

行政院國家科學委員會補助 大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** 計 畫 ***** : LRWD1 蛋白質中 LRR 及 WD 重複序列在細胞的功能探討
* 名 稱 *****

執行計畫學生： 郭昱廷

學生計畫編號 : NSC 97-2815-C-041-002-B

研究期間：97年07月01日至98年02月28日止，計8個月

指導教授：鄧燕妮

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 嘉南藥理科技大學生物科技系(所)

中華民國

98 年 03 月 31 日

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* 計畫 *
* : LRWD1 蛋白質中 LRR 及 WD 重複序列在細胞的功能探討 *
* 名稱 *

執行計畫學生：郭昱廷

學生計畫編號：NSC 97-2815-C-041-002-B

研究期間：97 年 7 月 1 日至 98 年 2 月底止，計 8 個月

指導教授：鄧燕妮

執行單位：嘉南藥理科技大學生物科技系

中華民國 98 年 03 月 31 日

第一章、緒論

第一節、男性不孕症的原因

造成男性不孕症的原因大致分為遺傳性與非遺傳性因素〔1〕。非遺傳性因素包括：環境、生活習慣、生理等因素；在環境因素部份，例如過度曝露在高溫或毒素污染的環境下，而使得睪丸的造精功能及精子的品質變差；不良的生活習慣，如抽菸、喝酒、熬夜和工作上的壓力等等，都會影響精子的活動力；生理因素方面，例如精索靜脈曲張(varicocele)、輸精管切除(vasectomy)、睪丸扭轉(testicular torsion)或性功能障礙等疾病〔1〕。遺傳性因素方面，已知造成人類男性不孕的原因包括：（1）、決定性別與生殖腺發育的基因發生突變，例如congenital bilateral absence of the vasdeferens (CBAVD) 的病人，其cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 基因發生突變，使蛋白質功能發生異常，影響輸精管(vasdeferens) 正常發育〔4, 5〕。（2）、內分泌異常(endocrinopathies)：哺乳動物的繁殖能力受下視丘-腦下垂體分泌的賀爾蒙調控著；下視丘分泌Gonadotropin releasing hormone (GnRH) 會刺激腦下垂體分泌黃體生成激素(luteinizing hormone, LH) 及濾泡刺激激素(follicle-stimulating hormone, FSH)，刺激睪丸組織產生成熟的精子。當調控賀爾蒙分泌的基因，例如 human GnRH processing enzyme gene (PC1) 或GnRH

receptor gene 發生突變時，造成腦下垂體性腺激素功能低下症（hypogonadotropic hypogonadism, HHG）和不孕症〔6, 7, 8, 9〕。(3)、染色體數目、結構異常：染色體數目異常方面，主要以47 XXY Klinefelter's syndrome 病人最常見，其主要臨床症狀為生殖器官發育不良（hypogenitalism）、生殖腺官能不足（HHG）及四肢細長等症狀〔10〕；染色體結構異常方面包括：異位（translocation）、倒轉（inversion）、缺失（deletion）。臨床發現，大約有25~30%患有造精功能障礙的不孕症病人中，無法找出真正的原因，將其歸類為不明原因的不孕症〔11〕。最近幾年分子生物技術的發展，以小鼠為模式，已知精子形成過程中有許多基因共同負責調控此一複雜的程序〔12〕；但大部分參與哺乳動物睪丸發育與精子形成過程相關的基因大部分仍是未知的〔13〕。

第二節、哺乳類動物之精子形成過程（Spermatogenesis）

哺乳類動物之精子形成過程發生在睪丸組織中，睪丸是由許多的曲精小管（seminiferous tubule）所組成，其內有精原細胞（spermatogonia）及賽透力細胞（Sertoli cell, SC），在曲精小管之間有萊狄吉細胞（Leydig cell, LC）。複雜的精子形成過程發生在曲精小管中〔圖一〕。人類胚胎時期約7-8週左右其睪丸組織已分化完全

〔14〕。胚胎發育早期時，睪丸組織基本組成是primordial germ cells (PGCs) 及somatic cells。其中premordial germ cells 會分化成精原細胞，而somatic cells 會分化成睪丸組織內的支持性細胞 (Sertoli cell) 及賀爾蒙分泌細胞 (Leydig cell)。從胎兒出生到男性青春期前 (prepubertal) 這段期間，精子的發育一直停留在精原細胞時期。於青春期開始後，腦下垂體會分泌黃體生成激素 (LH) 和濾泡刺激激素 (FSH)，LH 刺激睪丸組織中的Leydig cell 分泌睪固酮 (testosterone)，促使曲精小管內的精原細胞開始進行一系列複雜的精子形成過程；而FSH 則刺激曲精小管內的Sertoli cell 分泌一些物質以提供精子形成過程所需。精子形成過程由多重且複雜的程序所調控著，睪丸組織中的生殖細胞 (germ cells) 連續進行有絲分裂 (mitosis) 、減數分裂 (meiosis) 及後減數分裂 (post-meiotic phases) 等不同的分化階段〔15, 16, 17〕。其主要由未分化的 diploid spermatogonia ($2n$ ，雙倍體) 開始進行一系列分化過程，最後形成具有功能的成熟精子 haploid spermatozoa (n ，單倍體)。整個精子形成過程大致分為三個階段：（一）、精原細胞期 (spermatogonia phase or spermatocytogenesis)：在男性青春期時，因受到睪固酮的分泌而刺激精原細胞開始進行有絲分裂，此階段會形成三種不同型態的細胞，依其形狀可分成dark type A (Ad) 、pale type A (Ap) 及type B spermato-

gonia；其中type Adspermatogonia 代表未分化的幹細胞(stem cells)，其具有自我更新（self-renew）能力，同時也可分化成type Ap spermatogonia，再繼續分化成type B spermatogonia，最後分化為初級精母細胞（primary spermatocyte）。(二)、減數分裂期（meiotic phase or meiosis）：初級精母細胞會進行型態上的改變，依序為前線狀染色體精母細胞（preleptotene spermatocyte）、線狀染色體精母細胞（leptotene spermatocyte）、核分裂接合期精母細胞（zygotene spermatocyte）、前粗絲期精母細胞（early pachytene spermatocyte）、中粗絲期精母細胞（mid pachytene spermatocyte）及後粗絲期精母細胞（late pachytene spermatocyte），接著進入第一次減數分裂，形成次級精母細胞（secondary spermatocyte），次級精母細胞進行第二次減數分裂變為精細胞（spermatid）；(三)、精子形成期（spermatid phase or spermiogenesis）：精細胞含有23條染色體，在此階段精細胞會進行形態上的變化，慢慢成為成熟的精子（spermatozoa），此步驟使圓形頭的精細胞變成卵圓形頭的精子，並形成頂體（acrosome）部分，其裡面含有水解酶（hydrolyzing enzyme）可使精子穿透卵子；含粒腺體的中節（middle piece）形成，產生能量並形成尾巴向前推進；最後喪失細胞質形成殘餘體（residual body），當精子離開後，這些殘餘體會被Sertoli cell所吞噬〔18〕。整個生殖細胞分化過程中會慢慢由曲精小

管的周圍往管腔 (lumen) 中央移動，而漸漸形成成熟的精子，此精子生成所需的時間約74天〔19〕（圖二）。

第三節、原發性造精功能異常的組織學變化

造精功能障礙的致病機轉所知有限〔20〕。患有造精功能障礙的男性其第二性徵的發育可能與正常男性並無差異，雖然同樣有睪丸的形成，但是其精子的數目卻低於標準值 ($20 \times 10^6/\text{mL}$)。依據精液中精子數目的多寡將造精功能異常情形，分為：（1）無精子症（Azoospermia）：指精液中完全沒有精子存在；（2）精子減少症（Oligozoospermia）：指精子數目少於 $20 \times 10^6/\text{mL}$ ；（3）多精子症（Polyzoospermia）：指精子數目大於 $250 \times 10^6/\text{mL}$ 。另外，畸形精子症（Teratozoospermia）：是指70%以上精子的外觀異常，但精子數目正常〔21〕。睪丸組織病理切片檢查上，依造精功能受阻礙程度的不同區分為四種類型：（1）、正常造精功能的睪丸組織（Normal spermatogenesis, NR）：於睪丸組織切片中可見Sertoli cells (SC)、spermatogonia (Spg)、spermatocyte (Spc) 及 maturing spermatid (Spd) 等分化的生殖細胞型態；（2）、造精功能低下的睪丸組織（Hypospermatogenesis, HS）：其睪丸組織切片與正常的睪丸組織切片相同，也具有分化的生殖細胞型態，雖有成熟精子產生，但數量稀

