

网络出版时间:2012-12-21 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20121221.1728.008.html>

低温和获能对猪精子细胞骨架微管蛋白和肌动蛋白表达量的影响

吴俊波, 杨璐茜, 曹立朋, 田 宇, 杜宁宁, 金 一

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

【摘 要】 【目的】探究获能和低温冷冻对猪精子细胞骨架中微管蛋白和肌动蛋白表达量的影响。【方法】利用 SDS-PAGE、Western blot 技术, 分析获能和低温冷冻(−80 和 −196 °C)后猪精子总蛋白质种类以及猪精子细胞骨架微管蛋白和肌动蛋白表达量的变化。【结果】低温处理后, 猪精子总蛋白质的种类与新鲜精子相比发生变化, 而获能处理后几乎没有差异。低温冷冻导致猪精子细胞骨架微管蛋白和肌动蛋白的表达量较新鲜精子下降, 且 −196 °C 冷冻组肌动蛋白的表达量要略高于 −80 °C 冷冻组, 但二者微管蛋白的表达量基本没有差异。获能处理后猪精子肌动蛋白表达量略有下降, 而微管蛋白表达量基本没有变化。【结论】低温冷冻处理对猪精子总蛋白质的种类以及猪精子细胞骨架微管蛋白和肌动蛋白的表达量有明显影响, 而获能处理则影响较小。

【关键词】 猪精子; 获能; 低温; SDS-PAGE; Western blot

【中图分类号】 S828.3⁺4

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)01-0009-04

Effects of capacitation and low temperature on expression of tubulin and actin in boar sperm

WU Jun-bo, YANG Lu-xi, CAO Li-peng, TIAN Yu, DU Ning-ning, JIN Yi

(College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to examine the effects of capacitation and low temperature on expression of tubulin and actin in boar sperm. 【Method】 Changes of tubulin and actin expression and types of total sperm protein were analyzed by SDS-PAGE and Western bolt after capacitation and low temperature treatments were conducted in this experiment. 【Result】 Types of total sperm proteins changed significantly after treatment of low temperature, while capacitation did not change the proteins. The expression level of cytoskeletal tubulin and actin decreased after treatment of low temperature. Expression of tubulin after being frozen in −196 °C was higher than being frozen in −80 °C, while expression of tubulin was almost same at these two temperatures. 【Conclusion】 Low temperature treatments affect significantly the types of total sperm proteins and expression of cytoskeletal tubulin and actin, but effects of capacitation are neglectable.

Key words: boar sperm; capacitaion; low temperature; SDS-PAGE; Western blot

随着人工授精技术在现代养猪业中的普遍应用, 人们对猪精液冷冻保存技术的研究也取得了一定成果。但猪精子低温冷冻保存后受精能力仍然明

显下降, 导致人工授精的受胎率一直很低^[1], 造成这种结果的原因是精子遭受“获能样”损伤。研究发现, 低温保存后的精子头部与获能精子头部的外观

【收稿日期】 2012-05-07

【基金项目】 吉林省自然科学基金项目(201115229)

