

蘭嶼豬 *Oct-4* 基因啟動子區域的選殖與 DNA 序列分析⁽¹⁾

蕭振文⁽²⁾ 蔡麗卿⁽²⁾ 劉瑞珍⁽²⁾ 劉振發⁽²⁾ 戴謙⁽³⁾
陳立人⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：95 年 2 月 22 日；接受日期：95 年 5 月 10 日

摘要

本研究目的在選殖蘭嶼豬 (*Sus barbatus*) 的 *Oct-4* 基因上游啟動子區並完成 DNA 序列分析，供後續載體構築與幹細胞分化多能性研究之用。試驗自蘭嶼豬頸靜脈採集全血，離心分離白血球並萃取基因組 DNA 做為聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 的模板，再設計擴增 *Oct-4* 基因啟動子區域的引子進行 PCR。試驗結果顯示，PCR 後獲得單一條 3.1 kb 的複製片段，該條 PCR 產物經膠體回收後，選殖入 pGEM-T Easy 載體，並進行 DNA 序列分析與 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比對。結果顯示蘭嶼豬的 *Oct-4* 啟動子與 NCBI 資料庫的小鼠與人類比對，相似度分別為 53% 與 57%，啟動子區域內部分的高 GC 組成區則具有高度相似的保留性。本試驗選殖的蘭嶼豬 *Oct-4* 基因啟動子，配合報導基因表現，將可發展成為監控或測試幹細胞分化多能性的重要檢測標記。

關鍵詞：胚幹細胞、*Oct-4* 基因、豬、啟動子。

緒言

Octamer-binding transcription factor-4 (*Oct-4*) 是屬於 POU (Pit、Oct、Unc) 轉錄因子的家族成員，為調控哺乳動物胚早期發育之重要轉錄調節因子之一。在小鼠，*Oct-4* 是 *Pou5f1* 基因的產物，其功能為結合下游基因的啟動子或調節區域內編碼為 ATGCAAAT 的 8 個核苷酸序列而發揮調控標的基因表現的作用 (Herr and Cleary, 1995)。*Oct-4* 只表現在具有分化多能性 (pluripotent) 的細胞、生殖細胞 (Nichols *et al.*, 1998)、體外培養的幹細胞與胚腫瘤細胞等 (Tanaka *et al.*, 2002; Niwa *et al.*,

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1318 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 國科會南部科學園區管理局。

(4) 通訊作者，E-mail: Irchen@mail.tlri.gov.tw。

2000)，參與分化多能性細胞之最初形成、自我更新 (self renewal) 並維持細胞的分化多能特性，故與幹細胞的生長與分化調控具有密切關係。由於 *Oct-4* 基因不表現於 *in vivo* 或 *in vitro* 任何已分化的成體細胞。因此，分析 *Oct-4* 基因的表現，即可判定哺乳動物胚或胚幹細胞是否具有分化多能性的潛力。

利用體細胞核轉置 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 技術產製的小鼠胚雖然可以發育至囊胚期，但有大量的囊胚在著床後停止發育。此種異常，似與 SCNT 鼠胚無法順利啟動 *Oct-4* 等基因，導致具有分化多能性的胚細胞無法順利發育。Bortvin *et al.* (2003) 確認了 10 種與 *Oct-4* 具有相關的基因，並分別分析應用卵丘細胞或胚幹細胞做為供核源產製的 SCNT 鼠胚中 *Oct-4* 與相關基因的表現型式。結果發現以卵丘細胞做為供核源所產製的鼠胚中，僅 62% 其 *Oct-4* 及相關基因的表現正常。而利用胚幹細胞做為供核源所生產的 SCNT 囊胚，*Oct-4* 及相關基因的表現完全正常。因此，*Oct-4* 及相關基因能否正確的啟動，與 SCNT 胚的早期致死、胚移置後能否正常懷孕及分娩具有高度相關性 (Bortvin *et al.*, 2003)。

