

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.10.029

KATNAL1 基因突变筛查及其与无精症的相关性分析*

张国铸 黄灿华 周 鹏 黄文城 万 强[△]

(广州君赫生物科技有限公司 广东 广州 510300)

摘要 目的:探讨男性不育症患者 Katnal15 基因的一个突变位点与男性不育症的关系及意义。**方法:**运用聚合酶链反应(PCR)结合琼脂糖凝胶电泳和基因序列分析等方法,对 77 例原发性男性不育患者以及 84 名已生育的正常男性进行 Katnal1 基因筛查。**结果:**与精子形成的关键基因 KATNAL1 中 1 个致病突变位点 A236G 为的男性精子无力症 Katnal1 基因筛查的主要候选基因。**结论:**Katnal1 基因蛋白质编码序列区 A236G 可能是特发性少精无精症的诱发因素之一。临床上对原发性不育患者进行 A236G 基因突变筛查是十分必要的。

关键词:原发性不育;KATNAL1;无精症;少精症

中图分类号:R697.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)10-1909-03

KATNAL1 Gene Mutation Screening and its Association with Azoospermia*

ZHANG Guo-zhu, HUANG Can-hua, ZHOU Peng, HUANG Wen-cheng, WAN Qiang[△]

(Geneheal Biotechnology Co, Ltd, Guangzhou, Guangdong, 510300, China)

ABSTRACT Objective: To explore the association between a mutation of male sterility gene Katnal15 and the male infertility and its significance. **Methods:** Katnal1 gene of 77 primary infertile patients and 84 normal fertile male was detected by PCR techniques combined with agarose gel electrophoresis and gene sequence analysis. **Results:** A236G, an important disease-causing gene mutation site of Katnal1 gene which was essential for sperm development, was found to be the candidate screening gene for male azoospermia. **Conclusion:** The study demonstrates that A236G in the coding region of KATNAL1 gene may be one of the causative factors of oligospermia and azoospermia, resulting in male infertility. Clinically, it is necessary to perform a screening examination for A236G gene within the male primary infertile patients.

Key words: Primary infertility; KATNAL1; Azoospermia; Oligospermia

Chinese Library Classification(CLC): R697.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)10-1909-03

前言

Katnal1 基因编码的蛋白是调控提供养分并促使精子在睾丸内自由活动的微管不可或缺的组成物质^[1]。Katnal1 来源于在神经可塑性中具有围观切断蛋白功能的 KATANIN p60 基因家族(66%区域相同,78%区域保守)^[2]。KATANIN p60 被认为在有丝分裂和雌性减数分裂中增加微管的量以便于染色体的分离^[3-5]。

研究发现 KATNAL1 蛋白缺失导致不成熟精子过早释放。Katnal1 基因突变雄性小鼠表现为不育^[6]。KATNAL1 基因可以表达于小鼠的各种组织中,包括脑和肝脏,但是只有 Katnal1 基因突变会导致小鼠睾丸异常,质量和体积均小于正常睾丸。对于人类胚胎肾细胞研究发现过表达 KATNAL1,推测人类可能具有与小鼠相似的变化。精细胞成熟的一个重要的调控因子为细胞骨架所造成的联系,主要变化为极性细胞形状以及成份变化,从圆形的、富含胞质的未成熟状态转变为成熟状态,失去过

量胞质。精子在发育过程中依赖支持细胞提供营养,并将营养物质输送到管腔中^[7],两者关系密切。精子 KATNAL1 通过切断微管丝调控了微管动力学^[8,9]。

本研究室 katnal1 基因编码区的突变为例建立起的方法,进一步分析少精、无精症患者与 katnal1 基因突变的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

选择 2011 年 6 月 -2012 年 9 月间 84 名正常生育的男性及 77 名不育男性外周血标本。其中正常生育男性作为对照组,精液常规检查精子数均 $> 40 \times 10^6/\text{ml}$ 。而特发性不育男性年龄 27-39 岁,平均 32 岁,平均不育年限 5.5 年,其中连续 2 次精液分析并经离心沉淀均未发现精子者为无精子症,共 34 例;精子密度 $< 5 \times 10^6/\text{mL}$ 者为严重少精子症,共 43 例。所有参与的人员均通过临床检查排除精索静脉曲张、内分泌紊乱、生殖道梗阻、隐睾、附睾损伤等其他泌尿生殖系统疾患,且无特殊病史及

