

# 人牛精浆相关蛋白的亚细胞定位及生物活性

张杰 刘莹 宗志红 宿文辉 于秉治\*

(中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110001)

**摘要** 利用红色荧光蛋白表达载体 pDsRed1-N1 与人睾丸中牛精浆相关蛋白基因 (*hbrp*) 重组为 pDsRed1-N1/*hbrp*, 真核表达载体 pcDNA3.1-myc-his 与 *hbrp* 重组为 pcDNA3.1-myc-his/*hbrp*, 分别转染 HEK293 细胞, 建立稳定的真核表达细胞系。在荧光显微镜下观察 HBRP 的亚细胞定位, 并用放射自显影检测该细胞系的蛋白激酶 C (PKC) 活性。HBRP 定位在细胞膜及胞浆近膜处; HBRP 对 PKC 活性有明显的抑制作用。从而确定了人新的精子结合蛋白 HBRP 在细胞内的定位, 并认定了 HBRP 为有生物活性的功能蛋白。

**关键词** 人牛精浆相关蛋白; 牛精浆蛋白; 亚细胞定位; 蛋白激酶 C 活性

我们在人睾丸组织中发现并克隆了一个与牛精浆 (bovine seminal plasma, BSP) 蛋白相关的新基因 (human BSP-related protein, *hbrp*), 其 cDNA 为 1052 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 编码了一个含有 223 个氨基酸残基的蛋白质, 推测分子量 26.1 kDa<sup>[1]</sup>; 序列同源性分析发现, 与之最相近的是 BSP 蛋白家族; 氨基酸序列中含有 4 个纤连蛋白 II 型结构域, 与 BSP 蛋白在结构上有一定的相似性, 称为 HBRP<sup>[1]</sup>; 已确定 *hbrp* 基因定位于 19q1.3; 在肾等多种组织中有表达。本研究构建了 *hbrp* 基因的融合蛋白表达载体 pDsRed1-N1/*hbrp* 和 pcDNA3.1-myc-his/*hbrp*, 确定 HBRP 的亚细胞定位及其生物学活性, 为进一步研究 HBRP 的生物学功能打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

PCR 试剂盒、*E. coli* JM-109 感受态大肠杆菌、LB 培养基、质粒提取试剂盒、限制性核酸内切酶、琼脂糖等为 TaKaRa 公司产品, pcDNA3.1-myc-his、pDsRed1-N1 质粒购于 Clontech 公司, DNA 连接试剂盒购于 Promega 公司, DNA 快速纯化/回收试剂盒购于北京鼎国生物技术发展中心, Lipofectamine™2000 细胞转染试剂购于 Invitrogen 公司, 细胞培养液 DMEM 及胎牛血清为 Gibco 公司产品, 人胚肾 HEK293 细胞由北京协和医科大学细胞生物学教研室提供, 引物合成和 DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成。[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]三磷酸腺苷由北京福瑞生

物工程公司提供, 蛋白激酶 C (PKC) 活性测定试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 目的基因的获得** 设计含 *XhoI* 和 *BamHI* 酶切位点的引物: 引物 1: 5'-ATCTCGAGGATGACCCGATGGTCCAGTTACCTG-3'; 引物 2: 5'-GTGGATCCTCTGTGCTCAGCCTCAGTATGGCGG-3'。以克隆在 pGEX-5X-1 质粒上的 *hbrp* cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 5' 端引入 *XhoI* 酶切位点和起始密码, 3' 端引入 *BamHI* 酶切位点, 反应体系为 50  $\mu$ l, 反应产物为含 *BamHI* 和 *XhoI* 酶切位点的 *hbrp* 片段。

**1.2.2 目的基因与 T 载体的连接** PCR 产物经 1.4% 琼脂糖电泳, 将约 800 bp 处的 *hbrp* 胶纯化回收, 与 T 载体 pGEM-T Easy 连接, 反应体系为 10  $\mu$ l (2  $\mu$ l T 载体含 *BamHI* 和 *XhoI* 酶切位点的 2  $\mu$ l *hbrp*, 5  $\mu$ l 2 $\times$  缓冲液, 1  $\mu$ l DNA 连接酶), 室温反应 1.5 h。将反应产物转化到 *E. coli* JM-109 中, 涂布于 *amp*<sup>R</sup> 的琼脂平板培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单克隆菌落于 LB 培养基中培养 6~8 h, 提取质粒, *BamHI* 和 *XhoI* 双酶切过夜, 0.9% 琼脂糖电泳, 鉴定插入片段的阳性结果, 用于表达载体的构建。

