

嘉南藥理科技大學教師專題研究計畫

成果報告

期中進度報告

計畫名稱：Y染色體上DBY基因在生殖細胞的表現與調控分析研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNCE93-04

執行期間：93 年1 月1 日 至 93 年12 月31 日

計畫主持人：鄧燕妮 副教授

共同主持人：張建雄 教授

計畫參與人員：郭亭宜

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

執行單位：幼保系、生科系

中華民國 94 年 2 月 25 日

壹、中英文摘要

本研究主要探討 Y 染色體上 DBY 基因表現情形，以 real-time PCR 檢測在不同人類器官細胞 DBY 基因表現情形，DBY 基因在檢測的人體 20 個器官中有微量均等表現，其中，睪丸組織則表現大量。以 5' 及 3'RACE 進行 mRNA 的 5' 及 3' 端點的放大及定序，DBY mRNA 有二種型式，主要區別是 3'UTR 長度不同。其 open reading frame 包括 660 個胺基酸，在睪丸組織則僅表現具有較短 3'UTR 的 mRNA。以自製的 DBY 多株抗體，利用免疫組織染色演測 DBY 蛋白質在不同組織表現情形及細胞表現的位置，其中睪丸組織的細胞核有較明顯的表現，推測 DBY 蛋白質可能與細胞核基因表現調控有關。

關鍵字：DBY 基因、無精蟲症

Abstract:

We used Real-time RT-PCR to compare gene expression in different human tissue. Isolate and characterization DBY cDNA in the mammalian. Real-time PCR confirmed the expression in human tissue. The DBY mRNA is ubiquitously in any human tissue, specifically abundantly expressed in testis. The total length of DBY mRNA is identified by 5' and 3' RACE. There are two different forms of DBY mRNA. The expression pattern of DBY mRNA in testis has shorter 3'UTR. The DBY protein is involved 660 amino acids and expressed in the nuclear by Immunohistochemistry (data not shown). It is important of DBY in the human spermatogenesis. We hope to identify specific mutations or SNP patterns of the *DBY* gene in patients with spermatogenic patients. The study may help to clarify the role of *DBY* gene in human spermatogenesis.

Keywords : *DBY* gene, Azoospermia

貳、前言

男性不孕症的肇因

根據世界衛生組織對於不孕症的定義：夫妻雙方結婚一年，在毫無避孕的狀態下沒有辦法受孕者稱為不孕症 (Larry *et al.*, 1997)，其中 50% 因素來自於男方。造成男性不孕症的原因可分為遺傳性與非遺傳性因素 (Larry *et al.*, 1997)。非遺傳性因素包括環境因素、生活習慣、生理因素等。在遺傳因素方面，目前已知會影響男性生殖能力的遺傳因素大部分與染色體數目、結構異常或單基因遺傳疾病的問題有關 (Mak and Javi, 1996)。但在不孕症的男性中，約有 40-60% 在臨床理學檢查中無法確定其不孕症原因，因此將這些病人歸類為不明原因的不孕症 (idiopathic azoospermia) (De Kretser and Burger, 1997 ; Tuerlings *et al.*, 1997)。

原發性造精功能異常與組織學變化的區分

男性不孕症的病人中約有 10-23% 是因為造精功能異常所起 (Larry *et al.*, 1997)，此些患者的精蟲數目低於標準值 $20 \times 10^6/\text{mL}$ ，其男性第二性徵發育與睪丸形成與正常男性無顯著差異。依據精液中精蟲數目的多寡可將造精功能異常分類為四種：Azoospermia 為完全精蟲者；Oligozoospermia 為精蟲數目少於 $20 \times 10^6/\text{mL}$ ；Polyzoospermia 為精蟲數目大於 $250 \times 10^6/\text{mL}$ ；Teratozoospermia 為 60% 以上精蟲不正常但數目正常。在睪丸組織學上，可依其造精功能受阻礙程度的不同區分為：hypospermatogenesis、spermatogenic arrest (SGA)、Sertoli cell-only syndrome(SCOS) 等不同情況 (Damjanov, 1993)

