

研究简报

嘉庚蛸精子形成过程中KIFC1类似物 与NUP62分布的免疫荧光分析

马晓欣¹ 王 伟¹ 竺俊全^{1*} 杨万喜²¹宁波大学教育部应用海洋生物技术重点实验室, 宁波 315211; ²浙江大学生命科学学院精子实验室, 杭州 310058)**关键词** 嘉庚蛸; 精子形成; KIFC1类似物; NUP62; 免疫荧光

精子发生(spermatogenesis)是受基因调控的复杂的发育过程, 精子形成不同阶段生精细胞内基因特异性表达导致顶体的发生、精核形态的建成及尾部的形成, 精细胞内特有的微管套(manchette)和活跃于微管套上的各种分子马达(molecular motor)在上述各结构形成中发挥重要作用^[1-2]。C末端驱动蛋白KIFC1是分子马达的一种, 它沿着微管由正端向负端运动, 在大鼠精子发生过程中, 该种蛋白运输来自高尔基体的囊泡, 参与精子顶体的形成^[3]。核孔复合体蛋白NUP62是精细胞核膜上一种蛋白聚合体结构的组分之一, 在大鼠的精子形成过程中, KIFC1可以通过与NUP62结合, 和核膜上的蛋白聚合体建立联系, 参与精细胞核的拉长和浓缩过程^[4]。

嘉庚蛸(*Octopus tankahkeei*)是我国沿海重要经济头足类软体动物之一。与哺乳动物类似, 该物种精子形成过程中发生的主要细胞学事件包括顶体的发育、核形态的构建及尾部的形成, 其中核的形态变化大, 由早期精细胞的圆形或卵圆形核、变成中期精细胞的纺锤形核、再变成后期精细胞的长纺锤形核, 直至成熟精子的长柱状核, 顶体的发育经历了圆囊状、长囊状到钻头形的变化过程^[5-6]。而且, 嘉庚蛸精子形成过程中其精细胞核周围有一微管套结构, 该结构在精细胞早期形成, 直至未成熟精子, 成熟精子中微管套结构消失^[7]。我们的前期研究已经证实嘉庚蛸精巢中存在编码驱动蛋白KIFC1类似物的基因, 该基因在精细胞时期表达, 而在成熟精子中不表达^[8]。由于嘉庚蛸的精子形成与哺乳类大鼠有一定的相似性^[3-4], 因此, 我们假设嘉庚蛸中存在的这种KIFC1同源蛋白(即KIFC1类似物)在精子形成过程中可能起到与大鼠中类似的作用, 即KIFC1类

似物可能参与了顶体的发育及细胞核形态构建。为验证这一假设, 本研究用KIFC1抗体和偶联特雷西红的羊抗兔二抗标记KIFC1类似物, 用NUP62抗体和偶联异硫氰酸荧光素的兔抗鼠二抗标记NUP62, 并用DAPI标记细胞核, 激光共聚焦显微镜观察了嘉庚蛸精子形成过程中KIFC1类似物与NUP62的表达与分布, 探讨了KIFC1类似物与NUP62之间潜在的生理联系以及在精子形成过程中的可能作用。

动物材料: 性成熟的嘉庚蛸购自宁波市水产大世界市场, 挑选体重50~60 g、活力好的雄性个体10只, 供实验用。

固定包埋: 活体解剖嘉庚蛸, 迅速取得精巢和精荚, 切成小块或小段后立即放入新配制的4%多聚甲醛(PFA-PBS)溶液中固定过夜。翌日, 将固定好的组织块放到0.5 mol/L蔗糖-PBS溶液中, 4 °C过夜。次日, 待组织块沉底后取出, 放入盛有OCT包埋剂的小锡纸盒中, 置于-20 °C冰箱中保存备用。

冰冻切片: 将包埋好的精巢组织块从冰箱中取出, 于冰冻切片仪(MICROM HM525, -20 °C)上切片, 厚度7 μm。将切片贴于多聚赖氨酸包被的载玻片上, 置于-20 °C冰箱中保存。

