

异源 Oct-4 基因启动子在猪、兔和小鼠 早期胚胎中的时空表达活性*

张颖¹⁾ 史芳瑜¹⁾ 高绍荣²⁾ 林爱星^{1)**}

(¹⁾中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; ²⁾北京生命科学研究所, 北京 102206)

摘要 Oct-4 是一种哺乳动物早期胚胎中特异表达的转录因子, 它与细胞多能性的维持有关。异源 Oct-4 基因在早期胚胎中的表达模式尚不明确。构建了一个以完整的牛 Oct-4 调控区指导 GFP 表达的转基因结构 pOct-4(p)-GFP, 通过单精子注射的方法将其导入猪、兔和小鼠的受精卵中, 分析其在胚胎发育过程中的表达情况。结果显示: 牛 Oct-4 启动子驱动的 GFP 基因在 3 个物种的 2-细胞胚胎就已经开始表达, 在囊胚期表达加强且只特异表达于内细胞团中, 而不表达于滋养层。研究表明: 牛的 Oct-4 启动子在其他物种中也具有表达活性, 异源性 Oct-4 启动子在不同物种的早期胚胎中具有相似的表达模式。

关键词 Oct-4, 早期胚胎, 猪, 兔, 小鼠

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00128

Oct-4(POU5f1)属于 POU 转录因子家族之一, 特异表达于哺乳动物的早期胚胎, 与胚胎的发育与分化有关, 在胚胎干细胞(ES)等的全能性维持和自我更新方面起着关键作用^[1]。

Oct-4 基因在胚胎中的表达模式研究主要集中在小鼠上, 在小鼠囊胚中, Oct-4 只在内细胞团(inner cell mass, ICM)中表达^[2]。胚胎着床后, Oct-4 表达逐渐停止, 并被限制在生殖系细胞(germ line cell)中, 在分化的成体细胞中没有表达^[3]。Oct-4 基因在合子形成后的激活时间也已被明确, Yeom 和 Palmieri 等研究得知, Oct-4 基因的表达在小鼠胚胎 8-细胞之前就被激活了^[2,4], 在整个桑葚胚阶段 Oct-4 的 mRNA 和编码蛋白, 在所有的卵裂球中都有十分丰富而且一致的表达^[5], 到了囊胚阶段, Oct-4 在滋养层(trophoblast, TE)中的表达被抑制, 只在内细胞团中有表达^[6~8]。

与小鼠相比, Oct-4 在猪、牛等大型牲畜中的研究相对较少, 在家兔等动物中的研究就更为罕见。目前有限的研究显示: 尽管小鼠和牛的 Oct-4 基因在序列上有高度的同源性^[9], 但是运用蛋白质印迹(Western blot)技术发现其在牛囊胚中的表达位置不只局限在内细胞团中, 滋养层中也有表达^[10]。对猪胚胎的研究结果与牛相似, 无论体外培养还是体内发育的囊胚, Oct-4 在内细胞团和滋养层中均

有表达^[11]。

有些与发育相关的基因在表达上存在着物种特异性, 异源 Oct-4 基因的表达模式是否与内源的有所不同呢? Kirchhof 等^[11]研究认为, 小鼠 Oct-4 基因在猪和牛囊胚中的表达模式与其在小鼠自身中的表达模式存在不同, 不论是内源性 Oct-4 蛋白还是外源性 Oct-4-GFP, 在猪和牛的内细胞团和滋养层中都可以检测到, 而 Hao 等^[12]报道无论体外或体内培养的兔胚胎都不能表达异源性的 Oct-4-GFP。

以上这些研究结果似乎表明 Oct-4 基因的表达模式存在着一定的物种差异。为确定是否存在这些差异, 本研究构建了可直观了解异源 Oct-4 表达模式的表达载体, 以牛 Oct-4 基因的 5'端完整调控区驱动绿色荧光蛋白基因(GFP)的表达, 并通过单精子注射转基因(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)的方法将其转入猪、兔和小鼠的受精卵中, 分析异源 Oct-4 在早期胚胎中的表达模式。

* 国家自然科学基金资助项目(30570947)和国家高技术研究发展计划(863)部分资助项目(AA02Z113)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62731594, E-mail: linaix@cau.edu.cn