男性不孕症與 Y 染色體顯微缺失的關係

根據細胞遺傳學的研究發現，部分無精蟲症 (azoospermia) 患者的 Y 染色體長臂 (Yq) 末梢 (distal) 上的第六區間有缺失的現象，推測 Yq distal 位置必定存在與造精功能 (spermatogenesis) 相關的基因，將之稱為 azoospermia factor (AZF) (Tiepolo and Zuffardi, 1976)。近年來利用位於 Y 染色體第五及第六區間上的 STSs 以聚合一連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 方法，進行 Y 染色體顯微結構分析，發現部分無精蟲症患者有 Y 染色體的顯微缺失 (Henegariu *et al.*, 1994 ; Kirsch *et al.*, 1996 ; Stuppa *et al.*, 1996a,b ; De Kretser and Burger, 1997 ; Girardi *et al.*, 1997 ; Stuppa *et al.*, 1997 ; Stuppa *et al.*, 1998 ; Kenet-First *et al.*,

1999)。Vogt 等人將 Y 染色體 AZF 區域分成 AZFa、AZFb、AZFc 三個區域 (Vogt et al., 1996)。約有 10-15% 的 azoospermia 及 5-10% severely oligozoospermia 患者有 Y 染色體顯微缺失的現象 (Reijo et al., 1996)。一般認為 AZFa 區域的缺失與 Sertoli cell-only syndrome (SCOS) 有關；AZFb 區域的缺失與精蟲成熟障礙 (maturation arrest) 有關，將使造精功能停留在 pachytene spermatocyt 時期；AZFc 區域缺失將使造精功能停止在 spermatid 時期，無法有成熟的精子產生 (McElreavey and Krausz, 1999)。其中位於 AZFa 區域的 *DBY* 及 *DFFRY*、AZFb 的 *RBMY* 及 AZFc 的 *DAZ* 等基因缺失被認為可能造成精子發育障礙 (Graeme et al., 1998 ; Carlo et al., 2000)。*DBY* 基因序列分析具有 RNA helicase 特定的區域，推測可能與 RNA 結構、穩定度及表現有關，進而影響造精過程中其他基因的表現 (Lerry et al., 1989 ; Sherry et al., 1994)。

DBY 基因表現與結構

DBY 基因位於 Y 染色體 AZFa 區域，約在 deletion interval 5C/D 的位置 (Lahn and Page, 1997)，*DBY* (DEAD/H box polypeptide, Y chromosome) 基因全長為 15500 鹼基對包含 17 表現子，經選擇性 polyadenation 產生 DBY1 和 DBY2 兩種 mRNA。DBY1 mRNA 全長 2319 鹼基只表現在睪丸組織；DBY2 mRNA 較 DBY1 多了 3' 端非轉錄區域 (untranslated region)，全長為 4416 鹼基，為廣泛的表現在各組織中。DBY1 及 DBY2 mRNA 均表現含 660 氨基酸的蛋白質 (Carlo et al., 2000)。*DBY* 蛋白質結構由 N 端到 C 端依序排列包含 ATP binding domain、ATP hydrolysis/RNA unwinding domain 及 ATP hydrolysis/RNA binding domain。於 ATP hydrolysis/RNA unwinding domain 含有 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) motif。DEAD motif 廣泛存在於各種物種基因中，且序列呈現高度相似性，如酵母菌的 DED1 與 DBP1；果蠅的 vasa；老鼠的 mDEAD2、mDEAD3、PL10 及轉譯起始因子 (translation initiation factor - 4A)，被推測為具有 RNA helicase 功能 (Lerry et al., 1989 ; Sherry et al., 1994)。Carlo 等人分析 Y 染色體缺失發現，於 AZFa 區域 *DBY* 基因缺失，造成嚴重生殖細胞減少或完全缺乏 (Carlo et al., 2000 ; Foresta et al., 2000)。

