

體內發育、體外生產與體細胞核轉置牛胚之 重要基因表現分析⁽¹⁾

蕭振文⁽²⁾ 蔡麗卿⁽²⁾ 曲鳳翔⁽²⁾ 劉瑞珍⁽²⁾ 劉振發⁽²⁾
李善男⁽³⁾ 陳立人⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：94 年 6 月 10 日；接受日期：94 年 7 月 12 日

摘 要

本研究主要目的在探討體內發育 (*in vivo*)、體外受精與體細胞核轉置牛胚於不同發育階段 (2 細胞期至囊胚期) 之重要基因表現。體外生產的牛胚 (*in vitro* production, IVP)、體細胞核轉置 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 牛胚及田間牛胚非外科採集取得之部分活體牛胚, 利用萃取套組純化 mRNA 後, 利用反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 獲得互補 DNA (complementary DNA, cDNA), 再利用合成的引子進行 PCR 以分析重要基因的表現。結果顯示, 分析的 19 種基因中, 對照之常駐 (housekeeping) 基因 β -actin 與 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、E-cadherin (E-cad)、octamer-binding transcription factor (Oct-4)、glutamine synthetase (GS)、heat shock protein 70.1 (Hsp)、plakophilin (Plako) 與 poly (A) polymerase (Poly A) 在不同來源、不同胚期的全部牛胚均有表現。因胚源與胚期不同而表現差異的基因有 α -2 macroglobulin (A2M)、flavin-containing mono-oxygenase (FMO)、glucose transporter 1 (Glut-1) 與 IGF-I receptor (IGF-Ir)。而在不同胚源、不同胚期均未測到表現的基因有 connexin43 (Cx43)、Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD)、desmoglein 1 (Dg1)、IGF-I、interferon tau (IF- τ) 與 Mn SOD。為了確認基因之表現是否正確, 將測得表現的 5 種基因產物選殖入 pGEN-T Essay Vector system II 並進行 DNA 序列分析, 結果與 BLAST 網路資料庫比對後顯示為正確之序列。本研究之方法與結果可做為牛胚發育生物學與探索基因表現之參考。

關鍵詞：牛胚、基因表現、細胞核轉置。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1288 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, E-mail: lrchen@mail.tlri.gov.tw。

緒 言

體外生產 (*in vitro* production, IVP) 牛胚與體細胞核轉置 (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, 生產的囊胚經胚移置後約有 50% 可順利懷孕 (Niemann *et al.*, 2002)。雖然如此, IVP 牛胚在型態、發育時間及抗緊迫等性狀仍與體內胚有明顯差異 (Niemann *et al.*, 2002)。至於 SCNT 牛胚的生產效率則明顯偏低, SCNT 囊胚經移置後之產仔率低於 10% (Tian *et al.*, 2003)。活體取得或 IVP 的牛胚進行胚移置, 早期的懷孕率相近, 但在懷孕末期, 約有 25~35% 的 IVP 胎兒將因巨仔症 (large offspring syndrome, LOS) 而損失; 此現象在 SCNT 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, IVP 牛胚或 SCNT 牛胚在不同生長發育階段, 各種調控生長發育之重要基因表現差異極大; 這些重要基因, 包括了各種轉錄因子、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。這些重要基因表現之變異可能是造成 IVP 或 SCNT 牛胚發育終止或分娩前後損失的重要因素 (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。

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等可能的基因表現異常研究 (Niemann and Wrenzycki, 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。本研究應用 RT-PCR 技術, 分析 IVP 牛胚、SCNT 牛胚與活體取得之牛胚, 在不同發育階段的重要基因表現, 同時進行部分基因 DNA 序列分析, 以確認表現之正確性, 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

供試牛胚樣品係來自體外生產的 IVP 牛胚、核轉置技術生產的 SCNT 牛胚, 以及收集自田間牛胚移置所取得之體內桑椹期及囊胚期牛胚, 供基因表現分析之用。

(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, 條件為 38.5°C、5% CO₂ 及相對濕度 95%。而後以冷凍解凍之乳用公牛冷凍精液進行 8 h 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 h 開始評估受精卵之分裂率, 之後每隔 24 h 觀察胚的發育直到體外授精後第 7 天, 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-buffered saline, 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°C 低溫冷凍櫃中供萃取 mRNA 之用。

