

重组人睾丸精子结合蛋白对人精子蛋白激酶 A 及蛋白激酶 C 活性的影响

宿文辉 王国丽 张杰 金博 冯晨 张哲 徐小燕 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 为探讨人睾丸精子结合蛋白(human testis sperm binding protein, hTSBP)促进人精子获能的分子机制, 检测了重组 hTSBP 对人精子蛋白激酶 A (PKA)和蛋白激酶 C (PKC)活性的影响。用重组载体 pcDNA3.1/myc-His(-)B-tsbp 转染真核细胞后, 金属亲和层析纯化表达的重组蛋白质 His6-TSBP; 重组蛋白质处理健康成人精子后, 分别提取精子胞浆及胞膜蛋白组分, 发现重组蛋白质可以与精子胞膜结合; 经放射自显影检测, 发现 0.1 mg/ml 重组蛋白质可以提高人精子中 PKA 的活性, 对精子膜 PKC 活性无显著影响。

关键词 人睾丸精子结合蛋白; 精子功能; 蛋白激酶 A; 蛋白激酶 C

本实验室在人睾丸组织中克隆了一个与牛精浆蛋白(bovine seminal plasma proteins, BSP)相关的精子结合蛋白新基因, 与 BSP 在结构上具有一定的相似性, 命名为人睾丸精子结合蛋白(human testis sperm binding protein, hTSBP)基因。在随后的研究中, 我们应用原位杂交将该基因定位于 19q1.3^[1], 并对该基因进行了真核表达^[2], 经亲和层析纯化, 发现纯化的重组 hTSBP 在体外可以促进人精子获能, 对精子的膜功能具有保护作用^[3], 并可以提高体外培养精子的运动率(未发表)。为了确定 hTSBP 影响精子功能的分子机制, 在本研究中我们用金属亲和层析纯化得到的重组 hTSBP 培养健康成人精子, 检测了重组 hTSBP 与人精子膜的结合情况, 并用放射自显影法分析了该重组蛋白质对人精子蛋白激酶 A (PKA)活性及精子膜蛋白激酶 C (PKC)活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜人精液标本由辽宁省计划生育科学研究院生殖医学重点实验室提供。重组质粒 pcDNA3.1/myc-His(-)B-tsbp 和 HEK293 细胞, 均由本室保存。E. coli JM109 感受态细胞、限制性内切酶 BamHI 及 XhoI、质粒 DNA 快速抽提纯化试剂盒、DNA 胶回收纯化试剂盒均购自 TaKaRa 公司。无内毒素超纯质粒纯化试剂盒购自 V-Genex 公司。琼脂糖、G418 购自 Promega 公司。LB 培养基、脂质体转染试剂 LipofectAMINE™2000、抗 His6 抗体、Ni²⁺-NTA 纯化系统购自 Invitrogen 公

司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、预染中分子量蛋白 marker、AP 或 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、DAB 试剂盒购自北京中杉。DMEM 高糖培养基为 HyClone 公司产品。FBS 购自 Gibco 公司。DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成。Percoll 密度梯度离心液购自 Pharmacia 公司。其他常用试剂均参照《分子克隆实验指南》^[4]配制。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体 pcDNA3.1/myc-His(-)B-tsbp 的鉴定 该重组载体为本实验室构建并保存, 在开展本实验前对其进行鉴定和纯化。将重组载体转化感受态 E. coli JM109, 用质粒提取试剂盒提取质粒, XhoI 和 BamHI 双酶切, 1.4% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。所提重组质粒送 TaKaRa 公司测序正确后, 进行下述实验。

1.2.2 重组 hTSBP 的真核表达、纯化及亲和层析纯化 具体方法见参考文献^[2]。即以克隆有 tsbp 全长 cDNA 序列的原核表达载体 pGEX-5X-1/tsbp 为模板, 用 PCR 扩增 tsbp, 并通过 DNA 重组构建真核表达载体 pcDNA3.1/myc-His(-)B/tsbp。以重组体稳定转染 HEK293 细胞后, 蛋白质免疫印迹检测 His6-hTSBP 融合蛋白的表达。选择高表达量的细胞克隆, 扩增并用 Ni²⁺-NTA 金属亲和层析柱(IMAC)从细胞裂解液中纯化融合蛋白 His6-hTSBP, 纯化产物的纯度用

