泛素-蛋白水解酶复合体通路在小鼠精子体外获能、顶体反应及穿卵中的作用

王红梅[①②] 宋长城[②] 段崇文[①] 石伟先[②] 李存玺[②] 陈大元[①*] 王永潮[②*]

(①中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080; ②北京师范大学生命科学学院细胞研究所, 北京 100875. * 联系人, E-mail: chendy@panda.ioz.ac.cn, wangyc@public.bta.net.cn)

摘要 采用能阻断泛素-蛋白水解酶复合体通路(UPP)的抑制剂——ALLN, 抗泛素化蛋白的单克隆抗体——UCP_1和抗泛素的多克隆抗体——anti-Ub 处理精子或卵, 通过统计 B 型、AR 型精子百分率的变化和形成原核的卵的百分率的变化, 研究部分阻断或完全阻断 UPP 通路对体外精子获能、顶体反应及穿卵的影响. 结果表明: UCP_1, anti-Ub 及 ALLN 对精子体外获能和顶体反应均无明显影响, 但对精子穿卵能力有显著抑制作用. 据此推测 UPP 可能参与精子体外穿卵过程.

关键词 泛素-蛋白水解酶复合体通路 获能 顶体反应 体外穿卵

泛素-蛋白水解酶复合体通路(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)是细胞质和细胞核内依赖于 ATP, 非溶酶体途径的蛋白降解通路[1], 高效并高度选择性进行细胞内蛋白转换. UPP 包括相对独立的两个过程: (1) 对靶蛋白的泛素化修饰; (2) 26S 蛋白水解酶识别并水解多聚泛素化的靶蛋白.

泛素由 76 个氨基酸组成, 分子量为 8.45 ku. 它是一种在很多动植物中高度保守、从生殖细胞到体细胞及从胞核到胞质广泛存在的多肽. 在泛素连接酶的协助下, 泛素 C-末端甘氨酸的羧基能够与靶蛋白赖氨酸α-或ε-氨基结合形成泛素化的靶蛋白, 泛素 48 位赖氨酸的ε-氨基还需进一步泛素化形成多聚泛素后才能被蛋白水解酶复合体识别和水解[2]. 26S 蛋白水解酶复合体[3]由中部的 20S 水解核心和两端各一个 19S 的帽状结构组成. 它能识别多聚泛素化的蛋白并将其水解. 自然状态下, 细胞内存在蛋白水解酶复合体的天然抑制因子, 如 40 ku 六聚体和 31 ku 蛋白等. 实验中常用的抑制剂是合成的短肽或抗生素, 包括 aclacinomycin A, N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal (ALLN) 及 lactacystin 等.

目前有关 UPP 在雄性生殖中的研究主要集中在精子发生不同阶段泛素、泛素化蛋白、连接酶及蛋白水解酶复合体表达的变化上. 泛素尤其在精子变态过程所涉及的细胞间的相互作用、蛋白转换及染色质结构变化中起重要作用[4~6]. Day 等人[7]发现附睾中的一些蛋白具有泛素活性, 附睾上皮中的泛素还被证明与上皮细胞骨架蛋白的高度有序组装有关. 最近 Sutovsky 等人[8]发现, UPP 决定着精卵结合后精子线粒体的命运, 恒河猴和牛的精子线粒体早在精子发生过程中就被打上了泛素“标签”, 这个死亡信号使它们一旦面对卵细胞的蛋白降解机制, 就无法逃脱被降解的命运. 但以上结果尚不能详尽阐明 UPP 在雄性生殖系统中的作用, UPP 对体外精子获能、顶体反应及穿卵的影响目前尚无报道.

本文用抗泛素化蛋白的单克隆抗体——UCP_1 (monoclonal antibody against ubiquitin-conjugated protein 1)、抗泛素的多抗—— anti-Ub (anti-ubiquitin) 及蛋白水解酶复合体的抑制剂——ALLN, 研究了部分阻断或完全阻断 UPP 对精子体外获能、顶体反应及体外穿卵能力的影响, 借此判明 UPP 是否参与这些过程.

