

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

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(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-002-264-

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：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 16 日

研究成果報告

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，故進行下列實驗：一、利用肝細胞專一載體 pBS-HCRHPI-A 於肝癌細胞株中表達全長之重組第八因子蛋白。二、參照 hydrodynamics- based transfection 建立小鼠活體內重組第八因子蛋白表達系統。三、以 FIASH- EDT₂ 染劑進行第八因子蛋白在肝細胞內之活體標定。四、利用高純度的重組第八因子蛋白進行抗第八因子單株抗體之製備。五、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；在活體外培養哺乳動物細胞株表達系統中，進行穩定表達重組第八因子蛋白細胞株之選殖；在小鼠活體表達系統中，除已建立相關條件和分析方式外，分析更偵測到蛋白表達量較以往表達系統高出 500 倍之多。另外於活體標記系統上，已完成活體標定染劑 FIASH- EDT₂ 最適宜濃度及相關染色步驟的測試；在抗第八因子單株抗體之製備上，也挑選出八個細胞聚落進行第二次限數稀釋，以得單株化細胞株。未來可利用活體標記技術，在活體外及表現量超高的活體小鼠表達系統，分析正常第八因子在肝細胞內生合成

及運轉過程，以探討第八因子低表現量的原因外；更可比較該過程於正常第八因子及病人的突變蛋白之異同，以了解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。

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。

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 個胺基酸的多肽鏈；其中第 1 - 19 個胺基酸為訊號肽鏈（signal peptide），成熟的第八因子具有 2332 個胺基酸（3,5）。依蛋白質胺基酸序列，可將第八因子蛋白區分成 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 Willebrand factor）結合，形成非共價複合物。一旦經凝血酶切割後，第八因子會與 vWF 因子解離並活化，形成三聚體：A1-a1 / A2-a2 / A3-C1-C2，始具有輔因子活性（7）。活化第八因子以輕鏈（A3-C1-C2）與 vWF 因子（9-11）、活化的蛋白質 C（12）及磷脂質（9）結合，而第九因子的結合區則位於 A2 及 A3 結構功能區（13），另外 B 結構功能區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），為避免血液疾病傳染病，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）；但由於基因太大（cDNA 為 7kb

作出 2351 胺基酸)，且只有哺乳細胞製造出來的第八因子才有功能，無法使用其他系統表達，合成量非常低，約為其他重組蛋白產量的一千到萬分之一(23)，使得重組第八因子蛋白不但價格昂貴，且產量一直無法滿足病人的需要。另一方面，基因治療現在仍在臨床第 I-II 期試驗階段(19-21)，無法取代現行的治療方式，因此如何提昇重組蛋白的產量，在未來十年內仍是急待解決的問題。

關於重組第八因子蛋白在細胞表達系統中表達量甚低，有下列幾個已知原因，包括：一、第八因子核苷酸序列中具轉錄抑制子(transcriptional silencer)使得訊息核苷酸(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 因子結合成穩定結構以不被降解；在活體外表達系統中，常為純化方便而不添加 vWF 因子，使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 $0.02\text{ng}/10^6\text{cells}/24\text{hr}$ 提昇至 $0.084\text{ng}/10^6\text{cells}/24\text{hr}$ ；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，雖然不具 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；但由於 B 結構功能區佔第八因子大部分 N-link 胺基醣化位置(25 個中的 18 個)，目前尚無法證明此高度修飾的結構功能區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，本實驗室使用肝細胞株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(enhancer)、肝細

胞專一性啟動子 (Human α 1-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，並著手進行穩定表達重組第八因子蛋白的肝細胞株之選殖。

同時，由於以往以活體外培養哺乳動物細胞株表達全長重組第八因子蛋白，產量都很低（約為 $0.02\text{ng}/10^6\text{cells}/24\text{hr}$ ；23），僅為其他重組蛋白產量一千到萬分之一；受限於重組蛋白表達量的問題，無法進一步分析。為此，本實驗室參照 hydrodynamics- based transfection 的原理：將含高濃度欲表達基因質體 DNA 的 PBS 緩沖液，在極短時間（約 6-8 秒）內，以大量體積用尾巴靜脈注射方式注入小鼠體內；約 24 小時後，即可觀察到活體小鼠肝臟表達該重組蛋白，並可在周邊血測得。依文獻表示，以 luciferase 測試，每 $5\mu\text{g}$ 的質體 DNA，可以生成約每克肝細胞組織中含 $45\mu\text{g}$ 重組蛋白；而以組織染色也可觀察到，在注入 β -galactosidase 質體 DNA 後，也有近四成的肝組織細胞有該重組蛋白之表達（27）。有鑑於此表達方式的高產量，本實驗室亦應用於重組第八因子蛋白之表達；以期克服傳統在活體外表達系統之低產量問題，並可進一步觀察在活體內表達系統（*in vivo* culture system）中，第八因子在肝細胞內的生合成及相關運轉過程。

