

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 應用條件化基因剔除及轉基因策略探討小鼠C型血小板生長 因子(PDGF-C)生理作用之分子調控機制(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-138-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學畜產學系暨研究所

計畫主持人：鄭登貴

計畫參與人員：李國光、蔡元章、陳侑亨

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 31 日

應用條件化基因剔除及轉基因策略探討小鼠 C 型  
血小板生長因子(PDGF-C)生理作用之分子調控機制(2/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92 - 2313 - B - 002 - 138 -

執行期間： 92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

計畫主持人：鄭登貴

共同主持人：李國光、蔡元彰

計畫參與人員：陳侑亨

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學 畜產學系

中華民國 93 年 5 月 30 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告

## 應用條件化基因剔除及轉基因策略探討小鼠 C 型 血小板生長因子(PDGF-C)生理作用之分子調控機制(2/3)

計畫編號：NSC92-2313-B-002-138

92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

計畫主持人：鄭登貴 國立台灣大學 畜產學系

### 一、中文摘要

近年來，多種可用於生物體外且具備可誘導性質之基因表現系統陸續發展應用，遂得以進一步突破傳統產製轉基因動物之諸多限制，而能逕行經由四環黴素調控系統表現系統之應用，詳實探討特定基因在生物體內扮演之生理功能。基於前述事實，本研究首要目標，乃積極嘗試使用四環黴素來控制 rtTA 的表現；試圖將 PDGF-C 結合於 rtTA 相對應之啟動子下游，俾可藉由四環黴素有效控制 PDGF-C 基因之表現 (tet operator sequence; tet O)，達成條件化控制目標蛋白質 (PDGF-C) 之轉錄作用；且能夠進一步讓四環黴素辨識及調節轉 C 型血小板生長因子基因轉殖鼠之表現與否，從而有效監控轉殖基因之表現量。鑑於內源性 PDGF-C 基因之表現係受特定活化之啟動子 (promoter) 所控制，設若令該活化啟動子置換成為可接受四環黴素控制支配的轉錄活化子 (transactivator) tTA 及 rtTA 來調控，將使同時具備該二種構築的轉基因小鼠，可藉由使用四環黴素來調控目標基因的生理作用。基於此一原理，本研究首先成功構築一表現載體 (Expression vector) 及二種反應載體 (Response vector) 包括攜帶有特定專一性表現之啟動子諸如：四環黴素反應啟動子 (Tet-responsive promoter)，與同時攜帶有報導基因 (綠螢光蛋白質) 及本研究擬深入探討之 PDGF-C 目標轉殖基因。

初步結果已知該表現載體與反應載體混合雙基因顯微注射 (co-injection) 於小鼠原核階段胚，共係有 tet-on 和 tg pBi-EGFP

-PDGF-C 與 tet-on 及 Tg pTRE2hyg-PDGFC 兩組；其中前者合計生下之 25 隻小鼠，經剪尾萃取 genomic DNA 進行 PCR 分析後，確認有 1 隻小鼠係攜帶 tet-on 表現載體基因與綠螢光蛋白及 PDGF-C 之反應載體基因；後者試驗中合計獲得 65 隻小鼠出生，其中有 7 隻確認係帶有 tet-on 表現載體基因及 PDGF-C 之反應載體基因者。此等轉基因小鼠均已陸續發育成熟，刻正進一步提供針對 PDGF-C 之生物功能，包括：PDGF-C 表現對於卵巢周期性生理運轉與 PDGF-C 表現可能涉及新血管對於胚成功埋殖等之影響，進行詳實深入探之討。

**關鍵詞：**C 型血小板生長因子、四環黴素調控系統、綠螢光蛋白質、轉基因小鼠。

### 二、英文摘要

Several inducible gene expression systems have been developed *in vitro* in recent years to overcome limitations with traditional transgenic mice. One of these is the tetracycline-regulated system that has been used successfully *in vivo*, of which the expression of the targeted protein has been regulated by the promoter sequences containing tetracycline responsive element. To meet these purposes, two transgenes were first constructed, including the former ones carries a highly

specific transcription factor (Tet- responsive promoter) and the latter ones carries both of the target gene of PDGF-C regulated by a Tet-responsive promoter and the other target equipped with a double genes containing both the PDGF-C as well as the EGFP reporter sequences. Based on these, transgenic (Tg) mice harboring the transgene of PDGF-C assigned to be driven by tetracycline were generated after the microinjection strategy using a tetracycline-controlled transactivator (rtTA) and a rtTA-dependent promoter linked to a PDGF-C gene. These allow the expression of PDGF-C be well regulated by the tetracycline and/or its analogue. Consequently, the tightly regulated PDGF-C expression can reveal the true physiological effect of the gene.

