

# 家兔精子膜蛋白 rSP10 在大肠杆菌中的高效表达 及其抗血清的制备

刘建喜<sup>1</sup> 林爱星<sup>1</sup> 杨毅<sup>2</sup> 侯健<sup>1</sup> 胡宏宇<sup>1</sup> 陈永福<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094 )

<sup>2</sup>( 中国农业大学生物学院 北京 100094 )

**摘 要** 为研究家兔精子膜蛋白 rSP10 在精子膜上的定位及其免疫原性,将不含编码信号肽序列的 rSP10 基因插入表达载体 pET30a 中, N 端具有 His<sub>6</sub> 肽的融合蛋白 re-rSP10 得到高效表达,表达产物达细菌总蛋白的 67%。经 DEAE 柱层析纯化表达产物 re-rSP10,产量约为 50mg/mL 培养物。Western 实验结果表明,精子膜蛋白多克隆抗体能识别 re-rSP10,说明大肠杆菌表达的 re-rSP10 具有免疫原性。用纯化的 re-rSP10 免疫雌性兔,得到 re-rSP10 专一性多克隆抗血清。将 re-rSP10 专一性多克隆抗血清加入获能精子中,发现 SP10 专一性多克隆抗血清严重影响获能精子的运动并且表现为剂量依赖性,但获能精子凝集现象并不明显。

**关键词** 家兔 精子膜蛋白 rSP10 表达 抗血清

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0314-04

精子膜蛋白 SP10 是一种分化抗原,可在精子生成周期中的高尔基期(Golgi phase)和后续阶段检测出来,位于精子细胞顶体小泡的内部,是成熟精子的顶体内在蛋白<sup>[1]</sup>。顶体反应后仍存留于精子顶体内膜上<sup>[2]</sup>。

Northern 分析表明 SP10 仅在睾丸中表达,抗 SP10 的单抗与其他组织没有免疫交叉反应,这说明 SP10 具有组织特异性分布<sup>[3]</sup>。已经发现 SP10 广泛存在于小鼠<sup>[4]</sup>、大鼠(基因登录号:AJ243484)、狐<sup>[5]</sup>、牛<sup>[6]</sup>、猪<sup>[7]</sup>、狒狒<sup>[7]</sup>、猴<sup>[7]</sup>和人<sup>[8]</sup>等物种中。SP10 的组织特异性分布及其在不同物种中的广泛存在,暗示 SP10 在动物受精过程中扮演着重要角色,在生殖免疫避孕方面具有潜在应用价值。

SP10 单抗能抑制精子穿过去透明带的仓鼠卵,WHO 已将 SP10 定为首选疫苗(Primary vaccine candidate)<sup>[9]</sup>。牛体外受精实验发现,SP10 抑制受精的完成发生在精子对透明带的第二次结合<sup>[6]</sup>。

以家兔作模型,为了确定家兔精子膜蛋白 rSP10 在精子中的位置及其在精卵识别过程中的作用,在克隆了家兔 rSP10 基因基础上,决定在大肠杆菌中表达 re-rSP10,并制备 re-rSP10 专一性多克隆抗体。

## 1 材料与方法

### 1.1 重组表达载体的构建

为保证阅读框架的一致性以及引入合适的酶切位点,参照本室克隆的基因 rSP10(Genbank 登录号 AF251558)设计下列引物序列:上游引物 sp I 5'-cag gga tcc cag cct gat gag cct cct-3' 对应于 AF251558 (103bp-120bp);下游引物 sp II 5'-ca aag ctt agg ctt ctg gac ctt gtt-3' 对应于 AF251558 (1033bp-1050bp),引物由上海生工生物工程公司合成。以家兔睾丸 cDNA 文库总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,条件为 94℃ 5min,1 个循环;94℃ 50s,52℃ 40s,72℃ 1min,30 个循环;72℃ 延伸 20min。PCR 扩增产物经 BamHI 和 HindIII 双酶切定向克隆到 pET-30a(Promega)上,构建家兔精子膜蛋白重组表达载体 pET-30-rSP10,测序分析 pET-30-rSP10。

### 1.2 重组蛋白的诱导表达和纯化

重组表达载体 pET-30-rSP10 转化 BL21(DE3) (Promega)挑单克隆在含有 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37℃ 摇菌,当 OD<sub>600</sub> 达到 0.2 时,加入 IPTG 至终浓度 0.5mmol/L,诱导 pET-30-rSP10 表达,