收稿日期: 2009-03-06, 接受日期: 2009-05-12

1 材料和方法

1.1 Oct-4(p)-GFP 质粒的构建

Oct-4 基因启动子克隆自牛基因组, 是位于 Oct-4 基因上游完整的启动子, 共 3.5 kb, 包含远端增强子 (distal enhancer, DE)、近端增强子 (proximal enhancer, PE)、SP1 位点、激素反应元件等顺式元件。用克隆的 Oct-4 启动子替换质粒 pEGFP-N1(Clontech 公司)中 GFP 原有的 CMV 启动子, 构建出受 Oct-4 启动子驱动 GFP 表达载体。首先用 *Hind* III/*Sma* I 将 pEGFP-N1 质粒切成线性, 插入牛 Oct-4 3.5 kb 启动子, 再用 *Ase* I/*Nhe* I 将 CMV 启动子切除, 补平限制酶切末端后, 自连形成实验所需质粒 pOct-4(p)-GFP。构建好的质粒用内切酶 *Afl* II 线性化, 琼脂糖凝胶回收线性片段, 用 Omega 凝胶纯化回收试剂盒将回收到的片段纯化, 并用 TE 溶解回收片段至 50 mg/L 浓度, 保存于 -20℃。

1.2 单精子注射及体外培养

1.2.1 卵母细胞的收集

猪的卵母细胞来源于从屠宰场收集的卵巢, 将分离到的卵丘卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte complexes, COCs) 在成熟培养液中洗 3 次后放入预热的成熟培养滴 (NCSU23 添加 10% 的猪卵泡液、10 U/ml hCG、10 U/ml ECG、10 μg/L EGF、0.6 mmol/L 半胱氨酸、75 mg/L 青霉素和 50 mg/L 链霉素) 中, 在 39℃, 5% CO₂ 和 100% 湿度空气的 CO₂ 培养箱中培养 42~44 h, 单精子注射前用 0.1% 的透明质酸酶消化 2~3 min 以去除卵丘细胞, 然后挑选胞质均匀、第一极体明显的 M II 期卵母细胞进行操作。

小鼠和兔的卵母细胞均采用超数排卵, 然后从输卵管中回收获得。将从输卵管得到的 COCs 放入合适浓度的透明质酸酶中消化以去除卵丘细胞, 将消化干净的裸卵洗干净后分别放入预热的 CZB^[13] 和 M199 (加 10% 胎牛血清) 液滴中, 置 CO₂ 培养箱中备用。

1.2.2 精子的收集

将采到的公猪新鲜精子用含抗冻剂的稀释液稀释后进行常规冷冻, 在进行单精子注射前用含 0.3% BSA 的 TL-Hepes 液解冻离心洗涤 3 次后, 调整精子的密度为 6×10⁶/ml, 在液氮中直接冷冻解冻一次, 然后分装到 200 μl 离心管中于 -20℃ 保存备用。用于 ICSI 实验前, 将精子储存液 (含 BSA) 与

线性化后的 pOct4(p)-GFP 在 4℃ 冰箱中孵育 1 h 以上, 与精子混合后的 DNA 浓度为 5 mg/L。

用假阴道法采集兔精子, 轻轻放入盛有适量 mDM 液的 1.5 ml 离心管中, 于培养箱中孵育 20 min, 使精子缓慢上游, 取上清并将精子浓度稀释至 1×10⁶/ml~10×10⁶/ml, 分装于冻存管, 置液氮中冷冻, 解冻时将冻存管放 25℃ 水浴锅中 3~5 min 即可, 然后于室温下按体积比 9:1 混合精子与 DNA 10 min 即可。

从小鼠的附睾尾挤出精子团, 收集活力好的精子稀释浓度至 2×10⁶/ml~5×10⁶/ml, 分装于冻存管, 置于液氮中冷冻, 解冻时把冻存管置 25℃ 水浴 10 min 即可, 然后把冻精液与 DNA 以体积比 9:1 的比例混合, 室温孵育 1~2 min 即可用于注射。