目前，已知參與胚幹細胞分化調控的重要因子，包括有 *Oct-4*、*Sox 2*、*Nanog* 與 *Stat 3* (Boiani and Scholer, 2005; Chambers, 2004) 等各種轉錄因子。*Oct-4* 為調節早期胚之細胞所必需，只表現在內細胞群且對於滋養葉 (trophoblast) 具有抑制的調控作用 (down regulation)。本研究的目的是在選殖豬的 *Oct-4* 基因啟動子區域並進行 DNA 序列分析，供後續 *Oct-4* 在胚幹細胞表現調控與幹細胞分化功能性研究之用。

材料與方法

I. *Oct-4* 基因啟動子之選殖

- (i) 蘭嶼豬血液樣品之收集與基因組 DNA 純化萃取：自蘭嶼豬之頸靜脈採集全血，置入已添加抗凝血劑之離心管後，經 1,000 rpm 離心後，分離白血球，再利用基因組 DNA 純化套組 (Qiuiagen, GmbH) 並依照操作步驟進行基因組 DNA 之萃取純化與定量。
- (ii) 選殖 *Oct-4* 基因啟動子區域之引子設計：參考 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 內核酸資料庫中有關 *Oct-4* 基因啟動子的相似序列，設計引子並進行聚合酶連鎖反應，以便複製出蘭嶼豬 *Oct-4* 基因啟動子區域。引子序列為 sense primer : 5'-GGATCCCTAGCCTGGAAAC-3', antisense primer : 5'-GGATCAAGCTCGATGGACT-3'。
- (iii) PCR 及電泳：使用純化之蘭嶼豬基因組 DNA 為模板進行 PCR。PCR 反應液含有 10 μ M 的 sense 與 anti-sense 引子各 1 μ l、*Taq* DNA 聚合酶 (Roche, Germany) 0.5 μ l (5 U/ μ l)、10 \times PCR buffer 3 μ l、2.5 mM dNTP 0.6 μ l 及 2dH₂O 22.9 μ l，PCR 反應總體積為 30 μ l。PCR 條件為 denaturation 94°C 2 min，10 次循環的 94°C 15 sec、60°C 30 sec、72°C 2 min。接著為 20 次循環的 94°C 15 sec、60°C 30 sec、72°C 2 min，最後為 72°C 5 min extension；反應後維持於 4°C。PCR 後取 10 μ l 的產物並添加 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 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紀錄結果。

- (iv) DNA 片段回收與選殖：將長度為 3.1 kb 的單一核苷酸產物自膠體切下，再利用回收套組 (Qiagen, GmbH) 並依據其方法回收 DNA 片段。回收的 DNA 片段利用 pGEMN-T Esay Vector system II (Promega, USA) 套組，將 PCR 產物選殖入 pGEMN-T Esay Vector system II 的多選殖位置 (multiple cloning site, MCS)，再轉型入勝任細胞 (competent cells) *E. coli* 內，供進行 DNA 序列分析之用。
- (v) DNA 序列分析與比對：選殖之 PCR 產物利用 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。序列分析之引子乃應用載體 pGEM-T Esay Vector system II 上專供序列分析之 T7 及 SP6 序列進行。完成 DNA 序列分析的資料利用 Vector NTI (Infor Max Inc., USA) 連接到 NCBI 進行 DNA 序列之 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 比對，以了解基因啟動子區域的正確性與比較網路資料庫中的相似基因序列。

結果與討論

本研究主要目的在選殖蘭嶼豬的 *Oct-4* 啟動子並完成 DNA 序列分析，供進行後續基因構築與幹細胞分析測試之用。試驗自蘭嶼豬之頸靜脈採集全血後，分離白血球並純化基因組 DNA 做為模板，之後設計選殖 *Oct-4* 基因啟動子區域的引子進行 PCR。試驗結果顯示，PCR 後獲得單一條 3.1 kb 的特異產物 (圖 1)。該 PCR 產物經回收後選殖入 pGEM-T Easy 載體中的選殖位置 (圖 2)。經過 DNA 序列分析與 BLAST 比對，結果確定為蘭嶼豬的 *Oct-4* 基因啟動子調控序列。蘭嶼豬的 *Oct-4* 啟動子與 NCBI 資料庫的小鼠 (MMU297528) 與人類 (HSA297527) 比對，相似度分別為 53% 與 57%，啟動子區域內部分的高 GC 組成區則具有極高的相似性 (圖 3)。故確定為豬的 *Oct-4* 基因啟動子序列。