【作者简介】 吴俊波(1987—), 男, 吉林辽源人, 在读硕士, 主要从事动物繁殖生物技术研究。

【通信作者】 金 一(1967—), 男, 吉林延边人, 教授, 硕士生导师, 主要从事动物繁殖生物技术研究。E-mail: yijin@ybu.edu.cn

相似,不仅顶体顶部质膜完整性被破坏,还伴随着细胞骨架不同程度的位置迁移^[2-3]。细胞骨架是指存在于真核细胞中的蛋白纤维网架结构,是细胞连接的结构基础,其主要成分为微管、微丝和大小介于两者之间的中间纤维^[4]。微管是由微管蛋白组装形成的直径约为 24 nm 的管状结构;微丝,又称为肌动蛋白纤维,直径约为 7 nm,是由肌动蛋白构成的丝状结构。细胞骨架与细胞遗传物质的复制、传递、遗传信息的表达有密切联系^[5]。近年来,利用荧光免疫染色技术对不同哺乳动物精子获能和顶体反应后细胞骨架重分布定位的研究较多,但对精子冻融后细胞骨架表达量的变化及精子内蛋白质种类变化的研究较少。本试验采用 SDS-PAGE 凝胶电泳及 Western blot 免疫印迹技术,对猪精子冻融后蛋白质种类变化及细胞骨架主要成分微管蛋白和肌动蛋白表达量变化进行了研究,以期从分子生物学和细胞骨架角度探索精子冷冻损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 猪精液 猪精液由吉林延吉市韩吉牧业有限公司提供,采自成年健康、性欲旺盛的杜洛克公猪。镜检精子活力大于 80%者方可用于试验。

1.1.2 主要试剂与仪器 本试验所用试剂除特殊说明外,均购自 sigm 公司;SDS、过硫酸胺购于华美生物有限公司;DAB 底物显色液购自中杉金桥试剂公司;PVDF 膜购自 pall 公司;标准蛋白 Marker 购于 Fermentas 公司;垂直电泳槽、电泳仪及转膜仪购自北京六一仪器公司。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质提取 分别取等量的猪新鲜精子、获能精子以及冻融精子(冷冻温度分别为-80,-196℃),加入等体积的细胞裂解液 tris-triton buffer (10 mmol/L tris (pH 7.4),100 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L EGTA,体积分数 1% Triton100,体积分数 10%甘油,1 g/L SDS,5 g/L 脱氧胆酸盐)。于 4℃摇床上振荡 20 min,然后于 4℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液待用。

1.2.2 SDS-PAGE 凝胶电泳 对上述提取的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。SDS-PAGE 电泳采用 Laemmli 电泳体系^[6],浓缩胶质量浓度为 50 g/L,分离胶质量浓度为 50 g/L,在恒压下(浓缩胶 80 V,分离胶 120 V)进行电泳,待指示染料移到凝胶板下口 1 cm 左右时停止。取下凝胶后放入考马斯亮蓝染色

液中染色,在摇床上染色 1 h 后放入脱色液中脱色至蛋白条带清晰。

1.2.3 Western blot 蛋白质免疫印迹 将预先裁好与胶片大小相等的 Whatman 滤纸在转膜液(48 mmol/L Tris、39 mmol/L 甘氨酸、0.37 g/L SDS、200 mL/L 甲醇)中浸泡 30 min;将 PVDF 膜在甲醇中活化 10 min 后,转入转膜液中平衡。将上述 SDS-PAGE 电泳结束后未染色的凝胶放入转膜缓冲液中平衡 15 min,依次将 3 层 Whatman 滤纸、凝胶、PVDF 膜、3 层 Whatman 滤纸按顺序铺入半干石墨半干转膜仪中,每铺一层用玻璃棒赶净气泡。铺好后接通转膜仪电源,恒流转印 45 min。转印结束后在摇床上用 TBS 洗膜 3 次,每次 5 min,然后加入封闭液室温封闭 2 h;再次用 TBS 洗膜 3 次,每次 5 min,洗膜后加入稀释好的一抗(anti-actin, A2668;anti-α-tubulin, T9026),4℃过夜,洗膜(方法同上),加入 HRP 酶标二抗(anti-rabbit IgG peroxidase conjugate A0545; anti-mouse IgG peroxidase conjugate, A0168),室温孵育 2 h,再次洗膜(方法同上),加入底物显色液 DAB 显色。

2 结果与分析

2.1 低温和获能对猪精子总蛋白质种类的影响

对猪新鲜精子、获能精子以及-80 和-196℃冷冻精子的蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果见图 1。

