

Mapowanie białek plazmy nasienia knura przy wykorzystaniu metody elektroforezy dwukierunkowej w żelu poliakrylamidowym^{*)}

WŁADYSŁAW KORDAN, JERZY STRZEŻEK, DANIEL SOLIWODA,
MAREK LECEWICZ, MARZENA MOGIELNICKA

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Wydziału Bioinżynierii Zwierząt UWM, ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn

Kordan W., Strzeżek J., Soliwoda D., Lecewicz M., Mogielnicka M.

Mapping of boar seminal plasma proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

Summary

An attempt was made to use a modified 2-D PAGE technique to analyze seminal plasma proteins and their polymorphisms in relation to boar age and season. The 2-D PAGE analysis of seminal plasma proteins was performed using a buffer pH gradient of 3 to 10. Modifications to the 2-D PAGE procedure included substituting mercaptoethanol (ME) with dithiothreitol (DTT) and the use of a specific reagent assay (Plus One 2-D Clean-Up Kit, Amersham Biosciences), which markedly improved the resolution of the electrophoregrams. Polymorphisms by polypeptide mapping of boar seminal plasma were dependent on the animal age and season. Furthermore, the amount of polypeptides detected in the seminal plasma was significantly lower in 12 month-old boars compared with 3 year-olds. Additionally, the seminal plasma polypeptides were markedly lower in the summer than in the autumn. The results of the study showed that mapping seminal plasma proteins may be used as a marker for the secretor activity of boar accessory sex glands, and as a selection criterion for male reproduction.

Keywords: boar, seminal plasma, polyacrylamide gel electrophoresis

Plazma nasienia jest kompleksem białek, których synteza związana jest z jądrami, najądrzami i dodatkowymi gruczołami płciowymi (14). W składzie biochemicznym białek plazmowych zidentyfikowano enzymy, hormony (12), inhibitory proteinaz, glikoproteiny (15). Opłaszczając się po ejakulacji na powierzchni plazmoemy w obrębie struktur biochemicznych plemników, białka stają się systemami polifunkcyjnymi warunkującymi zdolność zapładniającą plemników, decydującymi często o płodności samca (17). W ostatnim okresie uzyskano interesujące rezultaty badań wskazujące, że niektóre białka plazmowe determinować mogą płodność buhajów (7), ogierów (1) i knurów (4). Podkreślono ich wpływ na przydatność nasienia do kriokonserwacji (5). Niemniej za niezbędne należy uznać dalsze poszukiwania nowych rozwiązań metodycznych pozwalających na charakterystykę strukturalną białek plazmy nasienia związanych z płodnością.

Obok rutynowo stosowanych w laboratoriach biochemicznych metod chromatografii powinowactwa,

chromatografii odwróconej fazy HPLC, sekwencjonowania białek, szczególne zainteresowanie dotyczy wysokorozdzielczych metod elektroforezy. Dwukierunkowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (2-D PAGE), obok spektrometrii masowej (MS), należy do bloku analitycznego stosowanego w proteomice, umożliwiając, między innymi, mapowanie białek (11). Termin mapowanie białek (protein mapping) dotyczy identyfikacji pojedynczych polipeptydów w złożonych mieszaninach białek przy wykorzystaniu metody 2-D. Omawiana metoda stanowi połączenie izoelektroogniskowania (IEF) i elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności soli sodowej siarczanu dodecylosodowego (SDS-PAGE) (10). W ten sposób metoda 2-D pozwala na jednoczesną identyfikację białek na podstawie ich ładunku elektrostatycznego oraz masy cząsteczkowej. Dwukierunkowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym została wykorzystana do charakterystyki plazmy nasienia różnych gatunków ssaków (1-3, 7, 9).

Celem badań była ocena zmienności liczby polipeptydów w plazmie nasienia, identyfikowanych metodą elektroforezy dwukierunkowej, w zależności od wieku knurów i sezonu, w którym pozyskiwano nasienie.

^{*)} Badania wykonane w ramach tematu badań statutowych UWM w Olsztynie nr 0103.0803.

Materiał i metody

Materiał doświadczalny. Ejakulatory pobierano metodą manualną od trzech knurów rasy wbp i pbz stacjonujących w Laboratorium Biologii Rozrodu Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt UWM w Olsztynie. Analizie poddano 24 ejakulatory. Uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie na pobieranie nasienia.