參、研究目的

本研究主要探討 Y 染色體上 *DBY* 基因在不同人類器官細胞 *DBY* 基因表現情

形，及 mRNA 型式，並以自製的 DBY 多株抗體，利用免疫組織染色演測 DBY 蛋白質在不同組織表現情形及細胞表現的位置，瞭解 DBY 基因在細胞表現調控情形及蛋白質表現位置，進而瞭解 DBY 基因在男性造精功能中可能扮演的角色。

肆、研究方法

一、反轉錄聚合酵素鏈反應 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

取 500 ng (Total RNA(1ng-5ug)不同組織及不同物種睪丸組織的 total RNA，加入 1 ul Oligo(dT)15 primer (500ug/ml) (Promega)、1ul 10mM dNTP，最後加入 DEPC.H₂O 將體積補到 12 ul，於 65°C 作用 5 分鐘後，置於冰上，此時 mRNA 的二級結構已打開。加入 4 ul 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH8.3、375 mM KCl、15 mM MgCl₂)、2 ul 0.1 M DTT、1 ul RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40unit/ul) 均勻混合後，置於 42°C 反應 2 分鐘。再加入 1 ul SuperScript II RTase (200unit/ul)，均勻混合後， 42°C 反應 50 分鐘，以 70°C 作用 15 分鐘去活性 (RTase inactivate)。最後以 1 ul RNaseH (2 unit/ul)，37°C 反應 20 分鐘，以除去黏合於 cDNA 上的 RNA。作用完成後，於 -20°C 保存。將合成好的 cDNA 取 1 ul，加入 2ul 10X PCR buffer、0.4 ul dNTP (10 mM)、0.8ul MgCl₂ (50 mM)、1 ul antisense primer 及 sense primer (10 μM)、0.5 U Taq DNA polymerase，加水將體積調整為 20 ul，經由熱循環機器 (Gene Amp PCR System 2700，Applied Biosystems) 進行 PCR 放大反應。PCR 反應條件為：以 95°C 作用 5 分鐘，使雙股 DNA 變性，再以循環式的裂解溫度 95°C 1 分鐘、煉合溫度 60°C 1 分鐘、延長溫度 72°C 1 分鐘進行 35 個循環，最後 72°C 處理 10 分鐘。反應結束後，以 1% 琼脂糖體進行電泳分析。

二、同步 PCR (Real Time PCR)

為分析候選基因在不同程度的造經功能障礙 (Normal、Hypo.、MA、SCOS) 的病人睪丸組織中 RNA 的表現量，將相同濃度的 RNA 經反轉錄酶 (reverse transcriptase) 轉成 cDNA 後，使用 LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche) 進行 Real Time PCR。再以 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 當參考基因做標的基因的校正。

針對候選基因設計出 specific primers；將 cDNA 稀釋成 20 倍使用當模板。製備 lightcycler SYBR-Green mastermix：取 0.3~1 μM primers (forward and revers)、4 mM magnesium chloride、1ul Master SYBR-Green、2 ul 稀釋 20 倍的 cDNA、最後補水使體積為 10 ul。PCR 條件為：Pre-incubation 95°C，10 分鐘，使模板 DNA 變性。Amplification phase：裂解溫度 95°C 5 秒鐘、煉合溫度 60°C 5 秒鐘、延長溫度 72°C 10 秒鐘進行 50 個循環。Melting curve analysis：在 PCR 完成後利用解鏈曲線來分析 PCR 之產物。

三、5'- and 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE，Clontech)

1) 5'-RACE :

5'-RACE cDNA 製備：

取 50ng-1ug 睾丸組織的 total RNA，加入 1 ul 5'-CDS primer (5'-(T)25VN-3' ; N = A, C, G, or T; V = A, G, or C ; 12 μM) 、1 ul BD SMART II A Oligonucleotide (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCAGGG-3' ; 12 μM) 、最後加水將體積補到 5 ul，於 70°C 作用 2 分鐘後，迅速置於冰上 2 分鐘，此時 mRNA 的二級結構已打開。加入 2 ul 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3 、375 mM KCl 、30 mM MgCl₂) 、1 ul DTT (20mM) 、1 ul dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, each at 10 mM) 、1 ul BD PowerScript Reverse Transcriptase，均勻混合後，置於 42°C 反應 1.5 小時。最後加入 Tricine-EDTA Buffer (10 mM Tricine-KOH pH 8.5 、1.0 mM EDTA) 將合成好的 cDNA 產物稀釋後使用，於-20°C 保存。

