

猪精子获能期间蛋白质磷酸化 时间依赖性的上调

张旭成, 袁慧敏, 金 一 *

(延边大学 农学院, 吉林 龙井 133400)

摘要:通过获能猪精子酪氨酸磷酸化蛋白分离和表达, 来确定精子获能的最佳状态。将猪精子悬浮于改良的 Tris 缓冲液 (mTBM) 获能培养基中, 在体积分数为 5% CO₂ 孵箱 37 °C 培养, 以考马斯亮蓝染液染色的方法来评价精子获能状态, 经过 SDS - PAGE 分离后, 进行 Western 免疫印迹分析, 检测获能猪精子间酪氨酸磷酸化蛋白的分布。有 27, 47 ku 的 2 种蛋白发生酪氨酸磷酸化, 其中 27 ku 的蛋白酪氨酸磷酸化水平自精子体外培养后呈递增趋势, 而 47 ku 的蛋白酪氨酸磷酸化水平在精子培养 1.5 h 时最高, 后呈递减趋势, 1.5 h 时获能状态最佳。

关键词:猪; 酪氨酸磷酸化; 精子获能; SDS - PAGE 电泳; Western 印迹

中图分类号: S828.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000 - 2286(2010)03 - 0577 - 04

Time-dependent Upregulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation in Pigs

ZHANG Xu-cheng, YUAN Hui-min, JIN Yi*

(College of Agronomy, Yanbian University, Longjing 133400, China)

Abstract: To determine the best condition for sperm capacitating by the separation and expression of tyrosine phosphorylated protein. Sperm from mature pigs was incubated in modified mTBM under 5% CO₂ in air at 37 °C. The effect of capacitation was assessed by Coomassie brilliant blue staining. Using Western blotting analysis after SDS - PAGE separation the distribution of tyrosine phosphorylated protein of pig sperm of capacitation was determined. There were two proteins (27 ku, 47 ku) phosphorylated in this experiment. The protein of 27 ku was detected by anti - phosphotyrosine monoclonal antibody, and the intensity of this protein increased in incubation. Then another protein of 47 ku was found and the level of this protein reached the highest point at 1.5 h, and the intensity of the protein decreasing in incubation. 1.5 h is the best condition for sperm capacitation.

Key words: boar sperm; tyrosine phosphorylation; capacitation; SDS - PAGE analysis; Western blotting

精子获能时, 精细胞内游离 Ca²⁺ 浓度升高后可激活腺苷酸环化酶或者抑制磷酸二酯酶, 进一步引起精子内 cAMP 水平升高, 从而启动精子的超激活运动。体外研究已经证实精子超活化需要许多生理因素, 包括 Ca²⁺、HCO³⁻、K⁺、BSA 和新陈代谢的底物。然而, 调节精子超活化的细胞内生物化学的机制基本上还未明确。据报道蛋白酪氨酸磷酸化是重要的蛋白质翻译后的事件, 参与不同的生物学过程;

收稿日期: 2010 - 03 - 03 修回日期: 2010 - 05 - 09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30960250)

作者简介: 张旭成 (1982 -), 男, 硕士生, 主要从事特种经济动物饲养与繁殖方向研究, E-mail: yhm2zxc@163.com;

*通讯作者: 金一, 教授, E-mail: yijin@ybu.edu.cn

蛋白酪氨酸磷酸化与精子超激活运动、超活化、获能及受精有联系。真核细胞中,蛋白的磷酸化/去磷酸化是调节蛋白生物活性最普遍的方式之一,通过它能调节细胞的许多生理活动。成熟精子是高度分化的特异细胞,不能转录翻译合成新的蛋白质。因此,蛋白酪氨酸磷酸化对精子运动力的维持、精子获能、超激活运动以及顶体反应等生理过程十分重要,这在小鼠、人和其他许多物种上都有报道^[1-2]。

