文章编号:1000-5404(2010)21-2263-06

论著

人精子纤维鞘多态性蛋白CABYR的寡聚化作用

李彦锋[1],何 畏[2],梁培禾[1],张 军[1],孙中义[1],张 勇[1],王洛夫[1],靳凤烁[1], Charles J. Flickinger[3], John C. Herr[3]
(400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科[1],400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科[2];22908 USA,美国弗吉尼亚大学细胞生物学系避孕和生殖健康研究中心, Charlottesville, VA[3])

【摘要】 目的 验证钙结合酪氨酸磷酸化调节蛋白(calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein, CABYR)不同异构体之间寡聚体的形成。方法 人精子提取物进行非还原和还原条件下的SDS-PAGE、二维IEF/SDS-PAGE、对角线电泳、二维blue native/SDS-PAGE电泳和免疫印迹分析。结果 在人精子中丰度最高的CABYR亚型是相对分子质量86×10^3仅含CRA编码区表达序列,具有钙结合能力的异构体。同时也存在既含CRA又含CRB编码区表达序列的CABYR亚型。在非还原条件下,丰度最高的130×10^3二聚体是由仅含CRA表达序列的86×10^3异构体和既含CRA又含CRB表达序列的50×10^3异构体组成。$(200\sim220)\times10^3$寡聚体是由86×10^3、50×10^3异构体,以及35×10^3(可能既含CRA又含CRB表达序列)的异构体和仅含CRA表达序列的30×10^3异构体组成。结论 证实CABYR异构体可形成寡聚体,CABYR主要通过86×10^3和50×10^3异构体形成异质二聚体,与其他CABYR异构体结合进一步形成更大的寡聚体,参与了人精子纤维鞘超分子结构的装配和形成。

【关键词】 钙结合酪氨酸磷酸化调节蛋白;精子;纤维鞘;寡聚化作用;多态性
【中图法分类号】 R321.1;R394-33;R394.3 **【文献标志码】** A

Oligomerization of Polymorphic protein CABYR in human sperm fibrous sheath

Li Yanfeng[1], He Wei[2], Liang Peihe[1], Zhang Jun[1], Sun Zhongyi[1], Zhang Yong[1], Wang Luofu[1], Jin Fengshuo[1], Charles J. Flickinger[3], John C. Herr[3] ([1]Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]Department of Cell Biology, Center for Research in Contraceptive and Reproductive Health, University of Virginia, Charlottesville, VA 22908, USA)

【Abstract】 **Objective** To confirm the formation of oligomers by different isomers of CABYR, a calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein. **Methods** Different human sperm extracts were analyzed by SDS-PAGE, 2D IEF/SDS-PAGE, 2D diagonal gel electrophoresis, 2D blue native/SDS-PAGE and Western blotting, respectively, in native or non-reducing condition and reducing condition. **Results** The most abundant and predominant subtype of CABYR in human sperms was CABYR-A with a 86×10^3 variant. Some variants contained both CABYR-A and CABYR-B. CABYR isomers were oligomerized by binding through disulfide bond. A 130×10^3 heterodimer was composed of a 86×10^3 CABYR-A variant and a 50×10^3 variant containing both CABYR-A and CABYR-B. A $(200-220)\times10^3$ isomer contained 86×10^3 variant and a 50×10^3 variant, as well as a 35×10^3 variant (may containing both CABYR-A and CABYR-B) and a 30×10^3 variant (CABYR-A only). **Conclusion** CABYR isomers can form oligomers mainly by 86×10^3 and 50×10^3 variants, and form large oligomers by binding to other CABYR isomers. CABYR isomers participate in assembly and formation of supra molecular structure of fibrous sheath in human sperms.

【Key words】 CABYR; spermatozoa; fibrous sheath; oligomerization; polymorphism

Supported by D43 TW/HD 000654 from the Fogarty International Center, NIH and the Starting Fund for Overseas Returning Scholar of Third Military Medical University(2007). Corresponding author: Li Yanfeng, Tel: 86-23-68757947, E-mail: lyf1000@yahoo.com.cn

【基金项目】 美国Fogarty国际中心D43 TW/HD 000654基金;第三军医大学回国人员启动基金(2007)
【通信作者】 李彦锋,电话:(023)68757947,E-mail:lyf1000@yahoo.com.cn

