生殖生理与胚胎着床 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001194

# 精子相关抗原 6（SPAG6）与 TCTE3 蛋白间相互作用探讨

双超凡[1]，柳赟昊[1]，刘骏玭[1]，闵　洁[1]，李梦颖[1]，桂　媛[1]，黄金宇[1]，张　玲[1]，张志兵[2]
（1. 武汉科技大学医学院公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学教研室，武汉　430065；
2. 弗吉利亚联邦大学妇产科学系，弗吉利亚里士满　23298）

【摘　要】**目的**：探讨精子相关抗原 6（sperm associated antigen 6，Spag6）和 T 复合体相关睾丸表达 3（T-complex associated testis expressed 3，TCTE3）之间的相互作用。**方法**：PCR 法观察 Tcte3 在雄性小鼠各组织中的表达；以小鼠睾丸 cDNA 为模板，扩增 Tcte3 序列，构建 Tcte3/pGADT7、Tcte3/pEGFPN2 重组质粒；以 Tcte3/pEGFPN2 转染 CHO 细胞和 COS-1 细胞，免疫荧光染色及 Western blot 检测 TCTE3 在细胞中的定位和表达；以 Spag6/pGBKT7 和 Tcte3/pGADT7 进行酵母双杂交实验，提取酵母蛋白后采用 Western blot 检测 TCTE3 与 SPAG6 之间是否存在直接的相互作用。**结果**：Tcte3 在睾丸、脑、肝、肾、肺、脾、肌肉中均有表达；酶切和测序鉴定证实 Tcte3/pGADT7 和 Tcte3/pEGFPN2 重组质粒均构建成功；体外实验发现 TCTE3 主要在 CHO 和 COS-1 细胞质中表达，当与 SPAG6 质粒共转染后，TCTE3 被募集至细胞微管中表达；酵母双杂交实验显示 TCTE3/ SPAG6 组合后，在缺少 SD/-Leu/-Trp/-His 的培养板上有菌落生成，Western blot 显示菌落中 TCTE3、SPAG6 蛋白表达显著，分子量正确。**结论**：精子相关抗原 SPAG6 与 TCTE3 之间存在直接的相互作用，SPAG6 可募集 TCTE3 至细胞微管中表达。

【关键词】男性不育；精子相关抗原 6；T 复合体相关睾丸表达 3；酵母双杂交；蛋白表达
【中图分类号】R34　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-08-31

## Investigation of interaction between SPAG6 and TCTE3 proteins

*Shuang Chaofan[1], Liu Yunhao[1], Liu Junpin[1], Min Jie[1], Li Mengying[1], Gui Yuan[1], Huang Jinyu[1], Zhang Ling[1], Zhang Zhibing[2]*
*(1. Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Wuhan University of Science and Technology; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Virginia Commonwealth University)*

【Abstract】***Objective***: To test the interactions between SPAG6 and Tcte3 proteins. ***Methods***: The expression of Tcte3 was observed in different tissues of mice by PCR. The testis cDNA was used as the template to amplify Tcte3 coding sequence by PCR, following with the Tcte3/pGADT7 and Tcte3/pEGFPN2 recombinant plasmids' constructing. Immunofluorescent staining and Western blot were used to detect the location and protein express after transfecting Tcte3/pEGFPN2 into CHO cells and COS-1 cells. The interaction between SPAG6 and TCTE3 was detected by Western blot after yeast two hybrid for Tcte3/pGADT7 and SPAG6/PGBKT7. ***Results***: Tcte3 mainly expressed in testis, brain, liver, kidney, lung, spleen and muscle. The results of restriction enzyme digestion and sequencing showed the Tcte3/pGADT7 and Tcte3/pEGFPN2 recombinant plasmids were constructed successfully. TCTE3 mainly located in the whole cytoplasm in vitro, whereas it was recruited to microtubule after co-transfecting with SPAG6. In yeast two hybrid assay, the mating group of TCTE3/SPAG6 grow promoted colonies to grow in SD/-Leu/-Trp/-His plates, and Western blot assay had identified TCTE3 and SPAG6 proteins could express in these colonies. ***Conclusion***: The directly interaction between SPAG6 and TCTE3 is confirmed, and SPAG6 could recruite TCTE3 to celluar microtubule.

