

精子蛋白 32 的表达及酪氨酸磷酸化调控猪精子顶体蛋白的活化

孙培亮, 崔明勋, 姜园园, 曹立朋, 金 一*

(延边大学农学院, 延吉 133002)

摘要: 为了探究猪精子蛋白 32(Sperm protein, sp32)表达及酪氨酸磷酸化调控猪精子顶体蛋白活化的关系,本研究对不同处理(鲜精、冷冻-解冻、获能、顶体反应)的猪精子顶体膜蛋白进行分离,通过考马斯亮蓝染色、SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测和分析。结果表明,猪精子经过获能处理、冷冻-解冻处理以及顶体反应处理后,前顶体蛋白(Proacrosin)和顶体蛋白(Acrosin)在转化过程中,sp32 表达有所差异,获能和顶体反应处理的 sp32 的表达量略高于冷冻-解冻处理组,而显著高于鲜精处理组。与其他处理组相比,冷冻-解冻精子处理组 sp32 酪氨酸磷酸化水平产生显著的差异。但在 SDS-PAGE 电泳中,猪鲜精处理组在蛋白质分子质量 38~170 ku 区间的蛋白表达条带较其他对比组明显,这表明猪精子在受精前所必需经历的获能和顶体反应过程中,顶体膜蛋白伴随着大分子的蛋白质修饰和降解。结论:sp32 作为一种前顶体蛋白结合蛋白,在前顶体蛋白活化过程中它的表达水平及酪氨酸磷酸化水平上调。

关键词: sp32; 前顶体蛋白; 顶体蛋白; 活化; 酪氨酸磷酸化

中图分类号: S828; S814.8

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)08-1229-07

The Expression and Tyrosine Phosphorylation of Sperm Protein 32 Regulate the Activation of the Boar Proacrosin/Acrosin System

SUN Pei-liang, CUI Ming-xun, JIANG Yuan-yuan, CAO Li-peng, JIN Yi*

(Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the relationship between the expression level, tyrosine phosphorylation of sp32 and the activation of the boar proacrosin/acrosin system, the acrosomal membrane proteins of boar sperm for different treatments (fresh sperm, freezing-thawing, capacitation, acrosome reaction) were separated, and stained by CBB, assayed using SDS-PAGE and Western blot analysis. The results showed that the expression level of sp32 was different in conversion of proacrosin/acrosin system after treatment of boar sperm capacitation, freezing-thawing and acrosome reaction, the expression of sp32 in experiment groups of capacitation and acrosome reaction were slightly higher than the freezing-thawing experiment group, and significantly higher than that of fresh semen group. The level of sp32 tyrosine phosphorylation had a significant difference between the freezing and thawing experiment group and other experiment groups. But bands with molecular mass of 38-170 ku in the fresh semen group were more obvious; it showed that the acrosomal membrane proteins were accompanied by modification and degradation of big molecular proteins when sperm underwent capacitation and the acrosome reaction. sp32 as a proacrosin binding protein, its expression and tyrosine phosphorylation level were

收稿日期: 2012-12-28

基金项目: 国家自然科学基金(31260529)

作者简介: 孙培亮(1983-), 男, 吉林白山人, 硕士, 主要从事动物配子与胚胎生物技术研究, E-mail: sunpeiliang2008@163.com

* 通信作者: 金 一, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物繁殖与生物技术的研究, E-mail: yijin@ybu.edu.cn

up-regulated in the activation of the boar proacrosin/acrosin system.

Key words: sp32; proacrosin; acrosin; activation; tyrosine phosphorylation

位于猪精子顶体中的分子质量为 32 ku 的蛋白能够特异性的结合顶体素原和顶体素中间体,参与形成的顶体素可以诱发获能反应进而发生受精作用,称其为精子蛋白 32 (Sperm protein 32, sp32), sp32 有 14 个磷酸化位点,其中 3 个属于酪氨酸磷酸化位点^[1]。即 sp32 是精子蛋白 (Sperm protein, sp) 中特异性地结合前顶体蛋白 (Proacrosin) 并精细性的调控获能及受精的一类蛋白^[2]。

