYPTVDVLRFKYLLKQALATGMRRGLLARPLNS	116
Mouse	HMVLEALKAREARQGTSVVAIKVYIQHKYPTVDTRFKYLLKQALETGVRRLLRPAHS	110
	:*****:* * *:::*****:*:*****. *:::***** *:::***** * * :*	
	C-Terminal Domain →	
Pig (α form)	KAKGATGSFKLVPKHKRKIQSRKTSTLKASRRPGQAKEKDPKAKKAKKDPNPGEVKKG	180
Pig (β form)	KAKGATGSFKLVPKHKRKIQSRKTSTLKASRRPGQAKEKDPKAKKAKKDPNPGEVKKG	180
Bovine	KAKGATGSFKLVPKDKRKIPPRKT----APRMPGQAEKDPKPKPSESKKDPANTVEVKKG	173
Human	KARGATGSFKLVPKHKKKIQPRKMAPATAPRRAGEAKGKGPKKPSEAKEDPPNVGKVKKA	176
Mouse	KAKGATGSFKLVPKPK-----TKKACAPKAGRGAAGAKETGSKKSGLLKDKQVKGATMEKG	166
	*:***** * * .. * * .. * * .. * * .. * * .. * * .. * * .. * * .. * * ..	
Pig (β form)	SRKPGQGRSGPAKTGEG-MKAPQKGNKTLDQEARLGEARKCSQQPDRPTQSPRRTTGPR	239
Bovine	SRKPREERAAPSKPGAA-KKAPKKGQTQKDEPRLGEAKKSSRRPDKAAQAPPSAGGPGG	232
Human	AKRPAKVQKPPKPGAATEKARKQGGAAKDTTRAQSGEARKVPPKPKDAMRAPSSAGGLSR	236
Mouse	QKR----RAYPCK-AATLEMAPK-----AKAKPKEVRKAPLKQDKAAGAPLTANG-GQ	214
	:: : * * . * :: ..: *:* . : *:. :* : * .	
Pig (α form)	KAKVKAPLERGPSHTTTPPLPAEAEAPGKTNPGSRNSKSTDTKGNGT---AKTKMGNKIP	296
Pig (β form)	KAKVKA-----EAEAPGKTNPGSRNSKSTDTKGNGT---AKTKMGNKIP	281
Bovine	KSKVKERGSR-----QADTKAHRKTQPGSQSSKSTVTKGNGAPL-AKCKMGGKVP	282
Human	KAKAKGSRSS-----QGDAEAYRKTKAESKSSKPTASKVKNGAASPTKKKVVAKAK	287
Mouse	KVKRSGSRQ-----EANAHGKTK--GEKSKPLASKVQNSVASLAKRKMADMAH	260
	* * . :::* ** : ..** . :* :*.. :* * :	
Pig (α form)	KEAVTQGTQEAPNAKAPPAKGSKMEPKPPARKVEAPKGLRKPGIPTTASSKVASKK	356
Pig (β form)	KEAVTQGTQEAPNAKAPPAKGSKMEPKPPARKVEAPKGLRKPGIPTTASSKVASKK	341
Bovine	KEAAGEG----PKAKAPVPPKAGSKKEPGLAGKAEASKGPRKPGIPTKSSVSKAASKK	338
Human	APKAGQG----PNTKAAAPAKGSKVVPAHLRKRTEAPKGRKAGLPIKASSKVVSSQR	343
Mouse	TVTVVQGAETVQETKVPTPSQDIGHKVQPIPRVRKAKTPENTQA-----	304
	. :* :::*.. *.. * * * * ..* : : :	
Pig (α form)	AEAKN 361	
Pig (β form)	AEAKN 346	
Bovine	AEAEG 343	
Human	AEA-- 346	
Mouse	-----	

圖 九、不同物種 H1Foo 胺基酸序列比對。豬 H1Foo 胺基酸序列與牛 (NP_001030449)、人類 (NP_722575) 及老鼠 (NP_612184) 等物種之胺基酸序列比較結果。灰色區塊為 H1Fooβ 所缺少之序列。

Fig. 9. Alignment of H1Foo amino acid sequences from the pig, bovine (NP_001030449), human (NP_722575) and mouse (NP_612184). The difference between pig H1Fooα and H1Fooβ is shaded in light grey.



圖十、豬 H1Foo 基因之真核表現載體。經轉染後可於真核細胞中表現豬 H1Foo (β 型態) 蛋白。

Fig. 10. The plasmid map of H1Foo eukaryotic expression vector. This plasmid expresses pig H1Foo protein (β form) in the eukaryotic cells.

