

PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 方法对弱精子症精子 mtATPase6 基因突变的检测

金龙金* 张春玲 楼哲丰¹ 张李雅² 陈林丽 李 玮 吕建新

(温州医学院生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室; ¹ 生物学实验中心;

² 温州医学院附属第一医院生殖医学中心; 温州 325035)

摘要 为了检测弱精子症精子 mtATPase6 基因突变, 采用 PCR 方法扩增了 17 例弱精子症 mtDNA 8 602~9 416 区域 815 bp 目的片段, 用 *MspI* 和 *HaeIII* 限制性内切酶酶切, 分别用琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳和单链构像多态性(SSCP)筛查突变。筛选出 3 例突变标本, 经测序确认突变位点和突变性质。结果显示 17 例标本全部扩增出 mtDNA 8 602~9 416 的 815 bp 目的片段, PCR 产物经 *MspI* 限制性内切酶酶切后电泳结果与剑桥序列预期酶切图谱相一致。PCR 产物经 *HaeIII* 酶切, 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上出现泳动带的异常, 在 17 例弱精子症中共筛选出 2 例酶切片异常标本。PCR-*HaeIII* 酶切产物的 SSCP 电泳图谱分析结果显示, 在 PCR-RFLP(*HaeIII*)电泳图谱正常的 15 例弱精子症标本中筛选出 1 例异常。两种方法在弱精子症精子标本中筛选出 mtATPase6 基因突变 3 例(3/17, 17.7%)。3 例测序结果发现 A8701G、C8943T、C8964T、T8966C、G9053A、C9060A、C9075T、A9120G、C9296T 共 9 个点突变, 其中 A8701G、T8966C、G9053A 三个突变为错义突变, 其余均为同义突变。上述结果提示, 弱精子症精子 mtATPase6 基因存在较高突变率; PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 能简单、快速、灵敏地筛选 mtATPase6 基因突变。

关键词 弱精子症; mtATPase6; 点突变; PCR-RFLP; PCR-SSCP

近年来不孕症呈逐年增长趋势, 据 1995 年世界卫生组织人类生殖特别规划署(WHO/HRP)的统计学显示, 全球不孕夫妇已达 6 000~8 000 万对。仅在美国, 1995 年就有 670 万妇女寻求不孕服务^[1]。

Hirsh^[2]报道, 在不孕的夫妇中有一半是因为男方的精子质量异常或功能障碍引起。Toppari 等^[3]报道, 斯堪的那维亚人近 10 年男性精子浓度下降, 精子活动力和形态恶化, 致年轻一代生育力下降。Petrelli 等^[4]、Hanke 等^[5]、Sallmen 等^[6]报道随着环境的恶化男性的精子质量、生育力受到了影响。

男性不育的病因很多, 精子质量低下是其中重要原因之一, 精子活动力是衡量精子质量的一项重要指标, ATP 是精子活动的主要能量来源。精子线粒体是精子的供能中心, mtATPase6 基因编码线粒体氧化磷酸化 ATP 酶复合体的第 6 亚单位, 参与线粒体的能量代谢。近年来, mtDNA 突变和缺失与男性不育的相关研究已引起人们的关注, Kao 等^[7]发现 mtDNA 4 977 bp 缺失、7 345 bp 缺失和 7 599 bp 缺失与精子活动力障碍有关。但线粒体基因点突变与精子活动力关系的研究还很少见, 而 mtATPase6 基因点突变

与弱精子症的关系研究更少见。本文用几种方法筛查了 17 例弱精子标本 mtDNA 8 602~9 416 区域(覆盖 mtATPase6 基因的绝大部分片段)的点突变。

1 材料与方法

1.1 研究对象

弱精子症精液标本来自本校附属医院生殖医学中心, 按世界卫生组织(WHO)精液参数标准, 选取精子活动力低下(a 级<25% 或 a+b 级<50%)病例 17 例, 禁欲 3 天以上, 手淫法采集精液标本, 37℃ 液化 20~30 min。