2h 后收集菌液 1mL,离心沉淀,加 2×SDS 上样缓冲液,煮沸 3min,12% SDS-PAGE<sup>[10]</sup> 检测表达情况。IPTG 诱导表达的重组菌株培养液 1000mL 离心沉淀,TE(20mmol/L Tris-Cl,1mmol/L EDTA,pH8.0)洗涤,重悬于 100mL TE(20mmol/L Tris-Cl,1mmol/L EDTA,pH8.0,1mmol/L PMSF),超声破碎,离心弃沉淀菌体,上清用(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀,沉淀重溶于 3mL TE,透析脱盐。透析产物经柱层析纯化,填料为 DEAE-Sephrose Fast Flow(Pharmacia),用 0.1mol/L KCl 洗脱,0.15mol/L KCl 洗脱回收,12% SDS-PAGE 检测纯化产物。

### 1.3 制备精子膜蛋白多克隆抗血清

采集家兔精液-70℃冻存,共采集 20mL 精液。精液冰上解冻,经 1500g 离心 10min,弃去精浆,用 D-PBS(5mg/L Phenel,36mg/L Sodium pyruvate,100mg/L CaCl<sub>2</sub>,D-glucose 1000mg/L)悬浮精子细胞。重复洗涤 2 次,以彻底去掉精浆蛋白。用增溶缓冲液(0.4% NP-40,0.2% SDS,0.01mol/L Tris-Cl,0.15mol/L NaCl,0.001 mol/L CaCl<sub>2</sub>,0.001 mol/L MnCl<sub>2</sub>,pH7.4)调整精子浓度为 10<sup>7</sup> 个/mL,加入 PMSF 至终浓度 1mmol/L,冰上温和搅拌 1h。精子悬液在 4℃ 下 10 000g 离心 1h,收集上清加入 4×体积-20℃预冷丙酮,-20℃放置 30min,4℃ 下 10 000g 离心 15min 收集沉淀。将沉淀溶解于含 1mmol/L PMSF,5mmol/L Benzamidene(sigma) 1μg/mL Pepstatin(sigma),1μg/mL Leupeptin(sigma) 增溶缓冲液中。免疫雌性新西兰兔分离抗血清并检测效价<sup>[10]</sup>。

### 1.4 精子膜蛋白多克隆血清检查重组蛋白免疫原性

重组蛋白菌株裂解液经 SDS-PAGE 后,以 100V 电压将蛋白电转移至硝酸纤维素膜上。以家兔精子膜蛋白多抗为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗(Sigma) 4-氯-1 奈酚(Promega)显色<sup>[10]</sup>。

### 1.5 重组蛋白专一性抗血清的制备

初免以 1mg 纯化重组蛋白 re-SP10 和等量弗氏完全佐剂乳化后皮下多点免疫 5~6 月龄未产母兔,15d 后以 1mg 纯化重组蛋白 re-SP10 和等量弗氏不完全佐剂乳化后肌注加强免疫,再过两周后以 1mg 纯化重组蛋白 re-SP10 和等量弗氏不完全佐剂乳化后腹腔注射加强免疫,10d 后耳静脉采血,ELISA 检查抗体滴度。选择高滴度母兔 5d 后静脉注射 1mg 纯化重组蛋白强化免疫,10d 后心脏大量采血,分离血清并分装,保存于-20℃备用。

### 1.6 重组蛋白抗血清对获能精子运动的影响

采集家兔精子,进行获能处理<sup>[11]</sup>,将获能精子

调整至 10<sup>6</sup>/mL。准备 4 个培养皿 A、B、C 和 D,每个加 100μL。A 中加入 10μL 对照血清,B 中加入 10μL 重组蛋白专一性抗血清,C 中加入 5μL 对照血清和 5μL 重组蛋白专一性抗血清,D 中加入 2μL 对照血清和 8μL 重组蛋白专一性抗血清。观察精子运动情况。

## 2 结果

### 2.1 重组表达载体的构建

用带有 BamHI 和 HindIII 限制性酶切位点的引物扩增 948bp 的片段,PCR 扩增产物经 BamHI 和 HindIII 双酶切定向克隆到 pET-30a 上,连接产物能切下一条约 900bp 的片段(Fig1)。经过测序分析表明,构建好的家兔精子膜蛋白重组表达载体 pET-30-rsp10 插入序列没有突变,连接相位正确。