少；（3）、造精功能停滯的睪丸組織（Maturation arrest, MA）：其最成熟的細胞型態為round spermatid，沒有成熟的精子產生；（4）、缺乏生殖細胞的睪丸組織（Sertoli cell-only syndrome, SCOS）：為最嚴重的睪丸組織病變，完全沒有生殖細胞（germ cells）存在〔22, 23〕（圖三）。

第四節、LRWD1基因文獻回顧

根據實驗室前人研究利用cDNA微晶片分析的方式〔24, 25〕，比較正常睪丸組織（NR）與造精功能障礙患者睪丸組織（MA或SCOS）間基因的表現差異和蛋白質二級結構及功能預測，顯示三種不同物種同源性基因所產生的蛋白質二級結構具有LRR domain（Leucine Rich Repeat, LRRs）及WD domain根據蛋白質預測的結果中此一未知基因所產生的蛋白質具有LRRs和WD 40 domain，其於生物體中具有許多不同的功能與作用。因此，推測此一未知基因可能於複雜的精子形成過程中扮演一重要角色。為了解人類BC030547此一未知基因mRNA於人類及小鼠不同組織的表現情形。LRRs是由20-29個胺基酸所組成的一種型式，一般序列為LxxLxLxxN/CxL在蛋白質序列的排列方式為前後重複。WD domain由40個胺基酸所組成，廣泛存於真核生物中，其一般序列為X11-24...GH...X23-41...WD，含有 glycine-histidine（GH）和

tryptophan– aspartic acid (WD) 故又名WD40 domain。

第五節、研究動機及策略

根據前人研究（25），LRWD1 mRNA 在不同組織中的表現，主要大量表現於人類睪丸組織中，其他組織中僅有微量表現，小鼠 AK084948 同源性基因 mRNA 的表現，主要也是大量表現於成熟小鼠的睪丸組織中，於腦、胃及卵巢組織僅有微量表現，以小鼠 AK084948 mRNA 的 RT-PCR 結果顯示，開始表現於出生後第 35 天的睪丸組織中，且一直持續表現到成熟小鼠階段。顯示此小鼠 AK084948 mRNA 主要為精子發育過程的後期表現基因。因此，推測人類 LRWD1 基因可能也為參與調控精子發育過程晚期的調控。

因此本研究擬以特定點突變方式將LRWD1上的LRR及WD1、WD2、WD3重複區域剔除，以瞭解LRR及WD1、WD2、WD3重複區域對於LRWD1與其他蛋白質結合的影響，進而推測LRWD1在生殖的功能與角色。

本研究中所使用的vector為Promega公司所設計的pHaloTag-pHT2 vector，使用此vector的原因是因為此vector在細胞內只表現HaloTag fusion protein此protein大小為33kDa，利用專一的HaloTag ligand即可有效偵測fusion protein，也可進一步做純化或分離，而一般的方法都用

螢光tag protein來觀察，耗時且困難，有時fusion tag甚至會干擾研究目標蛋白在胞內的位置。

第二章、材料與方法

以site-specific mutagenesis by overlap extension的方式分別將LRR及WD 1、WD2、WD3區域剔除，完成已分別剔除LRR、WD1、WD2、WD3的pHaloTag-pHT2-LRWD1的構築。以剔除WD1區域為例，利用BC030547-F2和BC030547-R3兩種primer，將因為WD1區域被去除掉的關係分成兩段的DNA用聚合酶鏈反應（Polymerase Chain Reaction）的方式接起來然後構築載體，LRR所使用的primer是BC030547-R3和BC030547(delLRR)-(F)，做出剔除LRR區域的DNA片段，剔除LRR和剔除WD1、WD2、WD3區域的構築載體完成後，再使用transformation送入*E.coli*大量製造，再從*E.coli*中抽出質體確認，然後transfection入GC-2 cell進行表現，再使用免疫螢光分析和西方墨點法觀察。

第一節、載體構築

首先分析 BC030547 及載體 pHaloTag-pHT2 (promega) 的 DNA 序列，尋找載體上適合的限制酶切點，並且避免 BC030547 基因序列內有相同切點，最後決定利用 *NheI* (Fermentas) 及 *BamHI* (Fermentas) 分別作為 BC030547 5' 端及 3' 端的切點（圖四）。

第二節、使用聚合酶鏈反應（Polymerase Chain Reaction）製造 insert

利用之前實驗室所製備好的pHaloTag-pHT2/BC030547的質體DNA為模板DNA再以所設計的primer進行聚合酶鏈反應（表一）（圖五）。

第三節、限制酶處理（restriction enzyme digestion）

使用 *Nhe*I (Fermentas) 和 *Bam*HI (Fermentas) 處理 pHaloTag-pHT2 vector (promega) 和用聚合酶鏈反應做出的 insert : LRWD1-del LRR、LRWD1-del WD1、LRWD1-del WD2、LRWD1-del WD3 置於 37°C 中反應 1 個小時，再置於 80°C 中 20 分鐘去活性，完成後就可進行接合反應（ligation）。

第四節、接合反應（ligation）

將已經過限制酶處理好的 vector : pHaloTag-pHT2 vector 和 insert : LRWD1-del LRR、LRWD1-del WD1、LRWD1-del WD2、LRWD1-del WD3 分別進行接合反應，加入 ligase (New England Biolabs, NEB) 和 10X ligase buffer (New England Biolabs, NEB) 置於 16°C 反應 2 個小時（圖六）（圖七）（圖八）（圖九），完成後即可進行轉型作用（transformation）。

第五節、大腸桿菌的轉型作用 (transformation)

將接合好的質體DNA加入已置於冰上解凍的大腸桿菌DH5α勝任細胞 (1 μ lligation mixture/10 μ l DH5α) ，以42°C水浴熱休克 (heat shock) 作用進行轉型作用，將質體送到細菌體內，然後塗在LB (Luria-Bertani, LB) +amp (ampicillin, amp) 的plate上，在37°C下培養over night。

第六節、質體萃取與確認

於 14000 rpm 離心 1 分鐘使菌體沉澱，完全去除上層培養液，利用鹼性溶菌法 (alkaline lysis) 分解細菌並萃取質體，一開始加入 70 μ l solution I (50mM glucose 、 25mM Tris-HCL pH8.0 、 10mM EDTA pH8.0)，劇烈震盪打散沈澱菌體，再加入 140 μ l solution II (10N NaOH 、 10% SDS)，翻轉 1.5 ml 微量離心管 (eppendorf) 數十次後，此時細菌因溶解而使溶液由淡黃色轉為澄清黏稠狀態，最後加入 105 μ l solution III (5M KAc 、 acetic acid)，翻轉 1.5ml 微量離心管數十次後出現白色懸浮物，以 14000 rpm 離心 5 分鐘。轉移上層含核酸的上清液至新的 1.5 ml 微量離心管，再加入 260 μ l 的異丙醇 (isopropanol) 於 1.5 ml 微量離心管中，均勻混合後以 14000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液。將沉澱物再加入 70% 酒精清洗，以 14000 rpm

離心 1 分鐘，然後風乾後，溶於 30 μ l 含 10 μ g/ml RNase TE buffer 中，在 37°C 中作用 15 分鐘，然後使用瓊脂膠體電泳確認分析質體濃度，接著以限制酶在 37°C 下作用 1 小時，進一步使用瓊脂膠體電泳確認分析載體構築。