(ii) SCNT 牛胚

係參考相關文獻進行生產 (Wilmut *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，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 h (李等, 1997)。
2. 供核細胞之製備：取得荷蘭母牛之耳朵組織，經酒精消毒後剪碎，並以 trypsin 處理予以分離培養成纖維母細胞 (fibroblast)，供核轉置之用。進行核轉置前，先將成纖維母細胞由含有 10% FBS 之 DMEM 培養基，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 μ g/ml Hoechst 33342 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. 供核與受核細胞之電融合：將經 SCNT 操作之重組胚置於含有 0.3 M mannitol、0.1 mM MgSO_4 及 0.1 mM CaCl_2 之電融合液中，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，條件為 1.34 kV/cm、維持 10 μ s。電融合處理之 SCNT 胚隨後置入含有 5% FBS 的 TCM-199 培養液中。
5. SCNT 胚之激活處理：已融合之 SCNT 胚培養 4 h 後，再移入含 5 μ M A23187 激活溶液中 5 min，然後移入含 2 mM 6-DMAP 之激活操作液中予以 4 h 之激活處理。SCNT 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 6 至 7 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°C 保存之 IVP 牛胚、SCNT 牛胚與活體取得牛胚樣品進行基因表現分析。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°C 維持 5 min 後，直接置於冰上。進行 RT-PCR 之反應總體積為 10 μ l，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°C 維持 1 h。製備之 cDNA 即可供 PCR 分析基因之表現型式。分析牛胚各種重要基因之引子序列、黏合溫度及產物長度如表 1 所示。

III. 牛胚重要基因表現分析

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 1 u 的 Taq DNA 聚合酶 (Promega, USA)。PCR 條件為 95°C 3 min、50 次循環的 94°C 30 sec、56°C 30 sec、72°C 3 min；72°C 8 min；最後維持於 4°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 min。電泳後將膠片置入染液 [0.5 \times 的 Tris-acetate-EDTA (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。

表 1. 牛胚基因 PCR 分析之引子序列、黏合溫度及產物長度

Table 1. Primers used for PCR of bovine embryo gene transcripts

Genes	Primer sequences	Annealing temperature (°C)	Fragment size (bp)
A2M	5'-TGTTGGACTTGATCTCTGCA-3' 5'-AGCTCTGCCATGAGAAACAC-3'	56	144
β-actin	5'-GAGAAGCTCTGCTACGTCGC-3' 5'-CAGACAGCACCGTGTGGC-3'	60	250
Cx 43	5'-TGGAATGCAAGAGAGGTTGAAAGAGG-3' 5'-AACACTCTCCAGAACACATGATCG-3'	56	293
Cu/Zn SOD	5'-GAAGAGAGGCATGTTGGAGA-3' 5'-CCAATTACACCACGAGCCAA-3'	58	220
Dg1	5'-GCAGATGGTATGTCAGCAGAGTGTG-3' 5'-GAAGTAAGGCCATATGCAGAGGTAG-3'	54	785
E-cad	5'-CTCAAGCTCGCGGATAACCAGAACAAAGAC-3' 5'-AGGCCCCCTGTGCAGCTGGCTAAATCAAAG-3'	55	332
FMO	5'-TCAACCAATTCACAATTGGAGT-3' 5'-AAGGTGTTCCCTCAGCACCAGT-3'	56	142
GAPDH	5'-CCAGAAGACTGTGGATGGCC-3' 5'-CTGACGCCTGCTTCACCACC-3'	60	248
Glut-1	5'-AGGAGCTGTTCCACCCCCTGGGAGCTGACT-3' 5'-TGTGGGTGAAGGAGACTCTGGCTGATAAAA-3'	59	327
GS	5'-ACAACCGAAAGCCTGCAGAG-3' 5'-GCGTAGGCTTTGTCCGCTCC-3'	56	206
Hsp	5'-AAGGTGCTGGACAAGTGCCAGGAGGTGATT-3' 5'-ACTTGGAAGTAAACAGAAACGGGTGAAAAA-3'	59	488
IGF-I	5'-AAGATGCCCATCACATCCTCCTCG-3' 5'-TTCTGAGCCTTGGGCATGTCGG-3'	61	335
IGF-Ir	5'-CATGCTGTTTGAGCTGATGC-3' 5'-GGCCTTGTCCTGAGTGTC-3'	57	259
IF-τ	5'-TGGCCTTCGTGCTCTCTCTAC-3' 5'-ATGTGGCATCTTAGTCAGCGAG-3'	63	250
Mn SOD	5'-CACCACAGCAAGCACCACGC-3' 5'-TCCCACACGTCAATCCCCAG-3'	57	409
Oct-4	5'-CGTTCTCTTTGGAAAGGTGTT-3' 5'-ACACTCGGACCACGTCTTTC-3'	55	314
Plako	5'-CCCGTGGACCCCGAGGTCTTCTTCA-3' 5'-CGGTGTAGGCGTTGCGGGCGTTGTA-3'	64	268
Poly A	5'-GTTTCCTCGGTGGTGTTCCTGGGCTATGC-3' 5'-TGGAGTTCTGTTGTGGGTATGCTGGTGTAA-3'	57	252

