

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : 利用 siRNA 探討生殖細胞專一性表達基因 Gcse 的功能 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 陳宜佩
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-050-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 王淑紅

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： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 103年03月27日

(一)摘要

對哺乳類雄性生殖來說，睪丸專一性的基因對精子生成過程是十分重要的。精細胞發育的過程(spermatogenesis)包含增生期(Spermatogonial proliferative phase)，減數分裂期(Meiotic phase)，精子發生期(Spermiogenic phase)，小鼠出生一週左右，生殖幹細胞會慢慢轉變成雙倍體的精原細胞(spermatogonia)，精原細胞依然擁有有絲分裂(mitosis)能力。當小鼠發育至出生後10天，精原細胞便進入第一次減數分裂前期，形成初級精母細胞(Primary spermatocyte)，之後初級精母細胞第一次減數分裂形成次級精母細胞(Secondary spermatocyte)。次級精母細胞會快速的再度進入第二次減數分裂形成完整的單倍體圓精細胞(round spermatid)。當小鼠發育至三周大，生殖細胞陸陸續續完成減數分裂，越來越多的圓精細胞出現。這些圓精細胞之後會開始改變稱之為精子發生期。精子發生期細胞核進入轉錄不活化(inactivating-transcription)階段，這階段所需蛋白之mRNA就會被堆積於類染色體(chromatoid body)中，從細胞核內送往細胞核外進行轉譯。同時，圓精細胞會漸漸長出尾巴，並且在細胞質的高基氏體(Golgi apparatus)開始發達，並於核的前端(anterior portion)特化出頂體(acrosome)構造，頂體是自然受精作用必備的胞器儲存受精所需之酵素蛋白。而在每個發育階段都會有一些特殊的基因參與調控,過去研究中我們發現一個新穎並專一表現在生殖細胞中的基因，命名為*Gcse* (germ cell specific expressed gene)。

而*Gcse*這個生殖細胞專一性表達的同源箱基因具有兩個isoform,*Gcse-l*(1589bp)和*Gcse-s*(906bp)。*Gcse-l*在睪丸和卵巢都有表現;而*Gcse-s*只表現在睪丸和成熟的卵細胞及受精卵,並沒有表現在卵巢。*Gcse-l*在late pachytene spermatozoa時表現在細胞核,當進入減數分裂時期轉而表現在頂體;*Gcse-s*則都只表現在細胞核，根據*Gcse*的表現分佈，我們推測*Gcse*參與生殖細胞的減數分裂與頂體的生成作用。

因此本計畫中我們主要的研究目標是在探討*Gcse*基因在卵細胞或精細胞發育所扮演的角色。所以我們利用transfect siRNA 進入GC1這個spermatogonia cell的方式來確認我們設計出的siRNA是否能成功的抑制*Gcse*基因的表現，之後再將設計成功的siRNA以顯微注射的方式注入至小鼠睪丸，確定*Gcse*基因的表現被抑制後，是否影響精細胞的發育；另外我們也將相同的

siRNA 片段打入 GV 時期的卵細胞以及 2PN 時期的胚胎，並以螢光免疫染色，觀察卵細胞是否完成減數分裂或 2PN embryo 早期胚胎發育是否正常。

(二) 研究動機與研究問題

研究動機：

(1). *Gcse* Gene

Gcse (germ cell specific expressed gene) 是一個生殖細胞專一性表達基因，根據表現分佈趨勢，我們推測 *Gcse* 與卵細胞的成熟及精細胞頂體的生成有關，因此延續過去的研究成果 (Huang et al., 2013)，本研究將以 siRNA 降低精細胞與卵細胞 *Gcse* 基因的表現，研究 *Gcse* 基因在卵細胞或精細胞發育所扮演的角色。

(2). *Gcse* 功能分析

雖然基因剔除是研究基因功能最好的方法，但須相當長的時間，同時需要相當的人力與物力來進行，而 RNAi 也是另外一種研究基因功能的方式，根據 Guo 等人(2010)的方法，我們將設計分別抑制 *Gcse-l* 與 *Gcse-s* 或同時抑制 *Gcse-s* 及 *Gcse-l* 的 siRNA 片段，先以 GC1 或 GC2 細胞株測試能夠抑制 *Gcse* 基因表現的 siRNA 片段，再將此 siRNA 片段注入 3 週大的小鼠 testis 中，48 小時後以 western blot 分析注射的 siRNA 片段是否抑制 *Gcse* 基因的表現，另外注射三週後由副睪分離精細胞，觀察精細胞的型態如頂體的形成是否異常，此研究 *Gcse* 基因對於 spermiogenesis 的影響；另外我們也將 siRNA 片段以顯微注射的方式打入 GV oocyte 或受精卵，研究 *Gcse* 對於卵細胞的成熟及早期胚胎發育的影響。

研究問題：

- (1) 製作及設計分別抑制 *Gcse-l* 與 *Gcse-s* 或同時抑制 *Gcse-s* 及 *Gcse-l* 的 siRNA 片段。
- (2) 以 GC2 細胞株為細胞模式，轉染抑制 *Gcse* 基因表現的 siRNA 片段，並於轉染後 48hr 收蛋白，以 western blot 分析 siRNA 片段是否抑制 *Gcse* 基因的表現。
- (3) 將此 siRNA 片段注入 3 週大的小鼠 testis 中，48 小時後以 western blot 分析注射的 siRNA