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，具有雙鉍的染劑 FIAsH- 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肽鏈（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，作者還利用了另一雙鉍染劑（ReAsH- EDT_2 ）進行標定，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-EDT₂ 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。

由於第八因子分子巨大，且分泌濃度很低，因此探討第八因子的生合成及結構功能關係的研究相當不易，大都必須依賴單株抗體的使用。雖然市面上有一些第八因子的單株抗體可供使用，但一般皆十分昂貴，且可適用的用途也不廣，如 American Diagnostica 公司生產的 ESH 系列單株抗體，只有註明抗體抑制第八因子活性的能力，及少數抗體的應用項目，某些只適用於免疫沈澱但不適用於西方點墨法，有些反之。實驗室自備單株抗體的好處在於可以大量供應，還可以用於篩選病人突變的第八因子、純化第八因子、以及研究第八因子細胞內的代謝（包括正常及突變）。之前實驗室利用大腸菌合成的第八因子融合蛋白，產生了三株對結構功能區具專一性的單株抗體，D2、E6 及 B12；其中 D2 及 E6 分別作用於第八因子輕鏈及 B 結構功能區的 N 端，B12 則作用於 A1 結構功能區，D2 及 B12 分別可抑制第八因子活性 80% 以上。但由於對第八因子的親和力均太低（以 biosensor 儀器測得，D2： $1.62 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ，E6： $2.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ，B12 則太低無法偵測），且為了得到更多作用於第八因子蛋白不同結構功能區的單株抗體，以為日後對重組第八因子蛋白之分析應用，本實驗室亦利用高純度重組第八因子蛋白（Hemofil M, Baxter 公司所提供）免疫小鼠，進行第八因子單株抗體之製備。

為詳細探討第八因子的生合成及其構造與功能的相關性，之前本實驗室已對國內 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)。本實驗中，進一步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，針對這些突變的重組第八因子蛋白進行研究分析，以進行相關之結構功能探討。

研究目的

利用活體外哺乳動物肝細胞株及活體小鼠之表達系統，分析正常第八因子在肝細胞內生合成及運轉過程，以探討第八因子低表現量的原因。同時比較該過程於正常第八因子及病人的突變蛋白之異同，以了解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

壹、質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII 之建構

由於載體 pBS-HCRHPI-A 上沒有適用的限制酶，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 以限制酶 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 中相同的限制酶位置，以 T₄ 連接酶連結之；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酶 EcoRV 切割確認後，進行 DNA 定序分析。

貳、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 μ g/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：

一、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 μ g	電擊緩衝液	電擊電 V	電擊電 μ F	溫度 $^{\circ}$ C
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。

二、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 125μ l 質體 DNA (5μ g) 加入 125μ l 氯化鈣溶液中，混合均勻後，以一秒一滴的速度緩慢加入 250μ l 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。

三、lipofection 轉感法

利用 Lipofectamine™ 2000 轉染試劑組 (invitrogen™ life technologies 公司) 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 10μ l Lipofectamine™ 2000 轉染試劑稀釋於不含血清的 250μ l 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。

參、hydrodynamics- based transfection 重組蛋白表達法

一、hydrodynamics 小鼠尾巴靜脈注射

欲表達基因質體 DNA 以 Endofree™ Plasmid Mega kits (Qiagen 公司)

抽出，並取適量之基因質體 DNA 稀釋於注射用 PBS 緩沖液中。取四周大之 ICR 品系公鼠，在 6-8 秒內，每隻小鼠以 22 號針頭由尾巴靜脈注射入含 100 μ g 質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII DNA 之 2 毫升 PBS 緩沖液。在固定時間點後，以眼窩採血法收集老鼠周邊血，離心取得血漿後，即可利用酵素連結免疫吸附試驗 (ELISA) 分析老鼠血漿中人類重組第八因子蛋白之含量；同時犧牲小鼠，取得小鼠肝臟製成切片，進行肝臟切片免疫染色分析。

