行政院國家科學委員會專題研究計畫　期中進度報告

建立全長第八因子的表達系統及從第八因子的細胞內運轉過程了解血友病的致病機轉(2/3)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC91-2314-B-002-184-
執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日
執行單位：國立臺灣大學醫學院醫事技術學系暨研究所

計畫主持人：林淑華

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中　華　民　國 92 年 5 月 29 日

中文摘要

A 型血友病是由於病人血液中缺乏第八因子活性所造成，此疾病為性聯遺傳，在男性發生率約五千到一萬分之一。第八因子由肝臟合成分泌，在血漿中第八因子濃度非常低(約為 100ng/ml)，與構造相似的蛋白－第五因子相比低了 100 倍。已知無任何細胞株可自然表現此蛋白，而體外細胞培養系統也無法大量合成第八因子（表現量比其它重組凝血因子蛋白低一百到一千倍)，使得第八因子在生合成及結構功能的相關研究、治療用蛋白的開發，以及基因治療上都受到限制。為了建立高產量的重組第八因子表達系統及適合活體細胞內觀察方法，以研究第八因子蛋白在細胞的生合成及運轉過程，故進行下列三方面實驗：一、利用肝細胞專一之載體 pBS-HCRHPI-A 於肝癌細胞株中表達全長之重組第八因子蛋白。二、以 FlAsH- EDT_2 染劑進行第八因子蛋白在肝細胞內之活體標定。三、參照血友病人的基因突變，建構六個點突變第八因子表達質體（突變 146、386、1689、1789、1823 及 1942)，並合成其重組蛋白，來進行相關研究。本研究目前已完成所有質體之建構，並以 DNA 定序確認；在建立第八因子活體標記系統上，已完成活體標定染劑 FlAsH- EDT_2 最適宜濃度及相關染色步驟的測試。在合成突變第八因子蛋白方面，已完成所表達質體，未來更可結合活體細胞標記法，比較各突變蛋白在肝細胞內生合成過程及分佈情形，探討各結構功能區之可能功能，將來可應用於更高效能、更具經濟價值之治療用重組第八因子蛋白之開發。

關鍵詞：凝血第八因子、哺乳細胞表達系統 、A 型血友病的致病的分子機制。

Abstract

FVIII functions as a cofactor of factor IXa in the blood coagulation. The disorder of FVIII deficiency causes hemophilia A, which is X-linked and is the most commonly inherited bleeding disease. FVIII is synthesized and secreted by the liver. It is present in plasma at a very low level (100 ng/ml) as compared to a very similar homology, FV (100 fold less than factor V). The mechanism for this difference has recently drawn a lot of attention because of its potential in facilitating hemophilia A gene therapy. Moreover, FVIII is poorly secreted by the liver and the reason for this is unclear. To solve all the above problems, we tested the vector (pBS-HCRHPI-A) that was provided by Dr. Miao from U. of Washington in three different cell lines (HepG-2, Hep3B and Huh7) for expressing the full-length factor VIII in the good level. For trace FVIII biosynthesis in intact cell, we genetically insert a small motif (17 residues) containing the sequence -Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys- into FVIII protein. This sequence can bind with a membrane-permeant biarsenical fluorophores, FlAsH-EDT_2. This study was decided to express wild-type FVIII and some mutants from hemophilia A patients. From comparison the intracellular fate and secretion of wild type FVIII and the mutants, we can understand the mechanism and pathological consequences of patients with hemophilia A. We have constructed wild-type FVIII expression plasmid and six FVIII mutants by site-directed mutagenesis. The insertion of tetracysteine motif into the 3’ terminal of WT and mutant FVIII expression plasmids were also completed and confirmed by sequence analysis. The set up of FVIII labeling in the living cells by FlAsH-EDT_2 staining is still in progress. We will first test labeling with transient expression of wild type FVIII, and then, six mutant FVIII proteins.

Keyword : factor VIII, expression system, intracellular fate and subcellular fractionation.