1.2 主要试剂

PCR 扩增引物依据文献^[8]设计, 上游引物位于 mtDNA 的 8 602~8 621, 序列为 5'-TTTCCCCCTCT-ATTGATCCC-3'; 下游引物位于 mtDNA 的 9 397~9 416, 序列为 5'-GTGGCCTTGGTATGTGCTTT-3',

收稿日期: 2007-05-29 接受日期: 2007-06-19

浙江省自然科学基金(No.Y206582)和温州市科技发展计划项目(No.Y20060063)资助

* 通讯作者。Tel: 0577-86689780, E-mail: jl20050101@yahoo.com.cn

引物由宝生物工程(大连)有限公司合成;限制性内切酶 *MspI*、*HaeIII* 为 Fermentas 公司产品;PCR 聚合酶试剂、DNA 片段纯化试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品;琼脂糖、Tris 试剂为 Promega 公司进口分装;蛋白酶 K 为 Merk 公司的产品;Tris- 饱和酚 (pH 8.0) 为上海生物工程技术服务有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 精子mtDNA的提取 参照人类血标本DNA常规酚-氯仿抽提方法略加以改进提取精子基因组总DNA, 主要改进之处是裂解液中加入 DTT 和裂解温度提高到 56 °C 裂解 1 h。

1.3.2 PCR 反应和产物鉴定 1 μ l DNA 模板, 上游引物和下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ l, dNTP 混合物(2.5 mmol/L)各 2 μ l, 1.5 μ l 25 mmol/L $MgCl_2$, 2.5 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲液(Mg^{2+} free), 0.1 μ l Taq酶(TaKaRa), 补充 ddH₂O 至 25 μ l。反应体系在 94 °C 预变性 5 min 后, 按 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min 程序共循环 33 次, 最后 72 °C 终末延伸 8 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖电泳鉴定。

1.3.3 PCR 产物的纯化和限制性内切酶酶切 按宝生物工程(大连)有限公司 DNA 片段纯化试剂盒说明书操作纯化 PCR 产物, 纯化以后的 PCR 产物分别用 *MspI*、*HaeIII* 两种限制性内切酶消化, 消化反应体系和反应条件按说明书操作, *MspI* 消化后的产物用 1.5% 琼脂糖电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶图像分析仪观察结果并照像。*HaeIII* 消化后的产物用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染, 数码照像。

1.3.4 *HaeIII* 限制性内切酶酶切产物的单链构象多态性(SSCP)分析 配置 6% 聚丙烯酰胺凝胶, 交联度 49:1, 含 5% 甘油。电泳槽加 0.5 $\times$ TBE, 120 V 预电泳 45 min。取 5 μ l PCR 酶切产物, 与等体积的 2 $\times$ 上样缓冲液混匀, 95 °C 变性 5 min 后冰浴 5 min, 立即加样, 每个加样孔中加 6 μ l 变性混合物。220 V, 18 °C, 电泳 12 h。银染显色, 将凝胶置于固定液(10% 冰乙酸溶液)中固定 30 min, 去离子水洗涤 3 次, 每次 3 min; 染色液(0.11% 硝酸银, 0.15% 甲醛)中染色 30 min, 去离子水冲洗 10 s; 置入显色液(3% 无水碳酸钠, 0.2 mg/L 硫代硫酸钠, 0.15% 甲醛)中显色至条带清晰时用 10% 冰乙酸溶液停显。白光观察, 数码照像。

1.3.5 序列测定 经 PCR-RFLP(*HaeIII*)和 PCR-SSCP 筛查出有突变的 3 例 PCR 产物经纯化后送宝生物工程(大连)有限公司进行正向测序, 将结果与剑桥

序列进行比对, 并观察测序峰图是否出现突变。

2 结果

2.1 PCR-RFLP 检测突变

2.1.1 mtDNA 8 602~9 416 片段 PCR 扩增 17 例精子活动力低下的精子 DNA 标本全部扩增出特异性条带。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示 815 bp, 与预期产物片段大小一致(图 1)。