【Key words】male infertility; sperm associated antigen 6; T-complex associated testis expressed 3; yeast two hybrid; protein expression

在我国，男性不育发生率呈上升趋势，男性不育已成为全球性的研究课题[1]。男性不育是一种有遗传特性的病理复杂的疾病，致病因素很多，其中精子发生障碍和精子质量是影响男性不育的重要因素[2-3]。研究发现，精子发生受多种基因共同调控，这些基因的缺失或突变均可导致精子发生障碍，精子相关抗原 6（sperm associated antigen 6，Spag6）就是其中的一种[4]。

SPAG6 最早在男性不育患者体内发现，在人和

作者介绍：双超凡，Email：1159683144@qq.com，研究方向：男性生殖健康。
通信作者：张志兵，Emails：zhangzhibing@wust.edu.cn.
基金项目：国家自然科学基金面上资助项目（编号：81671514、81571428）；国家自然科学基金青年资助项目（编号：81300536）；湖北省卫计委资助项目（编号：WJ2015Q026）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170313.1108.042.html（2017-03-13）

小鼠睾丸中高度表达[5]。研究发现，SPAG6 定位于调节纤毛运动的中心轴突上，决定其他蛋白在中心轴突上的定位[6]。Spag6 基因敲除小鼠表现出精子运动障碍、精子畸形、雄性不育、脑水肿等现象，表明 SPAG6 参与维持微管结构完整性并对精子的运动功能有重要作用[7-8]。SPAG6 作为微管相关蛋白还存在于其他含有纤毛细胞的组织和器官中，如中枢神经系统、呼吸系统，甚至部分肿瘤组织[9-10]。本课题组在前期实验中，构建了 SPAG6/pGBKT7 重组质粒，与小鼠 cDNA 文库进行酵母双杂交试验，以筛选可能与 SPAG6 发生相互作用的蛋白。测序结果显示，SPAG6 可能与 T 复合体相关睾丸表达 3（T-complex associated testis expressed 3，TCTE3）相互作用。

TCTE3 是精子鞭毛和纤毛中段轴丝动力蛋白轻链家族成员之一，最早在 T 单倍型小鼠睾丸中被鉴定[11]。研究表明，TCTE3 分布于整个精子尾部，在鞭毛动力蛋白和胞质动力蛋白中均有存在[12]。人类 Tcte3 基因与小鼠具有高度同源性，主要表达于睾丸中，表明 TCTE3 在男性生殖细胞的发育过程中起重要作用[11]。

本实验采用体外细胞实验和酵母双杂交实验，进一步探讨和验证 SPAG6 与 TCTE3 之间是否存在直接相互作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 设计小鼠 Tcte3 的特异性引物

在 PubMed 网站中检索“Tcte3”，根据 Tcte3 的 CDS 区设计其前后引物和限制性酶切位点，并选择 pGADT7 和 pEGFP-N2 为构建载体[Tcte3 引物和酶切位点：前引物 5'-gaa ttc atg gag cgg cga ggc cga atg-3'（*Eco*R Ⅰ，NEB）；后引物 5'-gga tcc c ttc aca ata gag agc aaa cac c-3'（*Bam*H Ⅰ，NEB）]。

### 1.2 Tcte3 在各组织的分布及其扩增

按 Trizol RNA 提取试剂盒（Invitrogen 公司）操作说明书，提取小鼠睾丸、脑、肝、肾、心、肺、脾、肌肉 8 种组织的总 RNA，并测量 RNA 的 A260/280 和浓度；取各组织 RNA 1 μL 按逆转录试剂盒（Thermo Scientific 公司）步骤完成逆转录反应。

以各组织 cDNA 为模板，PCR 观察 Tcte3 在小鼠组织的分布；以睾丸 cDNA 为模板，通过 2×Master Mix 高保真聚合酶 PCR 扩增 Tcte3 的 CDS 区（575 bp）。DNA 凝胶回收试剂盒（Axygene 公司）对 PCR 产物回收纯化。