Przygotowanie próbek plazmy nasienia do rozdzielów elektroforetycznych metodą 2-D PAGE. Do badań stosowano plazmę nasienia uzyskaną po dwukrotnym wirowaniu nasienia przez 20 minut, odpowiednio, przy $900 \times g$ i $10\,000 \times g$, w temperaturze pokojowej. Przed wykonaniem rozdzielu elektroforetycznego w próbach oznaczano zawartość białka (18). Zastosowano oryginalną, zmodyfikowaną, procedurę przygotowania próbek plazmy nasienia do rozdzielów elektroforetycznych. Próby rozcieńczano do końcowej koncentracji 0,1 mg białka/ml i preinkubowano w obecności specyficznego zestawu odczynnikowego (Plus One 2-D Clean-Up Kit, Amersham Biosciences) zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Po preinkubacji próby zawieszano w 100 μ l zmodyfikowanego buforu lizującego (9,5 M mocznik – Amersham Biosciences, 2% Triton X-100 – Sigma, 65 mM ($0,65 \times 10^{-1}$ M) DTT – Serva, 2% roztwór amfolitów w zakresie pH 3-10 – Amersham Biosciences) i poddawano elektroforezie dwukierunkowej.

Elektroforeza dwukierunkowa (2-D PAGE) białek plazmy nasienia. Przeprowadzono ją zgodnie z metodą podaną przez O'Farrel i wsp. (10), w gradiencie pH 3-10.

Izoelektroogniskowanie (IEF). Żele do izoelektroogniskowania (9,2 M mocznik, 4% poliakryloamid – Sigma, 20% Triton X-100, 2% roztwór amfolitów w zakresie pH 3-10) poddawano wstępnej preelektroforezie z zastosowaniem zmiennych wartości napięcia (200 V – 10 min., 300 V – 15 min., 400 V – 15 min.). Zasadniczy rozdziel elektroforetyczny, poprzedzony elektroforezą wstępną (500 V – 10 min.) prowadzono w temperaturze pokojowej (850 V – 4,5 godziny).

Elektroforeza denaturująca (SDS-PAGE). Po izoelektroogniskowaniu, żele poddawano inkubacji w buforze ekwilibrującym (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8; 2,3% SDS, 5,0% 2-merkaptioetanol – Serva, 10% glicerol – POCH, Gliwice, 0,05% błękit bromofenolowy, metanol – POCH, Gliwice) przez 10 minut. Rozdzielu elektroforetyczny prowadzono w 15% żelu poliakryloamidowym w obecności (SDS) oraz przy zastosowaniu buforu Tris-glicyna-SDS (pH 8,3) (8), wykorzystując aparat Mini Protean II (Bio-Rad).

Detekcja próbek po elektroforezie 2-D PAGE. Żele poliakryloamidowe barwiono metodą srebrową z wykorzystaniem zestawu odczynników Silver staining kit (Amersham Biosciences) (6). Analizę elektroforegramów przeprowadzono z zastosowaniem programu komputerowego PD Quest™ (Bio-Rad). Program ten pozwala na jednoczesne i precyzyjne wyznaczenie masy cząsteczkowej oraz ładunków elektrostatycznych analizowanych białek.

Wpływ wieku i pory roku na profil elektroforetyczny polipeptydów plazmy nasienia knura. Próbkę plazmy nasienia stosowane w badaniach elektroforetycznych uzyskiwano z ejakulatów 3 knurów spełniających kryteria normospermii, w odniesieniu do wybranych wskaźników makroskopowych, mikroskopowych, morfologicznych oraz

Tab. 1. Wybrane wskaźniki ejakulatów (n = 24)

Wskaźnik	\bar{x}	Normospermia wg (16)
Objętość ejakulatu (cm ³)	248,78	100-400
Koncentracja plemników (10 ⁶ /cm ³)	580,44	150-600
Ruchliwość plemników (%)	68,17	> 50
Odsetek plemników zmienionych morfologicznie (%)	7,80	< 20
Białko całkowite (mg/cm ³)	36,33	około 38,00