前言

A 型血友病是人類最常見的先天性出血性血液凝固異常疾病，此疾病是因為病人血液中缺乏第八因子(factor VIII)活性所導致，屬於性聯遺傳，發生率大約是每 5000-10000 男性中有一位（1,2）。第八因子是活化的第九因子（activated factor IX；FIXa）的輔因子；在凝血機轉中，活化的第九因子會切割活化第十因子（factor X），導致下游一連串酵素反應而產生血纖維凝塊（fibrin clot）使血液凝固（4），在此過程中，活化的第八因子可催化活化的第九因子切割第十因子的速率達 10000 倍以上（2）。

第八因子基因位於 X 染色體長臂的尾端（Xq28），基因全長 186 kb，含有 26 個表現序列（exon），mRNA 長約 9 kb，轉譯出 2351 個胺基酸的多鏈，19 個胺基酸為訊號胜月太鏈（signal peptide），因此成熟的第八因子具有 2332 個胺基酸（3,5）。依照與其他蛋白質胺基酸序列的相似性，第八因子蛋白可區分成 A、B、C 三種結構功能區（domain），由 N 端到 C 端依序為 A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2（5）；其中 a1、a2、a3 為酸性區域是含有多個天冬胺酸（Asp）及穀胺酸（Glu）的小間隔區，其構造與另一個凝血因子－第五因子非常相似。第八因子主要由肝細胞製造（6），在血漿中的濃度很低（約為 100ng/ml），是第五因子的百分之一（4,8）。在血液循環中第八因子會與 vWF 因子（von Willedrand factor）結合，形成非共價複合物。當成 vWF 因子解離並使第八因子活化，形成三聚體：A1-a1 / A2-a2 / A3-C1-C2，才具有輔因子活性（7）。有關第八因子和多種巨分子的重要結合區已被分析出來，在輕鏈（A3-C1-C2）上有 vWF 因子（9-11）、活化的蛋白質 C（12）及磷脂質（9）結合區，第九因子的結合區則位於 A2 及 A3 結構功能區（13），B 結構功能區則不參與第八因子的功能（9,14）。

針對 A 型血友病患的治療，除了由人類血漿純化所得的第八因子濃縮液外（15），目前已有從哺乳動物細胞作出的重組第八因子蛋白（recombinant FVIII protein）供應（16-18），但因合成量非常低，約為其他基因產量的一千到一萬分之一（23），使得重組第八因子蛋白價格昂貴，且產量一直無法滿足病人的需要，因此如何提昇重組蛋白的產量，是急待解決的問題。關於重組第八因子蛋白在細胞表達系統中表達量甚低，有下列幾個可能的機制，包括：一、第八因子 transcriptional silencer）使得訊息核酸（mRNA）表達量較差（20）。二、剛合成的第八因子蛋白在成熟過程中會與內質網內的 Bip 與 Calnexin 等 chaperone 互相作用，而滯留於內質網中無法成功分泌出細胞外（21）。三、第八因子蛋白本身極不穩定，分泌出細胞後，需與 vWF 因子結合以穩定結構且不被降解；然而在活體外表達系統中，常為了純化方便而不添加，使得第八因子在分泌的同時已有大量蛋白被降解（22）。近年來也有許多實驗室嘗試提昇重組第八因子蛋白的表達量，例如將第八因子 B 結構功能區刪除後，其蛋白活性與全長的第八因子蛋白並無差異，不但可縮短第八因子 cDNA 序列約 40%，還能有效提昇重組蛋白的產量達數十倍之多（由 0.02ng/10^6cells/24hr 提昇至 0.084ng/10^6cells /24hr；23）。此外，也有報告在第八因子 cDNA 序列中加入可提高重組蛋白表達量之第九因子 intron I，亦能提昇八到十五倍的產量（24）。

到目前為止，有關第八因子生合成的論文幾乎都是出自於 Dr. Kaufman 的實驗室（美

國密西根大學），且多數實驗室均使用無 B 結構功能區之重組第八因子蛋白進行分析，已知不具 B 結構功能區的第八因子蛋白在活性上等同於全長的第八因子，但無法証明其對第八因子在細胞內運轉等過程的影響，為了符合人體內的模式，本實驗室決定表達全長之重組第八因子蛋白，由於第八因子主要由肝臟製造，因此本實驗室決定在肝細胞株中進行第八因子之生合成及細胞內運轉過程之探討，並利用含有加強子（enhencer）、肝細胞專一性啟動子（Human á1-antitrypsin; hAAT promoter）、以及可提昇第八因子蛋白產量的第九因子之 intron I（24）的載體 pBS-HCRHPI-A 來進行實驗。因此本實驗計劃的第一個重點便是利用載體 pBS-HCRHPI-A 於肝癌細胞株中表達全長之重組第八因子蛋白。

