

特异性精子膜蛋白的结构、功能及 基因克隆与表达的研究

王琳芳

(中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学院
医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

[关键词] 精子膜蛋白, 抗生育, 基因表达

生殖过程包括生殖细胞(精子与卵子)的发生、成熟、受精、受精卵的着床和胚胎发育等环节。精子在发生过程中,其结构、形态、功能的分化以及基因表达都受到严格的时空调控,其中精子膜蛋白的合成与转化,对精子的成熟、获能和精卵识别起着十分重要的作用。因此,深入了解与精子细胞分化、成熟有关的膜蛋白的结构、功能及基因表达,不仅对生殖分子生物学的发展具有理论意义,并为探索免疫避孕新途径,发展抗生育疫苗也具有潜在实用价值。

本项目自70年代末开始,结合国内外的情况,应用现代分子生物学技术,对精子膜蛋白的分离纯化、结构功能及基因克隆与表达进行了系统性研究。首先,采用两性离子去污剂CHAPS或非离子型去污剂TritonX-100抽提;继之,应用制备电泳及凝胶过滤、离子交换等各类层析手段,迄今已分离纯化了七种有别于文献报道、具有强免疫原性的精子膜蛋白,其中三种来自于人(分别命名为BS-17, BS-84和YWK-Ⅱ抗原),四种来自于兔(rSMP-A, rSMP-B¹¹, BE-20和ESP-2),并对其分子量、等电点、糖含量及N端氨基酸序列等性质进行了研究。

1983年,我们在国际上首次研制出能引起人精子尾对尾凝集的抗人精子膜蛋白特异单克隆抗体YWK-1,属IgG1亚型,由Y1重链和λ轻链组成,1986年已被编入美国生殖生理学专著。在精子膜蛋白领域内,我们首先开展了抗独特型抗体的研究,制备了相应于一种精子膜蛋白的抗原决定簇及其抗体的两种抗独特型抗体,为表位抗原决定簇的研究奠定了基础。

将精子膜蛋白免疫家兔,获得了多种相应抗体,应用抗体观察了其相应抗原在精子和组织中的定位以及它们在生育中的作用。免疫组化染色及间接免疫荧光定位证明,这些膜蛋白分别位于精子头部顶体区、赤道区或中段和尾部;在组织中则显示分别位于睾丸生精细胞的不同发育阶段,或副睾体、尾的主细胞。在膜蛋白与生育效应的观察中,体外穿卵试验表明,上述七种抗原的相应抗体均有明显抑制人精子穿透去透明带金黄仓鼠卵的作用,正常对照组穿卵率为98.1%,实验组分别下降至12.8%—30%。小鼠同体双子宫被动免疫实验也显示了

本项工作获“863”高技术及国家自然科学基金资助。

本文于1996年5月6日收到。

注射膜蛋白抗体侧子宫,精子与卵的结合能力被大大抑制,与对照组相比, p 值小于0.001。此外,国外实验室根据我们所发表的上述部分抗原结构合成了多聚佐剂抗原肽(YWK-Ⅱ-MAPs和SMP-B-MAPs),免疫大鼠后,确能显著抑制其生育,进一步说明此特异性抗原的相应抗体具有明显的抗生育作用^[2]。我们还应用免疫转移印迹技术,对300例不育患者血清的抗精子抗体进行了分析,发现不育患者阳性率为45%左右,而正常生育者则小于5%。我们首先分析了不育患者血清中抗精子抗体相应抗原的出现频率,其中与我们分离抗原相应的抗精子抗体出现频率约为40%,此结果进一步支持以上特异性抗原与生育的关系。