收稿日期: 2008-05-12 接受日期: 2008-06-17

国家自然科学基金(No.30170987, No.30640002)和辽宁省博士启动基金(No.20051045)资助项目

* 通讯作者。Tel: 024-23256666-5477, E-mail: suwenhui616@hotmail.com

SDS-PAGE 和蛋白质印迹进行鉴定。

1.2.3 重组 TSBP 处理人精液样本 实验用精液样本来自于身体健康, 已证明有生育史的正常成年志愿者, 由辽宁省计划生育科学研究所生殖医学重点实验室提供, 其精液常规各项指标符合 WHO 规定的正常精液常规标准^[5]。精液液化后用 Percoll 密度梯度离心法优选精子, Percoll 法的具体操作如下: 在锥形离心管底加入 1.5 ml 的 80% Percoll 液, 在其上小心地加入 2 ml 55% Percoll 液, 将 2 ml 精液放到 Percoll 梯度管的上层, 300 r/min 离心 20 min, 将沉积物用 BWW 液连续悬浮并离心 2 次, 每次 10 min, 最后将离心沉积物加入 BWW 液, 精子密度均调整至 2×10^7 个/ml。BWW 培养液配制参照 Biggers 的方法^[6]。

将 0.5 ml 超滤浓缩的纯化重组蛋白质 His6-hTSBP 加入至 0.5 ml 精子培养液中(使重组蛋白质浓度为 0.1 mg/ml), 于 37 °C、5% CO₂ 条件下温育 1 h 或 3 h; 对照组精子不用重组蛋白质处理, 同条件培养。

1.2.4 精子膜蛋白的提取及 Western 印迹分析 取处理后精子培养液 1 ml 用缓冲液 A (100 mmol/L EDTA, 100 mmol/L EGTA, 1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 8.558 g 蔗糖)洗 3 次, 2 000 r/min 离心 10 min。将精子超声粉碎 20 s, 间隔 20 s 重复 5 次, 4 °C 100 000 g 离心 60 min, 沉淀物用缓冲液 B (含 1% Triton-100 的缓冲液 A)悬起, 充分混匀, 超声粉碎 20 s, 间隔 20 s 重复 2 次, 4 °C 过夜, 4 °C 100 000 r/min 离心 60 min, 取上清液为膜组分。

Western 印迹检测 His6-hTSBP 与精子膜的结合情况, 具体操作方法: 将各组培养精子分别用冷 PBS 洗 2 次后, 加入裂解缓冲液(pH 7.4 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% CHAPS, 100 µg/µl PMSF, 1 µg/µl 抑蛋白酶肽, 1 µg/µl 亮抑酶肽), 超声破碎后, 将裂解物以 15 000 r/min 离心 1 h, 收集上清液, 加入 SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 5 min。取 20 µl 经 10% SDS-PAGE 胶分离后, 电转印到硝酸纤维素薄膜上, 转印膜在 10% 脱脂奶粉中封闭 1 h, 抗 His6 抗体(1 : 5 000) 4 °C 温育过夜后, 再用 HRP 标记的二抗温育 2 h (1 : 2 000), 用 DAB 显色试剂盒检测目的蛋白对应的特异性条带。

1.2.5 放射自显影测定精子胞浆中 PKA 活性 将处理后及对照组的精子样本各 20 µl, 分别用冷 PBS 洗两次后, 加入裂解缓冲液, 将裂解物以 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液。测定蛋白质浓度, 加入裂解液使各组总蛋白浓度一致后各取 5 µl, 分别加入 20 µl PKA 反应液。PKA 反应液组成: 54 mmol/L β- 甘油