二、人類重組第八因子蛋白酵素連結免疫吸附試驗

取實驗室自備抗第八因子單株抗體 D2 稀釋在 50 mM bicarbonate 緩沖液中，使濃度為 20 μ g/ml，各取 100 μ l 加入 96 孔微量盤中，在 4 $^{\circ}$ C 吸附過夜後，用 TBST 清洗三次，加入含 5% 脫脂牛奶的 TBST 於 4 $^{\circ}$ C 作用過夜，之後置於 4 $^{\circ}$ C 保存。測量檢體時，取出適當數量的微量盤，吸掉 TBST 溶液後，用 TBST 清洗三次，依序加入 100 μ l 待測檢體（稀釋於 TBS/ 0.1%BSA 當中），在 4 $^{\circ}$ C 作用過夜後，再加入稀釋 5000 倍有鹼性磷酸酶標示的抗第八因子多株抗體 (Enzyme Research Laboratory 公司)，在室溫作用兩小時後，用 TBST 清洗三次，最後加入受質溶液 Enhanced K-Blue[®] TMB Substrate (Neogen 公司) 在室溫作用 15 分鐘，呈色後放入微量盤判讀儀 (SPECTRAmax340 microplate reader, Molecular Devices 公司)，於波長 450nm 下讀取吸光值。

肆、重組第八因子蛋白之活體標定

一、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，最後接上限制酶 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&ATM 中 (TA cloning kit,

益生生技公司)，完成質體 TA—fVIII—CTCD 之建構，並進行 DNA 定序分析確認。

二、質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII -CTCD 之建構

質體 TA—fVIII—CTCD 以限制酶 SalI 及 SmaI 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。

三、以染劑 FlAsH- EDT₂ 進行活體細胞標記

利用 FlAsH- EDT₂ Labeling Kit (PanVera 公司) 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- EDT₂ 0.125 μ M (溶於 10 μ M EDT/1g/l 葡萄糖/HBSS 中) 於 37°C 作用一小時後，再以清洗緩衝液 (250 μ M 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% formaldehyde 進行固定，完成封片後即可於螢光顯微鏡下觀察。

伍、抗第八因子單株抗體製備

一、小鼠免疫

選用 6 週大、純品系的 BALB/c 小鼠，第一次免疫取等體積的重組第八因子蛋白 (75 μ g, 由 Baxter 公司所提供) 溶液與 Freund 完全佐劑 (Freund's complete adjuvant, Sigma 公司) 混合完全後，採皮下注射，共免疫三隻小鼠。之後每隔十天追加免疫一次，皆以等體積的重組第八因子蛋白溶液與 Freund 不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant, Sigma 公司) 混合，進行皮下注射。分別於免疫前、第三次及第五次免疫後一週自眼角採血，以 ELISA 檢測血清中抗體效價，並選取第五次後，血清稀釋 10⁵ 倍下仍具高效價小鼠，於一個月後進行最後一次免疫，直接注射重組第八因子蛋白溶液至腹腔內，3 天後進行細胞融合。

二、細胞融合及單株抗體的製備

取出免疫小鼠的脾細胞與小鼠骨髓瘤細胞 P3/NS-1/1 Ag4 1 (NS-1) (由台

大微生物研究所蔡錦華博士贈與)，以 2:1 的比例混合，加入 PEG4000 進行細胞融合 (28)。融合瘤細胞經過 HAT 培養基篩選，然後收集培養液，以 ELISA 篩選分泌第八因子抗體的細胞聚落，然後選取呈陽性反應的融合瘤細胞聚落接著進行限數稀釋法 (limiting dilution)，以得到單株化細胞株。

三、以酵素連結免疫吸附試驗篩選融合瘤細胞

將全長重組第八因子蛋白 (由 Baxter 公司所提供) 稀釋在含 5mM 鈣離子的 TBS 溶液中，使濃度為 1 μ g/ml，各取 100 μ l 加入 96 孔微量盤中，在 4 $^{\circ}$ C 吸附過夜後，用 TBST 清洗三次，加入含 5% 脫脂牛奶的 TBST 於 4 $^{\circ}$ C 作用過夜，之後置於 4 $^{\circ}$ C 保存。測量檢體時，取出適當數量的微量盤，吸掉 TBST 溶液後，用 TBST 清洗三次，依序加入 100 μ l 待測檢體 (稀釋於 TBS/ 0.1%BSA 當中) 或是細胞培養上清液，在室溫作用三小時後，再加入稀釋 5000 倍有鹼性磷酸酶標示的抗老鼠免疫球蛋白 (pharmacia 公司)，在 37 $^{\circ}$ C 作用兩小時後，用 TBST 清洗三次，最後加入受質溶液 Enhanced K-Blue[®] TMB Substrate (Neogen 公司) 在室溫作用 15 分鐘，呈色後放入微量盤判讀儀 (SPECTRAmax340 microplate reader, Molecular Devices 公司)，於波長 450nm 下讀取吸光值。