1 材料与方法

(ⅰ) 主要试剂. 蛋白水解酶复合体的抑制剂 ALLN 购自 Peptides International 公司; 孕马血清(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、金霉素(CTC)、酸性台氏液、透明质酸酶、孕酮和液体石蜡为 Sigma 公司产品; FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 购自 Zymed 公司; 多聚甲醛购自 Fluka 公司; 胶体金标记的羊抗小鼠 IgG 购自中山公司; Kline-IVF 卵细胞培养液(99.3 mmol/L 氯化钠, 2.7 mmol/L 氯化钾, 1.8 mmol/L 氯化钙, 0.5 mmol/L 氯化镁, 0.36 mmol/L 磷酸二氢钠, 5.6 mmol/L D-葡萄糖, 25.0 mmol/L 碳酸氢钠, 0.5 mmol/L 丙酮酸钠, 25.0 mmol/L 乳酸钠, 4 mg/mL 牛血清白蛋白, 100 U/mL 青霉素 G, 50 μg/mL 链霉素, 0.001%酚红)和

M16 获能培养液(94.7 mmol/L 氯化钠, 4.8 mmol/L 氯化钾, 1.7 mmol/L 氯化钙, 1.2 mmol/L 磷酸二氢钾, 1.2 mmol/L 硫酸镁, 5.6 mmol/L D-葡萄糖, 25.0 mmol/L 碳酸氢钠, 0.33 mmol/L 丙酮酸钠, 23.3 mmol/L 乳酸钠, 4 mg/mL 牛血清白蛋白, 100 U/mL 青霉素 G, 50 μg/mL 链霉素, 0.001%酚红)均为本实验室配制. UCP_1 单抗和 anti-Ub 多抗由本实验室制备.

(ⅱ) 实验动物. 12 周龄昆明种雄性小鼠和 8 周龄昆明种雌性小鼠分别由中国科学院发育生物学研究所和遗传研究所实验动物研究室提供; 大耳白雄性兔由北京大学医学部提供.

(ⅲ) 金霉素显色实验. 新鲜配制金霉素显色液(250 μmol/L 金霉素, 130 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 5 mmol/L 半胱氨酸, pH 7.8), 固定液(1.25 mol/L Tris, 12.5%戊二醛, pH 7.8). 将 40 μL 小鼠精子悬液与 40 μL 预热至 37℃的金霉素显色液及 7 μL 固定液加入 Eppendorf 管中混匀, 37℃孵育 1 h, 取 5 μL 此混合液滴在载玻片上, 封片并加压力, 使精子尽量分散. 用荧光显微镜区分新鲜精子(F 型)、获能精子(B 型)和发生顶体反应的精子(AR 型).

(ⅳ) 精子获能曲线. 制培滴, 上覆石蜡油, 用前在 37℃, 5% CO_2 和 95%空气的培养箱中平衡 0.5 h (下述实验所用的培养条件及培滴制备方法与此相同). 将小鼠(n = 3)附睾尾精子培养于培滴中, 分别在 0, 30, 60, 90 min 收集精子, 用金霉素显色法统计 B 型精子百分率. 以培养时间为横坐标, B 型精子百分率为纵坐标, 绘出获能曲线, 以此确定使大部分精子获能所需的最短培养时间.

(Ⅴ) 间接免疫荧光. 将兔(n = 5)和小鼠(n = 5)附睾尾精子制成悬液(10^7 个/mL), 涂片. 经 4%多聚甲醛固定 10 min 后, 用 3% BSA 封闭 30 min, 然后与 1∶1000 UCP_1 于 37℃孵育 1 h. PBS 洗 3×10 min 后, 与 1∶100 FITC 标记羊抗小鼠 IgG 于 37℃孵育 30 min, PBS 洗 3×10 min, 用 0.01%伊文氏兰衬染, 封片.