Tash和 Means^[3]指出哺乳动物精子中存在各种磷酸化蛋白、蛋白激酶和蛋白质磷酸酯酶,提示蛋白质磷酸化/去磷酸化与精子生理过程有关。蛋白质磷酸化反应主要发生在丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)和酪氨酸(Tyr)残基上。精子既有 Ser/Thr磷酸化蛋白质,也有酪氨酸磷酸化蛋白质。但大量研究结果表明,精子的获能状态同酪氨酸磷酸化程度有关。Visconti等^[4]研究了小鼠精子获能与蛋白质酪氨酸磷酸化的关系,发现获能过程同 40~120 ku 蛋白的酪氨酸磷酸化程度具有时间依赖关系。此后,在仓鼠、牛、猪、马、猕猴及人精子中相继发现获能同酪氨酸磷酸化具有相关性。自 Leyton和 Saling^[5]首次用磷酸化特异性抗体证明小鼠精子存在酪氨酸磷酸化蛋白质以来,有关精子获能期蛋白质酪氨酸磷酸化的研究已取得很大进展,本试验采用 SDS-PAGE凝胶电泳和 Western免疫印迹技术检测猪精子获能前后酪氨酸磷酸化蛋白在精子上的分布特征,为探讨猪精子获能的分子机理奠定基础,使蛋白质酪氨酸磷酸化与精子获能的关系更加清楚。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 精液样本 来自韩吉牧业有限公司,成年,体质健康,性欲旺盛的 8 头杜洛克公猪。

1.1.2 试剂与仪器 丙烯酰胺、双丙烯酰胺(N-N 甲叉双丙烯酰胺)、SDS、过硫酸铵、考马斯亮兰 R-250、标准蛋白质 Marker等均购自华美生物科技有限公司;抗酪氨酸单克隆抗体(p-Tyr(PY99): sc-7020), 酶标(HRP)羊抗鼠 IgG h+1 购于上海优宁维生物科技有限公司;底物为二氨基联苯胺(DAB)购自北京拜尔迪生物技术有限公司;硝酸纤维素膜孔径为 0.45 μm。垂直电泳槽、转印仪购自日本日立公司。

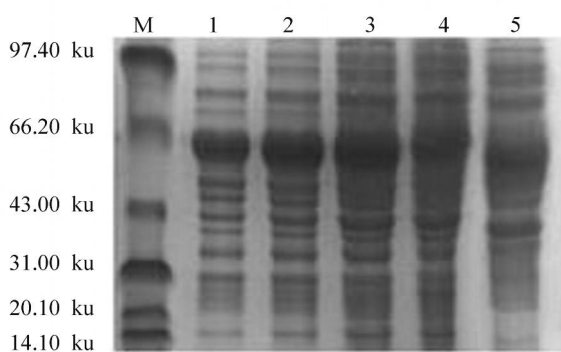
1.2 方 法

1.2.1 精子获能 将精子获能所需的清洗液 mPBS和获能液在室温下平衡 20 min。精子获能时,取预处理精液,按照 1:1 添加 mPBS,轻轻摇匀后离心(500 r/min, 5 min),弃上清;同样加入 2 mL 获能液,使沉淀精子悬浮;待精子悬浮后第 2 次离心(500 r/min, 5 min),弃上清,在沉淀精子中加入 2 mL 含有肝素(20 μg/mL)的获能液,置于 39.0 °C, (CO₂) = 5% 培养箱中呈 45 角倾斜,采用精子上浮(Swim-up)法进行获能。

1.2.2 蛋白质的提取 取预处理精液,用 10 倍体积含(NP-40) = 0.5% 的膜蛋白裂解液于冰上裂解 1.5 h,其间反复振荡。然后 4 °C 离心 20 min, 15 000 r/min。吸取上清液于透析袋中,0.01 mol/L Tris-HCl(pH = 7.5) 4 °C 条件下透析 48 h,得到猪精子膜蛋白溶液。-20 °C 保存备用。

1.2.3 SDS-PAGE电泳分析 SDS-PAGE电泳采用 Laemmli电泳缓冲体系^[6]。分离胶为 10%,浓缩胶为 5%,上样量为 40 μL。连接电源,使阳极在下,阴极在上。在恒压下(浓缩胶 80 V,分离胶 120 V)电泳 2 h,至指示染料移到凝胶板下口约 1 cm 处时停止。电泳完毕后,将取下的胶片一部分放入考马斯亮蓝染色液中,在摇床上摇动染色 0.75 h,然后置脱色液中脱色至蛋白带清晰为止。另一板做免疫印迹分析。抗原蛋白分析参照标准蛋白,记录样品蛋白质的显色条数及分子量。