### 1.3 Tcte3 的 TA 克隆及鉴定

回收产物用 T4 DNA 连接酶与 PCR2.1 载体进行 TA 克隆（Invitrogen 公司）。用 *Eco*R Ⅰ/*Bam*H Ⅰ 对质粒小提的 Tcte3/PCR2.1 连接质粒进行双酶切鉴定，对阳性质粒进行测序。

### 1.4 重组质粒 Tcte3/pGADT7 和 Tcte3/pEGFPN2 的构建

用 *Eco*R Ⅰ/*Bam*H Ⅰ 分别对 Tcte3/PAC2.1、pGADT7 和 pEGFP-N2 进行双酶切实验，37 ℃水浴 2 h，回收目的条带，并按照 Rapid DNA Ligation Kit（Roche 公司）快速连接试剂盒操作说明进行连接反应。将连接产物转化 DH5α 感受态细胞（参考 Tiangen 公司的 DH5α 说明书），挑取单克隆振荡培养后进行质粒 DNA 小提。

用 *Eco*R Ⅰ/*Bam*H Ⅰ 分别对重组质粒 Tcte3/pGADT7、Tcte3/pEGFP-N2 进行双酶切鉴定，对阳性质粒进行测序。

### 1.5 细胞转染及免疫荧光染色

用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液（Gibco 公司）培养 CHO 细胞和 COS-1 细胞。按照 GEMINI 转染试剂盒操作说明，将 Tcte3/pEGFP-N2 转染至 COS-1 细胞中。将 Tcte3/pEGFP-N2、SPAG6/pGL3 和 Tcte3/pEGFP-N2+SPAG6/pGL3 分别转染至 CHO 细胞中。

细胞转染 48 h 后，甲醇固定后于-80 ℃静置 7 min，PBS 反复清洗。随后，已转染 Tcte3/pEGFP-N2 的细胞加封片剂（Vector Laboratories）后封片。转染 SPAG6/pGL3 或 Tcte3/pEGFP-N2+SPAG6/pGL3 的细胞先用羊血清室温避光封闭 1 h，再以羊抗 SPAG6 抗体（1:300）作为一抗室温避光孵育 1 h，之后羊抗兔（1:500）二抗室温避光孵育 1 h，加封片剂后封片。

### 1.6 Tcte3/pEGFP-N2 融合蛋白的表达

COS-1 细胞转染 48 h 后，用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液处理细胞，提取总蛋白。参考 BCA 蛋白浓度测定试剂盒（Bio-Rad 公司）说明，取 5 μL 上清进行定量。

取 40 μg 融合蛋白进行 Western blot：10×Loadding Buffer，100 ℃、10 min 将蛋白变性后用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳；半干法转膜至 PVDF 膜上，0.5%脱脂奶粉封闭 1 h；以 2 mL绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）（Abcam 公司，1:1 000）为一抗 4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜 10 min，3 次；以鼠抗（1:2 000）为二抗室温孵育 1 h，TBST 洗膜 10 min，2次，再用 TBS 洗膜 1 次，10 min；最后 ECL 试剂盒（Thermo）显色、暗室曝光。

### 1.7 SPAG6 与 TCTE3 的酵母双杂交实验

依照 Clontech 酵母双杂交手册，采用 TE/LiAc 方法制备酵母 AH109 感受态细胞。以 SPAG6/pGBKT7+Tcte3/pGADT7 为实验组，p53/pGBKT7+lgT/pGBKT7 为阳性对照，p53/pGBKT7+pGADT7 和 SPAG6/pGBKT7+pGADT7 为阴性对照进行共转化。将上述各对质粒、变性处理的鲱鱼精载体 DNA、AH109 感受态细胞和 PEG/LiAc 冰上混匀，30 ℃水浴后加 20 μL DMSO；高速离心，用酵母浸出粉胨葡萄糖培养基（yeast extract peptone dextrose medium，YPD）溶液重悬沉淀，振荡培养后高速离心，生理盐水重悬沉淀。转化后的菌液分别涂布于 SD/-Leu、SD/-Leu/-Trp、SD/-Leu/-Trp/-His 固体培养基上，30 ℃培养 3~5 d。