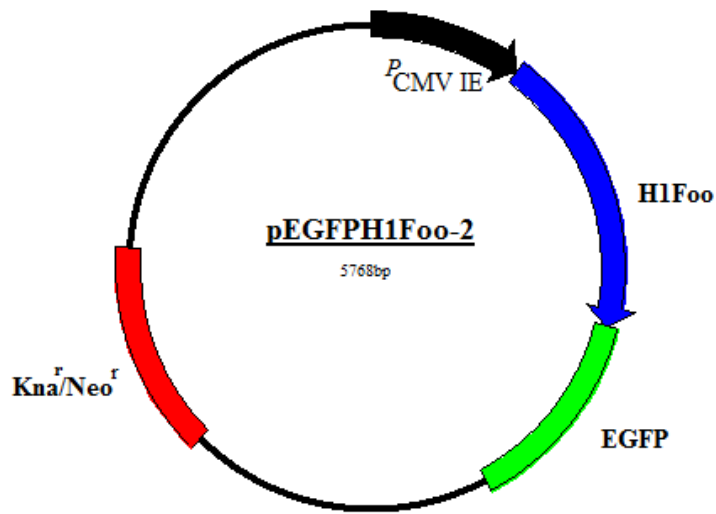


圖 十一、豬 H1Foo 及 EGFP 融合蛋白真核表現載體。經轉染後可於真核細胞中表現 H1Foo 蛋白質與綠色螢光蛋白之融合蛋白。

Fig. 11. The plasmid map of H1Foo fusion protein eukaryotic expression vector (pig H1Foo protein β from and EGFP). This plasmid expresses the fusion protein (pig H1Foo protein β from and EGFP) in the eukaryotic cells.

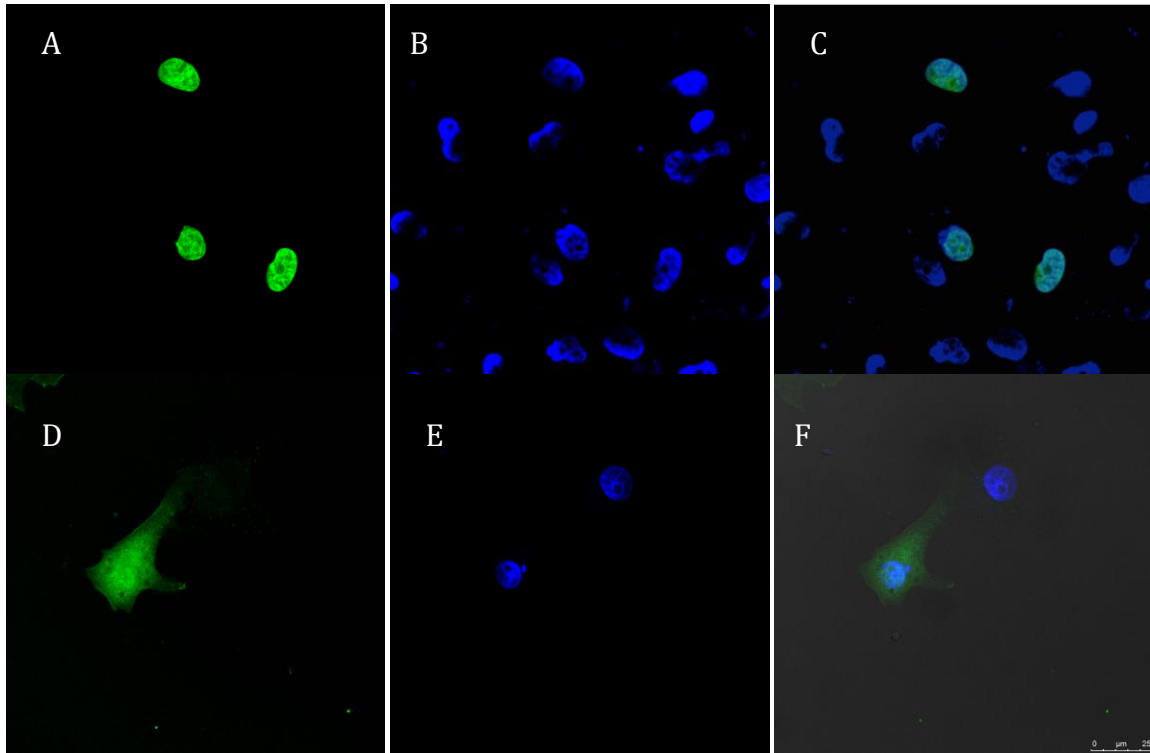


圖 十二、於 PECs 內表現 H1Foo 與 EGFP 之融合蛋白。A~C 為經 pEGFP-H1Foo-2 轉染後之 PEC，D~F 為經 pEGFP 轉染後之 PEC。A、D 以 488 nm 波長觀察綠色螢光蛋白；B、E 以 344 nm 波長觀察經 DAPI 染色之細胞；C，F 將綠色螢光及 DAPI 圖融合。

Fig. 12. Expression of the pig H1Foo- EGFP fusion protein in PEC. A-C: The PECs transfected with pEGFP-H1Foo-2 plasmids. D-F: The PECs transfected with pEGFP plasmids. A, D: Observation of the EGFP with wavelength 344 nm. B, F: Observation of the cells stained by DAPI with wavelength 418 nm. C, F: The EGFP image merged with DAPI stain image.

