

# 精子鞭毛畸形候选基因敲除小鼠 表型分析

16级生物科学系 曾宇研

指导老师：张锋



# 目录 | CONTENTS

01

研究背景

02

技术路线

03

研究结果

04

总结与展望

# 研究背景

BACKGROUND OF THE PROJECT

---

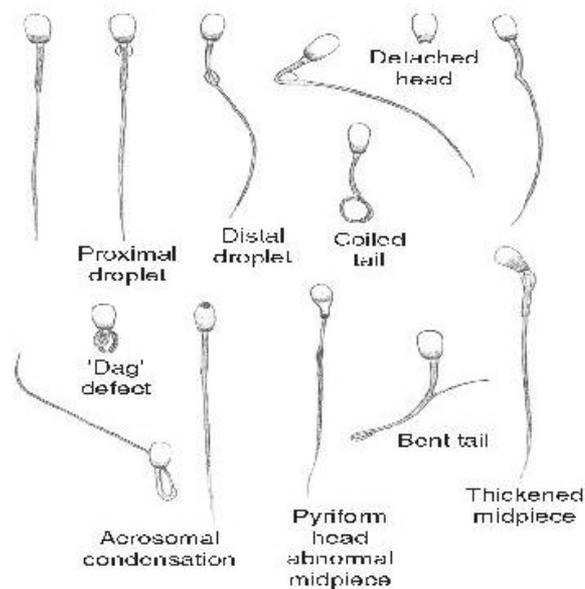
PART ONE

# 精子鞭毛多发畸形-表型

## Multiple Morphological Abnormalities of the Flagella, MMAF

形态正常人类精子：具有正常的顶体，卵形头长在5至6 $\mu\text{m}$ 之间，宽度在2.5至3.5 $\mu\text{m}$ 之间，颈部在4.0至5.0 $\mu\text{m}$ 之间，尾巴或鞭毛长约50 $\mu\text{m}$ 。<sup>1</sup>

MMAF特征：畸形精子比例较高，鞭毛有五个典型异常形态，包括无尾、短尾、卷尾、折尾的和不规则尾，并伴有活力急剧下降，同时患者不具有其它原发性纤毛障碍表型（PCD）。<sup>2</sup>

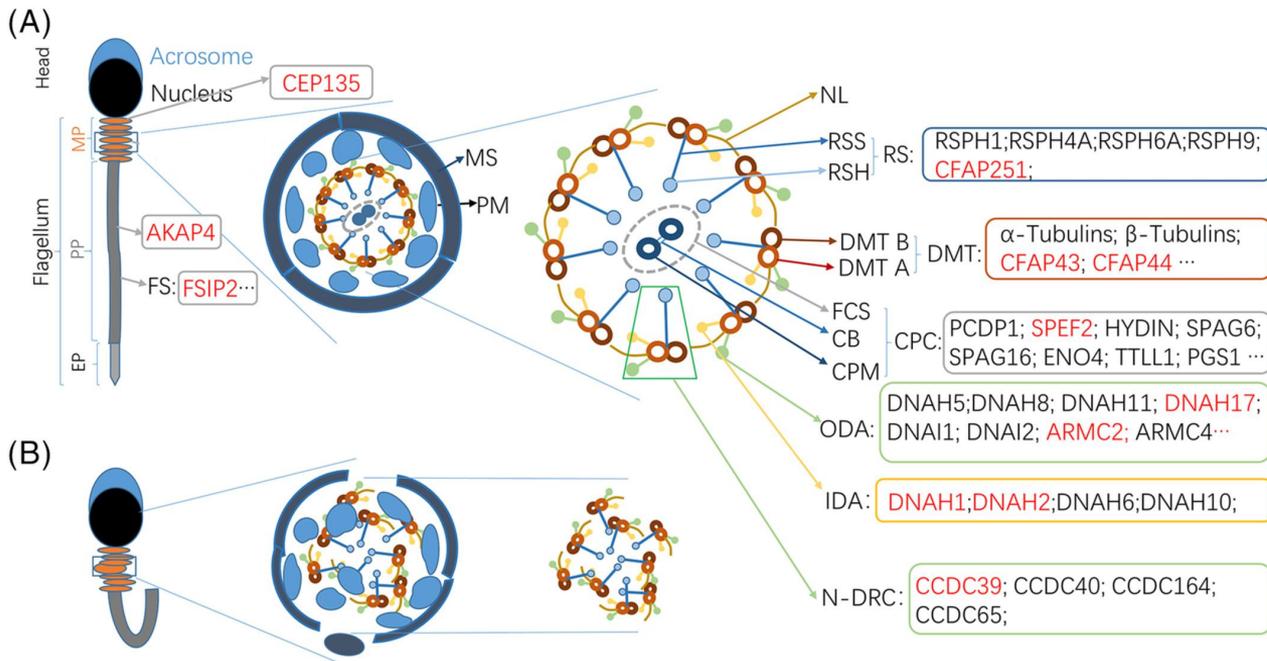


<sup>1</sup> Perrin A et al. Motile sperm organelle morphology examination (MSOME): where do we stand twelve years later? Expert Rev Obstet Gynecol. 2013;8:249–260. doi: 10.1586/eog.13.13.

<sup>2</sup> Ben Khelifa M 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. Am J Hum Genet 2014;94:95–104

# 精子鞭毛多发畸形-遗传

## Multiple Morphological Abnormalities of the Flagella, MMAF



目前发现与MMAF有关的基因突变：  
*DNAH1*, *CFAP43*, *CFAP44*, *CFAP69*,  
*CCDC39*, *AKAP4*, *CFAP251*, *QRICH2*,  
*FSIP2*, *ARMC2*, *SPEF2*, *TTC21A*等，  
证实了MMAF的遗传起源与遗传异质  
性。