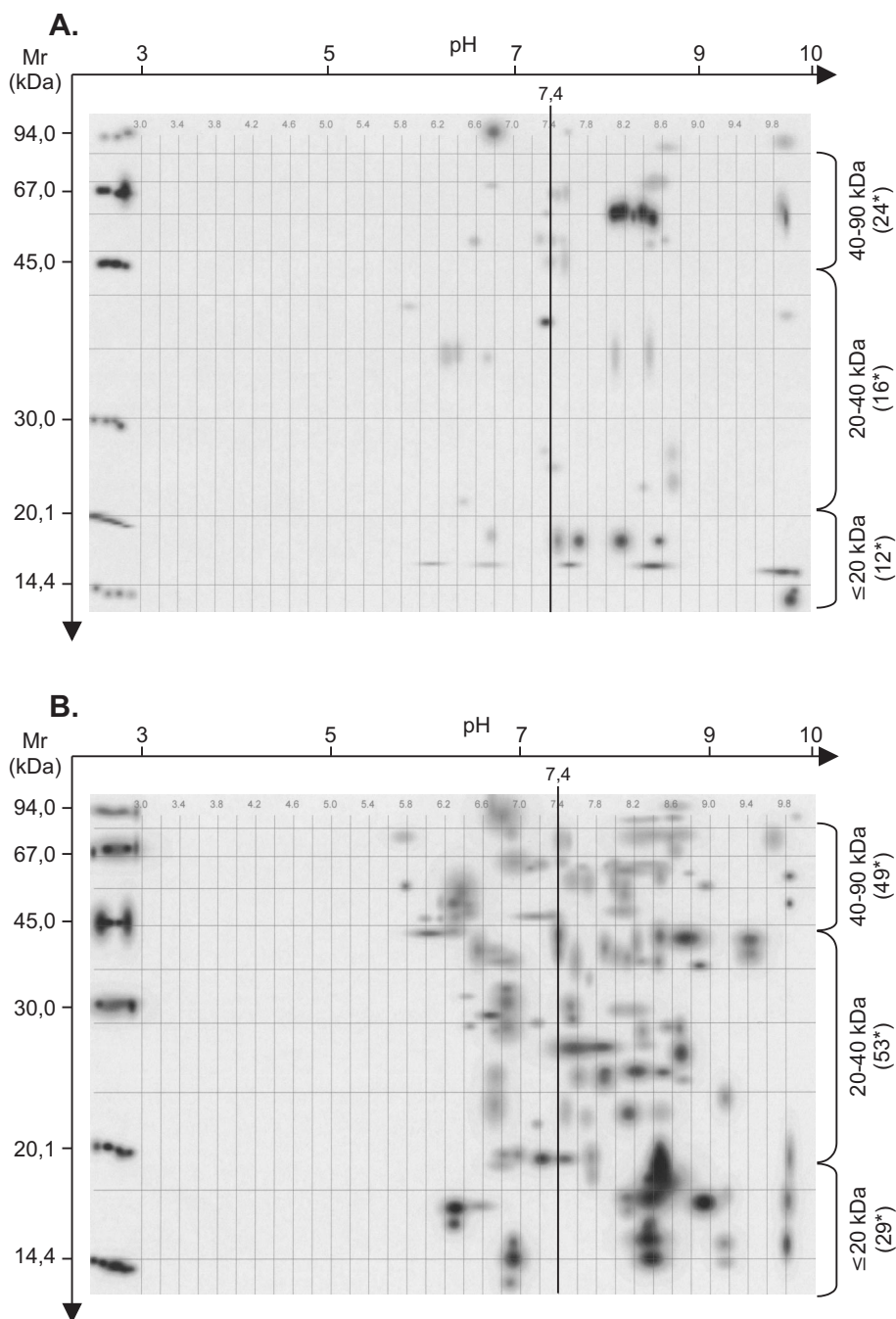
zawartości białka całkowitego (tab. 1). Po pobraniu ejakulatu sączono przez sterylną gazę w celu usunięcia frakcji galaretowatej, a następnie poddawano wirowaniu przy $10\,000 \times g$ w ciągu 15 minut, w temperaturze pokojowej. Uzyskaną w ten sposób plazmę nasienia przechowywano w temperaturze -80°C (193,2 K) do czasu dalszych analiz. Uwzględniono 12-miesięczne przedziały wiekowe knurów. Badaniem profili elektroforetycznych objęto plazmy nasienia uzyskane od knurów w wieku: 12 miesięcy, 24 miesięcy, 36 miesięcy i dodatkowo 42 miesięcy. Uwzględniając zmiany długości dnia świetlnego oraz wpływ tego zjawiska na właściwości biologiczne nasienia wyodrębniono cztery okresy, w których wykonano badania profili elektroforetycznych, tj. wiosenny (obejmujący miesiące: kwiecień, maj, czerwiec), letni (obejmujący miesiące: lipiec, sierpień, wrzesień), jesienny (obejmujący miesiące: październik, listopad, grudzień) oraz zimowy (obejmujący miesiące: styczeń, luty, marzec).

Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego Statistica 6.0 (statsoft). Stosowano test Dunnetta.

Wyniki i omówienie

Białka plazmy nasienia knura wykazują tendencję do agregacji powodowanej, między innymi, ich glikoproteinowym charakterem (15), co w znacznym stopniu utrudnia ich analizę elektroforetyczną. Stosowanie klasycznej metody elektroforezy dwukierunkowej (2-D) do analizy omawianych substancji nie daje zadowalających rezultatów, co przejawia się niską rozdzielczością otrzymanych elektroforegramów i w końcowym efekcie nie pozwala na ich obiektywną analizę. W niniejszych badaniach podjęto próbę adaptacji metody (2-D) do analizy białek plazmy nasienia knura.

W wyniku modyfikacji metody 2-D PAGE, polegającej na zastosowaniu specyficznego zestawu odczynnikowego (Plus One 2-D Clean-Up) do preinkubacji próbek, otrzymano wzrost rozdzielczości elektroforegramów. Zastosowanie preinkubacji w znacznym stopniu redukowało ingerencję substancji niepożądanych, takich jak: kwasy nukleinowe, detergenty, sole, lipidy, fenole. Dodatkowo zastąpienie w buforze lizującym 2-merkaptioetanolu DTT (ditiotritolem), posiadającym większą zdolność redukcji mostków disiarczkowych ze względu na obecność w składzie dwóch grup tiolowych (-SH), wpływało pozytywnie na rozdzielczość elektroforetyczną białek plazmy nasienia knura. Ob-



Ryc. 1. Elektroforeza dwukierunkowa (2-D) białek plazmy nasienia knura w wieku 12 miesięcy (A) i 36 miesięcy (B)

Objaśnienia: * – liczba polipeptydów

serwowane zjawisko pozwoliło na zastosowanie metody 2-D do analizy map polipeptydowych plazmy nasienia z uwzględnieniem wieku knurów i pory roku. W obrębie analizowanych elektroforegramów wyodrębniono trzy grupy polipeptydów, przyjmując za kryterium podziału ich masę cząsteczkową, tj.: $\leq 20,1$ kDa – grupa I; 20,1-40 kDa – grupa II; 40-90 kDa – grupa III.

Jak wynika z danych przedstawionych na ryc. 1, wraz z upływem wieku knura obserwowano zmiany ilościowe i jakościowe w składzie map polipeptydowych. Zjawisko to przejawiało się szczególnie wzrostem ogólnej liczby polipeptydów u analizowanego osob-

nika, odpowiednio, od 52 w wieku 12 miesięcy do 131 w wieku 36 miesięcy. Dynamiczny wzrost liczby polipeptydów obserwowano szczególnie w przedziale 20-40 kDa, od 16 u knura w wieku 1 roku do 53 u osobnika w wieku 3 lat oraz w grupie polipeptydów o masie cząsteczkowej 40-90 kDa, od 24 w wieku 12 miesięcy do 49 w wieku 36 miesięcy. Zmianom ilościowym frakcji polipeptydowych towarzyszyło pojawienie się białek o nowych właściwościach biochemicznych, których przejawem były wartości pI białek w zakresie pH obojętnego, a szczególnie zasadowego. Dotyczyło to zwłaszcza polipeptydów w przedziale mas cząsteczkowych od 20 do 40 kDa i od 40 do 90 kDa.

Rezultaty analiz ilościowych profili polipeptydowych plazmy nasienia z uwzględnieniem wieku knurów przedstawia ryc. 2A. W analizowanych próbkach plazmy nasienia obserwowano, potwierdzony statystycznie, wzrost ogólnej liczby polipeptydów wraz z upływem wieku knurów, odpowiednio, od 72 w wieku 1 roku do 125 w wieku 3 lat. U osobników w wieku 3,5 roku stwierdzono tylko nieznaczny wzrost liczby polipeptydów. Na podkreślenie zasługuje fakt istotnego wzrostu liczby polipeptydów u osobników 3-letnich, szczególnie w przedziale mas cząsteczkowych od 20 do 40 kDa. Również w pozostałych grupach (> 20 kDa, 40-90 kDa) najwyższą liczbę polipeptydów obserwowano u osobników w wieku 3-3,5 roku.