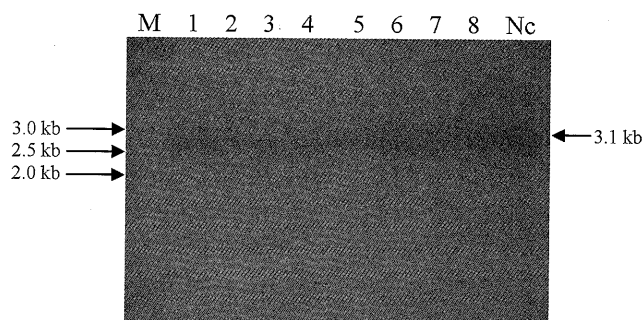


圖 1. 利用蘭嶼豬 (1-8 行) 的基因組 DNA 做為模板，配合選殖豬 *Oct-4* 基因啟動子的引子進行 PCR 擴增後的產物電泳圖。Nc 為負對照，M: 1 kb 標記。

Fig. 1. The PCR products amplified from Lanyu pigs genomic DNA (lane 1-8) with a pair of *Oct-4* promoter specific primers. Lane Nc: negative control. Lane M: 1 kb ladder marker.

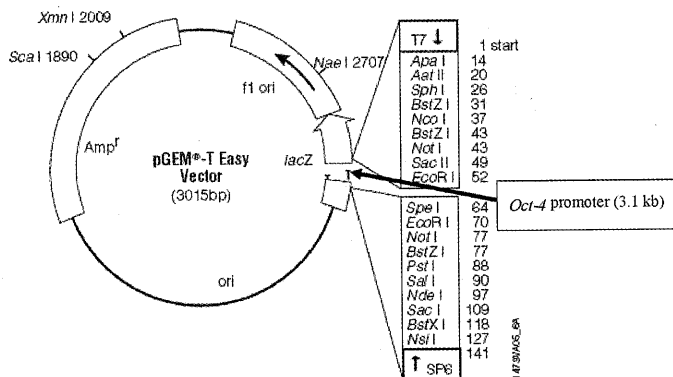


圖 2. 供選殖蘭嶼豬 *Oct-4* 基因啟動子的 pGEM T Easy 載體以進行 DNA 的序列分析。

Fig. 2. Map of the pGEM T Easy vector for subcloning and sequencing of Lanyu pigs *Oct-4* promoter.

Oct-4 是屬於 POU 家族的成員，是調控動物胚早期發育的重要調節轉錄因子。許多動物的 *Oct-4* 基因已經被選殖並進行研究。牛的 *Oct-4* (*Pou5f1* 基因) 已經被選殖、建立基因圖譜並進行發育過程的表現分析 (van Eijk *et al.*, 1999)。牛的未成熟卵母細胞、體外生產或 SCNT 的著床前牛胚，均可以見到 *Oct-4* 基因的表現 (蕭等, 2004 ; 蕭等, 2005)。比較牛、人類及與小鼠的 *Oct-4* 基因，可見在基因結構及基因組 DNA 的序列具有高度的相似性高，且在蛋白質層次的相似性分別達 90.6% 及 81.7% (Scholer *et al.*, 1989 ; Wang and Schultz, 1996)。而人類與小鼠的 *Oct-4* 蛋白質相似性達 87% (Takeda *et al.*, 1992)。推測小鼠、人與牛的 *Oct-4* 基因具有相似之功能與角色。牛的 *Oct-4* 基因啟動子接上螢光素酶報導基因後轉染小鼠的 P19 胚瘤類胚幹細胞株能夠有效的表現，證實牛的 *Oct-4* 啟動子能在小鼠類胚幹細胞中正常運用 (van Eijk *et al.*, 1999)。