(Ⅵ) Western blot. 收集小鼠(n = 3)附睾尾精子, 按 1×10^8 个精子加 10 μL 精子抽提液(抽提时加入终浓度为 5 μmol/L 的 ALLN, 以防泛素化蛋白降解), 于 4℃抽提 40 min, 蛋白经变性后用 12%的凝胶电泳分离, 随后将其转移到硝酸纤维素膜上. 用 3% BSA 封闭后与 1∶500 UCP_1 单抗于 37℃孵育 1 h, PBS 洗 3×10 min. 将膜在 1∶100 胶体金标记的羊抗小鼠二抗中于 37℃孵育 30 min, PBS 洗 3×10 min, 再用去离子水洗 3×10 min. 用 $AgNO_3$ 和对苯二酚显色, 加去离子水终止显色反应并用定影液定影.

(Ⅶ) UCP_1, anti-Ub 及 ALLN 对体外精子获能、顶体反应及穿卵的影响. 小鼠(n = 5)附睾尾精子体外培养 5 min 后, 用 3 组液体分别孵育 90 min: (1) 不加 UCP_1 或加 UCP_1; (2) 正常兔血清(由于 anti-Ub 来源于兔血清, 因此选正常兔血清作为 anti-Ub 的对照)或 anti-Ub; (3) DMSO(由于 ALLN 溶解于 DMSO 中, 因此选 DMSO 作为 ALLN 的对照)或 ALLN. 金霉素显色法统计 B 型精子百分率是否发生变化, 借此探明阻断 UPP 通路后对精子体外获能的影响.

小鼠(n = 5)附睾尾精子体外培养 60 min(由获能曲线得知, 此时大部分精子已获能)后, 分别加入如下液体: (1) UCP_1; (2) 正常兔血清或 anti-Ub; (3) DMSO 或 ALLN. 继续孵育 30 min, 然后用含 15 μmol/L 孕酮的获能培养液诱导顶体反应, 用金霉素显色法统计 AR 型精子百分率的变化, 借此探明阻断 UPP 通路对精子顶体反应的影响.

体外穿卵实验参照 Saling[9]的方法. 雌鼠(n = 10)腹腔注射 PMSG(10 IU/只), 48 h 后再注射 hCG(10 IU/只), 16 h 后将其断颈处死, 刺破输卵管壶腹挤出卵子团, 以收集超排卵. 用透明质酸酶(1 mg/mL)消化使卵细胞彼此分离, 再用酸性台氏液溶解透明带. 选择已排放第一极体、卵质均匀, 透明度好的卵, 分组培养于卵细胞培养液中. 另取雄鼠(n = 5)附睾尾精子, 体外诱导获能后分别用如下液体孵育 30 min: (1) UCP_1; (2) 正常兔血清或 anti-Ub; (3) DMSO 或 ALLN. 显微镜下检查精子活力及密度后与卵混合进行孵育. 当卵细胞排放第二极体、形成雌雄原核后标志已经受精. 以有原核形成的卵的百分率作为体外受精情况的检测指标. 另收集超排卵, 分别与 UCP_1, 正常兔血清, anti-Ub, DMSO 或 ALLN 培养 1 h. 再加入正常体外获能的精子进行体外穿卵实验, 检测正常情况下或经上述处理的卵与正常获能精子发生体外受精时, 原核形成百分率的变化. 以此判明阻断 UPP 后对精子体外穿卵的影响及这种影响施加的途径.

(Ⅷ) 统计方法. 采用 SPSS 数据统计分析方法中的单因素方差分析. 其中 ** 表示 $P < 0.01$, 有极显著差异; $P > 0.05$ 表示无显著差异.

2 实验结果

2.1 金霉素显色结果

F 型、B 型和 AR 型精子的金霉素染色结果如图 1

所示. 从小鼠附睾尾收集的新鲜精子经金霉素染色后, 整个精子头部都有明亮的黄绿色荧光(箭头所示), 这是新鲜精子(F 型)的典型染色. 附睾尾精子经体外获能培养 90 min 后, 金霉素染色显示, 荧光主要集中在精子头部的顶端, 而顶体后区有一无荧光暗带(箭头所示), 这是获能精子(B 型)的典型特征. 获能精子经孕酮诱导发生顶体反应后, 经金霉素染色, 发现整个精子头部都无荧光(箭头所示). 此种类型染色的精子称为顶体反应后的精子(AR 型).