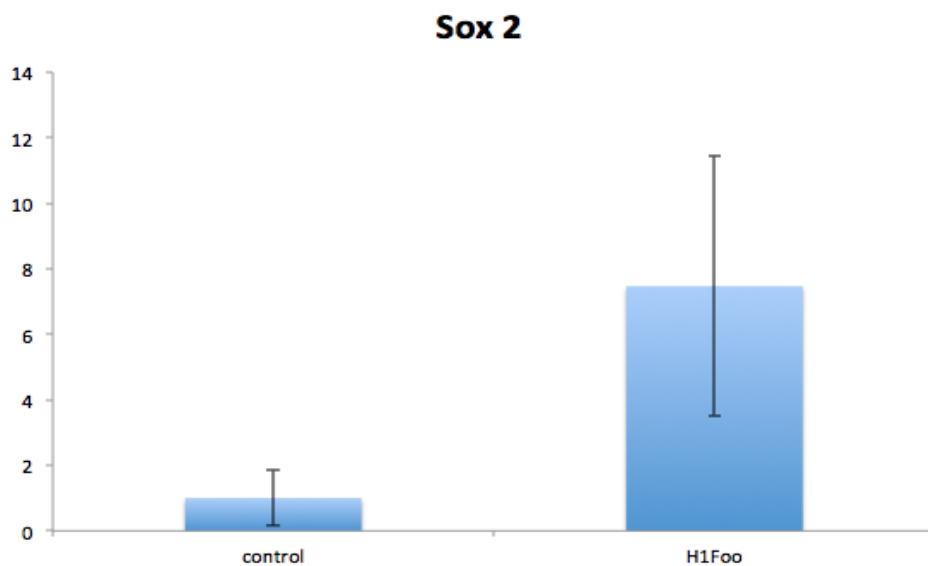
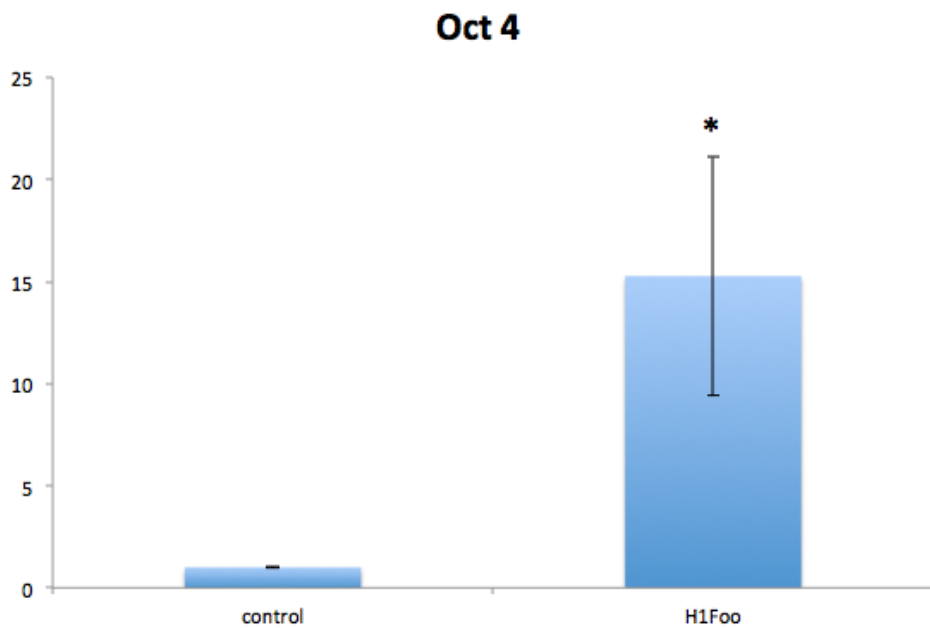


圖 十三 A、 比較 PECs 及轉染 pEGFP-H1Foo-2 之 PECs 其幹細胞相關基因表現量。A：Oct4 基因表現量 (t-test, $p < 0.05$)。B：Sox2 基因表現量。

Fig. 13. Real time PCR analysis of stem cell related gene expression in pEGFPH1Foo-2 transfected PEC. A: The expression level of Oct 4 (t-test, $p < 0.05$). B: The expression level of the Sox2.

