

葛晨玲, 李珣, 王晓晔, 等. 基于 iTRAQ 技术的猪精子释放蛋白 Transwell 小室分离及差异性分析 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(6): 29-37.
GE Chenling, LI Xun, WANG Xiaoye, et al. Separation of sperm-releasing protein by Transwell chamber based on iTRAQ technique and differential analyses[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(6): 29-37.

基于 iTRAQ 技术的猪精子释放蛋白 Transwell 小室分离及差异性分析

葛晨玲^{1†}, 李珣^{1†}, 王晓晔^{1†}, 梁莹莹¹, 陈志英¹,
杜倩¹, 唐胤晟^{2,3}, 胡传活¹

(1 广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530004; 2 广西畜禽品种改良站,
广西 南宁 530001; 3 广西科达畜禽改良有限责任公司, 广西 南宁 530001)

摘要:【目的】探索分离猪附睾头部精子释放蛋白的新方法, 确定释放蛋白的功能特点及信号通路。【方法】利用 Transwell 小室独特的共培养系统, 充分利用 0.4 μm 聚碳酸酯膜分离精子释放的蛋白。使用同位素标记相对和绝对定量 (iTRAQ) 技术分析释放的蛋白, 对鉴定到的差异蛋白, 使用 GO 数据库描述蛋白功能, 运用 KEGG 数据库 Pathway 分析, 确定差异蛋白最主要的生化代谢途径和信号转导途径, 同时用 IPR 数据库对差异蛋白的结构域进行非冗余分析。【结果】Transwell 小室上、下室共鉴定到 542 种蛋白, 其中, 464 种蛋白表达量显著上调, 78 种蛋白表达量显著下调。差异蛋白主要参与跨膜转运、离子运输、ATP 合成等生物过程。差异蛋白主要参与的信号通路为醛固酮调节的钠盐吸收、囊泡转运、EGFR 酪氨酸激酶抑制等。硫氧还蛋白、半乳糖、糖苷水解酶等构成差异蛋白的主要结构域, 为蛋白发挥作用提供结构基础。【结论】Transwell 小室分离蛋白的方法切实有效, iTRAQ 技术在附睾头部精子释放蛋白中成功鉴定出差异蛋白, 差异性分析及功能注释为探究差异蛋白参与的生命活动及功能奠定了基础。

关键词: 附睾; Transwell 小室; 同位素标记相对和绝对定量技术; 差异蛋白
中图分类号: Q753 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2019)06-0029-09

Separation of sperm-releasing protein by Transwell chamber based on iTRAQ technique and differential analyses

GE Chenling^{1†}, LI Xun^{1†}, WANG Xiaoye^{1†}, LIANG Yingying¹, CHEN Zhiying¹,
DU Qian¹, TANG Yinsheng^{2,3}, HU Chuanhuo¹

(1 College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;
2 Guangxi Work Station of Livestock & Poultry Breed Improvement, Nanning 530001, China;
3 Guangxi Keda Livestock & Poultry Breed Improvement Co., LTD, Nanning 530001, China)

Abstract: 【Objective】To explore a new method for isolating proteins released by spermatozoa of pig epididymis, and determine the functional characteristics and signaling pathways of released proteins. 【Method】The unique co-culture system of Transwell chamber was used to separate proteins secreted by sperms through 0.4 μm polycarbonate membrane. The isotopically labeled relative and absolute quantitation (iTRAQ) technique

收稿日期: 2019-01-23 网络首发时间: 2019-10-28 09:20:53
网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20191025.0844.030.html>

作者简介: 葛晨玲 (1994—), 女, 硕士研究生, E-mail: 504047512@qq.com; 李珣 (1985—), 女, 博士, E-mail: 418709071@qq.com; 王晓晔 (1987—), 男, 博士, E-mail: xywang@gxu.edu.cn; †对本文贡献相同;
通信作者: 唐胤晟 (1972—), 男, 畜牧师, E-mail: tys-200@163.com; 胡传活 (1964—), 男, 教授, 博士, E-mail: hch64815@gxu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31660700)

was used to analyze the released proteins and identify the differential proteins. The most important biochemical metabolic pathway and signal transduction pathway of differential proteins were confirmed by GO database describing their functions and KEGG database analyzing their pathways. Meanwhile, IPR database was used to conduct non-redundancy analysis for the domains of differential proteins. 【Result】 A total of 542 proteins were identified in the upper and lower rooms of Transwell chamber, of which 464 proteins were significantly up-regulated and 78 proteins were significantly down-regulated. The differential proteins were mainly involved in biological processes such as transmembrane transport, ion transport and ATP synthesis. The main involved signaling pathways of differential proteins were aldosterone-mediated sodium salt uptake, vesicle transport, and EGFR tyrosine kinase inhibition. Sulfur-oxidized protein, galactose, glycoside hydrolase and other major domains that constituted differential proteins provided structural bases for protein functions. 【Conclusion】 The method of separating proteins using Transwell chamber is effective. iTRAQ technique successfully identifies the differential proteins in proteins released by spermatozoa in epididymal head. The difference analysis and function annotation lay the foundation for exploring life activities and functional roles that differential proteins involved.

