



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101732714 A

(43) 申请公布日 2010.06.16

(21) 申请号 200810203094.7

(22) 申请日 2008.11.21

(71) 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市岳阳路 320 号

(72) 发明人 徐国良 周静 杜雅蕊 黄燕女

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 范征

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 15/00(2006.01)

A61P 15/08(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 29 页 附图 6 页

(54) 发明名称

一种精子领结合蛋白及其在精子形成过程中的作用

(57) 摘要

本发明涉及一种精子领结合蛋白及其在精子形成过程中的作用。本发明公开了一种 RIM 结合蛋白 3 或其促进剂或抑制剂的用途,用于制备调节雄性哺乳动物精子发育的组合物。本发明还公开了一种调节雄性哺乳动物精子发育的复合物,所述的复合物含有 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白。本发明还公开了筛选调节雄性哺乳动物精子发育的潜在物质的方法。

1. 一种 RIM 结合蛋白 3 或其促进剂或抑制剂的用途,其特征在于,用于制备调节雄性哺乳动物精子发育的组合物。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在于,所述的组合物含有 RIM 结合蛋白 3 的抑制剂,用于抑制雄性哺乳动物精子的成熟或释放,降低精子的致育能力或抑制 RIM 结合蛋白 3 与 Hook1 蛋白的相互作用 ;或

所述的组合物含有 RIM 结合蛋白 3 的促进剂,用于促进雄性哺乳动物精子的成熟或释放,提高精子的致育能力,促进 RIM 结合蛋白 3 与 Hook1 蛋白的相互作用。

3. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在于,所述的 RIM 结合蛋白 3 的抑制剂选自 :特异性抗 RIM 结合蛋白 3 的抗体 ;或特异性抑制 RIM 结合蛋白编码基因的转录或翻译的干扰分子或反义核苷酸 ;或

所述 RIM 结合蛋白 3 的促进剂是一表达载体,所述表达载体包含一基因盒,所述的基因盒含有编码 RIM 结合蛋白 3 的基因及与之操作性相连的表达调控序列。

4. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在于,所述的 RIM 结合蛋白 3 是 :

(a) 如 SEQID NO :2 所示氨基酸序列的蛋白 ;

(b) 将 (a) 所限定的蛋白的氨基酸序列经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有 (a) 所限定的蛋白功能的由 (a) 衍生的蛋白 ;或

(c) (a) 限定的蛋白的保守性变异蛋白质或其活性片段。

5. 一种筛选调节雄性哺乳动物精子发育的潜在物质的方法,其特征在于,所述方法包括 :

(1) 将候选物质加入到表达 RIM 结合蛋白 3 的体系中 ;和

(2) 检测候选物质对 RIM 结合蛋白 3 的影响 ;

若所述候选物质降低 RIM 结合蛋白 3 的表达或活性,则表明该候选物质是抑制雄性哺乳动物精子发育的潜在物质 ;若所述候选物质提高 RIM 结合蛋白 3 的表达或活性,则表明该候选物质是促进雄性哺乳动物精子发育的潜在物质。

6. 如权利要求 5 所述的方法,其特征在于,步骤 (1) 包括 :在测试组中,向表达 RIM 结合蛋白 3 的体系中添加待筛选的候选物 ;和

步骤 (2) 包括 :检测测试组的体系中 RIM 结合蛋白 3 的表达或活性,并与对照组比较,其中所述的对照组是不添加所述候选物质的表达 RIM 结合蛋白 3 的体系 ;

若测试组中 RIM 结合蛋白 3 的表达或活性在统计学上低于对照组,就表明该候选物是抑制雄性哺乳动物精子发育的潜在物质 ;若测试组中 RIM 结合蛋白 3 的表达或活性在统计学上高于对照组,就表明该候选物是促进雄性哺乳动物精子发育的潜在物质。

7. 一种调节雄性哺乳动物精子发育的复合物,其特征在于,所述的复合物含有 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白,两种蛋白相互结合。

8. 权利要求 7 所述的复合物的用途,其特征在于,用于筛选调节雄性哺乳动物精子发育的物质。

9. 一种利用权利要求 8 所述的复合物筛选调节雄性哺乳动物精子发育的潜在物质的方法,其特征在于,所述方法包括 :

(a) 将候选物质加入到 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白相互作用的反应体系中 ;和

(b) 检测候选物质对 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白相互作用的反应体系的影响 ;

若所述候选物质抑制 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用,则表明该候选物质是抑制雄性哺乳动物精子发育的潜在物质;若所述候选物质促进 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用,则表明该候选物质是促进雄性哺乳动物精子发育的潜在物质。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,

步骤 (a) 包括:在测试组中,向 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白相互作用的反应体系中添加候选物质;和

步骤 (b) 包括:检测测试组中 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用情况并与对照组中 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用情况进行比较,其中所述的对照组是不添加所述候选物质的 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白相互作用的反应体系;