2.1.2 PCR-RFLP对mtDNA 8 602~9 416片段突变筛查 mtDNA 8 602~9 416 片段的 PCR 产物经限制性内切酶 *MspI* 酶切消化后, 琼脂糖凝胶电泳产生 2 条片段, 1 条为 690 bp, 1 条为 125 bp(图 2)。结果与剑

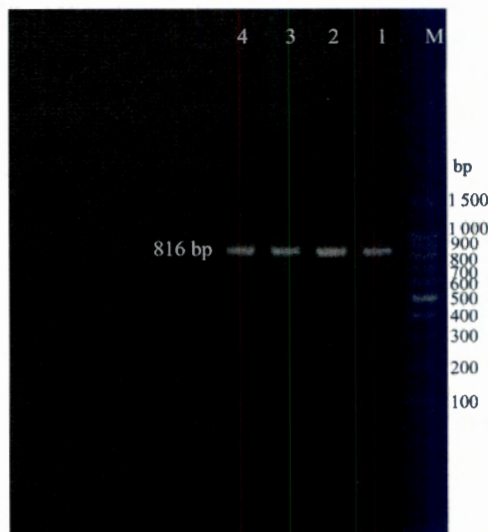


图1 mtDNA 8 602~9 416 片段 PCR 扩增产物电泳图谱

M: DNA 标准; 1~3: 弱精子标本; 4: 活动力正常精子标本。

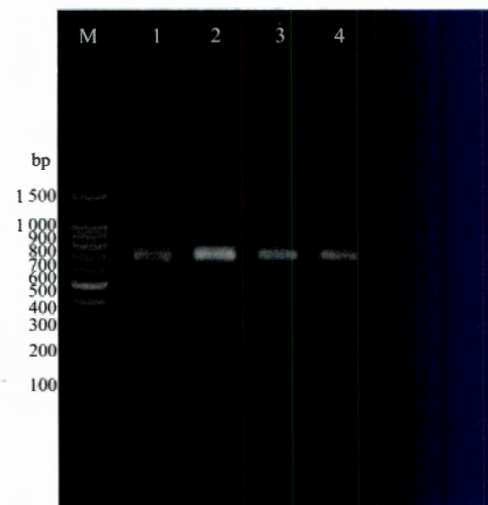


图2 mtDNA 8 602~9 416 PCR 扩增片段 *MspI* 酶切产物电泳图

M: DNA 标准; 1~2: 弱精子标本; 3~4: 活动力正常精子标本。

桥序列预期酶切片段大小一致。mtDNA 8 602~9 416 片段的 PCR 产物经限制性内切酶 *Hae*III 酶切, 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 从 17 例弱精子症精子 DNA 标本中共筛查出 2 例有异常电泳带(图 3)。

2.2 PCR-SSCP 检测突变

*Hae*III 酶切产物经变性, SSCP 电泳, 从 17 例标本中筛查出 2 例(其中 1 例在 PCR-RFLP 筛查结果中异常)具有泳动带异常的标本(图 4)。

2.3 WZSD70、WZSD74、WZSD79 标本 mtDNA 8 602~9 416 测序

WZSD70、WZSD74、WZSD79 三个标本测序结果与剑桥序列比对并观察测序峰图共检测出 9 个点突变, 分别是 A8701G、C8943T、C8964T、T8966C、G9053A、C9060A、C9075T、A9120G、

C9296T, 其中 A8701G(WZSD74)、T8966C(WZSD70)和 G9053A(WZSD79)3 个突变为错义突变, 分别是 Thr-Ala、Ile-Thr、Ser-Asn 突变(表 1, 图 5~图 11)。突变位点两侧序列与 *Hae*III 限制酶识别序列进行比较, 除 WZSD74 的 C9296T 突变使酶切位点丢失外, 其余突变均未涉及酶切位点。