完整的精子尾部可分为4个节段:连接头部的颈段、被螺旋排列的线粒体紧密包裹的中段、占尾部约3/4长度由纤维鞘包绕的主段和短的末段[1]。纤维鞘

是一种位于浆膜下包绕轴丝和外致密纤维的独特细胞骨架结构。它由2条纵形柱状体以及与之相连紧密排列的环形纤维肋组成。传统观点认为纤维鞘为精子尾部提供机械支撑,通过调节尾部的弯曲来影响其灵活度,限制其运动平面和尾部摆动形态[1,2]。然而近年来,纤维鞘相关蛋白的研究显示纤维鞘为多种糖酵解酶和信号级联放大通路的组分提供支架,从而发挥调节精子运动的功能[1]。纤维鞘不仅作为一种被动的弹性成分发挥作用,而且是精子尾部运动的主动调节器。目前发现与纤维鞘有关的蛋白有20余种[3-15],钙结合酪氨酸磷酸化调节蛋白(calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated protein,CABYR)是美国John C Herr小组在通过蛋白质组学策略寻找人精子中钙与蛋白酪氨酸激酶信号转导通路之间相关联的靶蛋白时发现的一种定位于精子主段的纤维鞘内,高度多态性的钙结合蛋白[15]。人CABYR基因具有2个编码区CRA和CRB,被1个插入的终止密码所分开,翻译产生6种不同的剪接异构体(Ⅰ~Ⅵ)。推测受磷酸化作用调节,CABYR异构体之间可发生寡聚化作用并可能参与精子的获能和运动超活化过程。但是,至今尚没有直接的证据证实CABYR异构体之间的寡聚化作用。本研究利用二维对角线电泳,BN-PAGE电泳,结合二维IEF-SDS/PAGE电泳对CABYR蛋白二聚体,寡聚体的形成进行了分析鉴定。

1 材料与方法

1.1 非还原和还原条件下的SDS-PAGE

按照文献[16]所述方法制备获得上游的人类精子。细胞浓度5×10^8/ml的精子常规溶解于Celis裂解液中[17],该裂解液由9.8 mol/L尿素,2% NP-40,蛋白酶抑制剂[2 mmol/L PMSF、3 mg/ml L-1-chlor-3-(4-tosylamido)-7-amino-2-heptanon-hydrochloride (TLCK)、5 mmol/L碘乙酰胺、5 mmol/L EDTA、1.46 μmol/L胃蛋白酶抑制剂A和2.1 μmol/L亮抑酶肽]和含有(还原条件)或不含(非还原条件)100 mmol/L二硫苏糖醇(DTT)或5% β-巯基乙醇(β-ME)。4 ℃持续振荡30~60 min,在16 000×*g*下离心5 min去除不溶性物质,上清液用于SDS-PAGE分析。

1.2 人类精子蛋白二维IEF/SDS-PAGE

按照上面方法制备精子提取液。1×10^8/ml精子溶解于含有100 mmol/L DTT的Celis裂解液中。取200 μl精子提取物,加入2%(体积分数)Ampholines (pH 3.5~10)后应用于第一维IEF电泳(等电聚焦)。非线性胶条(11 cm, pH 3~10)中加入200 μl样品,在50 V下水化12 h以上。IEF采用线性坡度上升直至8 000 V,总剂量为30 000 V·h,电流限制在每胶条50 mA,温度保持在20 ℃。等电聚焦完成后,IPG胶条在含有37.5 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)、6 mol/L尿素、4% SDS、20%甘油和100 mmol/L DTT的平衡缓冲液中孵育20 min。平衡后的IPG胶条转移至4%~15%的线性梯度凝胶,在室温下进行二维电泳(SDS-PAGE)(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)。

1.3 二维非还原/还原条件下的对角线电泳

对角线SDS-PAGE基本上参照文献[18]的方法进行。使用标准电泳设备,制备1.0 mm厚和1.5 mm厚的4%~15%大规格梯度凝胶(20 cm×16 cm, Protean II XL, Bio-Rad)分别用于对角线电泳的第一维和第二维电泳。在所有实验中,100~200 μg Celis裂解液(不含β-ME和DTT)精子样品用不含β-ME和DTT的2×样品缓冲液以1∶1稀释后,用于第一维电泳。电泳完成后,切取含有已经分离后蛋白的整条泳道胶条,置于含有还原缓冲液的容器内室温下孵育15 min。胶条旋转90°,水平置于第二维凝胶顶部,加入含有DTT或β-ME的SDS缓冲液覆盖胶条以提供还原条件,按常规方法进一步分离蛋白。在该阶段,由二硫键连接的蛋白可被DTT或β-ME分离,从而使其在第二维还原条件电泳下迁移至与第一维相比更低的真实分子量位置。凝胶进行考马斯亮蓝R-250染色或银染,或转膜后进行Western blot分析。