诊断率为30-50%，仍有待解决的  
MMAF病例的遗传原因和致病机制。

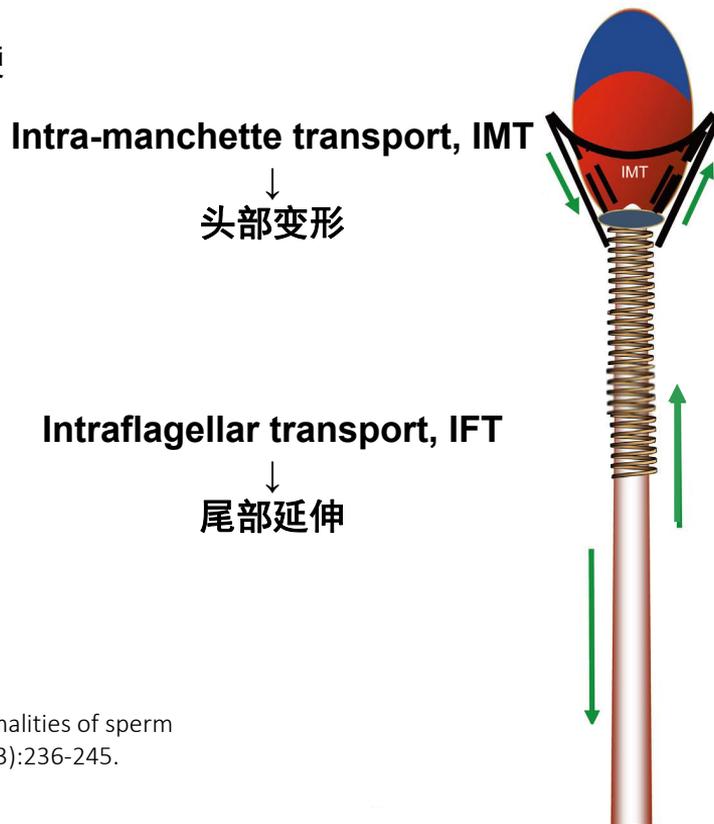
遗传模式：隐性纯合/复合杂合

超微结构：各种不同的轴周和轴丝  
缺损

# 鞭毛内运输

## Intraflagellar transport, IFT

蛋白不能在纤毛内合成，因此组装纤毛或鞭毛所需的蛋白都要从细胞体内转运出来。



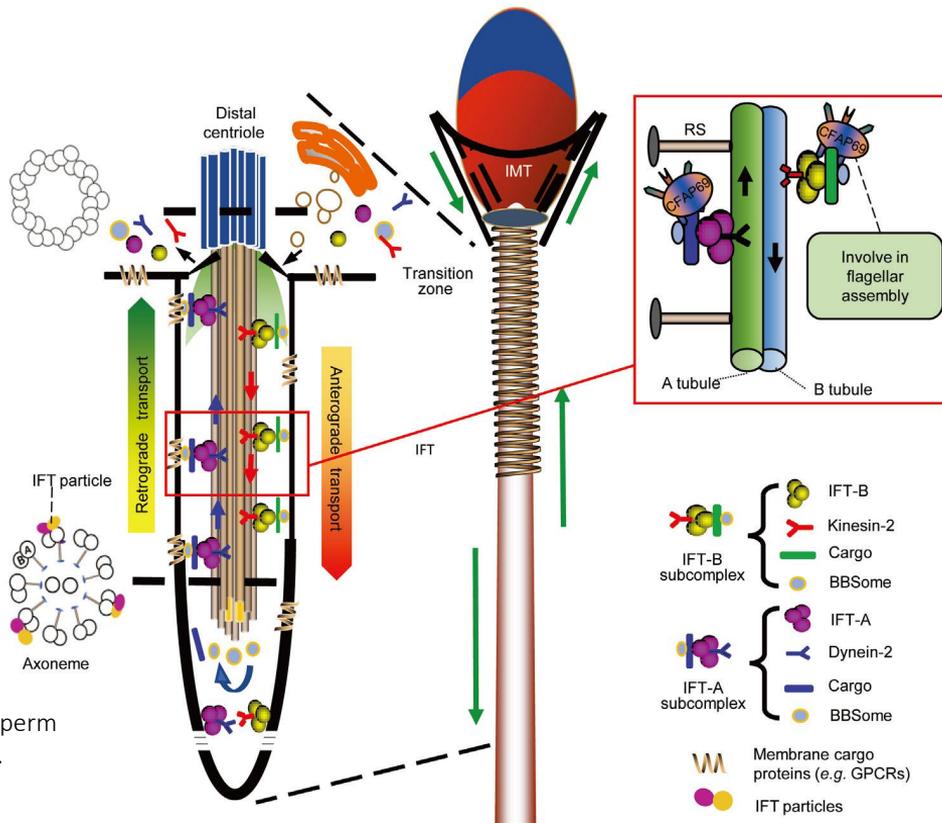
Wang WL, Tu CF, Tan YQ. Insight on multiple morphological abnormalities of sperm flagella in male infertility: what is new?[J]. Asian J Androl. 2020;22(3):236-245.

# 鞭毛内运输

## Intraflagellar transport, IFT

蛋白不能在纤毛内合成，因此组装纤毛或鞭毛所需的蛋白都要从细胞体内转运出来。

IFT主要由蛋白质复合物IFT-A，IFT-B，BBSome和微管依赖的分子马达介导。



Wang WL, Tu CF, Tan YQ. Insight on multiple morphological abnormalities of sperm flagella in male infertility: what is new?[J]. Asian J Androl. 2020;22(3):236-245.

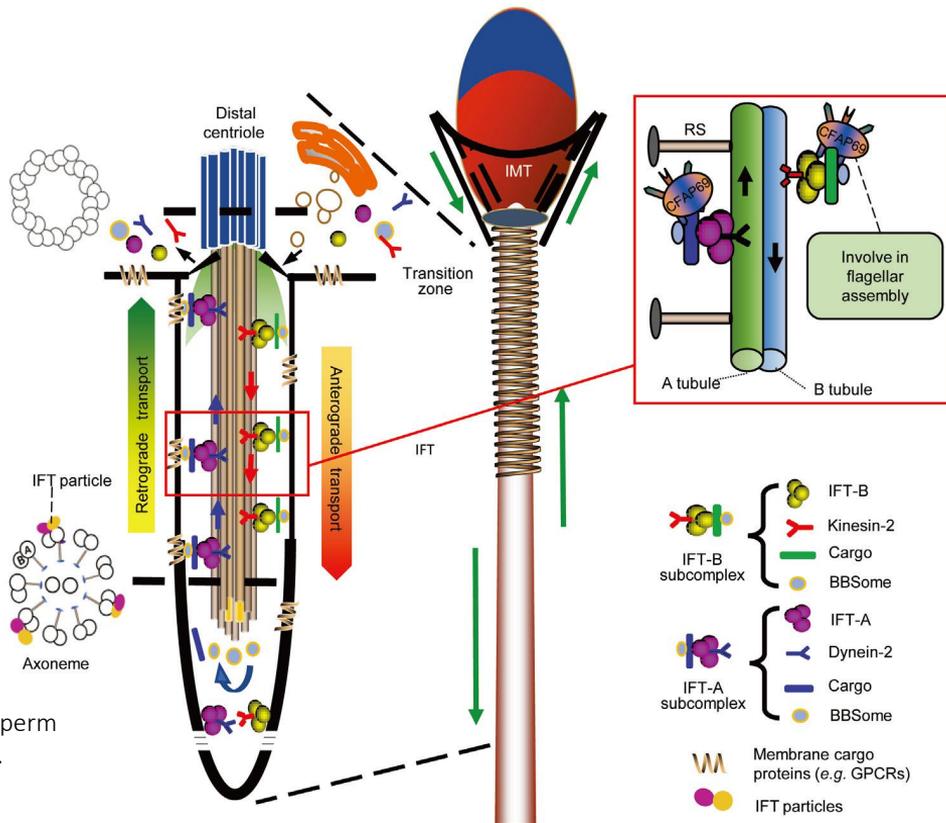
# 鞭毛内运输

## Intraflagellar transport, IFT

蛋白不能在纤毛内合成，因此组装纤毛或鞭毛所需的蛋白都要从细胞体内转运出来。

IFT主要由蛋白质复合物IFT-A，IFT-B，BBSome和微管依赖的分子马达介导。

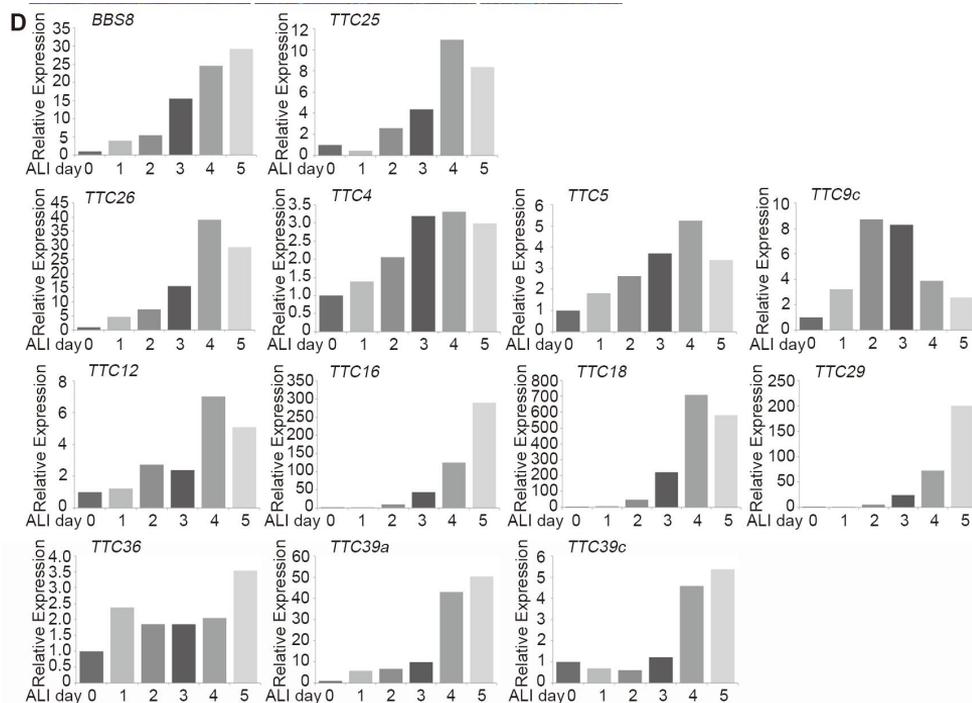
TPR结构域在除IFT122和IFT43外的IFT-A，IFT-B中的IFT56、IFT70、IFT88、IFT172，以及BBSome中的BBS4、BBS8中都广泛存在。



Wang WL, Tu CF, Tan YQ. Insight on multiple morphological abnormalities of sperm flagella in male infertility: what is new?[J]. Asian J Androl. 2020;22(3):236-245.

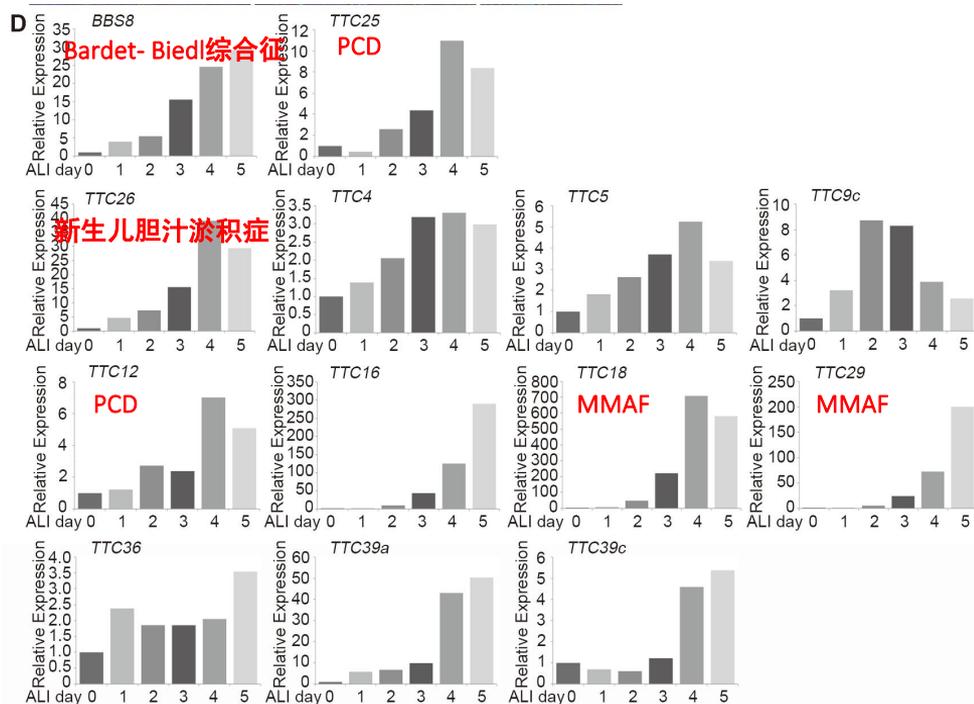
Luca D. D'Andrea, Lynne Regan. TPR proteins: the versatile helix[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2003, 28(12):655-662.