5'-RACE PCR反應：

將合成好的5'-RACE cDNA取2.5 ul，加入5 ul 10X BD Advantage 2 PCR Buffer 、1 μl dNTP Mix (10 mM) 、5 ul 10X Universal Primer A Mix 【 Long (0.4 μM) : 5'-CTAATACGACTCACTATAAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' ； Short (2 μM) : 5'-CTAATACGACTCACTATAAGGGC-3' ； UPM 】 、1ul 目標基因的 specific primers (GSP1 ; an antisense primer ; 10 μM) 、1 μl 50X BD Advantage 2 Polymerase Mix，最後加水將體積調整為50 ul，經由熱循環機器(Gene Amp PCR System 2700 , Applied Biosystems) 進行 RACE PCR 反應。 RACE PCR 反應條件為：裂解溫度 95°C 30秒、煉合溫度 68°C 30秒、延長溫度 72°C 3分鐘進行35個循環。反應結束後，以 1 % 琼脂糖體進行電泳分析。

2) 3'-RACE

3'-RACE cDNA製備：

取 50ng-1ug 睾丸組織的 total RNA，加入 1 ul 3'-CDS primer A (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN-3' ; N = A, C, G, or T; V = A, G, or C ; 12 μM) 、加水將體積補到 5 ul，於 70°C 作用 2 分鐘後，迅速置於冰上 2 分鐘，此時 mRNA 的二級結構已打開。加入 2 ul 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3 、375 mM KCl 、30 mM MgCl₂) 、1 ul DTT (20mM) 、1 ul dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, each at 10 mM) 、1 ul BD PowerScript Reverse Transcriptase，均勻混合後，置於 42°C 反應 1.5 小時。最後加入 Tricine-EDTA Buffer (10 mM Tricine-KOH pH 8.5 、1.0 mM EDTA) 將合成好的 cDNA 產物稀釋後使用，於-20°C 保存。

3'-RACE PCR反應：

取 2.5 ul 3'-RACE cDNA，加入 5 ul 10X BD Advantage 2 PCR Buffer 、1 μl dNTP Mix (10 mM) 、5 ul 10X Universal Primer A Mix 【 Long (0.4 μM) : 5'-CTAATACGACTCACTATAAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' ；

Short (2 μM) : 5'-CTAATACGACTCACTATAAGGGC-3' ; UPM】、1 ul目標基因的specific primers (GSP2；an sense primer；10 μM)、1 μl 50X BD Advantage 2 Polymerase Mix，最後加水將體積調整為50 ul，經由熱循環機器 (Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystems) 進行RACE PCR反應。RACE PCR反應條件為：裂解溫度95°C 30秒、煉合溫度68°C 30秒、延長溫度72°C 3分鐘進行35個循環。反應結束後，以1%瓊脂膠體進行電泳分析。

四、免疫組織化學分析 (Immunohistochemistry)

將石蠟切片染驕錢一天先至於37°C烘烤一夜後，在100% xylene 下脫蠟，分別在100%、95%、70% 的酒精中水化。風乾後，以3% hydrogen peroxide/methanol下作用5分鐘，將hydrogen peroxide去除，dH₂O 清洗5分鐘。將切片與citric acid一同取出，冷卻至60°C，重複二次。再以TBST 清洗二次各5分鐘。以1% BSA/TBST於室溫下作用15分鐘後，以覆蓋非專一性的區域。以一級抗體 (1:1000) 於室溫下作用一小時，以0.02% TBST 洗4次各5分鐘。以biotinylated link 室溫作用30分鐘。再以0.02% TBST 洗4次各5分鐘後，將biotinylated link 到掉，以streptavidin-HRP 室溫作用30分鐘後，置於0.02% TBST 中，取出後以DAB 受質反應呈色後，以dH₂O 清洗，以hematoxylin 作為counterstain 後，置於顯微鏡下觀察。