Key words: epididymal; Transwell chamber; isobaric tag for relative and absolute quantitation technique; differential protein

作为精子到达输精管的通道, 附睾是哺乳动物精子成熟, 获得受精能力, 储存和保护精子的重要器官。附睾液中的蛋白质由附睾上皮分泌, 与精子相互作用或被吸收到精子表面, 为精子的成熟和储存提供特殊的微环境^[1]。附睾液微环境的组成随精子通过的区段不同发生复杂和连续的变化^[2]。附睾头部、体部和尾部基因表达相差较大^[3], 头部是蛋白合成、分泌非常活跃的区域, 体部和尾部较少^[4]。分泌到附睾管腔液的蛋白呈现高度区域化, 附睾管腔中极少有蛋白存在连续分泌现象^[5]。目前附睾液中蛋白种类和作用的研究^[1]较多, 对附睾微环境中精子释放的蛋白的探究较少。精子经附睾转运后, 精子质膜组成和精子表面蛋白加工及修饰会发生巨大变化, 本研究通过体外培养对附睾头部曲细精管内精子释放的蛋白的种类进行鉴定和差异性分析, 确定精子释放蛋白影响受精过程的分子机制, 为阐明繁殖机理奠定一定的理论基础。

蛋白质组学是一门新兴学科, 以大规模、高通量的方式研究某种类型的细胞、组织或体液含有的所有蛋白质的功能^[6]。同位素标记相对和绝对定量 (Isobaric tag for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 技术是一种新的体外同位素标记方法, 由美国应用生物系统 (Applied biosystems) 公司推出^[7], 具有高通量、高灵敏度、高精确度的特点^[8-9]。同时使用液相色谱-串联质谱的 iTRAQ 可以同时分离和鉴定数百种蛋白质, 获得最大程度的全套信息^[10-11]。Transwell 小室由美国康宁 (Corning) 公司开发生

产, 该材料中间有一层聚碳酸酯膜组成的微孔滤膜将孔板内的培养空间分为上、下室 2 部分^[12], 根据不同细胞体积不同, 孔径 0.1~12.0 μm 不等, 主要用于共培养、趋化、迁移、侵袭等细胞试验^[13-14]。本研究充分利用 Transwell 小室独特的滤膜装置将精子细胞与释放蛋白分离为 2 部分, 消除了因上、下室培养液成分和作用条件不同等造成的干扰, 探究分离猪附睾头部精子释放蛋白的新方法。

1 材料与方法

1.1 样品采集

选取同一种猪场相同批次相同生长环境的 6 月龄性成熟长白猪 6 头, 无菌操作摘取附睾组织。样品采集于广西科达畜禽改良有限责任公司。

1.2 试剂与仪器

Q ExactiveTM HF-X 质谱仪、低温离心机、C18 除盐柱 (Thermo)、Bradford 蛋白定量试剂盒 (Bio-Rad)、多肽标记的 iTRAQ[®] 试剂盒、二硫苏糖醇 (Sigma)、碘乙酸 (Sigma)、胰酶 (Promega)、Transwell 小室和精子细胞培养液 (南宁阳光实验器材经营部)。

1.3 附睾头部精子的采集

摘取长白猪附睾, 剔除脂肪组织和结缔组织, 用 PBS 缓冲液冲洗 3 次洗去血迹, 浸润在预热的 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水中, 用无菌手术剪在附睾头部、尾部各切 1 个小孔, 以便空气流通, 保持管腔内大气压恒定。将 5 mL 注射器针头缓慢刺入附睾头部曲细

精管内, 轻轻挤压曲细精管并抽取精液, 用 1.5 mL EP 管收集, 室温 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 保留沉淀, 重新悬浮于 1 mL NC-BWW 培养液中。采用台盼蓝染色测定精子浓度, 用 NC-BWW 培养液作为稀释液将精子浓度调整为 $2\times 10^5\sim 5\times 10^5\text{ mL}^{-1}$, 观察并统计精子活力、成活率和畸形率, 弃去其中任一参数低于 60% 的样品。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 、95% 空气的环境中孵育 30 min 以便精子恢复正常生命状态。整个孵育过程中定期将精子悬浮液轻轻混合以防止细胞沉降, 并在孵育结束时再

次评估精子活力。

1.4 释放蛋白的分离

取稀释后的精子细胞溶液 2 mL 在单个 Transwell 小室内培养, 精子释放的蛋白及培养液通过微孔滤膜进入下室, 整个精子细胞被滤膜阻挡保留在上室。Transwell 小室收集释放蛋白的示意图如图 1。将 Transwell 小室在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 、95% 空气的环境中孵育 30 min, 以便精子正常分泌蛋白, 将上、下室的组分用 2 mL EP 管分别收集, 上室组分标记为 DCU, 下室组分标记为 DCL, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

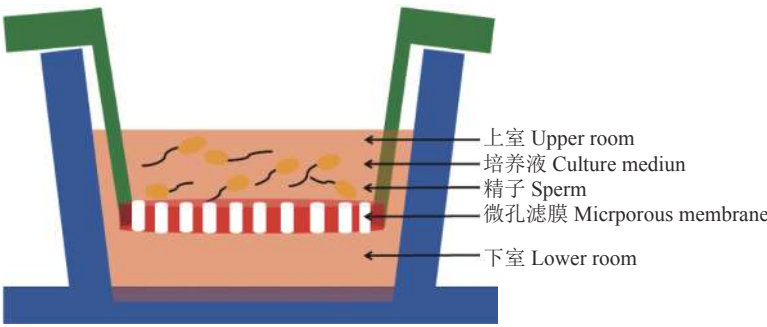


图 1 利用 Transwell 小室收集释放蛋白示意图

Fig. 1 Schematic diagram of released protein collection using Transwell chamber

1.5 总蛋白提取

从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出样品, 低温研磨成粉, 迅速转移至液氮预冷的离心管, 加入适量蛋白裂解液振荡混匀, 冰水浴超声使充分裂解; 离心后取上清加入二硫苏糖醇于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 然后加入足量碘乙酸, 于室温避光反应 1 h; 加入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷丙酮沉淀 2 h, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集沉淀; 加入 1 mL $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷丙酮重新悬浮, 并清洗沉淀, 加入适量蛋白溶解液溶解沉淀。