1.4 二维blue native/SDS-PAGE(BN/SDS-PAGE)电泳

精子细胞非变性条件下的天然蛋白裂解物的制备参照文献[19]所述方法进行。2×10^8上游精子溶解于250 μl CSH裂解液中[50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 25 mmol/L氯化钠, 1 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF和复合蛋白酶抑制剂(Roche, Indianapolis, IN)],冰浴30 min后,裂解物在4 ℃, 15 000×*g*下离心20 min,取上清液,置于冰上用于下一步试验。取125 μl上清液,与375 μl BN缓冲液(500 mmol/L ε-氨基己酸, 20 mmol/L Bistris, pH 7.0, 2 mmol/L EDTA, 12 mmol/L氯化钠,10% 甘油, 0.1% Triton X-100和1 mmol/L PMSF)混合后,置于Microcon YM50或YM10过滤柱中(Amicon Bioseparations; Millipore, Bedford, MA),在4 ℃, 15 000×*g*下离心45 min。去除滤出物,再加入450 μl预冷BN缓冲液于过滤柱中,同法离心共4次,最后离心后,倒置过滤柱于一微型离心管内,在350×*g*下离心1 min收集样品。制备5%~15% BN梯度胶(1.0 mm厚)。取等体积BN缓冲液(加入0.1%考马斯亮蓝G250)作为样品缓冲液加入等体积样品中,上样于上述胶中,取高分子量蛋白标准品(Amersham Biosciences)作为蛋白标志,在4 ℃下过夜电泳,电泳使用蓝色的阴极缓冲液(50 mmol/L Tricine, 15 mmol/L Bistris, pH 7.0)和阳极缓冲液(50 mmol/L Bistris, pH 7.0)。电泳完成后,切取单条泳道胶条,在含有还原剂(5% β-ME or 100 mmol/L DTT)的2×SDS Laemmli上样缓冲液中平衡20 min,然后置于1.5 mm厚的第二维SDS-PAGE胶上,用1×SDS Laemmli上样缓冲液覆盖,按常规方法进行第二维电泳,转膜及Western blot分析。

1.5 免疫印迹

电泳分离的蛋白质转移到PVDF上,膜使用含5%脱脂牛奶的PBS在室温下封闭1 h,加入免疫前血清或一抗(2种抗血清分别系通过应用CRA和CRB编码区重组表达序列蛋白CABYR-A和CABYR-B免疫大鼠获得,分别识别含CABYR-A和CABYR-B序列的异构体,均为美国弗吉尼亚大学避孕和生殖健康研究中心制备,工作浓度:抗-CABYR-A血清:1∶3 000;抗-CABYR-B血清:1∶1 000),4°C下孵育过夜,用含0.05%吐温-20的PBS缓冲液洗涤3次,加入HRP标记的羊抗大鼠IgG(Sigma-Aldrich公司),室温孵育1 h,同上法洗涤3次,免疫印迹信号通过化学发光试剂ECL (Amersham Pharmacia Biotech),或化学显色试剂3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(TMB)检测(Kirkegaard and Perry lab)。