获能是受精的一个重要前提,精子蛋白在经历了一系列生理生化的改变和修饰后才具备跟卵子受精的能力,包括前顶体蛋白糖基化,精子脂质体改变和 cAMP 及精子表面负电荷的上调等^[3]。尽管获能的相关分子机制还不完全清楚,但是精子蛋白以 AMP 依赖的酪氨酸酸化途径发生磷酸化研究已颇多^[4]。有研究发现精子蛋白酪氨酸磷酸化过程可能受 cAMP 及 Ca^{2+} 调控^[5],同时重碳酸盐、ROS 及蛋白激酶亦为动物精子获能的关键因子^[6-8]。S. Tardif 等^[1]通过体外试验,将猪精子分别进行获能培养(即用获能介质与非获能介质培养)与离子电渗法诱导顶体反应试验,然后分别提取精子蛋白,经 SDS-PAGE 电泳后用抗酪氨酸磷酸化抗体筛选,结果发现经过获能介质培养和离子电渗法诱导顶体反应的精子,均可在 32 ku 处出现一蛋白条带,而非获能介质培养的精子无此条带,他们将该蛋白称为 P32,并推测 P32 可能参与获能。最近 J. L. Bailey 等^[9]利用蛋白质组学方法研究 P32 蛋白酪氨酸磷酸化,并证实 P32 与获能相关。与此同时,C. Dubé 研究小组将体外制备的猪获能精子与非获能精子作对照,提取精子蛋白,经 SDS-PAGE 电泳后分别用抗酪氨酸磷酸化抗体与抗 sp32 抗体检测,结果发现 sp32 与 P32 在电泳图上有条带的重叠迹象,再将 P32 进行蛋白质质谱(MS/MS)分析,通过氨基酸序列查询证实两种蛋白的序列完全一致^[10],即 P32 为 sp32 经过酪氨酸磷酸化修饰的蛋白,这种变化伴随着猪精子的获能过程。另外 sp32 与精子顶体蛋白的成熟有非常重要的关系^[11],所以 sp32 既是一种与精子获能相关的酪氨酸磷酸化蛋白,也是一种前顶体结合蛋白。但是 sp32 作为一种促进前顶体蛋白成熟的结合蛋白,其具体机制尚不清楚^[12]。

本研究通过对不同处理的猪精液进行顶体膜蛋

白免疫印迹,从分子层面找到 sp32 表达程度及酪氨酸磷酸化程度对猪精子受精过程调控的微量关系,进而对研究猪精液的长期保存损伤机制提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验所需猪精液均采自延吉市韩吉牧业有限公司的健康成年长白公猪。用保温杯密封避光并且在 2 h 内带回实验室,运输过程中将其温度保持在 $(24 \pm 2) ^\circ\text{C}$,用于试验的精液必须符合以下条件才可用于试验:①颜色为乳白色;②活率 $> 80\%$;③顶体完整性 $> 75\%$ 。

1.2 试验药品

D- $C_6H_{12}O_6$ 、NaCl、KCl、 $NaHCO_3$ 、EDTA、柠檬酸二钠、 Na_2HPO_4 、BSA、 $MgCl_2$ 、 KH_2PO_4 、 $CaCl_2$ 、Tris 和咖啡因等均购自 Sigma 公司。预染蛋白质相对分子质量标准 (Page Ruler Prestained Protein Ladder SM0671)、PVDF 膜、免疫印迹一抗 (Rabbit Anti-Porcine sp32 antibody)、二抗 (Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) HRP)、一抗 (Mouse anti-Phosphotyrosine) 和二抗 (Goat Anti-Mouse IgG(H+L) HRP) 均购于北京华夏远洋生物科技有限公司。