挑取单克隆菌落，用 SD 培养液 30 ℃过夜培养，以AH109 酵母单克隆作为阴性对照，依照 Clontech 酵母双杂交手册提取酵母融合蛋白。Western blot 鉴定酵母融合蛋白，除分别对

2块膜用 HA 抗体(Abcam 公司)、Cmyc 抗体(Abcam 公司)孵一抗外，其余方法参考 1.6 Western blot。

## 2 结 果

### 2.1 Tcte3 在小鼠多个组织中表达

PCR 结果显示为 500~600 bp，小鼠睾丸、脑、肝、肾、肺、脾、肌肉中均有条带，与 Tcte3 的 CDS 区大小基本一致(图 1)，表明 Tcte3 在睾丸、脑、肝、肾、肺、脾、肌肉中均有表达。

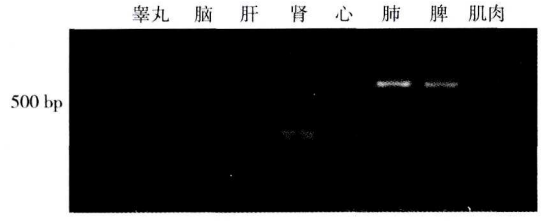


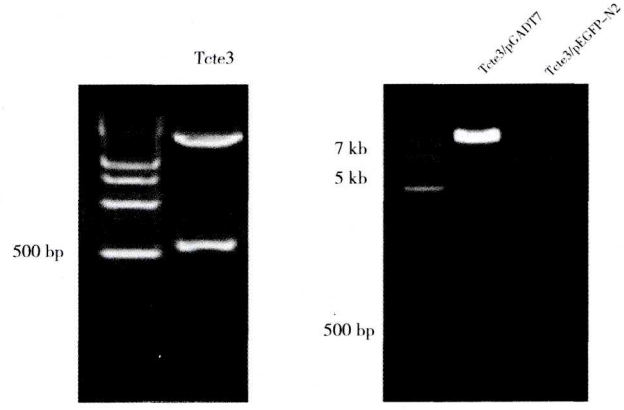

图 1 Tcte3 的组织分布

Fig.1 Tissue distribution of Tcte3 gene

### 2.2 重组质粒 Tcte3/pGADT7 和 Tcte3/pEGFP-N2 构建成功

TA 克隆后的 *Eco*R Ⅰ/*Bam*H Ⅰ 双酶切鉴定结果显示 2 条带分别位于 5 000 bp 和 500 bp 左右，与 PCR2.1 和 Tcte3 大小基本一致(图 2A)。测序结果与 NCBI 的 BLAST 结果进行比对，结果 100%匹配，证实 Tcte3 TA 克隆成功。

重组质粒的 *Eco*R Ⅰ/*Bam*H Ⅰ 双酶切鉴定结果显示 Tcte3/pGADT7 被切为大小约为 7.9 kb、575 bp 的 2 条带，Tcte3/pEGFP-N2 被切为大小约为 4.7 kb、575 bp 的 2 条带，皆与理论值基本一致 (图 2B)。测序结果与 NCBI 的 BLAST 结果进行比对，结果 100%匹配，重组质粒构建成功。




TA克隆鉴定显示 2 条带分别位于 4 000~5 000 kb 和 500~600 bp，分别为 PCR2.1 和 Tcte3 质粒

Tcte3/pGADT7 和 Tcte3/pEGFPN2 酶切鉴定均显示载体和 Tcte3 质粒的 2 条清晰条带

A. Tcte3/PCR2.1 的酶切鉴定

B. Tcte3/pGADT7 和 Tcte3/pEGFPN2 的酶切鉴定

图 2 Tcte3/PCR2.1、Tcte3/pGADT7 和 Tcte3/pEGFP-N2 重组质粒的酶切鉴定

Fig.2 Enzyme digestion of Tcte3/PCR2.1, Tcte3/pGADT7 and Tcte3/pEGFP-N2

### 2.3 SPAG6 募集 TCTE3 蛋白表达于细胞微管中

将 Tcte3/pEGFP-N2、Tcte3/pEGFP-N2+SPAG6/pGL3 重组质粒转染至 CHO 细胞，转染 48 h 后利用间接免疫荧光结合激光共聚焦显微镜在蓝、红、绿 3 种光源下观察融合蛋白的定位。结果显示在没有 SPAG6 的作用下，带有绿色荧光的 Tcte3/GFP 定位于细胞质中(图 3)。加了 SPAG6(红色荧光)的混合蛋白后，Tcte3 被募集至微管中表达(图 3)。