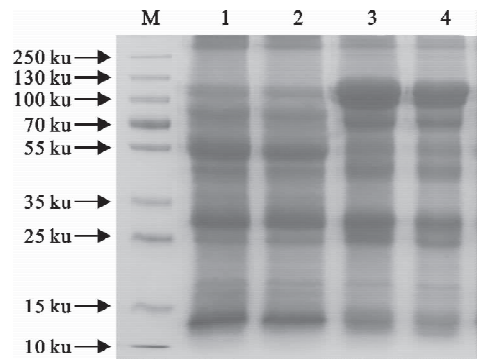


图 1 低温和获能对猪精子总蛋白质种类影响的 SDS-PAGE 电泳结果

M. 标准蛋白 Marker;1. 新鲜精子;2. 获能精子;
3. -80℃冷冻精子;4. -196℃冷冻精子

Fig. 1 SDS-PAGE results of effects of low temperature and capacitation treatments on types of total sperm proteins in boar sperm

M. Molecular weight Marker;1. Fresh semen;
2. Capacitation semen;3. Semen frozen in -80℃;
4. Semen frozen in -196℃

由图 1 可以看出,获能后精子样本的蛋白质种类与新鲜精子样本基本一致,而冷冻精子样本蛋白质种类与新鲜精子样本相比发生了变化。

2.2 低温和获能对猪精子细胞骨架微管蛋白和肌动蛋白表达量的影响

由图 2 可知,与新鲜精子相比,猪精子获能后微管蛋白的表达量基本不受影响,而冻融(−80 和 −196 ℃)后略有下降,不同温度冷冻处理(−80 和 −196 ℃)精子间的差异不明显;冻融后猪精子的肌动蛋白表达量均明显下降,且 −80 ℃冷冻精子肌动蛋白表达量降幅更大,这表明 −196 ℃的冷冻效果要优于 −80 ℃。获能后猪精子肌动蛋白的表达量与新鲜精子相比略有下降。

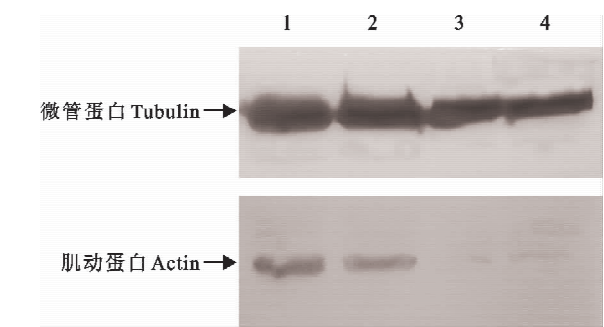


图 2 低温和获能对猪精子细胞骨架微管蛋白和肌动蛋白表达量影响的 Western blot 免疫印迹结果
M. 标准蛋白 Marker;1. 新鲜精子;2. 获能精子;
3. −80 ℃冷冻精子;4. −196 ℃冷冻精子

Fig. 2 Western blot results of effects of low temperature and capacitation treatments on cytoskeletal tubulin and actin in boar sperm
M. Molecular weight Marker;1. Fresh semen;
2. Capacitation semen;3. Semen frozen in −80 ℃;
4. Semen frozen in −196 ℃

3 讨 论

细胞骨架是细胞中一种呈纤维状的结构,不仅能使细胞保持一定的形态^[7],而且可形成纤毛和鞭毛等细胞器官,参与细胞的移动、细胞分裂、物质运输等多种细胞功能过程;此外其对细胞膜分子的移动也有重要作用^[8]。细胞骨架主要成分为微管蛋白和肌动蛋白,其分子质量分别为 55 和 42 ku^[9]。

本试验主要探究低温冷冻和获能处理对猪精子细胞骨架微管蛋白和肌动蛋白表达量的影响,通过蛋白质免疫印迹来分析微管蛋白和肌动蛋白对低温冷冻的敏感性,结果发现,新鲜精子和获能精子细胞骨架微管蛋白样品的条带基本相似,但经过 −80 和