1.3 试验仪器

电子天平、台式高速低温离心机、冰箱、倒置显微镜、培养箱、超净工作台、垂直电泳槽、转移电泳仪、紫外分光光度计和荧光显微镜。

1.4 药品的配制

常温保存液 (BTS): D- $C_6H_{12}O_6$ 36.9 g, NaCl 1.191 g, KCl 0.402 g, $NaHCO_3$ 1.260 g, EDTA 1.247 g, 硫酸卡那霉素 50 mg, 过 0.22 μm 微孔滤膜消毒, 4°C 封存待用。PBS: NaCl 8.00 g, KCl 0.20 g, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 1.56 g, KH_2PO_4 0.24 g, 青霉素 6.00 mg, 链霉素 5.00 mg, 超纯水定容至 1 000 mL, 过 0.22 μm 微孔滤膜消毒, 4°C 封存待用。冷冻稀释液基础液: D- $C_6H_{12}O_6$ 3 g, 乳糖 4 g, 超纯水定容至 100 mL。冷冻稀释液: 取冷冻稀释液基础液 78 mL, 煮沸后加 22 mL 新鲜卵黄, 青霉素和链霉素各 10 IU, 甘油 5 mL。现用现配。获能液: NaCl 3.31 g, KCl 0.112 g, $CaCl_2$ 0.473 9 g, Tris 1.212

g, D-C₆H₁₂O₆ 0.991 g, 丙酮酸钠 0.275 g, 咖啡因 0.194 g, BSA 0.5 g, 庆大霉素 1.0 mg, 超纯水定容至 500 mL, 调节 pH 为 7.6~7.8, 过 0.22 μm 微孔滤膜消毒, 4 ℃ 封存待用。0.01 mol·L⁻¹ PBS 溶液: NaCl 0.8 g; KCl 0.20 g; Na₂HPO₄ 0.144 g; KH₂PO₄ 0.02 g; 加入去离子水, 定容至 100 mL, 用 0.1 mol·L⁻¹ HCl 调节 pH 至 7.4。膜蛋白提取液: Tris 1.21 g; NP-40 0.5 mL; NaCl 0.7 g; MgCl₂·6H₂O 0.087 g; EDTA-Na₂ 0.028 8 g; PMSF 0.5 mL, 加入去离子水, 定容至 100 mL。一抗稀释: 用 PBS 对抗体进行 1:2 000~5 000 稀释, 4 ℃ 避光保存。二抗稀释: 用 PBS 对抗体进行 1:5 000~100 000 稀释, 4 ℃ 避光保存。DAB 显色液: DAB 6.0 mg, PBS 10.0 mL, 硫酸镍铵 0.1 mL, H₂O₂ 1.0 μL。

1.5 方法

1.5.1 精液的常规检测 室温下静置 2 h, 使精液缓慢降温到室温(20~23 ℃)。用显微镜于 37 ℃ 下进行常规品质检查。选择无异味、色泽乳白色、精子形态正常、活率在 0.7 以上、密度为“密”精液供试。每头份精液量, 浓稠部分约为 80~150 mL 左右。

1.5.2 精子活率测定 吸取 100 μL 精液样, 滴于预热的 37 ℃ 的血细胞计数板上, 盖上盖玻片, 在 20×20 的光学显微镜下计数并计算活率。25 格×16 格的血球计数板计算公式: 精子数·mL⁻¹=80 小格内精子个数/80×400×10 000×稀释倍数; 成活精子数·mL⁻¹=80 小格内成活精子个数/80×400×10 000×稀释倍数; 精子活率=成活精子数·mL⁻¹/精子数·mL⁻¹。

1.5.3 洗精 把从猪场取回的猪精液与 PBS 进行 1:5 的比例进行稀释, 1 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 重复 3 次, 留沉淀待用。

1.5.4 精子的获能 用室温下平衡 20 min 的 PBS 对洗精后的精液进行 1:1(v/v) 混合, 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 加入 2 mL 获能液, 使精子沉淀悬浮, 然后 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 在沉淀中加入 2 mL 含有终浓度为 20 μg·mL⁻¹ 肝素钠和 50 μg·mL⁻¹ BSA 的获能液, 立刻置于 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱 45° 倾斜, 孵化 4 h, 采用精子上浮(Swim-up)法进行获能^[13]。

1.5.5 精子的冷冻 洗精后的精子和冷冻稀释液按照 1:2~1:5 比例稀释混匀后用 0.25 mL 的

塑料细管进行分装并封口, 用纱布包裹 10~12 层, 先置于 4 ℃ 冰箱中预冷平衡 3~4 h, 再放入液氮液面上方 5~10 cm 处 10 min, 最后将样品完全放入液氮中长期保存。精子的冷冻-解冻处理: 从液氮中取出预先冷冻处理的猪精子, 放入 58 ℃ 的水浴锅中 8 s, 迅速取出。

