

正常精子和圆头精子差异表达蛋白的分离与鉴定^{*}

罗克莉¹⁾ 范立青¹⁾ 朱文兵 卢光琇^{**}

(中南大学生殖与干细胞工程研究所, 长沙 410078)

摘要 圆头精子症是一种表现为顶体缺失的男性不育症. 为了研究正常精子和圆头精子的蛋白质组成差异, 用固相 pH 梯度双向凝胶电泳和质谱分析等蛋白质组学方法, 分离了 30 份正常和 3 份圆头精子标本的蛋白质. 对其中 16 个在正常精子中有高丰度表达而在圆头精子中缺失, 和 1 个在圆头精子中表达明显下调的蛋白质点, 以及在圆头精子中存在而在正常精子中缺失的蛋白质簇 w 和点 x, 进行了肽质量指纹分析和蛋白质鉴定, 获得 8 个点的肽质量指纹图, 经 MS-Fit 软件搜索 SWISS-PROT 数据库来鉴定其身分. 发现其中 3 个点与高尔基体相关、2 个点与蛋白酶体相关、2 个点为锌指蛋白, 对其功能和与圆头精子形成的可能关系进行了初步探讨.

关键词 双向凝胶电泳, 质谱分析, 肽质量指纹图, 圆头精子, 蛋白质组学

学科分类号 Q503

圆头精子症是一种罕见的畸精症, 表现为顶体缺失, 患者因此而不育. 近年来用精子胞浆内注射法 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 治疗该病有长足进展, 但 ICSI 是否会将未知的遗传疾患传给后代尚不清楚. 因此进一步在蛋白质水平对圆头精子的病因学和病理生理学进行研究是很必要的. 此前对圆头精子的研究主要集中在核型、超微结构和显微授精后的临床结果等方面^[1~3]. 一些研究者利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、免疫标记、cDNA 克隆^[4], 对与圆头精子畸形相关的蛋白进行了分子生物学水平的研究, 但很少有人用蛋白质组学的方法来较全面地探讨圆头精子畸形时蛋白质表达的改变.

本文中, 作者利用双向电泳 (two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE) 和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 研究了一例圆头精子症患者精子蛋白的改变.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂: 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白质定量试剂盒为 Pierce 公司产品; 尿素、二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺、铁氰化钾 [$K_3Fe(CN)_6$]、蛋白质组学专用的胰蛋白酶 (trypsin)、三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA)、

α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CCA) 均为 Sigma 公司产品; 固相 pH 梯度预制胶条 (IPG strip, pH3-10L, 18 cm)、immobilized pH gradient (IPG) 缓冲液 (pH3-10L)、覆盖液、蛋白质银染试剂盒均为 Amersham Pharmacia 公司产品.

1.1.2 仪器: IPGphor 等电聚焦仪 (Pharmacia 公司); Protean XII 垂直电泳槽、MODEL1000/5000 电泳仪、PDQuest 2D 凝胶分析软件、GelDoc 2000 凝胶成像仪 (Bio-RAD 公司产品); Savant 冷冻浓缩机 (美国); Dy-B2 型脱色摇床 (国产); Voyage r-DE STR MALDI-TOF 质谱仪 (ABI 公司); Ex800 自动酶标仪 (Bio-TEK INSTRUMENTS INC).

1.2 精子标本的制备和裂解

共分析来自 10 个有生育力的正常人的 30 份精液标本 (3 份/人) 和来自一例圆头精子症患者的 3 份标本. 正常人的标本在精液量、密度、活动率和形态分析等方面必须符合 WHO 的正常精液标准^[5]. 圆头精子症的标本分别进行了巴氏染色后油镜分析和包埋后电镜分析, 均证实为 100% 圆头畸形. 该患者的核型分析和血清内分泌检查结果均正常. 所有供精者均签署了知情同意书.

精液液化后用 70% Percoll 分离去除精浆和圆

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (30170480).

^{**} 通讯联系人. ¹⁾ 并列第一作者.

Tel: 0731-4805319 Fax: 0731-4497661

E-mail: lgxdiredto@sina.com

收稿日期: 2003-03-10 接受日期: 2003-04-30

细胞, 用 PBS 洗 3 次后计数, 沉淀去上清液后冻存于 -70°C 或马上进行蛋白质抽提. Percoll 分离后的精子用硫脲裂解液 (含 7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲和 40 g/L CHAPS) 初步抽提蛋白质, 不可溶性沉淀用含 0.5 mol/L Tris-HCl 的 5 mol/L 盐酸胍进一步抽提, 两次的抽提物均用冷丙酮沉淀, 合并后用含 9 mol/L 尿素和 65 mmol/L DTT 的裂解液溶解后上样用于双向电泳.