Results from initial experiments showed that, by double transgenic vectors co-injection technology (Tet-on together with the transgene of pBi-EGFP-PDGF-C and Tet-on together with the transgene of pTRE2hyg-PDGF-C), followed by verification with PCR technology, in the first group, one of the twenty five new born transgenic mouse contains both transgenes of the Tet-on together with the pBi-EGFP-PDGF-C. On the other hand, results from the later studies appeared that seven out of 65 new born mice were transgenic containing both transgenes of tet-on and pTRE2hyg-PDGF-C. All these transgenic mice have reached sexually mature of age and ready providing for further *in vivo* studies to elucidate the physiological significance of PDGF-C gene expression on events related to animal reproduction as well as the vasculogenesis involved in embryonic implantation.

**Key words:** PDGF-C, tetracycline-regulated system, green fluorescent protein, transgenic mice.

### 三、緣由與目的

近年來由於分子生物學及新興生物技術之快速精進，使吾人對生命之奧秘得有機會深入詳加探討；其最大貢獻除有助於提昇禽畜之生產力與生殖效率外，且可提供針對禽畜及人類眾多繁殖相關遺傳疾病之有效診治依據。隨著新近人類基因體計畫 (Barbara and Donald, 2001) 之完成，許多生物的基因及其轉譯的蛋白質也已陸續完成其定序工作；然而對於這些蛋白質在生物體中的生理功能、表現部位及表現時間的資料大多仍未了解，尤其對牽涉到黃體血管新生成、胎盤之形成及分化、與子宮內膜血管系統之週期性變化等，涉及生殖生理系統之分子調控機制，目前仍鮮有詳實深入之探討。本研究室鑑於前曾與台北馬偕醫院醫研科李國光主任及蔡元彰博士合作，並成功選殖獲得一相關之人類生長因子，稱為 fallotein (命名為 PDGF-C) 基因 (Tsai *et al.*, 2000)；因此本計畫擬針對涉及動物生殖系統有關之 *fallotein / PDGF-C* 分子進行探討，利用條件化轉基因之動物模式，嘗試能究明此一特異性基因對於小鼠的正常生殖功能調控之分子作用機制。

四環黴素調控系統 ( tetracycline-dependent regulatory systems ; *tet* systems) 首先係由 Hermann Bujard 研究團隊所發展，旋即該策略被廣泛應用於體外培養細胞 (Beck *et al.*, 1982; Gossen and Bujard, 1992; Furth *et al.*, 1994; Gossen *et al.*, 1995)，俾為控制基因表現程度之依據；直至近年該技術的突破與應用，亦已能藉此系統更有效達成調控轉殖基因在轉基因動物中表現程度之目的 (Kistner *et al.*, 1996; Kamat *et al.*, 1999)。有鑑於一些藥物誘發基因表現的進行，可以利用具有特殊功能性質的誘發性啟動子以達到特定時間點的基因開啟與關閉，目前最廣為使用的誘發系統是 *tet*-系統，由四環黴素 ( tetracycline, *tet*) 或其水溶性衍生物 doxycycline (*dox*) 作為誘發的藥物。

*Tet*-系統有兩種，圖 1(A) 是原始的系統，包括一個逆活化子 (transactivator, tTA)，是由細菌的 *tet* 抑制子 (repressor) 及病毒 VP16 蛋白的逆活化區 (transactivation domain) 所構成的一個融合蛋白 (fusion protein)，當加入 *tet*

或 dox 誘發物時，tet 或 dox 會與 tTA 複合在一起，造成其構型的改變而無法結合到 PDGF-C 上游的 tet-操縱子(tet-operator)上，PDGF-C 重組蛋白質因而無法被製造出來，但是若停止 tet 或 dox 之處理時，tTA 本身即可去與 PDGF-C 的啟動子 tet-操縱子結合而造成 PDGF-C 的轉錄，即可製造 PDGF-C 蛋白質。圖 1(B)則是經過改良的 tet 系統，其 rtTA 逆活化子經過突變後，一般情況下不會去與 tet-操縱子結合，只有在加入 tet 或 dox 誘發物時才會一起結合到 tet-操縱子上造成 PDGF-C 的轉錄，產製該蛋白質產物。

職是之故，吾等將國科會三年期研究計畫之第二年計畫工作要點著重於將攜帶有 tetracycline-controlled transactivator (rtTA) 及 rtTA -dependent promoter 轉殖基因之構築(圖 2)，利用雙基因混合顯微注射 FVB 小鼠原核胚之方式，藉由代理孕鼠之懷孕生產，希望能獲得同時攜有表現載體與目標基因之轉雙基因小鼠。往後將進一步藉由此種 Tet-On™ Gene Expression Systems 小鼠動物模式，針對 fallotein / PDGF-C 深入探討其在動物生殖生理學所可能扮演分子調控機制。