1.6 蛋白质检

使用 Bradford 蛋白质定量试剂盒, 按照说明书配制 BSA 标准蛋白溶液, 对上、下室收集到的样品进行蛋白浓度测量。每组样品重复 3 次。取 $30\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白待测样品进行 $34.55\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS-PAGE 凝胶电泳, 其中浓缩胶电泳条件为 80 V 、20 min, 分离胶电泳条件为 120 V 、60 min。电泳结束后进行考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色至条带清晰。

1.7 iTRAQ 标记

上下室各取 $100\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白样品, 加入蛋白溶解液补足体积至 $100\text{ }\mu\text{L}$, 加入胰酶和 TEAB 缓冲液, 混匀后于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 酶切过夜; 加入等体积 1%(φ) 甲酸, 混匀后离心, 取上清液缓慢通过 C18 除盐柱, 然后用清洗液连续清洗, 再加入洗脱液洗脱 2 次, 洗脱样合并后冻干; 加入 TEAB 缓冲液复溶, 并加入足量

iTRAQ 标记试剂, 室温颠倒混匀; 取等体积标记后的样品混合, 除盐后冻干。将保存好的样品送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行馏分分离和液质检测。

1.8 质谱数据分析

质谱原始数据格式为 *raw, 存放质谱数据完整的扫描信息, 下机后的 raw 文件直接导入到 Proteome Discoverer 2.2 软件进行数据库检索, 谱肽和蛋白定量的具体分析参数为: 使用赛默飞超高分辨质谱仪 (Thermo Q ExactiveTM HFX), 标记量化, 胰蛋白酶酶切, 前体离子搜库时质量偏差容忍范围为 10^{-5} , 碎片离子搜库时质量偏差容忍范围位 0.02。本次使用的数据库为 P101SC18101236-01-sus_scrofa-uniprot-2018.10.29.fasta(48969 sequences)。

1.9 生物信息学分析

蛋白功能注释采用 GO 数据库 (<http://amigo.geneontology.org/amigo>) 进行分析, 从细胞组分、分子功能和生物过程 3 个方面对蛋白功能进行描述。通过 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 路径分析, 确定蛋白质参与的最主要的生化代谢途径和信号转导途径。使用 Interproscan(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 对蛋白质家族、结构域和功能位点进行非冗余分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白 SDS-PAGE 电泳

利用 Transwell 小室的上、下室收集蛋白, 收集后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 结果表明, 上、下室含有的总蛋白种类多、数量丰富, 蛋白条带大小有明显差异 (图 2)。

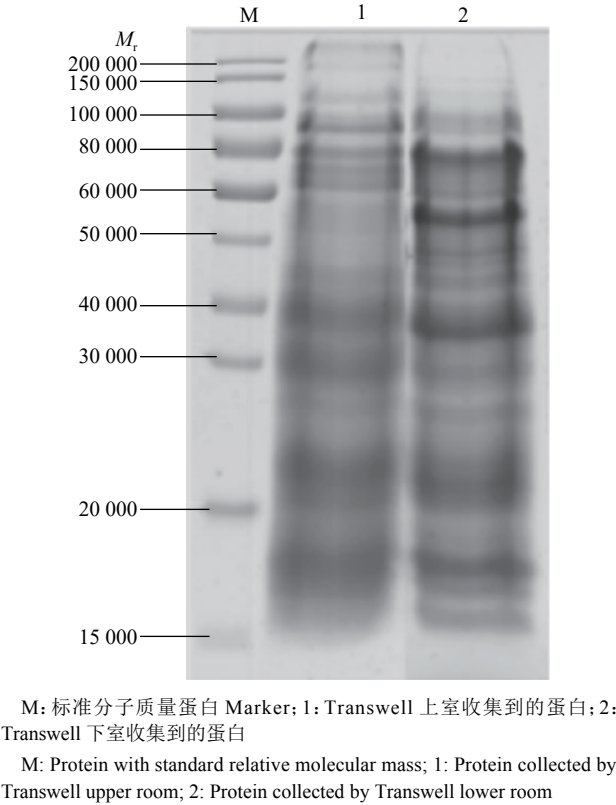


图 2 待测蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig. 2 SDS-PAGE results s of tested proteins

2.2 蛋白质质谱定量分析和鉴定

经质谱定量分析, 共鉴定到 542 种蛋白, 离子峰均一集中, 杂质干扰较少 (图 3)。分离出的蛋白相对分子质量主要集中在 $2\times 10^4\sim 4\times 10^4$ (图 4)。肽段长度主要集中在 9~13 肽, 仅有少部分蛋白质肽段长