1.2.4 Western免疫印迹 另一部分胶片移入转移缓冲液中浸润 5 min,将用转移缓冲液润湿的 6 张 Whatman 滤纸、硝酸纤维素膜及凝胶按 3 层滤纸、硝酸纤维素膜(正面朝上)、凝胶、3 层滤纸的顺序依次铺在半干式电泳凝胶转移仪的石墨平板上,每铺一层,要用玻璃棒赶走每层间的气泡。铺好后,将转印装置接通电源,转印 1.25 h。蛋白质 Marker切下来单独染色(考马斯亮蓝染色),将印迹膜放入封闭液中于 37 °C 恒温振荡器上放置 1 h,用 TBS 缓冲液洗 3 遍后加入一抗(酪氨酸磷酸化蛋白)于 37 °C 孵育 1 h。用 TBS 缓冲液洗 3 遍后加入酶标二抗(HRP 标记的羊抗鼠 IgG)于 37 °C 孵育 1 h。洗膜法同上,然后加底物(DAB)显色,显现特异性抗原蛋白条带。



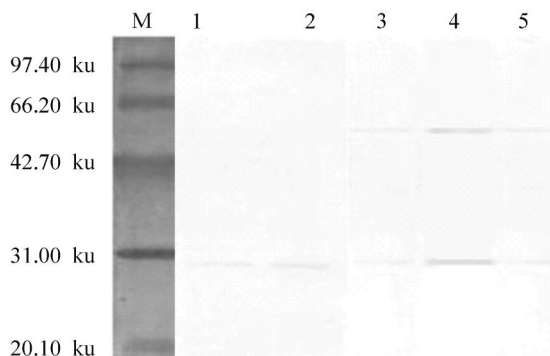
M 蛋白分子质量标准; 1 精子获能 (0 h);
2 精子获能 (0.5 h); 3 精子获能 (1 h);
4 精子获能 (1.5 h); 5 精子获能 (2 h)。

M. Molecular weight marker; 1. capacitation boar semen (0 h);
2 capacitation boar semen (0.5 h); 3 capacitation boar semen (1 h);
4 capacitation boar semen (1.5 h); 5 capacitation boar semen (2 h).

图 1 不同获能时间猪精子

酪氨酸磷酸化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig 1 SDS-PAGE analysis of tyrosine phosphorylated proteins in vitro capacitation of pig sperm



M 蛋白分子质量标准; 1 精子获能 (0 h);
2 精子获能 (0.5 h); 3 精子获能 (1 h);
4 精子获能 (1.5 h); 5 精子获能 (2 h)。

M. Molecular weight marker; 1. capacitation boar semen (0 h);
2 capacitation boar semen (0.5 h); 3 capacitation boar semen (1 h);
4 capacitation boar semen (1.5 h); 5 capacitation boar semen (2 h).

图 2 不同获能时间猪精子

酪氨酸磷酸化蛋白的 Western blotting 分析

Fig 2 Western blot analysis of tyrosine phosphorylated proteins in vitro capacitation of pig sperm

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 电泳分析

由图 1 可知:随着获能时间的增加,精液蛋白出现了很多新的蛋白,而在 2 h 时有部分蛋白丢失。

2.2 Western 免疫印迹分析

猪精子体外获能培养 0~0.5 h, Western blot 仅检测到 1 种分子量为 27 ku 的酪氨酸磷酸化蛋白 (图 2), 且这种蛋白的酪氨酸磷酸化水平随着获能的进行呈递增趋势。体外培养 1 h, 检测到另一种分子量为 47 ku 的酪氨酸磷酸化蛋白 (图 2), 此蛋白酪氨酸磷酸化水平在体外获能培养 1.5 h 达到最高峰, 后随获能的进行呈递减趋势。