抗体孵育: 将粘贴有切片的载玻片从冰箱中取出, 放置片刻使其恢复到室温。在样品的周围用PAP PEN-笔画一个圈, 然后将其浸没在0.1 mol/L的PBS(pH7.4)中复水10 min。取出载玻片放在垫有滤纸的培养皿中, 四周滴加PBS溶液保湿, 并在圈内滴加封闭液(6%牛血清白蛋白, BSA), 室温下封闭1 h,

收稿日期: 2012-01-08 接受日期: 2012-05-15

浙江省自然科学基金(No.Z307536)资助项目

*通讯作者。Tel: 0574-87608894, E-mail: zhujunquan@nbu.edu.cn

以减少后续反应中抗体的非特异性结合。然后用滤纸吸干封闭液,并在圈内滴加KIFC1抗体(polyclonal anti-KIFC1 antibody, 浓度1:200,用6%的BSA溶液稀释)和NUP62抗体(monoclonal anti-NUP62 antibody) (浓度1:100,用6%的BSA溶液稀释),置于4 °C冰箱中过夜。翌日,用TBST缓冲液(20 mmol/L Tris, pH7.5; 154 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EGTA, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100)洗3次,每次10 min,吸干液体后滴加偶联特雷西红的羊抗兔二抗(Texas Red conjugated-Goat anti-rabbit, 浓度1:200,用TBST稀释)和偶联异硫氰酸荧光素的兔抗鼠二抗(FITC conjugated-Rabbit anti-mouse, 浓度1:150,用TBST稀释),室温下孵育2 h。整个过程避光操作。

染色观察:加二抗孵育完后,在含TBST的染缸中洗3次,每次10 min。吸干液体,滴加适量细胞核染液DAPI,反应3 min后将多余染液除去,并滴加少许抗荧光猝灭剂封片,用滤纸吸干残余液体后立即在LSM 510激光共聚焦显微镜下观察与拍照。细胞核显示蓝色,KIFC1类似物显示红色,NUP62显示绿色。

早期精细胞中KIFC1类似物与NUP62的分布

由次级精母细胞分裂而来的早期精细胞形态不规则,在共聚焦显微镜下观察到细胞核呈卵圆形(图1a)。KIFC1类似物未见明显表达,未检测到明显的红色信号(图1b和图1d)。NUP62明显表达,绿色信号环绕着细胞核,且集中在核膜表面(图1c)。

中期精细胞中KIFC1类似物与NUP62的分布

中期精细胞逐渐拉长,细胞核沿着纵向延伸、横向压缩。在共聚焦显微镜下观察到细胞核呈纺锤形,核中央的凹陷明显可见(图1e)。KIFC1类似物明显表达,红色信号主要环绕细胞核周分布(图1f)。NUP62主要围绕核周,定位于核膜上(图1g)。两种蛋白在核周存在共定位关系(图1h)。