#### 四、材料與方法

##### 1.DNA 之製備

吾等進一步將此國科會計畫執行已構築完成的表現載體與反應載體(圖 2)，分別抽取不含內毒素(ednotoxin free)之大量 DNA 後，經 CsCl 超高速離心及多次透析純化，擇單一切割位置的截切限制酵素(tet-on 表現載體之切位酵素為 Sca I; Tg pBi-EGFP-PDGFC 反應載體之切位酵素為 Ahd I; Tg pTRE2hyg -PDGFC 反應載體之切位酵素為 Fsp I) 將環狀 DNA(circular form) 利用限制酵素截切成線狀 DNA (linear form)，並予以膠體電泳配合吸光值偵測定量 DNA 濃度，並調整至最終濃度為 3-5ng/μl，以供後續實驗之進行。諸如：細胞轉染(cell transfection)產製 tet 293 cell line (圖 3) 及 double -stable tet 293 contain PDGF-C gene cell line (圖 4)，以供進行體外分析(*in vitro*

assay) 四環黴素調控系統對於 PDGF-C 基因於細胞層次之表現情形；亦或是進行動物胚顯微注射(microinjection)，產製轉 PDGF-C 基因小鼠模式動物，供吾等深入瞭解該基因於生物體內所扮演之生物功能特性。

##### 2.Tet-on stable cell line 之建立

首先我們選擇 QBI 293 cell (transformed primary human embryonal kidney) 為 host cell，導因於前預備試驗中已先行利用 RT-PCR 方式確認此一細胞株並不會表現 mice PDGF-C 基因，以此為依據，初步需先行建立含有 tetracycline response element (transactivator; rtTA)之細胞株(圖 3)；吾等嘗試將 tet-on 表現載體之 DNA(1-2μg) 利用 BD CLONfectin™ transfection Reagent 轉染至寄主細胞中，又因該表現載體上含有 Neo resistant site，故於培養至 24-48 小時後添加 400-500 μg/ml G418 進行反覆長達 2-4 週之篩選，挑出 30-40 個 G418-resistant clones，再次轉染 pTRE2hyg-GFP (1-2μg) 報導載體(reporter vector)於 DMEM 培養液中，利用培養液中 Dox(1-2μg/ml)之添加與否，於培養 48 小時後，隨即於螢光顯微鏡下進行綠螢光蛋白有無表現之篩選程序，選擇差異值高達 20 倍以上的表現細胞株，液態氮凍存已建立完成之 Tet-on stable cell line。

##### 3. Double-stable tet-on contain tg pBi-EGFP- PDGF-C cell line 之建立

將轉殖基因(pBi-EGFP-PDGFC)之反應載體 DNA 轉染於 Tet-on stable cell line，待培養 24 至 48 小時後，添加 200-400 μg/ml hygromycin 或 1-5μg/ml puromycin，並於每 4 天更換 selection antibiotic (hyg or pur)，會觀察到有大塊細胞有死亡現象，將死亡細胞移除之，經此等反覆篩選 2-4 週後，即可挑出 30-40 個 hyg-resistant 或 pur-resistant colonies，針對每個 clone 分別進行 1μg/ml Dox 的有無添加，測試篩檢出對於 PDGF-C

蛋白質的生成量具高量 induction 表現的細胞株(圖 4)。

#### 4. 基因顯微注射

試驗用 FVB 品系供胚鼠與 ICR 品系受胚鼠均購自台大醫院實驗動物中心，首先進行發情同期化賀爾蒙處理，處理流程如下：腹腔注射 10 iu 孕馬血清激性腺激素(pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG), 48 小時後再予以腹腔注射 10 iu 人類絨毛膜性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)及配種閹公鼠或種公鼠，並以第二劑注射時間為零點，計算原核胚階段最適當之沖胚時間約為 12-16 小時後將供胚小鼠犧牲，取出輸卵管以 mice KSOM 培養液沖洗出原核階段胚，挑選雄雌原核明顯且健康的胚，覆蓋一層培養用礦物油，暫置於 37°C 恆溫培養箱，待架設好顯微操作設備，則可將原核胚用微細固定針進行固定並調整最佳之雄原核注射位置，將已定量至 3-5ng/μl 之外源注射基因置於超微細注射針內，進行顯微注射(microinjection)，並於微量注射後將胚移至代理孕母鼠，代為分娩轉基因小鼠。

#### 5. 轉基因小鼠基因組 DNA 之萃取

經由顯微注射及核移置至代理孕母所產下之仔鼠，需待其生長至 4 週齡，身體狀況較佳時，始進行剪尾分析工作。作法如下：將仔鼠左手固定，右手持滅菌剪刀，剪下約 1-2 公分尾巴至 1.5ml 離心管，剪碎尾巴組織後，加入 lysis 緩衝液 (內含 proteinase K) 200μl，置於 55°C 恆溫水浴槽反應約 8-12 小時，待組織完全 lysis 後，始進行一般的 DNA 萃取程序，加入等量之無水酒精，混合均勻後移置萃取管柱中，經數次反覆 wash 後，即可以 TE buffer 洗滌出 genomic DNA。

#### 6. 偵測各轉基因小鼠之專一性引子設計及其 PCR 反應偵測試驗

吾等針對 tetracycline regulated system 構

築之載體，進行 DNA 序列分析，分別針對 tet-on 反應載體基因 (圖 2-A)

pBi-EGFP-PDGF-C 表現載體基因 (圖 2-B) 及 pTRE2hyg-PDGF-C 表現載體 (圖 2-C)，進行設計專一性引子，以利後續分析出生仔鼠是否攜帶吾等預期所應攜有之外源基因。