片段是否抑制 *Gcse* 基因的表現。

- (4) 注射三週後由副睪分離精細胞，觀察精細胞的型態如頂體的形成是否異常，研究 *Gcse* 基因對於 spermiogenesis 的影響。
- (5) 將 siRNA 片段以顯微注射的方式打入 GV oocyte 或受精卵，研究 *Gcse* 對於卵細胞的成熟及早期胚胎發育的影響。

(三) 文獻回顧與討論

哺乳類動物的精子生成過程十分複雜並分成許多階段，這其中包括了精原細胞 (spermatogonia) 從生殖幹細胞分化；精原細胞自我更新 (renew) 及分化成初級精母細胞 (primary spermatocytes)；從雙倍體減數分裂到單倍體；以及從圓精細胞 (round spermatids) 發育到成熟精蟲 (spermatozoa) 等。精子生成在每一個分化階段都會開啟一些階段性誘導或抑制的特殊基因表現，這些基因表現量在生殖細胞中不是特別高就是具有專一性，而且它們通常是在轉錄或轉譯後修飾階段來參與調控。各式各樣的荷爾蒙、訊息路徑、轉錄因子以及環境分子，皆在分化過程及每個不同階段中扮演著重要的調節角色。

而哺乳類動物的卵細胞發育則是經歷一個相當長時間的階段，其中包含了出生前在胚胎的卵細胞發育和出生後的卵細胞發育。小鼠胚胎之發育天數約為20-21天，但直到胚胎發育至13.5天時，因為卵細胞進入減數分裂，才使得性腺得以區分。出生時，卵細胞會停滯在第一次減數分裂，而當卵細胞排出卵巢時，卵細胞則處在第二次減數分裂的中期階段，等到受精後才會完成第二次減數分裂。在小鼠卵細胞進入減數分裂到排卵期間，卵細胞會被濾泡圍繞，並由濾泡細胞提供發育之養分。而這段期間，科學家將濾泡細分為四個時期，分別為原始濾泡 (primordial follicles)、初級濾泡 (primary follicles)、次級濾泡 (secondary primary) 與空腔期濾泡 (antral follicles)。卵細胞在原始濾泡和初級濾泡的時期成長，其體積也逐漸變大。隨著發育的演進，周圍濾泡細胞快速地增生並發育成成熟濾泡，接著將成熟的卵細胞排出卵巢。

頂體異常在人類會造成一種罕見的不孕症稱為 globozoospermia,根據 UniGene library 分析

round spermatid,發現有 22%的基因屬於睪丸專一性基因，而這些睪丸專一性的基因中有 74% 其功能未知。而在 spermatocytes 中有 11%的基因屬於睪丸專一性基因，且有一半以上其功能未知。因此鑑別生殖細胞特定時期的基因對於解釋調節配子生成時分化的程序及機制是一個很好的方式。這些基因的產物在人類的繁殖中扮演了很重要的角色。

研究細胞型態專一性或發育時期專一性的基因能有助於我們去了解生殖發育的過程，並且藉由探討其機制來了解精子生成和卵子發育過程中的調控。雖然先前實驗發現 *Gcse* 表現的位置在精母細胞的核內，而減數分裂後則表現在單倍體精細胞頂體，但是 *Gcse* 在精子細胞的功能仍尚未清楚。本研究將以 siRNA 降低精細胞與卵細胞 *Gcse* 基因的表現，研究 *Gcse* 基因在卵細胞或精細胞發育所扮演的角色。

(四) 研究方法與步驟

1. Animals and cell culture

FVB/NJ 同系繁殖的小鼠購自國家實驗動物中心,提供無菌水和嚙齒動物飼料給小鼠自由採食，並飼養在中山醫學大學無特定病原體動物房環境中。所有的實驗程序的進行是根據了動物委員會的指引。

小鼠 GC2 細胞購自 ATCC ,依照廠商的說明培養在含 10%FBS 的 DMEM 內, 37°C、5% CO₂ 的環境中。

2. 製作抑制 *Gcse-s* 及 *Gcse-l* 的 siRNA 片段

分別取三段序列(639:*Gcse-l* ; 276:*Gcse-ls* ; 771:*Gcse-s*)交由量子生物科技有限公司設計分別抑制 *Gcse-l* 與 *Gcse-s* 或同時抑制 *Gcse-s* 及 *Gcse-l* 的 siRNA 片段。

3. Transfection

依照廠商(Invitrogen)的 protocol,將 Lipofectamin 和 siRNA 稀釋於 Opti-MEM 裡,再將這兩個溶液混合均勻,靜置室溫 5 分鐘。之後再將此混合液加入細胞中,培養 72 小時後取其蛋白。

4. Sample preparation and protein extraction

將 transfect siRNA 72 小時的 GC1 細胞用 PBS 清洗三次(每次 5 分鐘),加入 5X RIPA+50XPIM

混合液在冰上作用 5 分鐘,用細胞刮勺將細胞刮下來放置冰上作用 10~20 分鐘,使細胞破裂融出蛋白。之後離心 10 分鐘,取其上清液,其蛋白使用 Bradford Protein Assay 利用胎牛血清蛋白 (bovine serum albumin; BSA)來定量。