# TTC家族（主要包含TPR结构域）参与纤毛形成



小鼠气管上皮细胞诱导分化为多纤毛细胞过程中TTC基因表达上调。

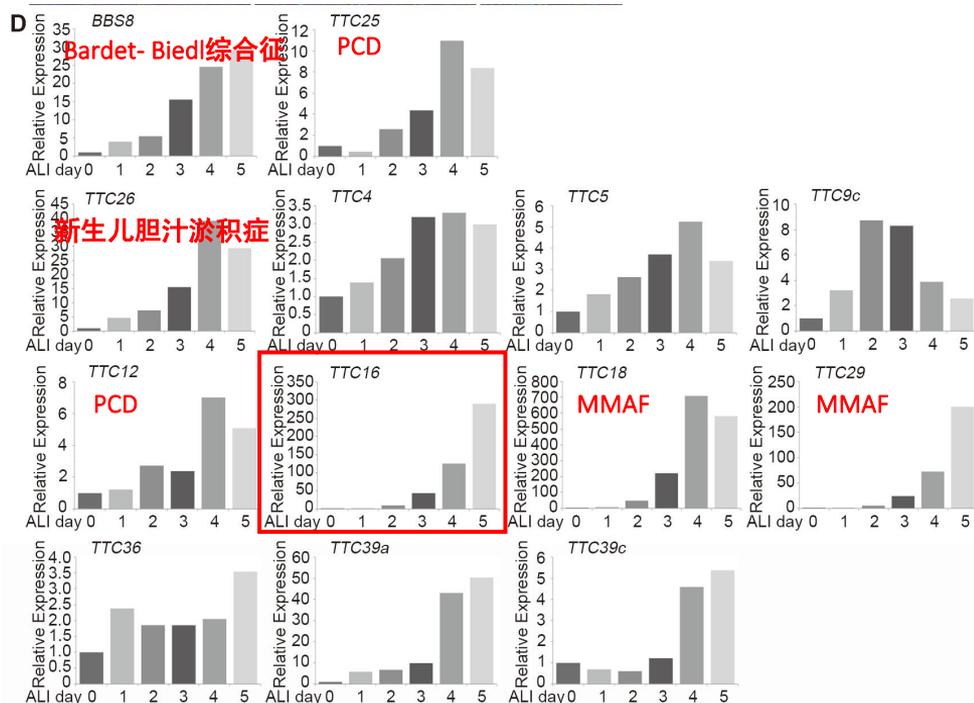
# TTC家族（主要包含TPR结构域）参与纤毛形成



TTC10—多囊肾  
TTC21A--MMAF

小鼠气管上皮细胞诱导分化为多纤毛细胞过程中TTC基因表达上调。

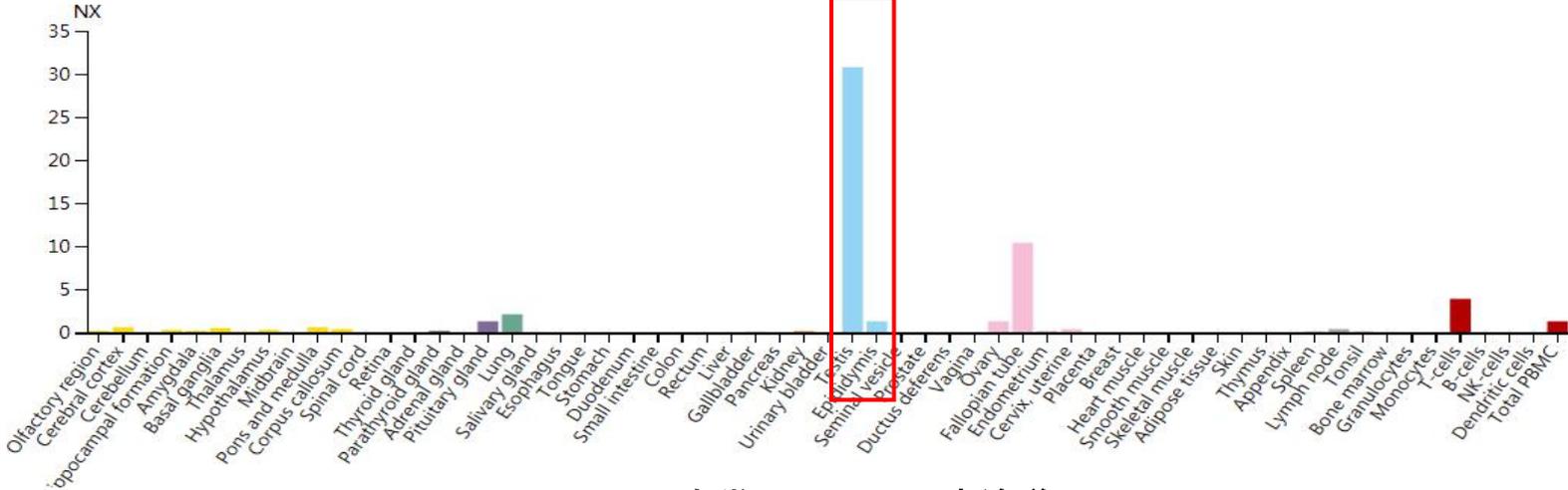
# TTC家族（主要包含TPR结构域）参与纤毛形成



TTC10—多囊肾  
TTC21A--MMAF

小鼠气管上皮细胞诱导分化为多纤毛细胞过程中TTC基因表达上调。

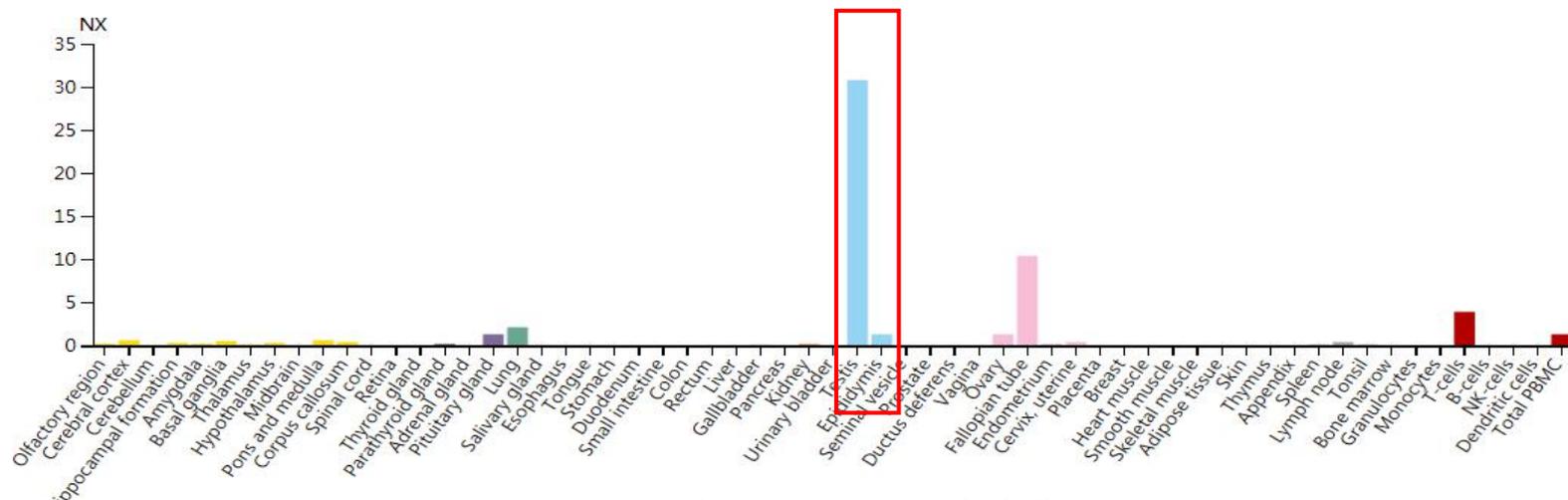
# TTC家族蛋白（主要包含TPR结构域）参与纤毛形成



人类TTC16 mRNA表达谱<sup>1</sup>

<sup>1</sup> <http://www.proteinatlas.org/>

## TTC家族蛋白（主要包含TPR结构域）参与纤毛形成



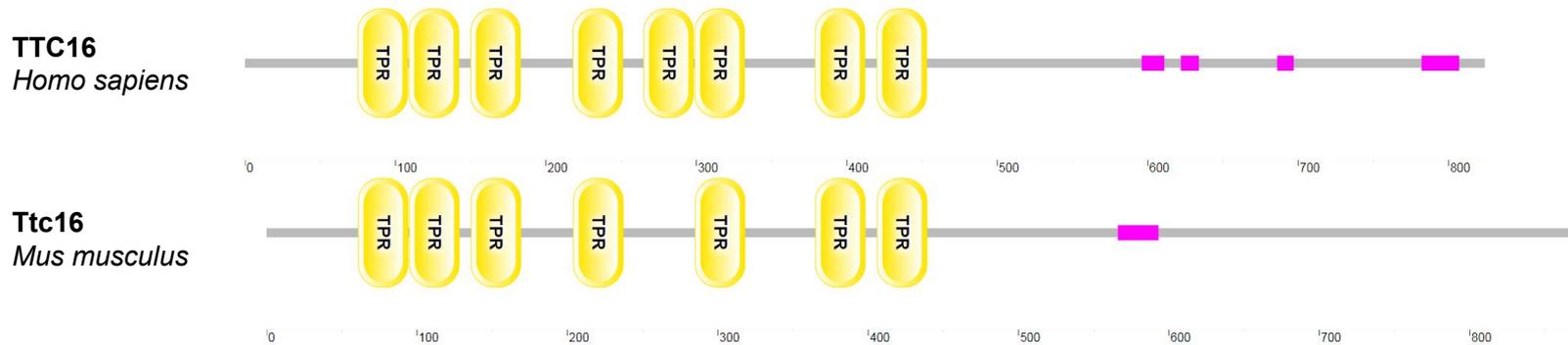
人类TTC16 mRNA表达谱<sup>1</sup>

**TTC16在精子发生中是否发挥功能？**  
**它的突变是否会造造成鞭毛内运输异常从而导致MMAF表型？**

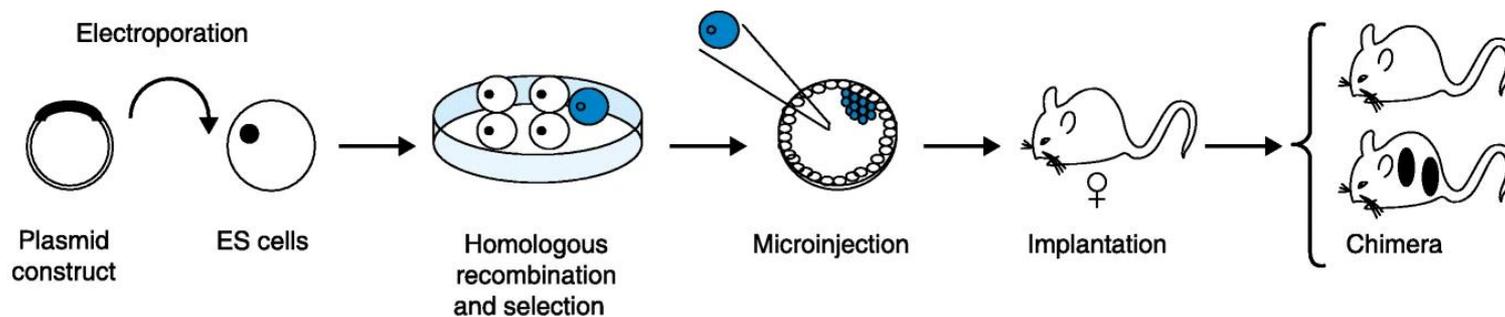
<sup>1</sup> <http://www.proteinatlas.org/>