1.5.6 精子的顶体反应处理 在上浮法获得的获能精液中加入溶于 DMSO 的钙离子载体 A23187 (2 μmol·L⁻¹), 然后孵化 30 min。

1.5.7 精液的品质检测

1.5.7.1 精子活率的测定: 取 50 μL 精液放 1 mL PBS 中, 再 37 ℃ 下孵育 20 min。然后, 取 20 μL 滴在保温 37 ℃ 的血细胞计数板上, 盖上盖玻片, 在 400× 光学显微镜下观察并计算精子活率。

1.5.7.2 考马斯亮蓝染色(CBB 染色法)^[14-15]: 吸取 20 μL PBS 精子悬液涂片晾干; 精子涂片用 CBB 染色液滴于玻片染 30 min, 三蒸水冲洗玻片, 晾干, 中性树脂封片。并在普通光学显微镜下进行观察、统计。

1.5.8 精子顶体膜蛋白分离 取鲜精用 0.01 mol·L⁻¹ PBS 洗涤离心, 2 500 r·min⁻¹, 3 次, 每次 10 min, 弃上清液。再用 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl 洗涤离心; 2 500 r·min⁻¹, 3 次, 每次 10 min, 弃上清液, 用 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl 溶解沉淀, 然后加入膜蛋白提取液进行冰上裂解, 1.5 h 后取出, 15 000 g 离心 20 min, 冰上吸取上清液于透析袋中, 用磁力搅拌器搅拌, 去离子水透析 2 h, 其间换水 1 次。0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl 透析 24 h, 中间换透析液数次。将透析后的膜蛋白溶液分装, -80 ℃ 保存备用。沉淀用不含有 NP-40 的膜蛋白提取液洗涤, -20 ℃ 保存。

1.5.9 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 用紫外分光光度计测定各样品浓度, 将各处理组蛋白浓度调至相同。本试验蛋白上样量为 45 μL, 电泳条件为浓缩胶(5%) 40 mA, 分离胶(15%) 80 mA, 电泳 3~4 h 左右。电泳完毕后分胶, 放入考马斯亮蓝染色液中, 进行染色脱色。平行组凝胶直接进行免疫印迹。

1.5.10 免疫印迹(Western blot) 剪 20 张与待转印凝胶大小相等的滤纸和 1 张 PVDF 膜, 将它们于转移缓冲液中浸泡 30 min, 直到膜之间没有气泡存在为止。然后按照阳极、10 层滤纸、PVDF 膜、凝胶、10 层滤纸、阴性的顺序依次摆放, 使滤纸、凝胶和 PVDF 膜之间对齐, 且确保各层之间没有气泡。1 mA·cm⁻² 电

转印 1 h。转移结束后,用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗膜,之后加包被液,平稳摇动,室温 2 h。然后弃包被液,用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗膜。加入一抗 4°C 放置 12 h,阴性对照,以 1% BSA 取代一抗,其余步骤与试验组相同。弃一抗和 1% BSA,用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 分别洗膜后加二抗,平稳摇动,室温 2 h。弃二抗,用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 洗膜。加入显色液,避光显色至出现条带时放入双蒸水中,终止反应,照相保存。

1.6 数据统计分析

数据分析使用 Excel 2007 软件,采用线性方程分析方法检测结果。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 电泳的 Marker 标准曲线回归分析

本研究需要大量反复的应用 SDS-PAGE 电泳技术,为确保电泳技术的科学和准确性,最后确定使用 15% 的分离胶浓度作为本试验的 SDS-PAGE 电泳适用浓度(sp32 分子质量较小),并对 Marker 进行了条带线性方程分析,由 $R^2 = 0.993$ 可知,该线性方程可用,条带标记显示准确(表 1 和图 1)。

表 1 Marker 的 SDS-PAGE 电泳条带参数

Table 1 The SDS-PAGE band parameters of Marker

由上至 下条带(x) Band	距胶块上缘距离/cm Distance of superior border	取 lg 值(y) Value of lg
1	1.7	0.230 449
2	2.2	0.342 423
3	3.2	0.505 150
4	4.2	0.623 249
5	6.0	0.778 151
6	7.6	0.880 814
7	9.9	0.995635
8	11.9	1.075 547