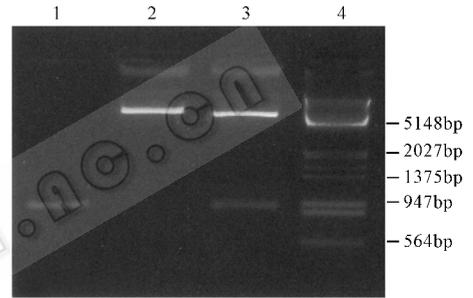


图 1 重组质粒 pET-30-rsp10 的酶切鉴定

Fig.1 0.8% agarose gel electrophoresis of PCR product and restriction enzyme assay of recombinant vector

- 1 PCR product of rsp10
- 2 pET-30a/BamHI + HindIII
- 3 pET-30-rsp10/BamHI + HindIII
- 4 Lambda DNA/EcoRI + HindIII

### 2.2 重组蛋白表达、纯化及与精子膜蛋白多抗的免疫印迹分析

根据插入 cDNA 的长度和融合蛋白的 His<sub>6</sub> tag,推测 re-SP10 的大小约为 32.7kD,而重组蛋白的表观分子量约为 60kD(Fig.2)。经 SDS-PAGE 凝胶电泳扫描分析,测得表达的重组蛋白 re-SP10 占细菌蛋白的 67%(Fig.2)。

re-SP10 纯化的最后产量大概为 50μg/mL 培养基,纯度达到 95%(Fig.3a)。与精子膜蛋白多克隆抗血清的免疫印迹分析证明,虽然存在非特异性现象,但多克隆抗血清能识别重组的家兔精子膜蛋白 SP10(Fig.3b)。

### 2.3 重组蛋白抗血清对获能精子运动的影响

在获能精子中加入抗血清,可以观察到如下结果(图 4)。精子经过获能处理后,活力约为 0.8,加入对照血清(A)后,随着时间的推移,直线运动的

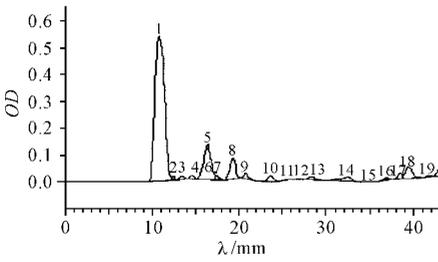


图 2 在大肠杆菌中的高效表达 re-SP10

Fig.2 Density scanning analysis of the percentage of re-SP10 in total *E. coli* proteins

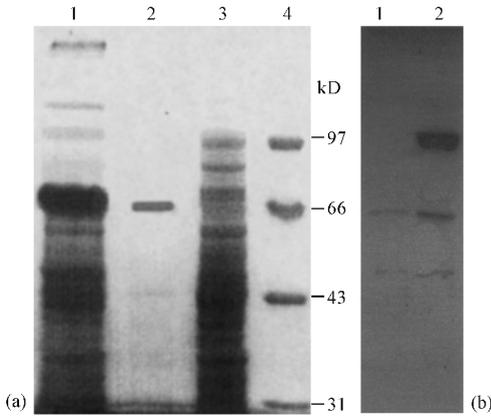


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析 (a) 和免疫原性鉴定 (b)

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant SP10 in *E. coli* (a) 1. Induced BL21 (DE3)-pET-30-re-rSP10 ; 2. Purified re-rSP10 fusion protein 3. None induced BL21 (DE3)-pET-30-re-rSP10 ; 4. Molecular mass markers ; (b) Western blot of (a) 1. immunoblotted with pre-immune sera ; 2. Immunoblotted with immune sera

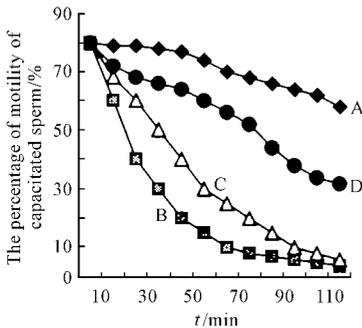


图 4 重组蛋白抗血清对获能精子运动的影响

Fig.4 Antisera against re-rSP10 effects on the motility of capacitated sperms

(A) Representation of control antisera. Antisera against re-rSP10 at dilution of 1 :1(A), 1 :20(B), 1 :50(C) and 1 :500(D)

获能精子数略有降低,出现少量的凝集现象。加入 rSP10 抗血清 (B, C, D) 后,随着抗血清增加,直线运动的获能精子数迅速减少。2h 后,C 和 D 中的直线运动的获能精子数接近于零。B 中精子也有少量凝

