

# 人睾丸特异性基因蛋白抗体制备及其在无精症睾丸组织中的表达\*

周永翠<sup>1</sup>, 刁瑞英<sup>2</sup>, 颜秋霞<sup>2</sup>, 桂耀庭<sup>2△</sup> (1. 汕头大学医学院第一附属医院生殖中心, 广东汕头 515041; 2. 北京大学深圳医院广东省与深圳市男性生殖与遗传重点实验室, 广东深圳 518036)

**【摘要】** 目的 探讨人睾丸特异性基因(TSC21)蛋白在无精子症患者睾丸组织中的表达特征。方法 构建人 pET32a-TSC21 表达载体, 转化到感受态 BL21 细菌, 诱导表达并纯化 TSC21 蛋白; 免疫小鼠, 制备抗人的 TSC21 多克隆抗体; 应用免疫组化方法检测 TSC21 在健康者睾丸组织和生精阻滞患者睾丸组织中的表达差异。结果 成功制备人 TSC21 的鼠源性多克隆抗体; TSC21 蛋白在健康者睾丸组织中主要定位于精母细胞和圆形精子细胞; 在生精阻滞的无精症患者中表达减弱。结论 TSC21 蛋白对于睾丸发育和精子发生可能具有重要作用, 其表达降低可能是男性不育症发生的重要原因之一。

**【关键词】** 睾丸特异性基因多克隆抗体; 无精症; 睾丸

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.13.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)13-1537-02

**Preparation of the antibody against human TSC21 protein and its expression characteristics in testis from patients with azoospermia\*** ZHOU Yong-cui<sup>1</sup>, DIAO Rui-ying<sup>2</sup>, YAN Qiu-xia<sup>2</sup>, GUI Yao-ting<sup>2△</sup> (1. Reproduction Medicine Center, the First Affiliated Hospital of the Medical College of Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China; 2. Key Laboratory of Shenzhen Male Reproduction and Genetics of Shenzhen Hospital, Beijing University, Shenzhen, Guangdong 518036, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the expression characteristics of TSC21 in testis from patients with azoospermia. **Methods** Human TSC21 gene was constructed recombinant expression plasmid pET32a vectors hTSC21, and transferred into BL21. IPTG induced the gene expressed. The protein of interest was purified, then we immunized the mice for preparing antiserum, and detected the expression and localization of TSC21 proteins and the difference of expression in testis from fertile men and the patients with azoospermia by immunohistochemistry. **Results** Anti TSC21 polyclonal antibody was generated successfully; Immunohistochemistry showed that TSC21 was predominantly located in spermatocytes and round spermatids. In the testis from patients with azoospermia, the expression of the protein was significantly decreased in spermatocytes and round spermatids. **Conclusion** TSC21 may participate in testicular development and spermatogenesis, and its abnormal expression may be one of the important factors in male infertility.

**【Key words】** TSC21 polyclonal antibody; azoospermia; testis

目前全世界大约有 15% 的夫妇受到不育症的影响, 男性因素占 50%, 其中无精子症在男性不育的致病因素中占 5%~20%<sup>[1]</sup>。精子的产生是一个极其复杂的多步骤过程, 在这个连续增殖分化的过程中, 任何一个环节出现异常都会引起精子发生过程停滞, 如停滞于精原细胞, 精母细胞或精子细胞等某个阶段而不能产生精子, 临床上表现为少精症和无精症<sup>[2]</sup>。睾丸特异性基因(TSC21)是本课题组前期工作中鉴定的一个睾丸特异性基因, 已证实 TSC21 基因在隐睾症和无精子症患者睾丸组织中的表达明显减少或消失, 提示该基因在睾丸组织精子发生的过程中具有重要作用<sup>[3-4]</sup>。本研究通过制备人 TSC21 的多克隆抗体, 并进一步采用免疫组化方法研究 TSC21 蛋白在健康者和无精症睾丸组织中的表达特征。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 健康者的睾丸组织取材于意外死亡的健康者或手术切除, 年龄 24~40 岁, 共 10 例。收集手术切除或活检的无精症患者新鲜标本, 年龄 22~36 岁, 共 10 例。只筛选活