陸、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，本實驗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'具譯讀終點核苷酸 7206)及轉譯起始序列(ATG，位在第八因子 cDNA 核苷酸 151)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 (μ g) 與 lipofectamine (μ l) 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 10 μ l 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 (μ g) 與 lipofectamine 10 μ l 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。

四、穩定表達重組第八因子蛋白肝細胞株之選殖

利用之前測試轉感效能最好的作用條件，在欲表達之肝細胞株中進行質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII 及抗藥性質體 pSV2-neo 之 lipofection 共同傳感，再進行傳感細胞株抗藥性篩選(G418 selection)。為確定所篩選出抗藥性細胞株也同時具有第八因子質體，進行轉感時，我們將質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII 及質體 pSV2-neo 的濃度調為 10:1。轉感 24 至 48 小時後，以適量比例繼代培養，並同時以適當濃度 G418 進行細胞株抗藥性篩選，約一星期後得到抗藥性細胞株。

貳、hydrodynamics- based transfection 重組蛋白表達

一、注射後重組蛋白最高表達天數測試

為確定小鼠施與 hydrodynamics 尾巴靜脈注射後，重組第八因子是否會表達及表達最高天數，分別在進行 hydrodynamics 尾巴靜脈注射 100 μ g 質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII DNA 後的 24、48、72、96 小時，取小鼠周邊血，分析老鼠血漿中人類重組第八因子蛋白之含量，結果如圖二。可見小鼠以此重組蛋白表達法，最高表現量可到 5.799 ng/ml（約為正常人體內含量 5.8 %），最高表達天數則在進行 hydrodynamics 尾巴靜脈注射後的 24 小時（平均每隻為 2.427 ng/ml）至 48 小時（平均每隻為 1.513 ng/ml）間。

二、注射質體 DNA 量與重組蛋白表達量關係

為找出達最高重組蛋白表達量時，所需小鼠尾巴靜脈注射的質體 DNA 量，我們測試了每隻老鼠分別施打 100、150、200、300 μ g 質體

pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII DNA 24 及 48 小時後，小鼠周邊血中人類重組第八因子蛋白之含量，結果如圖三、圖四。以施打 $100\mu\text{g}$ 質體

pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII DNA 的表達量最高；注射後 24 小時重組第八因子蛋白產量最高，平均每隻為 2.427 ng/ml （約為正常人體內含量 2.5%），48 小時後則平均每隻產量為 1.513 ng/ml （約為正常人體內含量 1.5%）為次高。

參、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 端加上一小段胜肽鏈，此胜肽鏈含有下列序列-Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys-（Xaa 為半胱胺酸外的任意胺基酸），可被 FIASH-EDT₂ 染劑結合染色。我們利用聚合酶連鎖反應來插入所需的核苷酸序列，所設計之引子（primer: fVIII-CTCD），包含第八因子 cDNA 3' 端序列及插入的核苷酸序列及限制酶 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 SmaI，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 FIASH-EDT₂ 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°C 作用一小時，包括 1) $0.125\mu\text{M}$ FIASH-EDT₂ 染劑溶於 $10\mu\text{M}$ EDT / 1g/l 葡萄糖 / 1 倍 HBSS 中，2) $10\mu\text{M}$ 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 $250\mu\text{M}$ 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。

三、染劑 FlAsH- EDT₂ 進行活體細胞標記之適合濃度測試

為了選出染劑 FlAsH- EDT₂ 最適合的濃度，我們先測試 0.125 μ M FlAsH- EDT₂ 及 0.5 μ M FlAsH- EDT₂ 對細胞進行染色，在螢光顯微鏡下觀察細胞非特异性結合的情形。如圖五 Hep3B 的結果顯示，0.5 μ M FlAsH- EDT₂ 產生的非特异性背景太強，0.125 μ M FlAsH- EDT₂ 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 μ M FlAsH- EDT₂ 來進行肝癌細胞株活體標記試驗。