1.3 双向凝胶电泳

根据 Gorg^[6] 的方法进行双向凝胶电泳. 第一向固相 pH 梯度等电聚焦采用 18 cm 的线性预制胶条 (pH 3-10L). 上样量为 500 μg 总蛋白, 总聚焦时间电压为 41 000 V $\cdot$ h. 聚焦结束后用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行第二向分离. 电泳结束后按蛋白质银染试剂盒操作手册进行银染.

1.4 凝胶图象分析和蛋白质点的鉴定

通过 GelDoc 2000 凝胶成像仪采集图象, 用 PDQuest 2D 凝胶分析软件分析并比较正常精子和圆头精子的双向电泳图谱.

1.5 蛋白质点的胶内酶切

随机切割在正常精子图谱上较浓而在圆头精子图谱中缺失或表达明显下调的斑点, 置于 1.5 ml Eppendorf 管中. 按 Bergman 等^[7] 的方法进行胶内酶切. 具体如下: 用脱色工作液 (30 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$: 100 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ = 1:1) 对银染胶块进行脱色, 用含 10 mmol/L DTT 的 100 mmol/L NH_4HCO_3 于 57°C 还原 1 h 后, 再以含 55 mmol/L 碘乙酰胺的 100 mmol/L NH_4HCO_3 烷基化 30 min. 冻干后以 0.02 g/L 胰蛋白酶 37°C 酶解过夜. 酶解后的肽片段依次用 2 份含 50 μl 5% TFA 的 50% 乙腈萃取, 萃取物以 Zip-TipTM (10 μl , Millipore) 脱盐和挂柱, 再与 CCA 基质液混合, 点样于不锈钢板上, 空气干燥后备用.

1.6 质谱分析

制备好的样品置于 Voyager-DE STR MALDI-TOF 质谱仪上进行分析, 以 CCA 为基质, 采用 100 ns 延迟抽取的方式. 飞行时间按以下条件操作: 反射模式、正离子谱测定, 加速电压为 20 kV、光栅电压为 13.9 kV, N_2 激光强度为 2662, 激光脉冲频率为 3.0 Hz, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 并用基质峰和胰蛋白酶自动降解片段峰作为内校正质谱峰, 获得肽质量指纹图.

1.7 数据库查询

通过互联网上的 MS-Fit 肽质指纹搜索软件

(<http://prospector.ucsf.edu>) 搜索 SWISS-PROT 库, 对获得的肽质指纹进行查询和鉴定. 查询条件: 肽质指纹图中的肽片段质量控制在 800 ~ 4 000 u, 表观 pI 的误差范围为 ± 0.5 pH, 表观分子质量的误差范围为 $\pm 20\%$, 肽片段分子质量最大容许误差控制在 $\pm 30 \times 10^{-6}$ u, 酶解片段不完全选择为 2 个, 物种来源选择人类, 使用单一同位素质量, 肽片段以正离子形式存在, 最少匹配肽片段数规定为 5, 半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸 (carbamidomethyl-Cys); 被选择的片段信号均应较强, 为基线强度的 1 倍以上.

2 结 果

2.1 正常精子和圆头畸形精子的形态学分析

圆头精子症的标本经巴氏染色后油镜分析和包埋后的透射电镜分析均证实为 100% 有顶体缺失的圆头畸形 (图 1 和图 2).

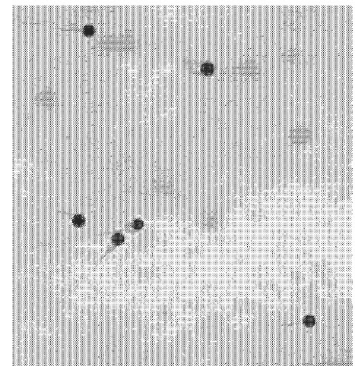


Fig. 1 Photomicrographs of Papanicolaou-stained round-headed spermatozoa
1 000 $\times$.