Cx43: Connexin 43, Dg1: Desmoglein 1, E-cad: E-cadherin, FMO: Flavin-containing mono-oxygenase, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Glut-1: Glucose transporter 1, GS: Glutamine synthetase, Hsp : Heat shock protein 70.1, IF-τ: Interferon tau, IGF-I: insulin-like growth factor-I; IGF-Ir: insulin-like growth factor-I receptor; Mn SOD: manganese-containing superoxide dismutase, A2M:α-2 macroglobulin, Oct-4: octamer-binding transcription factor, Plako: Plakophilin, Poly A: Poly (A) polymerase.

IV. DNA 片段回收與選殖

將部分基因分析所獲得之 PCR 產物切下，利用膠體回收套組（Qiagen, GmbH）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，選殖重要基因之 PCR 產物並接入 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（competent cells）*E. coli* 內，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 5 種基因利用 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）連接到 National Center for Biotechnology Information（NCBI）進行 DNA 序列之 Basic Local Alignment Search Tool（BLAST）比對，以了解上述重要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

本研究期能應用分子生物技術，分析體外生產的 IVP 牛胚、核轉置技術生產的 SCNT 牛胚，以及部份收集自田間牛胚移置所取得之體內桑椹期及囊胚期牛胚，在特定之發育階段過程中各種與胚發育相關之重要基因表現型式，探索不同來源牛胚之基因表現差異與生產效率的相關性。不同來源之牛胚利用 mRNA 萃取套組純化 mRNA 後，利用 RT-PCR 反轉錄成為 cDNA，再利用合成的引子進行聚合酶連鎖反應以分析重要基因的表現。結果顯示分析的 19 種基因中，對照的常駐基因 β -actin 與 GAPDH 是作為胚樣 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 β -actin 與 GAPDH 的 PCR 產物（表 2）。對照的常駐基因 β -actin 與 Accession NM_174580 的 β -actin 基因具有最高之相似性（表 3）。此外，本實驗分析參與 RNA 合成的 PolyA 基因及 Hsp 基因的結果，顯示在不同來源、不同胚期的牛胚樣品均有表現（表 2）。

Oct-4 是屬於 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，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 8 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）、胎兒原始性脊（primitive genital ridge）中的始基生殖細胞（primordial germ cell, PGC），以及體外培養的胚幹細胞（embryonic stem cell, ES cell）、胚畸胎瘤細胞（embryonal carcinoma cell, EC cell）與生殖幹細胞（embryonic germ cell, EG cell）等（Tanaka *et al.*, 2002; Niwa *et al.*, 2000）。在小鼠胚，Oct-4 的表現最早出現在 4~8 細胞期的胚中，而後在桑椹胚強烈表現；到了囊胚期，在內細胞群可見到 Oct-4 強烈表現，然滋養層中的 Oct-4 則減少（Scholer *et al.*, 1989）。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（VanEijk *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（Scholer *et al.*, 1989；Wang and Schultz, 1996），但牛胚 Oct-4 之表現卻異於小鼠與人類者。牛胚的 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，且其表現並不限於內細胞群，在滋養層亦可見到 Oct-4 的表現（VanEijk *et al.*, 1999）。本研究從不同來源與不同發育階段的牛胚得到的 mRNA 經反轉錄成為 cDNA 後，經 DNA 序列比對後與 *Bos taurus* 的 Oct-4（*Pou5f1* 基因）mRNA 有相同之序列（Accession NM_174580）（表 3）。文獻指出，

表 2. 不同來源與不同階段牛胚基因之表現

Table 2. Expression of developmental important genes for *in vitro* produced, nuclear transferred and *in vivo* derived bovine embryos