肆、抗第八因子單株抗體製備

一、小鼠免疫

利用高純度的重組第八因子蛋白進行 6 週大、純品系的 BALB/ c 小鼠免疫，不會有之前文獻所提，利用部份純化的第八因子免疫動物所遇到的困難 (29)，也可避免血漿第八因子製劑內含大量白蛋白，造成小鼠有強烈的抗白蛋白等反應。經五次免疫後，將依序採得眼角血，以 ELISA 檢測血清中抗體效價；並選取其中一隻在第五次免疫後，血清稀釋 10⁵ 倍下仍具高效價小鼠進行細胞融合。

二、細胞融合及單株抗體的製備

取出免疫小鼠的脾細胞與小鼠骨髓瘤細胞 NS-1 以 2:1 的比例混合，加入 PEG4000 進行細胞融合，並將融合瘤細胞分至 12 盤 96 孔微量盤中，進行一週的 HAT 培養基篩選，然後收集培養液，以 ELISA 篩選分泌第八因子抗體的細胞聚落，結果有四個融合瘤細胞聚落呈陽性反應。接著再進行這四個融合瘤細胞聚落之限數稀釋，把每株融合瘤細胞聚落以每孔 10 個細胞及每孔 1 個細胞分別分到 96 孔微量盤中，再收集培養液，以 ELISA 篩選，並挑選其中陽性反應較強的八個細胞聚落再進行限數稀釋，以得到單株化細胞株。

伍、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）之定序結果，分析了核苷酸 5076 至 6719，確定突變點 1789 在核苷酸 5572 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，以適當的限制酶接入質體 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酶切出，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。

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，有鑑於以往以活體外培養哺乳動物細胞株表達全長重組第八因子蛋白產量偏低的問題，本實驗室亦參照 hydrodynamics- based transfection 的方式，建立小鼠活體內重組第八因子蛋白表達系統。目前系統相關條件和分析方式均以建立完成，且初步分析，該系統表達量最高可達正常人體內濃度的 5.8 %，較以往實驗室以傳統活體外培養哺乳動物細胞株產量多 500 倍以上，如此高產量對日後在第八因子相關研究分析上將更具優勢。

而本實驗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 FIAsh- EDT₂ 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胜肽序列之表達質體，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。

為使日後研究工具更為多樣性且便利，也有鑑於目前市面上所提供之第八因子單株抗體，昂貴且用途不廣。本實驗室也利用高純度的重組第八因子蛋白進行抗第八因子單株抗體之製備。目前已挑選出八個陽性反應較強的細胞聚落進行第二次限數稀釋，最後所得到的單株化細胞株大量製備後，可用於篩選病人突變的第八因子、純化第八因子、以及研究第八因子細胞內的代謝（包括正常及突變）。

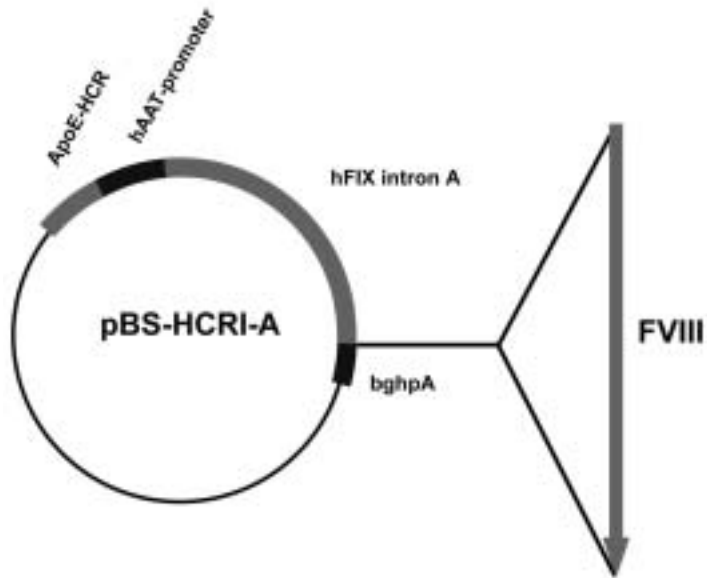
除了正常的第八因子外，本實驗亦收集臨床表型嚴重度不同之 A 型血友病

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- EDT₂ 進行活體細胞標記法，同時在活體外及活體內表達系統中，針對第八因子在肝細胞內之生合成、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。