# 小鼠模型

## 1. TTC16结构域保守

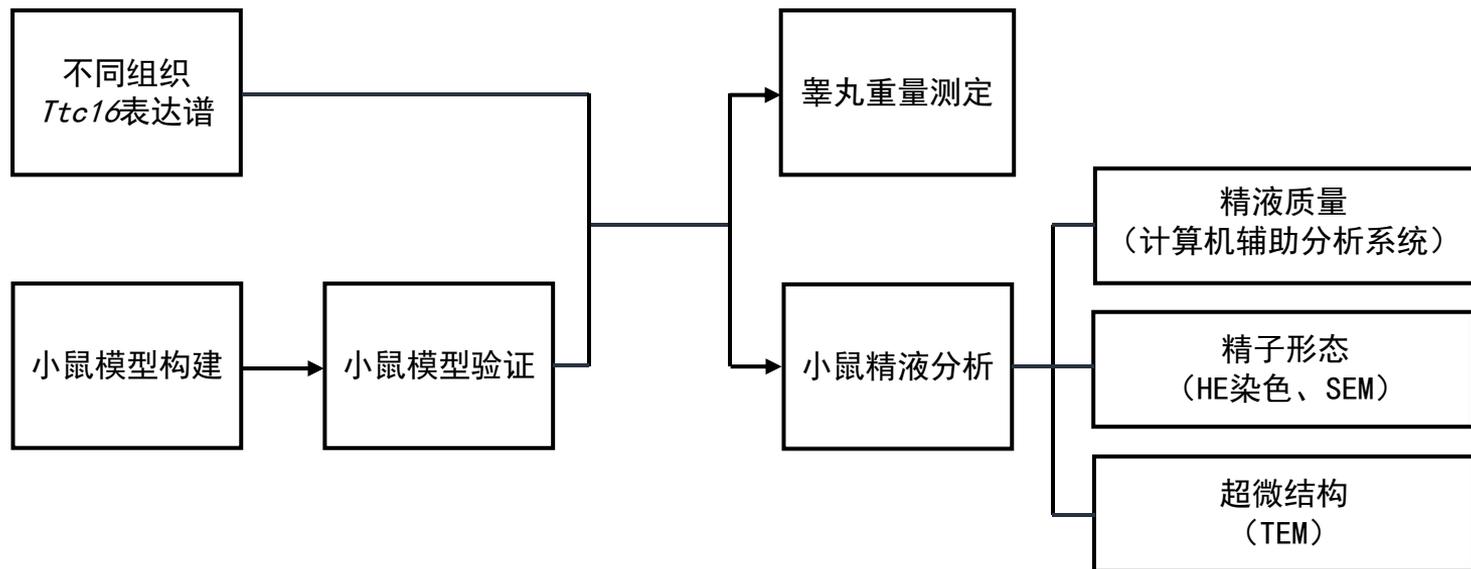


## 2. 基因编辑技术与胚胎干细胞显微注射技术成熟



# 技术路线

---



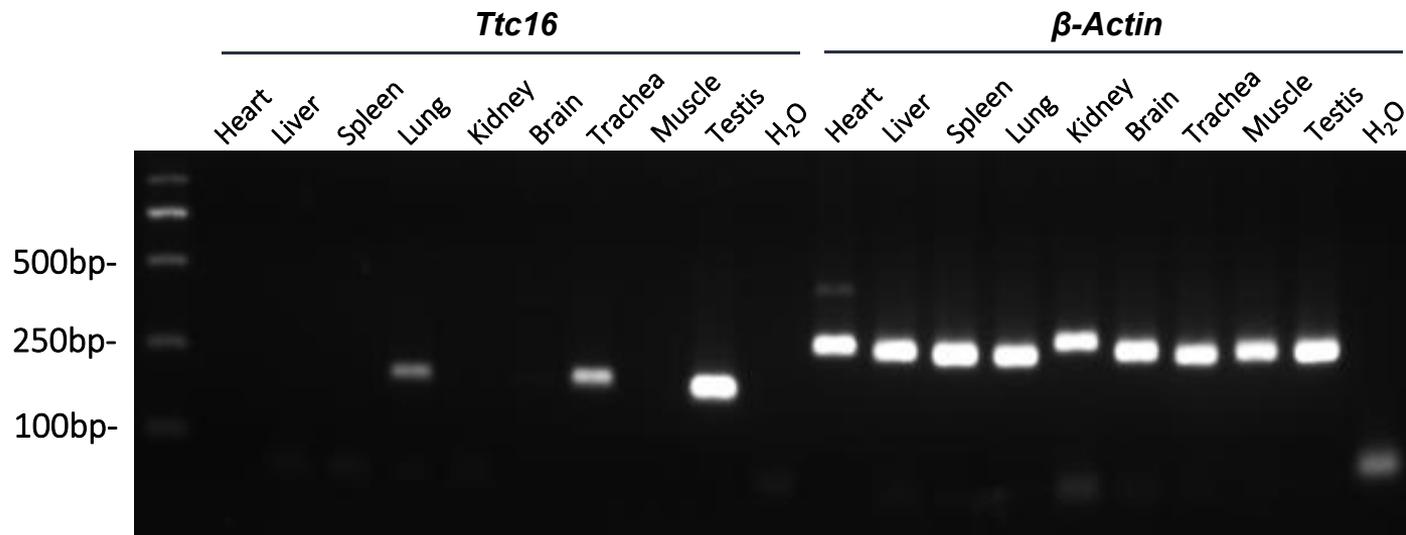
# 研究结果

RESULTS OF THE PROJECT

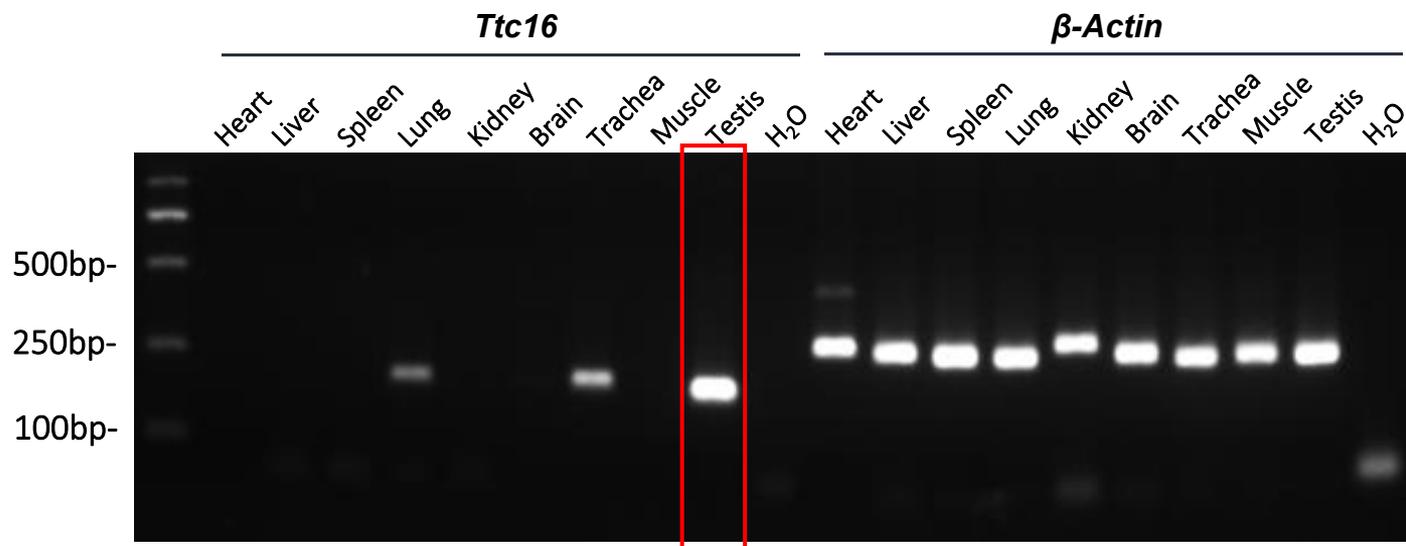
---

PART THREE

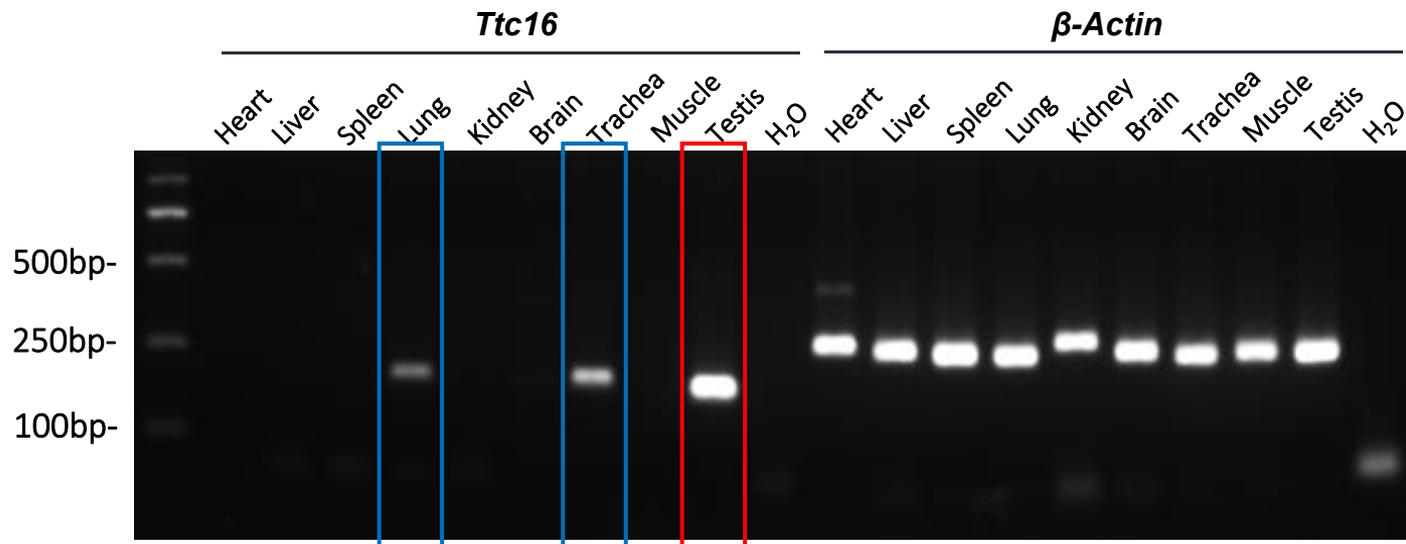
## *Ttc16* 在小鼠各组织中的表达情况



## *Ttc16* 在小鼠各组织中的表达情况

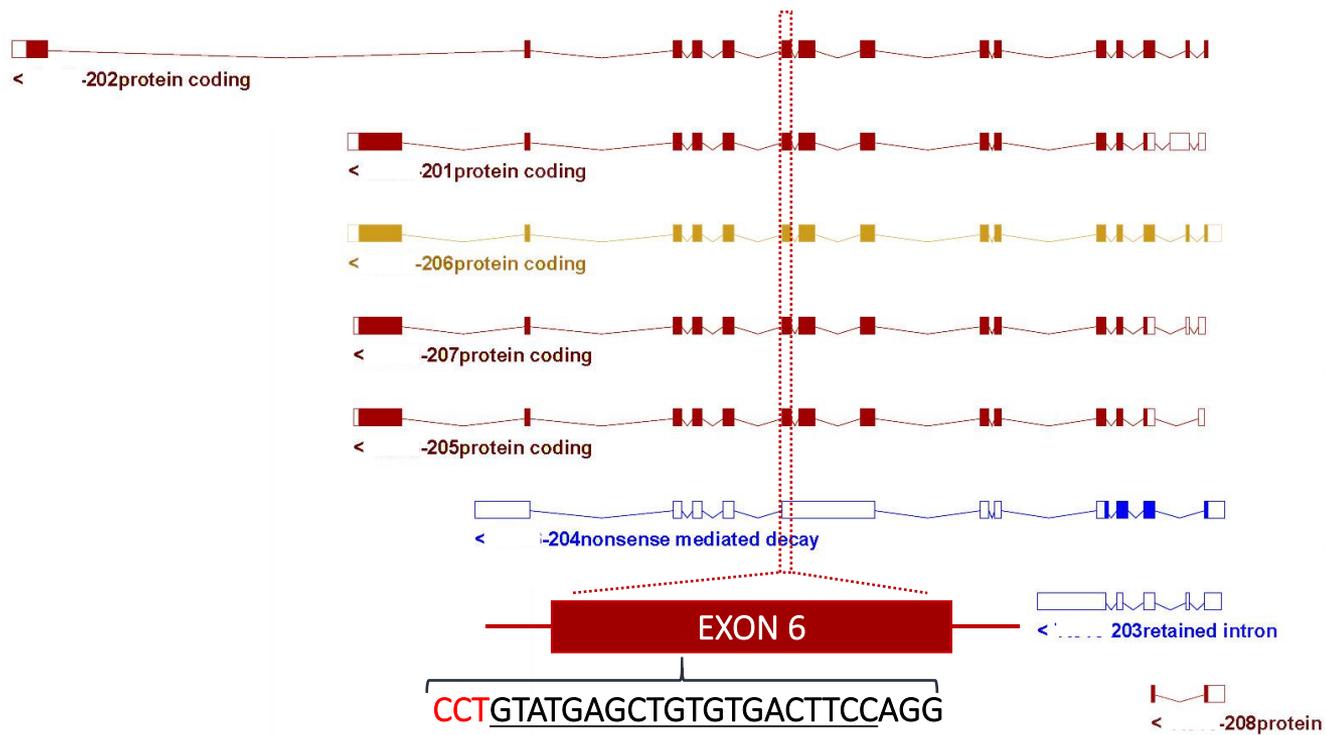