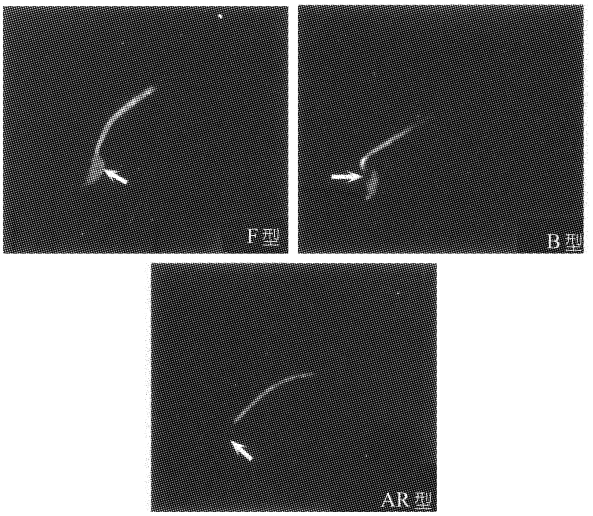

图 1 金霉素染色显示小鼠不同类型精子

F 型代表未发生获能和顶体反应的新鲜精子, 其特征为整个头部都有明亮的黄绿色荧光(箭头所示). B 型精子代表顶体完整的获能精子, 在头部顶体后区有一条无荧光的暗带(箭头所示). AR 型精子代表发生顶体反应的精子, 其特征为整个头部均无荧光(箭头所示). ×200

2.2 精子获能曲线

小鼠(n = 3)附睾尾精子获能曲线如图 2 所示. 在培养的最初 60 min 以内, B 型精子百分率不断增加. 培养超过 60 min 后, 大部分精子已获能, B 型精子百分率不再有显著变化. 因此, 在后述实验中, 选 60 min 这个时间点作为收集获能精子的最短培养时间.

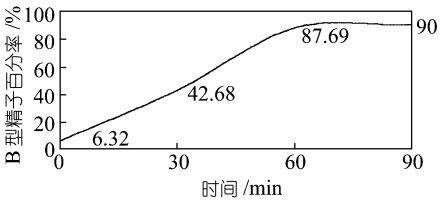

图 2 小鼠附睾尾精子获能曲线

B 型精子百分率在培养 60 min 以内不断增加, 超过 60 min 后, 大部分精子已获能, B 型精子百分率不再有显著变化

2.3 阻断 UPP 对小鼠附睾尾精子体外获能、顶体反应的影响

(ⅰ) UCP_1 对小鼠附睾尾精子体外获能、顶体反应的影响. 用 UCP_1 对兔和小鼠附睾尾精子进行间接免疫荧光染色发现, 兔和小鼠附睾尾精子头部赤道带和尾部中段显强烈荧光(图 3).

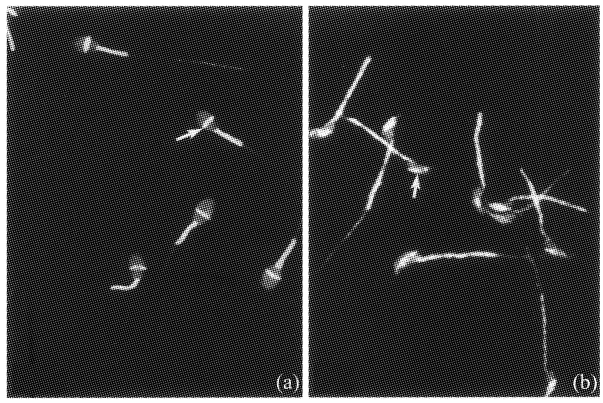

图 3 间接免疫荧光显示 UCP_1 识别的蛋白在兔(n = 5)和小鼠(n = 5)附睾尾精子中的定位

(a) 兔附睾尾精子, (b) 小鼠附睾尾精子. UCP_1 识别的蛋白主要分布在兔和小鼠附睾尾精子的头部赤道带(箭头所示)和尾部中段. ×200

Western blot 显示 UCP_1 识别小鼠附睾尾精子中 36.8 和 40.5 ku 的蛋白(图 4). 值得注意的是, 只有在蛋白提取过程中加入 ALLN 才能清晰地染出这两条带(图 4 中 2). 否则, 36.8 和 40.5 ku 的蛋白带将无法染出, 而 8.45 ku 的泛素单体和 16.9 ku 的泛素二聚体增加(图 4 中 1). 由此说明 UCP_1 识别的这两种蛋白仍是泛