集,C 和 D 中精子之间没有凝集现象。

### 3 讨论

SP10 含有 334 个 aa,其 N 端 21aa 为信号肽。成熟 rSP10 具有 313aa,N 端和 C 端是疏水区,中间是亲水区 (Fig.5)。根据 rSP10 结构预测其功能区应为中间的膜外侧的亲水区,而 C 端高度保守,具有强烈的疏水性,不可能具有重要的免疫原性表位<sup>[12]</sup>。

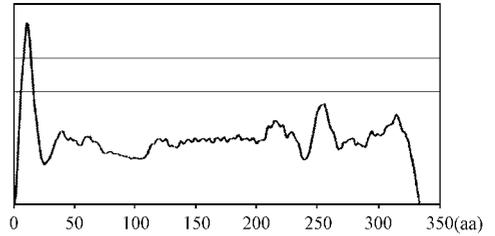


图 5 rSP10 多肽跨膜区的预测

Fig.5 “DAS” TM-segment prediction of rSP10

PCR 扩增的片段不包含 rSP10 信号肽,故重组表达载体 pET-30-rSP10 中的插入片段编码 22aa-334aa。为便于用疏水柱进一步纯化经 DEAE 纯化的重组蛋白,并研究其功能,在融合蛋白的 N 端设计有 His<sub>6</sub> tag。

re-rSP10 含 319aa,理论分子量为 32.7kD,但 re-rSP10 在 SDS-PAGE 凝胶电泳中表观分子量为 60kD,大于理论分子量。这种现象在老鼠<sup>[13]</sup>、狒狒<sup>[14]</sup>和人<sup>[14]</sup>的 sp10 基因在原核表达过程中也出现过,其原因可能是由于 rsp10 基因带负电 aa (Asp + Glu) 较多,达 46aa,使重组蛋白等电点理论值为 4.83,影响了 SDS 与多肽的结合,使 SDS-多肽复合物表面负电荷密度降低,从而使迁移率降低,表观分子量变大。

精子膜蛋白多克隆抗体能成功识别 re-rSP10,说明精子膜蛋白多克隆抗体中的 rSP10 多抗能识别 re-rSP10, re-rSP10 具有免疫原性,适合于用作抗原,可以用于制备 rSP10 专一性多克隆抗体,进一步用于 sp10 基因功能方面的研究。

对人、狒狒、猴和猪的 SP10 多肽进行免疫定位,发现其位于精子顶体内膜上,只有在精子获能发生顶体反应后,SP10 才暴露出来<sup>[15,6,9]</sup>。在体外受精过程中,重组蛋白抗血清对受精过程的影响表现为剂量依赖性<sup>[15]</sup>。SP10 单抗能降低体外受精率,但不影响精卵第一次结合<sup>[9]</sup>。进一步研究认为,SP10 的单抗可能通过阻止精子的 SP10 在顶体反应后实现其功能,或者是 SP10 的单抗使精子不能紧密结合于透明带上,导致顶体内容物无法暴露于卵的胞外基

质中,达到阻碍受精的目的<sup>[6]</sup>。牛体外受精实验认为 SP10 抑制受精完成,发生在精子对透明带的第二次结合<sup>[6]</sup>。考虑到 SP10 只有在获能精子发生顶体反应后才能暴露出来和抗体对受精过程的影响属于剂量依赖性两个因素,本实验在精子获能后加入中等剂量抗血清,对获能精子的运动进行了研究。发现 SP10 专一性多克隆抗血清严重影响获能精子的运动并且表现为剂量依赖性,但获能精子凝集现象并不明显,这与其他研究结果<sup>[6,9,16]</sup>不一致。有关精子膜蛋白 SP10 在精卵识别中的功能还有待于进一步研究。

免疫生殖避孕是生殖避孕的有效方法,SP10 能满足作为避孕疫苗的的必要条件。本实验室已克隆 *rsp10* 基因,成功地在大肠杆菌中表达了重组的 rSP10,并制备了表达产物的专一性多克隆抗血清,这为以家兔作模型,研究 *rsp10* 基因在精卵识别过程中的作用奠定了基础。

## REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Kurth B E, Flickinger C J, Herr J C. Localization of sperm antigen SP-10 during the six stages of the seminiferous epithelium in man. *Biol Reprod*, 1991 **44** :814 ~ 821

[ 2 ] Foster J A, Herr C. Interaction of human sperm acrosomal protein SP-10 with the acrosomal membrane. *Biol Reprod*, 1992 **46** :981 ~ 990