2.2 不同处理组的猪精子考马斯亮蓝染色法观察

对猪精子 4 种方式的处理,并用考马斯亮蓝法进行了精子状态染色,结果见图 2。染色结果显示新鲜猪精子头部蛋白分布较均匀,比较分散,顶体着色不明显。获能猪精子头部蛋白有部分聚集,顶体已经明显着色。冷冻-解冻猪精子头部蛋白有释放的现象,顶体显现脱落或者无着色。顶体反应前期猪精子头部蛋白更为集中,尤其顶体部分蛋白浓度

较高,着色较深。

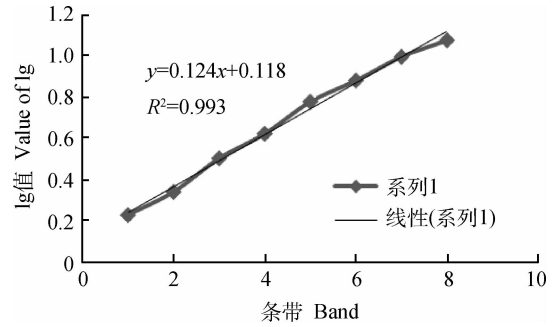


图 1 Marker 的 SDS-PAGE 电泳条带参数对应的标准曲线

Fig. 1 The standard curve of Marker

2.3 不同处理组的猪精子顶体膜蛋白组分 SDS-PAGE 电泳分离结果

将 4 种处理的猪精子顶体膜蛋白进行 SDS-PAGE,结果显示(图 3),猪精子顶体膜蛋白的分子质量大部分分布于 25 ku 以上,其中 25~38 ku 之间的蛋白表达量较微弱,而 38~170 ku 之间的蛋白表达效果比较明显。顶体反应前期的猪精子顶体膜蛋白的表达效果较其他 3 个处理组明显,条带颜色更深。获能和冷冻-解冻猪精子处理组条带相似。但是获能处理组在 32 ku 处条带没有冷冻-解冻猪精子处理组的明显,新鲜猪精子处理组在蛋白质分子质量 38~170 ku 区间的蛋白表达条带较明显。

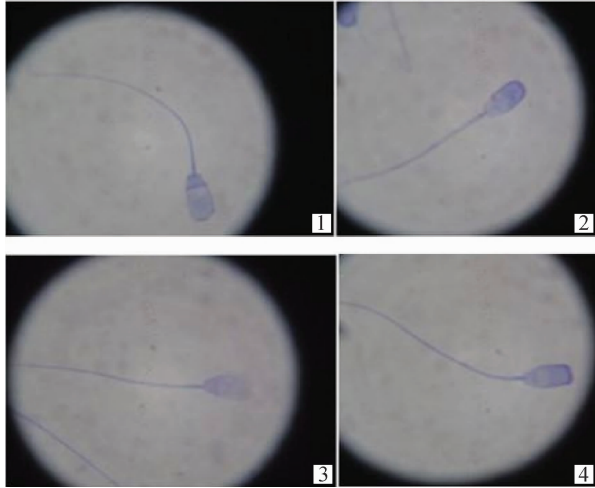
2.4 不同处理组的猪精子顶体膜蛋白组分中 sp32 抗体标记的 Western blot 结果

sp32 蛋白免疫印迹鉴定结果见图 4,结果显示,新鲜猪精子顶体膜蛋白在分子质量 32 ku 处有条带,但是不够明显。而获能猪精子,冷冻解冻猪精子,顶体反应前期猪精子在 32 ku 处条带显示明显。其中获能和顶体反应前期处理组的 sp32 表达量高于冷冻解冻猪精子处理组的 sp32 蛋白表达量。