磷酸盐, 14.5 mmol/L 对硝基苯磷酸盐, 24 mmol/L 吗啉代丙烷磺酸(MOPS), pH 7.2, 14.5 mmol/L 氯化镁, 14.5 mmol/L 乙撑双四乙酸, 0.12 mmol/L 乙二醇四乙酸, 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 75 µmol/L 酪氨酸蛋白酶抑制剂, 10 µmol/L 1-(5- 氯萘 -1- 磺酰)-1H- 六氢化 -1, 4- 二氮杂卓(ML-9), 1 g/L 肯普肽(PKA 底物), 1 mg/L 下述蛋白酶抑制剂: 亮肽素、抑肽酶、胃酶抑素、抑糜蛋白酶、胰蛋白酶 - 胰凝乳蛋白酶抑制剂, 50 µCi/ml [γ -³²P]ATP。37 °C 水浴 30 min 后, 加入等量样品缓冲液终止反应, 12% SDS-PAGE 将肯普肽分离出来, 晾干后放射自显影, 凝胶分析系统读取肯普肽相应自显影带, 代表 PKA 的活性。*t* 检验比较各处理组与对照组灰度值均值。

1.2.6 放射自显影测定精子膜组分中 PKC 活性 提取各组精子膜蛋白, 方法如前述, 测定 PKC 活性。方法同 PKA 的活性测定, 将底物肯普肽替换为 MARCKS (豆蔻酰化的富含丙氨酸的 PKC 特异性底物)。

2 结果

2.1 重组表达载体 pcDNA3.1/myc-His(-)B-tsbp 的双酶切鉴定

由本实验室保存的 pcDNA3.1/myc-His(-)B-tsbp 重组质粒扩增后经 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切, 1.4% 琼脂糖凝胶电泳显示 5.5 kb 的载体片段和 750 bp 的目的基因片段, 与预期大小相符(图 1)。DNA 测序显示插入片段序列正确, 无移码和突变。

2.2 His6-hTSBP 融合蛋白的真核表达及纯化

以抗 His6 抗体检测带有 His6 标签的 TSBP 融合蛋白。结果表明, 用 pcDNA3.1/myc-His(-)B-tsbp 质粒转染 HEK293 细胞后, 于培养细胞裂解物中检测到 30 kDa 融合蛋白的表达, 而未转染及空载体转染细胞中均为阴性(图 2)。

通过金属亲和层析柱纯化表达的 His6-hTSBP 融合蛋白, 随着洗脱缓冲液 pH 的下降, Ni²⁺-NTA 的亲合力降低, His6-hTSBP 融合蛋白被洗脱下来。pH 4.5 的缓冲液可将大部分融合蛋白洗脱下来。将上样液、流出液和洗脱液分别汇集, 进行 SDS-PAGE 分析的结果如图 3 所示。从图中可见, 除 30 kDa 的目的蛋白条带外, 洗脱液中尚存在几条杂蛋白带。Western 印迹结果显示, 洗脱液中可见预期大小的目的条带, 但通过超滤浓缩, 目的蛋白逐步得到富集(图 4)。Lowry 法测定浓缩的纯化重组蛋白质浓度为 0.206 mg/ml。

2.3 重组 hTSBP 与精子膜的结合

Western 印迹结果表明, 重组 His6-hTSBP 处理 1 h 或 3 h 后, 精子细胞膜上均有不等量的大小为 30 kDa 的 His6 融合蛋白结合, 而对照组则无(图 5), 即重组 His6-hTSBP 在体外可以与人精子细胞膜结合。

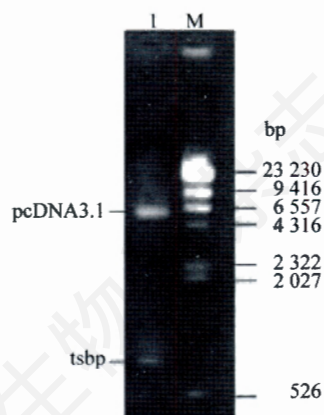


图 1 真核表达载体 pcDNA3.1/myc-His(-)B-tsbp 的双酶切鉴定
1: pcDNA3.1/myc-His(-)B-tsbp *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切产物; M: λ DNA/*Hind*III marker。