为解决精子膜蛋白的来源困难,我们进而通过三条不同的途径筛选出七种编码上述精子膜蛋白的cDNA片段。三条途径是:以特异性抗原的单克隆或多克隆抗体为探针,由自行构建的睾丸 λ gt11表达型cDNA库中筛选目的cDNA;以含抗精子膜蛋白抗体的不育者血清为探针,直接从睾丸 λ gt11cDNA库中筛选靶基因;根据所测特异性抗原的N端氨基酸顺序合成寡核苷酸引物,通过RT-PCR法扩增目的cDNA。核苷酸序列测定它们的长度:RSD-1为2069bp,RSD-2为1837bp,HSD-1为2482bp,HED-2为1926bp,BS-17为791bp,BED-20为499bp,2.4kb cDNA为2427bp。经同源性分析表明,以上七种cDNA均系首次发现,已被美国GenBank接受注册,其注册号分别为M31322,U12978,U15158,S58544,U26723,U26724和U26725。结构分析发现,其中一种cDNA(RSD-2)编码多肽近C端处有一强疏水峰,它与引起老年性痴呆症的淀粉样A4蛋白前体(APP)跨膜区高度同源,提示该编码蛋白(YWK-Ⅱ抗原)为一典型跨膜蛋白结构。分析还发现YWK-Ⅱ抗原与APP相同,从跨膜区进入胞内区有三个与跨膜终止有关的碱性氨基酸,但APP为赖氨酸-赖氨酸-赖氨酸,而YWK-Ⅱ中两个赖氨酸则被精氨酸取代。根据精子膜蛋白的结构特点,1990年在理论上提出,精氨酸-赖氨酸-精氨酸可能是精子膜蛋白跨膜终止信号结构特点的推断^[3]。1995年,国外在其它精子膜蛋白的研究中发表了相同的结构^[4]。

为进一步了解特异性精子膜蛋白在精子发生过程中的表达情况,我们首先在精子膜蛋白领域开展了转录水平的表达研究^[5],以标记转录产物反义RNA为探针,与睾丸组织切片进行组织原位杂交,结果显示,编码特异性精子膜蛋白的cDNA片段,在男性生殖系统不同部位,精子发生不同阶段被转录表达。在转译水平的表达研究中,我们选择了原核细胞(大肠杆菌)及真核细胞(哺乳动物细胞、昆虫细胞和痘苗病毒)体系,构建了一个大肠杆菌的分泌型表达载体(pSBC),改建了一个仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)的通用表达质粒(pSV₂-EP),重组质粒经转化或转染,成功地获得了在E.Coli DH5 α ,BL21(DE3)pLysS^[6]及CHO细胞中的表达,为今后大量制备抗原创造了条件。

以上工作,为在精子膜蛋白控制生育工程研究中,应用我们自己分离的cDNA研制新型抗生育疫苗奠定了坚实基础。

致谢 本项目的研究者还有中国科学院上海细胞生物学研究所严缘昌,国家计划生育委员会科学技术研究所宗书东,中国医学科学院基础医学研究所、中国协和医科大学基础医学院、医学分子生物学国家重点实验室缪时英、刘强远等研究人员。

参 考 文 献

- [1] Wang LF, Miao SY, Cao SL et al. Isolation and Characterization of a Rabbit Sperm Tail Protein. *Archives of Andrology*, 1986, **16**: 55-66.
- [2] Vanage G, Jaiswal YK, Lu Y A et al. Immunization with Synthetic Peptide Segments of a Sperm Protein Impair Fertility in Rats. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 1994, **84** (1): 1-15.
- [3] Yan YC, Bai Y, Wang LF et al. Characterization of cDNA Encoding a Human Sperm Membrane Protein Related to A4 Amyloid Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, **87**: 2405-2408.
- [4] Hardy DM and Garbers DL. A Sperm Membrane Protein that Binds in a Species-Specific Manner to the Egg Extracellular Matrix is Homologous to Von Willebrand Factor. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270** (44): 26025-26028.
- [5] Wang LF, Miao SY, Yan YC et al. Expression of a Sperm Protein Gene during Spermatogenesis in Mammalian Testis: An in Situ Hybridization Study. *Molecular Reproduction and Development*, 1990, **26**: 1-5.
- [6] Liu QY, Wang LF, Miao SY et al. Expression and Characterization of a Novel Human Sperm Membrane Protein. *Biology of Reproduction*, 1996, **54**: 323-330.

STUDIES ON STRUCTURE, FUNCTION, GENE CLONING AND EXPRESSION OF SPECIFIC SPERM MEMBRANE PROTEIN

Wang Linfang

*(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, National Laboratory of
Medical Molecular Biology, Peking Union of Medical College, Beijing 100005)*

Key words sperm membrane protein, antifertility, gene expression

征 订 启 事

《中国科学基金》杂志1997年的征订工作已经开始,请读者到当地邮局预订。邮发代号:82-413。1997年定价不变,全年16元。

本刊英文版——《Science Foundation in China》(半年刊)已从1993年开始出版发行。每年定价40元人民币,境外订阅美金40元(包括邮费),由本编辑部自办发行。刊号CN11-2851/N。

另外,本刊1996年出版了一期增刊——管理专刊。集中刊登有关科学基金管理方面的文章,需要订阅的读者请与编辑部直接联系购买。定价4元。