2.5 不同处理组的猪精子顶体膜蛋白组分中酪氨酸磷酸化蛋白抗体标记的 Western blot 结果

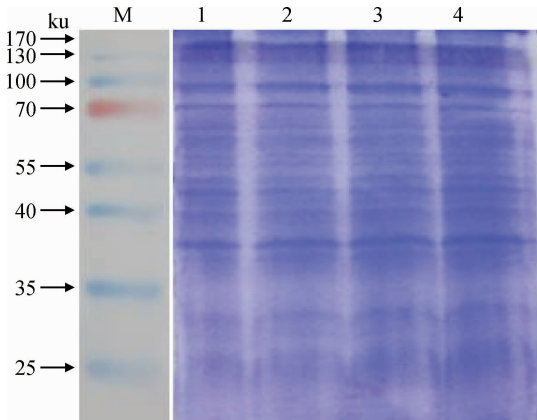
酪氨酸磷酸化蛋白抗体免疫印迹的不同处理组的猪精子顶体膜蛋白组分鉴定结果见图 5,结果显示,新鲜猪精子和顶体反应前期顶体膜蛋白中 sp32 的酪氨酸磷酸化程度较获能和冷冻-解冻精子的酪氨酸磷酸化程度低。其中冷冻-解冻精子较获能精子的 sp32 酪氨酸磷酸化表达量高,顶体反应前期精子较鲜猪精子的 sp32 酪氨酸磷酸化表达量高,而顶体反应前期的猪精子顶体膜蛋白中其它分子量的蛋

白酪氨酸磷酸化条带几乎没有。



1. 新鲜猪精子; 2. 获能猪精子; 3. 冷冻-解冻猪精子; 4. 顶体反应前期猪精子
 1. Fresh sperm; 2. Capacitation sperm; 3. Frozen-thawed sperm; 4. The prophase of acrosome reaction sperm

图 2 猪精子 4 种状态的考马斯亮蓝染色结果
 Fig. 2 The results of staining by CBB



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 新鲜猪精子; 2. 获能猪精子; 3. 冷冻-解冻猪精子; 4. 顶体反应前期猪精子。下同
 M. Page ruler prestained protein ladder SM06711; 1. Fresh sperm; 2. Capacitation sperm; 3. Frozen-thawed sperm; 4. The prophase of acrosome reaction sperm. The same as below

图 3 4 种处理猪精子的顶体膜蛋白组分 SDS-PAGE 电泳结果
 Fig. 3 The results of acrosin with four treatments by SDS-PAGE

3 讨论

从 SDS-PAGE 电泳分离结果来看,猪精子在经过获能,冷冻-解冻,顶体反应处理后,在保证冷冻-

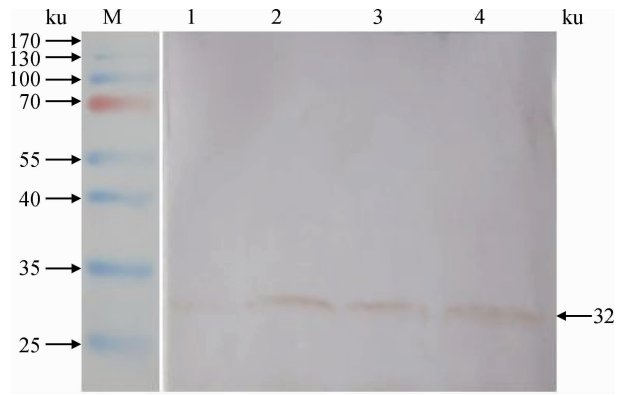


图 4 4 种处理猪精子的顶体膜蛋白中 sp32 表达的免疫印迹结果
 Fig. 4 The results of the expression of sp32 protein with four treatments by Western blot

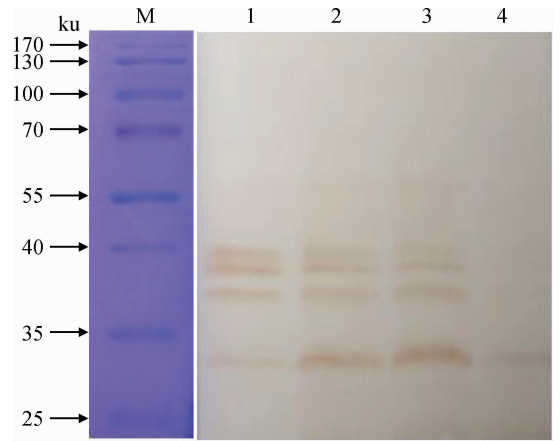


图 5 4 种处理猪精子的顶体膜蛋白中酪氨酸磷酸化蛋白表达的免疫印迹结果
 Fig. 5 The results of the expression of acrosome membrane protein tyrosine phosphorylation with four treatments by Western blot