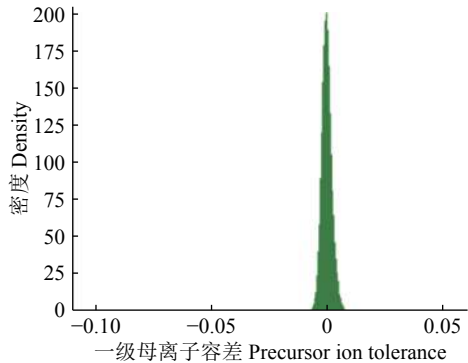


图 3 一级质谱母离子容差分布图

Fig. 3 The tolerance diagram of first-stage mass spectrometer precursor ion

度大于 22 肽 (图 5)。综上所述, 蛋白的质谱定量分析显示, 样品成分均一、杂质少、保真性强、可信度高。

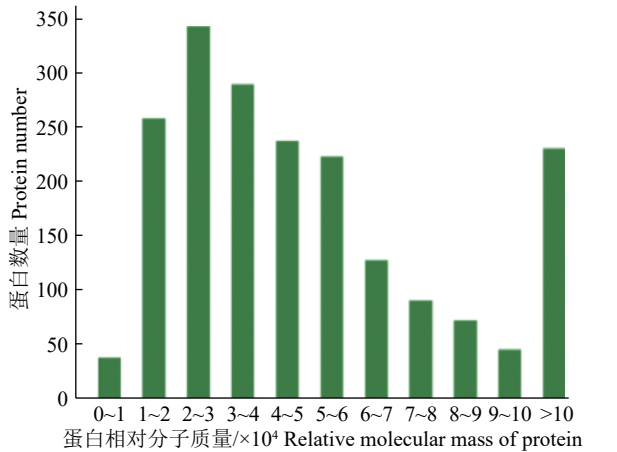


图 4 蛋白相对分子质量分布图

Fig. 4 Distribution diagram of relative molecular mass of protein

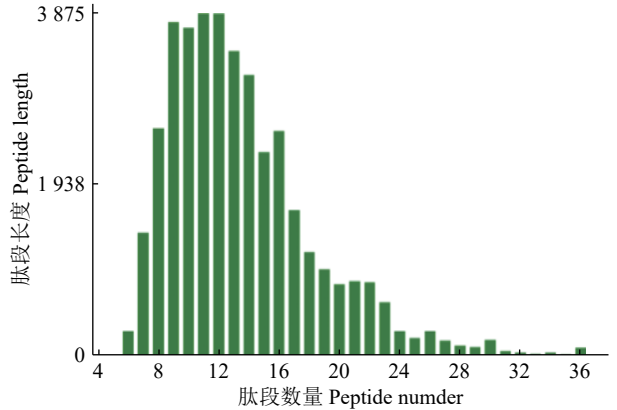


图 5 肽段长度分布图

Fig. 5 Peptide length distribution diagram

2.3 精子释放蛋白差异性分析

对 Transwell 小室上、下室收集到且均有表达的蛋白进行蛋白含量差异性分析, 当蛋白含量的差异倍数 (Fold change, FC) ≥ 1.5 , $P\leq 0.05$ 时, 蛋白表达量上调; 当 $FC\leq 0.67$, $P\leq 0.05$ 时, 蛋白表达量下调。在鉴定到的所有蛋白中, 464 种蛋白表达量显著上调, 78 种蛋白表达量显著下调。53.87% (292/542) 的蛋白未匹配到详细的描述, 仅得到相关的基因名称。上室表达量最高的蛋白为精子酵素 (Acrosin), 达 $90\ 082.5\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 下室表达量最高的是由 *WFDC10AL* 基因编码的未命名蛋白 (Uncharacterized protein), 达 $162\ 351.4\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。上、下室蛋白表达量不同表明精子内部蛋白与释放蛋白有所差异, 同时也说明利用 Transwell 小室分离精子释放蛋白的方法切实有效。在表达量上调、下调的所有蛋白中, 蛋白含量差异倍数排在前 10 位的蛋白汇总如表 1 和表 2。

表 1 前 10 位表达量上调蛋白信息¹⁾

Table 1 Top 10 up-regulated protein information

蛋白 Protein	蛋白描述 Protein description	基因 Gene	上室表达量/(ng·μL ⁻¹) Expression quantity in upper room	下室表达量/(ng·μL ⁻¹) Expression quantity in lower room	log ₂ (FC)
F1SSB0	E3泛素蛋白连接酶 E3 ubiquitin protein ligase	<i>RNF20</i>	299.10	20.00	3.90
F1RJ15	未描述蛋白 Uncharacterized protein	<i>SYCP2</i>	275.80	42.60	2.69
A2IBS6	Sara2蛋白 Sara2 protein	—	433.30	71.10	2.61
F1SRA1	衔接蛋白 GRB2-related adaptor protein 2	<i>GRAP2</i>	765.50	140.70	2.44
A0A287、AVV2	阴离子选择性通道蛋白 Anion selective channel protein	<i>VDAC1</i>	137.00	32.20	2.09
F1RNL3	未描述蛋白 Uncharacterized protein	<i>CCDC63</i>	144.20	34.90	2.05
I3LPR1	未描述蛋白 Uncharacterized protein	<i>CT83</i>	270.00	75.50	1.84
F1RFB9	巯基氧化酶 Sulfhydryl oxidase	<i>GFER</i>	95.60	27.60	1.79
A0A287ALG6	未描述蛋白 Uncharacterized protein	<i>APH1B</i>	229.50	67.60	1.76
F1SM17	UDP-葡萄糖醛酸 UDP-glucuronosyltransferase	<i>UGT1A6</i>	390.40	116.90	1.74