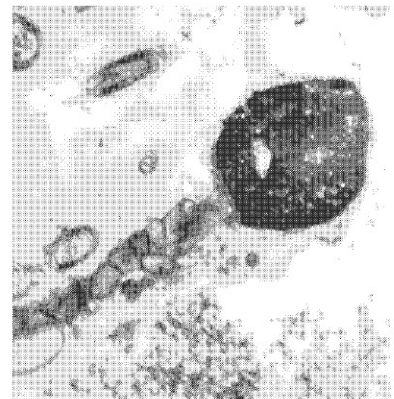


Fig. 2 Transimission electron microscopy of round-headed human spermatozoa
15 000 $\times$.

2.2 正常精子和圆头畸形精子双向电泳图谱

利用双向电泳技术分别分离 10 例正常人的 30 份精子标本 (3 份/人) 和 1 例圆头精子症患者的 3 份精子标本所提取的蛋白质, 经计算机分析后, 双向电泳图谱重复性高, 正常精子和圆头精子标本在分子质量 7.9 ~ 93.5 ku、等电点 pI 3 ~ 10 范围分别分离出 (905 ± 57) 和 (881 ± 32) 个蛋白质斑点, 其中大部分斑点分布在分子质量 12 ~ 66 ku、等电点 pI 4 ~ 8 范围 (图 3). 选取 40 个在正常精子和圆头精子中相互匹配的点进行位置重复性分析, 发现第一向偏差为 (2.47 ± 0.36) mm, 第二

向偏差为 (2.70 ± 0.48) mm. 选取一块斑点较多、分离效果较好的正常精子蛋白质图谱为参考胶, 将其他正常精子图谱和圆头精子图谱与其进行匹配, 平均匹配点数分别为 (663 ± 121) 和 (618 ± 117) , 平均匹配百分率分别为 73.3% 和 60.1%. 差异表达分析显示正常精子和圆头精子图谱有 607 个蛋白质点相互匹配, 其中正常精子有 298 个点未能匹配, 圆头精子有 274 个点未能匹配.

2.3 用质谱分析法鉴定蛋白质

在正常精子图谱和圆头精子图谱之间未匹配的蛋白质点中选出在各例正常精子中都有高丰度表

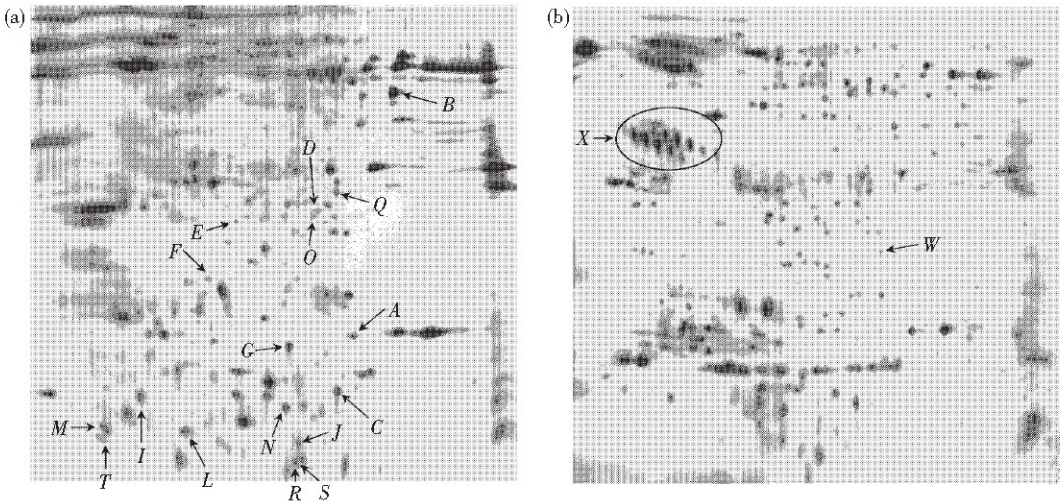


Fig. 3 2-D maps of normal (a) and round-headed human spermatozoa (b)

The spots that were differentially expressed between the globozoospermic and normal sperms were marked with arrows and letters.