后期精细胞中KIFC1类似物与NUP62的分布

后期精细胞继续延伸拉长,在共聚焦显微镜下能清楚地看到长纺锤形细胞核及中央的核内沟(图1i)。KIFC1类似物主要聚集在细胞核周围,核内也

有一定量分布(图1j)。NUP62围绕核周分布在核膜上,核内也有少量分布(图1k)。两种蛋白在核周的分布位置上基本重叠,共定位明显(图1l)。

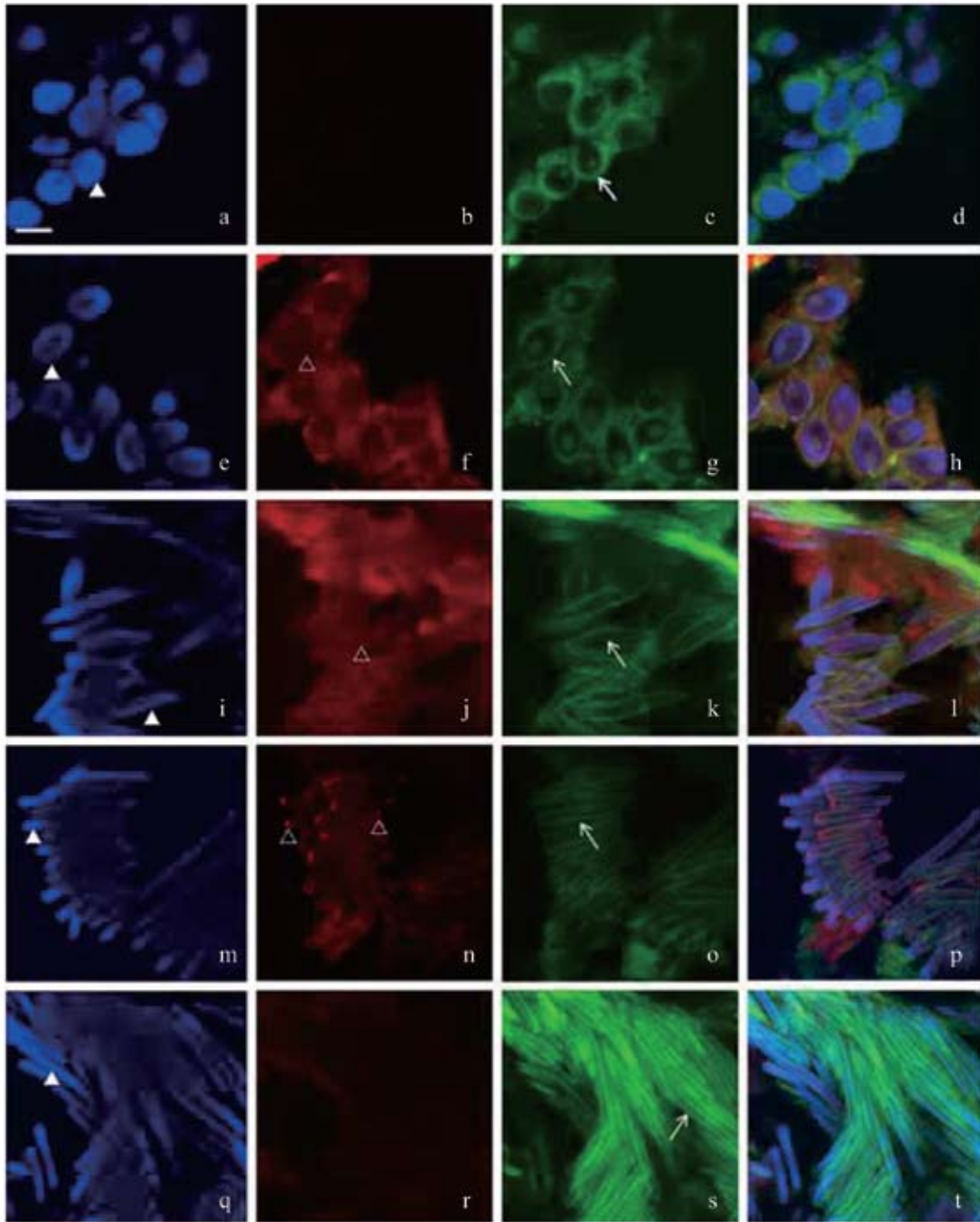
精子形成后KIFC1类似物与NUP62的分布

共聚焦显微观察表明,未成熟精子细胞核呈柱状(图1m)。KIFC1类似物的分布与在后期精细胞中相似,但KIFC1类似物的信号在细胞核的两端特别强(图1n和图1p)。NUP62的分布也与后期精细胞相似,除了定位于核膜上,还出现在核内部(图1o)。

成熟精子细胞核呈长柱状(图1q)。KIFC1类似物未见明显表达,未检测到明显的红色信号(图1r和图1t)。NUP62仍高表达,主要集中分布在核膜上,细胞核内也能检测到(图1s)。