伍、結果與討論

綜合本研究結果：

1) real-time PCR 檢測在不同人類器官細胞 DBY 基因表現情形：

DBY 基因在檢測的人體 20 個器官中有微量均等表現，其中，睪丸組織則表現大量（圖一）

2) 5'及 3'RACE 進行 mRNA 的 5'及 3'端點的放大及定序：

以 5'及 3'RACE 進行 mRNA 的 5'及 3'端點的放大及定序，DBY mRNA 全長 4416 總鹼基，在包括睪丸及其他不同組織均相同 mRNA 型式存在。

3) 免疫組織染色演測 DBY 蛋白質在不同組織表現情形及細胞表現的位置：

DBY 蛋白質在不同組織表現情形及細胞表現的位置，其中睪丸組織的細胞核有較明顯的表現 (data not shown)。

DBY 基因是一種廣泛表現的基因，在睪丸組織中 DBY 的 mRNA 或蛋白質均有明顯大量表現，DBY 基因在是 AZFa 區域的基因，由臨床病人的 AZFa 區域分析，推測 AZFa 區域缺失與 Sertoli cell-only syndrome (SCOS) 發生有關，因此 DBY 基因被認為與男性造精功能相關。由本研究結果發現 DBY 基因的大量表現在睪丸組織，可能在造精過程扮演重要角色，DBY 基因對於造精過程的調控，則有待更深入研究。

陸、參考文獻

- Carlo, F., Alberto, F., Enrico, M. (2000) Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for *DBY* in male infertility. *Hum Mol Genet* 9:1161-9.
- Damjanov, I. Pathology of infertility. First edition. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 1993, p18-21
- De Kretser, D. M., and Burger, H. G. (1997) The Y chromosome and spermatogenesis. *N Engl J Med* 336:576-577.
- Forestà, C., Ferlin, A., Moro, E. (2000) Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for *DBY* in male infertility. *Hum Mol Genet* 9:1161-9.
- Girardi, S. K., Mielenk, A., Schlegel, P. N. (1997) Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod* 12:1635-1641.
- Graeme M. Brown, Robert A. Furlong, Carole A. Sargent, Robert P. Erickson, Guy Longepied, Michael Mitchell, Michael H. Jones, Timothy B. Hargreave, Howard J. Cooke and Nabeel A. Affara. (1998) Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the *Dffry* gene. *Hum Mol Genet* 7:97-107.
- Hall, N. M., Brown, G. M., Furlong, R. A., Sargent, C. A., Mitchell, M., Rocha, D., Affara, N. A. (2003) *Usp9y* (ubiquitin-specific protease 9 gene on the Y) is associated with a functional promoter and encodes an intact open reading frame homologous to *Usp9x* that is under selective constraint. *Mamm Genome* 14:437-47.
- Henegariu, O., Hirschmann, P., Kilian, K., Kirsch, S., Lengauer, C., Maiwald, R., Mielke, K., and Vogt, P. (1994) Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia* 26:97-106.
- Kenet-First, M., Mualem, A., Shulta, J., Pryor, J., Robberts, K., Nolten, W., Meisner, L., Chandley, A., Gouchy, G., Jorgensen, L., Havighurst, T., and Grosch, J. (1999) Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* 53:27-41.
- Kirsch, S., Keil, R., Edelmann, A., Henegariu, O., Hirschmann, P., Lepaslier, D., and Vogt, P. H. (1996) Molecular analysis of the genomic structure of the human Y chromosome in the euchromatic part of its long arm (Yq11). *Cytogenet cell Genet* 75:197-206.
- Lahn, B. T., and Page, D. C. (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278:675-680.

Larry, I., and Lipshutz, S. S. (1997) Infertility in the male. Third edition. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, 173-174.

Lerry, P., Alzari, P., Sassoona, D., Wolgemuth, D., Fellous, M. (1989) The protein encoded by a murine male germ cell-specific transcript is a putative ATP-dependent RNA helicas. *Cell* 57: 549-59.