若测试组中 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用在统计学上弱于对照组,就表明该候选物质是抑制雄性哺乳动物精子发育的潜在物质;若测试组中 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用在统计学上强于对照组,就表明该候选物质是促进雄性哺乳动物精子发育的潜在物质。

一种精子结合蛋白及其在精子形成过程中的作用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域 ; 更具体地涉及一种精子结合蛋白及其作用机制和用途。

背景技术

[0002] 雄性哺乳动物正常的生育能力依赖于成功地产生包含有完整的父本基因组并且能够与卵子受精的具有运动能力的精子。圆形的精子细胞 (round spermatid) 必须经过一系列巨大的形态学变化才能成为成熟的, 能游动的精子。这一过程叫做精子形成 (spermiogenesis)。目前, 关于精子形态发生的机制还知之甚少。精子发生是一个非常复杂并受到严密调控的过程, 可以分为以下三个时相 : 有丝分裂期 (精原细胞的自我更新与增殖)、减数分裂期 (染色体数目由二倍体减少到单倍体) 和精子形成期 (单倍体精子变形至成熟精子)。其中在精子形成过程中, 单倍体圆形精子必须经过形态学方面巨大的变化才能形成成熟的精子, 这些形态学变化包括细胞核的延伸和浓缩、顶体和鞭毛的产生以及多余细胞质的排除。一个独特的微管结构——精子领短暂地出现在精子形成过程中 (Kierszenbaum, A. L. 等 (2007) ; Molecular biology of sperm head shaping ; Soc Reprod Fertil Suppl 65, 33-43), 该结构包裹着细胞核, 对细胞核正常形态的形成以及多余细胞质的排除都有直接作用。

[0003] 精子细胞的正常发育依赖于许多功能性基因在严密的时空调控下的正常表达。通过基因敲除手段, 已经发现至少有 20 种雄性生殖细胞特异性基因被认为在精子形成过程种发挥重要作用。这些基因涉及到调控顶体的形成、鞭毛的形成以及染色体的包装等等。

[0004] 尽管已经有这么多基因被鉴定出在精子形成的各个方面发挥作用, 但是关于精子细胞正常形态的形成以及细胞质的重新分布的分子机制仍然不是很清楚。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种 RIM (Rab 相互作用分子) 结合蛋白 3 或其促进剂或抑制剂的用途。本发明的另一目的在于提供一种调节雄性哺乳动物精子发育的复合物。本发明的另一目的在于提供筛选调节雄性哺乳动物精子发育的潜在物质的方法。

[0006] 在本发明的第一方面, 提供一种 RIM 结合蛋白 3 (RIM-BP3) 或其促进剂或抑制剂的用途, 用于制备调节雄性哺乳动物 (特别是兽亚纲哺乳动物, 包括人) 精子发育的组合物。

[0007] 在另一优选例中, 所述的组合物含有 RIM 结合蛋白 3 的抑制剂, 用于抑制雄性哺乳动物精子的成熟或释放, 降低精子的致育能力或抑制 RIM 结合蛋白 3 与 Hook1 蛋白的相互作用 ; 或所述的组合物含有 RIM 结合蛋白 3 的促进剂, 用于促进雄性哺乳动物精子的成熟或释放, 提高精子的致育能力, 促进 RIM 结合蛋白 3 与 Hook1 蛋白的相互作用。

[0008] 在另一优选例中, 所述的 RIM 结合蛋白 3 的抑制剂选自 : 特异性抗 RIM 结合蛋白 3 的抗体 (包括单克隆抗体和多克隆抗体) ; 或特异性抑制 RIM 结合蛋白编码基因的转录或翻译的干扰分子或反义核苷酸 ; 或所述 RIM 结合蛋白 3 的促进剂是一表达载体, 所述表达载

体包含一基因盒,所述的基因盒含有编码 RIM 结合蛋白 3 的基因及与之操作性相连的表达调控序列。所述表达载体在转入细胞后表达(或过表达)RIM 结合蛋白 3。

[0009] 在另一优选例中,所述的 RIM 结合蛋白 3 是:(a) 如 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的蛋白;(b) 将(a)所限定的蛋白的氨基酸序列经过一个或多个(如 1-50 个,较佳地 1-30 个,更佳的 1-5 个)氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有(a)所限定的蛋白功能的由(a)衍生的蛋白;或(c) (a)限定的蛋白的保守性变异蛋白质或其活性片段。

[0010] 在本发明的第二方面,提供一种筛选调节雄性哺乳动物精子发育的潜在物质的方法,所述方法包括:(1) 将候选物质加入到表达 RIM 结合蛋白 3 的体系中;和(2) 检测候选物质对 RIM 结合蛋白 3 的影响;若所述候选物质降低 RIM 结合蛋白 3 的表达或活性,则表明该候选物质是抑制雄性哺乳动物精子发育的潜在物质;若所述候选物质提高 RIM 结合蛋白 3 的表达或活性,则表明该候选物质是促进雄性哺乳动物精子发育的潜在物质。