將注射 siRNA 48 小時後的小鼠睪丸溶解於 lysis buffer [7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 4% (W/V) CHAPS, and 2% (W/V) DTT]和 1% (W/V) protease inhibitor 的混合液中。將此混合物放在震盪器上在 4°C 的環境下搖晃 1 個小時,之後離心 40,000g, 4°C, 1 小時去除沉澱物。GC2 細胞會溶於 lysis buffer 內,其蛋白使用 Bradford Protein Assay 利用胎牛血清蛋白 (bovine serum albumin; BSA)來定量。

5. Western blot analysis

將定量過後的 GC2 細胞的蛋白以 SDS-PAGE 分離蛋白質樣品中不同分子量的蛋白質,然後將蛋白質轉印至 PVDF 轉漬膜,再以由 TBST 緩衝液泡製成 5% 的安佳脫脂奶粉進行 blocking 1 個小時,之後將 Gcse 抗體當作一級抗體,靜置 4°C, O/N。隔天再使用 Goat anti rabbit 或 Goat anti mouse 當作二級抗體,來偵測 Gcse 蛋白在 GC2 細胞中受 siRNA 的抑制效果。

6. Immunofluorescence

將 GC1 細胞用 PBS 清洗三次(每次 5 分鐘),加入 4% paraformaldehyde 靜置 30 分鐘固定細胞,之後吸除 paraformaldehyde 再用 PBS 清洗三次(每次五分鐘)。然後加入 0.1% Triton buffer(含 1% BSA)靜置 30 分鐘進行穿孔,之後再用 PBS 清洗三次(每次 5 分鐘),再加入一抗,放置 4°C, O/N。隔天吸除一抗,用 PBS 清洗三次(每次 5 分鐘),之後加入二抗靜置室溫 3 小時,過後再用 PBS 清洗三次(每次 5 分鐘),然後加 DAPI 螢光油,用正立螢光顯微鏡觀察、拍照。

7. Intratesticular injection of siRNA against Gcse

我們將設計好抑制 *Gcse* 的 siRNA 稀釋成 20 μ M 並儲存在 -20°C 的環境中。將三周大的老鼠用 sodium pentobarbital 麻醉之後,從腹部中線開一個約 5mm 的切口,將睪丸裸露出來,注射 3~5 μ L 含有指示劑(0.4% trypan blue)的 siRNA 到細精管內,控制組的睪丸則注射 negative control 的 siRNA。注射完了之後將睪丸放回腹部,並且將切口縫合,之後讓小鼠復原三個禮拜,再犧牲分離其精細胞。為了證明 RNAi 在體內的效力,我們將使用西方點墨法來檢測注射 siRNA

48 小時過後 *Gcse* 蛋白的表現量來確認 siRNA 是否有效的抑制 *Gcse* 蛋白的轉譯。

8. Epididymal sperm morphology classification

注射 siRNA 三週後的小鼠,精子會儲存於附睪中,將精子取出分佈於玻片上,用 4% paraformaldehyde 固定於玻片上,利用 hematoxylin and eosin stain(H&E)和 1 μ g/mL PNA 在室溫下染兩個小時,之後再觀察精子的型態。透過 PNA 染色可以觀察到頂體是否正常發育。

9. 顯微注射 GV oocyte 或受精卵

以顯微注射的方式將 *Gcse* siRNA 打入 GV oocyte 或 2PN embryo ,並以螢光免疫染色,確定 *Gcse* 基因的表現是否被抑制,觀察 oocyte 是否完成減數分裂或 2PN embryo 早期胚胎發育是否正常。

10. Oocyte immunofluorescence

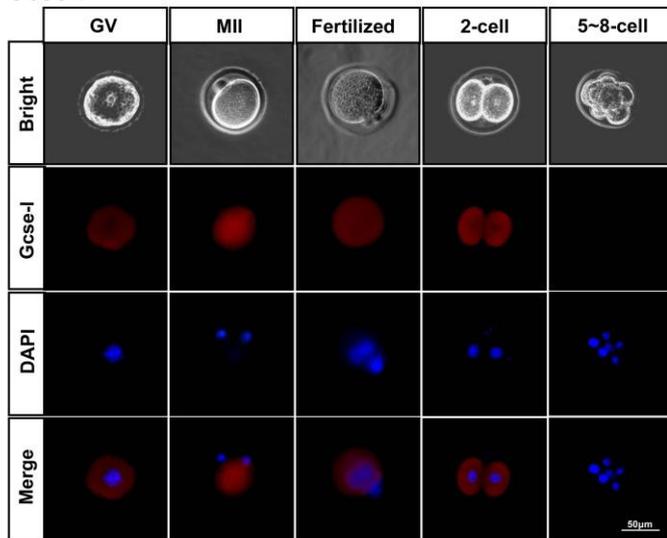
取出之卵細胞先用 0.05% glutaraldehyde/ 2% paraformaldehyde 固定,並在室溫下靜置 5 分鐘。將卵細胞換於 2% paraformaldehyde 中靜置 25 分鐘,再利用 1% Tween 20/2% paraformaldehyde 於室溫靜置 30 分鐘,使細胞穿孔。之後用 5mM glycine/PBS 清洗三次,每次 20 分鐘,然後加入 ICB buffer(含 1% BSA)5 分鐘,再加入一抗(in ICB buffer(含 1% BSA))100X 放置於 4°C 冰箱中 O/N。隔天用 ICB buffer 清洗三次,每次 20 分鐘,然後加入二抗(in ICB buffer(含 1% BSA))200X 一小時(須避光)。之後用 ICB buffer 清洗三次,每次 20 分鐘,然後染 DAPI(20X)一小時,再用 ICB buffer 清洗兩次,每次 5 分鐘,最後泡在 500ul ICB 再利用倒立顯微鏡觀察、分析。