受精後著床前的牛囊胚內細胞群 (inner cell mass, ICM) 及滋養層細胞 (trophoblast cells) 均顯現 *Oct-4* 的表現 (van Eijk *et al.*, 1999)。在小鼠胚，*Oct-4* 的表現最早出現在 4~8 細胞的胚，而後在桑椹胚及囊胚期之內細胞群見到 *Oct-4* 的強烈表現。著床後，*Oct-4* 僅表現於外胚層 (epiblast)。到了原腸期，*Oct-4* 僅表現在在始基生殖細胞中 (Palmieri *et al.*, 1994; Boiani *et al.*, 2002)。而在 2-4 細胞期的小鼠胚並未測得 *Oct-4* 的表現，此應是牛胚與鼠胚間表現時間的極大差異處。*Oct-4* 基因結構、序列與其在染色體的位置具有高度保留性。小鼠的 *Oct-4* 基因由 5 個外顯子 (exon) 所組成，在染色體上位於主要組織相容複合體 (major histocompatibility complex, MHC) 的區域 (Takeda *et al.*, 1992; Abdel-Rahman *et al.*, 1995; van Eijk *et al.*, 1999)。人、小鼠與牛的 *Oct-4* 分別位於第 6 對 (Takeda *et al.*, 1992; Krishnan *et al.*, 1995)、第 17 對 (Scholer *et al.*, 1990a, b; Yeom *et al.*, 1991)、第 23 對染色體的 MHC 區域 (van Eijk *et al.*, 1999)。小鼠與牛的 *Oct-4* 蛋白自外顯子 1 至 5 的胺基酸相似性分別為 71.0%、95.1%、95.4%、84.9% 與 82.8% (van Eijk *et al.*, 1999)。Kirchhof *et al.* (2000) 應用小鼠 *Oct-4* 基因啟動子構築含綠螢光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) 報導基因載體，顯微注入小鼠、牛與豬的體內胚或是體外胚，結果在擴張囊胚期可測得 *Oct-4* 同時表現在牛與豬胚的內細胞群與滋養層，而不似小鼠的 *Oct-4* 僅能表現於內細胞群。可見因為動物種別不同，*Oct-4* 在不同時期

Human (-1553)	<u>TGCTGGAGCTCCTTTAGCGTCTCTGAAGGGGATTCT</u> -GTGTGAGGGGAT	-1505
Mouse (-1065)	GGTGGAG-----AGCT-----G---GGGAAGTCTGTGTGAGGGGAT	-1032
Porcine (-1192)	<u>TGCTGGAGCTC--TTT</u> AGCTGCTCTGAAGGGGATTCT- GTGTGAGGGGAT	-1145
Human (-1504)	TGGGACTG-----GGGGGTGGGGAGCAGGAAGCA GTCCCCAGGGGAGCCA	-1459
Mouse (-1031)	TGGGGCTCAGGAGGGGGTTGGGGAGCAGGAAGTTGTCCCCAGGGGAGCCA	-982
Porcine (-1144)	TGGGGCTG-----GGGGGTGGGGGAGCAGGAAGCTGTCCCCAGGGGAGCCA	-1099
Human (-1458)	TCCAGGCCCATTCAGGGTTGAGCACTTGTTTAGGGTTAGAGCTGCCCC	-1409
Mouse (-981)	TCCTGGCCCATTCAGGGTTGAGT ACTTGTTTAGGGTTAGAGCTGCCCC	-933
Porcine (-1098)	TCCAGGCCCATTCAGGGTTGAGCACTTGTTTAGGGTTAGAGCTGCCCC	-1049
Human (-1408)	TCTGGGGACCGGGATTGTCCAGCCAAGGCCATTGTCCGTCCCCCTTCCCC	-1359
Mouse (-932)	TCTGGGGACCGAGATTGTCCAGCCAAGGCCATTGTCCGTCCCCCTTCCCC	-883
Porcine (-1048)	TCTGGGGACCGAGATTGTCCAGCCAAGGCCATTGTCCGGCCCCCTTCCCC	-999
Human (-1358)	CAGTCCCTCCCAGGCTTCTTTGAACCTGAAGTCAGATATTT--TT-TCTCC	-1311
Mouse (-882)	CAGTCCCTCCCAGGCCCTTTGAACCTGAAGTCAGATATTTCTTCTCTCT	-833
Porcine (-998)	CAGTCCCTCCCAGGCTTCTTTGAACCTGAAGTCAGATATTT--TTCTCTCC	-950
Human (-1310)	ACACCCCCACCCC---CTGGTTTCCCCACCCAGGGCCTAGGGCTGGAGG	-1263
Mouse (-832)	ACCCACCTCCCACCCGTTGGGTTTCTCCACCCAGGAAGTAGG--CTGGAAG	-784
Porcine (-949)	CCCCCCTTCCCTCC---TTGGCTTTCCTCCACCCAGGGCCTAGGGGTGGAGG	-902
Human (-1262)	CCTGGGCCAGGGAGGTGGGGGAGGGAGAACGGGGCCTACCGTGCTATTAG	-1213
Mouse (-783)	CTGGGATG-A GGAGGTGGGGGAGGGAGAACT GAGA---ATCTTGAGGAAAG	-737
Porcine (-901)	CCAGATT-G GGAGGTGGGGGAGGGAGAAC GTCA---ACTATGGGGCTAG	-855
Human (-184)	CCACCATTAGGCAAACATCCTTCGCCTCAGTTTCTCCC---CCCACCTCC	-138
Mouse (-172)	C-----AGGCAGATAGCGCTCGCCTCAGTTTCTCCA-CCCCACAGCT	-131
Porcine (-188)	CCAGCC---A-GCAAACACCTCCGCCTCAGTTTCTCCCACCCCCACCGAC	-139
Human (-137)	CTCTCTCCACCCATCCAGGGGGCGGGGCCAGAGGTCAAGGCTAGTGGGT	-88
Mouse (-130)	CTGT-----CCACCCACCCAGGGGGCGGGGCCAGAGGTCAAGGCTAGAGGT	-84
Porcine (-138)	CCCTCCCCACCCATCCAGGGGGCGGGGCCAGAGGTCAAGGCTAGTGGGT	-89
Human (-87)	GGGACTGGGGAGGGAGAGAGGGGGTTGAGTAGTCCCTTCGCA-AGCCCTCA	-39
Mouse (-83)	GGGATTGGGGAGGGAGAG-----GTGAAACCGTCCC-TAGGTAGCCGTCT	-39
Porcine (-88)	GGGATTGGGGAGGGAGAGAGGTGTCGAGCAGTCCCCTTGAGAGCCCTGG	-39
Human (-38)	TTTACCAAGCCCCCGGCTTGGGGCGCCCTTCTTCCCC	-1
Mouse (-38)	TTCCACCAAGCCCCCGGCTCGGGGTGCCACCTTCCCC	-1
Porcine (-38)	TTTACTGGGGCCCCCGGCTTGGGGCGCCCTTCTTCCCC	-1