Mak, V., and Jarvi, K. A. (1996) The genetics of male infertility. *J Urol* 156:1245-1257.

McElreavey, K.,and Krausz,C. (1999) Sex chromosome genetics '99 male infertility and the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 64:928-933.

Reijo, R., Alagappan, R. K., Patrizio, P., and Page, D.(1996) Severe oligospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 347:1290-1293.

Sherry, L. G., John, G. C.(1994) Mouse erythroid cells express multiple putative RNA helicase genes exhibiting high sequence conservative from yeast to mammals. *E S* 140:171-7.

Stuppia, L., Calabrese, G., Franchi, P. G., Mingarelli, R., Gatta, V., Palka, G., and Dallapiccola, B. (1996a) Widening of a Y-chromosome interval 6 deletion transmitted from a father to his infertile son accounts for an oligozoospermia critical region distal to the *RBM1* and *DAZ* genes. *Am J Hum Genet* 59:1393-1395.

Stuppia, L., Mastroprimiano, G., Calabrese, G., Peila, R., Teneaglia, R., and Palka, G.(1996) Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo-or azoospermia. *Cytogenet Cell Genet* 72:155-158.

Stuppia, L., Gatta, V., Mastroprimiano, G., Pompelli, F., Calabrese, G., Franchi, P. G., Morizio, E., Mingarelli, R., Nicolai, M., Tenaglia, R., Lmprota, L., Sforza, V., Bisceglia, S., and Palka, G. (1997) Clustering of Y chromosome deletions in subinterval E of interval 6 supports the existenec of an oligozoospermia critical region outside the *DAZ* gene. *J Med Genet* 34: 881-883.

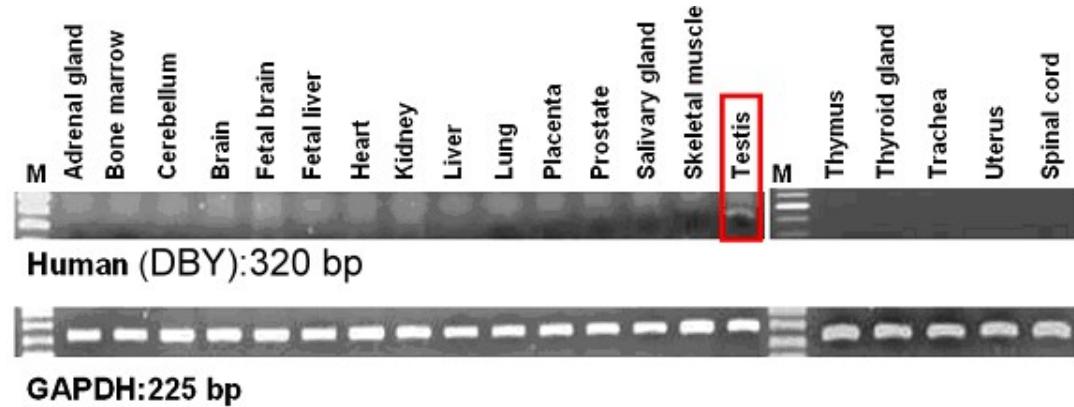
Stuppia, L., Gatta, V., Calabrese, G., Franchi, P. G., Morizo, E., Bombieri, C., Mingarelli, R., Sforza, V., Frajese,G., Tenaglia, R., and Palka, G. (1998) A quarter of men with idiopathic oligo-azoospermia display chromosomal abnormalities and microdeletions of different types in interval 6 of Yq11. *Hum Genet* 102:566-570.

Tiepolo, L., and Zuffardi, O. (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34:119-124.

Tuerlings, J., Kremer, J., and Meuleman, E. (1997) The practical application of genetics in the male infertility clinic. *J Androl* 18:576-581.

Vogt, P. H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F.,

and Kohn, F. M. (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5:933-943.



圖一・DBY 基因mRNA在人類不同組織表現情形，GAPDH是控制組。