Dr. Gaietta 在 2002 年時發表了一種新的活體細胞標記方式：利用能自由穿透細胞，具有雙硫鍵的 ReAsH- EDT_2 會與下列序列中的四個半胱胺酸（-Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys-；Xaa 為半胱胺酸外的任意胺基酸）進行高特異性及高親和力的結合，並於結合後才會發出綠色螢光的特性來進行活體細胞標記。這樣的標定方式不需先固定細胞，且該染劑對細胞的毒性亦不明顯，尤其只需在欲研究之蛋白 C 端加入含此序列的小片段胜月太鏈（4-20 個胺基酸），可使標定動作對欲研究之重組蛋白的影響降到最低。在該篇文章中，ReAsH- EDT_2）進行標定者 ReAsH-EDT_2 也會與上述序列中的四個半胱胺酸呈高特異性及高親和力結合，結合後則具紅色螢光。利用這兩種染劑螢光顏色之不同，可進行 pulse-labeling 的活體標記法，在不同時間點以不同染劑標定，藉由螢光顏色不同區分出不同時間合成的重組蛋白；此外，ReAsH- EDT_2 染劑亦可作為電顯觀察之標誌物，使得活體標定觀察之解析度可因電顯輔助而大有進展（25）。本實驗欲利用此標定方式進行重組第八因子蛋白之活體標定，來觀察第八因子的生合成及代謝過程。故本實驗計劃的第二個重點便是建立重組第八因子蛋白之 FlAsH- EDT_2 活體標定系統。

為了研究第八因子及 A 型血友病，本實驗室已對國內 A 型血友病患之基因突變作完整的分析，完成了 102 位（87 個不同家族）病人第八因子突變之鑑定，建立 A 型血友病患臨床表型及相關突變點之資料庫（26）。為了詳細探討第八因子的生合成及其構造與功能的相關性，本實驗室從病人資料庫中選定了數個位於不同結構功能區，臨床表型嚴重度亦不同之突變進行第八因子 cDNA 之定點突變，來對這些突變的重組第八因子蛋白進行研究分析。故本實驗計劃的第三個重點便是建構突變第八因子質體並表達其重組蛋白，以進行相關之結構功能探討。

研究目的

比較正常第八因子及病人的突變蛋白，研究其在肝細胞內生合成過程及運轉過程，研究造成第八因子低表現量的原因，並探討第八因子各結構功能區之可能功能，以期將來可應用於更高效能、更具經濟價值之治療用重組第八因子蛋白之開發。

研究方法

一、質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII 之建構

由於載體 pBS-HCRHPI-A 上沒有適用的限制脢，故先將連接子 SMS（Sac-MluI-SacI linker）接入其 NdeI 切割序列中，形成載體 pBS-HCRHPI-A－SMS；再將包含第八因子 cDNA 之質體 pYL1-fVIII 以限制脢 MluI 及 SalI 切割後，純化出含有全長第八因子 cDNA 大小 7.1 Kb 之 DNA 片段，接入載體 pBS-HCRHPI-A－SMS 中相同的限制脢位置，以 T_4 連接脢連結之；轉形（transform）至勝任細胞後，以兩條分別位在載體 pBS-HCRHPI-A－SMS 及第八因子 cDNA 上之引子組成 colony PCR 進行篩選。具有反應物之菌株再以限制脢 EcoRV 切割確認後，進行 DNA 定序分析。

二、肝癌細胞株之轉感（transfection）

本實驗中利用之人類肝癌細胞株（Hep3B、HepG2、Huh7）均以外加 10% FBS、2 mM L-glutamine、100 unit/ml penicillin、100 μg/ml streptomycin 之 DMEM（Dulbecco's modified Eagle's medium）培養液培養；繼代培養時，Hep3B 和 Huh7 以 0.05% Trypsin，HepG2 以 0.25% Trypsin 作用後，打散細胞，取適量細胞繼續培養。本實驗共使用了三種轉感方法：

(1) 電穿孔法（Electroporation）

各細胞株所用條件如下：

	細胞濃度 cells/ml	體積 ml	質體 DNA 量 μg	電擊緩衝液	電擊電壓 V	電擊電場 μF	溫度 ℃
Hep3B	7×10^6	0.5	40	MEM	320	500	25
HepG2	10^7	0.4	20	PBS buffer	300	960	on ice
Huh7	7×10^6	0.5	40	MEM	320	500	25