−196 ℃低温冷冻后,猪精子微管蛋白的表达量略有下降。目前,对冷冻损伤精子的研究表明,在冷冻过程中,精子细胞内外的自由水和结合水会形成冰晶,对精子细胞造成机械性损伤。微管蛋白的作用主要是构成细胞内的骨架系统,对精子细胞起到支撑和固定等作用^[10],冰晶所引起机械损伤可能直接作用于细胞骨架微管蛋白,导致其断裂或者降解。微管蛋白是纺锤体的主要组成元件。Liu 等^[11]的报道指出,猪 M II 期卵母细胞在 24 ℃维持 5 min,纺锤体即开始解聚;当温度降至 4 ℃时,其解聚速度加快,复温后纺锤体恢复程度很有限。冷冻导致纺锤体结构破坏的原因,可能是这些因素诱导了微管蛋白解聚,破坏了正常的微管结构^[12]。另外,微管蛋白还参与物质运输,冻融后微管蛋白表达量的降低或断裂可能会导致物质运输障碍,使精子寿命缩短,导致冻融后猪精子的存活率下降甚至大量死亡。

肌动蛋白分为 G-肌动蛋白(G-actin)和 F-肌动蛋白(F-actin),在正常的生理状态下,F-actin 与 G-actin 之间的聚合与解聚是一个动态的过程,该动态过程会影响 ATP 水解释放能量以及细胞质运动、细胞内运输和肌肉运动等生理过程^[13]。肌动蛋白的位置暗示其可能参与了受精前的一些重要反应。韩明铭等^[13]的研究结果显示,获能后猪精子细胞骨架中肌动蛋白的表达量下降,与本试验的结果相同,但本试验中并未出现相对分子质量为 86 的肌动蛋白亚体,具体原因仍需进一步研究。肌动蛋白在获能前的降解可能导致精子获能障碍而不能正常获能或发生顶体反应,导致冷冻精子的受精能力下降。

本试验中,2 种低温冷冻后,精子肌动蛋白的表达量均明显下降,表明猪精子肌动蛋白对低温冷冻较为敏感,导致其大量降解;而 −196 ℃冷冻组肌动蛋白的表达量要略高于 −80 ℃冷冻组,这表明 −196 ℃的冷冻效果要好于 −80 ℃,造成这种差异的根本原因还有待进一步的研究解决。目前研究显示,低温使胞内钙离子浓度增高,Ca²⁺ 依赖性蛋白酶活化磷酸化微管相关蛋白(MAP)失去结合微管的能力,微管聚合减弱,处于不稳定状态^[14]。肌动蛋白染色后显示,低温会使染色体呈扩散和凝聚两极现象,纺锤体结构改变,继而使细胞骨架出现溃裂,形成了细胞表面泡,表面泡通过扩张、破裂,使细胞骨架向着不可逆的损伤发生转化^[15]。另有研究表明,利用细胞松弛素 B (cytochalasin B)处理猪或

牛卵细胞后,会使卵细胞在低温下对低张溶液的耐受性提高,玻璃化保存效果增强^[16]。其机制可能是细胞松弛素 B 结合于肌动蛋白丝的一端,阻止肌动蛋白丝聚合,从而抑制肌动蛋白骨架的形成。这证明,低温保存对细胞内部的细胞骨架系统不利,原因可能是细胞膜处的微丝被固定,细胞的顺应性受到一定限制,无法承受渗透压的变化,使其运动和形状变化受限,造成冷冻损伤。

4 结 论

猪精子冻融后,蛋白质种类和表达量都发生了变化。其中,猪精子细胞骨架肌动蛋白的表达量与新鲜精子相比明显下降,−196 ℃ 冷冻猪精子肌动蛋白的表达量略高于−80 ℃ 冷冻精子;微管蛋白的表达量略有下降;两组冷冻处理间蛋白表达量差异不明显。获能处理后猪精子细胞骨架肌动蛋白的表达量与新鲜精子相比略有下降,但微管蛋白的表达量几乎没有发生变化。