检诊断为非梗阻无精症, 包括生精阻滞于精子发生过程中不同阶段及较严重的惟支持细胞综合征(SCOS)的睾丸组织。

**1.2 试剂** 大肠埃希菌 BL21 感受态菌株、限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 和 T4 连接酶购自 Neb 公司; 聚合酶链反应(PCR)回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司; 完全福氏佐剂购自美国 Sigma 公司; 免疫组化检测试剂盒购自 Zymed 公司; ECL 发光试剂盒购自 Pierce 公司; 硝酸纤维素膜(PVDF)购自 Millipore 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

## 1.3 人 TSC21 蛋白鼠源抗体的制备

**1.3.1 TSC21 蛋白的表达和纯化** 使用高保真酶扩增出 TSC21 基因的全长序列, PCR 产物经纯化后, 与 pET32a 空载体分别经 EcoR I 和 Xho I 双酶切胶回收后, 通过连接转化构建 pET32a-TSC21 重组表达载体。阳性克隆经测序正确后抽提质粒, 进行诱导表达。将重组质粒载体 pET32a-TSC21 转化到感受态 BL21 细菌。挑选单个克隆加入 5 mL LB/A+ 培养液, 37 °C, 200 r/min 摇床过夜。取上述菌液 2 mL 加入 100

\* 基金项目: 广东省教育厅“育苗工程”项目(LYM10076); 广东省医学科研基金项目(B2010214)。

△ 通讯作者, E-mail: guiyaoing2007@yahoo.com.cn。

mL 新鲜 LB/A 中, 200 r/min, 37 °C 摇床 2~4 h, 至 OD600=0.4~0.6。加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导, 200 r/min, 37 °C 摇床 4 h。离心收集诱导后菌液, 以未诱导的菌液为对照, SDS-PAGE 电泳鉴定是否有明显蛋白诱导条带。TSC21 在 BL21 细菌中表达形式为可溶性形式表达, 然后用亲和层析纯化。

**1.3.2 免疫小鼠制备抗体** 取 50 μg 纯化的 TSC21 蛋白加 200 μL 灭菌 PBS 与等体积的完全福氏佐剂混合进行充分乳化, 每只 50~100 μg 腹腔注射免疫 BALB/C 小鼠, 总剂量每只 0.5 mL。首次免疫后每隔 2 周加强免疫 1 次, 剂量同前, 用不完全福氏佐剂充分乳化后, 注射小鼠腹腔。第 3 次加强免疫后断尾取血, 分离血清, 测定血清效价。

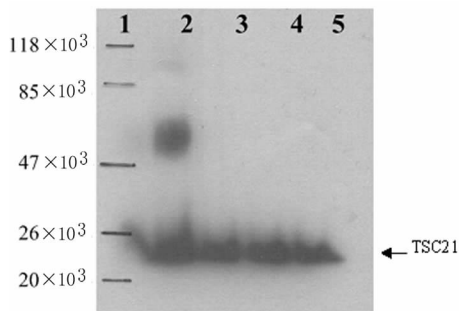
**1.4 Western blot 分析** 取健康者睾丸组织, 剪成细小碎片, 细胞漂洗液漂洗一遍, 加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂 1:100, 混匀组织, 匀浆样品, 冰上孵育 30 min 后, 12 000 g 离心 20 min, 分别获得各种组织裂解液。按比例加入 5×SDS 上样缓冲液, 100 °C 加热 15 min, 进行常规 SDS-PAGE 电泳后, 半干法转至 PVDF 膜上, 用 10 g/L 小牛血清 4 °C 封闭过夜。次日加入稀释的制备抗体, 室温下孵育 4 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 室温下孵育 1 h, TBST 彻底洗涤后, ECL 试剂处理后, 置荧光影像扫描仪上曝光, 计算机自动将每隔 20 s 检测到的信号保存。