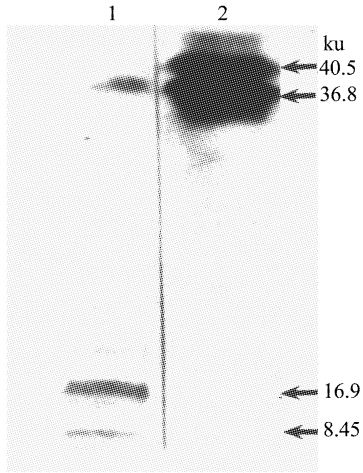

图 4 Western blot 显示 UCP_1 识别的小鼠附睾尾精子蛋白

1 示蛋白提取过程中未加蛋白水解酶复合体的抑制剂——ALLN, 泛素化蛋白降解为泛素单体(8.45 ku)和二聚体(16.9 ku); 2 示蛋白提取过程中加入 ALLN, 抑制剂能有效保护泛素化蛋白不被降解, 此时显示 UCP_1 识别分子量为 40.5 和 36.8 ku 的泛素化蛋白

素化蛋白, 在没有 ALLN 保护的情况下, 会被降解.

用空白(不加 UCP_1)或 1∶10 UCP_1 分别处理体外平行培养的两组精子, 并诱导获能和顶体反应. 对获能和顶体反应后的精子分别进行金霉素染色, B 型和 AR 型精子百分率的结果如图 5 中 1 和图 6 中 1 所示. 图 5 中 1 和图 6 中 1 的空白对照组与 UCP_1 处理组之间无显著差异, 说明 UCP_1 对精子体外获能和顶体反应无显著影响.

(ⅱ) anti-Ub 及 ALLN 对小鼠附睾尾精子体外获能、顶体反应的影响. 用 1∶100 anti-Ub(来源于兔血清, 因此选用正常兔血清作为对照)及 5 μmol/L ALLN(溶解于 DMSO 中, 因此选用 DMSO 作为对照)重复上述体外获能和顶体反应的研究, 形成 B 型或 AR 型精子百分率的变化如图 5 中 2 和 3 及图 6 中 2 和 3 所示. 图 5 中 2 和图 6 中 2 的组间均无显著差异, 说明 anti-Ub 对精子体外获能和顶体反应无显著影响. 图 5 中 3 和图 6 中 3 的组间也无显著差异, 说明 ALLN 对精子体外获能和顶体反应无显著影响.

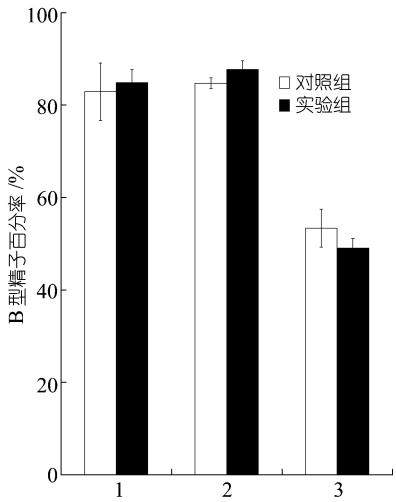

图 5 UCP_1, anti-Ub 或 ALLN 处理的小鼠(n = 5)附睾尾精子体外诱导获能后金霉素染色显示的 B 型精子百分率

1 示空白对照与 1∶10 UCP_1 (P = 0.5282, P > 0.05); 2 示正常兔血清对照与 1∶100 anti-Ub (P = 0.2526, P > 0.05); 3 示 DMSO 对照与 5 μmol/L ALLN (P = 0.0932, P > 0.05)