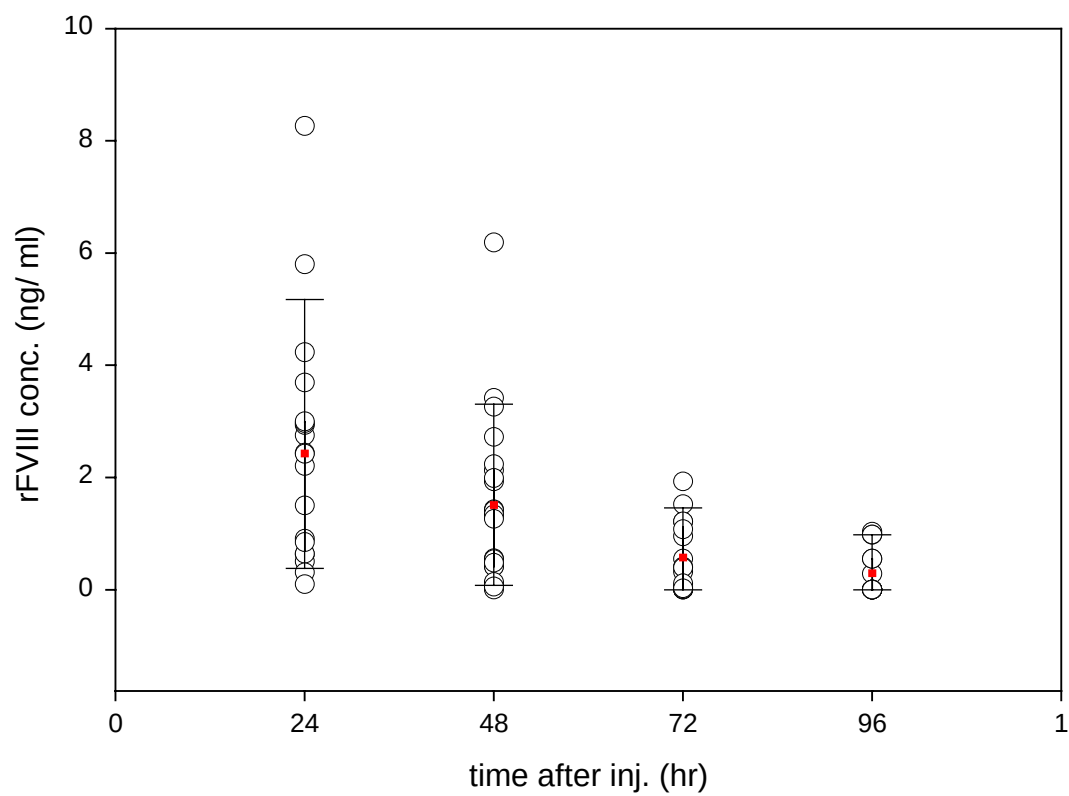
參考文獻

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

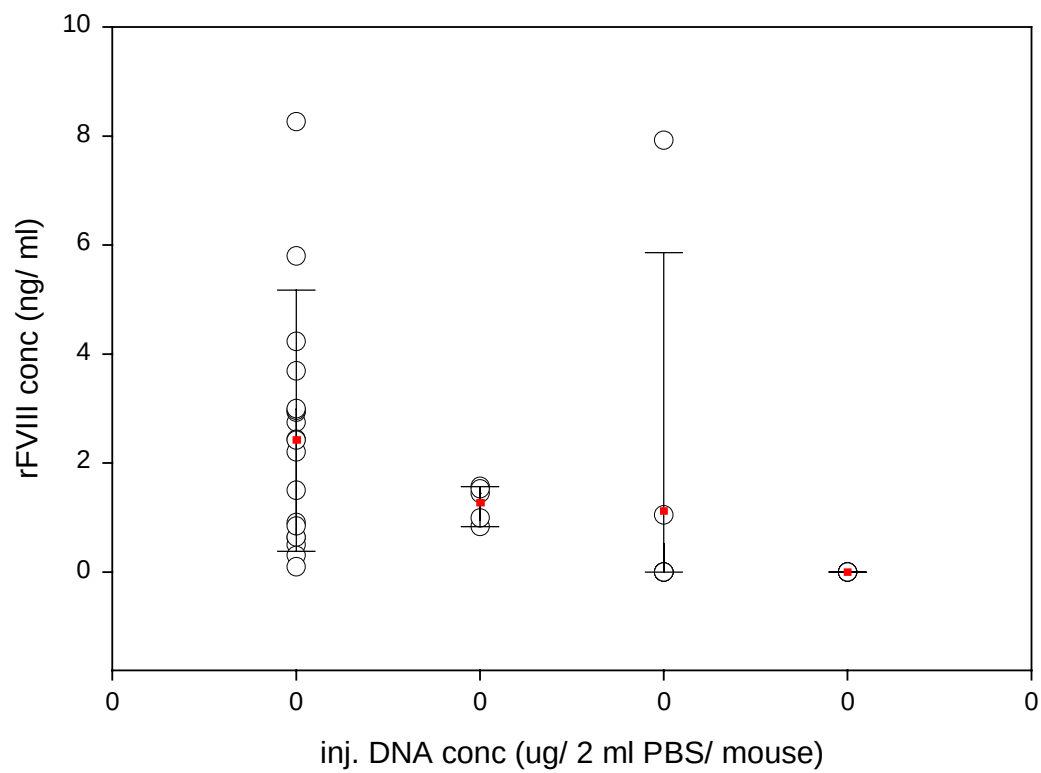
17. Chuah MK, Vandendriessche T, and Morgan RA (1995). *Human Gene Therapy* 6:1363
18. Dworki VJ, Belloni P, Nijjar T, Smith J, Couto L, Rabier M, Clift S, Berns A, and Cohen LK (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1023
19. Kaufman RJ, Pipe SW, Tagliavacca L, Swaroop M, and Moussalli M (1997) *Blood 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
27. Liu, F, Song, YK and Liu, D. (1999) *Gene Ther* 6: 1258
28. Harlow E., and Lane D. (1988) *Monoclonal antibodies*. pp.139-244, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
29. Brown J. E., Thuy L. P., Carton C. L., and Hougie C. (1983) *J Lab Clin Med* 101:793