第七節、細胞培養

本研究所使用的來自 Mouse spermatocyte (GC-2) cell。此細胞培養於含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 、1%NEAA (non essential amino acid, NEAA) 、1%Pyruvate、1%P/S (Penicillin/Streptomycin) 的 high glucose DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) 培養液中，培養環境為 37°C，5% CO₂。將細胞開始種於 25 cm² 培養皿中，大約兩天更換一次培養液，當細胞生長達培養皿九成滿時，用 1ml 0.5% trypsin-EDTA 溶液，於 37°C 作用 2 分鐘，將細胞打下，加入配置好的培養液將細胞均勻沖散，依實驗目的不同進行繼代培養 (subculture)。

第八節、質體的轉染 (transfection)

將構築好的 pHaloTag-pHT2-LRWD1、pHaloTag-pHT2-LRWD1-del LRR、pHaloTag-pHT2-LRWD1-del

WD1、pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD2、pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD3, 各取 0.8 μ g 分別加到 50 μ l 沒加胎牛血清的 high glucose DMEM 培養液中，再分別加入 50 μ l 沒加胎牛血清的 high glucose DMEM 培養液含有 2 μ l 的 lipofectamine 2000 (invitrogen) 轉染試劑，靜置 20 分鐘，就可分別加到已放入玻片的 12 孔盤中，靜置四小時後將培養液抽出換有加胎牛血清的 high glucose DMEM 培養液，24 小時候即可進行免疫螢光分析實驗。

第九節、免疫螢光分析 (immunofluorescence assay, IFA)

將前一天轉染完成的12孔盤中的GC-2 cell 每一孔都加0.5ml甲醇靜置15分鐘，再用PBS清洗一次，然後每一孔加入0.5ml 0.5% TritonX-100/PBS靜置15分鐘，再用1X TBS清洗兩次各5分鐘，接著加入每一孔加入0.5ml 3% BSA/PBS作用1小時以進行blocking反應，抽掉溶液後每孔加入25 μ l一級抗體anti-LRWD1 mAb (1 : 100 dilution) 4 $^{\circ}$ C overnight，再以TBST清洗兩次各5分鐘，再用1X TBS清洗一次5分鐘，然後每孔加入50 μ l二級抗體FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (1 : 200 dilution)，室溫避光作用一小時，再以TBST清洗兩次各5分鐘，再用TBS清洗一次5分鐘，然後每孔加入50 μ l DAPI染劑 (1 : 10 dilution) 作用3分鐘，作用完後用TBS清洗一下，就可進行封片，然

後觀察。

第十節、西方墨點法 (Western blot)

將 SDS-PAGE 完成的凝膠，利用垂直式轉印槽(Mini Trans-Blot Cell, Bio-rad)將蛋白質轉印到轉印膜 (PVDF transfer membrane) 上。

首先轉印膜與帶有樣品之凝膠一同浸泡於轉印緩衝液 (transfer buffer, 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, pH=8.3)後，將膠體置於負極，上方覆蓋轉印膜(正極)，之後上下各放上濾紙，最後外層再放上海綿即可進行轉印。轉印電壓 100V，60 分鐘。待轉印完成後，將轉印膜放置於 blocking buffer (5 % non-fat dry milk in TBST buffer)中，置於室溫下 1 小時，之轉印膜以 TBST 清洗 4 次，每次 10 分鐘，再將轉印膜放入含有一級抗體 anti-LRWD1 mAb 溶液中，於室溫下反應 1 小時(或於 4 °C 下隔夜)。以 TBST 清洗 3 次後，再將轉印膜放入含有二級抗體 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG 的 blocking buffer 中，於室溫下作用 1 小時。最後以 TBST 清洗 4 次，每次 10 分鐘，由於二級抗體上有鍵結酵素，以適當的基質 (substrate) 反應後，即可進行壓片。

第三章、結果

第一節、構築完成的載體使用限制酶確認

將構築完成的載體：pHaloTag-pHT2-LRWD1-del LRR、pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD1、pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD2、pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD3 使用限制酶確認（圖十）（表二），證實有把目標 domain 剔除。

第二節、免疫螢光分析（immunofluorescence assay, IFA）

透過免疫螢光分析結果發現 wild 和其他 delete form 所表現的 LRWD1 蛋白質表現在細胞中的亮點不能直接證實質體是送入 cell 當中表現的 LRWD1（圖十一），因為 GC-2 cell 本身也會生產 LRWD1 蛋白質，實驗中使用的一級抗體是 anti-LRWD1，所以也會與 GC-2 cell 本身生產 LRWD1 蛋白質作用，因此將會用 HaloTag 蛋白質的 ligand 證實亮點是否為送入的質體所產生的 LRWD1 蛋白質。

第三節、西方墨點法（Western blot）

從壓片出來的結果看出在 70kDa 位置左右有強烈表現的蛋白質，這是因為 LRWD1 在 GC-2 cell 本身就會表現，但是本研究所使用的 pHaloTag-pHT2 vector 上 Halo Tag 蛋白質會與接上的 LRWD1

產生的蛋白結合，使總大小增加到 pHaloTag-pHT2-LRWD1 為 104kDa，pHaloTag-pHT2-LRWD1-del LRR 為 96kDa，pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD1 為 98kDa，pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD2 為 99kDa，pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD3 為 99kDa，在圖中 100kDa 位置都沒發現蛋白質表現，所以推斷因本研究送進 cell 當中要表達的蛋白質較大，使得表現量很低，也有可能是轉染率太低，導致目標蛋白質收取量太少而無法從圖中看出表達的結果（圖十二）。

第四章、討論

臨床發現，大約有 25~30% 患有造精功能障礙的不孕症病人中，無法找出真正的原因，將其歸類為不明原因的不孕症〔11〕。最近幾年分子生物技術的發展，以小鼠為模式，已知精子形成過程中有許多基因共同負責調控此一複雜的程序〔12〕；但大部分參與哺乳動物睪丸發育與精子形成過程相關的基因大部分仍是未知的〔13〕。

根據前人研究〔25〕，LRWD1 mRNA 在不同組織中的表現，主要大量表現於人類睪丸組織中，其他組織中僅有微量表現，小鼠 AK084948 同源性基因 mRNA 的表現，主要也是大量表現於成熟小鼠的睪丸組織中，於腦、胃及卵巢組織僅有微量表現，以小鼠 AK084948 mRNA 的 RT-PCR 結果顯示，開始表現於出生後第 35 天的睪丸組織中，且一直持續表現到成熟小鼠階段。顯示此小鼠 AK084948 mRNA 主要為精子發育過程的後期表現基因。因此，推測人類 LRWD1 基因可能也為參與調控精子發育過程晚期的調控。

研究顯示含有 LRRs 的蛋白質具有許多不同的功能如參與哺乳動物的早期生長（early mammalian development），神經的發展（neural development）細胞的極化（cell polarization），調節基因表現及細胞凋亡的訊號；然而，LRRs 最主要的功能是參與細胞骨架（cytoskeleton）的形成，以提供蛋白質與蛋白質間的相互作用（protein-protein

interactions) [26]。含有 WD40 domain 的蛋白質其功能有：參與調節基因的轉錄作用 (transcriptional regulation) [27]、參與細胞間物質的傳送 (vesicular trafficking) [28]、調節細胞骨架形成和細胞分裂過程 (regulation of cytoskeletal assembly and cell division) [29, 30]、參與 mRNA 形成之處理，將 DNA 經轉錄作用所產生的初級轉錄物 (hn RNA) 於其 5' 端加頭蓋和 3' 端加 poly A tail (RNA processing) [31]、protein turnover [32]、參與細胞分化 (differentiation) [33]、參與細胞間訊息的傳遞 (signal transduction) [34]，推測 LRWD1 可能於複雜的精子形成過程中扮演一重要角色。

本研究將 LRR、WD1、WD2 及 WD3 重複區域分別剔除，也用限制酶確認有確實把目標 domain 剔除，在免疫螢光分析看到的亮點，不能直接證實是轉染進的質體產生的 LRWD1，也有可能是 GC-2 cell 自己產生的 LRWD1，實驗中使用的一級抗體是 anti-LRWD1，所以也會與 GC-2 cell 本身生產 LRWD1 蛋白質作用，將會用 HaloTag 蛋白質的 ligand 證實亮點是否為送入的質體所產生的 LRWD1 蛋白質。