## *Ttc16* 在小鼠各组织中的表达情况



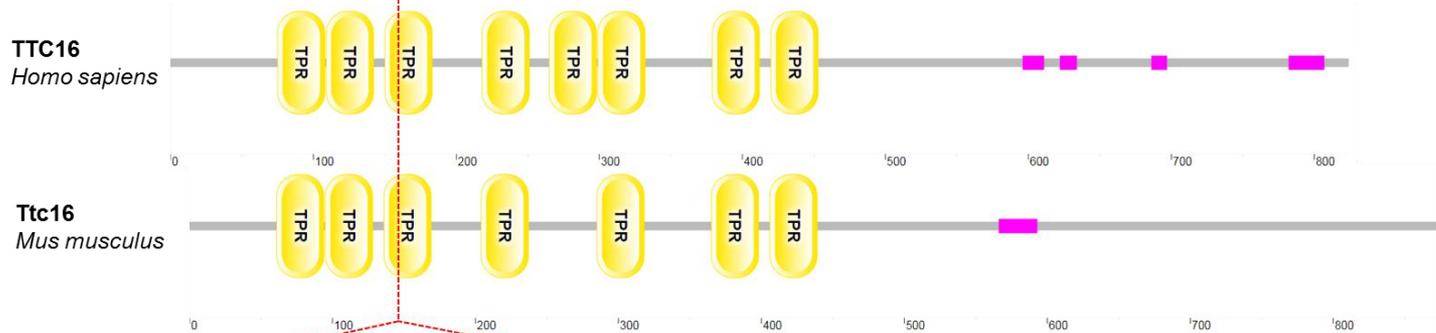
TTC16在睾丸中特异性高表达，在气管、肺部等纤毛富集组织中也有少量表达

# 小鼠模型构建



# 小鼠模型验证-Sanger测序

**A**

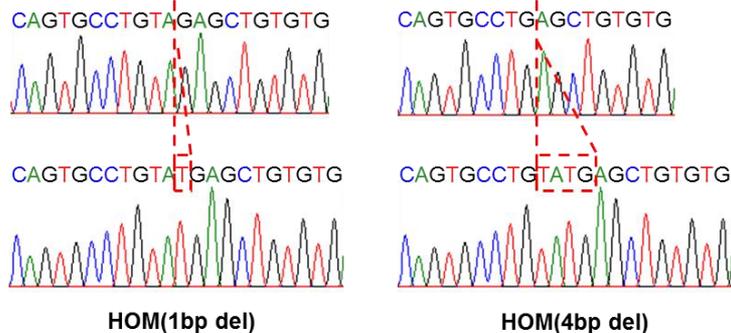


**B**

**WT cDNA**  
NM\_177384.3 ...CTCTACCTACAGGGTCAGTGCCTGTATGAGCTGTGT...  
... L Y L Q G Q C L Y E L C ... (824aa)

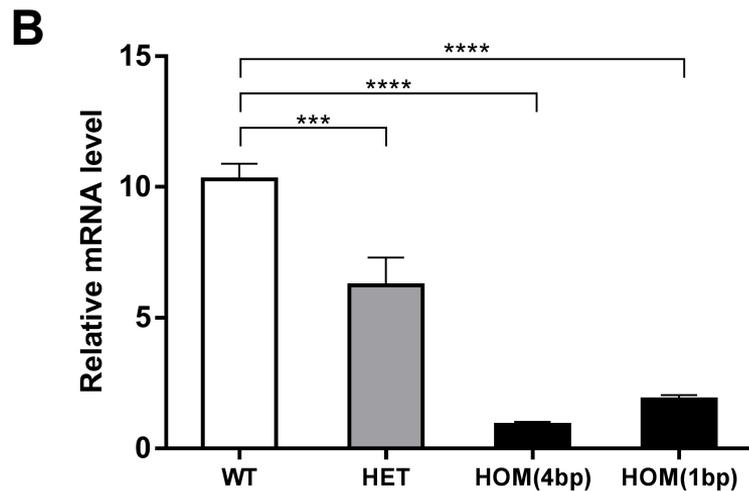
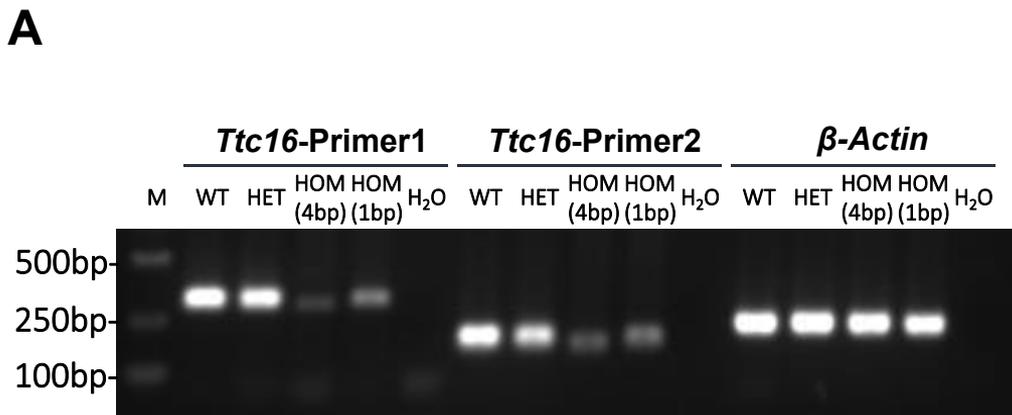