細胞電擊後於直徑 10 公分的培養皿中培養 48 小時後，進行觀察分析。

(2) 磷酸鈣沈澱法（calcium phosphate precipitation）

轉感前一天取適量之肝癌細胞株於六格培養盤（6-well plate）中培養 12 至 16 小時後，細胞生長達七成滿即可進行實驗。取 125 μl 質體 DNA（5 μg）加入 125 μl 氯化鈣溶液中，混合均勻後，以一秒一滴的速度緩慢加入 250 μl 的 2 倍 HBS 溶液（0.28 M Nacl / 1.5 mM sodium phosphate / 50 mM Hepes，pH 7.1）並同時打入氣泡，以利於磷酸鈣沈澱之產生。加完後劇烈震盪 20 秒並靜置室溫 20 分鐘，再均勻加進細胞培養液，培養 16 小時後，再以 PBS 沖洗細胞三次，繼續培養 48 小時後進行觀察分析。

(3)lipofection 轉感法

利用 Lipofectamine™ 2000 轉染試劑組（invitrogen™ life technologies Corp.，CA，USA）進行轉染。在轉感前一天取適量之肝癌細胞株以 2 ml 不含抗生素之培養液於六格培養盤（6-well plate）中培養 12 至 16 小時，細胞生長達九成滿即可進行實驗。分別將欲轉染之質體 DNA 與 10 μl Lipofectamine™ 2000 轉染試劑稀釋於不含血清的 250 μl Opti-MeM® 培養液中，靜置室溫 5 分鐘後，將兩者均勻混合，置於室溫 20 分鐘，再均勻加進細胞培養液，培養 48 小時後進行觀察分析。

三、質體 TA-fVIII -CTCD 之建構

引子 fVIII-CTCD 全長 86bp，為反向引子，包含第八因子 cDNA 3`端序列（18bp），並於轉譯終點（TGA）前插入 16 個胺基酸，其中含有四個半胱胺酸，最後接上限制脢

SalI 切割序列（5`-AAA/CGC/GTC/GAC/TCA/TGC/CCT/AGC/ACA/ACA/CTC/CCT/ACA/ACA/AGC/CTC/CCT/TGC/GGC/AGC/CTC/TGC/GAT/GAG/GTG/GTG/TGC/CTC/GC-3`）。利用此引子與位在第八因子 exon 23 之引子 8E23U 進行聚合酶連鎖反應，得到長度約 600 bp 之反應產物，然後接入載體 y T&A^{TM} 中（TA cloning kit，益生生技公司，台灣），完成質體 TA－fVIII－CTCD 之建構，並進行 DNA 定序分析確認。

四、質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII -CTCD 之建構

質體 TA－fVIII－CTCD 以限制酶 SalI 及 SwaI 切割後，純化出 600 bp 之 DNA 片段，再接入質體 pBS-HCRHPI-A－SMS－fVIII 上相同的限制酶位置；再轉形（transform）至勝任細胞，利用限制酶 PstI 切割篩選，並進行 DNA 定序確認。

五、以染劑 FlAsH- EDT_2 進行活體細胞標記

利用 FlAsH- EDT_2 Labeling Kit（PanVera Corp. , WI, USA）進行肝癌細胞株活體標記。先將欲標記細胞以 PBS 沖洗二次後，與染劑 FlAsH- EDT_2 0.125 μM （溶於 10 μM EDT／1g/l 葡萄糖／HBSS 中）於 37℃作用一小時後，再以清洗緩衝液（250 μM EDT／1g/l 葡萄糖／HBSS）沖洗 2 次，每次各 10 分鐘。最後再以 PBS 沖洗細胞三次，並利用 4% formardehyde 進行固定，完成封片後即可於螢光顯微鏡下觀察。

六、突變第八因子質體之建構

之前實驗室已參照數位血友病患之第八因子基因突變，來進行第八因子 cDNA 之定點突變，本人接續對這些突變第八因子進行 DNA 定序，確定該突變點正確且該區段其他序列亦未改變後，選擇適當的限制酶將含有突變點之 DNA 片段切出（因各突變點不同而有差異），純化後接入質體 pYLI-fVIII 及 pBS-HCRHPI-A-SMS- fVIII－CTCD 上相同的限制酶切點，與正常第八因子 cDNA 進行置換，利用 colony PCR 及限制酶切割進行篩選後，進行 DNA 定序分析確認。