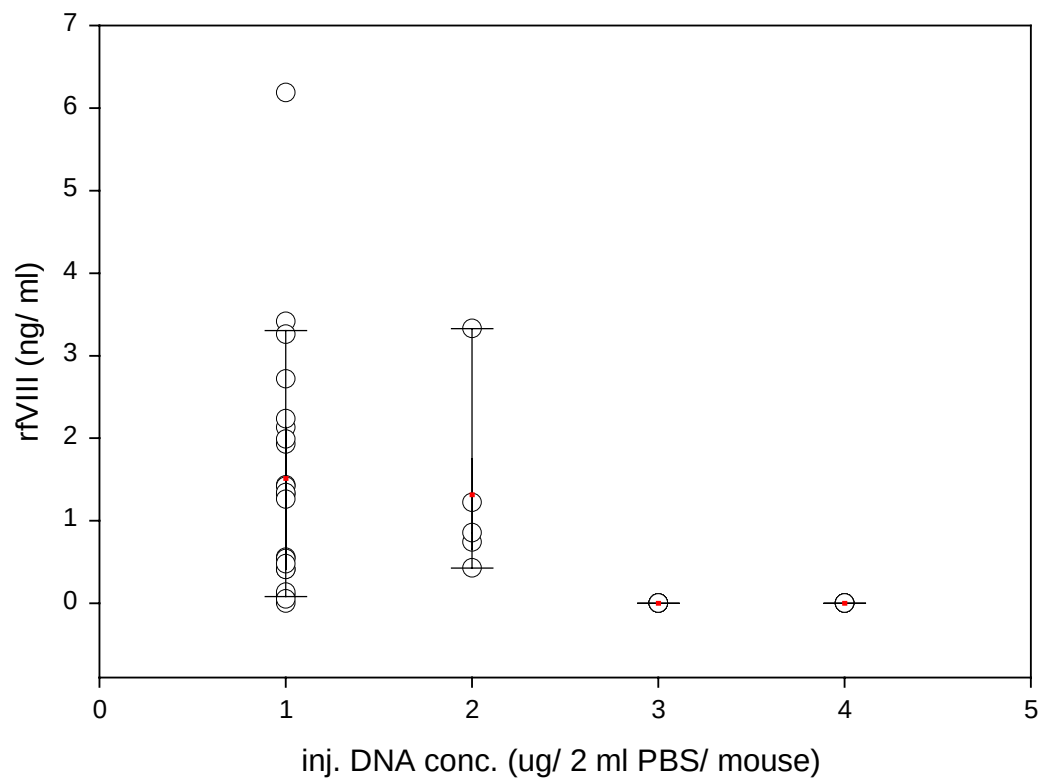
圖一、質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII 結構簡圖。載體上同時具有脂蛋白原 A 加強子 (ApoE-HCR)、肝細胞專一性啟動子 (hAAT promoter)、第九因子 intron I (hFIX intron A) 及 3'端 untranslated 區域 (3'-UTR) 及 polyadenylation signal (bghpA)。



