获能和冻融猪精子间细胞肌动蛋白 表达的差异

韩明铭1,金 一1,方南洙1,徐 妲2

(1 延边大学 农学院, 吉林 龙井 133400; 2 吉林市农业科学院 畜牧研究所, 吉林 吉林 132000)

[摘 要] 【目的】分析获能与冻融猪精子细胞肌动蛋白表达的差异。【方法】提取获能和冻融的猪精子蛋白,经过 SDS-PAGE 分离后,进行 Western-blot 免疫印迹分析,检测获能与冻融猪精子间细胞肌动蛋白的区别。【结果】新鲜和冻融猪精子细胞肌动蛋白单体的分子质量均约为 43 ku,但获能猪精子细胞肌动蛋白单体的分子质量约为 43 和 86 ku。【结论】冻融的猪精子细胞肌动蛋白单体分子质量约为 43 ku,但数量有所下降;获能后的猪精子出现了一种新型肌动蛋白亚单位,其分子质量约为 86 ku。

[关键词] 猪精子;获能;冻融;肌动蛋白

[中图分类号] S828.3+4

「文献标识码 A

「文章编号 1671-9387(2009)11-0047-04

Difference between capacitation and frozen-thawed cell actin expression in boar sperm

HAN Ming-ming¹, JIN Yi¹, FANG Nan-zhu¹, XU Da²

(1 College of Agriculture, Yanbian University, Longjing, Jilin 133400, China;

2 Institute of Animal Science , Jilin Academic Agriculture Science , Jilin , Jilin 132000 , China)

Abstract: [Objective] The study was done in order to analyze the difference between capacitation and frozen-thawed boar sperm cells actin expression. [Method] After SDS-PAGE separation of the capacitation and frozen-thawed boar sperm, western blotting analysis was carried out to detect the distinction between capacitation and frozen-thawed boar sperm cell actin. [Result] Monomer molecular weight of fresh and frozen-thawed boar sperm cells actin was about 43 ku, but capacitation boar sperm cells actin was about 43 ku and 86 ku. [Conclusion] Monomer molecular weight of frozen-thawed boar sperm cells actin was still 43 ku, but there was a decrease in number; a new actin subunit appeared in capacitation boar sperm, and the molecular weight was 86 ku.

Key words: boar sperm; capacitation; frozen-thaw; actin

随着哺乳动物生殖生物学技术的发展,动物精液的冷冻保存以及体外获能后的体外受精,在动物种质资源保护上日益显示出强大的应用潜力,进而精子细胞的内部结构及其生理变化成为目前的主要研究内容。已有研究发现,获能、顶体反应的精子与冻融的精子头部外观相似,细胞骨架在精子内发生

不同程度的位置迁移,细胞骨架的变化与精子的受精率关系密切,并对其中的一些动力学事件起着决定性的作用[1-3]。细胞骨架的主要成分是微管、微丝和中间纤维[4],这些纤维是由不同的蛋白质亚单位(骨架蛋白)以特定的方式聚合形成的。细胞骨架的主要蛋白由肌动蛋白、微管蛋白和中间纤维蛋白构

^{* [}收稿日期] 2009-03-05

[[]基金项目] "211"工程重点学科项目;延边大学研究生科研项目

[[]作者简介] 韩明铭(1981一),女,吉林长春人,在读硕士,主要从事动物繁殖生物技术研究。

[[]通信作者] 金 一(1967一),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。

成,存在于哺乳动物精子的头部。其中肌动蛋白 (Actin)是微丝的结构成分,外观呈哑铃状,又称球形 G-actin,其形成的微丝称为纤维形 F-actin。Brener等^[5]报道,精子获能过程中肌动蛋白状态表现为 G-actin 向 F-actin 转变;然而已有研究表明^[6],蛋白质分子质量为 90 和 43 ku 的人精子蛋白冻融后,其分子质量有下降的趋势,但对精子冻融后肌动蛋白分子质量变化以及对随后发育影响的报道甚少。基于此,本试验采用 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western-blot 免疫印迹技术,检测获能与冻融的猪精子间细胞肌动蛋白表达的差异,探讨不同处理条件下猪精子细胞肌动蛋白的变化规律,为哺乳动物精子提供可靠的细胞肌动蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 猪精液 由韩吉牧业有限公司提供,采自8 头成年、体质健康、性欲旺盛的杜洛克公猪。

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;肌动蛋白抗体(A2668),购于 Sigma 公司;酶标(HRP)兔抗牛 IgG,购自北京博奥森生物技术有限公司;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,均购自日本日立公司。

1.2 方 法

1.2.1 蛋白质的提取 分别收集新鲜、冻融和获能的猪精液样本,用 PBS(phosphate buffered saline)洗涤 2 次后,冻存于一20 ℃冰箱,24 h 内即进行蛋白质提取。用含 0.5 mol/L 的 tris-HCl、0.28 mol/L 2-巯基乙醇、5 mol/L 盐酸胍的裂解液裂解精子;再用三氯乙酸/丙酮法沉淀蛋白质[7],提取沉淀的蛋白质冻干,将冻干的蛋白质沉淀以裂解缓冲液(8 mol/L 尿素、40 g/L CHAPS(C_{32} H₅₈ N₂ SO₇)、40 mmol/L Tris)溶解后,在沸水中变性 5 min,一20 ℃保存。