在西方墨點法方面也無法從圖中 100kDa 位置上看出本研究欲表現的蛋白，在 70kDa 上是 GC-2 cell 自己產生的 LRWD1，因此推論本研究所使用的載體上的 HaloTag 蛋白質加上 LRWD1 產生的蛋白質

加起來分子量較大，cell 表現不容易，也有可能是轉染率太低造成取到的目標蛋白質量太少，所以看不出明顯片段。將嘗試其他方法提高轉染率，例如換細胞株，增加目標蛋白質的收取量，以利確實看出 delete form 和 wild 之間的差異。

爲了避免送入 cell 表現的蛋白質過大導致表現不易，所以將改用其他載體，升高蛋白質的表現量，完成研究的實用性。

第五章、結論

本研究將 LRR、WD1、WD2 及 WD3 重複區域分別剔除，並且構築 pHaloTag-pHT2 完成 pHaloTag-pHT2-LRWD1-del LRR、pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD1 pHaloTag-pHT2-LRWD1-del LRR、pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD1、pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD2、pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD3 的構築。從免疫螢光分析和西方墨點法沒做出明顯的結果，難以判斷 LRR、WD1、WD2 及 WD3 重複區域分別剔除掉後在細胞中表現的差異性。

爲了證實免疫螢光分析圖中的亮點是本研究送入的質體產生出來的 LRWD1，將會加入 ligand 與 HaloTag 蛋白質結合做確認。

往後爲了避免送入 cell 表現的蛋白質過大導致表現不易，所以將改用其他載體，升高蛋白質的表現量，以利以後的研究觀察，也將嘗試其他方法提高轉染率，例如換細胞株，增加目標蛋白質的收取量，以利確實看出 delete form 和 wild 之間的差異。

參考文獻

1. Larry IL, Stuart S. Infertility in the male. Third edition. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 1997;173-174.
2. Mosher WD. Reproductive impairments in the United States. *Demography*. 1985;22:415-430.
3. Lipshultz LI. Infertility. *J Urol.* 1997;157(3):847-848.
4. Anguiano A, Oates RD, Amos JA *et al.* Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *J Am Med Assoc.* 1992;267(13):1794-1797.
5. Patrizio P, Asch RH, Handelin B, Silber SJ. Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations. *Hum Reprod.* 1993;8:215-220.
6. Burns KH, Matzuk MM. Genetic models for the study of gonadotropin actions. *Endocrinology*. 2002;143:2823-2835.
7. Achermann JC, Weiss J, Lee EJ, Jameson JL. Inherited disorders of the gonadotropin hormones. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;179:89-96.
8. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev.*

2000;21:551-583.

9. Adashi EY, Hennebold JD. Single-gene mutations resulting in reproductive dysfunction in women. *N Engl J Med.* 1999;340:709-718.
10. Mak V, Jarvi KA. The genetics of male infertility. *J Urol.* 1996;156:1245-1257.
11. Tuerlings J, Kremer J, Meuleman E. The practical application of genetics in the male infertility clinic. *J Androl.* 1997;18:576-581.
12. Escalier D. Impact of genetic engineering on the understanding of spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2001;7:191-210.
13. Sha J, Zhou Z, Li J *et al.* Identification of testis development and spermatogenesis-related genes in human and mouse testes using cDNA arrays. *Mol Hum Reprod.* 2002;8 (6) :511-517.
14. Cralson BM. Human embryology and developmental biology. Second edition. Mosby, Inc., St. Louis; 1999:380.
15. Eddy EM. Chauvinist genes of male germ cells: gene expression during mouse spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(4):695-704.
16. Eddy EM. Regulation of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 1998;9(4):451-457.
17. Eddy EM. Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res.*

- 2002;57:103-128.
18. Okabe M, Ikawa M, Ashkenas J. Gametogenesis 98 male infertility and the genetics of spermatogenesis. *Am J Hum Genet.* 1998;62:1274-1281.
19. Michael HR, Edward JR, Lynn JR. Histology: A text and atlas. Second edition. Williams and Wilkins, *Maryland*; 1989:617.
20. Asano M, Furukawa K, Kido M *et al.* Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *EMBO.* 1997;16:1850-1857.
21. Asano M, Furukawa K, Kido M *et al.* Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *EMBO.* 1997;16:1850-1857.
22. Damjanov I. Pathology of infertility. First edition. Mosby-Year Book, Inc., St.Louis;1993:12.
23. Damjanov I. Pathology of infertility. First edition. Mosby-Year Book, Inc., St.Louis;1993:18-21.
24. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression

- profiling using cDNA microarrays. *Nature Genet.* 1999;21:10-14.
- 25.郭亭宜 探討人類造精功能有關之基因 嘉南藥理科技大學生物科
技研究所碩士論文 2005
26. Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition
motif. *Curr Opin Struct Biol.* 2001;11 (6) :725-732.
27. Fisher AL, Caudy M. Groucho proteins: transcriptional corepressors
for specific subsets of DNA-binding transcription factors in
vertebrates and invertebrates. *Genes Dev.* 1998;12:1931-1940.
28. Gerich B, Orci L, Tschochner H *et al.* Non-clathrin-coat protein a is a
conserved subunit of coatomer and in *Saccharomyces cerevisiae* is
essential for growth. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92:3229-3233.
29. Vaisman N, Tsouladze A, Robzyk K, Ben YS, Kupiec M, Kassir Y.
The role of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc40p in DNA replication and
mitotic spindle formation and/or maintenance. *Mol Gen Genet.*
1995;247:123-136.
30. Hartman JJ, Mahr J, McNally K *et al.* Katanin, a microtubulesevering
protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a
WD40-containing subunit. *Cell.* 1998;93:277-287.
31. Dalrymple MA, Petersen BS, Friesen JD, Beggs JD. The product of

the PRP4 gene of *S. cerevisiae* shows homology to β subunits of G proteins. *Cell*. 1989;58:811-812.

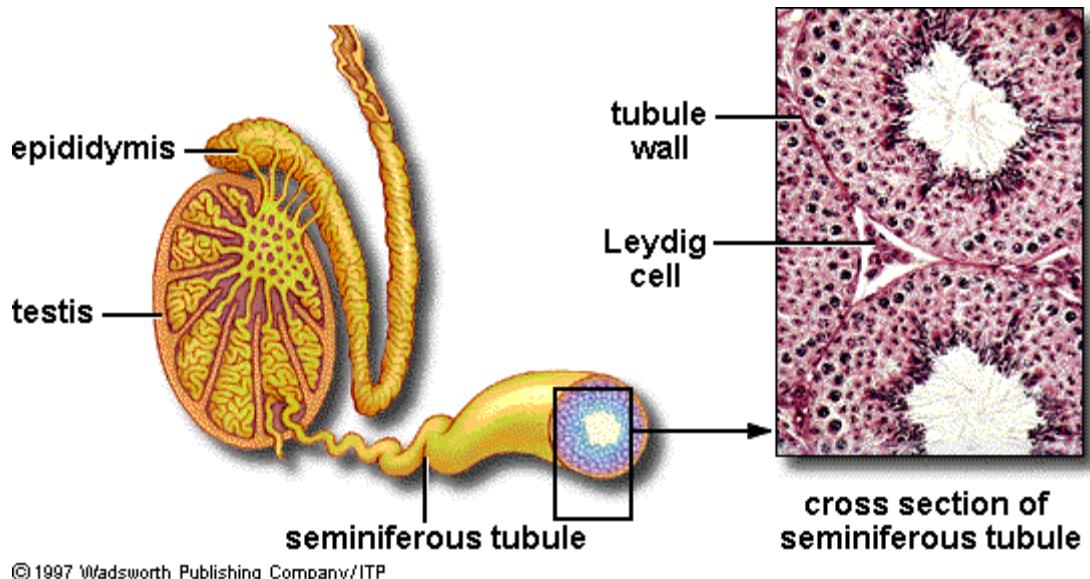
32. Patton EE, Willems AR, Tyers M. Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet*. 1998;14:236-243.
33. Jiang J, Struhl G. Regulation of the Hedgehog and Wingless signaling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature*. 1998;391:493-496.
34. Hoecker U, Tepperman JM, Quail PH. SPA1, a WD-repeat protein specific to phytochrome A signal transduction. *Science*. 1999;284:496-499.
35. Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol*. 2002;4 Suppl:s41-49.