[ 3 ] Freemerman A J, Wright R M, Flickinger C J *et al.* Tissue specificity of the acrosomal protein SP-10: A contraceptive vaccine candidate molecule. *Biol Reprod*, 1994 **50** :615 ~ 621

[ 4 ] Liu M S, Aebersold R, Fann C H *et al.* Molecular and development studies of a sperm acrosome antigen recognized by HS-61 monoclonal antibody. *Biol Reprod*, 1992 **46** :937 ~ 948

[ 5 ] Beaton S, Have J, Cleary A *et al.* Cloning and characterization of the cDNA encoding the fox sperm protein FSA-Acr.1 with similarities to the SP-10 antigen. *Mol Reprod Dev*, 1995 **40** :242 ~ 252

[ 6 ] Coonrod S A, Herr J C, Westhusin M E. Inhibition of bovine fertilization *in vitro* by antibodies to SP-10. *J Reprod Ferti*, 1996 **107** :287 ~ 297

[ 7 ] Herr J C, Wright R M, Jhon E *et al.* Identification of human acrosomal antigen SP10 in primates and pigs. *Biol Reprod*, 1990 **42** :377 ~ 382

[ 8 ] Herr J C, Flickinger C J, Homyk M *et al.* Biochemical and morphological characterization of the intra-acrosomal antigen SP10 from human sperm. *Biol Reprod*, 1990 **42** :181 ~ 193

[ 9 ] Anderson D J, Johnson P M, Alexander N J *et al.* Monoclonal antibodies to human trophoblast and sperm antigens: report of two WHO sponsored workshops, Toronto, Canada, June 30, 1986. *J Reprod Immunol*, 1987, **10** :231 ~ 257

[ 10 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[ 11 ] Brackett B G, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod*, 1975, **12** :260 ~ 274

[ 12 ] Reddi P, Castillo J R, Klotz K *et al.* Production in *Escherichia coli*, purification and immunogenicity of acrosomal protein SP-10, A candidate contraceptive vaccine. *Genem*, 1994, **147** :189 ~ 195

[ 13 ] Wright R M, Jhon E, Klotz K *et al.* Cloning and sequencing of cDNAs for the human intra-acrosomal antigen SP-10. *Biol Reprod*, 1990 **42** :693-701

[ 14 ] Wright R M, Suri A K, Kornreich B *et al.* Cloning and Characterization of the gene coding for the human acrosomal protein SP10. *Biol Reprod*, 1993 **49** :316 ~ 325

[ 15 ] Naz R K, Alexander N J, Isahakia M *et al.* Monoclonal antibody to a human germ cell membrane glycoprotein that inhibits fertilization. *Science*, 1984 **225** :342 ~ 344

[ 16 ] Foster J A, Klotz K, Flickinger C J *et al.* Human SP-10: acrosomal distribution, processing and fate after the acrosome reaction. *Biol Reprod*, 1994 **51** :1222 ~ 1231

## High Expression of Rabbit Sperm Membrane Protein rSP10 in *Escherichia coli* and Preparation of its Specific Antisera

LIU Jian-Xi<sup>1</sup> LIN Ai-Xing<sup>1</sup> YANG Yi<sup>2</sup> HOU Jian<sup>1</sup> HU Hong-Yu<sup>1</sup> CHEN Yong-Fu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> National Laboratories for Agrobiotechnology; <sup>2</sup> College of Biology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** To study the position and immunogenicity of rSP10, the rabbit *rsp10* gene which did not include sequences coding for signal peptides was inserted into expression vector pET30a. An in-frame fusion protein was made such that a His<sub>6</sub> stretch was produced at the N terminus of re-rSP10. High expression was obtained, the amount of re-rSP10 up to 67% in the total bacterial protein. The re-rSP10 was purified by DEAE chromatography and the yield of purified re-rSP10 was approximately 50 μg/mL of culture. Western blotting analysis of re-rSP10 with rabbit polyclonal sera raised against rabbit sperm membrane protein showed that the synthesized antigen possessed immunogenicity of rSP10. Specific antisera against re-rSP10 was induced using purified re-rSP10 as an antigen. The motility of capacitated sperms were affected but no aggregation was observed.

**Key words** rabbit, sperm membrane proteins, rSP10, expression, antisera

Received: November 6, 2000

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62893464; Fax: 86-10-62893055; E-mail: [liujianxi600@cau.edu.cn](mailto:liujianxi600@cau.edu.cn) 中国农业科学院生物技术研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>