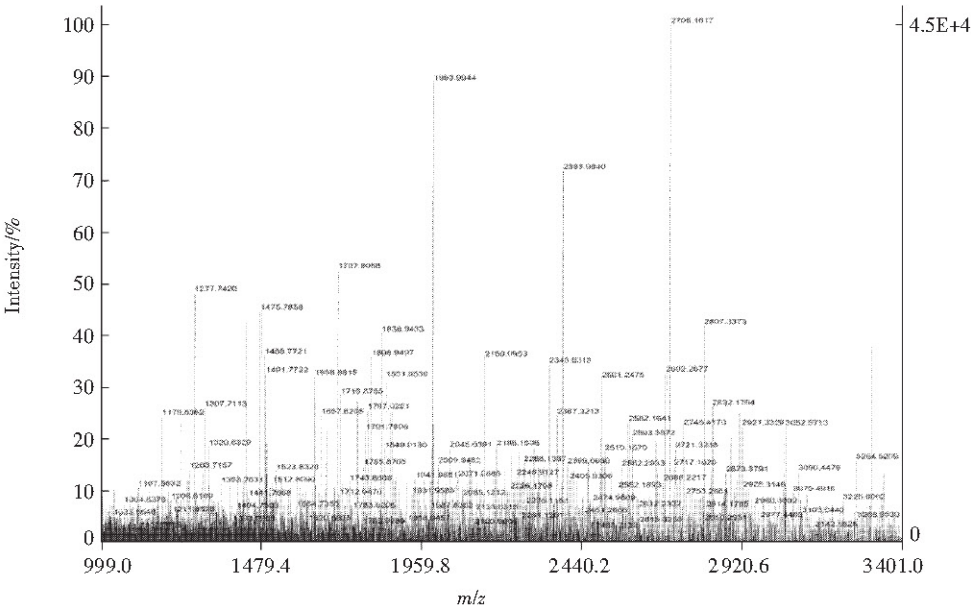


Fig. 4 MALDI-TOF mass spectrum of spot G

达、而在该圆头精子症患者的3份精子标本中均缺失(点*B~T*)或表达下调(点*A*)的17个点,以及在圆头精子中存在而在正常精子中缺失的*W*蛋白质簇和点*X*,进行了原位酶解和MALDI-TOF-MS肽质量指纹图分析(图3),其中8个点(点*A~G, R*)得到较满意的肽质量指纹图(图4为点*G*

的肽质量指纹图示例)。对所获得的肽质量指纹图用MS-Fit 查询软件搜索SWISS-PROT 数据库,结合双向凝胶电泳图谱上各点的表观分子质量、等电点、匹配肽段的多少和覆盖率进行综合分析,鉴定结果见表1。

Table 1 Differentially-expressed protein identified by mass spectrometry

Spot (cf. Fig. 2)	SWISS-PROT (Accession No.)	Detected peptides (Matched peptides)	MOWSE Score	Cove-rage sequence/%	Peptide identified
A	Q00382	137(9)	2486	47	Adapter-related protein complex 1 sigma 1A subunit(Golgi adaptor HA1/AP1DE adaptin sigma-1A subunit)
B	O00232	231(10)	6016	32	26S proteasome non- ATPase regulatory subunit 12 (26S proteasomoe regulatory subunit p55)
C	Q15828	261(10)	878e+004	97	Cystatin M precursor (Cystatin E)
D	O95249	463(9)	211e+004	44	28 ku Golgi SNARE protein
E	P51504	615(19)	2.314e+005	64	Zinc finger protein 80 (ZNFPT17)
F	P28070	260(10)	5.070e+009	40	proteasome subunit beta type 4 precursor (proteasome beta chain)
G	Q13795	2230(52)	5.319e+014	99	ARF-related protein (ARP)
R	Q15937	111(4)	1369	49	Zinc finger protein 79 (ZNFpT7)

3 讨 论

随着基因组计划的完成,蛋白质组的研究变得越来越重要。蛋白质组学研究的优点在于它能从整体的角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态。而既往关于圆头精子的研究主要集中在单个蛋白质的研究。我们已在早期的研究中建立稳定的、重复性高的精子蛋白提取和双向电泳分离技术^[8],现通过蛋白质组学的方法,选出在正常精子中有高丰度表达、而在圆头精子症患者精子中缺如(点*B~T*)或表达下调(点*A*)的17个点进行MALDI-TOF-MS分析,8个点得到较满意的肽质量指纹图,发现其中3个点(*A、D、G*)与高尔基体相关、2个点(*B、F*)与蛋白酶体相关、2个点(*E、R*)为锌指蛋白。而在圆头精子中存在、在正常精子中缺失的*W*蛋白质簇和*X*点由于酶解不完全未能得到鉴定。