利用 PCR 反應所建立快速篩選程序如下，首先先將小鼠尾巴之 genomic DNA 稀釋約 100ng/μl 取 1μl 作為 template、再添加 10mM 引子 1、10mM 引子 2 各 0.5μl、2mM dNTP 2μl、10X PCR buffer 2μl、*taq* polymerase 0.3μl，最後加水至最終體積為 20μl，以下述條件進行 PCR 反應，以 94°C 5mins denature 後，進行 30 個 cycle 的 94°C 30sec、60°C 30sec 及 70°C 1mins 的重複循環，最後以 72°C 5mins 完成反應，而後取 10μl 的終產物進行洋菜膠電泳分析。表 1 所列者，乃用以偵測各轉殖基因時所使用之寡核酸引子序列。

### 五、結果

#### 1. 藉由四環黴素調控 PDGF-C 基因表現系統之離體測試分析

本研究目前已成功建立 Tet-on stable cell line 與 Double-stable Tet-on vector contain tg pBi-EGFP-PDGF-C；試驗結果證明利用 G418、hygromycin 及 puromycin 反覆進行 stable cell colonies 之篩選後，再藉著使用 Doxycycline 搭配 EGFP 進行螢光觀察，結果發現前述成功選殖出的細胞株，於添加 1μg/ml 濃度的四環黴素衍生物(doxycycline) 狀況下培養 36-48 小時後，利用螢光顯微鏡觀察，明顯可見實驗組有綠螢光蛋白質之生成，反之則無(圖 5)。進一步將此已感染 Tet-on 表現載體及 pBi-EGFP-PDGF-C 反應載體的 293A 細胞株，萃取其細胞蛋白質進行西方墨點分析(western blot immunoblotting)，進一步得證當加入 doxycycline 時可有效誘導 PDGF-C 及 GFP 兩種蛋白質產物的生成；相同之結果亦可見於加入 doxycycline，於感染 Tet-on 表現載體及 pTRE2hyg-PDGF-C 反應

載體的 293A 細胞株中，確係具有有效誘導 PDGF-C 蛋白質之產生 (圖 6)。故有鑑於此，吾等已成功建立一離體(*in vitro*)觀察系統，可完美藉由四環黴素衍生物之添加與否，調控目標蛋白質(PDGF-C)之生成。

## 2. Tet-on 表現載體和 pBi-EGFP-PDGF-C 反應載體混合施打之轉雙基因動物產製

藉由 tg tet-on 和 tg pBiEGFP-PDGF-C 二種外源基因混合顯微注射，共計施打 120 個原核鼠胚，成功併用胚移植技術，共移置 108 個顯微注射受精卵至 5 隻代理孕母鼠，共計分娩 25 隻仔鼠(表 2)，經 PCR 分析，獲得一同時攜有上述雙基因之轉基因公小鼠#15(圖 7)，其所產下的 F1 仔代，經 tail genomic DNA 之 PCR 分析 23 隻仔鼠中共有 3 隻帶有雙基因(圖 8)，初步獲悉 germ line transmission 比率為 13% (表 3)。

## 3. Tet-on 表現載體和 pTRE2hyg-PDGF-C 反應載體混合施打之轉雙基因動物產製

藉由 tg tet-on 和 tg pTRE2hyg-PDGF-C 二種外源基因混合顯微注射，共計施打 205 個原核鼠胚，成功併用胚移植技術，共移置 182 個顯微注射受精卵至 8 隻代理孕母鼠，共計分娩 65 隻仔鼠(表 2)，經 PCR 分析，獲得一同時攜有上述雙基因之轉基因公小鼠#1、#16、#20、#37、#52、#59、#64 (圖 9)，其所產下的 F1 仔代，經 tail genomic DNA 之 PCR 分析，6 隻仔鼠中有 1 隻帶有 tet-on 單基因、1 隻帶有 tg tet-on / tg pTRE2hyg-PDGF-C 雙基因 (圖 10)，初步獲悉 germ line transmission 比率為 16.7 % (表 3)。

## 六、討論

PDGF-C / *fallotein* 基因之發現，係應用人類輸卵管組織之 cDNA 為模板，並參考表皮生長因子之核酸序列設計之引子，經聚合酶連鎖反應 (PCR) 擴增而獲得，該基因並被證實在卵巢及子宮等亦有所表現。故參考人類 *fallotein* 基因之 cDNA 序列及小鼠的 EST 資料庫，設計專一性核酸引子，並以小鼠卵