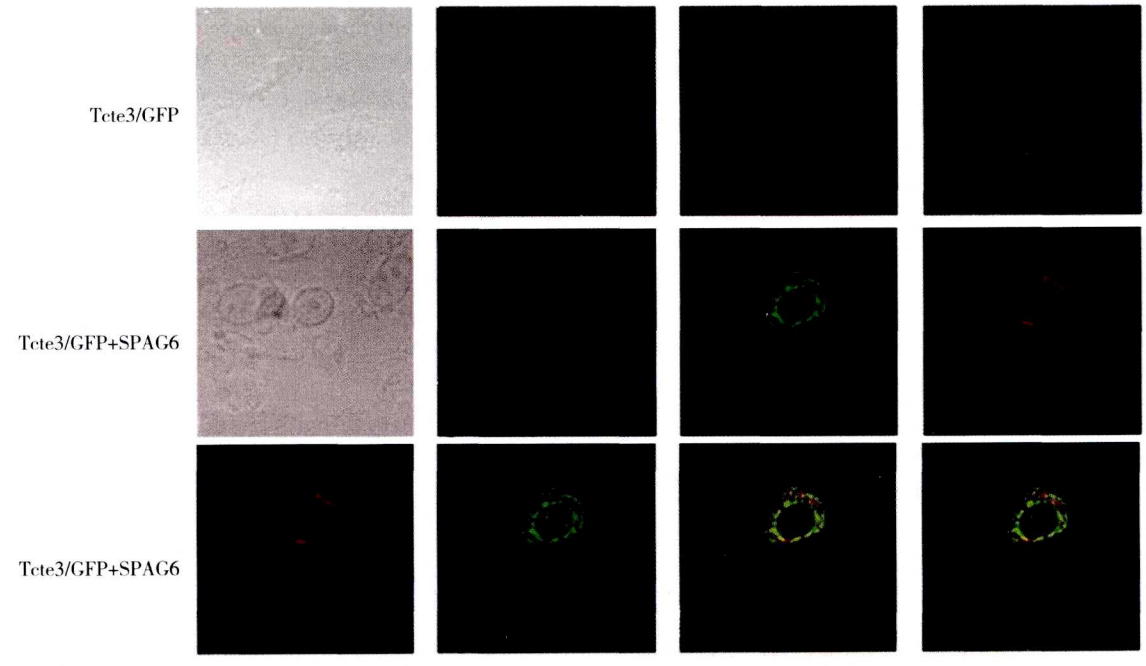



图 3 融合蛋白的表达

Fig.3 Expression of fusion protein

2.4 Western blot 检测 Tcte3 在 COS-1 细胞的表达

Tcte3/pEGFP-N2 转染 COS-1 细胞 48 h 后提取细胞蛋白，以 COS-1 细胞作为阴性对照。Western blot 结果显示检测到带有绿色荧光 GFP-Tag 的 Tcte3 蛋白的表达，Tcte3/GFP 融合蛋白分子量约 47 kD，是 TCTE3(21 kD)与 GFP(26 kD)之和，表明融合蛋白表达成功(图 4)。