圖 3. 人類、小鼠與蘭嶼豬部份 *Oct-4* 基因啟動子序列的 BLAST 比對。粗體字序列為推測為 Sp1/Sp3 轉錄因子結合位置。底線標示為重疊之賀爾蒙反應區 (hormone-responsive element, HRE) 結合位置。

Fig. 3. BLAST comparison of human, mouse and Lanyu pigs partial *Oct-4* promoter DNA sequences. The bolded type sequences were putative Sp1/Sp3 binding site. The underlined sequences were the overlapping hormone-responsive element (HRE) binding site.

胚的表現型式亦不同。此外，在核轉置恆河猴的擴張囊胚及胚幹細胞中可測得 *Oct-4* 的表現，獲得與人類 *Oct-4* 相似的 697 bp 片段 mRNA 產物，序列相似性達 98.6%，而在已分化的胚幹細胞或胎兒成纖維母細胞則未見 mRNA 的表現。核轉置恆河猴胚 *Oct-4* 的表現時間與小鼠相似 (Mitalipov *et al.*, 2003)。由於體細胞並不能表現 *Oct-4*，因此，測定核轉置胚 *Oct-4* 的表現與否，是研究及追蹤基因再程式化的重要基因標記，*Oct-4* 能順利表現，則顯示核轉置胚成功的基因再程式化。