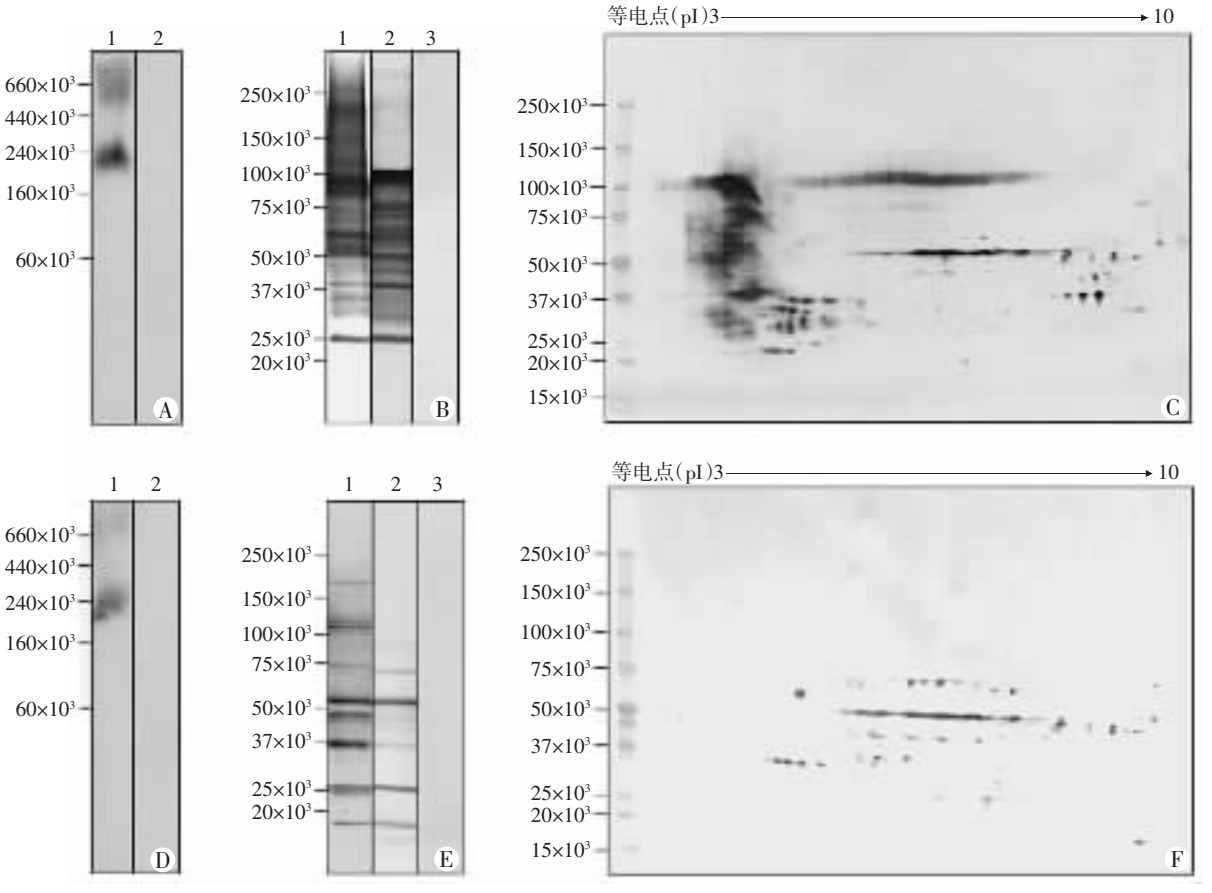
2 结果

2.1 人 CABYR 蛋白的多态性

应用精子非变性条件下的天然蛋白提取物，还原和非还原条件下的精子提取物进行一维 blue native/SDS-PAGE，SDS-PAGE，二维对角线电泳和免疫印迹分析，结果发现应用抗-CABYR-A（图 1A）或抗 CABYR-B 抗体（图 1D）的免疫印迹显示在非变性条件下含 CRA 和 CRB 表达序列的 CABYR 蛋白均呈 200×10^3 的条带，在非变性胶中亦可见更高分子量的弥散性条带出现，但 200×10^3 的条带是非变性条件下该蛋白最主要的存在类型。在非还原条件下，该 200×10^3 条带仍然清晰可见，但该条带的大部分已经裂解为不同较低分子量条带（图 1B、E，第 1 道）。在还原条件下，CABYR 的所有异构体裂解为单体并根据其分子量大小而分离（图 1B、E，第 2 道）。免疫印迹显示含 CRA 表达序列的异构体表达丰度明显高于含 CRB 表达序列的异构体。丰度最高的主要异构体是表观分子量 86×10^3，仅含 CRA 表达序列的异构体 CABYR-A。某些异构体既含 CRA 又含 CRB 表达序列（图 1B、E，第 2 道）。人 CRA（图 1C）和 CRB 表达序列（图 1F）阳性蛋白在二维电泳免疫印迹中显示为大量散在多处的阳性斑点，而且，大部分为仅 CRA 表达序列阳性。部分异构体既含 CRA 又含 CRB 表达序列，如 50×10^3 和 35×10^3 的异构体。

2.2 人精子 CABYR 寡聚化作用鉴定

应用人精子蛋白提取物行二维对角线电泳后，使用抗 CABYR-A 多抗（抗血清）（图 2A）和免疫前血清（图 2B）进行免疫印迹分析鉴定 CABYR 异构体之间寡聚化作用。应用抗 CABYR-A 抗体的免疫印迹显示既含 CRA 又含 CRB 表达序列的 50×10^3 异构体在还原条件下仍迁移至同一水平，提示该异构体为一单体。一维电泳下所示（70～75）$\times10^3$ 条带在还原条件下迁移至 50×10^3，提示该条带可能是由 1 个 50×10^3 异构体