**1.2.3 重组表达载体的构建** 将质粒 pcDNA3.1-myc-his、pDsRed1-N1 分别和 pGEM-T/*hbrp* 同时

收稿日期: 2005-08-01 接受日期: 2005-11-17

国家自然科学基金资助项目 (No.30170987)

\* 通讯作者。Tel: 024-23256666-5299, Fax: 024-23261253

*Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切, 0.9% 琼脂糖电泳, 从胶中回收 *hbrp* 片段和酶切后载体, 进行连接反应, 方法同 1.2.2。

1.2.4 测序 将培养 pcDNA3.1-myc-his/*hbrp* 和 pDsRed1-N1/*hbrp* 的菌种送 TaKaRa 公司测序。确定测序结果正确后, 用试剂盒小量提取重组质粒, 用于转染。

1.2.5 细胞培养 HEK293细胞用10%胎牛DMEM培养, 常规传代、接种、冻存。

1.2.6 脂质体转染混合液的配制 溶液A: 用250  $\mu$ l 无血清 DMEM 培养液稀释 4.0  $\mu$ g 质粒(pcDNA3.1-myc-his、pDsRed1-N1、pcDNA3.1-myc-his/*hbrp* 和 pDsRed1-N1/*hbrp*)/ 孔, 溶液B: 用250  $\mu$ l 无血清 DMEM 培养液稀释 10  $\mu$ l 脂质体转染试剂 Lipofectamine™ 2000/ 孔, 在5 min 内将溶液A 与溶液B 轻柔混匀, 室温放置 20 min。

1.2.7 转染(分别设置重组载体转染组、空质粒转染组和未转染组) 将HEK293细胞接种到6孔培养板中, 待细胞生长达50% 汇合时, 去除培养液, 无血清 DMEM 培养基轻柔洗涤细胞一次, 各组细胞分别加入相应的转染混合液, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内 37 °C 培养 6 h, 弃去转染混合液, 加新鲜全培养基温育细胞 48 h。

1.2.8 G418抗性克隆的筛选 将细胞接种至24孔培养板中, 待细胞生长达70% 汇合左右, 换成不同浓度的G418 (Geneticin), 浓度范围: 由100到800  $\mu$ g/ml, 以50  $\mu$ g/ml 递增, 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 浓度下培养14天, 确定抑制细胞生长的G418的最小致死浓度。

1.2.9 转染细胞的筛选 按1:3比例传代, 换含G418浓度为350  $\mu$ g/ml (最小致死浓度)的细胞培养液, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内37 °C培养14天, 每3~5天更换培养液, 同时以正常培养的未转染组细胞作为对照。

1.2.10 克隆(细胞集落)的挑选及培养 用10  $\mu$ l 加样器吸取5  $\mu$ l 0.1% 胰蛋白酶吹吸10~15次使细胞脱壁, 将消化液连同克隆移入含有同样培养液的培养瓶中继续培养, 以获得稳定转染细胞系。

1.2.11 稳定转染细胞系的鉴定 收集稳定培养的细胞, 提取蛋白质, 用 his 蛋白抗体 Western 印迹检测细胞系中 *hbrp* 的表达情况。pcDNA3.1-myc-his 与 *hbrp* 重组后表达为融合蛋白, his 蛋白的表达代表 *hbrp* 的表达情况。

1.2.12 亚细胞定位 在荧光显微镜下观察实验组和对照组红色荧光分布情况, 将重组体 pDsRed1-N1/*hbrp*、空质粒 pDsRed1-N1 稳定转染和未转染的 HEK293 细胞, 在荧光倒置显微镜下观察, 以 558 nm 激发波长激发标本, 记录红色荧光信号所在各组细胞内分布。