Oct-4 基因的表現，是由 TATA-less 的啟動子所驅動 (Okazawa *et al.*, 1991)。啟動子區域，至少包含了近端加強子 (proximal enhancer, PE) 與遠端加強子 (distal enhancer, DE) (Yeom *et al.*, 1996)。*Oct-4* 基因的啟動子由轉錄起始點往上游算，自 -1 至 -250 區域為具有功能的最小啟動子區 (minimal promoter)，此區域內含有一群重疊的結合位置，可與各種轉錄或調控因子進行結合 (Pikarsky *et al.*, 1994; Schoorlemmer *et al.*, 1994; Sylvester and Scholer, 1994)。此區域內的核苷序列富含 GC 位置 (如圖 3 所示)，推測可能是轉錄因子 Sp1 與 Sp3 的結合區，結合後使啟動子產生功能 (Sylvester and Scholer, 1994; Pesce *et al.*, 1999)。此區域亦為賀爾蒙反應區 (HRE) (Sylvester and Scholer, 1994)。賀爾蒙反應區的排列是由三段類似 AGGTCA 序列 (如圖 3 所示) 所組成 (Ovitt and Scholer, 1998; Fuhrman *et al.*, 1999)。此三段序列可被類固醇—甲狀腺的受體所辨識，進而專一結合而使得 *Oct-4* 的表現下降 (Sylvester and Scholer, 1994; Barnea and Bergman, 2000)。利用 *Oct-4* 啟動子區域下游接入 *Lac Z* 報導基因，經由轉染細胞，可了解啟動子區內加強子如何影響調控 *Oct-4* 基因表現 (Yeom *et al.*, 1996)。在最小啟動子的上游 5-kb 區域是遠端加強子，主要作用是驅動桑椹胚、內細胞群及始基生殖細胞 (Primordial Germ Cells, PGCs) 中 *Oct-4* 的表現。而近側加強子的作用則是啟動外胚層 *Oct-4* 的表現 (Yeom *et al.*, 1996)。此種近端與遠端加強子的作用轉換，與尿囊膜中 PGCs 的分佈具有時間與空間的特異性相符合。遠端與近端加強子可分別驅動報導基因在胚幹細胞與胚細胞中的表現，顯示存在於細胞中的轉錄因子可以調控 *Oct-4* 啟動子，特異於不同細胞或發育過程中表現 (Yeom *et al.*, 1996)。在 *Oct-4* 基因的轉錄起始點上游 1.2 kb 是近側加強子，已知是視黃酸 (retinoic acid) 誘發所導致 *Oct-4* 表現下降的主因 (Okazawa *et al.*, 1991)。此兩種加強子的活性可以被區域的訊息及細胞內的特異因子所調控，是小鼠胚發育過程調控 *Oct-4* 表現的關鍵因素 (Nordhoff *et al.*, 2001)。比較小鼠及人 (Takeda *et al.*, 1992) 的 *Oct-4* 啟動子，顯示本試驗所選殖的蘭嶼豬 *Oct-4* 啟動子區與這些動物相似而具有高度的序列保留性，尤其是可能做為 Sp1/Sp3 及 HRE (van Eijk *et al.*, 1999) 的結合位置 (圖 3)。而研究 *Oct-4* 維持分化全能性的角色，可利用標的阻斷及標的剔除 (gene knock out) 小鼠，來干擾內源基因的作用而獲得了解 (Scholer *et al.*, 1989)。剔除 *Oct-4* 基因的體外培養小鼠胚，雖可發育成為類似囊胚之外觀，卻僅具有滋養層細胞而無法形成內細胞群，且在胚移置後無法著床。具有分化多能性的胚幹細胞應用視黃酸或其他誘發分化的藥劑處理，將導致 *Oct-4* 表現下降 (Minucci *et al.*, 1996)。

選殖蘭嶼豬 *Oct-4* 基因啟動子的主要目的，在於生物醫學的研究上，蘭嶼豬的生理、解剖及器官大小與人類較相近，故具有提供生物醫學、疫苗檢驗及藥物反應等用途。未來，若基因轉殖、幹細胞與 SCNT 技術更為成熟，利用豬做人類疾病研究與新療法研發模式，或為生物工廠生產人類組織移植療法極欠缺的組織與器官移植來源，將是重要的畜產生技研究方向。而本研究選殖的蘭嶼豬 *Oct-4* 基因啟動子調控區，未來將可利用該啟動子進一步選殖，連接 GFP 報導基因的構築體，進行幹細胞的基因轉殖與相關表現測試，開發可做為監控胚幹細胞分化多能性的重要基因標記。