2.4 WZSD70、WZSD74、WZSD79 突变标本的精子活动力指标分析

3 例筛选出 mtATPase6 基因突变的标本精子活动力低下, 其中 WZSD74 标本的精子活动力严重低下(a 级精子 1.2%, b 级精子 2.6%), 比 WZSD70(a 级精子 22.1%, b 级精子 2.6%)和 WZSD79(a 级精子 25.2%, b 级精子 7.3%)精子活动力更低。

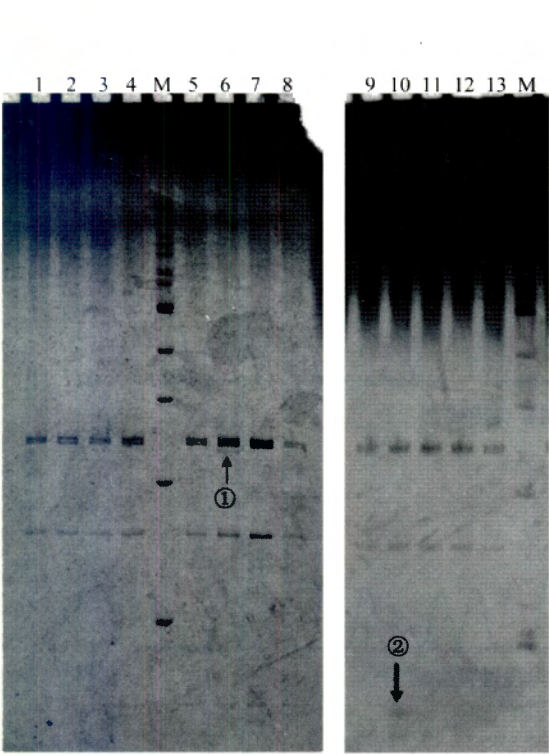


图 3 *Hae*III 酶切产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
M: 100 bp DNA 标准; 1~5、7~9 和 11~13: 正常电泳带; 6(WZSD70)、10(WZSD74)箭头所示①和②异常电泳带。

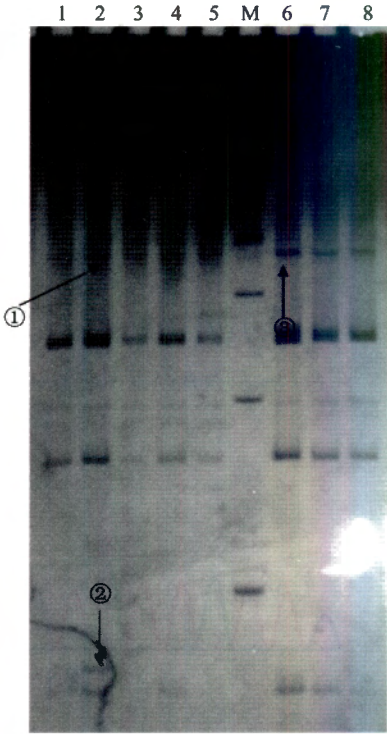


图 4 *Hae* III 酶切产物 SSCP 电泳图谱
M: 100 bp DNA 标准; 1、3~5 和 7~8: 正常泳动带标本; 2(WZSD74)、6(WZSD79)标本箭头所示①②③为异常电泳带。

表 1 WZSD70、WZSD74、WZSD79 标本测序结果的点突变

样品编号	8701	8943	8964	8966	9053	9060	9075	9120	9296
WZSD70		C-T*		T-C* [△]		C-A*	C-T*	A-G*	
				Ile-Thr					
WZSD74	A-G [△]	C-T*	C-T						C-T
	Thr-Ala								
WZSD79					G-A [△]				
					Ser-Asn				