**HOM(1bp del)**  
c.483del ...CTCTACCTACAGGGTCAGTGCCTGTA-G  
p.Tyr161\* ... L Y L Q G Q C L \* (161aa)

**HOM(4bp del)**  
c.481-484del ...CTCTACCTACAGGGTCAGTGCCTG-AGCTGT...  
p.Tyr161Ser ... L Y L Q G Q C L S C ... (210aa)



**基因编辑产生了两种移码突变，它们都会造成终止密码子的提前**

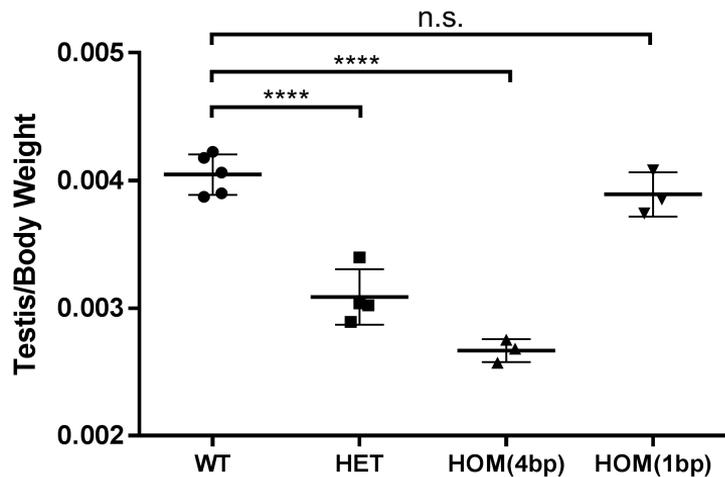
## 小鼠模型验证-qPCR



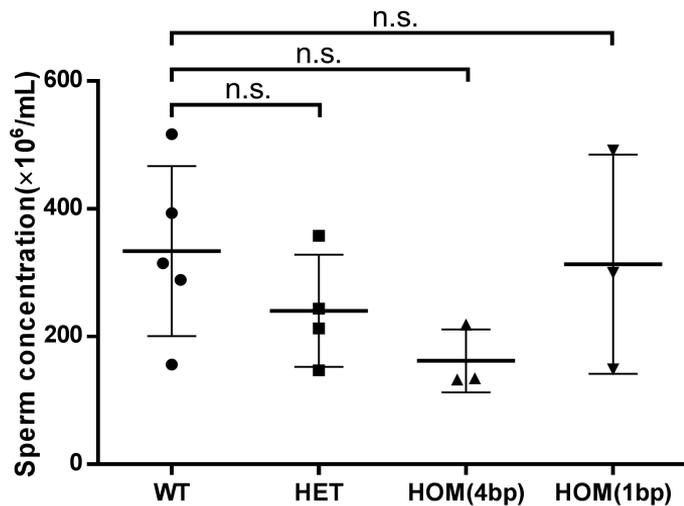
相比于野生型，杂合小鼠正常长度mRNA表达水平减少了40%，纯合4 bp缺失小鼠减少了90%，纯合1 bp缺失小鼠减少了80%