1.2.2 SDS-PAGE 电泳分析 SDS-PAGE 电泳采用 Laemmli 电泳缓冲体系^[8],分离胶含量为 100 g/L,浓缩胶含量为 50 g/L,上样量为 40 μ L。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,取下一板胶片

放入考马斯亮蓝染色液中,在摇床上摇动染色 0.5~1 h,然后置脱色液中脱色至蛋白带清晰为止;另一板胶片做 Western-blot 免疫印迹分析。

1.2.3 Western-blot 免疫印迹 将胶片移入转移缓冲液 (48 mmol/L Tris-NaOH、39 mmol/L 甘氨酸、0.037 g/L SDS、200 ml/L 甲醇)中浸润 5 min,将转移缓冲液润湿的 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,按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 1~1.5 h。将蛋白质 Marker 切下单独染色(考马斯亮蓝染色);将印迹膜放入封闭液中于室温震荡器上放置过夜,用 PBS 缓冲液洗 3 遍后加入一抗(肌动蛋白)于 37 ℃孵育 1 h,用 15 mL 8.5 g/L NaCl 洗 3 遍后,加入酶标二抗(HRP标记的兔抗牛 IgG),于 37 ℃孵育 1 h。洗膜方法同上,然后加底物(DAB) 显色。

2 结果与分析

2.1 猪精子细胞肌动蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析 将新鲜、冻融和获能的猪精液样本进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果见图 1。由图 1 可见,新鲜、 冻融和获能的精液样本蛋白质得到了分离。

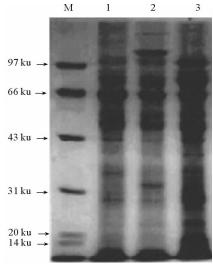


图 1 获能和冻融猪精子细胞肌动蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

M. 蛋白分子质量标准;1. 新鲜的猪精子; 2. 冻融的猪精子;3. 获能的猪精子

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of capacitation and frozen-thawed boar semen actin

M. Molecular weight Marker; 1. Fresh boar semen;

2. Frozen-thawed boar semen; 3. Capacitation boar semen

由图 2 可见,新鲜的猪精子细胞肌动蛋白单体的分子质量约为 43 ku;冻融的猪精子细胞肌动蛋白单体的分子质量也约为 43 ku,但细胞肌动蛋白单体的数量有所下降;获能的猪精子细胞肌动蛋白单体的分子质量约为 43 和 86 ku,表明获能后的猪精子出现了一种新型肌动蛋白亚单位。

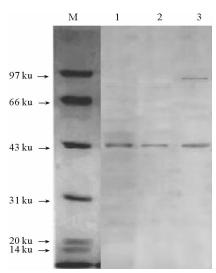


图 2 获能和冻融猪精子细胞肌动蛋白的 Western-blot 免疫印迹分析 M. 蛋白分子质量标准;1. 新鲜的猪精子; 2. 冻融的猪精子;3. 获能的猪精子

Fig. 2 Western-blot analysis of capacitation and frozen-thawed boar semen actin

M. Molecular weight Marker; 1. Fresh boar semen;

2. Frozen-thawed boar semen; 3. Capacitation boar semen

3 讨论

细胞骨架[9]是细胞中一种呈纤维状的结构,使细胞保持一定的形态,并可形成细胞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的作用[10]。肌动蛋白是细胞骨架中一种重要的组成成分,其单体分子质量为 43 ku 球形 G-肌动蛋白,在一定条件下,聚合形成纤维状的肌动蛋白。在正常的生理状态下,F-actin 与 G-actin 之间的聚合和解聚是一个动态的过程,该动态过程的进行关系到 ATP 水解释放能量与细胞质运动、细胞内运输和肌肉运动等生理过程。肌动蛋白参与调节猪精子获能和顶体反应,但精子细胞骨架与精子的获能、顶体反应以及冻融之间的相互联系研究甚少。

本试验结果表明,新鲜的猪精子细胞肌动蛋白的分子质量约为43 ku;冻融的猪精子细胞肌动蛋白的分子质量也约为43 ku,但肌动蛋白单体的数量有所减少;获能的猪精子细胞肌动蛋白的分子质量约为43和86 ku,出现了一种肌动蛋白的新型亚单位。