精子发生是一个高度特化的发育过程,由各种复杂的信号通路来引导^[1,9-10],并包含着细胞学变化极其剧烈的结构重组^[11-12]。在高等动物,精子发生最显著的形态学变化发生在精细胞分化形成精子的过程中,包括顶体的发育、核形态的演变及尾部的形成等事件,这些事件的发生是各发育阶段精细胞中基因表达受到严格调控的结果^[2,13]。而基因表达和调控的表现形式之一就是精细胞中特异的细胞骨架结构的衍变以及与细胞骨架相联系的马达蛋白的动态变化^[12,14]。嘉庚蛸的精子形成过程亦包含着剧烈的细胞结构重组,其复杂性可以与哺乳类相比拟,从精细胞到成熟精子的转变产生了表面有螺旋横纹的钻头形顶体、中央凹陷的长柱状细胞核以及细长的尾部^[5-6,15]。并且,我们已经证实了嘉庚蛸精子形成过程中细胞核周围微管的活动与核的拉长和浓缩高度协调^[7]。而之前编码驱动蛋白KIFC1类似物基因的发现以及该基因在嘉庚蛸精子形成过程中的表达时序的分析使我们确认了嘉庚蛸精细胞中KIFC1同源马达蛋白的存在^[8]。

KIFC1是一种C末端马达蛋白,属于驱动蛋白14亚家族的成员^[16-17]。后者与许多重要的细胞学事件关联,如在细胞分裂和细胞器的转运等方面起到重要作用^[17-21]。在大鼠的精细胞中,KIFC1负责高尔基体来源的囊泡物质向顶体的运输,并参与顶体的形成^[3]。它还与核膜上的一个包含核孔复合体蛋白NUP62的复合体相互作用,并协助精细胞核完成形态构建^[4]。本研究利用免疫荧光的方法观察了驱动



a-d: 早期精细胞; a: 细胞核; b: KIFC1类似物未见明显表达; c: NUP62的分布; d: a、b、c的叠加; e-h: 中期精细胞; e: 细胞核; f: KIFC1类似物的分布; g: NUP62的分布; h: e、f、g的叠加; i-l: 后期精细胞; i: 细胞核; j: KIFC1类似物的分布; k: NUP62的分布; l: i、j、k的叠加; m-p: 未成熟精子; m: 细胞核; n: KIFC1类似物的分布; o: NUP62的分布; p: m、n、o的叠加; q-t: 成熟精子; q: 细胞核; r: KIFC1类似物未见明显表达; s: NUP62的分布; t: q、r、s的叠加; 实心三角指示细胞核着色; 空心三角指示KIFC1信号; 箭头指示NUP62信号; 标尺=5 μm 。

a-d: early spermatid; a: nucleus; b: expression of the KIFC1-like protein was not obvious; c: distribution of NUP62; d: merge of three stainings; e-h: intermediate spermatid; e: nucleus; f: distribution of KIFC1-like motor; g: distribution of NUP62; h: merge of three stainings; i-l: late spermatid; i: nucleus; j: distribution of KIFC1-like motor; k: distribution of NUP62; l: merge of three stainings; m-p: immature sperm; m: nucleus; n: distribution of KIFC1-like motor; o: distribution of NUP62; p: merge of three stainings; q-t: mature sperm; q: nucleus; r: expression of the KIFC1-like protein was not obvious; s: distribution of NUP62; t: merge of three stainings. The filled triangle refers to the staining of nucleus; The open triangles denote signal of KIFC1; The arrows point to signal of NUP62; Bar=5 μm .

图1 嘉庚蛸精子形成过程中KIFC1类似物与NUP62分布的免疫荧光分析

Fig.1 Immunofluorescence analysis of the distribution of KIFC1-like protein and NUP62 during spermiogenesis in *Octopus tankahkeei*

蛋白KIFC1类似物和核孔复合体蛋白NUP62在嘉庚蛸精子形成不同阶段的分布特征。早期精细胞,形态结构变化不明显, KIFC1类似物尚未明显表达,说明它还没有开始发挥作用,而NUP62出现在核膜上,这与它作为核孔复合体的成分之一是相吻合的^[22]。中期精细胞,核纵向延伸和横向压缩,此时KIFC1类似物和NUP62都出现在核周,两者在分布位置上的重叠暗示着它们可能存在生理接触,在功能上存在某种联系。后期精细胞,纵向延伸和横向压缩的程度加强,核已拉长为长纺锤形, KIFC1类似物和NUP62的分布仍然表现出高度的一致性,除了定位在核周,还出现在核内,说明它们在细胞核周可能存在相互作用,在细胞核内也可能发挥作用。未成熟精子,核已拉长为柱状, KIFC1类似物和NUP62仍共同定位于核周,而且KIFC1类似物在细胞核的前端的顶体区域表达特别强,此时顶体仍处在进一步发育成熟阶段^[6],这意味着KIFC1类似物可能在顶体发育完善过程中发挥作用^[3]。成熟精子,顶体、细胞核及尾部均已发育完善,核呈长柱状, KIFC1类似物不再明显表达及发挥作用;而NUP62仍然表达,并定位到核膜上及核内,暗示着它在细胞内物质的核质转运方面可能存在某种作用。