表一、PCR 反應所使用的 primer 序列

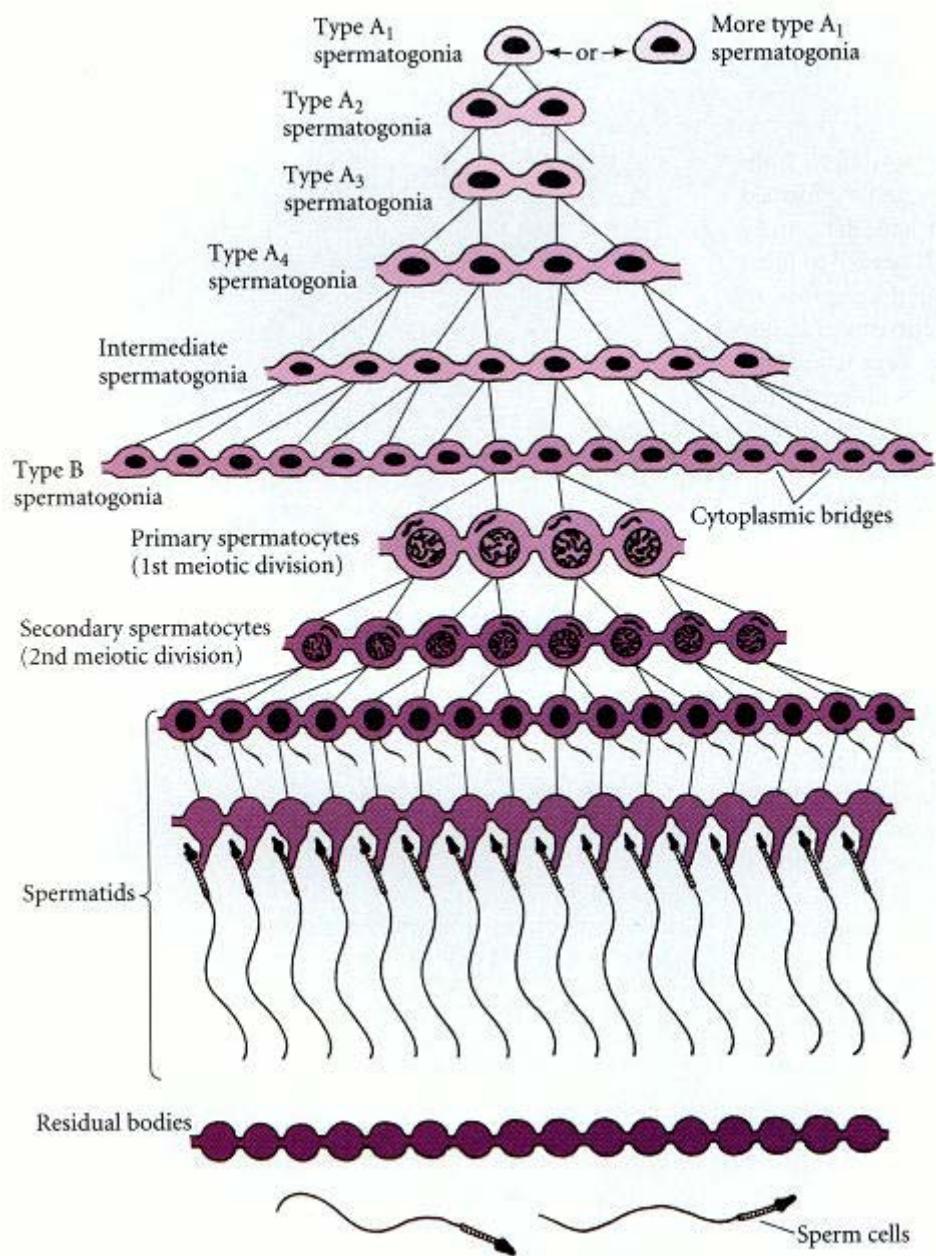
Delet domain	Primer 名稱	sequence	Site*	PCR product (bp)
LRR	BC030547-R3	5'cg cgatcc cgac ttcgat catc ctcccc agatg gct3' (包含BamHI切位)	1923 ~ 1940	1733
	BC030547 (del LRR)-(F)	5'ctag ctag catg acac tc cg gtgc ctcc gctg 3' (包含 NheI 切位)	208~ 227	
WD1	BC030547-F2	5'ctag ctag catgg cccc c tc ggcgc3' (包含 NheI 切位)	1~ 19	813
	BC030547 delWD1-R12	gtctggcacacagcaggctg	802~ 813	
	BC030547-R3	5'cg cgatcc cgac ttcgat catc ctcccc agatg gct3' (包含BamHI切位)	1923 ~ 1940	
	BC030547 delWD1-F12	ctgctgtgtgccagacggc	976~ 987	
WD2	BC030547-F2	5'ctag ctag catgg cccc c tc ggcgc3' (包含 NheI 切位)	1~ 19	1140
	BC030547 delWD2-R13	accccgatacgcacgtgcag	1129 ~ 1140	
	BC030547-R3	5'cg cgatcc cgac ttcgat catc ctcccc agatg gct3' (包含BamHI切位)	1923 ~ 1940	
	BC030547 delWD2-F13	acgtgcgtatcgggtgcc	1264 ~ 1275	
WD3	BC030547-F2	5'ctag ctag catgg cccc c tc ggcgc3' (包含 NheI 切位)	1~ 19	1617
	BC030547 delWD3-R14	ttgctgaccaccgtggactgg	1605 ~ 1617	
	BC030547-R3	5'cg cgatcc cgac ttcgat catc ctcccc agatg gct3' (包含BamHI切位)	1923 ~ 1940	
	BC030547	ccacgggtcagcaacatcc	1744	