巢之 cDNA 基因庫 (cDNA library) 作為模板進行 PCR 反應，獲得長度為 700 bp 之小鼠 *fallotein* 基因片段，再以該基因片段作為探針，選殖全長 cDNA 長度為 2,692 bp，其中自第 198 至 1,235 bp 為轉譯區序列，可演譯出一個含有 345 個胺基酸，分子量為 38,741 Da 之蛋白質；值得注意的是，該蛋白質在第 55 至 160 個胺基酸序列為 CUB 組區(domain)，而於 C-端之第 250 至 337 個胺基酸序列則與血管內皮細胞生長因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) 相類似。再者 Gilbertson *et al.*, (2001) 曾指出其研究團隊利用腺病毒感染方式，高量表現 PDGF-C 基因於大鼠動脈環處，明顯可離體 (*in vitro*) 觀察到血管有高密度向外生長 (aortic ring outgrowth) 現象，推斷可能與血管生成相關。

再者，我們實驗室亦曾將腺病毒表現載體應用於小鼠卵巢移植試驗中，發現 PDGF-C / *fallotein* 基因與卵的品質、數量有密切相關性，此種特性推測極為可能和 PDGF-C 能促進血管生成，改善移植卵巢局部血管密度，增加血氧及養分供應，進而導致異位移植卵巢之卵質有較佳的發育程度。然而究竟動物活體內 PDGF-C 基因扮演何確切之生物功能，目前仍無定論，為進一步釐清此點，考慮 PDGF-C 為一生長因子，若於一不受調控的狀態下，過量表現此分子對胚胎發育必將造成重大亦或致命的影響，故吾等嘗試以四環黴素調控系統表現系統，應用條件化基因剔除及轉基因策略產製基因轉殖動物的方式，嘗試建立可調控的轉 PDGF-C 基因小鼠，希冀能於小鼠胚胎發育或成長階段，以餵飼 Dox 的方式，條件化誘導 PDGF-C 表現，探討小鼠 C 型血小板生長因子(PDGF-C) 生理作用之分子調控機制。

試驗進行迄今，初步成功獲悉 tet-on 293 細胞株的離體試驗 (*in vitro* assay) 有鑒於 tet-on 293 細胞株的離體實驗調查結果顯示，四環黴素衍生物(Doxycycline)確係可緊