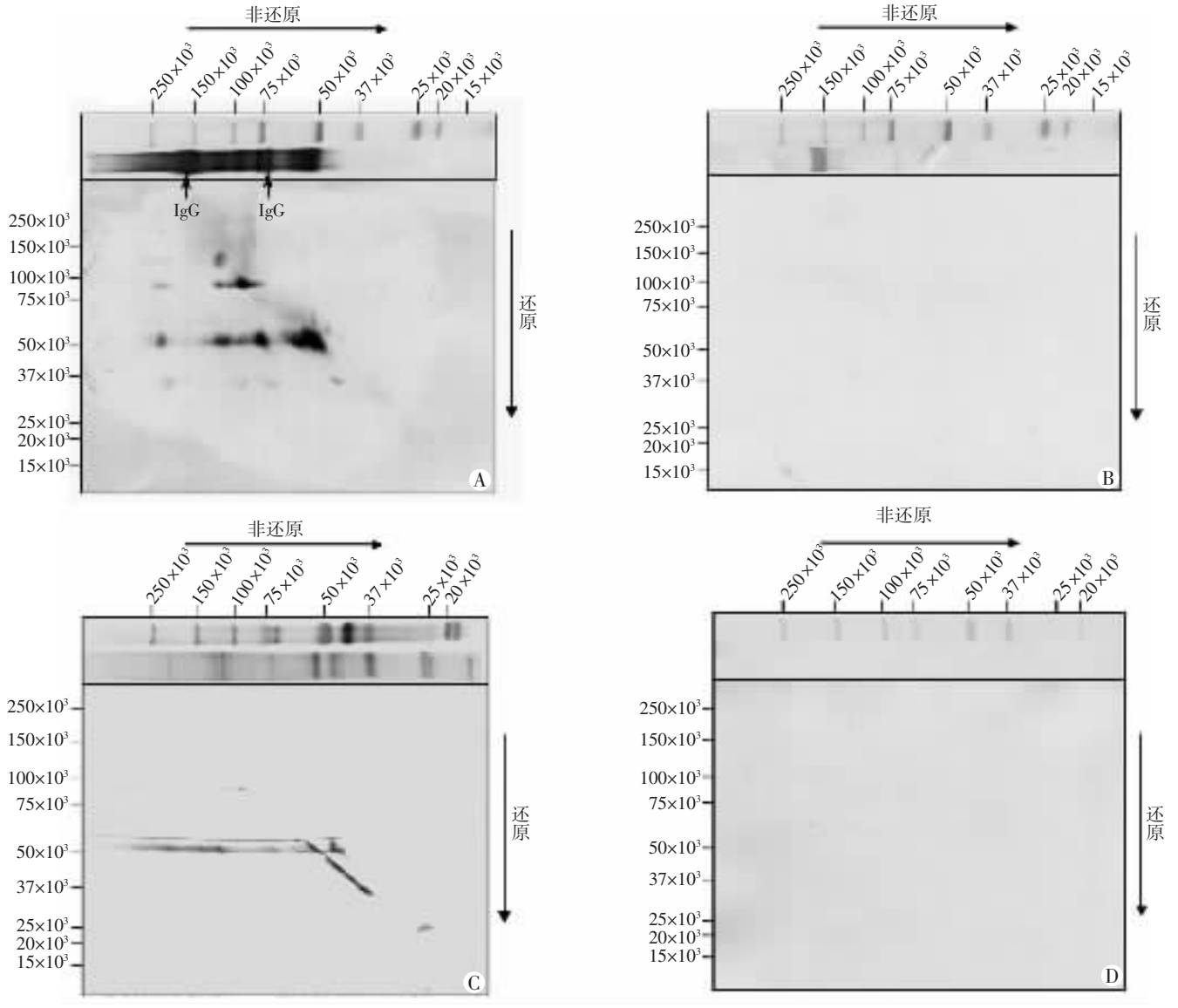
A：非变性条件下 CABYR-A 免疫印迹　1：抗 CABYR-A 血清，2：免疫前血清（阴性对照）；B：非还原和还原条件下 CABYR-A 免疫印迹　1：非还原条件下 CRA 表达序列阳性蛋白，2：还原条件下含 CRA 表达序列的异构体单体，3：免疫前血清（阴性对照）；C：CABYR-A 二维 IEF/SDS-PAGE 免疫印迹；D：非变性条件下 CABYR-B 免疫印迹　1：抗 CABYR-B 血清，2：免疫前血清（阴性对照）；E：非还原和还原条件下 CABYR-B 免疫印迹　1：非还原条件下 CRB 表达序列阳性蛋白，2：还原条件下含 CRB 表达序列的异构体单体，3：免疫前血清（阴性对照）；F：CABYR-B 二维 IEF/SDS-PAGE 免疫印迹

与免疫前血清相对照（A 和 D，第 2 道），应用抗 CABYR-A（A，第 1 道）和抗 CABYR-B 抗血清（D，第 1 道）的免疫印迹结果显示在非变性状态下均存在一 200×10^3 条带。在非还原条件下，CRA（B，第 1 道）和 CRB 表达序列阳性蛋白（E，第 1 道）在低分子量区域均出现多个条带，该 200×10^3 条带仍然存在。在还原条件下，所有高分子量区域的弥漫性条带均裂解为低分子量区域清晰的含 CRA（B，第 2 道）和 CRB 表达序列（E，第 2 道）的异构体单体。含 CRA 表达序列的异构体整体丰度更高，且丰度最高的 CABYR 蛋白是仅含 CRA 表达序列的 86×10^3 异构体。人精子 CRA（C）和 CRB 表达序列阳性蛋白（F）二维免疫印迹显示 CABYR 具有明显的多态性，某些异构体仅含 CRA 表达序列，某些异构体既含 CRA 又含 CRB 表达序列