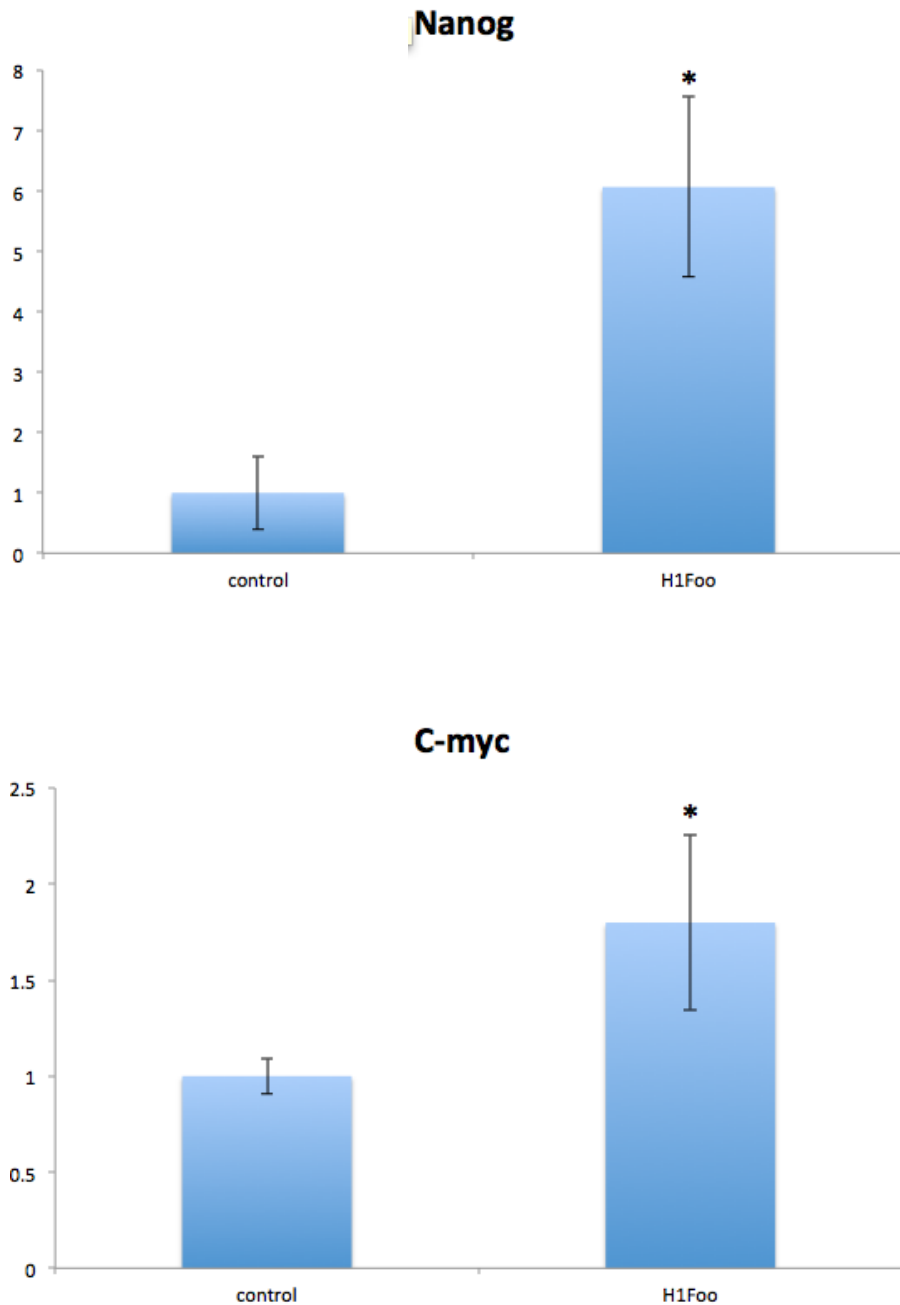


圖 十三 B、比較 PECs 及轉染 pEGFP-H1Foo-2 之 PECs 其幹細胞相關基因表現量。C：Nanog 基因表現量 (t-test, $p < 0.05$)。D：C-myc 基因表現量 (t-test, $p < 0.05$)。

Fig. 13. Real time PCR analysis of stem cell related gene expression in pEGFPH1Foo-2 transfected PEC. C: The expression level of Nanog (t-test, $p < 0.05$). D: The expression level of the C-myc (t-test, $p < 0.05$).

表四、以pEGFPH1Foo質體轉染PEC對其細胞週期的影響

Table 4. Effect of pEGFPH1Foo transfection on PEC cell cycle

單位：%

Cell	G0/G1	S	G2/M	Sub-G1	>4n
A	85.35	5.14	7.06	0.83	0.27
B	83.52	6.58	7.70	1.05	0.50
C	69.73	12.48	7.74	6.81	0.54