* 基金项目:广东省科技计划项目(2012B010900044)

作者简介:张国铸(1989-),男,本科,研发骨干,从事疾病分子诊断,分子诊断试剂盒研发方面的研究, E-mail: zhangguoz125@sina.com

[△] 通讯作者:万强(1980-),男,博士,技术总监,从事疾病分子诊断,分子诊断试剂盒研发的方面研究

(收稿日期:2014-10-16 接受日期:2014-11-12)

家族史。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 外周血基因组 DNA 的抽提 使用德国 Qiagen 公司的全血 DNA 提取试剂盒, (1) 每个患者分别取 EDTA 抗凝全血 1 mL, 加入到 1.5 mL 的 EP 管中, 加入 20 μ L 蛋白酶 K 和 Buffer AL, 充分混匀并且振荡 15 sec。(2) 56 $^{\circ}$ C 条件下温育 10 min。(3) 加入 200 μ L 的无水乙醇, 充分混匀冰振荡 15 sec。(4) 将样品转入 QIAamp spin column 离心柱管中, 8000 r/min 离心 1 min。(5) 去除离心柱下的滤液, 加入 500 μ L 的 Buffer AW1, 8000 r/min 离心 1 min。(6) 去滤液, 加入 500 μ L 的 Buffer AW2, 14000 r/min 离心 3 min。(7) 将 QIAamp spin column 离心柱放入 1.5 mL 的 EP 管中, 在 QIAamp spin column 膜中部加入 50 μ L 的超纯水, 室温静置 2 min, 8000 r/min 离心 1 min, 将 DNA 洗脱下来; (8) 取适量的产物进行 DNA 定量, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 聚合酶链反应(PCR)引物设计 采用 *katnall* 基因来扩增, 选择 *katnall* 基因所含的外显子基因, 引物由上海生工公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences primer

基因名称 Name of gene	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
KAex1-F	ATG AAT TTG GCT GAG ATT TG
KAex1-R	CTG TTG CCA TTT GCC TTT G
KAex2-F	GTT CGG CAG GAA TTA TTG
KAex2-R	CTG TGT TCT GCA GGA ACA G
KAex3-F	AGC TCC ACC TCA GAT CAG
KAex3-R	CTT GTC ATC TCT CCC TCT
KAex4-F	GGA AGG AAG AAT ATG CAA G
KAex4-R	CAA TGA ATG CTA GGA TTC C
KAex5-F	GGA TGA CAT AGC AGA TCT G
KAex5-R	CTT CCA TGG CCT TCT AAT C
KAex6-F	GGT GTA CTG ATG GTT GGA
KAex6-R	CAT CTC AAA CAA CAG ACG A
KAex7-F	GCT AGA TTT TAT GCC CCT A
KAex7-R	CAT CCA TCT GAA TGA GCA
KAex8-F	GAG TTG GAG GAG CTT TAG
KAex8-R	CTG TTG GGA GAG GTA TAT A
KAex9-F	CAA AAG GAA GAG CTG AGC
KAex9-R	CTG CAA ACA TTA GTG ATG T
KAex10-F	GGA TGC CTC TTT AAT GGC
KAex10-R	TCA AGC AGA TCC AAA TTC AAC

1.3 PCR 扩增和检测

PCR 反应体系总体积为 25 μ L, 包括 DNA 模板约 100 ng、10 $\times$ buffer 2.5 μ L、dNTP 终浓度 200 μ mol/L、10 pmol/L 引物各 0.5 μ L、DNA 聚合酶 1 U。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min、95 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 最后置 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物检测经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 60 V 恒压电泳 30 min, 溴乙锭染色后在凝胶成像系统观察结果。PCR 反应中均设有正常生育男性对照。

1.4 外显子 PCR 扩增产物序列测定

1.4.1 PCR 产物的凝胶回收 用 Qiagen 公司的凝胶回收试剂

盒从凝胶中回收 DNA 样品, 方法如下:

- (1) 在紫外灯下用刀片切下含有预期条带的凝胶块。
- (2) 将切下的凝胶块, 放入 EP 管中, 每 100 mg 凝胶倒入 600 μ L Buffer QG 缓冲液, 55 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 在此期间每隔 1-2 min 中轻摇 EP 管, 使凝胶完全溶解。
- (3) 加入 100 μ L 异丙醇并振荡混匀。
- (4) 将样品转移到 Qiaquick spin column 柱中, 13000 r/min 离心 1 min。
- (5) 弃去离心柱底部的液体, 加入 0.5 mL 的 Buffer QG, 13000 r/min 离心 1 min。
- (6) 弃去离心柱底部的液体, 加入 0.75 mL 的 Buffer PE, 13000 r/min 离心 1 min。
- (7) 弃去离心柱底部的液体, 再次 13000 r/min 离心 1 min。
- (8) 将 Qiaquick column 中的过滤柱放入一支空的 1.5 mL EP 管中, 往柱中过滤膜上加入 25 μ L 超纯水, 室温下静置 2 min, 13000 r/min 离心 1 min, 收集管中离心液。
- (9) 取适量的回收产物分别进行 DNA 定量和电泳鉴定回收效果。

1.4.2 序列测定 PCR 扩增产物纯化后, 以相应引物, 委托上海生工公司进行 DNA 序列测定。

2 结果

Katnall 基因的 PCR 扩增产物送生工公司测序, 结果显示不育症男性患者中发现 21 例 *Katnall* 基因 KAex2 外显子区 236 位碱基发生了 A-G 的杂合突变, 1 例为 KAex4 区突变, 1 例为 KAex9 区存在突变。84 例正常生育的男性中没有发现 *Katnall* 基因中有突变的情况。

表 2 原发性不育组和正常生育对照组 GALNTL5 基因测序检测结果
Tbale 2 Detection results of GALNTL5 gene sequencing in primary infertility group and normal fertile group

KATNAL1 编码区 The KATNAL1 coding region	原发性不育组例数 Cases of mutation in primary infertility group	正常生育对照组例数 Cases of mutation in normal fertile group
KAex1	0	0
KAex2	21	0
KAex3	0	0
KAex4	1	0
KAex5	0	0
KAex6	0	0
KAex7	0	0
KAex8	0	0
KAex9	1	0
KAex10	0	0

3 讨论

随着社会发展以及各种压力或者污染等等, 造成人类生殖能力下降, 全世界有 20% 左右的育龄夫妇会面对不育不孕问

题,因为男性不育占到40%~60%^[10]。现在临床上男性不育常见病因有精子生成以及成熟障碍、精子的输运及附属性腺功能障碍等,深层次原因复杂,主要涉及生殖系统激素调节、遗传、感染机制等^[11],还有很多原因不明的不育症,包括特发性无精子、弱精子、少精子、畸形精子症^[12,13]。目前,分子生物学方法已经深入到男性不育症研究当中。其中遗传损害类型很多,主要包括基因重排、染色体非整倍体畸形、基因缺陷等^[14-16]。经过敲除小鼠和果蝇基因实验发现超过3000个基因在雄性生育能力起着重要作用,涉及生精细胞系、性腺及躯体发育相关的功能基因调控网络。现在研究发现了很多与男性不育有关的遗传物质畸形和多效性单基因遗传病^[17,18]。

Katnal1 基因对人类制造正常精子不可或缺,而在因精子无力症导致不育的患者体内,这一基因存在异常,为检测*Katnal1* 基因中是否存在基因突变导致男性不育症的诱发原因,本研究对比了77例子少精子症和无精子症男性与74例正常生育力男性外周血*Katnal1* 基因蛋白质编码序列,确定了少精子症和无精子症男性患者*Katnal1* 基因单核苷酸多态性突变位点,*Katnal1* 基因共有10个外显子,其中在21例患者中发现位于*Katnal1* 基因中的KAex2 编码区的点突变位点。KAex2 位于3655-3815之间,编码Ile84-Gly122 氨基酸,测序结果显示该位点位于编码区域的236碱基位,为A-G的杂合突变。由于该位点的突变率明显高于在不育症患者中*Katnal1* 基因另外两个蛋白编码区域位点的突变率,在调查患有不育症的男性的精子时发现,有部分患者的该基因突变,无法正常工作,因此,确认了该基因与人类男性不育症有关。因此该位点的突变存在很有可能导致蛋白质结构的破坏和疾病诱发的可能性,从而导致少精子症和无精子症。这与相关文献报道相似^[19,20]。