图 2 His6-hTSBP 融合蛋白在 HEK293 细胞中的 Western 印迹分析

1: 未转染 HEK293 细胞; 2: 空载体转染 HEK293 细胞; 3: 重组载体转染 HEK293 细胞; M: marker。

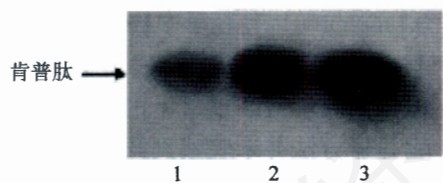


图 6 重组 hTSBP 对人精子 PKA 活性的影响

1: 空白对照组; 2: 重组 hTSBP 处理 1 h 组; 3: 重组 hTSBP 处理 3 h 组; 与空白对照组相比, $*P < 0.01$ 。

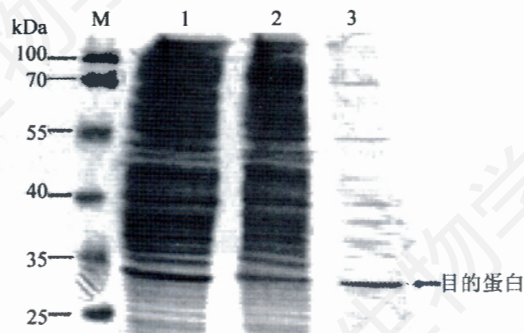


图 3 12% SDS-PAGE 分析 His6-hTSBP 融合蛋白金属亲和层析纯化效果

M: marker; 1: 上样液; 2: 亲和层析流出液; 3: 亲和层析洗脱液。

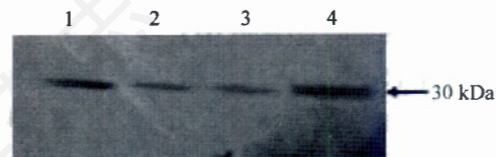


图 4 Western 印迹分析 His6-hTSBP 融合蛋白金属亲和层析纯化效果

1: 上样液; 2: 亲和层析流出液; 3: 亲和层析洗脱液; 4: 超滤浓缩液。

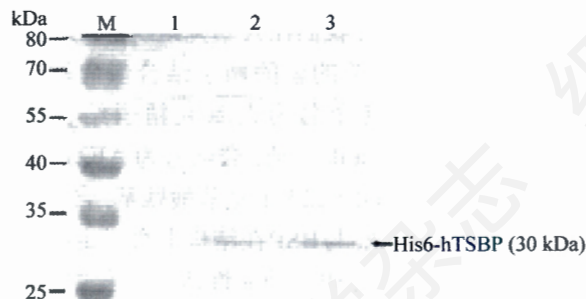
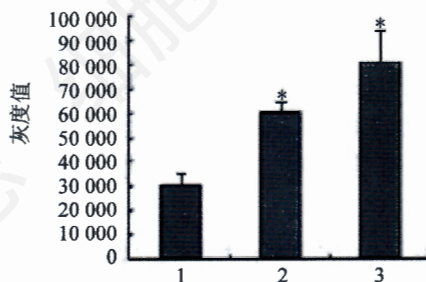


图 5 Western 印迹分析 His6-hTSBP 与人精子膜的结合

M: marker; 1: 无 His6-hTSBP 培养精子; 2: 纯化 His6-hTSBP 培养 1 h 精子; 3: 纯化 His6-hTSBP 培养 3 h 精子。