Genes	Embryos	Developmental stage of bovine embryo					
		2-cell	4-cell	8-cell	>8-cell	Morula	Blastocyst
A2M	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	+
	IVP	—	—	—	—	—	—
	SCNT	+	—	—	—	—	—
β -actin	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	+
	IVP	+	+	+	+	+	+
	SCNT	+	+	+	+	+	+
Cx43	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	—	—
	IVP	—	—	—	—	—	—
	SCNT	—	—	—	—	—	—
Cu/Zn SOD	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	—	—
	IVP	—	—	—	—	—	—
	SCNT	—	—	—	—	—	—
Dg1	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	—	—
	IVP	—	—	—	—	—	—
	SCNT	—	—	—	—	—	—
E-cad	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	+
	IVP	+	+	+	+	+	+
	SCNT	+	+	+	+	+	+
FMO	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	+
	IVP	—	—	—	—	—	—
	SCNT	+	+	—	—	—	—
GAPDH	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	+
	IVP	+	+	+	+	+	+
	SCNT	+	+	+	+	+	+
Glut-1	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	+
	IVP	—	—	—	—	—	—
	SCNT	—	—	—	—	—	—
GS	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	+
	IVP	+	+	+	+	+	+
	SCNT	+	+	+	+	+	+
Hsp	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	+
	IVP	+	+	+	+	+	+
	SCNT	+	+	+	+	+	+
IGF-I	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	—	—
	IVP	—	—	—	—	—	—
	SCNT	—	—	—	—	—	—
IGF-I receptor	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	—
	IVP	+	+	+	+	—	—
	SCNT	+	+	+	+	+	—
IF- τ	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	—	—
	IVP	—	—	—	—	—	—
	SCNT	—	—	—	—	—	—
Mn SOD	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	—	—
	IVP	—	—	—	—	—	—
	SCNT	—	—	—	—	—	—
OCT-4	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	+
	IVP	+	+	+	+	+	+
	SCNT	+	+	+	+	+	+
Plako	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	+
	IVP	+	+	+	+	+	+
	SCNT	+	+	+	+	+	+
Poly A	<i>In vivo</i>	nd	nd	nd	nd	+	+
	IVP	+	+	+	+	+	+
	SCNT	+	+	+	+	+	+

+: gene expression detected; —: not detected; nd: not determined.

牛胚發育的前十天均可見到 Oct-4 的表現 (Ponsuksili *et al.*, 2002; VanEijk *et al.*, 1999)，而本研究的結果顯示供試的 IVP 牛胚與 SCNT 牛胚，在二細胞期到囊胚期的階段，以及採集之桑椹期與囊胚期之體內牛胚，均確有 Oct-4 (*Pou5f1*) 的表現。

表 3. 5 種牛胚發育的重要基因經選殖與 DNA 序列分析後進行 BLAST 的結果

Table 3. Results of BLAST search of five developmental important genes of bovine embryos

Genes	DNA homology	Accession no.
β -actin	β -Actin	NM-174580
E-cad	<i>Bos taurus</i> e-cadherin (CDH1) mRNA	AY508164
Glucose transporter 1	<i>Bos taurus</i> glucose transporter type I (GLUT-1) mRNA	BOVGLUTI
IGF-I receptor	<i>Bos Taurus</i> mRNA for insulin-like growth factor-I receptor, beta-subunit	BTIGFIB
OCT-4	<i>Bos taurus Oct-4</i>	NM-174580

IF- τ 、IGF-I 及其受體 IGF-Ir 等基因是細胞訊息傳遞系統因子。IF- τ 是牛囊胚之滋養葉的主要產物，可將胚存在於子宮內的訊號傳達給母體，以提供母體懷孕建立與否的辨識機制 (Ponsuksili *et al.*, 2002)。文獻指出，IVP 牛胚發育達囊胚期至孵化期可檢出 IF- τ 基因之表現，囊胚期之前的胚未能檢測到該基因的表現 (Hernandez-Ledezma *et al.*, 1992)。本研究在不同來源牛胚之各個胚期樣本中均未檢出 IF- τ 的表現，可能是基因表現量太低或其他因素尚有待進一步的確認。IGF-I 基因及其受體 IGF-Ir 基因對於著床前胚之發育扮演重要的角色，IGF-I 是著床前哺乳動物胚面臨緊迫時的重要存活因子，例如將牛胚曝露於溫度升高等緊迫培養條件下，IGF-I 具有保護胚葉細胞，減少細胞凋亡並改善發育至囊胚的比例 (Jousan and Hansen, 2004)。本研究分析的不同來源與不同發育階段的供試牛胚，均未見 IGF-I 基因的表現。此結果與 Ponsuksili *et al.* (2002) 與 Niemann *et al.* (2002) 的結果類似，氏等在未成熟的牛卵母細胞及利用不同培養系統所生產孵化前各階段的牛胚均未測得 IGF-I 基因的表現。而 IGF-Ir 基因的表現除了囊胚期的體內發育胚、桑椹期與囊胚期的 IVP 牛胚及囊胚期的 SCNT 牛胚外，其他不同來源的各期別牛胚均有表現。其 DNA 序列經比對與 Accession No. BTIGFIB 相似 (表 3)。而其他的研究卻顯示，體外培養在牛胚或小鼠胚於囊胚期的各發育階段均可見 IGF-I 及其受體基因的表現 (Lonergan *et al.*, 2000; Lighten *et al.*, 1997; Doherty *et al.*, 1994)，顯示在不同哺乳動物或個體間，IGF-I 基因的啟動機制具有差異性 (Ponsuksili *et al.*, 2002)，而體外培養的條件與環境也可能影響胚之 IGF-I 基因的表現 (Lonergan *et al.*, 2000)。