图 1　人精子 CRA 和 CRB 表达序列阳性蛋白在非变性、非还原和还原条件下的免疫印迹分析

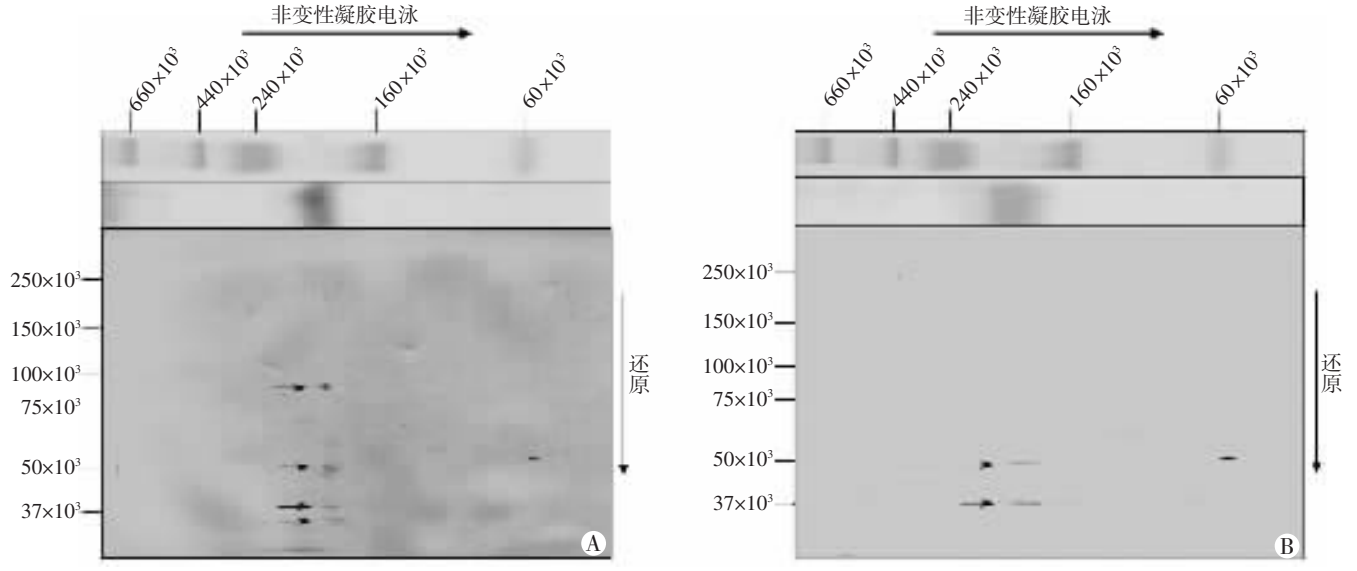
与另一(20～25)×10^3大小 CABYR 异构体或其结合伴侣蛋白所组成。130×10^3条带在还原条件下,裂解为 86×10^3和 50×10^3条带,提示该 130×10^3条带是由 1 个仅含 CRA 表达序列的 86×10^3异构体和 1 个既含 CRA 又含 CRB 表达序列的 50×10^3异构体所组成的异质二聚体。根据其表达丰度,该异质二聚体是非还原条件下所见的最主要二聚体。200×10^3的条带也可见裂解为 86×10^3和 50×10^3的条带。推测 200×10^3条带应该是含有 86×10^3、50×10^3异构体以及其他异构体的寡聚体。由于在非变性条件下存在更高分子量的弥散条带,因此,本研究结果提示 CABYR 主要由仅含 CRA 表达序列的 86×10^3异构体和既含 CRA 又含 CRB 表达序列的 50×10^3异构体组成异质二聚体,同时,还可以和其它异构体共同形成更大的寡聚体,参与人精子纤维鞘中超分子结构的装配和形成。

为进一步证实人 CABYR 蛋白的寡聚化作用,本研究同时应用抗 CABYR-B 抗体进行了免疫印迹分析。应用抗 CABYR-B 多抗(抗血清)(图 2C)和免疫前血清(图 2D)进行的免疫印迹结果显示 50×10^3条带是既含 CRA 又含 CRB 表达序列的异构体,且与应用抗 CABYR-A 抗体的免疫印迹结果相一致,证实 50×10^3条带为既含 CRA 又含 CRB 表达序列的单体。在非还原条件下存在的所有上述明显的高分子量条带如(70～75)×10^3、130×10^3、200×10^3条带在还原条件下裂解后均显示存在一 50×10^3的 CRB 表达序列阳性条带,提示所有上述高分子量条带的组成中,均包含该 50×10^3异构体,该结果与上述应用抗 CABYR-A 抗体的免疫印迹结果相吻合。



A、B:应用抗 CABYR-A 多抗(A)和免疫前血清(B)获得的人精子免疫沉淀产物,行对角线电泳和免疫印迹结果　在非还原条件下的(70～75)×10^3条带在还原条件下裂解为 50×10^3条带。130×10^3条带裂解为 86×10^3和 50×10^3。200×10^3条带也裂解为 86×10^3和 50×10^3。因为还原作用的不完全性,存在 130×10^3水平条带(或斑点)。C、D:人精子 Celis 裂解液提取物对角线电泳后应用抗 CABYR-B 多抗(C)和免疫前血清(D)的免疫印迹结果　所有在非还原条件下的(70～75)×10^3、130×10^3和 200×10^3的 CRB 表达序列阳性条带在还原条件下裂解后均可见 50×10^3的 CRB 表达序列阳性条带