[△]错义突变, * 异质性突变, 其余均为同义突变和同质性突变

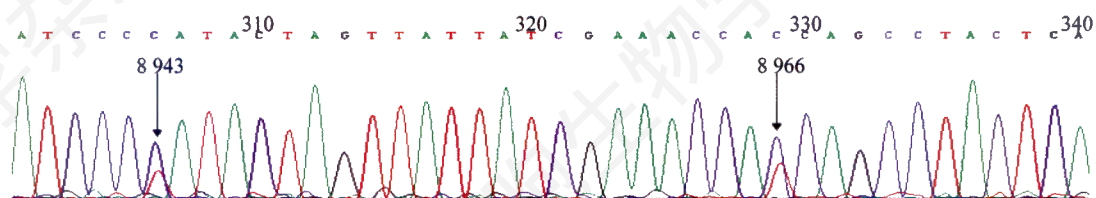


图5 WZSD70 标本 C8943T 和 T8966C 异质性突变峰图

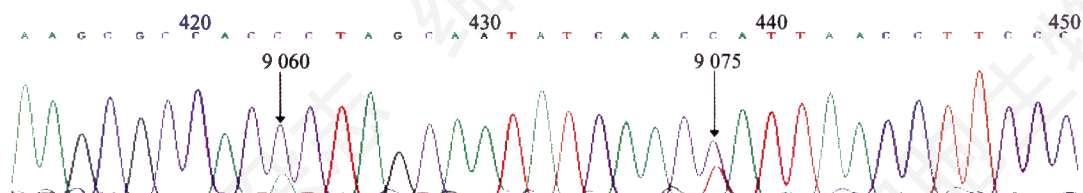


图6 WZSD70 标本 C9060A 和 C9075T 异质性突变峰图

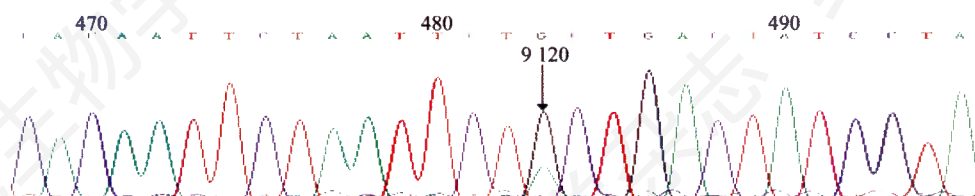


图7 WZSD70 标本 A9120G 异质性突变峰图

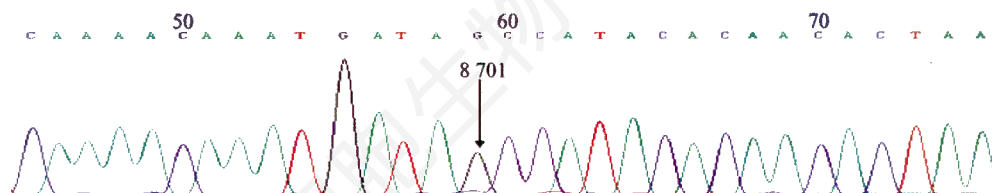


图8 WZSD74 标本 A8701G 突变峰图

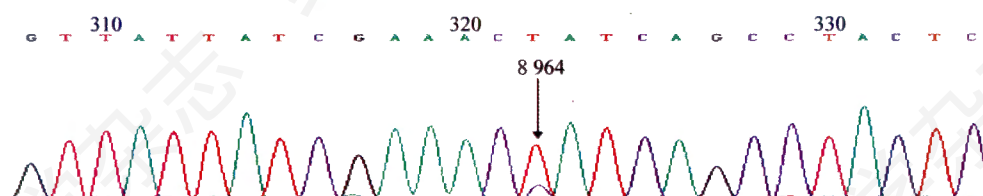


图9 WZSD74 标本 C8964T 异质性突变峰图

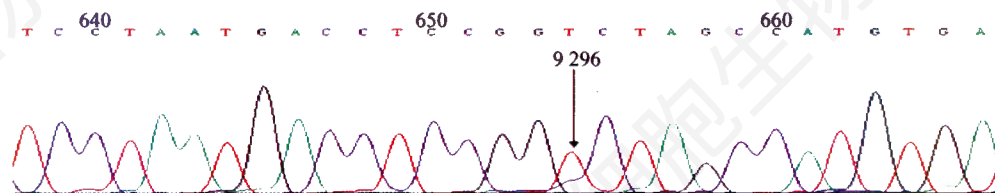


图10 WZSD74 标本 C9296T 突变峰图

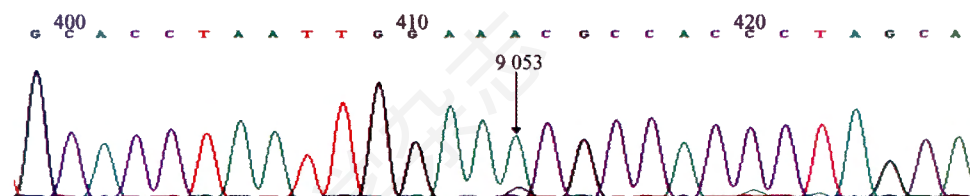


图11 WZSD79 标本 G9053A 突变峰图

3 讨论

越来越多的证据证明精子活动力依赖于精子线粒体的氧化磷酸化供能。线粒体基因编码了呼吸链和氧化磷酸化 ATP 酶 4 个复合体中的部分亚基, 这些基因的突变可能导致精子氧化磷酸化功能异常和产能不足, 从而导致精子活动力降低。Ruiz-Pesini 等^[9]通过分析了有生育障碍的高加索人线粒体单倍体突变来研究线粒体突变的作用, 结果显示具有 H 型单倍体突变的人精子氧化磷酸化功能显著高于其他类型, 而具有 T 型单倍体突变的人精子氧化磷酸化功能显著低于其他类型, 由于限制酶只能发现酶切位置上的碱基突变, 因而他们未能在 T 单倍型中检测到 mtATPase6 基因的突变。