Glut-1、GS、MnSOD 與 FMO 等基因的表現可能與胚代謝作用的酵素有關 (Lequarre *et al.*, 2001)。本研究在活體桑椹期與囊胚期的牛胚中測得 Glut-1 基因之表現，經 DNA 序列分析與比對後與 Accession No. BOVGLUTI 的 *Bos taurus* Glut-1 的 mRNA 具相似性 (表 3)。本試驗在 SCNT 與 IVP 的牛胚未測得該基因的表現，與其他文獻之結果不同，此將待進一步以敏感之即時-PCR (real-time PCR) 進行檢測。本實驗結果發現 GS 基因在所有不同來源、不同發育階段的牛胚均有表現 (表 2)。Glutamine synthetase 在著床前胚的生長過程，是屬於去除毒性物質機制的重要酵素成員，在去除有毒毒離氨、將神經遞質 (neurotransmitter) 及促毒作用 (excitotoxic) 的 glutamate 轉換成 glutamine 時扮演重要的角色。該酵素的表現證明了胺基酸的高度活性及能量代謝作用的進行。在體外培養的環境下，胚若曝露於高氧或光照的培養條件、培養基中含有重金屬或胚的代謝失衡，將因反應氧的產生而製造不利於胚發育的過氧化物 (Johnson and Nast-Esfahani, 1994)。MnSOD 的功能是做為抗

氧化劑，胚表現該酵素有助於將氧化自由基轉換成無害的中間產物 (Lequarre *et al.*, 2001)。Harvey *et al.* (1995) 指出，體內或體外培養的著床前不同發育階段的小鼠胚均可以檢出 MnSOD 基因之表現，但在著床前不同發育階段的牛胚則測不到該酵素的表現。然而，Lequarre *et al.* (1997) 利用 RT-PCR 檢測牛的卵母細胞、著床前不同階段的 IVP 胚與體內胚，均檢出 MnSOD 基因的表現。本研究分析的牛胚完全測不到 MnSOD 基因的表現與 Harvey *et al.* (1995) 的結果相似。Dolphin *et al.* (1996) 利用定量性 RNase 保護分析法，研究 FMO 家族中 FMO 1、FMO3 與 FMO4 基因在胎兒及成人之組織中表現。結果發現 FMO1 僅表現在成人的腎臟而不表現在肝臟，而胎兒之肝與腎則均有 FMO1 表現。人類肝臟中缺乏 FMO1 的表現，與豬或兔等動物明顯不同，因為 FMO1 是該等動物成熟後肝臟組織主要的酵素型式。FMO3 在成人的肝臟中含量相當豐富，在胎兒的含量則較少。因此，推測 FMO 的表現受到發育及組織特異性的調控，造成表現型式的轉換。而該酵素之作用與去除毒性的能力及敏感性有關 (Hines *et al.*, 1994)。本研究分析 FMO 基因的表現，僅在活體牛胚及 2-4 細胞期的 SCNT 胚中檢出 (表 2)。

A2M 基因的產物 α -2 macroglobulin 是一種大分子胞漿糖蛋白，作為許多蛋白分解酶的抑制劑，屬於細胞內的蛋白質清理系統 (Lorent *et al.*, 1995)。在小鼠 17 天之前的胚，A2M 基因的表現量會逐漸增加 (Lorent *et al.*, 1995)。本研究分析的結果，僅在活體牛胚及 2 細胞期 SCNT 胚中檢出 A2M 基因的表現。