結果與討論

壹、利用載體 pBS-HCRHPI-A 於肝癌細胞株表達全長重組第八因子蛋白

一、質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII 之建構

以 SalI 及 MluI 切出質體 pYL1-fVIII 上的第八因子 cDNA，接入同樣經 SalI 及 MluI 切割之載體 pBS-HCRHPI-A－SMS，完成質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII（圖一）之建構。為確認質體中第八因子 cDNA 之完整性（3`具　譯　讀　終　[illegible]06）及轉譯起始序列（ATG，位在第八因子 cDNA 核　　[illegible]1）前並未因建構動作而構成其他轉譯起點，利用位在載體 pBS-HCRHPI-A SMS 上引子（primer: pBSCF）及位在第八因子 cDNA exon 25 之引子（primer: 7003U）定序第八因子 cDNA 與載體 pBS-HCRHPI-A－SMS 頭尾連接處，確定沒有發生錯誤。

二、肝癌細胞株轉感方式之選擇

第八因子主要由肝細胞合成，為了符合在人體內的表達模式，故構築了會專一性表達於肝細胞中的表達載體 pBS-HCRHPI-A－SMS-fVIII；由於之前報告顯示，重組第八因子蛋白表達量會因不同細胞株而有差異，故選用三種人類肝癌細胞株（Hep3B、 HepG2

及 Huh7）進行表達研究。為找出各細胞株轉感效能最好（transfection efficiency）之轉感方式，我們使用三種方法（電穿孔法、磷酸鈣沈澱法及 lipofection 轉感法），以綠螢光表達質體（pEGFP-C3）進行測試，轉感 48 小時後觀察有表達綠螢光蛋白之細胞比例來了解轉感效能，結果顯示這三種細胞以 lipofection 轉感法進行轉感時，其效能較其它兩種方法好，平均可以有三成左右的細胞表現綠螢光，因此之後實驗均選擇以 lipofection 轉感法進行轉感。

三、lipofection 轉感法之最佳化

根據 Lipofectamine™ 2000 產品說明書建議，可調整質體 DNA (μg)與 lipofectamine（μl）之比例以得到最佳效果，因此我們取用不同量之質體 pEGFP-C3 與 10μl lipofectamine 反應，依下列比例（1:0.5, 1:1.5, 1:2.5, 1:3.5 及 1:5）來進行 lipofection 轉感，48 小時後觀察表達綠螢光蛋白之細胞比例，在同為細胞全滿情況下，螢光顯微鏡 200 倍視野下隨機選取 10 個視野進行細胞計數來比較，其結果見表一。Hep3B 及 HepG2 在 DNA (μg)與 lipofectamine 10μl 作用比例 1:1.5 的轉感效能較好，而 Huh7 則在作用比例 1:3.5 時有較好的轉感效能。

貳、重組第八因子蛋白在肝細胞株內之活體標定

一、質體 pBS-HCRHPI-A－SMS－fVIII－CTCD 之建構

為了進行活體細胞標記法，故在第八因子蛋白 C 端加上一小段胜肽含有下列序列-Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys-（Xaa 為半胱胺酸外的任意胺基酸），可被 FlAsH- EDT_2 染劑結合染色。我們利用聚合酶連鎖反應設計之引子（primer: fVIII-CTCD），包含第八因子 cDNA 3`端序列及插入的限制酶 SalI 切割點。將引子 fVIII-CTCD 與引子 8E23U 進行聚合酶連鎖反應，得到的反應產物接入 TA cloning 的質體中構成質體 TA－fVIII－CTCD，經過 DNA 定序分析後，確定含有所需之 DNA 片段且方向正確。藉由引子 fVIII-CTCD 所外加之 SalI 限制酶切點及原本位在第八因子 cDNA 上之單一限制酶切點 SwaI，便可將所需 DNA 片段從 TA－fVIII －CTCD 切出，接入質體 pBS-HCRHPI-A－SMS-fVIII 同樣的位置上，完成質體 pBS-HCRHPI-A－SMS－fVIII－CTCD。以引子 8E23U 進行 DNA 定序分析，確定轉譯終點前已成功插入具四個半胱胺酸序列之 DNA 片段。

二、測試活體標記中染劑 FlAsH- EDT_2 等溶液對活體細胞毒性

為了確定活體標記的步驟及使用溶液不會傷害細胞，我們先以下列幾組溶液與細胞 37℃作用一小時，包括 1) 0.125μM FlAsH- EDT_2 染劑溶於 10μM EDT／1g/l 葡萄糖／1 倍 HBSS 中，2)10μM EDT／1g/l 葡萄糖／1 倍 HBSS 溶液，3) 1g/l 葡萄糖／1 倍 HBSS 溶液，4)0.01%酒精／1g/l 葡萄糖／1 倍 HBSS 溶液（EDT 分子溶於酒精中，最後染劑中酒精濃度約為 0.01%），再以 250μM EDT／1g/l 葡萄糖／1 倍 HBSS 溶液沖洗 2 次，每次各 10 分鐘，然後固定封片，觀察細胞形態是否受影響，以確保染色步驟不會對活細胞有影響。結果顯示細胞形態都沒有受到影響，表示這些溶液不會對細胞造成傷害。