Holyoake 等^[10]发现 2 个最常见的突变 9 055 和 11 719 在低活动力精子中发生率显著升高。因此线粒体基因突变检测尤其是编码氧化磷酸化酶亚单位的线粒体基因突变的检测对于弱精子症发生的相关性研究具有重要的意义。

我们分析的 17 例标本中, 采用 PCR-RFLP 检测出了 2 例电泳带异常的标本, 说明酶切片段产生了差异(图 3)。这 2 例的测序结果, 从突变点及其两侧的序列看仅 1 例(WZSD74)的 1 个点突变 C9296T 导致 HaeIII 限制酶酶切位点的丢失, 从而产生电泳异常, 其余突变均未涉及 HaeIII 酶切位点。在突变峰图中也未发现酶切位点的异质性突变。我们推测 WZSD70 酶切电泳图谱中产生的差异可能是涉及酶切位点的异质性突变, 但其突变 DNA 的比例未达到能够在测序中检测出来的水平。PCR-SSCP 是检测未知 DNA 突变的简单快速的方法之一, 但该方法 PCR 产物的长度一般要求在 400 bp 之内, 我们 PCR 扩增的片段长度为 815 bp, 超过 400 bp, 因此我们应用了 PCR-限制酶-SSCP 方法, 结果检测出了 2 例异常条带(图 4), 根据电泳条带的位置和测序序列酶切位点分析, WZSD74 和 WZSD79 标本异常条带①③的产生可能是位于 8 602~8 839 或 9 027~9 267 区间的碱基突变, 测序结果在 mtDNA 8 602~8 839 区段仅 WZSD74 标本发现 A8701G 的突变, 该突变可能是导致 SSCP 电泳图中异常条带①产生的原因(图 4)。WZSD79 标本