**1.5 组织切片制备** 取睾丸组织, 迅速移至 4% 多聚甲醛溶液固定 36 h, 流水冲洗 30 min, 再浸入各级乙醇(50%、70%、80%、90%、95%、100%) 脱水各 25~30 min, 苯透明约 2 h, 至标本透明后浸蜡 2h, 常规包块。组织切片机切片, 厚度为 5 μm, 展片于多聚赖氨酸处理好的载玻片上, 于 60 °C 烤箱中烤片过夜。设立阴性对照, 分别以磷酸盐缓冲液(PBS)和非免疫的正常鼠血清代替一抗进行免疫组化染色。染色结果的判定以细胞内含有棕黄色染色颗粒为阳性染色细胞。

**1.6 睾丸组织中 TSC21 的免疫组化** 准备健康者和无精症患者睾丸石蜡切片, 应用制备的鼠源抗人 TSC21 抗体进行免疫组织化学染色, 检测蛋白在健康者和无精症患者睾丸组织中的表达。

**2 结 果**

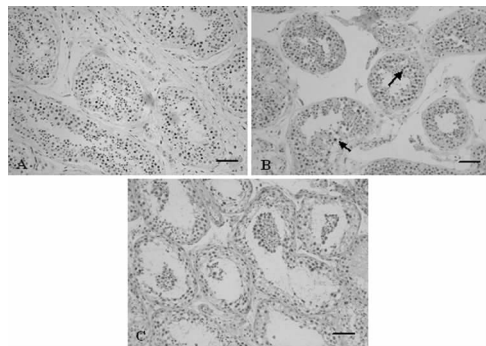
**2.1 TSC21 抗体制备的鉴定** Western blot 结果显示, TSC21 抗体可识别健康者睾丸总蛋白中相对分子质量约为 21 ×10<sup>3</sup> 的 TSC21 蛋白质(抗原), 而与健康者肾脏、肺和子宫组织蛋白之间没有结合。人 TSC21 蛋白质相对分子质量 20.61 ×10<sup>3</sup>, Western blot 结果基本符合理论大小, 其结果初步确定 TSC21 蛋白质在人睾丸组织中表达, 见图 1。



注: 1. Marker; 2. 菌体全蛋白抗原; 3. 纯化 TSC21 蛋白; 4~5. 人体睾丸组织。

图 1 TSC21 在人体睾丸组织的表达

**2.2 TSC21 蛋白在无精症患者睾丸组织中的表达特征** 由图 2 的免疫组化结果可见, 在正常睾丸中 TSC21 蛋白主要在精母细胞和圆形精子细胞中表达(B 箭头所示)。与正常睾丸组织相比, TSC21 蛋白在生精阻滞的无精症患者中表达减少(C)。



注: A. 阴性对照; B. 健康者睾丸组织; C. 无精症患者睾丸组织。(标尺=50 μm)。

图 2 TSC21 蛋白的表达和定位

**3 讨 论**

TSC21 是本实验室在前期的工作中鉴定的一个睾丸特异性基因。人 TSC21 基因<sup>[3]</sup> 定位于人染色体 2p11.2 位点, 其 cDNA 长度 797 bp, 开放阅读框 542 bp, 编码一个由 180 个氨基酸组成、相对分子质量为 20.61 ×10<sup>3</sup> 的蛋白质。前期的研究证实 TSC21 基因在人和小鼠中均呈现睾丸特异性和年龄依赖性表达模式, 绿色荧光蛋白融合基因转染实验显示 TSC21 蛋白质定位于精母细胞的细胞核上, 且 TSC21 在隐睾症和无精子症患者睾丸组织中的表达明显减少或消失。这些结果提示该基因在睾丸组织精子发生的过程中具有重要作用。本课题进一步采用免疫组化方法, 对该基因在蛋白质水平的表达特征进行了研究。