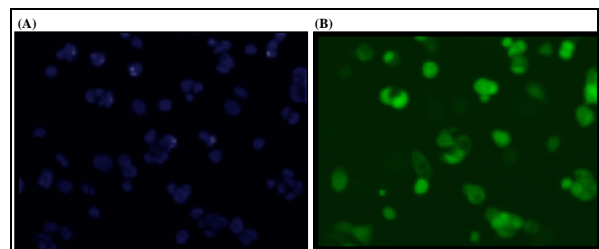
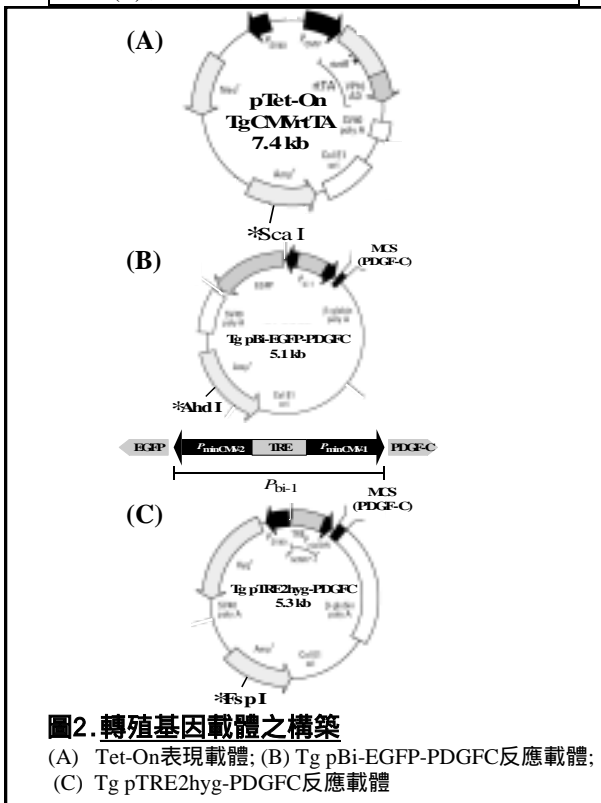
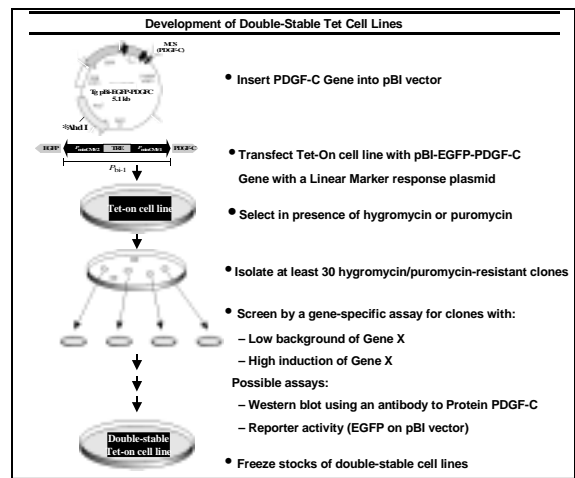
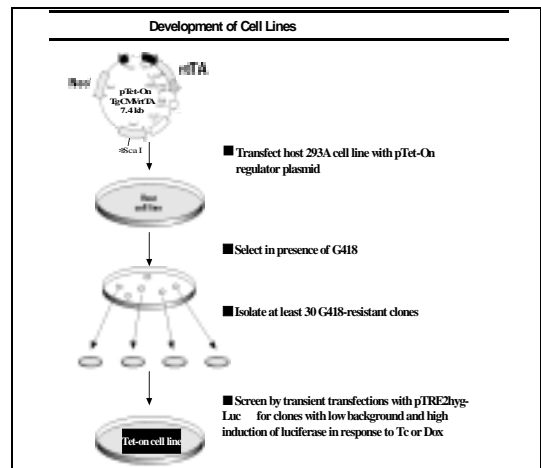
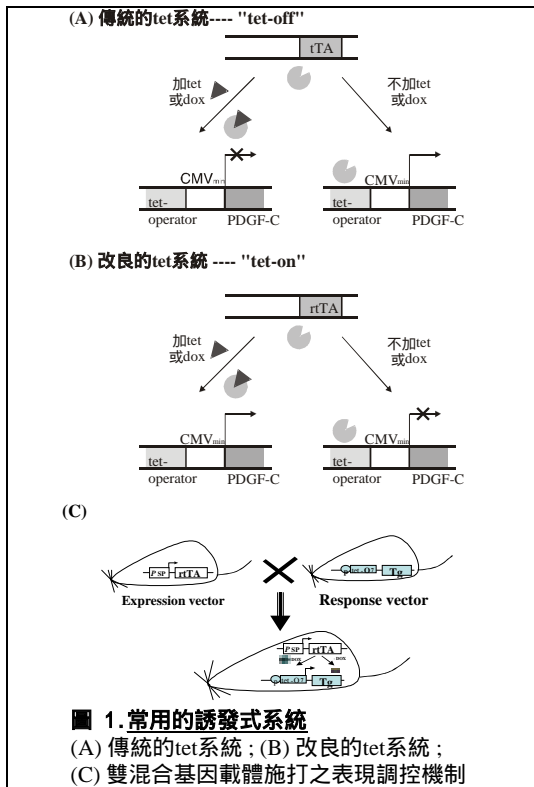
密調控 tet-on / pTRE2hyg-PDGF-C 及 tet-on/pBi-EGFP-PDGF-C 雙基因之表現,故大膽推測於轉殖小鼠中此模式應屬可行,而相同之調控策略於其他基因的轉殖小鼠中亦曾獲得證明(Furth *et al.*,1994),因此吾人樂觀預期於本實驗中亦可獲得等同的結果;再者本年度吾等已成功建立二種雙基因轉殖小鼠,其中 tet-on / pTRE2hyg-PDGF-C 雙基因轉殖組已獲得 7 個 strain,而 tet-on / pBi-EGFP-PDGF-C 雙基因轉殖組則獲得 1 個 strain;經由配種實驗預期可得到廣泛且多樣的可調控 PDGF-C 表現圖譜,將有助於釐清 PDGF-C 的生理作用,諸如:促進或抑制 PDGF-C 高量表現所導致的詳實生理變化,將可進一步闡明該分子具備的可能醫療潛力或醫療效果。

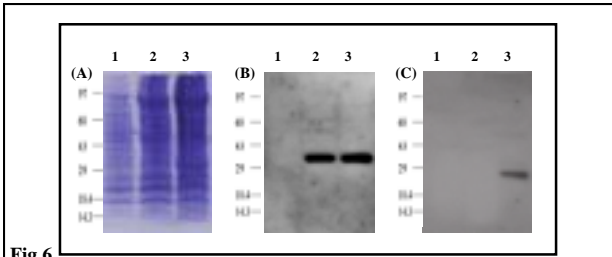
鑒於 Tet-On 調控系統於細胞層次業經確認可以順利運作,本研究第三期計畫之研究策略及目標,將全力著重於運用已成功產製之轉基因小鼠,藉由 Tet-On Regulatory Expression System 之條件化調控系統,針對小鼠 C 型血小板生長因子(PDGF-C)基因,可以據以藉由產製轉基因小鼠之活體測試策略,探討解析 PDGF-C 基因之詳實生理功能。預期完成之工作項目將包括有:1.調察 PDGF-C 對成長階段小鼠生殖器官育的影響、2.調察 PDGF-C 對小鼠黃體及子宮內膜血管生成的影響、3.調察 PDGF-C 對小鼠胎盤形成及早期胚胎發育的影響,以上工作項目除可達成徹底明瞭 PDGF-C 對小鼠生殖生理及胚胎發育的影響外,尚且建立了 Tet-on 基因轉殖小鼠的產製可供日後研究對早期胚胎發育具重大影響的基因之用。