先前的研究显示圆头精子分为两型,其中I型为真正的纯粹的圆头精子综合症,其染色质呈球状

排列,顶体完全缺失^[9],轴丝和尾部的微管和线粒体排列异常^[10]。在本研究中,巴氏染色后形态学分析提示本例圆头精子症为I型。Holstein等^[11]的研究提示,I型纯圆头精子综合症是由生精细胞的高尔基体和邻近的支持细胞融合造成的。尽管公认顶体衍生于高尔基体,但关于顶体生成的具体分子机制仍不十分明确。Yao等^[12]发现高尔基体相关PDZ和含卷曲motif蛋白(GOPC)缺失的雄性小鼠患圆头畸形精子症。本研究中发现圆头精子中适配体相关蛋白复合物1σ1A亚单位(adapter-related protein complex 1 sigma 1A subunit)表达量明显减少、28 ku高尔基SNARE蛋白(28 ku Golgi SNARE protein)、ADP核糖化因子相关蛋白(ADP-ribosylation factor related protein, ARP)缺失,这几种蛋白质均与高尔基体相关。具体而言,适配体相关蛋白复合物主要参与晚期高尔基体/穿高尔基体管道系统和/或内体内蛋白质的分选,28 ku高尔基SNARE蛋白参与由内质网至高尔基体和高尔基体内的物质运输的调节,ADP核糖化

因子相关蛋白与ADP核糖化因子(ADP-ribosylation factors, ARFs)家族有较远的相似性,而ARFs有诱发内质网和高尔基体对蛋白质分泌的作用。它们在圆头精子中的改变也从蛋白质水平进一步证实了高尔基体结构和功能异常可导致精子的顶体形成障碍。

顶体是一种含有多种酶类的特化的溶酶体,精子与卵子识别、结合和受精需要这些酶类的参与,因此缺乏顶体的圆头精子有授精障碍。本研究发现圆头精子中有两种蛋白酶体的亚单位(26S蛋白酶体非ATP酶调节亚单位12、蛋白酶体 β 亚单位4型前体)缺失。蛋白酶体是一种广泛分布于真核生物的多功能蛋白酶,它与泛素共同调节蛋白质的降解。Tipler等^[13]曾利用10%~40%甘油梯度法从正常人类精子中纯化出26S蛋白酶体,Bohring等^[14]用双向电泳和质谱分析法研究精子膜抗原时发现蛋白酶体的两种亚单位(成分C2和 ξ 亚单位)。蛋白酶体可能与成熟精子产生过程中的大量细胞内重组和蛋白质降解活动有关,而本研究中这两种蛋白酶体亚单位的缺失可能影响生精过程中精子的正常分化,进而影响顶体的形成和线粒体的正常排列。

锌指蛋白在哺乳动物体内是一个大家族,现有研究证实其中多种成员与男性精子形成有关(如ZNF230)^[15]。特别是basonuclin,它曾被认为局限分布于上皮的角质细胞内,但Yang等^[16]在1997年发现这种蛋白质也分布于发育阶段的精细胞,特别是精子细胞变形阶段末,basonuclin聚集于顶体和鞭毛的线粒体鞘,因此它被认为与精子的分化有关。本研究中发现两种锌指蛋白(锌指蛋白79和80)存在于正常精子中,但在圆头精子中缺失,这也提示了这两种蛋白质的缺失可能参与导致了圆头精子的形成。

另一个蛋白质(cystatin E)的缺失与圆头精子发生机制的可能关系尚不清楚。Cystatin E属cystatin超家族,已知该家族中的cystatin C与精子生成与变形过程有关,cystatin相关附睾特异基因(CRES)蛋白存在于小鼠精子顶体,可能与顶体内蛋白质加工的调节有关^[17]。

总而言之,通过肽质指纹法(PMF)鉴定的这8种蛋白质缺失,可能造成了圆头精子的形成,也有可能是圆头精子顶体缺失的后果。为了进一步了解圆头精子中这些蛋白质改变对疾病所起的作用,有必要对其他有差异表达的蛋白质点进行质谱