众所周知, 精子的产生虽然是生精细胞分裂分化和凋亡的过程, 但它又不是只与生殖细胞有关的单一类型细胞的事件, Sertoli 细胞和 Ledyig 细胞都积极地参与到精子产生的调控当中。而睾丸不同种类细胞中表达的基因, 在精子产生的过程中必然起着不同的作用, 并有着不同的作用机制。因此明确基因/蛋白在睾丸中的细胞定位, 是对其进行深入功能研究的最直接而重要的信息。本研究采用免疫组化方法研究 TSC21 蛋白在人睾丸的组织定位, 结果显示, TSC21 蛋白主要分布于人睾丸组织的精母细胞和圆形精子细胞核中, 这与 mRNA 的组织定位相一致。为了进一步研究 TSC21 蛋白的功能, 本文比较了健康者和生精阻滞的无精症患者的蛋白表达差异, 结果发现, 与正常睾丸组织相比, TSC21 蛋白在生精阻滞的无精症患者中表达减少, 表明了 TSC21 蛋白的表达减少与无精子症患者的生精障碍可能有一定的关系。

Rual 等<sup>[5]</sup> 采用严格的高通量酵母双杂交方法, 构建了一个包含 8 100 个开放阅读框的蛋白质-蛋白质互作网络, 并发现 TSC21 是黑色素瘤相关抗原 11(MAGEA11) 的互作基因。MAGEA11 基因表达于雄性激素依赖的组织和前列腺癌细胞系中, 是雄激素受体惟一的辅调控因子, MAGEA11 通过调控相互作用之间的功能域提高雄激素受体的活性<sup>[6]</sup>。进一步的研究和探讨该基因的功能对于揭示精子发生过程中的分子机制, 以及临床男性不育的诊断和治疗均具有重要的意义。

**参考文献**

[1] Nishimune Y, Tanaka H. Infertility caused(下转第 1540 页)

的信息;测试信息(TCD):包括试验名称、稀释倍数等试验信息;结果(OBX):检验结果信息,包括试验名称、检验结果、标志、参考范围、检验仪器等结果信息。

### 1.3 业务流程

1.3.1 工作单信息查询 检验仪器扫描到标本条码向 LIS 发出查询工作单的申请消息 ORM^R01, LIS 收到查询申请后返回工作单的申请消息 ORR^0。

1.3.2 仪器发送结果到 LIS 在检验仪器检验完成后主动向 LIS 发送结果 ORU^O01, LIS 收到结果后返回确认消息 ACK^R01。

1.4 接口结构 本文的接口程序由 3 个大模块组成,见图 1。

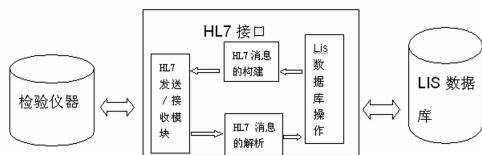


图 1 HL7 接口结构

1.4.1 HL7 发送/接收模块 由于系统采用的是客户机/服务器(Client/Server,C/S)模式,可以通过 TCP/IP,利用 socket 建立连接传递 HL7 消息。传输的数据格式为由符合 HL7 的消息字符串。

1.4.2 HL7 消息的构建/解析模块 HL7 消息的构建即将数据根据 HL7 编码成标准的 HL7 消息,HL7 消息的解析即为以上过程的逆过程。

1.4.3 Lis 数据库操作模块负责数据保存与读取。

## 2 结果

工作站通过 TCP/IP 同时与检验仪器和 LIS 服务器连接,接口程序作为工作站的一个服务运行在后台,与检验仪器实现结果数据和测试项目申请信息双向通信,结合 LIS 的标本条码化管理,可显著提高临床检验效率。

## 3 讨论

目前各类检验仪器采用的通讯标准不一样,系统管理方式不一致,使得信息共享难以实现,寻求一个符合各个系统厂商利益,医疗卫生界认可的标准是解决当前难题的首要条件。异构医疗信息系统之间实行信息共享是全球医疗卫生信息化的发展趋势<sup>[5]</sup>。HL7 是医疗领域不同应用之间电子传输的国际标准。它自 1987 年发布第一版以来,发展迅速,1997 年发布的 v2.3 版本得到了美国国家标准化协会(ANSI)的认可,从 1996 年开始 HL7 就开始研发 v3.0 的版本,并于 2003 年 12 月发布了一个比较完整的 v3.0 版本,2004 年 3 月 ANSI 将其接纳为美国国家标准,2006 年 9 月国际标准化组织(ISO)将其接