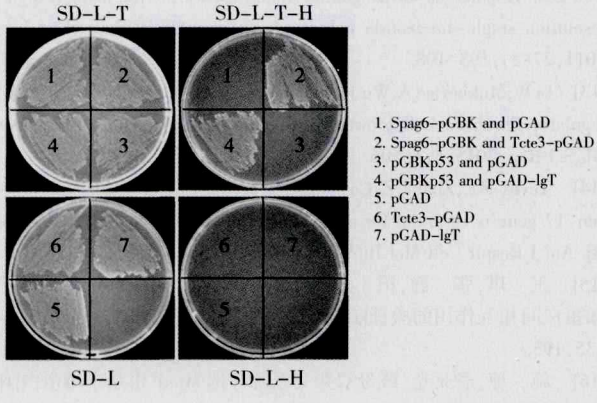



图 4 Western blot 检测 Tcte3 在 COS-1 细胞中的表达

Fig.4 Tcte3 expression in COS-1 cells detected by Western blot

2.5 酵母双杂交(Yeast-2-Hybrid)观察 Tcte3 和 SPAG6 直接的相互作用

用 Yeast-2-Hybrid 实验验证 TCTE3 和 SPAG6 之间的相互作用，将 SPAG6 与 C-myc-tag 融合，Tcte3 与 HA-tag 融合。作为阳性对照，p53 与 C-myc-tag 融合，LgT 与 HA-tag 融合。这 4 对质粒在 SD/-Leu/-Trp 的板子上均长出菌落，在 SD/-Leu/-Trp/-His 的板子上仅 SPAG6/pGBKT7 +Tcte3/pGADT7、p53/pGBK7+lgT/pGAD7 长出菌落，证明 Tcte3 和 SPAG6 之间存在直接相互作用(图 5)。

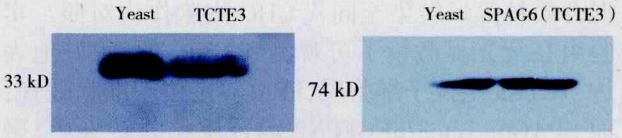



注：Yeast-2-Hybriy 结果显示，Tcte3/pGADT7 与 Spag6/pGBKT7 配对、阳性对照 p53/pGBKT7+lgT/pGADT7 配对可在 SD/-Leu/-Trp/-His 的筛选平板中生长

图 5 TCTE3 和 SPAG6 的酵母双杂交实验

Fig.5 Yeast-2-Hybriy of TCTE3 and SPAG6

挑取 SD/-Leu/-Trp/-His 平板上的 SPAG6/pGBKT7+Tcte3/pGADT7 单克隆菌落提取蛋白，以 AH109 酵母细胞蛋白为阴性对照。图 6 显示，通过 HA 抗体检测，TCTE3 融合蛋白分子量约为 33 kD，是 TCTE3(21 kD)和 HA-tag(12 kD)之和；通过 C-ymc 抗体检测，SPAG6 融合蛋白分子量约为 74 kD，是 SPAG6(57 kD)和 C-myc-tag(17 kD)之和，证实 SPAG6/pGBKT7+Tcte3/pGADT7 融合蛋白的表达。




A. 以 HA 为一抗的结果　　B. 以 c-myc 为一抗的结果

注：酵母蛋白的 Western blot 证实了 SPAG6/pGBKT7 + Tcte3/pGADT7 融合蛋白的表达

图 6 酵母蛋白的 Western blot 实验

Fig.6 Western blot of yeast protein

## 3 讨 论

SPAG6 是精子相关抗原 SPAG 之一，与衣藻鞭毛相关蛋白 16(Chlamydomonas flagellum associated protein 16，PF16)是同源体，SPAG6 主要在精子鞭毛中表达[6-7,13]。Spag6 基因敲除小鼠精子鞭毛正常的“9+2”结构丧失，包括中心微管缺失和外周致密纤维鞘发生变化，KO 小鼠多在性成熟前死亡，即使存活到成年也会表现为精子发生和精子运动障碍，导致雄性不育[9,14]。通过这些研究，本课题组猜想Spag6与男性不育重要相关。

由于蛋白多与分子伴侣或其他蛋白结合后发挥作用，本研究决定选用 Yeast-2-Hybrid 来研究 SPAG6 的功能。其原理是依赖于转录激活因子 GAL4 的 DNA 结合结构域(DNA binding domain，DNA-BD)和转录激活结构域(activation domain，AD)在空间上充分靠近，从而激活下游基因表达。本研究将已知蛋白作为诱饵蛋白(bait)与 BD 融合，将待研究蛋白作为靶蛋白(target)与 AD 融合，如果 bait 和 target 之间发生相互作用就能激活下游报告基因如 His、GFP 等的表达[15-16]。