(五)結果

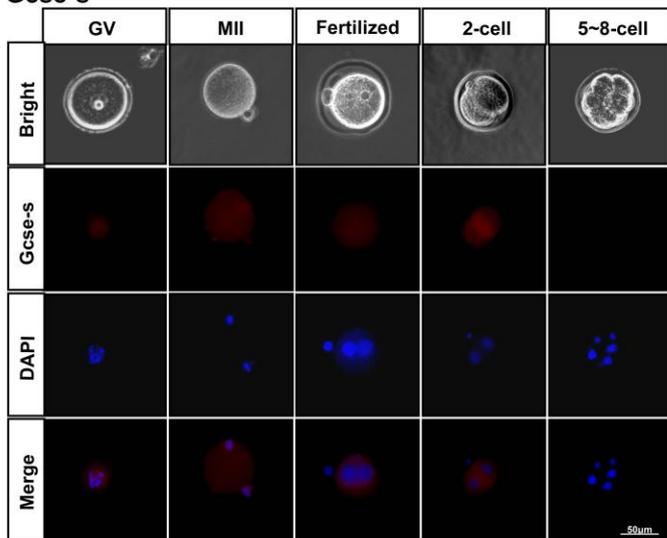
(1) *Gcse* 表現在卵母細胞、受精卵和早期胚胎

前人的研究發現 *Gcse* RNA 會在 oocyte(卵母細胞)和 xygotes(受精卵)表現,但到 2-cell 時期即沒有表現,所以我們想知道 *Gcse* 蛋白的表現趨勢為何?我們利用免疫螢光染色的方式去染色,結果顯示 *Gcse-l* 和 *Gcse-s* 皆表現在 germinal vesicle oocytes(GV)即未進入減數分裂的卵母細胞、metaphase II oocytes(MII)及減數分裂中期的卵母細胞、fertilized eggs 受精卵,一直表現到 2-cell 時期的早期胚胎,但在 5~8-cell 時期則沒有表現(Fig.1)。

Gcse-l



Gcse-s



Control IgG

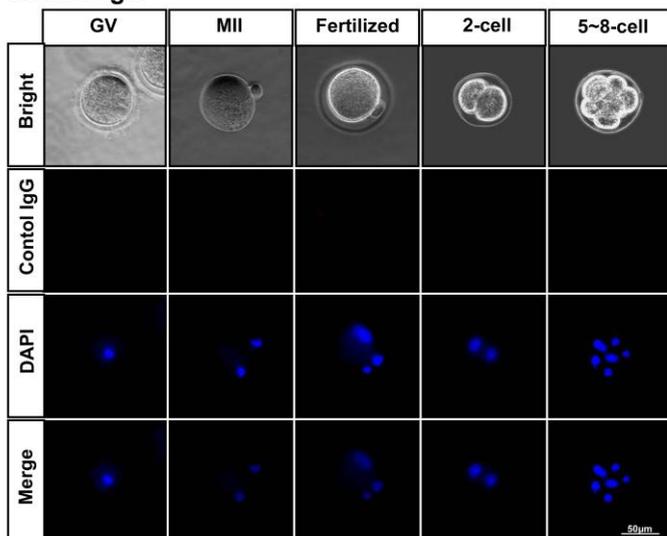


Fig.1 Gcse-l 和 Gcse-s(red)皆表現在 GV 時期的卵母細胞、MII 時期的卵母細胞、受精卵和 2-cell 時期的早期胚胎，但在 5~8-cell 的早期胚胎並沒有表現。(DAPI:blue)

(2) Gcse 蛋白在成熟小鼠睪丸中的表現

前人的研究也發現 *Gcse* 在小鼠睪丸中有表現，所以我們想知道 *Gcse* 在小鼠睪丸中是表現在哪個部位?我們利用免疫螢光染色的方式去辨認 *Gcse* 蛋白在成熟小鼠睪丸中的表現分佈。我們利用 Lectin-PNA 去辨認頂體上的蛋白，結果顯示 *Gcse-l* 表現在成熟精子頂體的位置 (Fig.2a)，而 *Gcse-s* 則表現在精子頭部的的位置 (Fig.2b)。