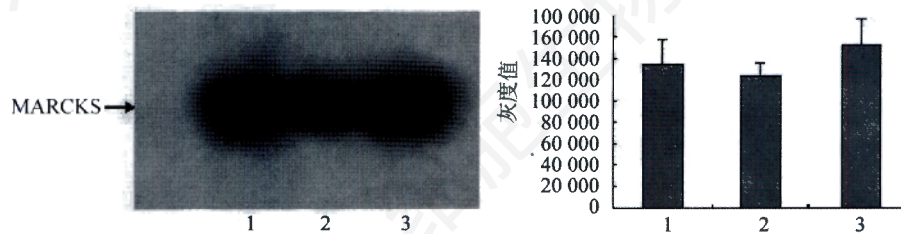


图7 重组hTSBP对人精子PKC活性的影响

1: 空白对照组; 2: 重组hTSBP处理1 h组; 3: 重组hTSBP处理3 h组。

2.4 重组hTSBP对人精子PKA活性的影响

PKA的活性测定结果表明(图6), 重组hTSBP (0.1 mg/ml) 1 h及3 h处理组精子的PKA活性与对照组相比均增加明显($P < 0.01$)。

2.5 重组hTSBP对人精子膜PKC活性的影响

PKC的活性测定结果表明(图7), 重组hTSBP (0.1 mg/ml) 1 h及3 h处理组精子膜的PKC活性与对照组相比均无显著差异。

3 讨论

在研究牛精浆蛋白及其相关蛋白在受精卵发育过程中的重要作用时, 我们在人睾丸组织中发现并克隆了一个与BSP相关的新的精子结合蛋白基因的cDNA序列, 将其命名为人睾丸精子结合蛋白(hTSBP), 并在GenBank注册, 登陆号为AF279147。其开放阅读框架共编码223个氨基酸残基, 含有4个纤连蛋白II型结构域, 与BSP在结构上有一定的相似性。在对hTSBP进行初步功能性研究过程中, 我们利用分子生物学手段, 检测到在hTSBP高表达的细胞系中, PKC活性与对照组相比明显降低, 表明hTSBP对PKC的活性有一定的抑制作用^[7]。BSP所具有的II型结构特点, 使其可与精子表面的磷脂结合, 促进肝素和HDL诱发的牛附睾精子获能^[8], 为了深入研究hTSBP在相关方面的生物学功能, 我们在前期的研究中应用基因重组的方法在人胚肾细胞系中表达了hTSBP并进行了亲和层析纯化^[2]。在获得纯化的重组蛋白质后, 我们发现重组hTSBP可以促进人精子的获能并改善膜功能, 提高人精子的受精能力^[3]和体外培养的运动率。

精子跨膜细胞信号转导与精子的活力密切相关, 不同的细胞信号通过细胞信号转导通道引起精子鞭毛蛋白的磷酸化或去磷酸化来调节精子的活力^[9]。在多种哺乳动物精子实验中, cAMP类似物、AC激

动剂及PKA激动剂都能刺激并提高精子的活力, 但cAMP/PKA信号通路产生这种作用的分子基础仍不十分清楚, 目前可以肯定这种刺激作用与精子鞭毛中的蛋白质磷酸化有关^[10]。胞外刺激信号与精子表面受体结合后, 通过GTP结合蛋白(G蛋白)传递给腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)使其活化。当AC被激活时, 水解三磷酸腺苷(ATP)产生cAMP, 后者通过激活PKA使鞭毛蛋白磷酸化, 这一过程对维持精子活力十分重要^[11]。PKA能激活位于顶体外膜的电压依赖性钙通道, 使顶体内部的 Ca^{2+} 释放至胞质中, 引起一次相对较弱的胞内 Ca^{2+} 浓度的上升。 Ca^{2+} 浓度上升使PKC从胞质转移到膜上, 成为“待激状态”, 与膜磷脂的水解产物DG结合后被激活。激活的PKC使一种位于质膜上的电压依赖型 Ca^{2+} 通道开放, 从而导致胞质中第二次较大幅度的 Ca^{2+} 浓度上升^[12]。胞质 Ca^{2+} 浓度及pH的升高导致膜溶解, 从而发生顶体反应^[13]。