與正常的體內牛胚比較，IVP 或 SCNT 牛胚容易發生胚早期死亡、巨仔症及產仔損失等問題。咸信這種異常現象和體外生產與核轉置牛胚之基因表現有關係 (Niemann and Wrenzycki, 2000; Niemann *et al.*, 2002)。Cx43 基因表現與胚的緊實化 (compaction)、囊胚腔形成 (cavitation) 及間隙連結 (gap junction) 有關。文獻指出，體內發育的牛囊胚可以偵測到 Cx43 的持續表現。然而，本研究分析的牛胚樣本均未檢出 Cx43 基因的表現。此外，在所有的胚樣中，Plako 與 Dgl 這兩種參與胚細胞間連接的胞橋小體糖蛋白 (desmosomal glycoprotein) 的基因表現分析結果，顯示在不同來源與不同發育階段的牛胚 Plako 基因皆有表現，但 Dgl 基因之表現則均未檢出 (表 2)。而在所有胚樣均檢出的 E-cad 的表現，經過序列分析後與 Accession No. AY508164 相似 (表 3)。

造成體內胚、IVP 及 SCNT 牛胚基因表現差異的因素甚多，包括不同的培養條件、培養基中的添加物及操作方法等 (Rief *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2003)。而生產 SCNT 牛胚時不同的操作順序、激活處理、使用的供核細胞種類、來源及繼代數目等，是造成 SCNT 牛胚基因的表現異於 IVP 胚或體內胚，且影響生產效率及異常現象的重要因素 (Wrenzycki *et al.*, 2001)。Wrenzycki *et al.* (2001) 分析以組織培養液-199 (TCM-199) 或合成輸卵管液 (synthetic oviduct fluid, SOF) 生產的 IVP 牛胚中 Cx43、Glut-1、PolyA、Desmocollin II (DC II)、DC III、Hsp、IF- τ 、Plako、E-cad 及 Zonula occludens-1 (ZO-1) 等十種與牛胚緊實化、囊胚腔形成、胚代謝、RNA 合成與抗緊迫有關的基因表現，結果發現利用 SOF 培養系統生產的牛囊胚除了 Plako 與 IF- τ 外，其餘基因之表現量與體內胚相近，特別在桑椹期胚階段。顯示 SOF 培養系統較 TCM-199 系統更適合牛胚培養。而兩種培養系統中添加血清或巨分子化合物 polyvinyl alcohol (PVA) 對 10 種測定基因的表現量僅有些微之影響 (Niemann *et al.*, 2002; Wrenzycki *et al.*, 2001)。Yaseen *et al.* (2001) 比較添加發情期母牛血清的 TCM-199 與添加 PVA 的 SOF 系統對於各種 IGF 因子家族 mRNA 表現的影響，結果在未成熟的卵母細胞及發育到已孵化的牛囊胚期均未測得 IGF 的表現，其他 IGF 的表現量與時間則因不同之培養系統而異。TCM-199 系統生產的囊胚 IGF- II 顯著高於 SOF 者。

Wrenzycki *et al.* (1999) 利用 TCM-199 為基礎培養系統，添加血清或巨分子化合物 polyvinyl alcohol (PVA) 進行 IVP 牛胚的培養。結果添加血清培養的牛胚 Cx43、Glut-1、PolyA、DC II、DC III、Hsp 及 IF- τ 等基因之表現量顯著升高。且 Cx43 之表現在 8-16 細胞期後消失，發育到孵化囊胚時又再度出現；而添加 PVA 培養的牛胚在不同胚期均檢出 Cx43 的表現。參與細胞間連接的 Plako 表

現則無差異，且 Dg1 與 DC I 在所有胚期均未測出基因的表現。而 Hsp 與 PolyA 在著床前牛胚均持續的表現。

SCNT 胚的生產除了受到體外培養條件的影響外，更取決於供核細胞之基因組能否正確啟動。SCNT 牛胚中 actin、basic fibroblastic growth factor (bFGF)、IGF-I、IGF-II、IGF-Ir、transforming growth factor α (TGF α)、lactate dehydrogenase (LDH)、phosphofructokinase (PFK)、citrate synthase (CS)、TEC-antigen (TEC)、Oct-4、FGF2、FGF4、FGF2r、glycoprotein 130 (gp130) 及 interleukin-6 (IL6) 等 16 種基因的表現型式曾被學者分析。結果 Oct-4、IL6 FGF2、FGF4、FGF2r 與 gp130 等 6 種與發育有關的重要基因在 SCNT、體內及 IVP 牛胚的表現有差異。著床前各發育階段的 IVP 或 SCNT 牛胚之 Oct-4、FGF2 與 gp130 的表現型式相同。而部分 SCNT 的桑椹期或囊胚期牛胚則發現 IL6、FGF4 與 FGF2r 的表現異常。由於此 3 種基因對於胚早期著床後的發育扮演著重要角色，因此推測此與 SCNT 牛胚之存活率下降有關係 (Daniel *et al.*, 2000)。特別是體內胚可以檢出 FGF-4 基因之表現，而在 SCNT 胚卻否；因此 FGF-4 基因或可做為評估 SCNT 牛胚品質的分子標記 (Daniel *et al.*, 2000)。