	delWD3-F14		~ 1756	
--	------------	--	-----------	--

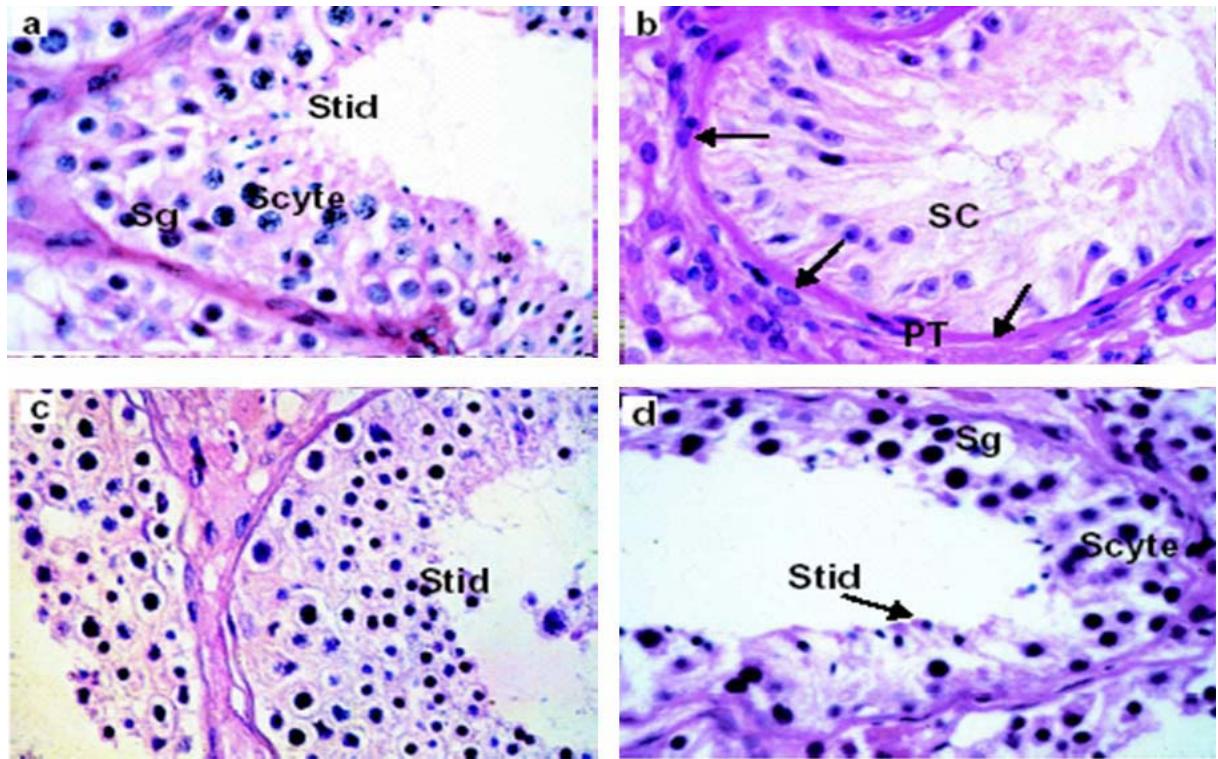
*NCBI accession no : BC030547



圖一、睪丸組織剖面圖。哺乳類動物之精子發育過程發生在睪丸組織，睪丸是由許多曲精小管(seminiferous tubule) 所組成，其內有精原細胞 (spermatogonia) 及 Sertoli cell，在曲精小管之間有Leydig cell。在整個細胞分化的過程中，精母細胞 (spermatocytes) 會慢慢由曲精小管 (seminiferous tubule) 的外圍往中央的管腔 (lumen) 移動，而漸漸形成成熟的精子。

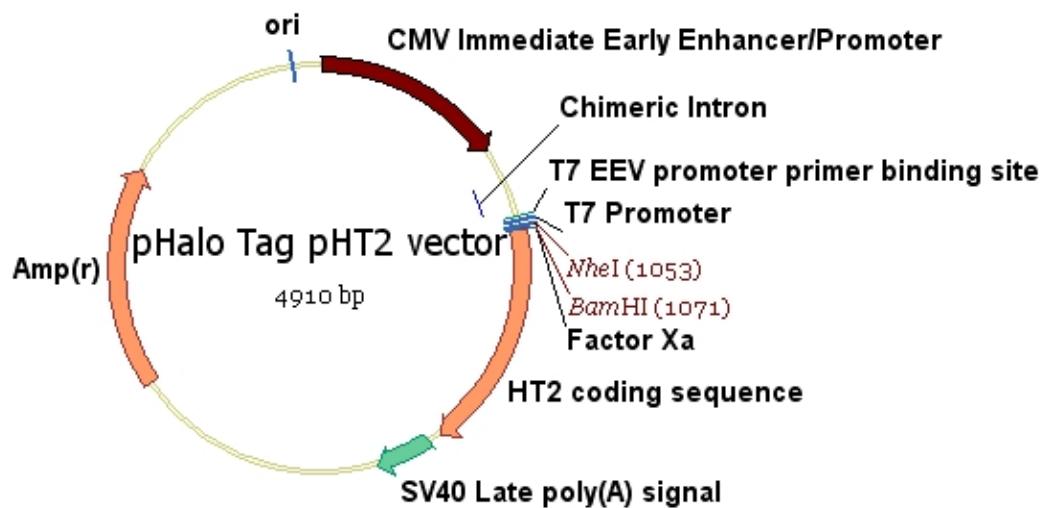


圖二、哺乳類動物之精子發育過程 (Spermatogenesis)，分為三個階段：(一)、精原細胞期 (spermatogonia phase or spermatocytogenesis)；(二)、減數分裂期 (meiotic phase or meiosis)；(三)、精子形成期 (spermatid phase or spermiogenesis) 〔19〕。

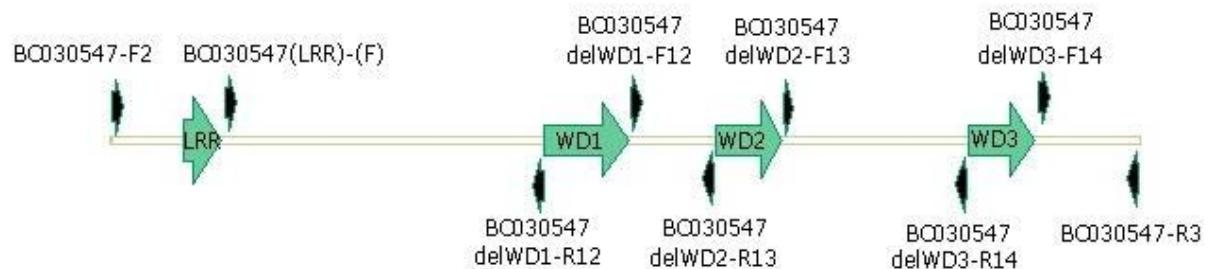


圖三、造精功能障礙的睪丸組織病理切片染色。依造精功能受損的程度可區分為四種不同的類型：a、正常造精功能的睪丸組織（Normal spermatogenesis, NR）； b、缺乏生殖細胞的睪丸組織（Sertoli cell-only syndrome, SCOS）； c、造精功能停滯的睪丸組織（Maturation arrest, MA）； d、造精功能低下的睪丸組織（Hypospermatogenesis, HS）。

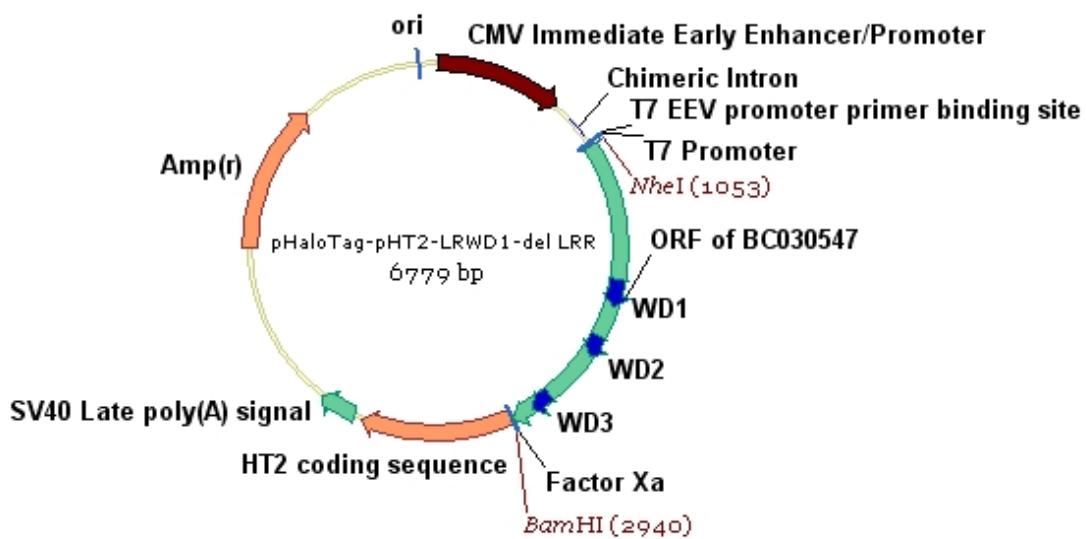
SC : Sertoli cells 、Spg : spermatogonia 、Spc : spermatocyte 及Spd : spermatid [35] 。