## 睾丸重量与精液密度

A

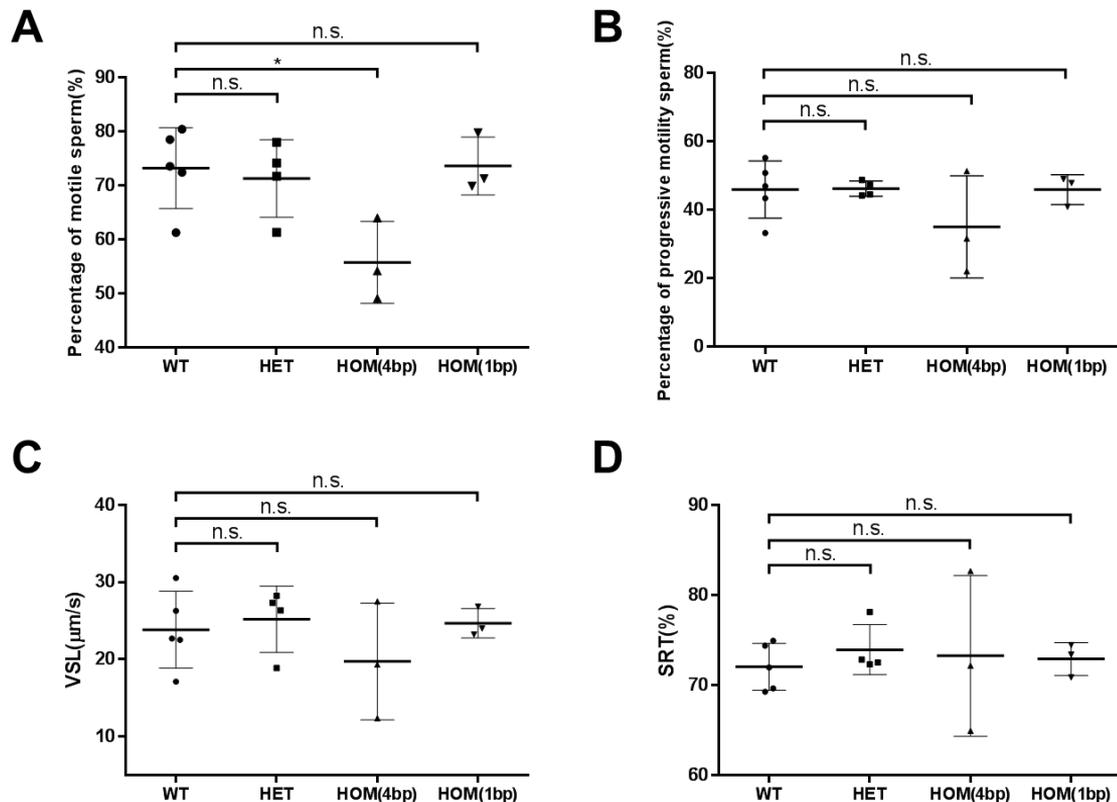


B



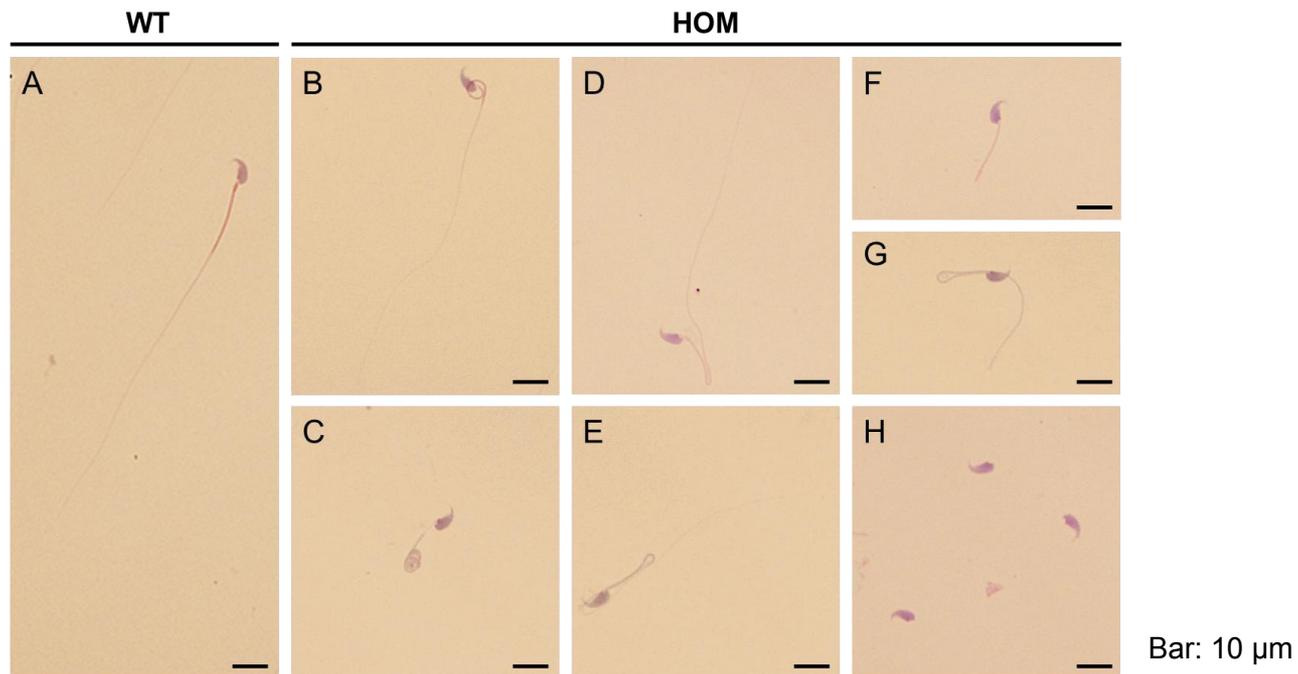
相比于野生型，杂合体与4bp缺失纯合体在睾丸质量与体重的比值上有显著降低，精液密度也有类似趋势

# 精液分析



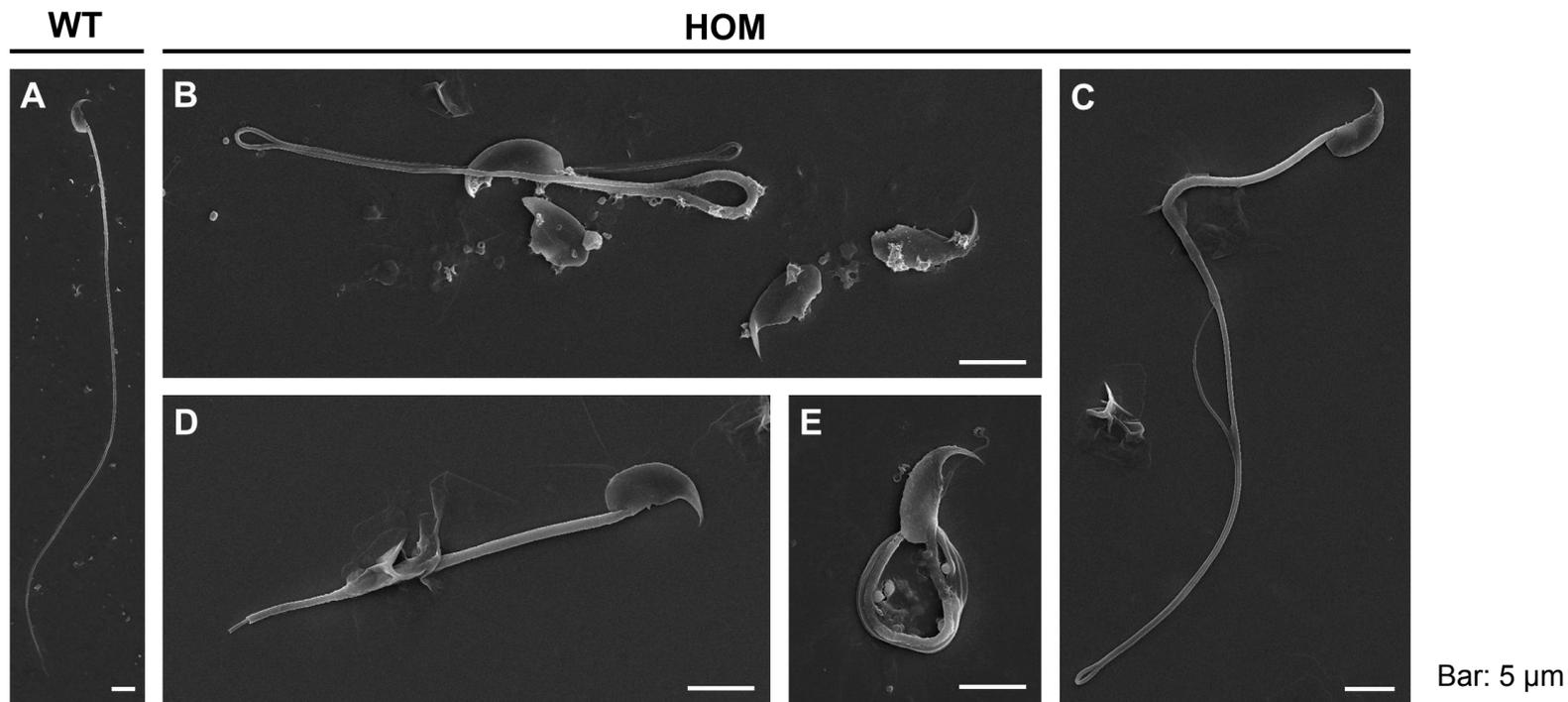
相比于野生型，运动精子比例在4bp缺失纯合小鼠中有显著降低，而前向性运动精子比例、精子直线运动速度、运动的前向性在4种基因型中没有显著差异