供核體細胞不同的繼代次數對於 SCNT 胚的基因表現會有所影響，Kasinathan *et al.* (2001) 指出，使用繼代 5 至 6 代的 G0 或 G1 期供核細胞，比繼代 8 代者容易導致 DNA 甲基化轉移酶 I (DNA methyltransferase I, DNMTI)、Mash 2 及 IF- τ 等基因表現的明顯改變。而以不同來源的體細胞做為供核細胞的研究，也顯示利用成熟牛隻成纖維細胞做為供核源，在懷孕末期的流產及胎兒異常明顯高於使用胎兒成纖維細胞做為供核細胞者 (Hill *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2000)。

在分析牛胚的基因表現時，有學者考慮到不同胚之間或單一胚內的胚葉細胞是否也會有基因表現量的變化 (Lequarre *et al.*, 1997)。Niemann *et al.* (2002) 分析結果發現個別胚之間相同基因的表現型式相當一致。也有學者推論，個別牛胚間基因表現若有差異，可能與卵母細胞來源及其處理方法有關係 (Watson *et al.*, 1999)。為了進一步有效的研究基因表現的型式，開發敏感性與重複性高的微晶片 (microarray)，以同時分析單一牛囊胚內數目眾多的基因表現。Ushizawa *et al.* (2004) 應用建構之子宮胎盤 cDNA 庫建立的微晶片，分析受精後第 7、14、21 天的牛胚、第 28 天胚之外膜與胎兒的基因表現，分析了共 1,773 個基因，同時亦發現部分新的候選基因或了解已知基因的全新功能。目前，有關牛基因組序列的資料遠不及實驗動物，故可先行應用其他實驗動物建立的 cDNA 庫來測試 DNA 的雜合性，如此可加速牛胚基因表現的研究進程。

本試驗取自不同來源的牛胚樣品，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 之後反轉錄成為 cDNA，供基因的表現分析之用且建立了分析之方法。本試驗中部分的基因經過分析後其表現型式與相關文獻的結果有差異，例如 FMO、A2M 與 Cx43 等，推測可能的原因為牛胚樣品的數量及利用傳統 PCR 的敏感度不足所致。若可應用更敏感精確的即時 PCR 進一步分析牛胚之重要基因表現。以提升檢測之準確性 (Steuerwarl *et al.*, 1999)，同時將分析的基因數目擴大並涵蓋具有開發成為分子標記的基因，將有助於對牛胚發育全能性之了解。而本實驗結果顯示，利用 RT-PCR 進行早期牛胚基因表現是可行的技術，也顯示未來開發牛胚分子檢測標幟以判定牛胚發育潛力的可行性。