1.2.3 单精子注射

单精子注射过程已经是十分成熟的技术^[14], 一般是通过操作手或借助特殊的仪器驱动, 使注射针穿过透明带和质膜, 将精子注射到卵母细胞质中。3 种动物的不同在于小鼠单精子注射需要用 Piezo 脉冲冲击穿透透明带, 再将吸附了 DNA 的精子注射进卵母细胞中, 猪和兔不需要用 Piezo, 只要用注射针刺穿透明带将精子注入卵母细胞即可。

1.2.4 注射后胚胎的培养

注射后的猪卵母细胞需用电融合仪进行一次直流脉冲激活, 场强为 130 V, 脉冲时程为 80 μs, 然后先移入 6-DMAP (NCSU23 中添加 2 mmol/L 6-DMAP) 中处理 6~7 h, 再移入发育培养液 (上述 NCSU23 中加入 0.4% BSA) 中, 在 38℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养, 在不同卵裂期观察并统计胚胎发育情况。

注射完毕的兔卵母细胞加入 5 μmol/L 离子霉素 (ionomycin) 放培养箱中 5 min 后, 取出受精卵放入含有 10 mg/L 放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 的培养液中 1 h, 取出受精卵再次放入含离子霉素的液滴中 5 min, 最后将受精卵放入含 CHX 的液滴中 3 h。激活完毕的受精卵用 H199 洗 3 次, 移入 M199 中, 在 38℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养, 在不同卵裂期观察并统计胚胎发育情况。

注射后的小鼠卵母细胞无需激活, 注射完毕后即可放入 CZB 培养液中, 于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养, 在不同卵裂期观察并统计胚胎发育情况。

另外, 实验中还以未与 DNA 孵育的上述精子注射的胚胎作为对照组。

1.3 胚胎中 GFP 表达的观察

利用正置荧光显微镜(Nikon E800), 在蓝光(激发波长 488 nm)的激发下观察胚胎表达 GFP 的情况. 分别统计 3 个物种各发育阶段胚胎数和表达 GFP 胚胎数, 并使用 Nikon CP4500 数码相机拍摄下状态好的阳性胚胎.

1.4 统计分析

对单精子注射胚胎和对照组胚胎的卵裂率和囊胚率进行卡方(χ^2)检验, $P < 0.05$ 视为差异显著.

2 结 果

2.1 注射后胚胎发育情况

我们用构建好的 pOct-4(p)-GFP 质粒分别注射了 106 枚猪卵母细胞、140 枚兔卵母细胞和 110 枚小鼠卵母细胞, 卵裂率和囊胚率等数据见表 1. 其中兔的卵裂率略高于其他两种动物, 为 81.4%, 囊胚发育率以小鼠为最高, 为 27.2%, 对照组与注射组卵裂率差异不显著($P > 0.05$), 但对照组囊胚发育率显著高于注射组($P < 0.05$).

Table 1 The rates of cleavage and blastocyst of ICSI oocytes

Species	Treatment	No.of injected embryos	No.of cleaved embryos(%)	No.of developed to blastocysts(%)
Pig	Experiment	106	72(67.9)	14(19.4)
	Control	46	34(73.9)	14(41.2)
Rabbit	Experiment	140	114(81.4)	26(22.8)
	Control	48	43(89.6)	22(51.2)
Mouse	Experiment	110	81(73.6)	22(27.2)
	Control	42	33(78.6)	20(60.6)

2.2 卵裂期(2 细胞到桑椹胚)胚胎中的 Oct-4-GFP 表达情况

在注射后 24 h(小鼠)、48 h(兔)、72 h(猪)观察胚胎发育情况, 除了一部分未发生卵裂的细胞外, 都发育到了 2- 细胞或 4- 细胞阶段. 72 h(小鼠)、96 h(兔)、168 h(猪)后, 可以观察到囊胚. 各阶段 GFP 阳性胚胎比例, 见表 2.

Table 2 The percentage of GFP-positive embryos at different developmental stages

Species	2-cell(%)	4-cell(%)	8-cell(%)	Morulas(%)	Blastocysts(%)
Pig	16/26(61.5) ¹⁾	13/23(56.5)	8/18(44.4)	4/11(36.4)	3/11(27.3)
Rabbit	15/22(68.2)	15/25(60.0)	10/21(47.6)	6/14(42.9)	3/10(30.0)
Mouse	19/29(65.5)	11/21(52.4)	6/15(40.0)	5/15(33.3)	4/12(33.3)

¹⁾ No.of embryos expressing GFP/ no.of embryos observed(%).