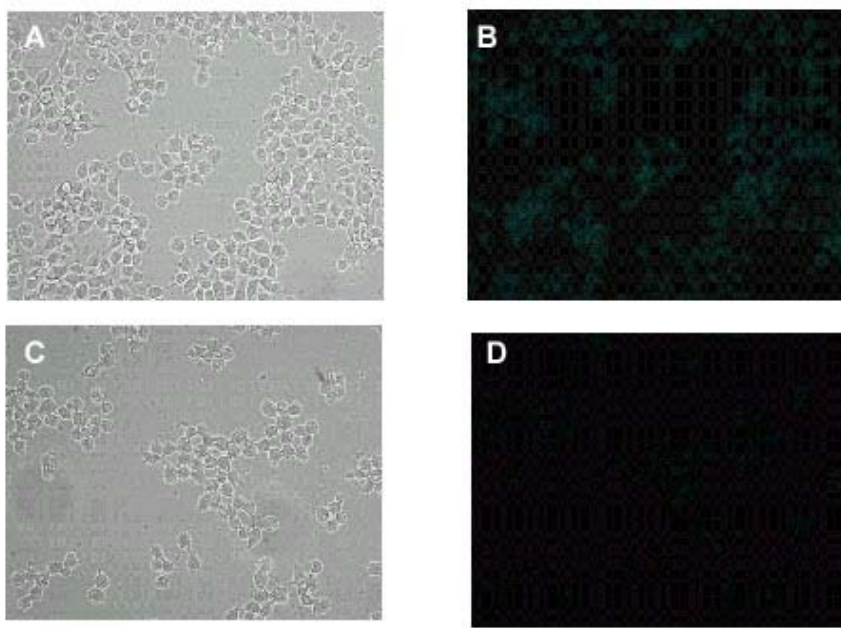
圖二、進行 hydrodynamics 尾巴靜脈注射 $100 \mu\text{g}$ 質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII DNA 後的 24、48、72、96 小時，老鼠血漿中人類重組第八因子蛋白含量之平均值與標準差。



圖三、老鼠分別施打 100、150、200、300 μ g 質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII DNA 24 小時後，周邊血中人類重組第八因子蛋白含量之平均值與標準差。



圖四、老鼠分別施打 100、150、200、300 μ g 質體 pBS-HCRHPI-A-SMS-fVIII DNA 48 小時後，周邊血中人類重組第八因子蛋白含量之平均值與標準差。



圖五：染劑 FlAsH- EDT₂ 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 μ M FlAsH- EDT₂ 及 0.125 μ M FlAsH- EDT₂ 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。

表一： Hep3B、 HepG2 及 Huh7 lipofection 轉感法之最佳條件測試。質體 pEGFP-C3 DNA 與 10 μ l 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 μ g	Lipofectamine μ l	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

表二：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				構築質體使用限制酶在第八因子 cDNA 上位置	
	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	所位結構功能區	核苷酸突變	胺基酸突變	質體 pYLI-fVIII(mutant)	質體 pBS-HCRHPI-A-SM S- fVIII -CTCD(mutant)
輕型	6.253	7.2	1789	A3	CTT→TTT	Leu→Phe	BstEII (核苷酸 5076) SwaI (核苷酸 6719)	Eco47III (核苷酸 1980) SwaI(核苷酸 6719)
中度形	2.79	4.6	1823	A3	ATG→ATA	Met→Ile	BstEII (核苷酸 5076) SwaI (核苷酸 6719)	Eco47III (核苷酸 1980) SwaI(核苷酸 6719)
嚴重形	0.944	<1	146	A1	CCA→TCA	Pro→Ser	SmaI(核苷酸 596) KpnI(核苷酸 1965)	MluI(核苷酸 151 前) Eco47III(核苷酸 1980)
	0.6	<1	386	A1	ATT→AGT	Ile →Ser	SmaI(核苷酸 596) KpnI(核苷酸 1965)	MluI(核苷酸 151 前) Eco47III(核苷酸 1980)
	4.61	<1	1689	A3	CGC→CGT	Arg→Cys	BstEII (核苷酸 5076) SwaI (核苷酸 6719)	Eco47III (核苷酸 1980) SwaI(核苷酸 6719)
	0	<1	1942	A3	TGG→TAG	Trp→stop	BstEII (核苷酸 5076) SwaI (核苷酸 6719)	Eco47III (核苷酸 1980) SwaI(核苷酸 6719)