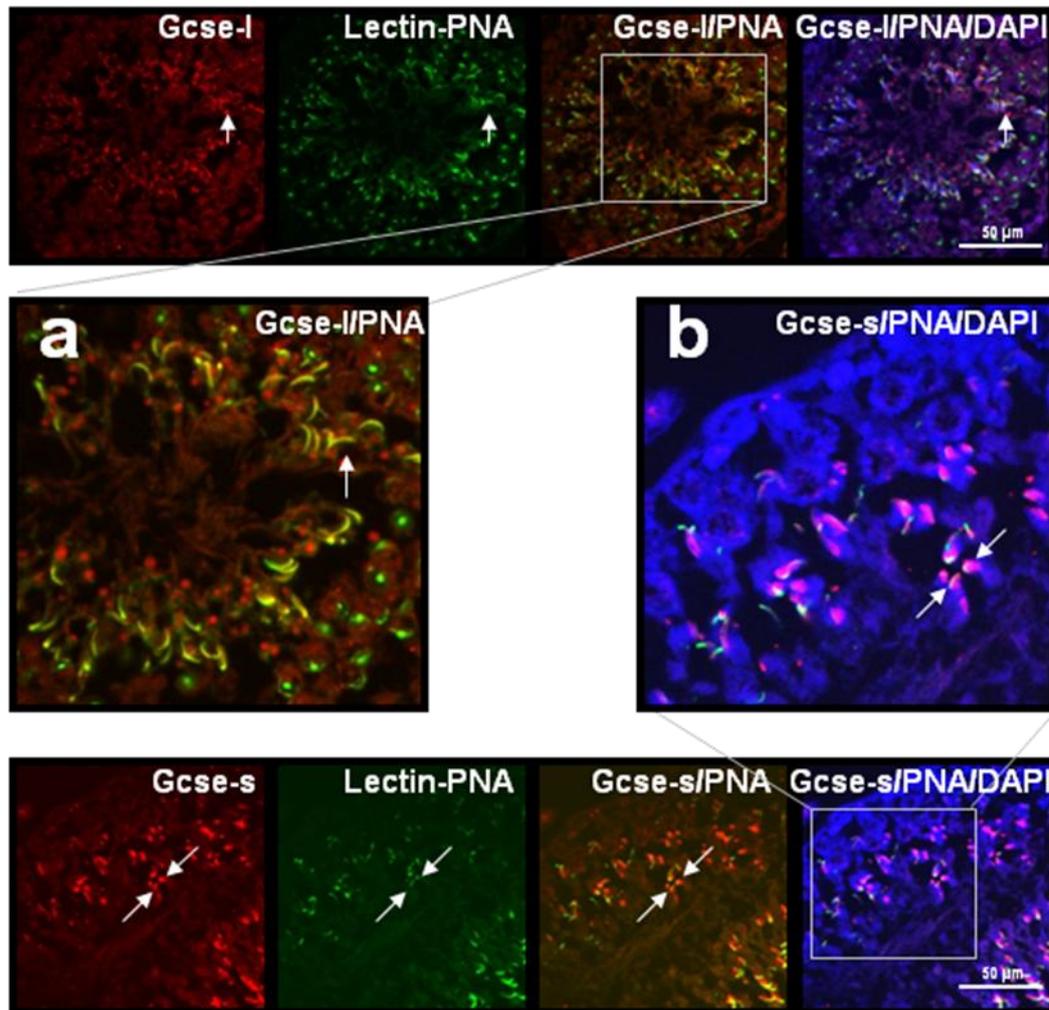


Fig.2a 利用免疫螢光染色可以看到箭頭所指的地方，*Gcse-l*(red)和 Lectin-PNA(green)共定位在成熟小鼠睪丸中精子頂體的位置。

Fig.2b 而 *Gcse-s*(red)則沒有與 Lectin-PNA(green)共同表現在頂體，但表現在精子頭部的的位置。(DAPI:blue)

(3).Gcse siRNA 片段的設計及其相對應的位置

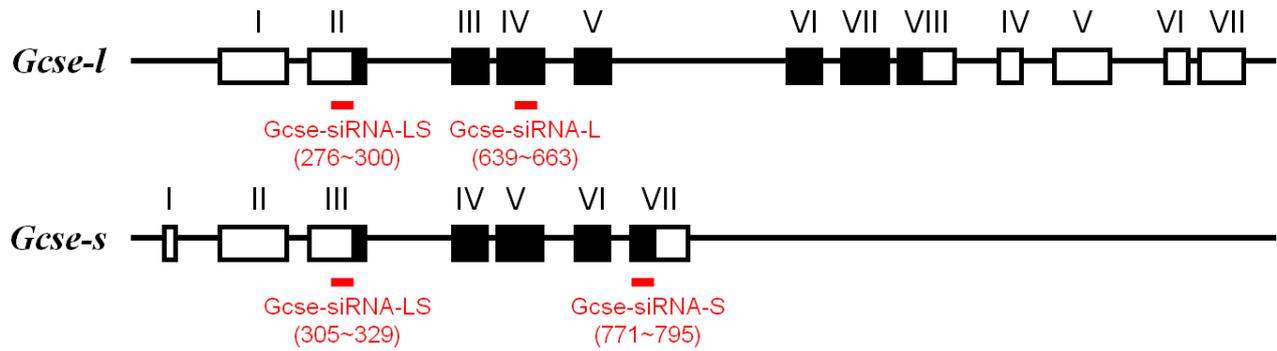


Fig.3 *Gcse-l* 和 *Gcse-s* 的 exon 位置和不同的 siRNA block point(red line)。

(4) siRNA 抑制 Gcse 蛋白表現:

In vitro:

首先我們為了要確認設計好的 siRNA 是否能夠有效的抑制 Gcse 蛋白的轉譯,我們將 *Gcse-l-V5* 表現載體以及會抑制 *Gcse-l* 的 siRNA-L 以及 *Gcse-l*、*Gcse-s* 都會抑制的 siRNA-LS 一起共同轉染(cotransfect)進去 GC1 細胞內,經過 72 小時後,收其蛋白並利用 Western Blot 的方法來檢測 siRNA 抑制 Gcse 表現的結果。結果顯示 siRNA-L、siRNA-LS 的 *Gcse-l* 的表現量確實比 siRNA-negative 低(Fig.4a),與 α -tubulin 比較過後得出統計圖(Fig.4b)。siRNA-L 及 siRNA-LS 降低 *Gcse-l* 的表現量至 50% 以下。