测序结果在 8 602~8 839 区段内未发现基因突变, 而在 9 027~9 267 区段内发现了 1 个位点 G9053A 的突变, 该突变可能是电泳异常条带③(图 4)产生的原因。另外 WZSD74 标本异常条带②可能是 C9296T 突变使 HaeIII 限制酶酶切位点丢失的结果。如果以上推测成立, 我们认为 PCR-RFLP 和 PCR-限制酶-SSCP 方法是一种简单、快速、灵敏的筛选基因突变的方法。

mtATPase6 基因突变与弱精子症发病相关的研究报道还很少见, Thangaraj 等^[11]在一例低活动力精子患者中通过对 mtATPase6 基因测序检测到 10 个单核苷酸替换, 其中 A8678C 和 A8860G 的突变为错义突变, 而在血液细胞中没有发现核苷酸替换。错义突变可能对蛋白质的空间结构和功能造成影响。Thangaraj 等的研究结果和我们对 3 例弱精子症精子 mtATPase6 测序的结果推测在精子线粒体中可能比体细胞有更多的点突变, 这些点突变可能和精子活动力有关, 也可能与精子活动力无关, 再根据 Holyoake 等^[10]的研究结果, 推测这些点突变中可能有部分与其他位点的突变组成突变单倍体影响精子活动力。在我们测序分析的 3 例弱精子症标本中出现了 9 个位点的碱基替换(其中 8 个位点突变位于 mtATPase6), 在这 9 个碱基替换中, 有 5 个位点为异质性突变, 有 3 个位点的碱基替换为错义突变, 这 3 个错义突变在弱精子症的发生中可能更有意义, 但是否与精子活动力低下相关有待于做进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Stephen EH et al. *Fam Plann Perspect*, 2000, **32**: 132
- [2] Hirsh A et al. *BMJ*, 2003, **327**: 669
- [3] Toppari J et al. *Cad Saude Publica*, 2002, **18**: 413
- [4] Petrelli G et al. *Contraception*, 2002, **65**: 297
- [5] Hanke W et al. *Int J Occup Med Environ Health*, 2004, **17**: 223
- [6] Sallmen M. *Int J Occup Med Environ Health*, 2001, **14**: 219
- [7] Kao SH et al. *Mol Hum Reprod*, 1998, **4**: 657
- [8] Rieder MJ et al. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**: 967
- [9] Ruiz-Pesini E et al. *Am J Hum Genet*, 2000, **67**: 682
- [10] Holyoake AJ et al. *Int J Androl*, 2001, **24**: 175
- [11] Thangaraj K et al. *J Androl*, 2003, **24**: 388

Detection of *mtATPase6* Point Mutation on Asthenospermia by PCR-RFLP and PCR-SSCP

Long-Jin Jin*, Chun-Ling Zhang, Zhe-Feng Lou¹, Li-Ya Zhang², Lin-Li Chen, Wei Li, Jian-Xin Lu
(College of Life Sciences, Key Research Laboratory for Medical Genetics of Zhejiang; ¹Central Laboratory of Biology;
²Reproductive Medicine Center, First Affiliated Hospital; Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract The aim of the research is to detect the relativity between *mtATPase6* point mutation in sperms and asthenospermia. The 815 bp fragment of mtDNA 8 602–9 416 was amplified by PCR for 17 asthenospermia cases. Detection of mutation was performed using PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) with restriction enzymes *MspI* or *HaeIII* and PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) analysis. Three mutant cases were detected and confirmed by DNA sequencing with their mutant sites. The result of PCR-RFLP with *MspI* is consistent with the forecasted restriction map in all 17 cases. But 3 cases with mutations were detected by PCR-RFLP with *HaeIII* and PCR-SSCP. There are several types of *mtATPase6* point mutations: A8701G, C8943T, C8964T, T8966C, G9053A, C9060A, C9075T, A9120G and C9296T. Three of them (A8701G, T8966C, G9053A) were missense mutation. There is higher mutation rate of *mtDNAase6* in asthenospermia sperms. PCR-RFLP and PCR-SSCP are two simple and quick methods for detecting gene mutation.

Key words asthenospermia; *mtATPase6*; point mutation; PCR-RFLP; PCR-SSCP

Received: May 29, 2007 Accepted: June 19, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y206582) and the Wenzhou Science & Technology Development Program (No.Y20060063)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689780, E-mail: jl20050101@yahoo.com.cn