A. 單獨加入水，進行轉染試驗。

B. 單獨加入 lipofectmine 2000 轉染試劑，進行轉染試驗。

C. 加入 lipofectmine 2000 與 pEGFPH1Foo 質體，進行轉染試驗。

伍、討論

一、選殖豬 H1Foo cDNA 全長序列

本研究結果顯示豬 H1Foo 基因結構具有內含子，此有異於一般體細胞連接性組蛋白之特性；但此結果與先前對於其它物種 H1Foo 基因研究結果相同，例如：鼠，牛及人類等 (Tanaka *et al.*, 2001; McGraw *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2009)，其基因結構皆由 5 個外顯子及四個內含子所組成。另外，各物種之 H1Foo 基因，其內含子 1 長度佔全基因長度超過 50%，例如豬之 H1Foo 基因其內含子 1 長度/全基因結構長度：23728 bp/27998 bp (84%)，在牛方面，則為 26021 bp/30830 bp (84%)。而內含子 1 上分布 3 種特定之轉錄因子結合位 (AML-1a, SRY 和 CdxA)。SRY 基因其位於 Y 染色體上固其只表現於雄性個體上；SRY 作為轉錄因子，可與特定之 DNA 序列或結構結合並進行調控轉錄作用，另其為胚胎發育時期促使決定分化為睪丸 (testis) 之觸發器 (Harley *et al.*, 1996)；雖然對於許多基因來說，內含子 1 內具有順式作用元件 (cis-acting element) 區域可與加強子 (enhancer) 或抑制子 (silencer) 結合，藉此達到對於該基因表現量之調控目的 (Gaunitz *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 1998)；但於 H1Foo 基因之研究尚無明確指出其內含子 1 具有此種基因表現調控功能。

此外，卵母特異性連接組蛋白 H1Foo 其 mRNA 有些特徵與體細胞連接組蛋白不同，其 3' 端非編碼區具有多聚腺苷酸化序列 AAUAAA (polyadenylation)，能使 mRNA 之 3' 端加上 poly-A 的序列，而體細胞 H1 之 mRNA 則無 poly-A 結構；另，卵母特異性連接組蛋白 H1Foo 之 mRNA 的 3' 非編碼區具有 cytoplasmic polyadenylation element (CPE, UUUUA1-2U) 序列，

此序列在卵母細胞成熟過程中為轉譯作用 (translation) 是否順利啟動之重要因子 (De Moor and Richter 1999)，另一型態之CPE序列 (U) 12-27，此序列則是在胚胎成熟時期，同樣是使mRNA能成功進行轉譯作用的重要因子，由此可知卵母特異性連接組H1Foo蛋白質在卵母細胞及胚胎的成熟過程中扮演重要角色 (Joel 1999)。

豬之 H1Foo 基因具有 RNA 選擇性切位，其切位於外顯子 3 及外顯子 4 之間的內含子上；此現象同樣出現於老鼠之 H1Foo 基因上，小鼠 H1Foo 基因之 RNA 選擇性切位現象，被推測為隨機發生的事件 (Tanaka *et al.*, 2004)。小鼠 H1Foo 基因選擇性切剪接位造成外顯子 4 後端多了 3 個核苷酸序列，造成閱讀框架位移，影響蛋白質結構上之 C-terminal，相較另一個切位減少了 58 個胺基酸 (Tanaka *et al.*, 2004)。反之，豬 H1Foo 基因兩種不同 mRNA 轉錄版本其差異為外顯子 4 前端具有多出的 45 個核苷酸與否，因此此剪接位並未造成後續之閱讀框架位移，所以並未對下游蛋白質序列造成影響，而只是於中間加入了一段 15 個胺基酸序列。此外，豬 H1Foo 兩種版本之 mRNA 其表現量並不平均，由生發泡時期萃取所得之 RNA 進行 RT-PCR 後，將 PCR 之產物經由接合作用放入 pGEM-T Easy Vector 中，後續進行轉形作用，將接有 PCR 產物之質體放入大腸桿菌中後，利用抗生素及 X-gel 進行篩選後，結果 286 個選殖的菌落中只發現了 12 個於外顯子 4 前端多出 45 個核苷酸之 H1Foo 基因的存在。

組蛋白在演化過程中具有高度之保守性，但在各物種之間仍可以觀察到其組蛋白亞單元之序列具有明顯差異，尤其是連接性組蛋白 (Fu *et al.*, 2003; McGraw *et al.*, 2006)。至今在哺乳動物中發現共有 11 種亞單元 (variant) 連接性組蛋白，其中七種體細胞連接組蛋白 (H1.1 至 H1.5, H10 和 H1x)，三種精子特異性細胞連接組蛋白 (H1t、H1T2 和 H1LS1)，一種卵母細胞特

異性連接組蛋白 (Wiśniewski *et al.*, 2007)，為何哺乳動物具有多亞單元連接性組蛋白其原因仍未明，但各連接性組蛋白亞單元表現之變換相對於細胞當時所處分化或發育時期，連接性組蛋白對於細胞內基因表現調控具有相當程度關聯性 (Teranishi *et al.*, 2004)。