1.2.13 PKC 活性测定 将重组体、空质粒稳定转染的细胞和未转染的细胞(10<sup>6</sup> 个)分别用冷 PBS 洗两次后, 加入裂解缓冲液(pH 7.4 的 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L 的 NaCl, 1%CHAPS, 100  $\mu$ g/ $\mu$ l PMSF, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 抑肽酶, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 亮肽酶), 超声波粉碎, 将裂解物以 12 000 g 离心 30 min, 各收集上清液 30  $\mu$ l, 分别加入 PKC 反应液 20  $\mu$ l (54 mmol  $\beta$ - 甘油磷酸盐, 14.5 mmol 对硝苯基磷酸盐, 24 mmol 吗啉代丙烷磺酸, pH 7.4, 14.5 mmol 氯化镁, 14.5 mmol 乙撑双四乙酸, 0.12 mmol 乙二胺四乙酸, 1 mmol 二硫苏糖醇, 2.4  $\mu$ mol 蛋白激酶 A 抑制剂, 75  $\mu$ mol 鱼藤酮, 10  $\mu$ mol 1-(5- 氯奈 -1- 磺酰)-1H- 六氢化 -1, 4- 二氮杂卓(ML-9), 5 g/L 肉豆蔻酸化的富含丙氨酸的 C 激酶底物 (MARCKS), 1.8 MBq/ml [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]三磷酸腺苷(166 MBq/mmol)。37 °C 水浴 30 min 后, 加入等量样品缓冲液终止反应, 15%SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后近行放射自显影, 凝胶分析系统读取 MARCKS 相应自显影带, 代表 PKC 的活性。

## 2 结果

### 2.1 PCR 琼脂糖电泳结果

以 pGEX-5X-1/*hbrp* 为模板, 5' 端引入 *Xho*I 酶切位点和起始密码, 3' 端引入 *Bam*HI 酶切位点, 扩增得到有 *Xho*I 和 *Bam*HI 接头的 *hbrp* 片段(图 1)。

### 2.2 pcDNA3.1-myc-his/*hbrp* 和 pDsRed1-N1/*hbrp* 重组体鉴定

图 2 为 pcDNA3.1-myc-his/*hbrp* 重组体经 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切后, 约 800 bp 处为 *hbrp*, 5 400 bp 处为 pcDNA3.1-myc-his 载体, 表明载体中含有正确的目的基因片段。

图 3 为 pDsRed1-N1/*hbrp* 重组体经 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切后, 约 800 bp 处为 *hbrp*, 4 700 bp 处为 pDsRed1-N1 载体, 表明载体中含有正确的目的基因片段。

### 2.3 稳定转染细胞系的鉴定结果

用 his 蛋白的抗体 Western 印迹检测细胞系中 *hbrp* 的

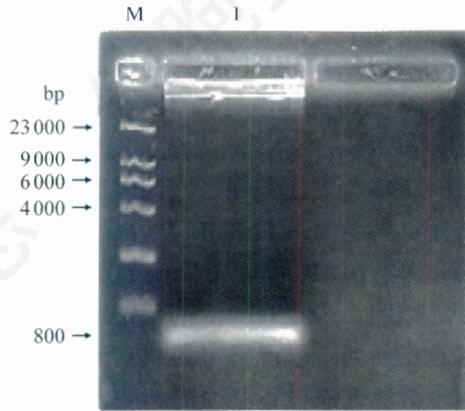


图1 经PCR扩增得到的含有XhoI和BamHI酶切位点的hbrp片断  
M: DNA marker; 1: hbrp的PCR产物。

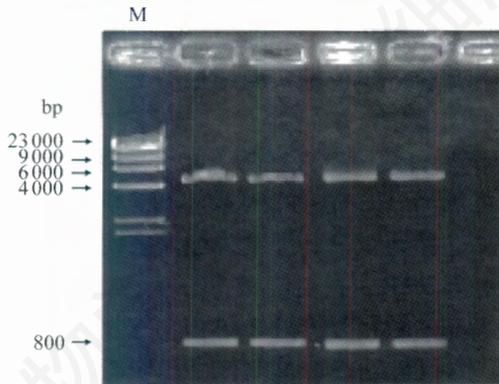


图2 hbrp与pcDNA3.1-myc-his载体连接后，酶切鉴定结果  
M: DNA marker; 约800 bp处为hbrp, 5400 bp处为pcDNA3.1-myc-his载体。

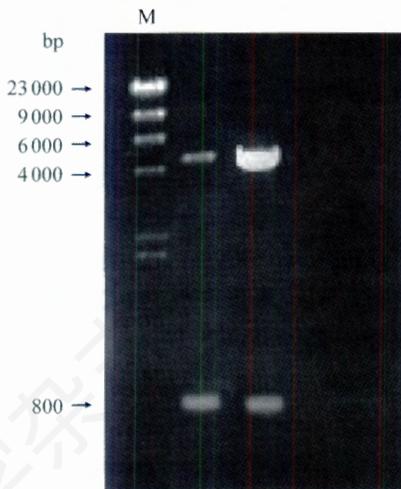


图3 hbrp与pDsRed1-N1载体连接后，酶切鉴定结果  
M: DNA marker; 约800 bp处为hbrp, 4700 bp处为pDsRed1-N1载体。