## 七、參考文獻

1. Barbara, RJ, and K Donald. 2001. The Human Genome. *Science* 291(5507): 1153.
2. Beck, CF, R Mutzel, J Barbe, and W Muller. 1982. A multifunctional gene (tetR) controls Tn10-encoded tetracycline resistance. *J. Bacteriol.* 150: 633-642.
3. Blackburn, MR, M Wakamiya, CT Caskey, and RE Kellems. 1995. Tissue-specific rescue suggests that placental adenosine deaminase is important for fetal development in mice. *J. Biol. Chem.* 270: 23891-4.
4. Calzonetti, T, L Stevenson, and J Rossant. 1995. A Novel Regulatory Region Is Required for Trophoblast Specific Transcription in Transgenic Mice. *Dev. Biol.* 171: 615-626.
5. Furth, PA, L St Onge, H Boger, P Gruss, M Gossen, A Kistner, H Bujard, and L Hennighausen. 1994. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91: 9302-9306.
6. Gilbertson DG, Duff ME, West JW, Kelly JD, Sheppard PO, Moore M, Feldhaus AL, Humes JM, Palmer TE, and Hart CE. 2001. Platelet-derived Growth Factor C (PDGF-C), a Novel Growth Factor That Binds to PDGF  $\alpha$  and  $\beta$  Receptor. *J. Biol. Chem.* 276: 27406-27414.
7. Gossen, M, and H Bujard. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 5547-5551.
8. Gossen, M, S Freundlieb, G Bender, G Muller, W Hillen, and H Bujard. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science (Washington DC)* 268: 1766-1769.
9. Kamat, A, KH Graves, ME Smith, JA Richardson, and CR Mendelson. 1999. A 500-bp region, approximately 40 kb upstream of the human CYP19 (aromatase) gene, mediates placenta-specific expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 96: 4575-80.
10. Kistner, A, M Gossen, F Zimmermann, J Jerecic, C Ullmer, H Lubbert, and H Bujard. 1996. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93: 10933-10938.
11. Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15:8125-8148.
12. Udo, B, and B Hermann. 2000. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol.* 327: 401-421.

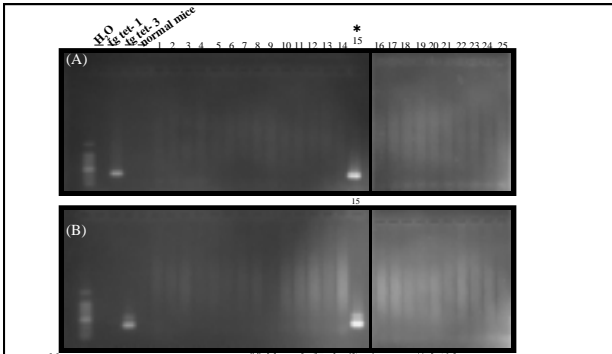






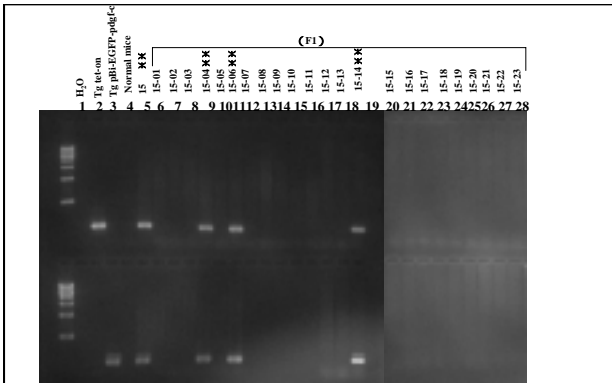
**Fig 6.**  
**In vitro** assay of the transcription/translation regulation of the Tet-response system.

Total protein extract from (1) 293A cell transfected with Tet-On vector and pTRE2hyg-PDGF-C vector. The cells did not treated with doxycycline. (2) 293A cell transfected with Tet-On vector and pTRE2hyg-PDGF-C vector. (3) 293A cell transfected with Tet-On vector and pBi-EGFP-PDGF-C vector. In (2) and (3) the cells have been treated with doxycycline. (A) The protein was separated by SDS-PAGE and stained with coomassie blue. (B) The SDS-PAGE was immunoblotted analysis with a PDGF-C specific antibody (SP-1). (C) The SDS-PAGE was immunoblotted analysis with EGFP antibody.



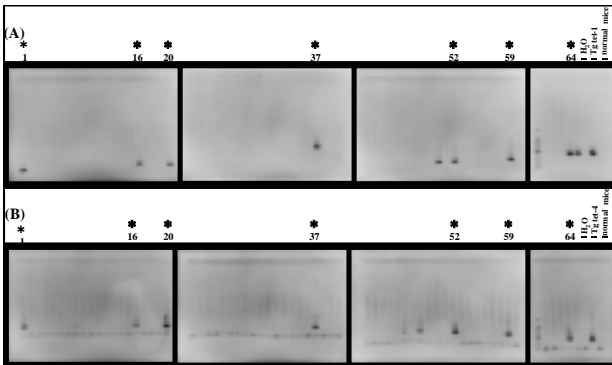
**7. 轉 Tet on / pBi-EGFP-PDGF-C 雙基因小鼠(雜代)之PCR分析結果**

(A) The PCR analysis results of tet-on (transgene tet-1) specific single in the result of 25 strains of the transgenic mice, #15 shows positive results.  
(B) The PCR analysis results of pBi-EGFP-PDGF-C (transgene tet-3) specific single in the result of 25 strains of the transgenic mice, #15 shows positive results.