1) “—” 指未在数据库中匹配到相应基因
1) “—” indicated no matched gene in database

表 2 前 10 位表达量下调蛋白信息¹⁾

Table 2 Top 10 down-regulated protein information

蛋白 Protein	蛋白描述 Protein description	基因 Gene	上室表达量/(ng·μL ⁻¹) Expression quantity in upper room	下室表达量/(ng·μL ⁻¹) Expression quantity in lower room	log ₂ (FC)
A0A287、AGA4	6-磷酸果糖激酶 6-phosphofructokinase	<i>PFKL</i>	192.90	1 504.40	-2.96
A0A28、7BFE6	未描述蛋白 Uncharacterized protein	<i>RAB35</i>	151.70	628.40	-2.05
F1SJS9	钠通道蛋白 Sodium channel protein	<i>SCN5A</i>	309.90	884.60	-1.51
A0A28、6ZP34	未描述蛋白 Uncharacterized protein	<i>HYDIN</i>	12.10	33.30	-1.46
F1SP87	未描述蛋白 Uncharacterized protein	—	1 457.10	3 788.80	-1.38
P28839	细胞溶质氨肽酶 Cytosol aminopeptidase	<i>LAP3</i>	374.70	884.00	-1.24
D3K5J6	顶体囊泡蛋白1 Acrosomal vesicle protein 1	<i>ACRV1</i>	13 111.60	30 718.30	-1.23
A0A286、ZTC4	未描述蛋白 Uncharacterized protein	—	227.90	529.50	-1.22
F1SQU2	未描述蛋白 Uncharacterized protein	<i>SCYL2</i>	76.80	178.20	-1.21
F1RL06	未描述蛋白 Uncharacterized protein	<i>LOC100523213</i>	1 064.20	2 459.40	-1.21

1) “—” 指未在数据库中匹配到相应基因
1) “—” indicated no matched gene in database

2.4 差异蛋白 GO 功能注释分析

将差异蛋白数据在 GO 数据库进行搜库, 功能注释共得到 543 个条目, 其中分子功能 (Molecular function) 占 52.30%(284/543), 细胞组分 (Cellular component) 占 11.79%(64/543), 生物过程 (Biological process) 占 11.42%(62/543), 另外 133 个蛋白未得到功能注释 (图 6)。差异蛋白主要参与跨膜转运 (Transmembrane transport)、离子转运 (Ion transport)、含嘌呤的化合物生物合成 (Purine-containing compound biosynthesis)、ATP 合成 (ATP synthesis) 等生物过程, 是构成细胞膜 (Cell membrane)、细胞器 (Organelle)、细胞质 (Cytoplasm) 等细胞组分的主要成分, 使小分子结合 (Small molecule

binding)、底物特异性跨膜转运 (Substrate-specific transmembrane transport)、核酸结合 (Nucleotide binding)、嘌呤核糖结合 (Purine ribonucleoside binding)、非折叠性蛋白质结合 (Unfolded protein binding) 等功能正常进行。精子经过附睾微环境时, 被赋予运动和受精能力, 此次验证的差异性蛋白主要在信号转导和呈递运输方面发挥作用, 佐证了精子释放蛋白的生物功能。细胞组分的验证表明差异蛋白能够维持机体生命活动的正常进行, 共同构成精子完整的细胞形态。核酸结合、嘌呤核糖结合等分子功能充分说明精子释放蛋白能够携带相关的遗传信息进入雌性生殖道, 为遗传信息的稳定提供分子基础。