解冻精子活率 > 30% 的前提下,发现其顶体膜蛋白的表达量较鲜猪精子有较明显差异,主要表现在鲜猪精子顶体膜蛋白在分子质量较大的 38~170 ku 区间的蛋白表达条带较其它 3 个处理组明显,而其他 3 个处理组在 25~38 ku 之间的蛋白表达量较鲜猪精子明显,由此证明,猪精子顶体膜蛋白的组分变化可能与精子受精过程中精子的获能变化的密切相关。从猪精子顶体膜蛋白组分中 sp32 的 Western blot 结果来看,随着猪精子向着获能过程的变化,精子顶体蛋白中 sp32 呈现出一定的变化规律。获能和顶体反应前期的猪精子顶体蛋白中 sp32 表达明显,而鲜精和冷冻-解冻的猪精子 sp32 表达不明显甚至很微弱。从猪精子顶体膜蛋白组分的酪氨酸磷

酸化蛋白免疫印迹结果上看,获能和冷冻-解冻处理组精子的顶体膜蛋白组分的酪氨酸磷酸化程度非常相似,但冷冻-解冻猪精子 sp32 酪氨酸磷酸化程度最深,这也许从分子层面上说明了冷冻-解冻猪精子虽然和获能精子有相似的状态和生化指标,但是由于冷冻损伤的原因,使得冷冻-解冻猪精子出现受精障碍^[16]。顶体反应前期的猪精子顶体膜蛋白仅有 sp32 的酪氨酸磷酸化条带依稀可见,这也许与顶体为了穿透透明带而逐渐发生顶体反应,相关蛋白降解或者释放有关系^[17-19]。由此证明,sp32 蛋白的表达水平及 sp32 的酪氨酸磷酸化程度调控猪精子顶体蛋白的活化,进而影响猪精子的受精率。试验还发现新鲜、获能、冷冻-解冻处理猪精子顶体膜蛋白中分子量在 37~40 ku 蛋白的酪氨酸磷酸化表达呈现特殊的恒定性,这与 P. Kalab 等^[20]、M. M. Bravo 等^[21]研究证实的猪精子获能前后 40~50 ku 的蛋白磷酸化程度相对较为恒定非常类似,这种特殊的恒定性可能是对猪精子内源自生性酪氨酸磷酸化蛋白体系的又一补充。

sp32 位于精子头部,其前体相对分子质量约 61 ku,是一种高度保守的哺乳动物蛋白质。T. Baba 等已发现 sp32 具有连接和促进顶体素原成熟成顶体素的作用属于顶体素(原)结合蛋白[(pro)acrosin binding protein]^[22]。随后进一步证实 sp32 的结合作用具有特异性:它能特异性地结合相对分子质量为 55、53 ku 顶体素原以及 49 ku 顶体素中间体,却不能结合 43 ku 顶体素中间体和 35 ku 顶体素,并且结合 55、53 ku 顶体素原的能力强于 49 ku 顶体素中间体。顶体素在受精过程中起重要作用,sp32 特异性地结合顶体素(原)体现了机体在受精过程中调控的精细性。目前认为 sp32 在获能的后期或者顶体反应的早期与顶体素原结合,在已发生顶体反应的精子中未能检测到 sp32,推测 sp32 随顶体反应而释放出来或被蛋白酶水解^[23]。

4 结 论

猪精子在受精过程中趋向获能和顶体反应状态转变过程时,顶体膜蛋白伴随着大分子的蛋白质修饰和降解;没有受精能力的鲜精顶体膜蛋白组中,38~170 ku 区间的蛋白表达条带较明显,而 32 ku 蛋白表达不明显,这与膜蛋白未经修饰或激活转变有直接关系。获能和顶体反应前期的猪精子顶体膜蛋白中 sp32 表达较高,说明 sp32 的表达调控猪精