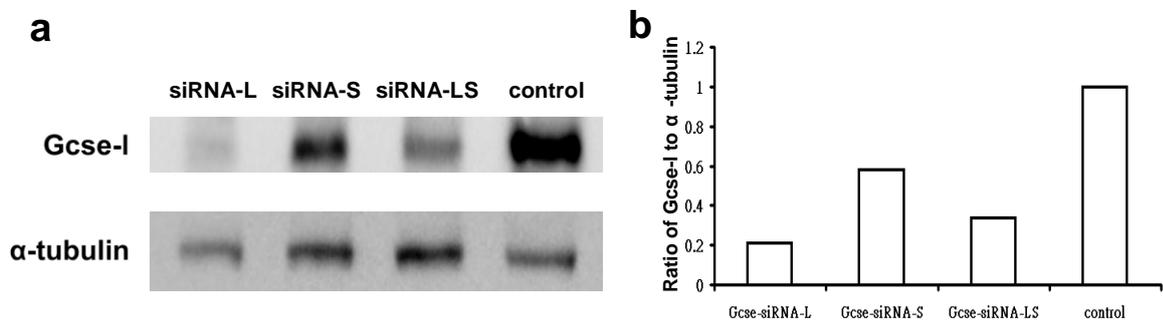


Fig.4a 以 Gcse-l 的抗體當作一抗,偵測在 GC1 細胞中 Gcse 蛋白的轉譯是否受 siRNA 的抑制。Gcse-siRNA-L 和 Gcse-siRNA-LS 的 Gcse-l 都比 siRNA-negative 的 Gcse-l 表現量低。

Fig.4b 將 Fig.4a 的 Gcse-l 與 α -tubulin 做比較, Gcse-siRNA-L 和 Gcse-siRNA-LS 的 Gcse-l 表現量都比 siRNA-negative 低

In vivo:

另外，我們也將會抑制 *Gcse-1* 的 siRNA-L 打入三週大的小鼠睪丸中(Fig.5a)，確認其是否能夠有效的抑制 *Gcse-1* 蛋白的轉譯。我們在打入 siRNA 三週過後，犧牲小鼠，取其睪丸萃取蛋白並利用 Western Blot 的方法來檢測結果。結果顯示 *Gcse-siRNA-L* 確實有抑制 *Gcse-1* 的表現(Fig.5b)，與 α -tubulin 比較過後得出長條圖，可以明顯的看出打入 *Gcse-siRNA-L* 的 *Gcse-1* 的表現量與 control 組比起來下降了約五成左右(Fig.5c)。

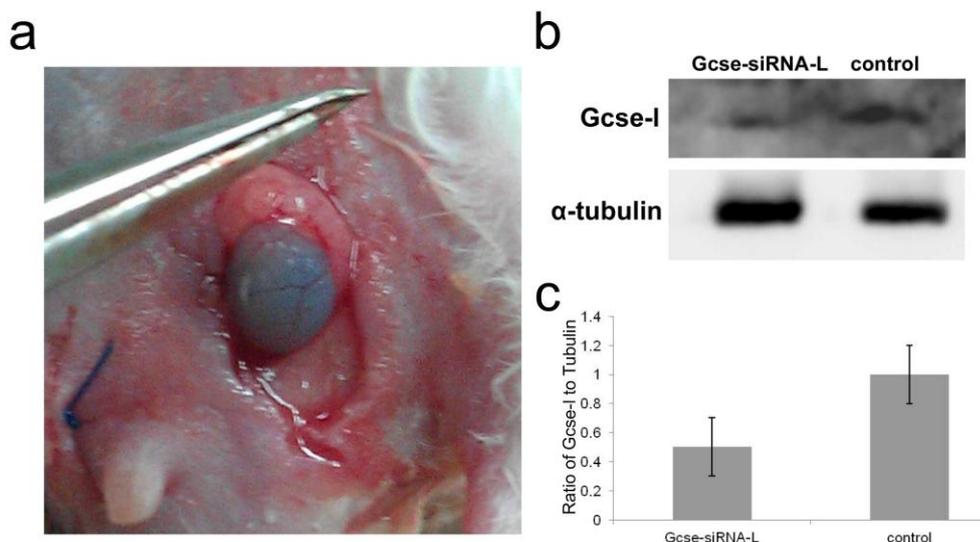


Fig.5a. 將設計好的 *Gcse-siRNA-L* 與 negative control 的 siRNA (含有 trypan blue) 打入三週大的老鼠睪丸細精管中。

Fig.5b. 以 *Gcse-1* 的抗體當作一抗,偵測在小鼠睪丸中 *Gcse-1* 蛋白的轉譯是否受 siRNA 的抑制。打入 *Gcse-siRNA-L* 的 *Gcse-1* 蛋白表現量比 control 組的 *Gcse-1* 蛋白表現量低。

Fig.5c. 將 b 的 *Gcse-1* 與 α -tubulin 做比較, 打入 *Gcse-siRNA-L* 的 *Gcse-1* 的表現量與 control 組比起來下降了約五成左右。

(5) Knock down *Gcse-1* 造成精子形態異常:

證明我們所設計的 siRNA 能有效抑制 *Gcse* 的表現後，我們想要知道將 *Gcse-1* knock down 後會不會對精子的生成造成影響?所以我們將 *Gcse-siRNA-L* 打入三週大的小鼠睪丸中三週後，從其尾狀副睪分離出成熟的精子，在顯微鏡底下以明視野觀察精子的型態是否有異常。結果顯示在 knock down *Gcse-1* 以後精子的頭部及身體皆會出現異常，其中以頭部出現異常的

比率較高。型態異常的精子其頭部與正常型態的精子比較，會從原本的彎月型變成類似棒狀的型態(Fig.6)。

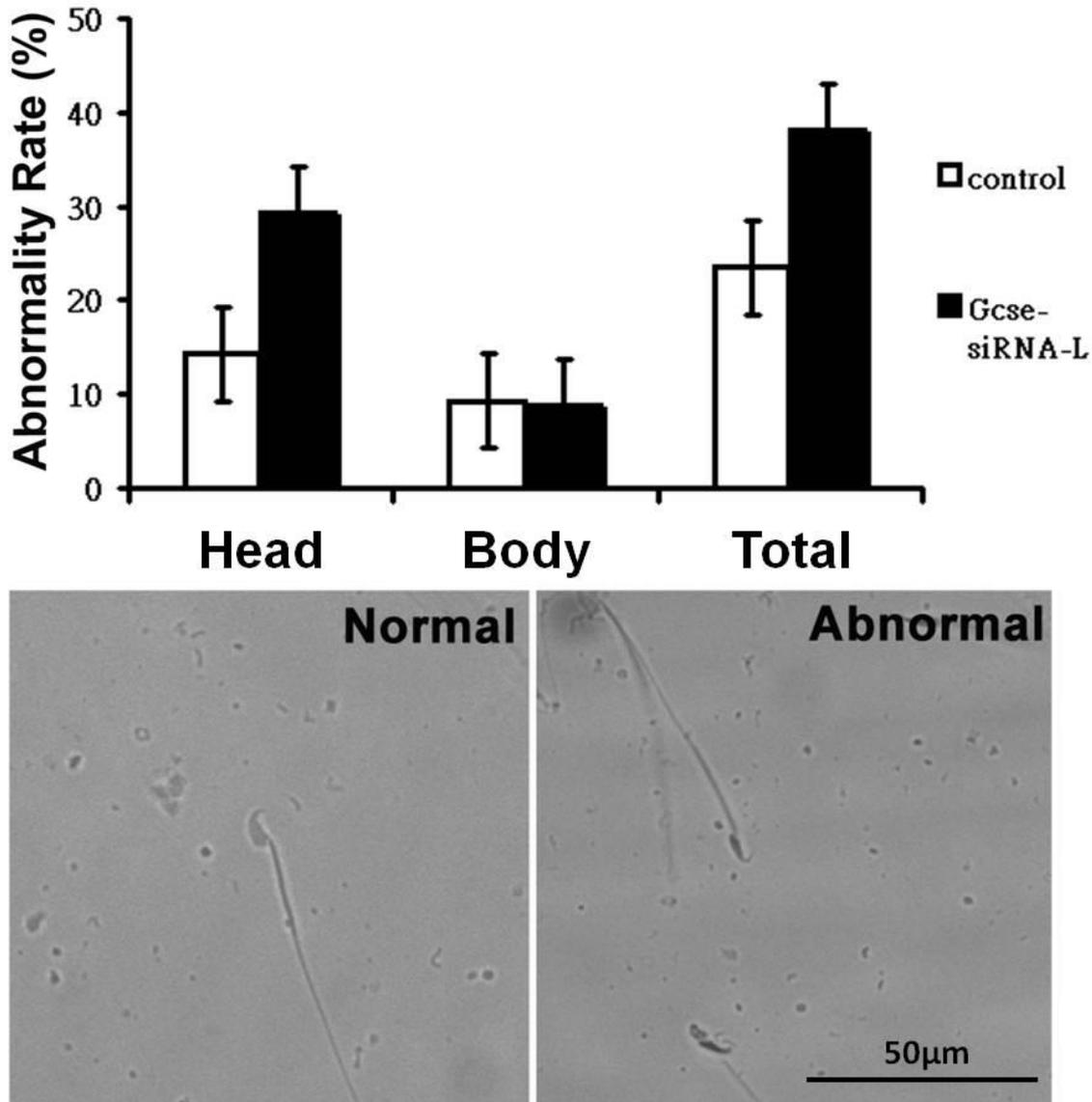


Fig.6 將 Gcse-siRNA-L 打入小鼠睪丸中，三週後從尾狀副睪分離成熟的精子，在顯微鏡底下以明視野觀察，發現有些精子有發生異常，其中以頭部異常較多。我們也統計出其頭部、身體及全身的變異率，knock down *Gcse-1* 後的精子頭部異常的變異率比 control 組高出將近 5 成。

另外，我們也以免疫螢光染色的方式去看那些頭部異常的精子，其頂體是否同樣也會出現異常。結果顯示，正常型態的精子頂體是呈現鐮刀型狀的，而頭部型態異常的精子，其頂體也同樣會有異常，有些甚至沒有頂體(Fig.7)。