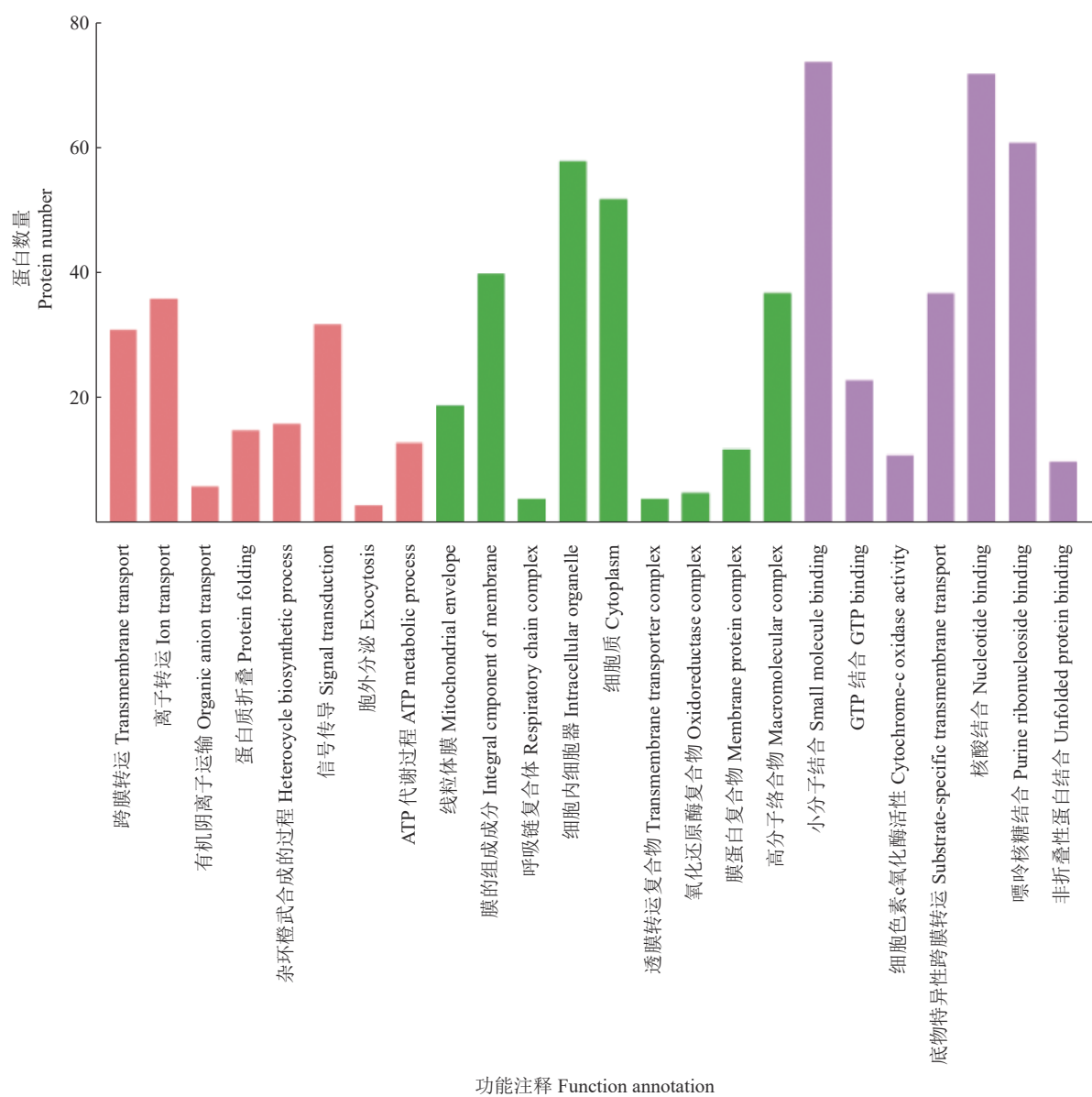


图 6 差异蛋白 GO 功能注释分析

Fig. 6 GO function annotation analysis of differential protein

2.5 差异蛋白 KEGG 富集分析

应用与 GO 富集相同的差异基因进行 KEGG 路径富集分析, 结果如图 7 所示, 前 5 位的功能条目分别为: 醛固酮调节的钠重吸收 (Aldosterone-regulated sodium reabsorption)、囊泡运输 (Vesicular transport)、EGFR 酪氨酸激酶抑制 (EGFR tyrosine kinase inhibitor)、自噬 (Mitophagy)、NOD 样受体信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway)。醛固

酮是肾素-血管紧张素系统的重要活性成份之一, 可激活糖皮质激素诱导蛋白激酶 1 以及氧化应激等引起的细胞凋亡和损伤。此外, 自噬信号通路预测表明差异性蛋白可能参与精子的抗氧化和凋亡过程, 影响精子的繁殖力。精子分泌蛋白 KEGG 通路富集分析缩小了精子发生机制所涉及的信号转导途径, 为进一步深入研究奠定基础。