3 种动物均在 2- 细胞期就可以观察到 GFP 表达(图 1), 但此时荧光较弱, 从 4- 细胞之后荧光开

始变强, 这在小鼠和兔子的胚胎中尤其明显(图 2). 小鼠注射后的胚胎中嵌合体比较少, 而且各个卵裂

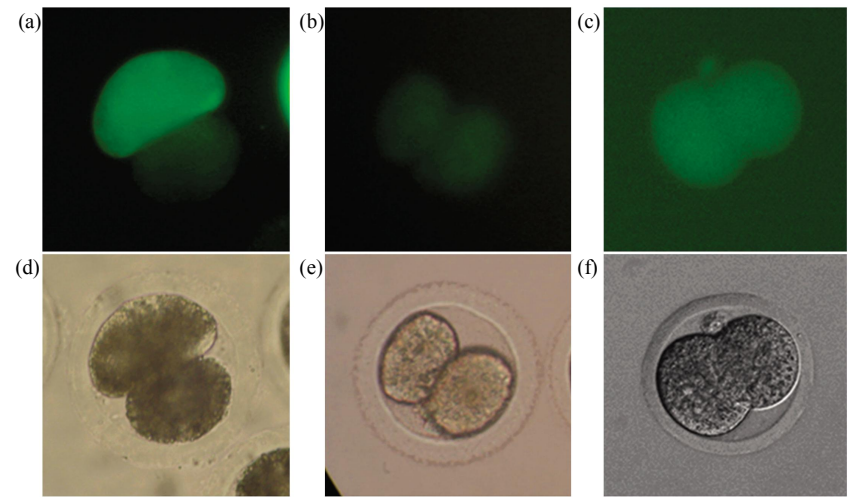


Fig. 1 2-cell embryos expressing GFP

Pig 2-cell embryos(a, d), Rabbit 2-cell embryos(b, e), Mouse 2-cell embryos(c, f). The embryos expressing GFP are shown on (a), (b), (c), the parallels in bright light are shown on (d), (e), (f).

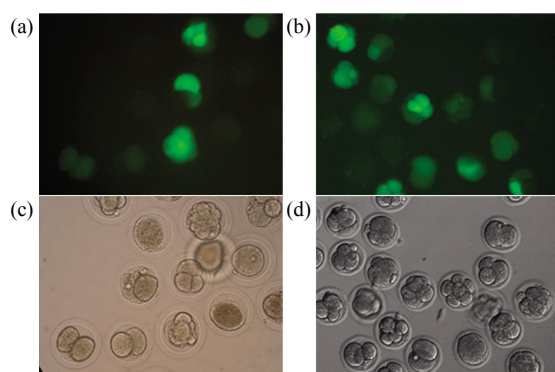


Fig. 2 Cleaved embryos expressing GFP of rabbit and mouse

Rabbit cleaved embryos(a, c), Mouse cleaved embryos(b, d). The embryos expressing GFP are shown on (a, b), the parallels in bright light are shown on (c, d).