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待進一步試驗之證明。類似的試驗結果在牛的卵母細胞與受精後的各胚期中亦得到證明 (Mcgraw *et al.*, 2006)，牛體細胞型H1於8-至16-細胞胚期後才會出現，且牛之H1Foo隨著胚發育其表達強度則不斷減弱，至8-至16-細胞胚期急遽下降，之後就無法偵測得到，而8-至16-細胞胚期正是牛胚原性與母源性基因轉換的時期，因此，連接組蛋白不同亞單元表現的變化似乎是早期胚發育的一個顯著性特徵。

豬 H1Foo 蛋白質胺基酸序列與其他物種作比對後結果顯示，其相似度並不高，同為哺乳動物之人類 (*Homo sapiens*)、牛 (*Bos Taurus*) 及小鼠 (*Mus musculus*)，其全長胺基酸序列比對結果分別為 54.4%，66.0%和 39.9%，但是若只比較胺基酸序列中第 60 至第 130 共 70 個胺基酸之序列片段，稱為中央球狀區域 (Central globular domain)(Mcgraw *et al.*, 2006)，其相似度會大幅提升為 88%，89%和 81%。此結果顯示在不同物種之間，連接組蛋白其中央球狀區域仍保有相當程度的保守性，因為此區域為連接組蛋白與 DNA 結合之主要區域，故此部分之胺基酸序列在各物種之間相似度極高。

二、 H1Foo 蛋白質功能探討

在高等真核生物當中，所有已知連接組蛋白之亞單元皆具有相同蛋白質結構:具有高度保守性中心球狀功能區，序列較短的 N 端片段及具有豐富

離胺酸 (lysine) 長片段之 C 端序列 (Sarg *et al.*, 2005)。中心球狀功能區具有一翼狀螺旋 (winged helix motif) 結構，而此結構可以讓連接組蛋白與核小體相互結合 (Becker *et al.*, 2005)。另，連接組蛋白之兩端同樣與染色質有所交互作用，並具有調控基因轉錄之功能，其中 C 端是透過本身所帶有之正電荷與帶有負電荷之連接 DNA 緊密結合，並藉此調控染色質之緊縮程度，達到調控基因表現之目的。連接性組蛋白之各種亞單元分別表現於各種不同種類或時期之細胞。體細胞連接組蛋白及卵母細胞特異性連接組蛋白其同樣表現於細胞核中，但只能在卵母細胞中觀察到卵母細胞特異性連接組蛋白之存在 (Becker *et al.*, 2005)。另外，在體細胞核轉置的試驗當中所發生體細胞組蛋白轉換成卵母細胞特異性連接組蛋白；以及在受精過程中，卵母細胞特異性連接組蛋白迅速進入精子細胞核中，取代原本精子細胞中與染色質結合之精蛋白，並調控精子染色質於受精後之解聚 (decondensation) 到再折疊 (remodeling) 的過程 (Tanaka *et al.*, 2001; McLay *et al.*, 2003)。由這些研究結果顯示，H1Foo 於卵母細胞內扮演對於染色質之重組與再折疊的重大影響之因子，儘管其作用機制迄今不明。

2006 年，Shinya Yamanaka 的研究小組發現，取四個基因 (Oct3/4, Sox2, C-myc, Klf4) 送入一般體細胞，可以使細胞產生再程序化現象，回到有如胚胎幹細胞，其具多能性分化功能的細胞，稱為誘導多能性幹細胞 (iPS)。iPS 細胞的特質類似胚胎幹細胞，只要經由特殊訊號分子的引導，即可將它們轉換成為各種體細胞。2007 年，美國 James Thomson 研究團隊也發表利用 Oct4, Sox2, Nanog, Lin28 也可以將人類體細胞轉化為幹細胞，由此可知，Oct4, Sox2, C-myc 等基因表現對於體細胞轉換回胚胎幹細胞是必須的。

卵母特異性連接組 H1Foo 蛋白質與體細胞核的基因組再程序化 (genomic reprogramming) 的研究中發現，當體細胞核移置進入小鼠去核卵母細胞 10 分鐘後，卵母特異性連接組 H1Foo 即出現在供核體中，並且供核體

細胞中的原有的體細胞型H1s會被卵母特異性連接組H1Foo替換，於4-細胞胚期後才再度出現 (Terakihhi *et al.*, 2004)；另一試驗則是在胚胎幹細胞 (embryonic stem cell) 中分別額外表現卵母特異性連接組蛋白H1Foo及其它一般體細胞連接組蛋白，其胚胎幹細胞經過七天培養後，表現卵母特異性連接組蛋白H1Foo之胚胎幹細胞持續表現幹細胞標的基因Oct4及Nanog；此外，表現其他亞單元連接組蛋白之胚胎幹細胞，經七天培養後，已表現出Gata4等細胞分化標的基因，反之，表現卵母特異性連接組蛋白H1Foo之胚胎幹細胞則沒有偵測到其相關基因 (Hayakawa *et al.*, 2012)。