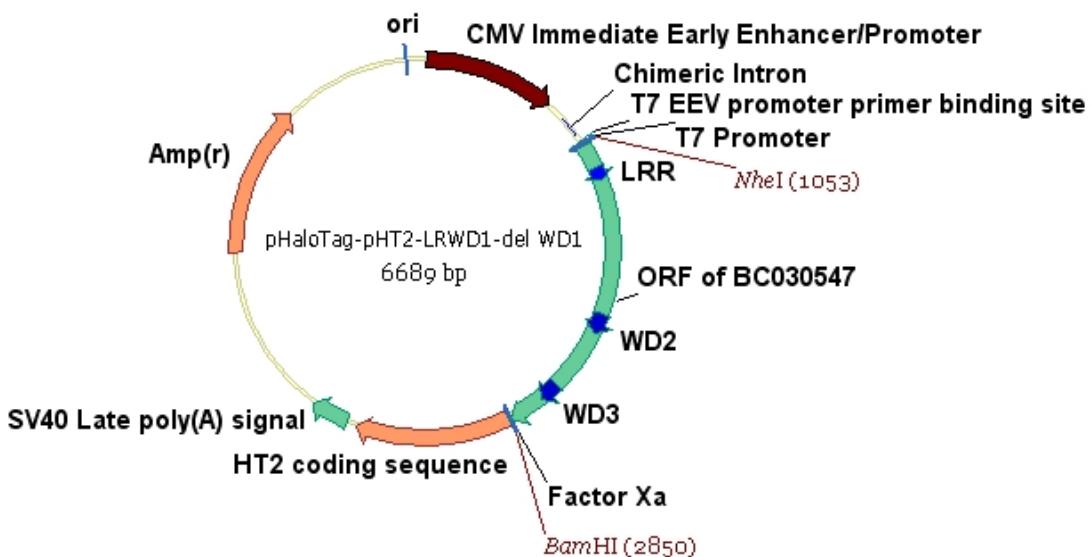
圖四、本研究這次所使用的載體及 *NheI*、*BamHI* 切位的位置



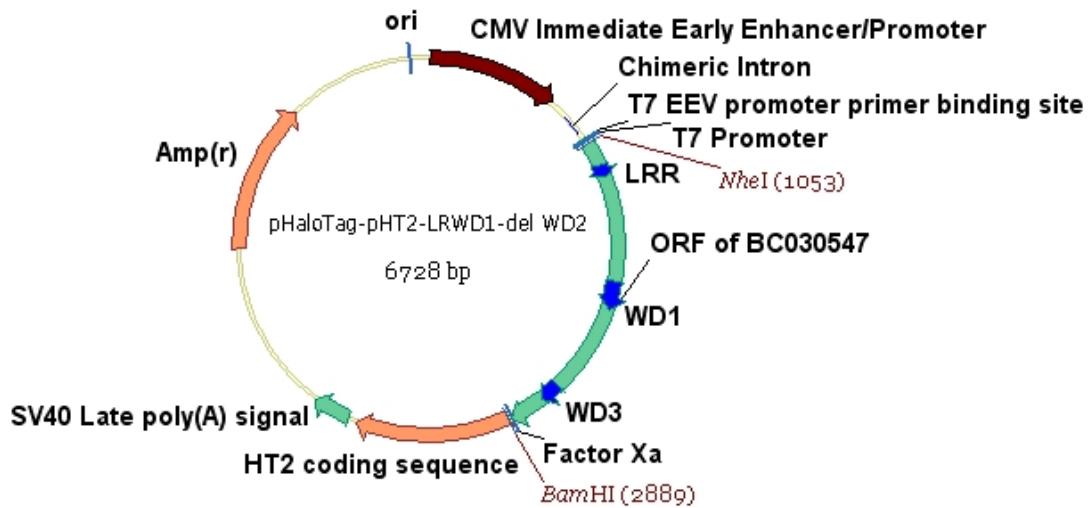
圖五、LRR 和 3WD domain 所對應的 primer 方式



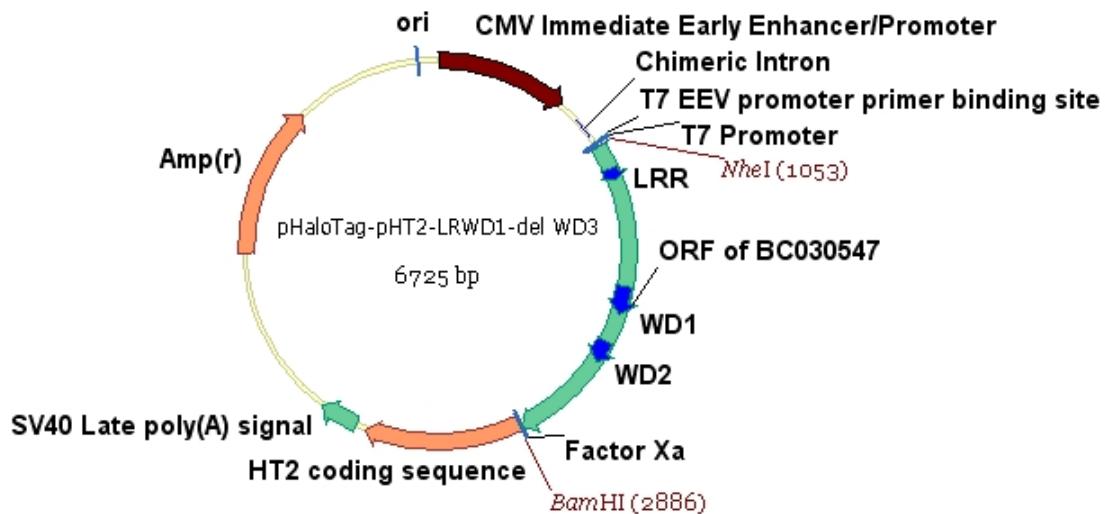
圖六、構築完成的 pHaloTag-pHT2-LRWD1-del LRR 輽體



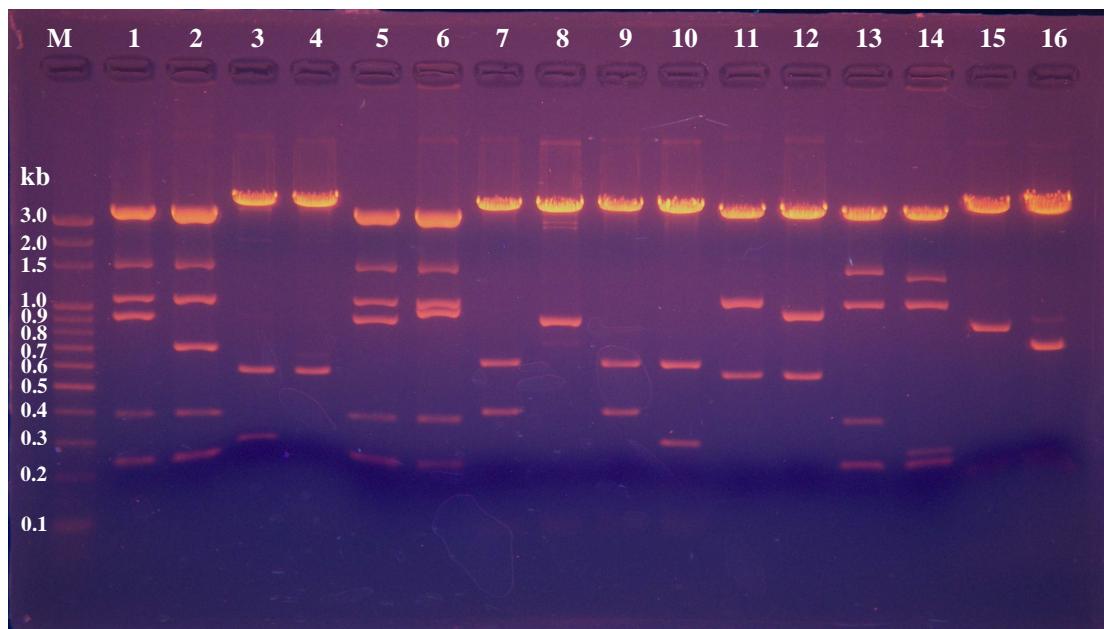
圖七、構築完成的 pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD1 輽體