(ⅲ) 阻断 UPP 对小鼠获能精子体外穿卵的影响. 将小鼠(n = 5)获能精子分别进行如下 3 种处理: (1) 不加 UCP_1 或 1∶10 UCP_1 处理; (2) 正常兔血清或 1∶100 anti-Ub 处理; (3) DMSO 或 5 μmol/L ALLN 处理. 然后使其与雌鼠(n = 10)的正常超排卵(卵分为具透明带卵和去透明带卵两类)进行体外受精实验. 通

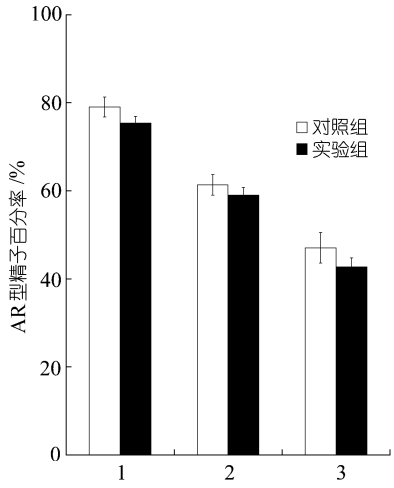

图 6 UCP_1, anti-Ub 或 ALLN 处理的小鼠(n = 5)附睾尾精子体外诱导顶体反应后金霉素染色显示的 AR 型精子百分率

1 示空白对照与 1∶10 UCP_1 (P = 0.5614, P > 0.05); 2 示正常兔血清对照与 1∶100 anti-Ub (P = 0.3125, P > 0.05); 3 示 DMSO 对照与 5 μmol/L ALLN (P = 0.0754, P > 0.05)

过统计形成原核的卵的百分率判断精子体外穿卵能力的变化, 结果如图 7 和 8 所示. 图 7 显示不同处理的获能精子穿具透明带卵的能力的变化. UCP_1, anti-Ub, ALLN 与其各自的对照组间都存在极显著差异, 说明三者对精子穿具透明带卵均有极显著抑制作用. 图 8 显示不同处理的获能精子穿去透明带卵的能力的变化. 图 8 中 1 的对照组与实验组间无显著差异,

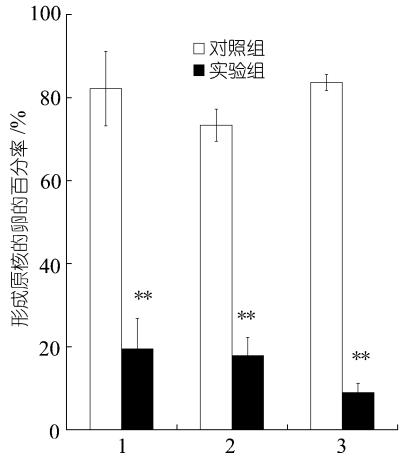

图 7 UCP_1, anti-Ub 或 ALLN 处理的雄性小鼠(n = 5)获能精子与雌鼠(n = 10)具透明带卵进行体外受精时形成原核的卵的百分率

1 示空白对照与 1∶10 UCP_1 (P = 0.006, P < 0.01); 2 示正常兔血清对照与 1∶100 anti-Ub (P = 0.000, P < 0.01); 3 示 DMSO 对照与 5 μmol/L ALLN (P = 0.000, P < 0.01). **示与对照相比有极显著差异(P < 0.01)

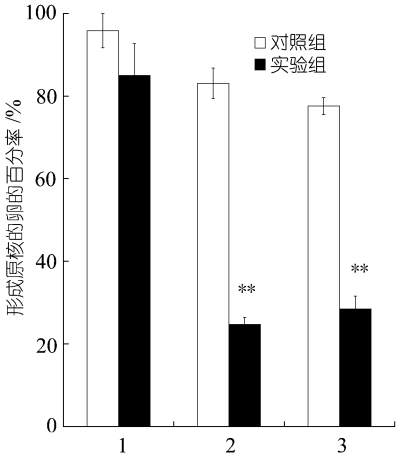

图 8 UCP_1, anti-Ub 或 ALLN 处理的雄性小鼠(n = 5)获能精子与雌鼠(n = 10)去透明带卵进行体外受精时形成原核的卵的百分率

1 示空白对照与 1∶10 UCP_1 (P = 0.2463, P > 0.05); 2 示正常兔血清对照与 1∶100 anti-Ub (P = 0.0000, P < 0.01); 3 示 DMSO 对照与 5 μmol/L ALLN (P = 0.0000, P < 0.01). **示与对照相比有极显著差异 (P < 0.01)