四、染劑 FlAsH- EDT_2 進行活體細胞標記之適合濃度測試

為了選出染劑 FlAsH- EDT_2 最適合的濃度，我們先測試 0.125μM FlAsH- EDT_2 及

0. 5 μM FlAsH- EDT_2 對細胞進行染色，在螢光顯微鏡下觀察細胞非特異性結合的情形。如圖二 Hep3B 的結果顯示，0. 5 μM FlAsH- EDT_2 產生的非特異性背景太強，0.125 μM FlAsH- EDT_2 的背景較能接受，其他兩種細胞結果相同，故之後實驗將會使用 0.125 μM FlAsH- EDT_2 來進行肝癌細胞株活體標記試驗。

參、突變重組第八因子蛋白之表達

一、突變第八因子 cDNA 之序列分析

對這些突變第八因子進行 DNA 定序分析，來確定該突變點正確且該區段其他序列亦未改變。附件六為突變 1789（位在 A3 結構功能區）之定序 [illegible]76 至 6719，確定突變點 1789 在核酸 [illegible]72 上由 C 變成 T，所轉譯之胺基酸亦由異白胺酸（Isoleucine）轉變為苯丙胺酸（Phenylalanine），而該區段其他序列並未改變。

二、突變重組第八因子表達質體之構築

之前本實驗室已收集多個臨床表型嚴重度不同之 A 型血友病患，並選擇其中六個突變點，包含突變 146、386（位在 A1 結構功能區），突變 1689、1942、1823 及 1789（位在 A3 結構功能區），進行第八因子 cDNA 定點突變（表二）。本人接續將上述突變第八因子 cDNA 片段，以適當的限制脢接入質體 pYLI-fVIII 中，與正常的第八因子 cDNA 進行置換。為了在肝細胞株中表達及進行活體標記，進一步將含有突變的 DNA 片段由 pYLI-fVIII (mutant) 質體上以適當的限制脢切出，於 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII -CTCD 質體上進行置換動作。目前六個突變之表達質體均構築完成，連接點及以及突變點附近之 DNA 定序也已完成，確認無誤。之後將表達於肝癌細胞株內，合成突變的重組第八因子蛋白，進行活體細胞標記等工作，比較與正常第八因子蛋白在肝細胞內生合成等過程之異同，來探討各突變所造成的影響。

參考文獻

1. Galjaard H. Genetic metabolic disease (Elsevier, New York, 1980)
2. Van Dieijen G, Tans G, Rosing J, and Hemker HC (1987). *J. Biol. Chem.* 256:3433
3. Gitschier J, Kogan S, Levinson B, and Tuddenham EGD (1988). *Blood* 72:1022
4. Hoyer L W. (1994). Hemophilia A [Review]. *The New England Journal of Medicine* 330:38
5. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, Amphlett GW, Foster WB, Coe ML, Knutson GJ, Fass DN, and Hewick RM (1984). *Nature* 312:342
6. Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EGD, and Lawn RM (1985). *Nature* 317:726
7. Eaton D, Rodriguez H, and Vehar GA (1986). *Biochemistry* 25:505
8. Fay P J (1993). *Thrombosis and Haemostasis* 70:63
9. White, G. C. d., and Shoemaker, C. B. (1989) *Blood* 73(1), 1-12
10. Foster, P. A., Fulcher, C. A., Houghten, R. A., and Zimmerman, T. S. (1988) *J Biol Chem* **263**(11)**,** 5230-4
11. Precup, J. W., Kline, B. C., and Fass, D. N. (1991) *Blood* **77**(9)**,** 1929-36