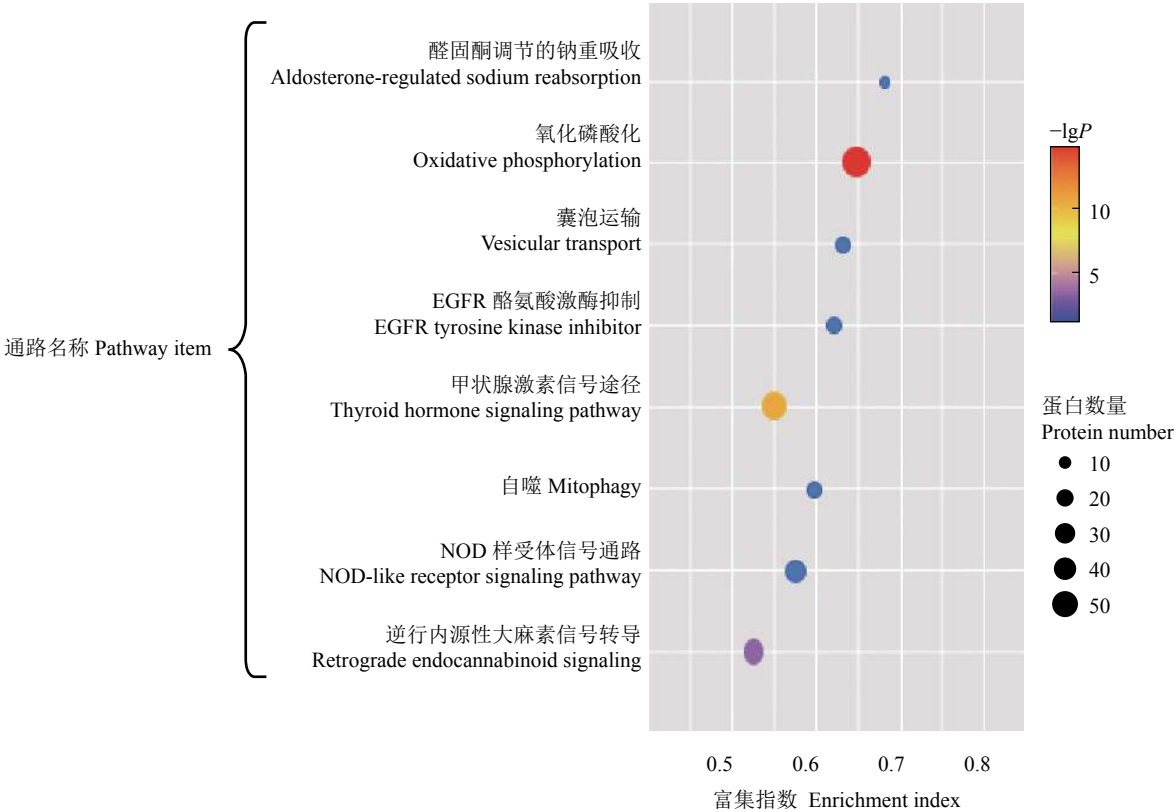


图 7 差异蛋白 KEGG 富集散点图

Fig. 7 KEGG enrichment scatter plot of differential protein

2.6 差异蛋白结构域分析

对差异蛋白进行结构域分析, 结果表明, 硫氧还蛋白样折叠 (Thioredoxin-like fold)、半乳糖结合域 (Galactose-binding domain-like)、糖苷水解酶 (Glycoside hydrolase)、组蛋白折叠 (Histone-fold)、琥珀酸脱氢酶 (Succinate dehydrogenase) 等为差异蛋白的主要结构域, 为蛋白发挥生理功能提供稳定的结构基础。半乳糖、糖苷水解酶和琥珀酸脱氢酶等结构域表明差异蛋白可能参与精子的糖代谢途径, 为精子发生和精卵结合提供动力来源。

3 讨论与结论

栗瑞兰等^[15] 选取成年公羊的附睾分段分割研究 GPX5 在附睾中的表达与蛋白定位, 齐晓伟等^[16]

采用分段处理鉴定大鼠附睾管腔液中可能参与精子成熟和精子表面修饰的附睾特异蛋白。与以上研究不同, 本研究旨在探究在附睾微环境作用下, 精子通过附睾后释放出的蛋白如何参与后续生理活动, 故创新使用 Transwell 小室分离猪附睾头部精子释放蛋白, 有效避免了机械压力破坏精子完整的内部结构, 并维持其正常生命活动, 保证其在生理状态下分泌蛋白。Transwell 上、下小室独特的分离装置最大程度上确保检测的蛋白为分泌成分, 排除精子体内结构性物质的干扰。该试验对猪附睾头部精子释放蛋白分离方法的优化, 为后续成分的功能研究奠定了基础。

精子在附睾运行过程中与附睾液微环境相互作用不断成熟, 表现为获得运动能力和受精能力,

精子获得这些新性状可能与其质膜的变化有关,即精子膜结构发生有序改变,包括膜脂、膜蛋白、膜上糖基成分、膜电荷以及膜流动性与通透性的改变^[17]。当精子离开附睾腔后,精子表面会释放大量的蛋白质,参与精子的发生、成熟、获能、精卵粘附与识别、顶体反应等环节。本研究中,差异性蛋白 ADAM3、CCT3、CCT8 与精卵结合和顶体反应有关,PRKACA 与精子获能有关^[18],同理类推,ADAM29、CCT2、CCT4、CCT5 和 CCT6A 这些未被描述功能的蛋白,可能同属一个家族具有同样的功能。本研究有很多蛋白未被富集到详细的功能描述,我们可通过对基因的研究推测蛋白特征。例如,SYCP2 基因被证实小鼠纯合 SYCP2 突变体减数分裂受到阻滞,雄性不育,雌性生育力降低,产仔数大幅减少^[19]。CRISP1、ADAM7、GPX5、SPAM1、SPINK2、PSME4、TXNDC8 被证明为附睾转运期间添加的蛋白质,非分泌蛋白^[20-23]。

本研究表达量显著下调的磷酸果糖激酶,在人类最常见的不育遗传病 Klinefelter 综合征中,患者睾丸组织中该基因的表达量严重下降^[24]。此外,附睾特异性 α -甘露糖苷酶 (Epididymis-specific α -mannosidase, MAN2B2) 可以影响猪排卵率进而影响产仔数^[25]。因此推测精子表面释放的蛋白通过调控糖酵解相关酶影响机体的繁殖能力。富集通路分析表明囊泡运输作为精子细胞参与精卵结合的重要途径^[26],钙感受器可触发突触囊泡融合, Ca^{2+} 在精子的活动能力、获能、定向运动、顶体反应及受精卵发育中都起重要作用^[27]。酪氨酸激酶家族成员 EGFR 定位于细胞膜上,EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKI) 能够选择性地竞争胞内酶结构域 Mg-ATP 结合位点,催化 ATP 磷酸基转移至下游蛋白酪氨酸残基上,使其发生磷酸化,阻止下游信号转录^[28]。磷酸基团的添加或去除可以诱导变构修饰,引起蛋白质构象变化,导致其激活或失活^[29],因此,酪氨酸磷酸化对促进精子获能至关重要。