圖八、構築完成的 pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD2 載體



圖九、構築完成的 pHaloTag-pHT2-LRWD1-del WD3 載體

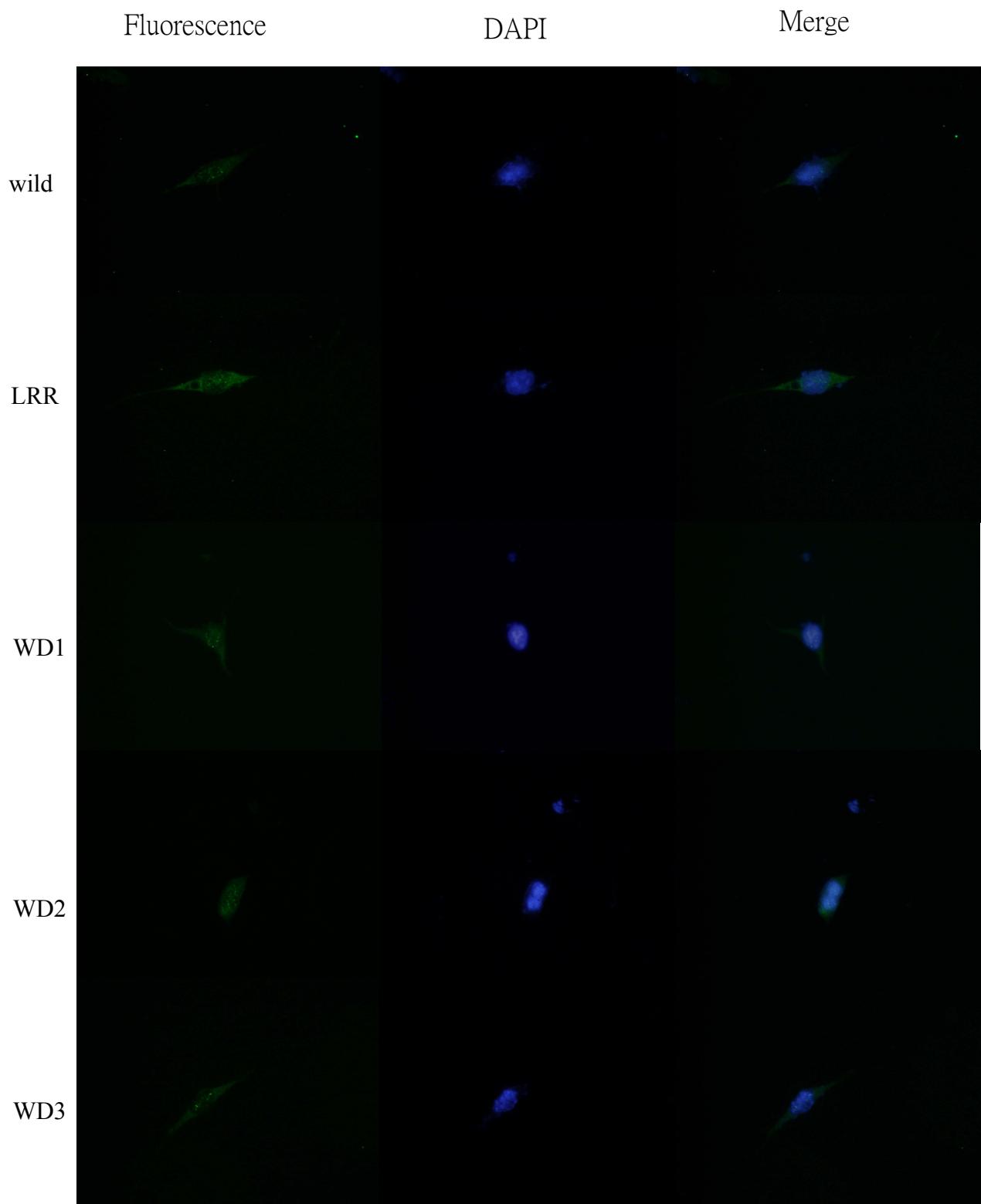


圖十、構築完成的載體使用限制酶確認之電泳圖，每個 Land 的內容列於表二。

表二、此表是圖十中每個 Land 的內容，每個構築完成的載體都使用兩組限制酶做確認是否有確實剔除目標 domain。

M : 100 bp ladder DNA marker

Land	1	2	3	4	5	6	7	8
內容	wild	del LRR	wild	del LRR	wild	del WD1	wild	del WD1
限制酶	<i>NheI</i> <i>NaeI</i>	<i>NheI</i> <i>NaeI</i>	<i>NheI</i> <i>XhoI</i>	<i>NheI</i> <i>XhoI</i>	<i>NheI</i> <i>NaeI</i>	<i>NheI</i> <i>NaeI</i>	<i>PvuII</i>	<i>PvuII</i>
底線為確認片段	239,241, 396, <u>911</u> , 1058,4012	239,241, 396, <u>703</u> , 1058,4012	<u>283</u> ,595, 5976	<u>75</u> ,595, 5976	239,241, 396, <u>911</u> , 1058,4012	241,396, <u>987</u> ,1058, 4012	97, <u>424</u> , <u>643</u> ,5691	97, <u>904</u> , 5691
Land	9	10	11	12	13	14	15	16
內容	wild	del WD2	wild	del WD2	wild	del WD3	wild	del WD3
限制酶	<i>PvuII</i>	<i>PvuII</i>	<i>BamHI</i> <i>XhoI</i>	<i>BamHI</i> <i>XhoI</i>	<i>NaeI</i>	<i>NaeI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i>
底線為確認片段	97, <u>424</u> , 643,5691	97, <u>301</u> , 643,5691	595, <u>1084</u>	595, <u>961</u>	239,241, 396,1058, 4922	239,241, <u>270</u> ,1058, 4922	40,169, <u>886</u> ,5760	40,169, <u>700</u> ,5760

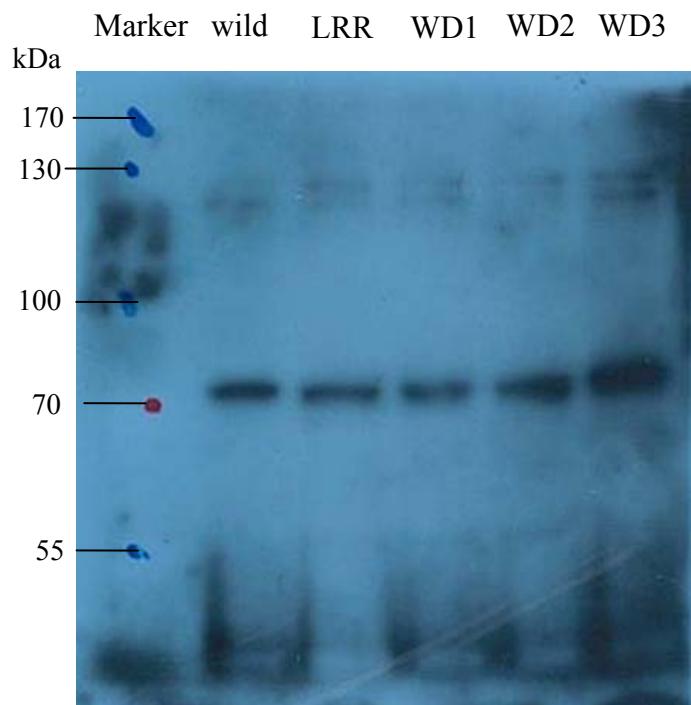


圖十一、免疫螢光分析 (immunofluorescence assay, IFA) 看 LRWD1

和其他剔除目標 domain 表現細胞的位置。左排的文字所標明的 wild

是指沒有剔除任何 domain，而 LRR、WD1、WD2、WD3 指的是剔

除的目標 domain。從圖中看到的亮點，不能確認是本研究送入的質體產生的 LRWD1，有可能是 GC-2 cell 自己產生的 LRWD1，實驗中使用的一級抗體是 anti-LRWD1，所以也會與 GC-2 cell 本身生產 LRWD1 蛋白質作用。



圖十二、西方墨點法（Western blot）觀察 delete form 與 wild 大小差異結果圖。上排的文字所標明的 wild 是指沒有剔除任何 domain，而 LRR、WD1、WD2、WD3 指的是剔除的目標 domain。在 70kDa 的位置上表達的是 GC-2 cell 自己產生的 LRWD1 蛋白質，而本研究轉染進 GC-2 cell 的質體產生的預測大小為 100kDa 左右，因為分子量較大較難表現，收取的目標蛋白質量很少，所以無法在圖上看到明顯片段。