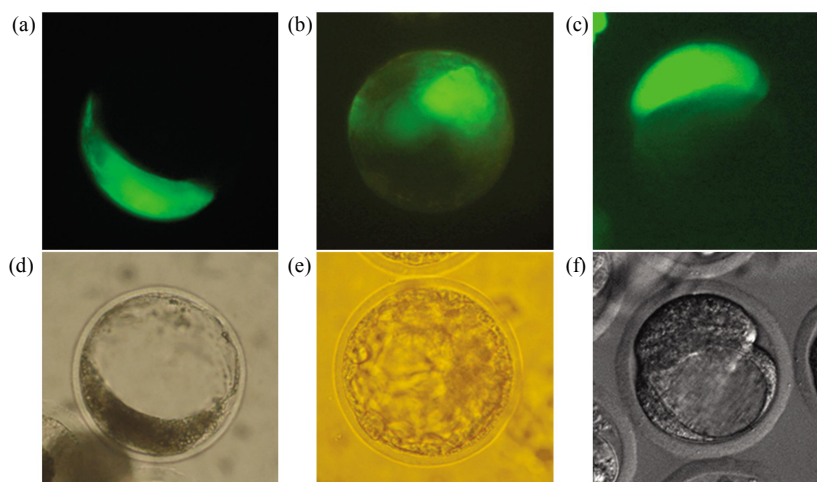


Fig. 3 Blastocysts expressing GFP

Pig blastocyst(a, d), Rabbit blastocyst(b, e), Mouse blastocyst(c, f). The embryos expressing GFP are shown on (a), (b), (c), the parallels in bright light are shown on (d), (e), (f).

3 讨 论

Oct-4 是最重要的多能性标记因子之一, 它特异性地在多能性细胞 (比如胚胎干细胞和原始生殖细胞) 中表达. 在早期胚胎发生过程中, 随着受精卵发育 Oct-4 基因被逐渐激活, 已报道的 Oct-4 基因的表达模式存在着一定的差异, 我们推测造成这些差异的原因可能与不同的研究方法有关. 先前的很多研究主要是通过 RT-PCR 或 Western blot 方法, 这些方法在样品的处理及操作过程会存在一定的误差. 本研究采用了可视性策略来直观了解异源 Oct-4 启动子在不同物种胚胎中的动态表达模式.

为了更好地研究异源 Oct-4-GFP 结构在早期胚胎中的表达, 本研究使用了单精子注射技术(ICSI)

球中绿色荧光的强度大体相同, 尤其是 2- 细胞期基本两个卵裂球的表达情况一致, 从 4- 细胞开始出现嵌合体现象, 而兔和猪的胚胎中嵌合体比例高于小鼠, 有些胚胎从 2- 细胞开始卵裂球中的 GFP 表达强度就不一致了, 4- 细胞之后的胚胎中有些卵裂球完全不发光.

2.3 囊胚中 Oct-4-GFP 的表达情况

在注射后 3 天、4 天、7 天可以分别观察到小鼠、兔、猪的囊胚, 牛的 Oct-4 基因在这 3 种动物囊胚中的表达均被限制在内细胞团, 在滋养层几乎没有表达(图 3).

介导的转基因方法, 这是因为 ICSI 转基因技术能够获得较高比例的转基因胚胎, 有利于基因表达效率的统计分析, 而且, ICSI 转基因技术在不同物种中有很好的重复性, 便于物种间的比较. 从本实验来看, ICSI 后胚胎的分裂率和对照组没有差异, 但囊胚率均显著低于对照组, 说明精子吸附的 DNA 分子或者转基因的表达产物可能对胚胎发育能力有一定影响. 然而, 本实验条件下, 总的阳性胚胎率达到 60%, 这个效率可以使我们获得足够的胚胎来分析转基因的表达情况.

已报道的关于早期胚胎 Oct-4 表达模式的研究表明, 小鼠、猪和牛内源性 Oct-4 从 2- 细胞期就开始表达了^[5, 10, 11], 兔的相关报道不详. 我们的试验结果显示, 注射了异源 Oct-4 的小鼠、猪和兔的胚

胎都是从 2- 细胞起开始有微弱的绿色荧光出现, 4- 细胞之后开始增强表达, 这个结果说明, 异源 Oct-4 基因与内源基因具有同步效应, 在表达的时间性上受到相同的控制. 本实验室还曾经将有 CMV 驱动的报告基因 CMV-GFP 分别导入兔和小鼠的受精卵中, 均在 2- 细胞期就发现了 GFP 的强烈表达, 且在囊胚的内细胞团和滋养层细胞中都存在 GFP 的表达, 这些结果明显区别于 Oct-4 的表达模式. 小鼠、猪和兔的胚胎在卵裂期都有嵌合体的出现, 这之前许多实验室的实验结果一致^[15~18], 说明产生嵌合体是注射过程本身特有的现象, 与注射的外源基因类型无关. 其可能原因是: 尽管在单细胞精子阶段带入外源基因, 但并没有在第一次 DNA 复制前发生整合, 或者是插入的基因在细胞分裂过程中丢失. 是否早期的不同卵裂球中就存在着表达上的差异还有待于相关研究来验证.