## 精子形态 (HE染色)



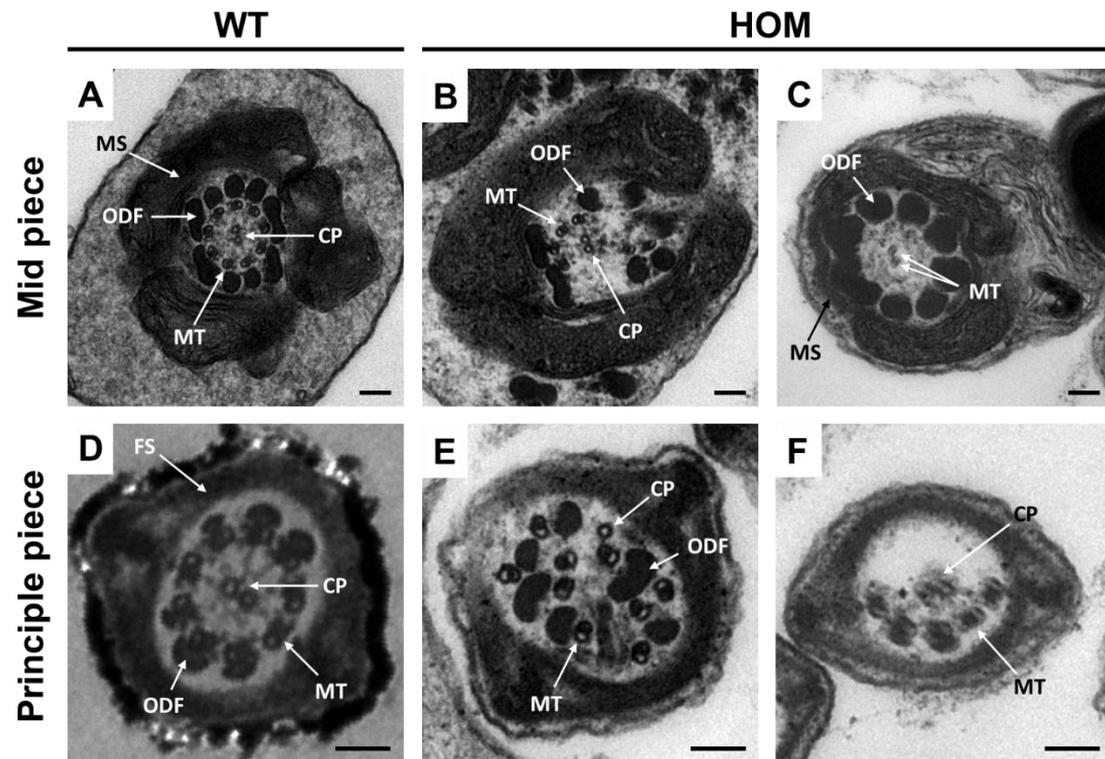
纯合小鼠精子中观察到了MMAF表型

# 精子形态（扫描电镜，SEM）



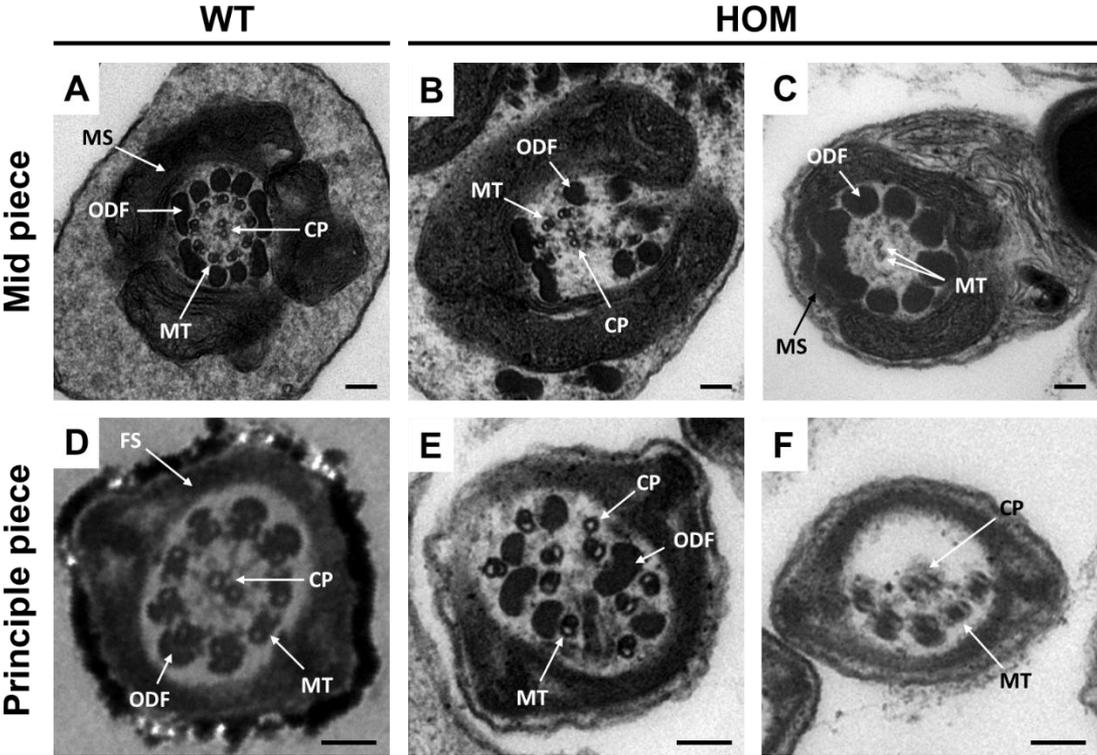
纯合小鼠精子在扫描电镜下的MMAF表型

# 精子尾部超微结构（透射电镜，TEM）



Bar: 100 nm

# 精子尾部超微结构（透射电镜，TEM）



Bar: 100 nm

	总数 (个)	畸形数 (个)	畸形率 (%)	WT畸形率参考 (%)
中段	49	7	14.29	2-3
主段	323	24	7.43	2-3

**透射电镜下观察到了纯合小鼠精子尾部中段和主段超微结构异常，异常率高于野生型**

# 总结与展望

CONCLUSION AND DISCUSSION

---

PART FOUR

## 总结

---

- RT-PCR证明了*Ttc16*在小鼠睾丸中特异性高表达，并且在气管、肺部等纤毛富集组织中也有少量表达
- CRISPR-Cas9与胚胎干细胞显微注射技术构建了*Ttc16*敲除小鼠模型，产生了两种移码突变；qPCR从mRNA表达水平验证了CRISPR-Cas9基因敲除效率较高
- 生育力相关表型分析显示：*Ttc16*纯合突变小鼠睾丸重量显著降低；运动精子比例下降；通过HE染色和扫描电镜方法观察到了纯合突变小鼠精子鞭毛多发畸形；精子中段和主段超微结构异常率增加

## 展望

---

我们的数据结果初步显示雄鼠中*Ttc16*基因的纯合突变带来了一定的生育力表型变化，推测*TTC16*有可能是男性生育力下降的重要遗传原因，后续还需要进一步的定量统计。

之后如果可以获得更好的抗体，应尝试对野生型精子中的*Ttc16*蛋白进行免疫荧光标记以观察其定位，或者通过免疫金标记在电镜下直接观察*Ttc16*超微结构的定位，以进一步解释*Ttc16*的功能。

关于*TTC16*相关的功能研究寥寥无几，阐明*Ttc16*在小鼠精子发生中是否发挥功能、发挥怎样的功能，将使我们能够更加深入地理解这一新基因，并且提高我们对MMAF病理生理学的理解、补充精子发生的机理；新候选致病基因的挖掘也将为遗传咨询以及为病人提供临床上的个性化治疗方案有重大指导作用。

# 致谢

---

我要感谢张老师能够提供给我这样的平台，在我学到知识、锻炼能力的同时也结识了很多优秀的人；我也要感谢带领我进入实验室、教我生物信息学分析方法、各种湿实验的刘春雨师姐，教我湿实验、带着我参与课题的丛江珊师姐，以及带我做免疫荧光、经常帮我找东西的田世雄师兄，十分认真帮我修改论文与ppt的吴燕华老师。此外，实验室的刘王杰师姐、张玲师姐、宋成成师兄也曾对我的一些科研上的问题给予过解答，感谢这些前辈的存在，让我对课题的理解更加深入。

最后还要感谢一直陪伴我支持我的家人，与我一起学习、一起玩耍的朋友们，与我谈心、给我建议的室友，以及或多或少帮助过我的人们。感谢你们在我不知所措、疲惫失落时仍能给予我慰藉，在我快乐时分享我的快乐，让我能够更加勇敢无畏地向前走。

# Q&A

THANK YOU FOR WATCHING

---

答辩学生：曾宇研

指导老师：张锋