纳为 ISO 标准'ISO/HL7 21731:2006'。在检验信息系统中使用 HL7 等协议作为数据交换的标准是未来发展的必然趋势。使用同一的标准将大大减 LIS 系统的开发维护成本,如本文中的接口程序除了可以用迈瑞的 BC5800 外,还可应用于与迈瑞血细胞分析仪 BC5300、罗氏公司前处理控制系统 IT3000 等一些遵从 HL7 通信标准的实验仪器的通信。

HL7 支持 TCP/IP,TCP 提供了对段的检错、应答、重传和排序的功能,并提供了可靠地建立连接和拆除连接的方法,还提供流量控制和拥塞控制的机制。从而保证了数据底层通讯的可靠性。使用 TCP/IP 协议在局域网内传输速度最高可达几十兆,对于一些数据量大的二进制数据(如血常规的散点图和直方图)的传输这点非常重要,HL7 官方推荐使用 base64 标准将二进制的图像编码成字符串进行传输<sup>[6]</sup>,因此 HL7 适用于检验仪器与 LIS 之间的实时、高速、可靠的数据交换。

HL7 发展迅速,技术日趋成熟,HL7 作为医疗卫生信息化标准成为了医疗界的共识,HL7 在美国,英国,日本等发达国家应用广泛<sup>[7]</sup>。使用 HL7 可以简化异构医疗信息系统的集成方案,节约异构医疗系统信息交换的成本,符合医学信息化的发展趋势,因此综合来看,使用 HL7 节约了 LIS 开发维护成本,节省了信息交换时间,保证了数据的可靠性,提高了工作效率。

## 参考文献

- [1] 付森,何叶松,李莉. HL7 标准医院信息系统概述[J]. 中国临床研究,2010,23(11):1051-1052.
- [2] 钱志明,徐海澎. 基于 HL7 V3 建立临床数据中心[J]. 中国数字医学,2008,3(5):67-69.
- [3] 范友志,张伟成. 基于 HL7 标准的生理参数传输平台设计[J]. 电子测量技术,2010,33(11):28-31.
- [4] 余浩,郭广宏,董振南,等. LIS 中 HL7 接口设计与实现[J]. 中国数字医学,2010,7(1):55-58.
- [5] 张翠英,张尚军,徐晨勇,等. 医疗信息交换标准-HL7[J]. 生物医学工程学杂志,2001,18(1):111-115.
- [6] 丁敏,宋余庆,王春红. 基于 HL7 v3 消息的医学图像信息交换的研究[J]. 计算机工程与设计,2009,30(7):3986-3988.
- [7] 俞汝龙. HL7 组织与 HL7 标准简介[J]. 中国数字医学,2007,2(7):41-43.

(收稿日期:2012-03-23)

(上接第 1538 页)

by polymorphisms or mutations in spermatogenesis-specific genes[J]. J Androl,2006,27:326-334.

- [2] 郭应禄,辛钟成. 男子生殖医学[M]. 北京:科学出版社,2005:28-71.

- [3] Yu Z, Tang A, Gui Y, et al. Identification and characteristics of a novel testis-specific gene, Tsc21, in mice and human[J]. Mol Biol Rep,2007,34(2): 127-134.

- [4] 余振东,唐爱发,吴波,等. 新基因 TSC21 的生物信息学分析及其原核载体构建表达[J]. 中国实验诊断学,2007,

11(1):16-19

- [5] Rual JF, Venkatesan K, Hao T, et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network[J]. Nature,2005,437(7062):1173-1178.

- [6] Bai S, He B, Wilson EM. Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction[J]. Mol Cell Biol,2005,25(4):1238-1257.

(收稿日期:2012-03-11)