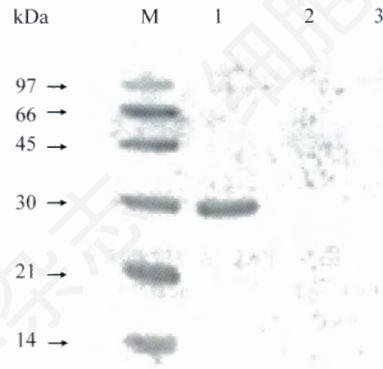


图4 Western印迹检测pcDNA3.1-myc-his/hbrp重组体表达结果  
M: marker; 1: pcDNA3.1-myc-his/hbrp转染组; 2: pcDNA3.1-myc-his转染组; 3: 未转染组。

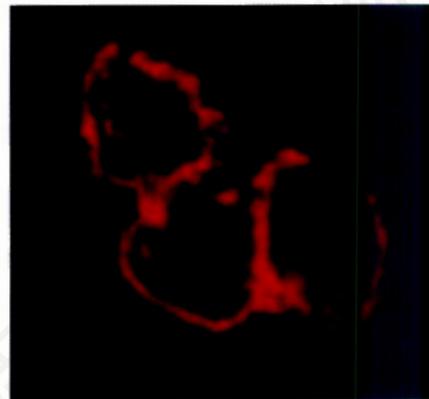


图5 HBRP的亚细胞定位  
pDsRed1-N1/hbrp转染细胞后，红色荧光信号主要在胞膜及胞浆近膜处表达。

表达情况，确定稳定表达细胞系的建立(图4)。泳道1为重组体转染组，pcDNA3.1-myc-his/hbrp重组后为融合蛋白，his的存在代表hbrp的表达情况，在28 kDa处可见一条带，说明hbrp在细胞中有表达，稳定转染细胞系建立；泳道2为空载体转染组，由于空载体的标签蛋白很小，因此泳道2没有明显条带显示；泳道3为未转染组，因而没有印迹的结果显示。

#### 2.4 亚细胞定位结果

在荧光倒置显微镜下，以558 nm激发波长激发标本，pDsRed1-N1/hbrp转染组细胞红色荧光信号主要分布在胞膜及胞浆近膜处(图5)。

#### 2.5 PKC活性检测结果

将pcDNA3.1-myc-his/hbrp转染的细胞、pcDNA3.1-myc-his空质粒转染细胞和未转染的对照

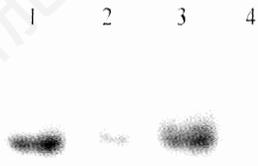


图6 PKC活性检测结果

1、3: 对照组PKC活性; 2、4: pcDNA3.1-myc-his/hbrp重组体转染细胞组PKC活性。

组细胞同时用放射自显影方法检测PKC活性, 结果如图6所示, 第2、4泳道中可见克隆细胞系中PKC活性明显低于第1、3泳道(对照组细胞)PKC的活性。表明重组蛋白质HBRP对PKC活性有一定的抑制作用。

### 3 讨论

我们一直从事PKC亚型在精子的分布、精子活动力与PKC活性之间的关系以及受精卵早期发育机制的研究。近期从牛精浆中纯化了一个PKC的抑制剂, 测序发现与BSP蛋白序列完全相同<sup>[1]</sup>。对BSP蛋白与PKC间关系的探讨, 发现BSP蛋白不仅能抑制PKC的活性, 还能抑制酪氨酸蛋白激酶(TPK)的活性<sup>[2]</sup>。而在人的生殖系统中与BSP蛋白功能相关的蛋白质未见报道。*hbrp*是最新发现的与BSP蛋白相关的人类新基因, 已经在GenBank注册, 登录号为AF279147<sup>[3]</sup>。

BSP蛋白是牛精浆中的主要蛋白质, 在牛精子发育、精子获能及顶体反应过程中具有多种生物学功能。BSP蛋白在由肝素或HDL/apoA-1诱导的精子获能过程中发挥重要的调控作用<sup>[4]</sup>。有关哺乳动物的生殖医学的研究还表明, 伴随着哺乳动物精子的获能, 精子胞膜上的胆固醇将发生流失。BSP蛋白还具有刺激牛精子胞膜上胆固醇迁移的功能<sup>[5]</sup>。在众多的可促进胆固醇迁移的主要生物成分中, BSP蛋白是关键的一种。BSP蛋白对PKC活性的抑制作用已经得到证明<sup>[2]</sup>。PKC不仅存在于多种动物及人精子尾部, 而且精子尾部至少存在有 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 三种PKC亚型; 精子尾部的PKC活性及含量也与精子的形态结构及其活动力变化密切相关<sup>[6]</sup>。在马等多种动物中已经发现了BSP同源蛋白质的存在, 而在人的生殖系统中未有报道。*hbrp*的发现与克隆填补了这一空白, 有关该基因的相关研究已经作了报道, 然而, 对于其表达蛋白HBRP的研究还刚刚