前期实验中，本课题组通过酵母双杂交筛选发现 TCTE3 很可能与 SPAG6 发生相互作用，之后查阅文献了解到 SPAG6 与 TCTE3 两种蛋白都与生殖系统或肿瘤相关[18-20]，因此推测 SPAG6 与 TCTE3 之间存在相互作用。TCTE3 是精子鞭毛和纤毛中段轴丝动力蛋白轻链 TCTEX-TYPE 家族成员之一[11]。Tcte3 含有 4 个内含子，在小鼠精子鞭毛的中段轴丝外侧双联微管中表达[17]，分布于整个精子尾部，与雄性生殖细胞的分化以及精子活力产生有重要的关系[18]。

Tcte3 在小鼠各组织分布证实其在睾丸中有表达，本课题组构建 Tcte3/pGADT7、Tcte3/pEGFPN2 重组质粒，通过 *Eco*R Ⅰ/*Bam*H Ⅰ 双酶切鉴定和DNA 测序，以确保重组质粒构建成功。培养 CHO 细胞，分别将 Tcte3/pEGFP-N2 重组质粒和 SPAG6/pGL3 质粒转染至 CHO 细胞，同时将 SPAG6+Tcte3/pEGFPN2

混合质粒等量转染至同代 CHO 细胞作为对照。实验组在荧光显微镜下可观测到 GFP-Tag 很好地表达，TCTE3 定位于细胞质，SPAG6 定位于细胞微管；而 SPAG6+Tcte3/pEGFPN2 混合质粒共转染后，融合蛋白在细胞中的定位发生了变化，TCTE3 被募集至细胞微管表达。Western blot 结果也证实了这种定位的改变确实是 SPAG6 和 TCTE3 之间作用的结果。初步说明 SPAG6 与 TCTE3 之间存在相互作用，但仍不能判断 SPAG6 与 TCTE3 之间是否存在直接作用。

为进一步探讨 SPAG6 与 TCTE3 之间是否存在直接作用，本研究将 Tcte3/PGADT7 与 SPAG6/PGBKT7 重组质粒进行酵母双杂交。为避免 SPAG6 自身能与酵母中 BD 结合而发挥转录激活作用，导致假阳性。所以在设计实验时，增加了一组阳性对照 p53/pGBKT7+lgT/pGBKT7 和一组阴性对照 p53/pGBKT7+pGADT7，同时设置了只有 AD 载体质粒的对照组以判断有无假阳性的影响。

结果显示，实验组在 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Leu/-Trp/-His 的平板上都长出了菌落，而在只有 AD 载体质粒的杂交实验中，虽然在 SD/-Leu 的平板上长出了菌落，但是在 SD/-Leu/-Trp 的平板上并无菌落生成。Western blot 结果也证实了 SD/-Leu/-Trp 平板中的物质确实是 SPAG6 和 TCTE3。因此，可以断定 SPAG6 与 TCTE3 之间是存在相互作用，并且是一种直接相互作用。

SPAG6 是精子发生的重要蛋白，TCTE3 又在精子运动起着重要作用。这为本课题组在研究精子发生和精子运动方面提供了许多新的思路——SPAG6 与 TCTE3 相互作用后是如何影响精子的、SPAG6 与 TCTE3 相互作用后定位的改变有什么影响，同时还可以研究 TCTE3 蛋白在不同组织的功能。本研究证实了 SPAG6 与 TCTE3 蛋白之间存在直接相互作用，为进一步研究其功能与生物学特性打下一定基础。今后本课题组将利用细胞实验、基因敲除等进一步研究 SPAG6 与 TCTE3 蛋白相互作用对精子发生、运动和能量代谢等的影响，为男性不育治疗提供理论依据。

## 参 考 文 献


[1] 谷翊群. 男性生育力与精液参数的变化趋势[J]. 中华男科学杂志，2014，20(12)：1059-1062.

[2] 汪瑶瑶. 精子 DNA 损伤在男性不育症中的研究进展[J]. 现代泌尿外科杂志，2014，19(6)：419-422.