參考文獻

- 蕭振文、蔡麗卿、陳裕信、曲鳳翔、楊鎮榮、李善男、陳立人。2004。 *Oct-4*基因於體外受精與體細胞核轉置牛胚之表現分析。畜產研究 37(4): 301-312。
- 蕭振文、蔡麗卿、曲鳳翔、劉瑞珍、劉振發、李善男、陳立人。2005。體內發育、不同方式生產的牛胚於不同發育階段之重要基因表現分析。畜產研究 38(3): 183-196。
- Abdel-Rahman, B., M. Fiddler, D. Rappolee and E. Pergament. 1995. Expression of transcription regulating genes in human preimplantation embryos. Hum. Reprod. 10: 2787-2792
- Barnea, E. and Y. Bergman. 2000. Synergy of SF-1 and RAR in activation of Oct-3/4 promoter. J. Biol. Chem. 275: 6608-6619.
- Boiani, M. and H. R. Scholer. 2005. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6: 872-884.
- Boiani, M., S. Eckardt, H. R. Scholer and K. J. McLaughlin. 2002. *Oct-4* distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. Genes Dev. 16: 1209-1219.
- Bortvin, A., K. Eggan, H. Skaletsky, H. Akutsu, D. L. Berry, R. Yanagimachi, D. C. Page and R. Jaenisch. 2003. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. Development. 130: 1673-1680.
- Chambers, I. 2004. The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. Cloning Stem Cells 6: 386-391.
- Fuhrmann, G., I. Sylvester and H. R. Scholer. 1999. Repression of *Oct-4* during embryonic cell differentiation correlates with the appearance of TRIF, a transiently induced DNA-binding factor. Cell Mol. Biol. 45: 717-724.
- Herr, W. and M. A. Cleary. 1995. The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. Genes Dev. 9: 1679-1693.
- Kirchhof, N., J. W. Carnwath, E. Lemme, K. Anastassiadis, H. Scholer and H. Niemann. 2000. Expression pattern of *Oct-4* in preimplantation embryos of different species. Biol. Reprod. 63: 1698-1705.
- Krishnan, B. R., I. Jamry and D. D. Chaplin. 1995. Feature mapping of the HLA class I region: localization of the POU5F1 and TCF19 genes. Genomics 30: 53-58.
- Minucci, S., V. Botquin, Y. I. Yeom, A. Dey, I. Sylvester, D. J. Z. and, K. Ohbo, K. Ozato and H. R. Scholer. 1996. Retinoic acid-mediated down-regulation of Oct-3/4 coincides with the loss of promoter occupancy *in vivo*. EMBO J. 15: 888-899.
- Mitalipov, S. M., H. C. Kuo, J. D. Hennebold and D. P. Wolf. 2003. *Oct-4* expression in pluripotent cells of the rhesus monkey. Biol. Reprod. 69: 1785-1792.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer and A. Smith. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor *Oct-4*. Cell 95: 379-391.
- 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.
- Nordhoff, V., K. Hubner, A. Bauer, I. Orlova, A. Malapetsa and H. R. Scholer. 2001. Comparative analysis of human, bovine, and murine *Oct-4* upstream promoter sequences. Mamm. Genome. 12: 309-317.