KIFC1类似物在不同发育阶段精细胞中的动态分布规律与我们已经报道的原位杂交结果反映的基因表达时序是一致的^[8],并且,在嘉庚蛸精子形成过程中发生显著细胞结构重组的阶段, KIFC1类似物和NUP62定位上的重叠与小鼠精细胞中的情况相似^[4],它们在精细胞内分布的一致性正是二者存在相互作用的基础。KIFC1类似物与NUP62分布位置上的相关性暗示着它们在一些重要的细胞结构重组过程中的潜在功能, KIFC1类似物可能正是通过与核孔复合体蛋白NUP62的相互作用从而与细胞核膜上的大分子聚集体建立联系,由此将马达蛋白运动产生的动力作为细胞核形变的直接拉力或者间接地起调节作用。

然而,我们必须以更多的实验证据为依据来阐释KIFC1类似物在嘉庚蛸精子形成过程中的作用机制。KIFC1类似物与发育过程中的顶体的生理联系怎样? KIFC1类似物及NUP62两种蛋白与核质运输因子RAN GTPase及Importin α/β 存在怎样的关系?与之联系的大分子聚合物是否包含诸如SUN-CASH复合体的核膜元件?这些问题均需要进一步的蛋白

功能分析实验来找到答案。

参考文献 (References)

- 1 He Z, Kokkinaki M, Dym M. Signaling molecules and pathways regulating the fate of spermatogonial stem cells. *Microsc Res Tech* 2009; 72(8): 586-95.
- 2 Lui WY, Cheng CY. Transcription regulation in spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2008; 636: 115-32.
- 3 Yang WX, Sperry AO. C-Terminal kinesin motor KIFC1 participates in acrosome biogenesis and vesicle transport. *Biol Reprod* 2003; 69(5): 1719-29.
- 4 Yang WX, Jefferson H, Sperry AO. The molecular motor KIFC1 associates with a complex containing nucleoporin NUP62 that is regulated during development and by the small GTPase RAN. *Biol Reprod* 2006; 74(4): 684-690.
- 5 Zhu JQ, Yang WX, You ZJ, Jiao HF. The ultrastructure of the spermatozoon of *Octopus tankahkeei*. *Jou She Res* 2005; 24(4): 1203-7.
- 6 竺俊全, 杨万喜, 尤仲杰, 王 武, 焦海峰. 嘉庚蛸精子发生的超微结构. *水产学报*(Zhu Junquan, Yang Wanxi, You Zhongjie, Wang Wu, Jiao Haifeng. Ultrastructure of spermatogenesis of *Octopus tankahkeei*. *Journal of Fisheries of China*) 2006; 30(2): 161-9.
- 7 俞鹤明, 王 伟, 竺俊全, 杨万喜. 嘉庚蛸精子形成过程中微管的分布特征及作用分析. *中国细胞生物学报*(Yu Heming, Wang Wei, Zhu Junquan, Yang Wanxi. Analysis on dynamic distribution and function of microtubule during *Octopus tankahkeei* spermiogenesis. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2010; 32(2): 251-5.
- 8 Wang W, Zhu, JQ, Yang WX. Molecular cloning and characterization of KIFC1-like kinesin gene (ot-kifc1) from *Octopus tankahkeei*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2010; 156(3): 174-82.
- 9 Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(47): 16489-94.
- 10 Lie PP, Cheng CY, Mruk DD. Coordinating cellular events during spermatogenesis: A biochemical model. *Trends Biochem Sci* 2009; 34(7): 366-73.
- 11 Hess RA, Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol* 2008; 636: 1-15.
- 12 Wang R, Sperry AO. Identification of a novel Leucine-rich repeat protein and candidate PP1 regulatory subunit expressed in developing spermatids. *BMC Cell Biol* 2008; 9: 9.
- 13 Kimmins S, Kotaja N, Fienga G, Kolthur US, Brancorsini S, Hogeveen K, *et al*. A specific programme of gene transcription in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2004; 8(5): 496-500.
- 14 Zou Y, Millette CF, Sperry AO. KRP3A and KRP3B: Candidate motors in spermatid maturation in the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 2002; 66(3): 843-55.
- 15 Li Z, Zhu JQ, Yang WX. Acrosome reaction in *Octopus tankahkeei* induced by calcium ionophore A23187 and a possible role of the acrosomal screw. *Micron* 2010; 41(1): 39-46.
- 16 Hirokawa N, Takemura R. Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res* 2004; 301(1): 50-9.
- 17 Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfam-