鉴定,并利用免疫标记等技术对单个有意义的蛋白质进行在精子中的亚细胞定位和特征分析。

致谢 感谢湖南师范大学生命科学学院梁宋平教授、谢锦云教授及陈平副教授为本文中质谱分析提供了可贵的技术支持及理论建议。

参 考 文 献

- 1 Stone S, O'Mahony F, Khalaf Y, *et al.* A normal livebirth after intracytoplasmic sperm injection for globozoospermia without assisted oocyte activation: case report. *Hum Reprod*, 2000, **15** (1): 139~141
- 2 Baccetti B, Capitani S, Collodel G. Genetic sperm defects and consanguinity. *Hum Reprod*, 2001, **16** (7): 1365~1371
- 3 Nardo L G, Sinatra F, Bartoloni G. Ultrastructural features and ICSI treatment of severe teratozoospermia: report of two human cases of globozoospermia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2002, **104** (1): 40~42
- 4 Lalonde L, Langlais J, Antaki P, *et al.* Male infertility associated with round-headed acrosomeless spermatozoa. *Fertil Steril*, 1988, **49** (2): 316~321
- 5 World Health Organization. WHO Laboratory Manual for The Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction (2nd edition). UK: Cambridge University Press, 2000. 6~23
- 6 Gorg A. The current state of 2-DE with IPG. *Electrophoresis*, 2000, **21** (6): 1037~1053
- 7 Bergman A C, Benjamin T, Alaiya A, *et al.* Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, **21** (3): 679~686
- 8 罗克莉, 范立青, 卢光琇. 人类精子蛋白质组分析的双向蛋白电泳技术研究. *湖南医科大学学报*, 2001, **26** (2): 181~184
Luo K L, Fan L Q, Lu G X. *Bullet Hunan Med Univ*, 2001, **26** (2): 181~184
- 9 Singh G. Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa. *Int J Fertil*, 1992, **37** (2): 99~102
- 10 Pedersen H, Rebbe H. Fine structure of round-headed human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1974, **37** (1): 51~54
- 11 Holstein A F, Schirren C, Schirren C G. Human spermatids and spermatozoa lacking acrosomes. *J Reprod Fertil*, 1973, **35** (3): 489~491
- 12 Yao R, Ito C, Natsume Y, *et al.* Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (17): 11211~11216
- 13 Tipler C P, Hutcheon S P, Hendil K, *et al.* Purification and characterization of 26S proteasomes from human and mouse spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 1997, **3** (12): 1053~1060
- 14 Bohring C, Krause E, Habermann E, *et al.* Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. *Mol Hum Reprod*, 2001, **7** (2): 113~118
- 15 Zhang S, Qiu W, Wu H, *et al.* The shorter zinc finger protein ZNF230 gene message is transcribed in fertile male testes and may be related to human spermatogenesis. *Biochem J*, 2001, **359** (Pt 3): 721~727
- 16 Yang Z, Gallicano G I, Yu Q C, *et al.* An unexpected localization of basonuclin in the centrosome, mitochondria, and acrosome of developing spermatids. *J Cell Biol*, 1997, **137** (3): 657~669
- 17 Syntin P, Cornwall G A. Immunolocalization of CRES (cystatin-related epididymal spermatogenic) protein in the acrosomes of mouse spermatozoa. *Biol Reprod*, 1999, **60** (6): 1542~1552

Isolation and Identification of Differentially-expressed Proteins in Round-headed Human Spermatozoa

LUO Ke-Li¹⁾, FAN Li-Qing¹⁾, ZHU Wen-Bing, LU Guang-Xiu^{**}

(*Research Institute of Reproduction and ES cells, Central-South University, Changsha 410078, China*)

Abstract In order to reveal proteins differentially expressed in round-headed sperm in human being, two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry were performed on 30 normal sperm samples from 10 fertile men and 3 sperm samples from a globozoospermic patient. In the range of molecular weight 7.9 ~ 93.5 and pI 4 ~ 8, altogether (905 ± 57) and (881 ± 32) spots were detected on the 2-DE map of normal and globozoospermic sperms, respectively. 607 spots were matched between the two groups. Mass spectrometry were performed with 16 proteins which were found to be absent in the round-headed sperms and 1 which expressed in a much lower concentration. Altogether 8 protein spots were identified and their possible roles are discussed. Among them, 3 spots were Golgi apparatus-related, 2 spots were subunits of proteasome and 2 spots were zinc finger proteins. Their absence or down-expression possibly interrupt spermatogenic process.

Key words two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, peptide mass fingerprinting, round-headed sperm, proteomics

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30170480).

** Corresponding author. ¹⁾The two authors contribute equally to this work.

Tel: 86-731-4805319, Fax: 86-731-4497661, E-mail: lgxdirector@sina.com

Received: March 10, 2003 Accepted: April 30, 2003