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。

- Daniels, R., V. Hall and A. O. Trounson. 2000. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulose cell nuclei. *Biol. Reprod.* 63 : 1034~1040.
- Doherty, A. S., G. L. Temeles and R. M. Schulz. 1994. Temporal pattern of IGF-I expression during mouse preimplantation embryogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 37 : 21~26.
- Dolphin, C. T., T. E. Cullingford, E. A. Shephard, R. L. Smith and I. R. Philips. 1996. Differential developmental and tissue-specific regulation of expression of the genes encoding three members of the flavin-containing monooxygenase family of man, FAO1, FMO3 and FMO4. *Eur. J. Biochem.* 235 : 683~689.
- Harvey, M. B., M. Y. Arcellana-Panlilio, X. Zahang, G. A. Schultz and A. J. Watson. 1995. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biol. Reprod.* 53 : 532~540.
- Hernandez-Ledezma, J. J., J. D. Sikes, C. N. Murphy, A. J. Watson, G. A. Schultz and R. M. Roberts. 1992. Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by *in vitro* techniques. *Biol. Reprod.* 47 : 374~380.
- 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.
- Hill, J. R., Q. A. Winger, C. R. Long, C. R. Looney, J. A. Thompson and M. E. Westhusin. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.* 62 : 1135~1140.
- Hines, R. N., J. R. Cashman, R. M. Philpot, D. E. Williams and D. M. Ziegler. 1994. The mammalian flavin-containing monooxygenases: molecular characterization and regulation of expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 125 : 1~6.
- Johnson, M. H. and M. H. Nast-Esfahani. 1994. Radical solutions and culture problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioassays* 16 : 31~38.
- Jousan, F. D. and P. J. Hansen. 2004. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol. Reprod.* 71 : 1665~1670.
- Kasinathan, P., J. G. Knott, P. N. Moreira, A. S. Burnside, D. J. Jerry and J. M. Robl. 2001. Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. *Biol. Reprod.* 64 : 1487~1493.
- Kato, Y., T. Tani and Y. Tsunoda. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fertil.* 120 : 231~237.
- 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.
- Lequarre, A. S., B. Grisart, B. Moreau, N. Schuurbiers, A. Massip and F. Dessy. 1997. Glucose metabolism during bovine preimplantation development: analysis of gene expression in single oocytes and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 48 : 216~223.
- Lequarre, A. S., J. M. Feugang, O. Malhomme, I. Donnary, A. Massip, F. Dessy, A. Van Langendonck, N. Schuurbiers, A. Massip and F. Dessy. 2001. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of *in vitro* culture. *Mol. Reprod. Dev.* 58 : 45~53.

- Lighten, A. D., K. Hardy, R. M. L. Winston and G. E. Moore. 1997. Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptor in human preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 47 : 134~139.
- Loneragan, P., A. Gutierrez-Adan, B. Pintado, T. Fair, F. Ward and J. De la Fuente. 2000. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-1 growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 57 : 146~152.
- Lorent, K., L. Overberge, D. Moechars, B. De Strooper, F. van Leuven and H. van den Berghe. 1995. Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor associated protein. *Neuroscience* 65 : 1009~1025.
- 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.
- 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. Prelle. 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.
- 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.
- Ushizawa, K., C. B. Herath, K. Kaneyama, S. Shiojima, A. Hirasawa, T. Takahashi, K. Imai, K. Ochiai, T. Tokunaga, Y. Tsunoda, G. Tsujimoto and K. Hashizume. 2004. cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2 : 77.

- VanEijk, 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.
- Watson, A. J., M. E. Westhusin, P. A. De Sousa, D. H. Betts and L. C. Barcroft. 1999. Gene expression regulating blastocyst formation. *Theriogenology* 51 : 117~133.
- 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. Schnieke, 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.
- Yaseen, M. A., C. Wrenzycki, D. Herrmann, J. W. Carnwath and H. Niemann. 2001. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different *in vitro* systems. *Reproduction* 122 : 601~10.
- Young, L. E., K. D. Sinclair and I. Wilmut. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* 3 : 155~163.

Gene expression of *in vivo*, *in vitro* produced and somatic cell nuclear transferred bovine embryos ⁽¹⁾

Jen-Wen Shiau ⁽²⁾, Lee-Ching Tsai ⁽²⁾, Feng-Hsiang Chu ⁽²⁾, Jui-Jane Liu ⁽²⁾, Jenn-Fa Liou ⁽²⁾, San-Nan Lee ⁽³⁾ and Lih-Ren Chen ^{(2) (4)}

Received : June 10, 2005 ; Accepted : July 12, 2005

Abstract

The purpose of this study was to compare the gene expression patterns for *in vitro* produced (IVP), nuclear transferred and *in vivo* derived embryos at specific developmental stages. The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to analyze the gene expression. In order to further identify these genes, the PCR products of five genes were subcloned and their DNA sequences were determined. Messenger RNA was isolated from bovine embryos produced by IVP, SCNT and *in vivo* at 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula, and blastocyst stages. The cDNA was obtained by RT-PCR and used for gene expression analysis by PCR. Results showed that the gene expression of β -actin, GAPDH, Oct-4, GS, Hsp, Plako, and PolyA were observed in all embryos inspected. The expression of A2M, FMO, Glut-1 or IGF-Ir genes was specific to different embryos sources and developmental stages. The expression of Cx43, Cu/Zn SOD, Dg1, E-cad, IGF-I, IF- τ and Mn SOD were not detected in all embryos. These results and methods used in this study demonstrated the expression profile of the important genes involved in bovine embryo development.

Key words : Bovine embryo, Gene expression, Somatic cell nuclear transfer.

(1) Contribution No.1288 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, E-mail : lrchen@mail.tlri.gov.tw