而 2 和 3 组间有极显著性差异, 说明 anti-Ub 和 ALLN 对精子穿去透明带卵有极显著抑制, 而 UCP_1 基本不影响这一过程.

为了验明导致上述差异出现的原因是通过精子还是通过卵产生的, 我们用与上述处理相同浓度的(1)空白或 UCP_1, (2) 正常兔血清或 anti-Ub 以及(3) DMSO 或 ALLN 处理雌鼠(n = 10)的超排卵, 再与小鼠(n = 5)正常获能精子混合, 统计形成原核的卵的百分率. 结果如图 9 所示. 图 9 中 1~3 的对照组和实验组间均无显著性差异. 说明经上述处理的卵与正常获能精子发生体外受精的能力无显著变化. 因此, UCP_1, anti-Ub 或 ALLN 对体外穿卵的影响主要是通过精子实现的.

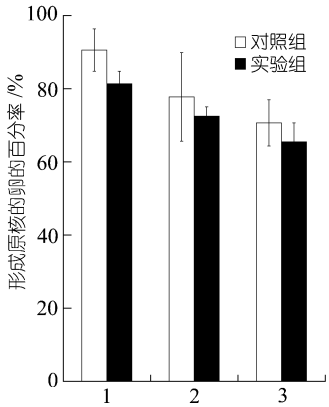

图 9 UCP_1, anti-Ub 或 ALLN 处理的雌鼠(n = 10)超排卵与小鼠(n = 5)正常获能精子发生体外受精时形成原核的卵的百分率

1 示空白对照与 1∶10 UCP_1 (P = 0.2752, P > 0.05); 2 示正常兔血清对照与 1∶100 anti-Ub(P = 0.4232, P > 0.05); 3 示 DMSO 对照与 5 μmol/L ALLN (P = 0.3824, P > 0.05)

3 讨论

本研究用一株来源于 HeLa 细胞的泛素化蛋白的单克隆抗体 UCP_1 对兔和小鼠附睾尾精子进行免疫荧光染色时发现, UCP_1 识别的蛋白特异分布于成熟精子头部赤道带和尾部中段. 我们推测, UCP_1 结合蛋白的这种分布特点可能和精子的某些生理功能有关. 在随后进行的体外穿卵实验中发现, UCP_1 明显抑制获能精子穿具透明带卵, 继而又证明 UCP_1 在成熟精子中识别并结合的蛋白仍是泛素化蛋白. 基于以上研究, 我们有理由推断: 泛素-蛋白水解酶复合体通路可能在受精过程精子与卵细胞的相互识别中发挥作用.

我们用抗泛素的多抗——anti-Ub 和蛋白水解酶复合体抑制剂——ALLN 对此问题进行深入研究, 发现 anti-Ub, ALLN 对小鼠精子体外获能和顶体反应都无显著影响, 但 anti-Ub 或 ALLN 处理的获能精子穿具透明带卵和去透明带卵的能力都被显著抑制. 为了进一步确证 UCP_1, anti-Ub 或 ALLN 对体外受精的影响是通过精子还是卵实现的, 我们用 UCP_1, anti-Ub 或 ALLN 单独处理卵, 然后再与正常获能精子混合进行实验. 结果显示, 此种处理的卵都能与正常获能精子发生体外受精. 由此可见, UCP_1, anti-Ub 及 ALLN 显著影响体外受精过程, 且这种影响主要是通过精子施加的.