體細胞核轉置試驗是藉由卵母細胞中之環境條件使體細胞進行再程序化之作用，代表卵母細胞之環境同樣為影響體細胞可否順利進行再程序化之重要因素 (Gurdon and Alison *et al.*, 2008)，本研究雖可藉由轉染作用，使體細胞內表現H1Foo蛋白，藉此影響體細胞原本的基因表現，特別是幹細胞相關基因如Oct4、Nanog及C-myc，此結果顯示H1Foo蛋白質可能參與體細胞再程序化的反應。此外，本研究結果顯示H1Foo表現於體細胞中導致誘發細胞凋亡，但其機制仍待進一步探討。

陸、結論

一、豬之H1Foo基因具有選擇性剪切位，因此有兩種不同長度cDNA模版，其中H1Foo α cDNA 為1086 bp，共編碼361個胺基酸，H1Foo β cDNA 為1041 bp，編碼346個胺基酸。

二、H1Foo蛋白質只存在於細胞核當中，且其存在對於幹細胞等相關基因之 (Oct 4、Nanog、C-myc) 表現量有顯著之影響，另，對於細胞週期也有其影響力。

柒、參考文獻

- Adenot, P. G., E. Campion, E. Legouy, C. D. Allis, S. Dimitrov, J. Renard and E. M. Thompson. 2000. Somatic linker histone H1 is present throughout mouse embryogenesis and is not replaced by variant H1 degrees. *J. Cell Sci.* 113:2897-2907.
- Alison, M. R., R. Poulson, S. Forbes, and N. A. Wright. 2002. An introduction to stem cells. *J. Pathol.* 197: 419-423.
- Baake, M., M. Bauerle, 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.
- Bartova, E., J. Krejci, A. Harnicarova, G. Galiova, and S. Kozubek. 2008. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J. Histochem. Cytochem.* 56:711-721.
- Becker, M., A. Becker, F. Miyara, Z. Han, M. Kihara, D. T. Brown, G. L. Hager, K. Latham, E. Y. Adashi, and T. Misteli. 2005. Differential in vivo binding dynamics of somatic and oocyte-specific linker histones in oocytes and during ES cell nuclear transfer. *Mol. Biol. Cell.* 16:3887-3895.
- Clarke, H. J., M. Bustin, and C. Oblin. 1997. Chromatin modifications during oogenesis in the mouse: removal of somatic subtypes of histone H1 from oocyte chromatin occurs post-natally through a post-transcriptional mechanism. *J. Cell Sci.* 110:477-487.
- de Moor, C. H., and J. D. Richter. 1999. Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of cyclin B1 mRNA. *EMBO J.* 18:2294-2303.
- Fu, G., P. Ghadam, A. Sirotkin, S. Khochbin, A. I. Skoultchi, and H. J. Clarke. 2003. Mouse oocytes and early embryos express multiple histone H1 subtypes. *Biol. Reprod.* 68:1569-1576.

- Furuya, M., M. Tanaka, T. Teranishi, K. Matsumoto, Y. Hosoi, K. Saeki, H. Ishimoto, K. Minegishi, A. Iritani, and Y. Yoshimura. 2007. H1foo is indispensable for meiotic maturation of the mouse oocyte. *J. Reprod. Dev.* 53:895-902.
- Gao, S., Y. G. Chung, M. H. Parseghian, G. J. King, E. Y. Adashi, and K. E. Latham. 2004. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Dev. Biol.* 266:62-75.
- Gaunitz, F., K. Heise, and R. Gebhardt. 2004. A silencer element in the first intron of the glutamine synthetase gene represses induction by glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 18:63-69.
- Gurdon, J., and A. Murdoch. 2008. Nuclear transfer and iPS may work best together. *Cell Stem Cell.* 2: 135-138.
- Hall, V. J., J. Christensen, Y. Gao, M. H. Schmidt, and P. Hyttel. 2009. Porcine pluripotency cell signaling develops from the inner cell mass to the epiblast during early development. *Dev. Dyn.* 238:2014-2024.
- Hammoud, S. S., D. A. Nix, H. Zhang, J. Purwar, D. T. Carrell, and B. R. Cairns. 2009. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460:473-478.
- Harley, V. R., R. Lovell-Badge, P. N. Goodfellow, and P. J. Hextall. 1996. The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain. *FEBS Lett.* 391:24-28.
- Hayakawa, K., J. Ohgane, S. Tanaka, S. Yagi, and K. Shiota. 2012. Oocyte-specific linker histone H1foo is an epigenomic modulator that decondenses chromatin and impairs pluripotency. *Epigenetics* 7:1029-1036.
- Jullien, J., C. Astrand, R. P. Halley-Stott, N. Garrett, and J. B. Gurdon. 2010. Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in