图 2　人精子提取物或免疫沉淀产物的二维对角线电泳后免疫印迹分析



人精子全细胞非变性裂解产物进行二维 BN/SDS-PAGE（第一维和第二维均为5% ~15 % 梯度胶）电泳并应用抗 CABYR-A（A）或 CABYR-B（B）抗体的免疫印迹分析显示：A：在非变性条件下，200×10^3 CRA 表达序列阳性条带在还原条件下裂解为位于同一垂线上的 4 个低分子量条带，分别为 86×10^3，50×10^3，35×10^3，30×10^3。B：在非变性条件下，200×10^3 CRB 表达序列阳性条带在还原条件下裂解后可见位于同一垂线上的 2 个低分子量条带，分别为 50×10^3，35×10^3。故该 2 个条带应该为既含 CRA 又含 CRB 表达序列的异构体。200×10^3 的 CRA 和 CRB 表达序列阳性条带是由仅含 CRA 表达序列的 86×10^3 和 30×10^3 异构体和既含 CRA 又含 CRB 表达序列的 50×10^3 和 35×10^3 异构体形成的寡聚体

图 3 CABYR 蛋白寡聚化作用的 2D BN/SDS-PAGE 分析鉴定

为进一步证实 CABYR 寡聚体的组成成分，人精子非变性蛋白提取物进行 2-D BN/SDS-PAGE 电泳，应用抗 CABYR-A 多抗的免疫印迹结果（图 3A）显示在非变性条件下及非还原条件下所见的 200×10^3 条带在还原条件下裂解为 4 个 CRA 表达序列阳性条带，分别位于 86×10^3、50×10^3、35×10^3 和 30×10^3 的同一垂直线上。同时，应用抗 CABYR-B 多抗的免疫印迹（图 3B）结果显示该 200×10^3 条带在还原条件下降解为 2 个 CRB 阳性条带，位于 50×10^3 和 35×10^3 的同一垂直线上。该结果进一步证实了在非变性条件下该 200×10^3 条带是由 86×10^3（仅含 CRA 表达序列）和 50×10^3 异构体（含 CRA 和 CRB 表达序列），以及 35×10^3（可能既含 CRA 又含 CRB 表达序列）和 30×10^3（仅含 CRA 表达序列）的异构体组成。在对角线电泳时后面 2 个条带可能由于该类低分子量异构体的丰度较低而没有能够检测出。

3 讨论

CABYR 是一种高度多态性的蛋白。人 CABYR 含有 2 个编码区 CRA 和 CRB，产生 6 种剪接异构体。由于该蛋白的 N -末端存在与 PKA 的 RII 二聚体化表位和 AKAP 结合表位同源的预测表位，因而提示 CABYR 的异构体可能进行自我组装并与 AKAPs 结合[16]。但哪些异构体以及它们如何参与了纤维鞘超微结构的装配，至今尚没有阐明。为此，本研究利用二维对角线电泳、BN-PAGE 电泳，结合二维 IEF-SDS/PAGE 电泳对 CABYR 蛋白二聚体、寡聚体的形成进行了分析鉴定。

如果一种蛋白复合体包含二硫键（SS），在二维对角线电泳条件下，其组成成分将作为多个斑点出现于对角线的下方，体现其各自的相对分子质量。多蛋白复合体（MPC）在非变性条件下，也可通过 BN-PAGE 电泳进行分析，然后通过还原条件下的第二维电泳，使同一 MPC 的蛋白组分迁移至同一垂直线上[20]。这两种二维电泳方法，结合非还原和还原条件下的一维电泳，和 2D IEF/SDS-PAGE 电泳图像可清楚地显示 CABYR 蛋白的寡聚化和其各自单体的组成成分。本研究初期，曾试图使用人精子 Celis 提取液直接进行 2D 对角线电泳，但由于 CABYR 蛋白异构体的复杂性和在非还原条件下的分辨率的有限性，导致分辨 CABYR 多聚体的准确组成极为困难。因而，本研究后期使用抗 CABYR-A 多抗，首先进行人精子蛋白提取物的免疫沉淀，然后取该沉淀进行 2D 对角线电泳，从而获得了理想清晰的免疫印迹图像。本研究证实人 CABYR 存在多种不同的异质二聚体。一种 70×10^3 ~ 75×10^3 的异质二聚体由 1 个 50×10^3 异构体和另一个 $(20\sim25)\times10^3$ 的 CABYR 异构体或某一个伴侣蛋白构成。一种丰度占主体的 130×10^3 异质二聚体是由 86×10^3（仅含 CRA 表达序列）和 50×10^3 异构体（含 CRA 和 CRB 表达序列）所组成。同时本研究也证实

一种 200×10^3 的寡聚体的形成，该寡聚体是由 86×10^3 和 50×10^3 异构体，以及 35×10^3（可能含 CRA 和 CRB 表达序列）和 30×10^3（仅含 CRA 表达序列）异构体组成。显然，参与人精子纤维鞘超分子结构形成和装配的更大分子量寡聚体是由上述异质二聚体和寡聚体通过进一步的寡聚化而形成。本研究还表明，应用二维对角线电泳和 BN-PAGE 电泳方法适用于对人精子内某些蛋白寡聚化作用和 MPC 的组成进行分析鉴定。