起步。

为进一步研究HBRP的功能, 确定HBRP的亚细胞定位及其生物学活性是必要和势在必行的。

首先根据HBRP的组织表达情况<sup>[3]</sup>, 选用人胚肾细胞HEK293为表达细胞系。同时利用报告基因技术, 选用红色荧光蛋白RFP表达载体pDsRed1-N1与*hbrp*构建pDsRed1-N1/*hbrp*重组体, 稳定转染HEK293细胞, 确定HBRP的亚细胞定位。报告基因技术是将任何一段已确定的顺式调控序列插入报告基因上游以控制报告基因的表达, 从而直观地报道宿主细胞内基因的表达调控及其相关信号转导通路的活动<sup>[7]</sup>。将pDsRed1-N1/*hbrp*转染细胞, 36h后荧光信号最强, 在荧光显微镜下观察, 荧光信号主要分布在胞膜及胞浆近胞膜处, 表明*hbrp*基因编码的蛋白质在细胞浆及细胞膜中存在, 从亚细胞水平确定*hbrp*编码了一种细胞浆内蛋白, 即没有确切的亚细胞定位。定位的实验结果与生物信息学预测的结果是一致的。

BSP蛋白结构中含有两个前后排列的纤连蛋白II型结构域<sup>[8]</sup>, HBRP的氨基酸序列分析发现其结构中含有4个纤连蛋白II型结构域, 表明该蛋白质可能是一种与BSP蛋白功能相关的精子结合蛋白。同源分析与之最相近的是BSP蛋白家族。BSP蛋白对PKC及TPK活性的抑制作用已明确。因此检测HBRP对PKC活性的影响, 从而验证HBRP的生物学活性。

细胞内PKC活性较低, 如HBRP对PKC活性有抑制作用, 会更增加PKC活性的检测难度。因此, 利用分子生物学手段, 构建pcDNA3.1-myc-his/*hbrp*重组体, 转染细胞, 建立稳定的高表达的细胞系; 应用放射自显影技术高效地测定HBRP对PKC活性的影响。结果表明HBRP明显地抑制PKC的活性, 从而确定HBRP是有生物学活性的蛋白质。

本实验仅仅是对HBRP的亚细胞定位以及对其生物学活性的初步探讨。说明HBRP是有生物功能的人类新的蛋白质, 这一新蛋白质对PKC活性的抑制机制及其在是否在精子获能、顶体反应、胆固醇外流等多方面有生物学功能, 还有待于更深入的研究。

### 参考文献 (References)

- [1] Yu BZ et al. *Biomedical Research*, 1995, **16**: 155
- [2] Yu BZ et al. *Cell Biochem Funct*, 2003, **21**: 183
- [3] 罗 阳等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, **18**: 191
- [4] Therien I et al. *Biol Reprod*, 1995, **52**: 1372

[5] Therien I *et al. Biol Reprod*, 1998, **59**: 768  
[6] 张 杰等。生殖与避孕, 2000, **20**: 172

[7] Schwechheimer C *et al. Plant Mol Biol*, 1998, **36**: 195  
[8] Salois D *et al. Biol Reprod*, 1999, **61**: 288

## Biological Activity and Subcellular Localization of HBRP

Jie Zhang, Ying Liu, Zhi-Hong Zong, Wen-Hui Su, Bing-Zhi Yu\*

(Department of Biochemistry and Molecule Biology, China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract** Two recombinant eukaryotic expression vectors, pDsRed1-N1/hbrp and pcDNA3.1-myc-his/hbrp, have been constructed and used to transfect HEK293 cell to form a stable expression cell line. The cellular localization and biological function of HBRP were investigated using fluorescence microscope and radioautography method, respectively. The experimental results showed that HBRP was a functional protein which localizes in the cellular membrane and cellular plasma near the membrane, and had a notable inhibitory effect on the PKC activity.

**Key words** HBRP; BSP protein; subcellular localization; PKC activity

Received: August 1, 2005 Accepted: November 17, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170987)

\*Corresponding author. Tel: 86-24-23256666-5299, Fax: 86-24-23261253