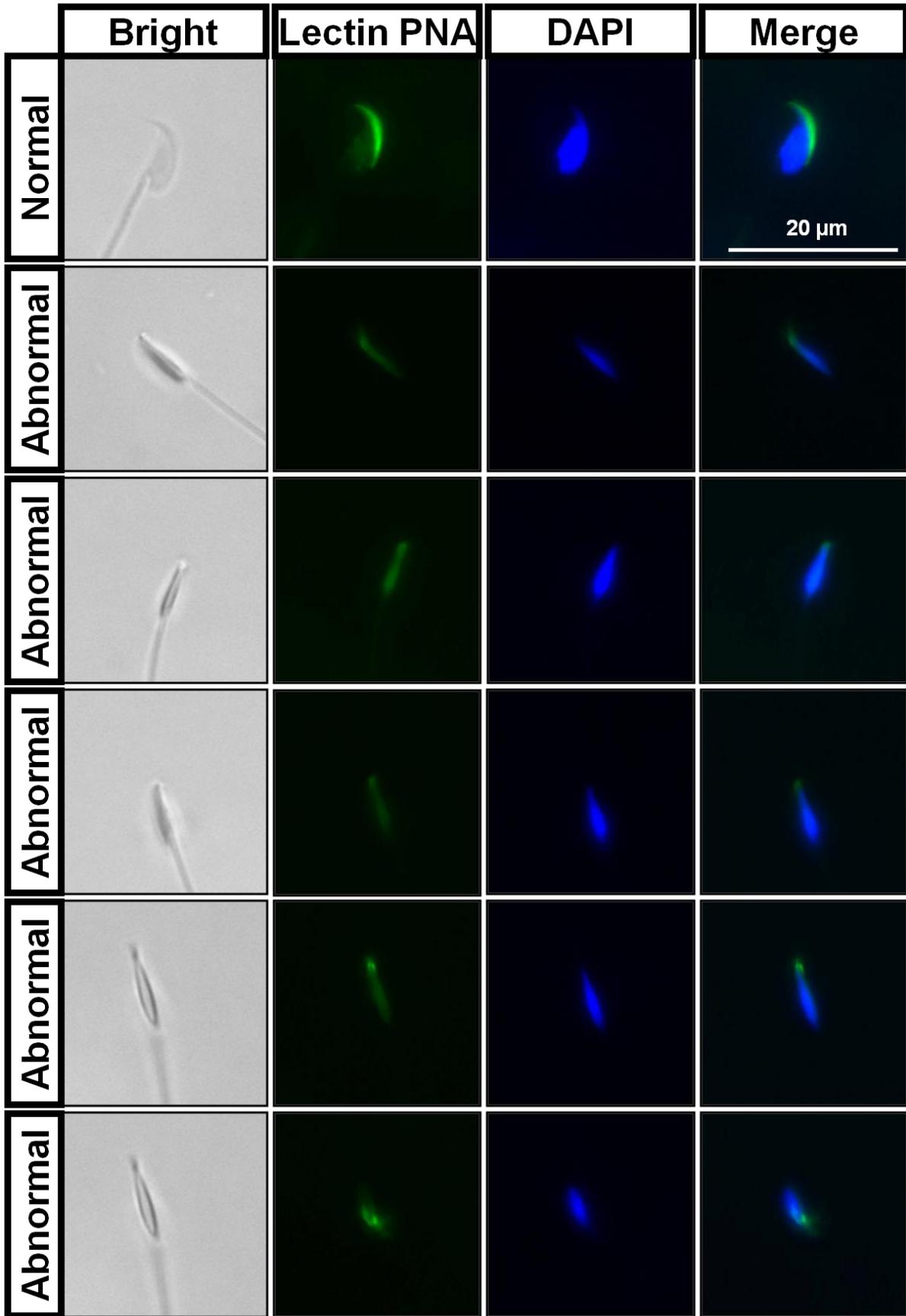


Fig.7 將 Gcse-siRNA-L 打入小鼠睪丸中，三週後從尾狀副睪分離成熟的精子，利用免疫螢光染色的方式染色，發現頭部有異常的精子，其頂體同樣會有異常。(DAPI:blue；Lectin PNA:green)

(六) 參考文獻

1. Wu, Y., Chen, X., Wang, S., Jiang, M., Zheng, B., Zhou, Q., Bi, Y., Zhou, Z., Huang, X., Sha, J. (2012) Flotillin-2 is an acrosome-related protein involved in mouse spermiogenesis. *Journal of Biomedical Research* 26(4):278-287
2. Huang, S.L., Chou, T.C., Lin, T.H., Tsai, M.S., and Wang, S.H. (2013) Gcse, a novel germ-cell specific gene, is differentially expressed during meiosis and gametogenesis. *Reproductive Sciences* 20(10), 1193-1206.
3. Guo, X., Shen, J., Xia, Z., Zhang, R., Zhang, P., Zhao, C., Xing, J., Chen, L., Chen, W., Lin, M., Huo, R., Su, B., Zhou, Z., Sha, J. (2010). Proteomic analysis of proteins involved in spermiogenesis in mouse. *Journal of Proteome Research*, 1246–1256
4. Baarends WM, Grootegoed JA. (1999). Cellular and molecular aspects of spermatogenesis. *Molecular Biology in Reproductive Medicine*, 275–286.
5. Zhao GQ, Garbers DL. (2002). Male germ cell specification and differentiation. *Developmental Cell* 2, 537–547.
6. Eddy EM. (2002). Male germ cell gene expression. *Recent Progress in Hormone Research* 57, 103–128.