本研究中精子表面释放蛋白主要参与跨膜转运、离子运输、化合物生物合成、ATP 合成等生物过程,这些蛋白对维持精子形态结构完整性、新陈代谢、生理功能、超极化运动、膜流动性改变、完成受精过程等可能起关键作用^[30]。综上所述,本研究创新使用 Transwell 小室分离猪附睾头部精子释放蛋白,并采用高灵敏度、高准确性的 iTRAQ 技术检测释放蛋白,对鉴定得到的差异蛋白进行生物信息学分析,从 GO 功能注释、KEGG 富集、结构域预测等

方面进行研究,为今后从蛋白水平和基因水平阐明受精过程和生殖机理提供试验依据。

参考文献:

- [1] 刘芙君,李建远,王海燕. 附睾分泌蛋白与精子成熟的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(5): 457-460.
- [2] TURNER T T. Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1991, 637: 364-383.
- [3] JOHNSTON D S, JELINSKY S A, BANG H J, et al. The mouse epididymal transcriptome: Transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis[J]. *Biol Reprod*, 2005, 73(3): 404-413.
- [4] HERMO L, ROBAIRE B. Epididymal cell types and their functions[M]//ROBAIRE B, HINTON B T. The epididymis: From molecules to clinical practice. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001: 81-102.
- [5] SYNTIN P, DACHEUX F, DRUART X, et al. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis[J]. *Biol Reprod*, 1996, 55(5): 956-974.
- [6] LAU A T Y, HE Q Y, CHIU J F. Proteomic technology and its biomedical applications[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2003, 35(11): 965-975.
- [7] ROSS P L, HUANG Y L N, MARCHESE J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(12): 1154-1169.
- [8] SU L, CAO L, ZHOU R, et al. Identification of novel biomarkers for sepsis prognosis via urinary proteomic analysis using iTRAQ labeling and 2D-LC-MS/MS[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1). doi: 10.1371/journal.pone.0054237.
- [9] HUANG C, WANG Y, LIU S, et al. Quantitative proteomic analysis identified paraoxonase 1 as a novel serum biomarker for microvascular invasion in Hepatocellular Carcinoma[J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(4): 1838-1846.
- [10] GLEN A, EVANS C A, GAN C S, et al. Eight-plex iTRAQ analysis of variant metastatic human prostate cancer cells identifies candidate biomarkers of progression: An exploratory study[J]. *Prostate*, 2010, 70(12): 1313-1332.
- [11] KESHAMOUNI V G, MICHAELIDIS G, GRASSO C S, et al. Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype[J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(5): 1143-1154.
- [12] 唐秋琳,毕锋. Transwell 法检测细胞侵袭迁移能力实

验中的影响因素[J]. *实验科学与技术*, 2018, 16(4): 18-21.

[13] SHAW L M. Tumor cell invasion assays[J]. *Methods Mol Biol*, 2005, 294: 97-105.

[14] MARSHALL J. Transwell® invasion assays[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 769(2): 97-110.

[15] 栗瑞兰, 张通, 范晓梅, 等. GPX5 在成年绵羊附睾中的表达与蛋白定位[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(24): 4989-4995.

[16] 齐晓伟, 常勇杰, 于和鸣. 大鼠附睾管腔液 Mr22000 蛋白的鉴定研究[J]. *中华男科学杂志*, 2009, 15(1): 20-25.

[17] GADELLA B M. The assembly of a zona pellucida binding protein complex in sperm[J]. *Reprod Domest Anim*, 2008, 43(5): 12-19.

[18] SKERGET S, ROSENOW M A, PETRITIS K, et al. Sperm proteome maturation in the mouse epididymis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11). doi: 10.1371/journal.pone.0140650.

[19] YANG F. Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis[J]. *J Cell Biol*, 2006, 173(4): 497-507.

[20] CAO W, GERTON G L, MOSS S B. Proteomic profiling of accessory structures from the mouse sperm flagellum[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(5): 801-810.

[21] STEIN K K, GO J C, LANE W S, et al. Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions[J]. *Proteomics*, 2010, 6(12): 3533-3543.

[22] GUO X, SHEN J, XIA Z, et al. Proteomic analysis of proteins involved in spermiogenesis in mouse[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(3): 1246-1256.

[23] CHAUVIN T, XIE F, LIU T, et al. A systematic analysis of a deep mouse epididymal sperm proteome[J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(6): 141.

[24] ALVES M G, MARTINS A D, JARAK I, et al. Testicular lactate content is compromised in men with Klinefelter syndrome[J]. *Mol Reprod Dev*, 2016, 83(3): 208-216.

[25] CAMPBELL E M, NONNEMAN D J, KUEHN L A, et al. Genetic variation in the *mannosidase 2B2* gene and its association with ovulation rate in pigs[J]. *Anim Genet*, 2010, 39(5): 515-519.

[26] 陈元颖, 郝振华, 李巍. 囊泡运输的分子细胞机制[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(1): 3-12.

[27] 黄品秀, 韦继红. 受精调控机制的研究进展[J]. *中华妇幼临床医学杂志 (电子版)*, 2014, 10(1): 116-119.

[28] YARDEN Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: Signalling mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(4): 3-8.

[29] TILLO S E, XIONG W H, TAKAHASHI M, et al. Liberated PKA catalytic subunits associate with the membrane via myristoylation to preferentially phosphorylate membrane substrates[J]. *Cell Rep*, 2017, 19(3): 617-629.

[30] HE L, JIANG H, CAO D, et al. Comparative transcriptome analysis of the accessory sex gland and testis from the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1). doi: 10.1371/journal.pone.0053915.

【责任编辑 李庆玲】