[参考文献]

- [1] 朱士恩. 猪精液冷冻技术研究 [J]. 猪业科学, 2007, 24(5): 44-47.
Zhu S E. Boar sperm freezing technology [J]. Swine Industry Science, 2007, 24(5): 44-47. (in Chinese)
- [2] Chen C K, Wang C W, Tsai W J, et al. Evaluation of meiotic spindles in thawed oocytes after vitrification using polarized light microscopy [J]. FertiSteril, 2004, 82(3): 666-672.
- [3] Kim N H, Day B N, Lee H T, et al. Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation and fertilization in the porcine oocyte [J]. Zygote, 1996, 4(2): 145-149.
- [4] 熊培颖, 高黄生. 细胞骨架与力信号传导 [J]. 国外医学口腔医学分册, 2005, 32(2): 120-122.
Xiong P Y, Gao H S. Cytoskeleton and force signal transduction [J]. Foreign Medical Sciences, 2005, 33(2): 120-122. (in Chinese)
- [5] 袁韦军. 细胞骨架的基本成分与功能 [J]. 生物学教学, 2006, 32(4): 5-8.
Yuan W J. The basic components and functions of the cytoskeleton [J]. Biology Teaching, 2006, 32(4): 5-8. (in Chinese)
- [6] 夏其昌. 蛋白质电泳技术指南 [M]. 北京: 化学工业出版社,

2007.

Xia Q C. Protein electrophoresis technical guide [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007. (in Chinese)

- [7] Frixione E. Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton [J]. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2000, 46(2): 73-94.
- [8] 金伯泉. 细胞和分子免疫学 [M]. 北京: 科技出版社, 2007: 388-391.
Jin B Q. Cellular and molecular immunology [M]. Beijing: Science and Technology Press, 2007: 388-391. (in Chinese)
- [9] Katerina D, Harry D M, Natasa Sebkova, et al. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization [J]. Reproduction, 2005, 130(3): 61-69.
- [10] Dvorakova K, Palecek J, Peknicova J. Changes in immuno-cytochemical localization of cytoskeletal proteins in boar spermatozoa after the AR induced by specific cytoskeletal inhibitors [J]. Folia Biologica, 2001, 47(2): 18-27.
- [11] Liu R H, Sun Q Y, Li Y H, et al. Effects of cooling on meiotic spindle structure and chromosome alignment within *in vitro* matured porcine oocytes [J]. Molecular Reproduction and Development, 2003, 65(1): 212-218.
- [12] 武彩红, 芮 荣, 戴建军, 等. 猪卵母细胞玻璃化冷冻后细胞骨架的变化 [J]. 动物学研究, 2006, 27(4): 382-389.
Wu C H, Rui R, Dai J J, et al. Changes of the cytoskeleton in cell vitrification of pig oocytes [J]. Zoological Research, 2006, 27(4): 382-389. (in Chinese)
- [13] 韩明铭, 金 一, 方南洙, 等. 获能和冻融猪精子间细胞肌动蛋白表达的差异 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 37(11): 47-50.
Han M M, Jin Y, Fang N Z, et al. Difference between capacitation and frozen-thawed cell actin expression in boar sperm [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2007, 37(11): 47-50. (in Chinese)
- [14] Cabello-Agueros J F, Hernandez-Gonzalez E O, Mujica A. The role of F-actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction [J]. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2003, 56(2): 94-108.
- [15] Rogers B J, Bastias C, Coulson R L, et al. Cytochalasin D inhibits penetration of hamster eggs by guinea pig and human spermatozoa [J]. Journal of Andrology, 1989, 10(4): 275-282.
- [16] Brenner E, Rubinstein S, Cohen G, et al. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction [J]. Biology of Reproduction, 2003, 68(4): 837-845.