- ily: Insights into structure and function. Trends Cell Biol 2005; 15(9): 467-76.
- 18 Walczak CE, Verma S, Mitchison TJ. XCTK2: A kinesin-related protein that promotes mitotic spindle assembly in *Xenopus laevis* egg extracts. J Cell Biol 1997; 136(4): 859-70.
- 19 Ems-McClung SC, Zheng YX, Walczak CE. Importin α/β and Ran-GTP regulate XCTK2 microtubule binding through a bipartite nuclear localization signal. Mol Biol Cell 2004; 15(1): 46-57.
- 20 Goshima G, Vale RD. Cell cycle-dependent dynamics and regulation of mitotic kinesins in *Drosophila* S2 cells. Mol Biol Cell 2005; 16(8): 3896-907.
- 21 Cai S, Weaver LN, Ems-McClung SC, Walczak CE. Kinesin-14 family proteins HSET/XCTK2 control spindle length by cross-linking and sliding microtubules. Mol Biol Cell 2009; 20(5): 1348-59.
- 22 Wiemann S, Kolb-Kokocinski A, Poustka A. Alternative pre-mRNA processing regulates cell-type specific expression of the IL411 and NUP62 genes. BMC Biol 2005; 3: 16.

Immunofluorescence Analysis of the Distribution of KIFC1-like Protein and NUP62 during Spermiogenesis in *Octopus tankahkeei*

Ma Xiaoxin¹, Wang Wei¹, Zhu Junquan^{1*}, Yang Wanxi²

¹Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

²The Sperm Laboratory, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Immunofluorescence and confocal microscopy were employed to investigate the localization pattern of a KIFC1-like protein and NUP62 as well as their relationship during spermiogenesis in *Octopus tankahkeei*. In early spermatid, the nucleus was round or oval, expression of the KIFC1-like protein was not obvious, and NUP62 was abundantly located in the nuclear membrane. In intermediate spermatid, the nucleus became spindle-shaped, the KIFC1-like protein was apparently expressed and located around the nucleus, and NUP62 was mainly located in the nuclear membrane. In late spermatid, the nucleus resembled a long spindle, the KIFC1-like protein was concentrated in proximity to the nuclear periphery and also located within the nucleus, and NUP62 was distributed in the nuclear membrane and within the nucleus. In immature sperm, the nucleus was cylindrical, distribution of the KIFC1-like protein and NUP62 was similar to that in late spermatid, and the KIFC1-like protein was enriched at two ends of the cell. In mature sperm, the nucleus became long rod-shaped, expression of the KIFC1-like protein was not detected, and expression of NUP62 was maintained at a high level. The results indicated that the KIFC1-like protein was probably involved in the biogenesis of acrosome and through its interaction with NUP62 or other mediator, associated with some macromolecular assembly in the nuclear membrane, thus providing the nucleus with direct shaping force or influencing the shaping process via indirect regulation.

Key words *Octopus tankahkeei*; spermiogenesis; KIFC1-like protein; NUP62; immunofluorescence

Received: January 8, 2012 Accepted: May 15, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Z307536)

*Corresponding author. Tel: 86-574-87608894, E-mail: zhujunquan@nbu.edu.cn