子顶体蛋白的活化。冷冻-解冻精子处理组中也有明显的 sp32 条带,但较获能和顶体反应前期的精子表达水平低,虽然其 sp32 酪氨酸磷酸化程度最高,但是与正常的获能精子相比存在差异,sp32 酪氨酸磷酸化程度超过获能“阈值”的现象也许与受到低温损伤的猪精子很难发生真正的获能和顶体反应有关。

参考文献:

- [1] TARDIF S, DUBÉ C, CHEVALIER S, et al. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65: 784-792.
- [2] ARCELAY E, SALICIONI A M, WERTHEIMER E, et al. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation [J]. *Int J Dev Biol*, 2008, 52: 463-472.
- [3] TAKASHI W I, MAHBUB HASAN A K M, SATO K. Protein-tyrosine kinase signaling in the biological functions associated with sperm [J]. *J Signal Transduct*, 2012, 10(1): 1-18.
- [4] FICARRO S, CHERTIHIN O, WESTBROOK V A, et al. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 11579-11589.
- [5] HARAYAMA H, NISHIJIMA K, MURASE T, et al. Relationship of protein tyrosine phosphorylation state with tolerance to frozen storage and the potential to undergo cyclic AMP-dependent hyperactivation in the spermatozoa of Japanese Black bulls [J]. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77: 910-921.
- [6] HARRISON R, GAD ELLA B M. Bicarbonate induced membrane processing in sperm capacitation [J]. *Theriogenology*, 2005, 63: 342-351.
- [7] ARCELAY E, SALICIONI M, WERTHEIMER E, et al. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse spermacapacitation [J]. *Int J Dev Biol*, 2008, 52: 463-472.
- [8] AMINARDE D E, FLAHERTY C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784: 106-115.
- [9] BAILEY J L, TARDIF S, DUBÉ C, et al. Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm kinase activity and capaci-

- tation[J]. *Theriogenology*, 2005, 63: 599-614.
- [10] DUBÉ C, LECLERC P, BABA T, et al. The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm[J]. *J Androl*, 2005, 26(4): 519-528.
- [11] TARDIF S, DUBÉ C, BAILEY J L. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 207-213.
- [12] 范蓉, 罗彬, 谢小薰, 等. 精子蛋白 32 研究进展[J]. *解剖学报*, 2007, 30(4): 503-505.
- [13] 韩明铭, 金一, 方南洙, 等. 不同获能条件对猪精子体外获能和体外受精的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2009, 45(19): 18-21.
- [14] MOLLER C C, BLEIL J D, KINLOCH R A, et al. Structural and functional relationships between and hamster zonapellucida glycoprotein [J]. *Dev Biol*, 1990, 137(1): 276-286.
- [15] 叶华虎, 苟本富, 刘卢生, 等. 考马斯亮蓝染色评价哺乳动物精子顶体反应发生的效果[J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25(7): 582-582, 587.
- [16] GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ L, EGA-FERRUSOLA C O, MACIAS-GARCIA B, et al. Identification of protein tyrosine phosphatases and dual-specificity phosphatases in mammalian spermatozoa and their role in sperm motility and protein tyrosine phosphorylation[J]. *Biol Reprod*, 2009, 80: 1239-1252.
- [17] 张媛媛, 胡启蒙, 王亮亮, 等. 哺乳动物精子磷酸化蛋白质组学研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(4): 76-82.
- [18] 李大吉. 猪精子前顶体蛋白动力学活化作用的研究[D]. 延吉: 延边大学, 2010.
- [19] 张旭成. 不同处理对猪精子蛋白磷酸化的位点分布、水平及质量的影响[D]. 延吉: 延边大学, 2010.
- [20] KALAB P, PEKNICOVA J, GEUSSOVA G, et al. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway[J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 51: 304-314.
- [21] BRAVO M M, APARICIO I M, GARCIA-HERREROS M, et al. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa [J]. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71(1): 88-96.
- [22] BABA T, MCHIKAWAL Y, KASHIWABARA S, et al. Proacrosin activation in the presence of a 32 ku protein from boar spermatozoa [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 160(3): 1026-1032.
- [23] BABA T, NIIDA Y, MICHIKAWA Y, et al. An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 10133-10140.

(编辑 程金华)