此外, 在本研究过程中发现, 只有在精子发生获能后加入 UCP_1, UCP_1 才能与精子很好结合. 而如在获能之前加入 UCP_1, UCP_1 往往不能很好与精子结合, 并最终影响其穿卵. 前人研究表明, 精子获能过程中细胞膜组成成分发生剧烈改变. 获能之前, 一些蛋白的表位可能并不暴露, 因此其抗体不能与之结合, 但当精子获能后, 由于蛋白修饰作用或蛋白之间的相互影响, 致使一些蛋白的表位暴露, 此时若加入其特异性抗体, 便会发生抗原与抗体的相互作用, UCP_1 结合蛋白可能就属于此类.

尽管精子与卵识别、结合乃至融合的分子生物学机制尚未完全清楚, 但许多证据表明, 在受精开始阶段, 精子头部表面和卵子透明带表面的糖基互补和匹配是构成同种精卵特异性结合的分子基础[10~12]. 在卵子透明带上存在相应于精子的糖蛋白受体, 即精子受体. 精子与卵接触后, 与透明带上的蛋白发生

逐级识别, 二者发生第一级匹配后, 再发生第二级识别, 精子与卵发生如此逐级识别后, 精子质膜特异性地与卵的质膜融合. UCP_1 只抑制获能精子穿具透明带卵, 而对其穿去透明带卵无显著影响这一结果表明, UCP_1 主要在精子与卵透明带的识别中起作用, 而一旦越过透明带这个屏障, UCP_1 便再也不能阻止精子与卵的质膜融合及其后发生的受精过程. 所以 UCP_1 结合蛋白可能作为配体与透明带蛋白相互识别并结合, 或者 UCP_1 结合蛋白作为调节精子与卵细胞透明带识别的蛋白而发挥作用.

用 anti-Ub 及 ALLN 阻断 UPP 后, 体外受精明显被抑制. 但 anti-Ub 和 ALLN 具体抑制了哪些蛋白的水解, 这些蛋白是直接参与精子与卵细胞的相互识别还是仅作为此过程的调节因子, 这些蛋白又是在哪一层次上影响了精、卵相互识别, 这些问题都有待于进一步研究. 然而, 阻断 UPP 后, 对精卵体外受精的明显抑制作用有力地说明, UPP 参与精卵体外受精过程.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: G1999053901)、国家自然科学基金重点项目(批准号: 39430080)和中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室资助项目.

参 考 文 献

1 Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. J Cell Physiol, 2000, 182(1): 1~11
2 Strous G J, Govers R. The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. J Cell Sci, 1999, 112(Pt 10): 1417~1423
3 DeMartino G N, Slaughter C A. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. J Biol Chem, 1999, 274(32): 22123~22126
4 Tokunaga Y, Imai S, Torii R, et al. Cytoplasmic liberation of protein gene product 9.5 during the seasonal regulation of spermatogenesis in the monkey (Macaca fuscata). Endocrinology, 1999, 140(4): 1875~1883
5 Tipler C P, Hutchon S P, Hendil K, et al. Purification and characterization of 26S proteasomes from human and mouse spermatozoa. Mol Hum Reprod, 1997, 3(12): 1053~1060
6 Chen H Y, Sun J M, Zhang Y, et al. Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. J Biol Chem, 1998, 273(21): 13165~13169
7 Day I N, Hinks L J, Thompson R J. The structure of the human gene encoding protein gene product 9.5 (PGP9.5), a neuron-specific ubiquitin C-terminal hydrolase. Biochem J, 1990, 268(2): 521~524
8 Sutovsky P, Moreno R D, Ramalho-Santos J, et al. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. Nature, 1999, 402 (6760): 371~372
9 Saling P M. Involvement of trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zonae pellucidae. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78(10): 6231~6235
10 Myles D G, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with the egg. Biol Reprod, 1997, 56(2): 320~327
11 Boldt J, Howe A M, Parkerson J B, et al. Carbohydrate involvement in sperm-egg fusion in mice. Biol Reprod, 1989, 40(4): 887~896
12 Wolfsberg T G, Bazan J F, Blobel C P, et al. The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(22): 10783~10787

(2001-04-03 收稿, 2001-07-06 收修改稿)