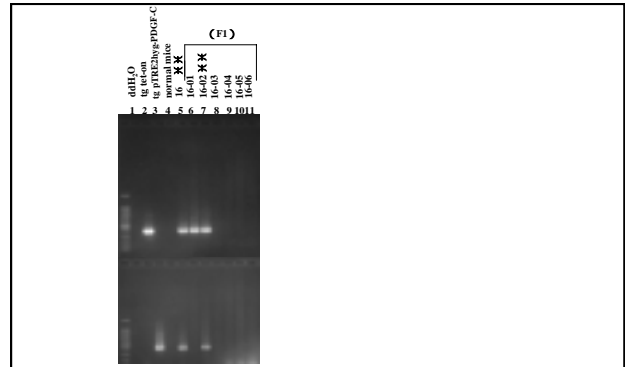
**8. 轉 Tet on / pBi-EGFP-PDGF-C 雙基因小鼠(子代)之PCR分析結果**

PCR analysis of the offspring from bitransgenic animal (tet-on/pBi-EGFP-PDGF-C)#15, show the #15-04 #15-06 #15-14 have tet-on and pBi-EGFP-PDGF-C specific single. This result show the #15 can generation which implies that both transgenic vectors are localized on the same chromosome.



**9. 轉 Tet on / pTRE2hyg-PDGF-C 雙基因小鼠(雜代)之PCR分析結果**

(A) The PCR analysis results of tet-on (transgene tet-1) specific single in the result of 65 strains of the transgenic mice, #16 #20 #37 #52 #59 #64 shows positive results.  
(B) The PCR analysis results of pTRE2hyg-PDGF-C (transgene tet-4) specific single in the result of 65 strains of the transgenic mice, #16 #20 #37 #52 #59 #64 shows positive results.



**10. Tet on / pTRE2hyg-PDGF-C 轉雙基因小鼠(子代)之PCR分析結果**

The PCR analysis of the offspring from bitransgenic animal (tet-on / pTRE2hyg-PDGF-C)#16, show that #16-02 have tet-on and pTRE2hyg-PDGF-C specific signals and #16-02 only have tet-on single. This result show the #16 can generation which implies that both transgenic vectors are localized on different chromosome.

**表 1. 用以偵測各轉殖基因時所使用之寡核苷酸引子序列**

Tg tet-on	反義轉殖基因
tet-on-F6593	5'-AATTCGGTTCGCTTGTGCTGCATAAA-3'
tet-on-R6993	5'-GTCCCGCCCTAACCTCCGCCATCC-3'
Tg pBi-EGFP-PDGF-C 表現轉殖基因	
pBiEGFP-pdgfc-F5187	5'-AAAACCTCCACACCTCCCTGAACCTGAACAT-3'
pBiEGFP-pdgfc-R5521	5'-TCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAA -3'
Tg pTRE2hyg-PDGF-C 表現轉殖基因	
pTRE2hyg-pdgfc-F5753	5'-CACGGCGGAGATGCAATAGGTCAGG-3'
pTRE2hyg-pdgfc-R6201	5'-CTCCGCCAGTCCGCCATTCTCC-3'

**表 2. 各不同轉殖基因小鼠品系之產出效率**

組別	Tet 1+3	Tet 1+4
外源基因注射名稱	tg Tet-on	tg Tet-on
外源基因注射名稱	tg pBi-EGFP-PDGF-C	tg pTRE2hyg-PDGF-C
顯微注射方式	co-injection	co-injection
供胚小鼠品系	FVB	FVB
受胚小鼠品系	ICR	ICR
移置顯微注射受精卵數	108	182
分檢胎次	5	8
初生總仔鼠數	25	65
雙基因轉殖動物/注射受精卵數	0.93 %	3.8 %
雙基因轉殖動物/出生仔鼠總數	4.0 %	10.7 %
(F0)攜帶雙外源基因數	1	7
(F0)攜帶tet-on 基因數目	0	2
(F0)攜帶tet-on 基因數目	0	3

**表 3. 轉殖基因在各不同轉基因小鼠品系性腺中之傳承效率**

	Tet 1+3組	Tet 1+4組
F0 親代編號 / 性別	#7-3 / male	#12-3 / male
F1 總出生數	56	11
已分析之F1 總數	23	6
攜帶雙基因F1數目	3 (13%)	1 (16.7%)
攜帶單基因F1數目	0	1 (16.7%)