在不同动物的胚胎发育过程中, 胚胎基因组激活时间有所不同^[9], 猪是在 4- 细胞期激活, 小鼠是在 2- 细胞期激活, 兔是在 8~16 细胞期激活. 在本实验中, 3 种动物均在 2- 细胞期就有 GFP 表达, 说明控制胚胎基因组激活的因素对外源 Oct-4 基因的表达影响并不大, 这与前人的发现一致^[15, 16]. 在注射后的短时间内, 游离在染色体外的质粒 DNA 可能不受染色体环境的抑制而优先转录. 不过, 小鼠、猪和牛的内源性 Oct-4 的表达也是从 2- 细胞开始的^[5, 10, 11]. 在小鼠配子和早期胚胎中, 内源性 Oct-4 基因启动子区的 DNA 甲基化水平很低^[20], 表明在受精初期内源性 Oct-4 就可能已经处于转录允许状态. 在实验中我们还将 Oct-4(p)-GFP 质粒转染不同动物的多种体细胞, 均未发现任何绿色荧光, 这验证了 Oct-4 不能在动物体细胞中表达, 也说明了我们所构建的载体在动物早期胚胎特异表达上具有可靠性. 同时也表明, 与 Oct-4 启动子结合的转录装置只特异性地存在于早期胚胎细胞中, 而且在不同物种中是保守的.

在本实验中, 注射的 pOct-4(p)-GFP 在 3 种动物均特异性地在内细胞团中表达, 而滋养层中几乎没有看到 GFP 的表达, 在小鼠上的实验结果与文献报道的一致^[2, 21]. 但 Kirchhof 等^[11]报道, 猪和牛囊胚中的 Oct-4 表达模式与小鼠不同, 不论是内源性 Oct-4 蛋白还是异源性 Oct-4-GFP, 在内细胞团和滋养层中都可以检测到, Hao 等^[12]报道异源性 Oct-4-GFP 不能在兔胚胎中表达. 这些观察与我们的实验结果不同. 目前, 尚难解释造成这些差异的

原因, 但在他们的研究中, 所用的外源 Oct-4 启动子序列中缺失了近端增强子元件 PE, 以前人们都认为 PE 在着床前胚胎、ES 细胞以及 EC 细胞中的活性很低以至于被忽略, 但 PE 的缺失是否与这些实验结果的差异有关, 尚需进一步证实.

虽然有研究者认为, Oct-4 蛋白在囊胚中的定位在不同物种(比如小鼠和牛)中不同^[10, 11, 22], 但 Oct-4 mRNA 的表达和分布在小鼠和牛胚胎中高度相似, 牛囊胚中的 Oct-4 mRNA 被特异性地定位于内细胞团中, 而非滋养层^[23]. 我们的实验结果也表明, Oct-4 启动子在不同物种中有相似的表达模式, 暗示 Oct-4 基因在哺乳动物中的表达存在着相似的调控机制.

Oct-4 是多能性细胞和早期胚胎的重要标记因子, 研究 Oct-4 的表达模式对我们了解干细胞多能性维持、胚胎早期分化和体细胞重编程机制等方面有重要意义. 本研究结果为进一步探讨 Oct-4 基因的作用机制提供了有用信息.

参 考 文 献

- 1 Pesce M, Scholer H R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*, 2001, **19**(4): 271~278
- 2 Palmieri S L, Peter W, Hess H, *et al.* Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Developmental Biology*, 1994, **166**(1): 259~267
- 3 Yeom Y I, Fuhrmann G, Ovitt C E, *et al.* Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*, 1996, **122**(3): 881~894
- 4 Yeom Y I, Ha H S, Balling R, *et al.* Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech Dev*, 1991, **35**(3): 171~179
- 5 Catherine E, Ovitt, Scholer H R. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Molecular Human Reproduction*, 1998, **4**(11): 1021~1031
- 6 Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, *et al.* A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell*, 1990, **60**(3): 461~472
- 7 Rosner M H, Viganao M A, Ozato K, *et al.* A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*, 1990, **345**(6277): 686~692
- 8 Scholer H R, Dressler G R, Balling R, *et al.* Oct-4: a germlinespecific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J*, 1990, **9**(7): 2185~2195
- 9 Nordhoff V, Hubner K, Bauer A, *et al.* Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mammalian Genome*, 2001, **12**(4): 309~317
- 10 van Eijk M J T, van Rooijen M A, Modina S, *et al.* Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine

- POU5F1. *Biology of Reproduction*, 1999, **60**(5): 1093~1103
- 11 Kirchhof N, Carnwath J W, Lemme E, *et al.* Expression pattern of Oct4 in preimplantation embryos of different species. *Biology of Reproduction*, 2000, **63**(6): 1698~1705
 - 12 Hao R, Wuensch A, Klose R, *et al.* Rabbit nuclear transfer and *in vivo*-fertilized embryos fail to express a mouse Oct-4 promoter-driven EGFP reporter gene. *Reprod Fertil Dev*, 2007, **19**(1): 137~138
 - 13 Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, *et al.* *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. New York: CSHL Press, 2003. 588
 - 14 Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, *et al.* *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. New York: CSHL Press, 2003. 585~597
 - 15 Chauhan M S, Nadir S, Bailey T L, *et al.* Bovine follicular dynamics, oocyterecovery, and development of oocytes microinjected with a green fluorescent protein construct. *J Dairy Sci*, 1999, **82**(5): 918~926
 - 16 Kubisch H M, Hernandez-Ledezma J J, Larson M A, *et al.* Expression of two transgenes in *in vitro* matured and fertilized bovine zygotes after DNA microinjection. *J Reprod Fertil*, 1995, **104**(1): 133~139
 - 17 Takeda S, Toyoda Y. Expression of SV40-LacZ gene in mouse preimplantation embryos after pronuclear microinjection. *Mol Reprod Dev*, 1991, **30**(2): 90~94
 - 18 Chan A W S, Kukolj G, Skalka A M, *et al.* Timing of DNA integration, transgenic mosaicism, and pronuclear microinjection. *Mol Reprod Dev*, 1999, **52**(4): 406~413
 - 19 Telford N A, Watson A J, Schultz G A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev*, 1990, **26**(1): 90~100
 - 20 Yamazaki Y, Fujita T, Low E, *et al.* Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, 2004, **73**(2): 180~188
 - 21 Pesce M, Wang X, Wolgemuth D J, *et al.* Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev*, 1998, **71**(1~2): 89~98
 - 22 Wuensch A, Habermann F A, Klose R, *et al.* Screening Oct-4 promoter activity in bovine first and second round SCNT embryos using an EGFP reporter construct. *Reprod Fertil Dev*, 2006, **18**(2): 146~146
 - 23 Kurosaka S, Eckardt S, McLaughlin K J. Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct-4 transcript localization. *Bio Reprod*, 2004, **71**(5): 1578~1582

Spatio-temporal Expression of Heterologous Oct-4 Promoter in Preimplantation Embryos of Pig, Rabbit and Mouse*

ZHANG Ying¹⁾, SHI Fang-Yu¹⁾, GAO Shao-Rong²⁾, LIN Ai-Xing^{1)**}

¹⁾ State Key Laboratory for Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agriculture University, Beijing 100094, China;

²⁾ National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China)

Abstract The transcription factor Oct-4 is expressed specifically in mammalian preimplantation embryos and its function is related to the maintenance of embryonic stem cell pluripotency. The functional role of the heterogenous expression of Oct-4 remains unclear however. A GFP reporter construct, pOct-4(p)-GFP was generated, containing the upstream regulatory regions of bovine Oct-4 gene and its expression pattern was evaluated in the developing embryos of mouse, pig and rabbit following intracytoplasmic sperm injection. GFP fluorescence was visible early at the 2-cell stage and then became stronger in the blastocysts of all three species. However, the distribution of the GFP signals was restricted to the cells of inner cell mass and no fluorescence was detectable in trophectoderm cells. These results suggest that the bovine Oct-4 promoter is functional and that its embryonic expression activity is similar in different mammalian species.

Key words Oct-4, preimplantation embryos, pig, rabbit, mouse

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00128

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30570947) and Partly Supported by Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02Z113).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62731594, E-mail: linaix@cau.edu.cn

Received: March 6, 2009 Accepted: May 12, 2009