本研究证实了仅含编码区 A 表达序列，86×10^3 的 CABYR 异构体（异构体 I）是纤维鞘内 CABYR 的主体形式。多态性 CABYR 蛋白的异构体可通过二硫键进行寡聚化作用。结合该蛋白最初文献所显示的有关生物学信息[20]，本研究证实由 86×10^3 仅含 CRA 表达序列的异构体（推断为异构体Ⅰ）和 50×10^3 既含 CRA 又含 CRB 表达序列的异构体（推断为异构体Ⅲ）所组成的一种 130×10^3 异质二聚体是该蛋白形成的占主导地位的二聚体。更高分子量的寡聚体是基于 130×10^3 异质二聚体并结合其他异构体所形成。同时，CRA 和 CRB 表达序列均参与了 CABYR 的二聚体化和寡聚化作用，从而参与人精子纤维鞘超分子结构的装配和形成。

参考文献：

[1] Eddy E M, Toshimori K, O'Brien D A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa[J]. Microsc Res Tech, 2003, 61(1): 103 - 115.

[2] Fawcett D W. The mammalian spermatozoon[J]. Dev Biol, 1975, 44(2): 394 - 436.

[3] Vijayaraghavan S, Liberty G A, Mohan J, *et al*. Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein[J]. Mol Endocrinol, 1999, 13(5): 705 - 717.

[4] Mandal A, Naaby-Hansen S, Wolkowicz M J, *et al*. FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa[J]. Biol Reprod, 1999, 61(5): 1184 - 1197.

[5] Brown P R, Miki K, Harper D B, *et al*. A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum[J]. Biol Reprod, 2003, 68(6): 2241 - 2248.

[6] Mei X, Singh I S, Erlichman J, *et al*. Cloning and characterization of a testis-specific, developmentally regulated A-kinase-anchoring protein (TAKAP-80) present on the fibrous sheath of rat sperm[J]. Eur J Biochem, 1997, 246(2): 425 - 432.

[7] Bunch D O, Welch J E, Magyar P L, *et al*. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis[J]. Biol Reprod, 1998, 58(3): 834 - 841.

[8] Hsu H C, Lee Y L, Cheng T S, *et al*. Characterization of two non-testis-specific CABYR variants that bind to GSK3beta with a proline-rich extensin-like domain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329(3): 1108 - 1117.

[9] Krisfalusi M, Miki K, Magyar P L, *et al*. Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa[J]. Biol Reprod, 2006, 75(2): 270 - 278.

[10] Kim Y H, Haidl G, Schaefer M, *et al*. Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece[J]. Dev Biol, 2007, 302(2): 463 - 476.

[11] Fujita A, Nakamura K, Kato T, *et al*. Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella[J]. J Cell Sci, 2000, 113(pt 1): 103 - 112.

[12] Frayne J, Hall L. A re-evaluation of sperm protein 17 (Sp17) indicates a regulatory role in an A-kinase anchoring protein complex, rather than a unique role in sperm-zona pellucida binding[J]. Reproduction, 2002, 124(6): 767 - 774.

[13] Carr D W, Fujita A, Stentz CL, *et al*. Identification of sperm-specific proteins that interact with A-kinase anchoring proteins in a manner similar to the type II regulatory subunit of PKA[J]. J Biol Chem, 2001, 276(20): 17332 - 17338.

[14] Bajpai M, Fiedler S E, Huang Z, *et al*. AKAP3 selectively binds PDE4A isoforms in bovine spermatozoa[J]. Biol Reprod, 2006, 74(1): 109 - 118.

[15] Naaby-Hansen S, Mandal A, Wolkowicz M J, *et al*. CABYR, a novel calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated fibrous sheath protein involved in capacitation[J]. Dev Biol, 2002, 242(2): 236 - 254.

[16] White D R, Phillips D M, Bedford J M. Factors affecting the acrosome reaction in human spermatozoa[J]. J Reprod Fertil, 1990, 90(1): 71 - 80.

[17] Celis J E, Rasmussen H H, Madsen P, *et al*. The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1992): towards an integrated approach to the study of cell proliferation, differentiation and skin diseases[J]. Electrophoresis, 1992, 13(12): 893 - 959.

[18] Sommer A, Traut R R. Diagonal polyacrylamide-dodecyl sulfate gel electrophoresis for the identification of ribosomal proteins crosslinked with methyl-4-mercaptobutyrimidate[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974, 71(10): 3946 - 3950.

[19] Camacho-Carvajal M M, Wollscheid B, Aebersold R, *et al*. Two-dimensional Blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates: a proteomics approach[J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3(2): 176 - 182.

[20] Schagger H, Cramer W A, von-Jagow G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis[J]. Anal Biochem, 1994, 217(2): 220 - 230.

（收稿：2010-06-27 修回：2010-08-28）

（编辑 王 红）