Morisawa 等[11] 发现,加入肌动蛋白抗体后,顶 体区显示出免疫荧光标记,其顶体中段亦被抗体标 记,表明精子细胞的肌动蛋白存在于顶体区。顶体 的完整与否直接影响着精子的冷冻效果和获能后的 顶体反应能力,表明在精液的冷冻保存过程中对顶 体区肌动蛋白的保护也尤为重要。本试验结果表 明, 冻融的猪精子细胞肌动蛋白单体的分子质量仍 约为 43 ku,但在 Western-blot 分析中可以看出,冻 融猪精子的条带颜色略浅于新鲜的猪精子。说明在 猪精液的冷冻保存过程中,肌动蛋白受到损伤,但只 要保证 G-actin 向 F-actin 转变过程的正常进行,使 冻融后的猪精子达到获能的标准,进而也能保证体 外受精的正常进行。Brener等[5]报道,精子获能过 程中肌动蛋白状态表现为由 G-actin 向 F-actin 转 变,获能精子的肌动蛋白绝大部分处于聚合状态,但 精子顶体反应的诱导可以触发快速的 F-actin 的解 离。从本研究 Western-blot 分析结果中可以看出, 获能的猪精子条带中出现了分子质量约为 86 ku 的 条带,可能是由于猪精子在获能的过程中出现大量 的 G-actin 向 F-actin 转变,促使有少量的 G-actin 聚 合成二倍体,导致精子在获能过程中出现了一种新 型的肌动蛋白亚单位,这与 Naaby-Hansen 等[12] 在 1997年发现肌动蛋白新亚型的结果基本一致。 Morisawa 等[11]证实,随着精子内钙离子载体诱导 顶体反应的发生,精子顶体区显示出免疫荧光标记 越来越密集,这说明顶体反应发生过程中有肌动蛋 白的聚合现象。Castellani-Ceresa 等[13-14] 研究发 现,精子发生顶体反应后,其顶体上的肌动蛋白绝大 多数是聚合状态的;获能的或已经发生精子顶体反 应的马精子头端存在 F-actin,这说明在马精子的获 能和发生顶体反应的过程中存在 F-actin 聚合状态 的转变,并且该过程对精子受精功能是必需的。 Howes 等[15]的研究结果亦支持上述观点。同时, Brener 等[5]指出,精子顶体反应的诱导可以触发快 速的 F-actin 的解离,即在发生顶体反应之前,F-actin 必须被降解,这样才能使精卵接近,进而使后续 的生理过程顺利进行。本研究中,在猪精子的获能 过程中,有部分精子自发的发生顶体反应,并在猪精 子顶体反应的瞬间使 F-actin 降解为 G-actin,而解

离出的 G-actin 绝大部分处于聚合状态,使获能猪精子的 G-actin 含量不会明显高于新鲜猪精子,进而出现获能猪精子分子质量约为 43 ku 条带的颜色略深于新鲜猪精子的现象。

4 结 论

新鲜、冻融和获能的猪精子细胞肌动蛋白单体的分子质量均约为43 ku;但获能后的猪精子出现了一种新型肌动蛋白亚单位,其分子质量约为86 ku。

[参考文献]

- [1] 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]. Ferti Steril, 2004, 82(3);666-672.
- [2] 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.
- [3] Kim N H, Chung H M, Cha K Y, et al. Mierotubule and microfilament organization in maturing human oocytes [J]. Hum Reprod, 1998, 13(8); 2217-2222.
- [4] Siu M K Y, Wong C H, Lee W M, et al. Sertoligerm cell an choring junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of lipid and protein kinases [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(26): 25029-25047.
- [5] Brener E, Rubinstein S, Cohen G, et al. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm cap acitation and acrosome reaction [J]. Biol Reprod, 2003, 68(3):837-845.
- [6] 曹文雷,向祖琼,王益鑫.应用双向电泳分析精子冻融前后蛋白改变的初步研究 [J]. 中国男科学杂志,2003,17(1):18-21.

 Cao W L,Xiang Z Q, Wang Y X. The study of analysis of protein changes application of two-dimensional gel electrophoresis in freezing-thawing semen [J]. Journal of Male Science,2003, 17(1):18-21. (in Chinese)
- [7] 曾少举,桑建利,梁前进.一种牛精子膜蛋白的纯化及在生殖中的作用[J].北京师范大学学报:自然科学版,2000,36(5):

683-687.

Zeng S J, San J L, Liang Q J. Purification of a membrane protein and reproductive role in bovine sperm [J]. Journal of Beijing Normal University: Natural Science Edition, 2000, 36(5): 683-687. (in Chinese)

- [8] 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 Guide [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007. (in Chinese)
- [9] Frixione E. Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton [J]. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2000, 46(2):73-94.
- [10] 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)
- [11] Morisawa S, Cherr G N. Acrosome reaction in spermatozoa from hagfish (Agnatha) Eptatretus burgeri and eptatretus stouti; acrosomal exocytosis and identification of filamentous actin [J]. Dev Growth Differ, 2002, 44(4); 337-344.
- [12] Naaby-Hansen S, Flickinger C J, Herr J C. Two-dimensional-gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa [J]. Biol Reprod, 1997, 56(3): 771-787.
- [13] Castellani-Ceresa L, Brivio M F, Radaelli G. F-actin in acrosome-reacted boar spermatozoa [J]. Mol Reprod Dev, 1992.33 (1):99-107.
- [14] Castellani-Ceresa L, Mattioli M, Radaelli G, et al. Actin polymerization in boar spermatozoa; fertilization is reduced with use of cytochalasin D [J]. Mol Reprod Dev, 1993, 36(2):203-211.
- [15] Howes E A, Hurst S M, Jones R. Actin and actin-binding proteins in bovine sperm atozoa; potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction [J]. J Androl, 2001, 22(1); 62-72.