本研究首先检测了重组hTSBP与人精子之间的结合作用。用纯化的重组hTSBP培养人精子后提取精子膜蛋白, Western印迹后经DAB显色, 除了检测到重组hTSBP与精子膜的结合, 还在60 kDa左右存在一条杂蛋白带, 这可能是由于精子培养液上清液中含有组氨酸、谷氨酰胺以及牛血清成分, 可以与抗His6抗体发生非特异反应(图5)。此外, 本研究还检测了重组hTSBP对人精子PKA及PKC活性的影响。在对精子的激酶活性测定结果表明, 重组hTSBP在0.1 mg/ml可以使精子中PKA的活性有所提高(图6), 这与在tsbp基因转染细胞系中检测到的结果相一致^[14]; 但本研所得的重组蛋白质在0.1 mg/ml时通过放射自显影方法并未观察到其对精子膜PKC活性的影响(图7)。此外, 重组hTSBP是否通过PKA对精子受精能力产生影响还需要进一步证实。值得注意的是, 本研所得的融合蛋白的浓度及作用环境与该蛋白

质的生理状态有一定差别,要进一步确定其生物学功能,还需要获得从组织中纯化的蛋白质。目前,我们正在制作该新基因编码蛋白的抗体,用以对其功能进行更深入的研究。

参考文献(References)

- [1] 张 杰等. 实验生物学报, 2005, 38: 177
- [2] 宿文辉等. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22: 553
- [3] 宿文辉等. 生殖与避孕, 2007, 27: 334
- [4] 萨姆布鲁克等著, 黄培堂等译. 分子克隆实验指南, 北京: 科学出版社, 2002
- [5] 世界卫生组织编, 谷翊群等译. 人类精液及精子-宫颈粘液相互作用实验室检验手册, 北京: 人民卫生出版社, 2001, 61
- [6] Biggers JD *et al.* In: Daniel JC (ed.) *Methods in Mammalian Embryology*, San Francisco: Freeman and Co, 1971, 66
- [7] 张 杰等. 中国生物工程杂志, 2004, 24: 52
- [8] Therien I *et al.* *Biol Reprod*, 1997, 57: 1080
- [9] Guraya SS. *Int Rev Cytol*, 2000, 199: 1
- [10] Dinkins MB *et al.* *Zygote*, 2000, 8: 245
- [11] Miki K *et al.* *J Biol Chem*, 1998, 273: 34384
- [12] Patrat C *et al.* *Biol Cell*, 2000, 92: 255
- [13] Breitbart H *et al.* *Mol Hum Reprod*, 1997, 3: 195
- [14] 宿文辉等. 生物医学工程杂志, 2007, 24: 1334

Effect of Recombinant hTSBP on Activity of PKA and PKC in Human Sperm

Wen-Hui Su, Guo-Li Wang, Jie Zhang, Bo Jin, Chen Feng, Zhe Zhang, Xiao-Yan Xu, Bing-Zhi Yu*

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

Abstract To investigate the molecular mechanism of promotion of human sperm capacitation by human testis sperm binding protein (hTSBP), the effects of hTSBP on activity of protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) in human sperm were detected. Recombinant plasmid pcDNA3.1/myc-His(-)B-tsbp was used to transfect HEK293 cell and recombinant protein His6-hTSBP was expressed and purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC); Human sperm from healthy volunteer was treated with the recombinant protein, then the plasma protein and the membrane protein were extracted respectively. His6-hTSBP was found to combine to human sperm membrane *in vitro*. The result of autoradiography showed that 0.1 mg/ml His6-hTSBP could increase the activity of PKA in human sperm plasma, but had no significant effect on the activity of PKC in sperm membrane.

Key words human testis sperm binding protein; sperm function; protein kinase A; protein kinase C

Received: May 12, 2008 Accepted: June 17, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170987, No.30640002) and the Doctor Starting Foundation of Liaoning Province (No.20051045)

*Corresponding author. Tel: 86-24-23256666-5477, E-mail: suwenhui616@hotmail.com