[3] 苏春霞，王 凌，王若竹，等. 不育男性精液白细胞增高对精子质量影响临床研究[J]. 中国实验诊断学，2015，19 (4)：665-666.

[4] Wang J，Li X，Zhang Z ，et al. Expression of prestin in OHCs is reduced in Spag6 gene knockout mice[J]. Neurosci Lett，2015，592：42-47.

[5] Teves ME，Sears PR，Li W，et al. Sperm-associated antigen 6 (SPAG6) deficiency and defects in ciliogenesis and cilia function：polarity，density，and beat[J]. PLoS One，2014，9(10)：e107271.

[6] Sapiro R，Tarantino LM，Velazquez F，et al. Sperm antigen 6 is the murine homologue of the Chlamydomonas reinhardtii central apparatus protein encoded by the PF16 locus[J]. Biol Reprod，2000，62(3)：511-518.

[7] Zhang Z，Sapiro R，Kapfhamer D，et al. A sperm-associated WD repeat protein orthologous to Chlamydomonas PF20 associates with Spag6，the mammalian orthologue of Chlamydomonas PF16[J]. Mol Cell Biol，2002，22(22)：7993-8004.

[8] Yan R，Hu X，Zhang Q，et al. Spag6 negatively regulates neuronal migration during mouse brain development[J]. J Mol Neurosci，2015，57 (4)：463-469.

[9] Cooley LF，El Shikh ME，Li W，et al. Impaired immunological synapse in sperm associated antigen 6(SPAG6) deficient mice[J]. Sci Rep，2016，6：25840.

[10] Noushmehr H，Weisenberger DJ，Diefes K，et al. Identification of a cpg island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma[J]. Cancer cell，2010，17(5)：510-522.

[11] Han YB，Feng HL，Cheung CK，et al. Expression of a novel T-complex testis expressed 5(Tctex5) in mouse testis，epididymis，and spermatozoa[J]. Mol Reprod Dev，2007，74(9)：1132-1140.

[12] Teshiba R，Masumoto K，Esumi G，et al. Identification of TCTE3 as a gene responsible for congenital diaphragmatic hernia using a high-resolution single-nucleotide polymorphism array[J]. Pediatr Surg Int，2011，27(2)：193-198.

[13] Li W，Mukherjee A，Wu J，et al. Sperm associated antigen 6 (SPAG6) regulates fibroblast cell growth，morphology，migration and ciliogenesis [J]. Sci Rep，2015，5：16506.

[14] Teves ME，Zhang Z，Costanzo RM，et al. Sperm-associated antigen-17 gene is essential for motile cilia function and neonatal survival [J]. Am J Respir Cell Mol Biol，2013，48(6)：765-772.

[15] 王 琪，张 静，田 杰，等. 酵母双杂交 RRS 筛选系统对已知蛋白间相互作用的验证[J].重庆医科大学学报，2008，33(2)：133-135，193.

[16] 施 琼，翁亚光. 酵母双杂交系统筛选 Mps1 相互作用蛋白[J]. 重庆医科大学学报，2006，31(6)：854-856，888.

[17] Rashid S，Grzmil P，Drenckhahn JD，et al. Disruption of the murine dynein light chain gene Tcte3-3 results in asthenozoospermia[J]. Reproduction，2010，139(1)：99-111.

[18] Kiselak EA，Shen X，Song J，et al. Transcriptional regulation of an axonemal central apparatus gene，sperm-associated antigen 6，by a SRY-related high mobility group transcription factor，S-SOX5[J]. J Biol Chem，2010，285(40)：30496-30505.

[19] Silina K，Zayakin P，Kalnina Z，et al. Sperm-associated antigens as targets for cancer immunotherapy：expression pattern and humoral immune response in cancer patients[J]. J Immunother，2011，34(1)：28-44.

[20] Parveen Z，Bibi Z，Bibi N，et al. Disruption of murine Tcte3-3 induces tissue specific apoptosis via co-expression of Anxa5 and Pebp1 [J]. Comput Biol Chem，2014，53PB：214-225.


（责任编辑：冉明会）