Wyniki badań wskazywać mogą na osiągnięcie pełnej zdolności sekrecyjnej dodatkowych gruczołów płciowych knura w wieku około 3 lat. Zjawisko to zapewne dotyczy szczegól-

nie gruczołów pęcherzykowych, które u knura są głównym źródłem białek plazmy nasienia (15).

Jak wynika z danych przedstawionych na ryc. 2B, najwyższą, potwierdzoną statystycznie, liczbę polipeptydów obserwowano w okresie jesiennym – 122, najniższą w letnim – 84. W okresie zimowym i wiosennym zanotowano wartości pośrednie. Wyniki takie dotyczyły wszystkich grup analizowanych polipeptydów, niezależnie od ich masy cząsteczkowej. Tym niemniej istotny wzrost liczby polipeptydów w okresie jesiennym stwierdzono w grupach w przedziale mas cząsteczkowych 20-40 kDa i 40-90 kDa, odpowiednio: 55 i 56. Natomiast dla okresu letniego wartości te

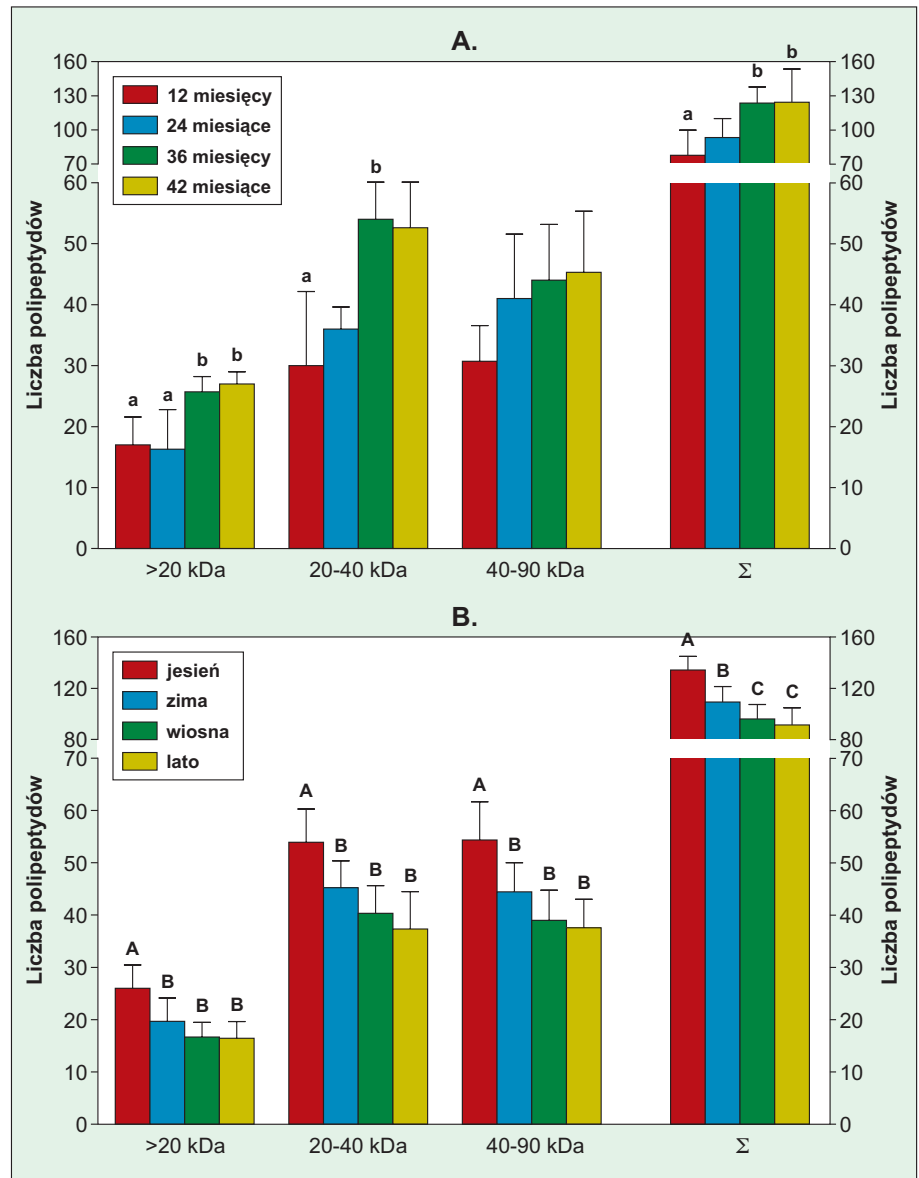
wynosiły, odpowiednio, 36 i 37 polipeptydów. Obserwowane zjawisko wskazywać może na sezonową zmienność w zakresie aktywności translacyjnej dodatkowych gruczołów płciowych knura. Należy nadmienić, iż ejakulatory kolekcjonowane w miesiącach letnich charakteryzują się obniżoną jakością, natomiast jesienią wykazują najwyższą wartość biologiczną (16).