3 讨论

获能过程中,酪氨酸磷酸化的 CABYR 具有同钙结合的能力,在精子主段 Ca^{2+} 的摄取和释放过程中发挥作用^[7]。体外获能条件下,人精子 CABYR 发生酪氨酸磷酸化,一种酸性 (pH4.0)、分子质量为 86 ku 结合钙的 CABYR 异构体生成增加,而碱性磷酸酶的去磷酸化作用能阻断钙结合于酸性的 CABYR 异构体^[7]。Visconti 等^[4]研究了小鼠精子获能与蛋白质酪氨酸磷酸化的关系,发现获能过程同 40~120 ku 蛋白的酪氨酸磷酸化程度具有时间依赖关系。Leyton 和 Saling 首次利用抗磷酸化酪氨酸抗体,在小鼠精子中发现 52, 75, 95 ku 3 种酪氨酸磷酸化蛋白质,其中,95 ku 蛋白质在获能或与透明带相互作用后与抗体的免疫反应性增强。随后 Naz 等^[8]报道 4 种 [(95/94 ± 3) ku, (46 ± 3) ku, (25 ± 7) ku, (12 ± 2) ku] 人精子酪氨酸磷酸化蛋白质,其酪氨酸磷酸化依赖精子的生理状态。本试验发现体外获能培养过程中,猪精子发生酪氨酸磷酸化蛋白的种类发生变化,由未获能培养前 1 种蛋白增加到获能后 2 种蛋白。其中分子质量 27 ku 的蛋白酪氨酸磷酸化水平在体外获能培养 1 h 后随获能的进行呈递增趋势,47 ku 的蛋白酪氨酸磷酸化水平在猪精子体外获能孵育 1.5 h 时达最高峰,此时精子运动方式剧烈变化,鞭毛大幅度不规则运动,为精子超激活阶段,推测分子质量 47 ku 的蛋白参与精子超激活的调控。说明了分子质量 27 ku、47 ku 蛋白磷酸化程度具有时间依赖性,这与 Fleisch 等报道相一致。而在豚鼠、仓鼠精子发现的 80 ku 蛋白的酪氨酸磷酸化,去磷酸化和再磷酸化与精子超激活运动的发生,失活和

再发生有关^[9],且 KulaNand等^[10]证明分子质量 80 ku的蛋白为 AKAP83,它的酪氨酸残基磷酸化在啮齿类动物精子获能培养中起重要作用。最近发现人精子中的 AKAP3和 AKAP4是获能期间主要的酪氨酸磷酸化蛋白^[11]。所以,AKAPs的酪氨酸磷酸化可能是精子获能和(或)与运动性有关的信号传导级联调节部分。猪精子上发现的这种 47 ku的蛋白是否也是 AKAPs家族中一员以及它在精子获能及超激活过程中如何作用有待进一步研究。

参考文献:

- [1]Visconti P E, Kopf G S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation[J]. Biol Reprod, 1998, 59(1): 1.
- [2]Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation pattern exhibited by rat spermatozoa[J]. Biol Reprod, 2001, 64(5): 1545.
- [3]Tash J S, Means A R. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility[J]. Biol Reprod, 1983, 28(1): 75.
- [4]Visconti P E, Bailey J L, Moore G D, et al Capacitation of mouse spermatozoa: I Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation[J]. Development, 1995, 121(4): 1129.
- [5]Leyton L, Saling P. 95 ku sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to Zona binding[J]. Cell, 1989, 57(7): 1123.
- [6]厦其昌. 蛋白质电泳技术指南 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 18.
- [7]Naaby Hansen S, Mandal A, Wolkowicz M J, et al CABYR, a novel calcium binding tyrosine phosphorylation—Regulated fibrous sheath protein involved in capacitation[J]. Dev Biol, 2002, 242(2): 236.
- [8]Naz R K, Ahmad K, Kumar R. Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function[J]. J Cell Sci, 1991, 99(Pt 1): 157.
- [9]Si Y, Okuno M. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation[J]. Biol Reprod, 1999, 61(1): 240.
- [10]Kula Nand A. Associated changes in protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in hamster spermatozoa[J]. Andrologia, 2001, 33(2): 95.
- [11]Ficarro S, Chertihin O, Westbrook V A, et al Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(13): 11579.