总之,少或者无精子症是很多因素相互作用结果,单核苷酸多态性(SNPs)为*KATNAL1* 编码序列区基因,可能是一种诱发因素,综合原因需要SNPs 变异分析基础上,结合多基因筛查、遗传修饰因子检测、Y染色体单倍群分析等遗传学实验进一步综合研究。因此,在临床上治疗不孕不育症使用体外受精,筛选精子的时候,该基因能够成为标志,并希望能够为解明不孕不育的病理做贡献。

参考文献(References)

- [1] Smith LB1, Milne L, Nelson N, et al. KATNAL1 regulation of sertoli cell microtubule dynamics is essential for spermiogenesis and male fertility[J]. PLoS Genet, 2012, 8(5): e1002697
- [2] McNally FJ, Vale RD. Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules[J]. Cell, 1993, 75: 419-429
- [3] Buster D1, McNally K, McNally FJ. Katanin inhibition prevents the redistribution of gamma-tubulin at mitosis[J]. J Cell Sci, 2002, 115 (Pt 5): 1083-1092
- [4] Hartman JJ, Mahr J, McNally K, Okawa K, et al. Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit [J]. Cell, 1998, 93 (2): 277-287
- [5] McNally FJ, Okawa K, Iwamatsu A, et al. Katanin, the microtubule-severing ATPase, is concentrated at centrosomes [J]. J Cell Sci, 1996, 109(Pt 3): 561-567
- [6] McNally K, Audhya A, Oegema K, et al. Katanin controls mitotic and meiotic spindle length[J]. J Cell Biol, 2006, 175(6): 881-891
- [7] Kumar S, Jayant K, Agrawal S, et al. A rare case of continuous type splenogonadal fusion in a young male with primary infertility[J]. Case Rep Urol, 2014, 2014: 796761
- [8] Rigden DJ, Liu H, Hayes SD, et al. Ab initio protein modelling reveals novel human MIT domains[J]. FEBS Lett, 2009, 583(5): 872-878
- [9] Sonbuchner TM, Rath U, Sharp DJ. KL1 is a novel microtubule severing enzyme that regulates mitotic spindle architecture [J]. Cell Cycle, 2010, 9(12): 2403-2411
- [10] Chianese C, Gunning AC, Giachini C, et al. X Chromosome-Linked CNVs in Male Infertility: Discovery of Overall Duplication Load and Recurrent, Patient-Specific Gains with Potential Clinical Relevance [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e97746
- [11] Geremek M, Ziętkiewicz E, Bruinenberg M, et al. Ciliary genes are down-regulated in bronchial tissue of primary ciliary dyskinesia patients[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88216
- [12] Onoufriadi A, Shoemark A, Schmidts M, et al. Targeted NGS gene panel identifies mutations in RSPH1 causing primary ciliary dyskinesia and a common mechanism for ciliary central pair agenesis due to radial spoke defects[J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(13): 3362-3374
- [13] Ben Khelifa M, Coutton C, Zouari R, et al. Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella[J]. Am J Hum Genet, 2014, 94(1): 95-104
- [14] Hodzi A, Ristanovi M, Zorn B, et al. Genetic variation in circadian rhythm genes CLOCK and ARNTL as risk factor for male infertility [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59220
- [15] Liu M, Yin Y, Ye X, et al. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice[J]. Hum Reprod, 2013, 28(3): 707-717
- [16] Tewes AC, Ledig S, Tüttelmann F, et al. DMRT1 mutations are rarely associated with male infertility [J]. Fertil Steril, 2014, 102(3): 816-820
- [17] Odisho AY, Nangia AK, Katz PP, et al. Temporal and geospatial trends in male factor infertility with assisted reproductive technology in the United States from 1999-2010 [J]. Fertil Steril, 2014, 102(2): 469-475
- [18] Yarosh SL, Kokhtenko EV, Churnosov MI, et al. Synergism between the N-acetyltransferase 2 gene and oxidant exposure increases the risk of idiopathic male infertility [J]. Reprod Biomed Online, 2014, 29(3): 362-369
- [19] Yue C, Fang C, Li L, et al. [Progress in research on azoospermia factor and male infertility][J]. Chinese Journal of Medicine Genetics, 2014, 31(3): 302-306
- [20] Gudeloglu A, Brahmabhatt JV, Parekattil SJ. Medical management of male infertility in the absence of a specific etiology[J]. Semin Reprod Med, 2014, 32(4): 313-318