W posumowaniu należy stwierdzić, że zmodyfikowana metoda elektroforezy dwukierunkowej (2-D) może być z powodzeniem stosowana w analizie białek plazmy nasienia knura. Z kolei uwarunkowany wiekiem knurów i porą roku polimorfizm map polipeptydowych plazmy nasienia knura może być wykorzystany jako marker molekularnych zmian aktywności sekrecyjnej dodatkowych gruczołów płciowych. Stanowiąc może zarazem istotny wyznacznik kwalifikacji samców do rozrodu.

Piśmiennictwo

- Brandon C. I., Heusner G. L., Caudle A. B., Fayrer-Hosken R. A.: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 1999, 52, 863-873.
- Desnoyers L., Therien I., Manjunath P.: Characterization of the major proteins of bovine fluid to two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol. Reprod. Dev.* 1994, 37, 425-435.
- Cardozo J. A., Fernandez-Juan M., Forcada F., Abecia A., Muñi-Blanco T., Cebrian-Perez J. A.: Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 2006, 66, 841-850.
- Flowers W. L.: Relationships between seminal plasma proteins and boar fertility. *Ann. Swine Rep.* 2001, 1-4.
- Fraser L., Dziekońska A., Strzeżek J., Strzeżek R.: Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: Its effect on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology* 2007 (w druku).
- Heukeshoven J., Dernick R.: Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985, 6, 103-112.
- Killian G. J., Chapman D. A., Rogowski L. A.: Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod.* 1993, 49, 1202-1207.
- Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- Mc Dowell K. J., Little T. V., Timoney P. J., Adams M. H.: Characterization of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and geldings supplemented with testosterone. *Res. Vet. Sci.* 61, 33-37.
- O'Farrel P. Z., Goodman H. M., O'Farrel P. H.: High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 1977, 12, 113-142.
- Panisko E. A., Conrads T. P., Goshe M. B., Veenstra T. D.: The postgenomic age: Characterization of proteomes. *Exp. Hemat.* 2002, 30, 97-107.
- Shivaji S., Scheit K. H., Bhargava P. M.: *Proteins of Seminal Plasma*. A Wiley-Interscience Publications, New York 1990.
- Strzeżek J.: Nasienie i użytkowanie rozplodowe knura, [w:] Wierzbowski S. (red.): *Andrologia*. Platan-Kryspinów 1996, 201-217.
- Strzeżek J.: Plazma nasienia a niektóre funkcje biologiczne plemników. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, 59-68.
- Strzeżek J.: Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Biol. Reprod.* 2002, 2, 243-266.
- Strzeżek J., Demianowicz W., Lubarda Z., Torska J.: The effect of season on acrosin activity and plasmolemma susceptibility of boar spermatozoa. *Proc. 12th Int. Congress Anim. Reprod.* The Hague, Netherlands 1992, 4, 532-534.
- Strzeżek J., Wysocki P., Kordan W., Kuklińska M., Mogielnicka M., Soliwoda D., Fraser L.: Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod. Biol.* 2005, 5, 279-290.
- Weichselbaum T. E.: An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am. J. Clin. Path. Techn. Sect.* 1946, 10, 40.

Adres autora: dr hab. Władysław Kordan, prof. nadzw. UWM, ul. Ocza-powskiego 5, 10-718 Olsztyn; e-mail: wladyslaw.kordan@uwm.edu.pl



Ryc. 2. Wpływ wieku knurów (A), (n = 12) oraz pory roku (B), (n = 12) na liczbę polipeptydów plazmy nasienia knura po elektroforezie 2D

Objaśnienia: a, b, A, B, C – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie: małymi przy $p \leq 0,05$; dużymi przy $p \leq 0,01$