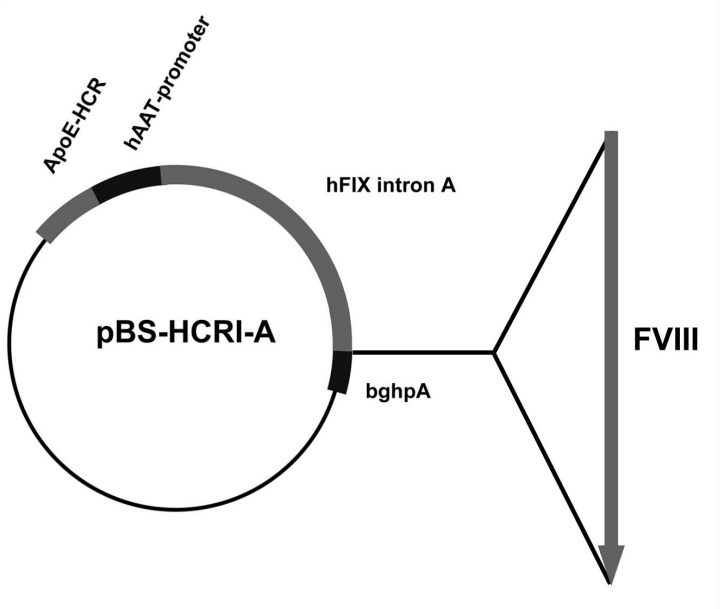
12. Walker, F. J., Scandella, D., and Fay, P. J. (1990) *J Biol Chem* **265**(3)**,** 1484-9
13. Fay, P. J., Beattie, T., Huggins, C. F., and Regan, L. M. (1994) *J Biol Chem* **269**(32)**,** 20522-7
14. Toole, J. J., Pittman, D. D., Orr, E. C., Murtha, P., Wasley, L. C., and Kaufman, R. J. (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(16)**,** 5939-42
15. Gill FM (1984). *In Factor VIII inhibitors*, ed Hoyer LW (Liss, New York), 19
16. Connelly S, and Kaleko M (1997). *Thrombosis and Haemostasis* 78:31
17. Chuah MK, Vandendriessche T, and Morgan RA (1995). *Human Gene Therapy* 6:1363
18. Dworki VJ, Belloni P, Nijjar T, Smith J, Couto L, Rabier M, Clift S, Berns A, and Cohen LK (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1023
19. Kaufman RJ, Pipe SW, Tagliavacca L, Swaroop M, and Moussalli M (1997) *Blood Coagul Fibrinolysis* 8(Suppl. 2), S3.
20. Lynch CM, Israel DI, Kaufman RJ, and Miller AD (1993) *Hum Gene Ther* 4, 259.
21. Dorner, AJ, Bole, DG, and Kaufman, RJ. (1987) *J Cell Biol* 105, 2665.
22. Fay PJ (1988) *Arch. Biochem. Biophys*. 262,525.
23. Saenko EL, Loster K, Josic D, and Sarafanov AG (1999) *Thromb. Res*. 96, 343.
24. Carol HM, Kazuo O, Gijsbert AP, Leonard M, Xin Y, Arthur RT, and Mark AK. (2000) *Mole.Ther* 1,522
25. Guido G, Thomas JD, Stephen RA, James B, Oded T, Dale WL, Gina ES, Roger YT, and Mark HE (2002) *Science* 296: 503
26. Lin, SW, Lin, SR and Shen, MC. (1993) *Genomics* 18: 496-504.

計畫成果自評

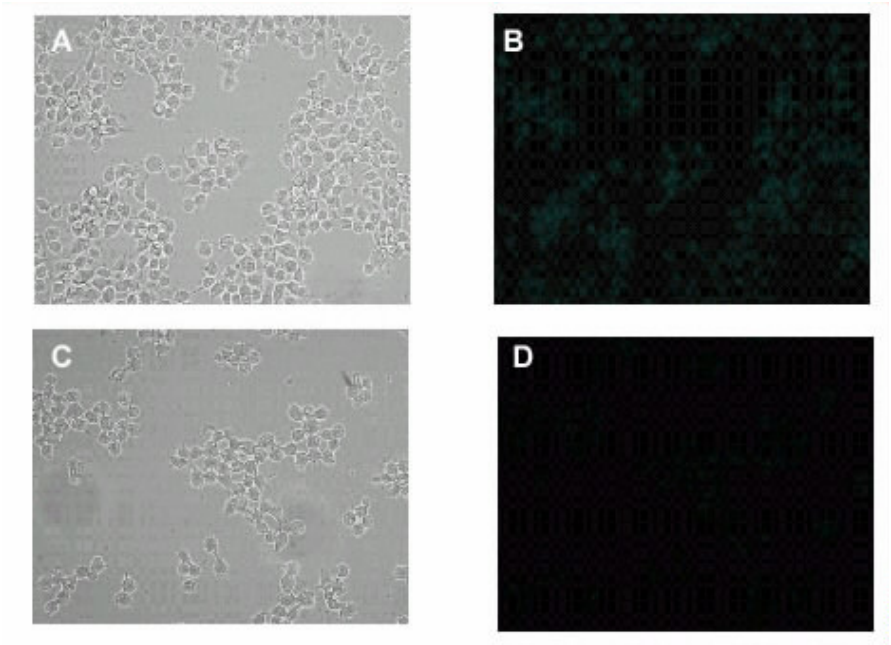
本研究至目前已完成所有載體之建構，並以 DNA 定序確認之。為能於肝細胞株中表達重組第八因子蛋白，亦針對各肝癌細胞株建立效率最好之轉感步驟，故未來可在最符合人體內的模式下，對重組第八因子蛋白之生合成過程及產量進行分析，來克服目前在重組第八因子蛋白上之重大難題。