- which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:5483-5488.
- Leung, K. K., L. J. Ng, K. K. Ho, P. P. Tam, and K. S. Cheah. 1998. Different cis-regulatory DNA elements mediate developmental stage- and tissue-specific expression of the human COL2A1 gene in transgenic mice. *J. Cell Biol.* 141:1291-1300.
- McGraw, S., C. Vigneault, K. Tremblay, and M. A. Sirard. 2006. Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 73:692-699.
- Nakazawa, Y., A. Shimada, J. Noguchi, I. Domeki, H. Kaneko, and K. Kikuchi. 2002. Replacement of nuclear protein by histone in pig sperm nuclei during in vitro fertilization. *Reproduction* 124:565-572.
- Oliveri, R. S., M. Kalisz, C. K. Schjerling, C. Y. Andersen, R. Borup, and A. G. Byskov. 2007. Evaluation in mammalian oocytes of gene transcripts linked to epigenetic reprogramming. *Reproduction* 134:549-558.
- Prather, R. S. 2007. Nuclear remodeling and nuclear reprogramming for making transgenic pigs by nuclear transfer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 591:1-13.
- Richter, J. D. 1999. Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:446-456.
- Sarg, B., A. Green, P. Soderkvist, W. Helliger, I. Rundquist, and H. H. Lindner. 2005. Characterization of sequence variations in human histone H1.2 and H1.4 subtypes. *FEBS J.* 272:3673-3683.
- Schnieke, A. E., A. J. Kind, W. A. Ritchie, K. Mycock, A. R. Scott, M. Ritchie, I. Wilmut, A. Colman, and K. H. Campbell. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science.* 278: 2130-2133.
- Simonsson, S., and J. Gurdon. 2004. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat. Cell Biol.* 6: 984-990.

- Standley, H. J., and J. B. Gurdon. 2002. Uncommitted *Xenopus* blastula cells can be directed to uniform muscle gene expression by gradient interpretation and a community effect. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 993-998.
- Sutovsky, P., and R. S. Prather. 2004. Nuclear remodeling after SCNT: a contractor's nightmare. *Trends Biotechnol.* 22:205-208.
- Takahashi, K., and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Tanaka, M., J. D. Hennebold, J. Macfarlane, and E. Y. 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.
- Tanaka, M., M. Kihara, B. Meczekalski, G. J. King, and E. Y. Adashi. 2003. *H1foo*: a pre-embryonic H1 linker histone in search of a function. *Mol. Cell Endocrinol.* 202:5-9.
- 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.
- 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* in nuclear transfer. *Dev. Biol.* 266:76-86.
- Whitworth, K., G. K. Springer, L. J. Forrester, W. G. Spollen, J. Ries, W. R. Lamberson, N. Bivens, C. N. Murphy, N. Mathialagan, J. A. Green, and R. S. Prather. 2004. Developmental expression of 2489 gene clusters during pig embryogenesis: an expressed sequence tag project. *Biol. Reprod.* 71:1230-1243.

- Wisniewski, J. R., A. Zougman, S. Kruger, 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.
- Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, and K. H. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385: 810-813.
- Woodcock, C. L., and R. A. Horowitz. 1995. Chromatin organization reviewed. *Trends Cell Biol.* 5:272-277.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II, and J. A. Thomson. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-1920.
- Zlatanova, J., and D. Doenecke. 1994. Histone H1 zero: a major player in cell differentiation? *FASEB J.* 8:1260-1268.

捌、英文摘要

The oocyte-specific linker histone H1 (H1Foo) participates in regulation of gene expression in various steps of embryogenesis. The sequence of full-length H1Foo cDNA has been identified in mice, human, bovine and other non-mammalian species, but not in pig. The objective of this study were to investigate the involvement of porcine H1Foo (pH1Foo) in early embryogenesis by obtaining the full length pH1Foo cDNA and overexpression of pH1F00 in somatic cells. By using 5'-rapid amplification of cDNA end (RACE) method, total RNAs from germinal vesicle (GV)-stage oocytes were used to obtain the full length cDNA. For the one-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), RT was performed using pH1Foo gene-specific reverse primer and subsequent PCR was carried out by adding a forward primer containing the adaptor sequence. The resulting PCR fragments were cloned into a TA cloning vector and then sequenced. The full length of pH1Foo cDNA was 1107 bp and 346 amino acids encoded open reading frame. The pH1Foo cDNA was inserted into the eukaryotic expression vector and transfected into the porcine aortic endothelial cells (PECs). The result of localization of H1Foo-enhanced green fluorescent protein (EGFP) indicated H1Foo protein was located in nucleus. The result of Real-time PCR indicated that the expression of stem cell related genes (Oct4, Nanog and C-myc) were significantly increased in pH1Foo tranfected PECs. In addition, In pH1Foo tranfected PECs, proportion of the G0/G1 phase cells were reduced and the sub-G1 phase cells were increased. In conclusion, the H1Foo protein affected the stem cell related genes (Oct4, Nanog and C-myc) and induced the cell apoptosis.

Keywords: pig, oocyte specific linker histone, reprogramming