- Okazawa, H., K. Okamoto, F. Ishino, T. Ishino-Kaneko, S. Takeda, Y. Toyoda, M. Muramatsu and H. Hamada. 1991. The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *EMBO J.* 10: 2997-3005.
- Ohmura, M., S. Yoshida, Y. Ide, G. Nagamatsu, T. Suda and K. Ohbo. 2004. Spatial analysis of germ stem cell development in *Oct-4/EGFP* transgenic mice. *Arch. Histol. Cytol.* 67: 285-296.
- Ovitt, C. E. and H. R. Scholer. 1998. The molecular biology of *Oct-4* in the early mouse embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 1021-1031.
- Palmieri, S. L., W. Peter, H. Hess and H. R. Scholer. 1994. *Oct-4* transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev. Biol.* 166: 259-267.
- Pesce, M., K. Anastassiadis and H. R. Scholer. 1999. *Oct-4*: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs.* 165: 144-152.
- Pikarsky, E., H. Sharir, E. Ben-Shushan and Y. Bergman. 1994. Retinoic acid represses *Oct-3/4* gene expression through several retinoic acid responsive elements located in the promoter-enhancer region. *Mol. Cell Biol.* 14: 1026-1038.
- Scholer, H., A. K. Hatzopoulos, N. Suzuki and P. Gruss. 1989. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. *EMBO J.* 8: 2551-2557.
- Scholer, H. R., S. Ruppert, N. Suzuki, K. Chowdhury and P. Gruss. 1990a. New type of POU domain in germ line-specific protein *Oct-4*. *Nature* 344: 435-439.
- Scholer, H. R., G. R. Dressler, R. Balling, H. Rohdewohld and P. Gruss. 1990b. *Oct-4*: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J.* 9: 2185-2195.
- Schoorlemmer, J., A. van Puijenbroek, M. van Den Eijnden, L. Jonk, C. Pals and W. Kruijer. 1994. Characterization of a negative retinoic acid response element in the murine Oct4 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1122-1136.
- Sylvester, I. and H. R. Scholer. 1994. Regulation of the *Oct-4* gene by nuclear receptors. *Nucleic Acids Res.* 22: 901-911.
- Takeda, J., S. Seino and G. I. Bell. 1992. Human *Oct3* gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res.* 20: 4613-4620.
- Tanaka, T. S., T. Kunath, W. L. Kimber, S. A. Jaradat, C. A. Stagg, M. Usuda, T. Yokota, H. Niwa, J. Rossant and M. S. Ko. 2002. Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res.* 12: 1921-1928.
- van Eijk, M. J., M. A. van Rooijen, S. Modina, L. Scesi, G. Folkers, H. T. van Tol, M. M. Bevers, S. R. Fisher, H. A. Lewin, D. Rakacolli, C. Galli, C. de Vaureix, A. O. Trounson, C. L. Mummery and F. Gandolfi. 1999. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. *Biol. Reprod.* 60: 1093-1103.
- Wang, L. and G. A. Schultz. 1996. Expression of *Oct-4* during differentiation of murine F9 cells. *Biochem. Cell Biol.* 74: 579-584.
- Yeom, Y. I., H. S. Ha, R. Balling, H. R. Scholer and K. Artzt. 1991. Structure, expression and chromosomal location of the *Oct-4* gene. *Mech. Dev.* 35: 171-179.
- Yeom, Y. I., G. Fuhrmann, C. E. Ovitt, A. Brehm, K. Ohbo, M. Gross, K. Hubner and H. R. Scholer. 1996.

Germline regulatory element of *Oct-4* specific for the totipotent cycle of embryonal cells. Development 122: 881-894.

Cloning and sequencing of porcine *Oct-4* promoter in Lanyu pigs ⁽¹⁾

Jen-Wen Shiau ⁽²⁾, Lee-Ching Tsai ⁽²⁾, Jui-Jane Tailiu ⁽²⁾, Jenn-Fa Liou ⁽²⁾, Chein Tai ⁽³⁾ and Lih-Rèn Chen ⁽²⁾ ⁽⁴⁾

Received : Feb. 22, 2006 ; Accepted : May. 10, 2006

Abstract

The purpose of this study was to clone and sequence the promoter of *Oct-4* gene in Lanyu pigs (*Sus barbatus*). Blood samples were collected and the genomic DNA was purified and used as templates for polymerase chain reaction (PCR) with *Oct-4* promoter-specific primers. After PCR, a specific 3.1 kb PCR product was obtained. Following gel purification and subcloning into the pGEM-T Easy vector, DNA sequencing and Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) were performed for further comparison. The results indicated that the sequence of cloned porcine *Oct-4* promoter showed a similarity of 57% and 53% to the *Oct-4* promoter of human and mouse, respectively. Some conserved regions with high GC contents within the *Oct-4* promoter shared the highest similarities across species. The *Oct-4* promoter cloned in this study could be used as an important marker to detect and screen the pluripotency of embryonic stem cells.

Key words: Embryonic stem cell, *Oct-4* gene, Porcine, Promoter.

(1) Contribution No.1318 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

(3) Southern Taiwan Science Park Administration, National Science Council, Sinshih, Tainan 741, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, Email: lrchen@mail.tlri.gov.tw