此外，本實驗亦嘗試建立第八因子活體標記步驟，進而改善傳統以抗原抗體螢光染色標定法所遇到的重重困難。目前已初步測試活體標定染劑 FlAsH- EDT_2 最適宜濃度及相關染色步驟，並已成功建構於第八因子蛋白 C 端加上具四個半胱胺酸質體，以供活體標記使用。未來可利用此一標記方式，對重組第八因子在活體細胞內之生合成、運轉及降解過程進行分析，該標記法還能以電顯觀察及具有 pulse-labeling 的特性，可得到較抗原抗體螢光染色更高解析度之觀察結果，且可追蹤正常生理情形下的變化。

除了正常的第八因子外，本實驗亦收集臨床表型嚴重度不同之 A 型血友病患之基因突變，合成具點突變之重組第八因子蛋白。目前已完成所有的表達載體，未來更可結合染劑 FlAsH- EDT_2 進行活體細胞標記法，針對於肝細胞內之生合成、運轉及降解過程及分佈情形進行比較，探討各突變造成的影響以及各結構功能區可能具有之角色，以利於日後開發具更高效能、更具經濟效益之治療性重組第八因子蛋白。



圖一、質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII 結構簡圖。載體上同時具有脂蛋白原 A 加強子（ApoE-HCR）、肝細胞專一性啟動子（hAAT promoter）、第九因子 intron I（hFIX intron A）及 3'端 untranslated 區域（3'-UTR）及 polyadenylation signal（bghpA）。



圖二：染劑 FlAsH- EDT_2 進行 Hep3B 活體細胞標記之適合濃度測試。圖 A, B 和 C, D 分別為 0. 5 μM FlAsH- EDT_2 及 0.125 μM FlAsH- EDT_2 細胞 +染色結果。其中圖 A, C 為 200 倍視野可見光下觀察結果，而圖 B, D,為相同視野螢光下觀察結果。

表四： Hep3B、 HepG2 及 Huh7 lipofection 轉感法之最佳條件測試。質體

pEGFP-C3 DNA 與 10 μl lipofectamine，依不同比例進行 lipofection 轉感，48 小時後 200 倍視野下表達綠螢光蛋白細胞顆數。

質體 DNA 與 lipofectamine 比例	載體 DNA PEGFP-C3 μg	Lipofectamine μl	200 倍視野下表達綠螢光蛋白細胞平均顆數		
			Hep3B	HepG2	Huh7
1: 0.5	20	10	31.5	10	26
1: 1.5	6.67	10	49	26.5	38.75
1: 2.5	4	10	33.5	22.5	43.75
1: 3.5	2.86	10	23.5	15.25	62.3
1: 5	2	10	19	13.5	26

表五：已進行定點突變及表達質體構築之突變第八因子。

臨床表型嚴重度			突變情況				構
	病人血液第八因子蛋白濃度(ng/ml)	病人血液第八因子蛋白活性(%)	胺基酸位置	所位結構能 區	核 酸 突	胺基酸突變	質
輕型	6.253	7.2	1789	A3	CTT→TTT	Leu→Phe	B S
中度形	2.79	**4.6**	1823	A3	ATG→ATA	Met→Ile	B S
嚴重形	0.944	<1	146	A1	CCA→TCA	Pro→Ser	S K
	0.6	<1	386	A1	ATT→AGT	Ile →Ser	S K
	4.61	<1	1689	A3	CGC→CGT	Arg→Cys	B S
	0	<1	1942	A3	TGG→TAG	Trp→stop	B S