[0011] 在另一优选例中,步骤(1) 包括:在测试组中,向表达 RIM 结合蛋白 3 的体系中添加待筛选的候选物;和步骤(2) 包括:检测测试组的体系中 RIM 结合蛋白 3 的表达或活性,并与对照组比较,其中所述的对照组是不添加所述候选物质的表达 RIM 结合蛋白 3 的体系;若测试组中 RIM 结合蛋白 3 的表达或活性在统计学上低于(优选显著低于,如低 20%以上,较佳的低 50%以上;更佳的低 80%以上)对照组,就表明该候选物是抑制雄性哺乳动物精子发育的潜在物质;若测试组中 RIM 结合蛋白 3 的表达或活性在统计学上高于(优选显著高于,如高 20%以上,较佳的高 50%以上;更佳的高 80%以上)对照组,就表明该候选物是促进雄性哺乳动物精子发育的潜在物质。

[0012] 在另一优选例中,所述的体系选自:细胞(如原核细胞(如大肠杆菌细胞),真核细胞(如 CHO 细胞,精子细胞)或酵母细胞)或细胞培养物体系、亚细胞体系、溶液体系、组织体系、器官体系或动物体系。

[0013] 在本发明的第三方面,提供一种调节雄性哺乳动物精子发育的复合物,所述的复合物含有 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白,两种蛋白相互结合。所述复合物是分离的。

[0014] 在本发明的第四方面,提供所述的复合物的用途,用于筛选调节雄性哺乳动物精子发育的物质。

[0015] 在本发明的第五方面,提供一种利用所述的复合物筛选调节雄性哺乳动物精子发育的潜在物质的方法,所述方法包括:(a) 将候选物质加入到 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白相互作用的反应体系中;和(b) 检测候选物质对 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白相互作用的反应体系的影响;若所述候选物质抑制 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用(如相互结合),则表明该候选物质是抑制雄性哺乳动物精子发育的潜在物质;若所述候选物质促进 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用,则表明该候选物质是促进雄性哺乳动物精子发育的潜在物质。

[0016] 在另一优选例中,步骤(a) 包括:在测试组中,向 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白相互作用的反应体系中添加候选物质;和步骤(b) 包括:检测测试组中 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用情况并与对照组中 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用情况进行比较,其中所述的对照组是不添加所述候选物质的 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白相互作用的反应体系;若测试组中 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用在统计学上弱于(优选显著弱于,如弱 20%以上,较佳的弱 50%以上;更佳弱 80%以上)对照组,就表明该候选物

质是抑制雄性哺乳动物精子发育的潜在物质;若测试组中 RIM 结合蛋白 3 和 Hook1 蛋白的相互作用在统计学上强于(优选显著强于,如强 20%以上,较佳的强 50%以上;更佳的强 80%以上)对照组,就表明该候选物质是促进雄性哺乳动物精子发育的潜在物质。

[0017] 在另一优选例中,所述的体系选自:细胞(如原核细胞(如大肠杆菌细胞),真核细胞(如 CHO 细胞,精子细胞)或酵母细胞)或细胞培养物体系、亚细胞体系、溶液体系、组织体系、器官体系或动物体系。

[0018] 在另一优选例中,所述方法还包括:对获得的潜在物质进行进一步的细胞实验和/或动物试验,以从候选物质中进一步选择和确定对于调节雄性哺乳动物精子发育的组合物。

[0019] 在另一优选例中,所述的候选物质包括但不限于:肽、聚合肽、拟肽、非肽化合物、碳水化合物、脂、抗体或抗体片段、配体、有机小分子、无机小分子和核酸序列。

附图说明

[0020] 图 1. RIM-BP3 在小鼠睾丸中的特异表达。

[0021] (A) RIM-BP3 的结构示意图,显示保守的结构域和用于产生抗体的抗原区域。

[0022] (B) Northern 杂交检测不同组织中 RIM-BP3 的转录本。mRNA 杂交膜(Clontech)上每条泳道包含 2 μ g 的 mRNA。杂交探针为 RIM-BP3C 末端编码区(3547-4260bp)。

[0023] (C) Western 杂交分析 RIM-BP3 蛋白在不同组织中的表达情况。以 α -微管蛋白作为上样量参照。

[0024] (D) Western 杂交检测 RIM-BP3 蛋白在出生后小鼠不同时期的睾丸中的表达情况。上图显示小鼠精子发生过程中的各个时相。PL:前细线期精母细胞;L:细线期精母细胞;Z:偶线期精母细胞;P:粗线期精母细胞;D:双线期精母细胞;MI:减数分裂 I 期;MII:减数分裂 II 期。中图显示 Western 杂交检测 RIM-BP3 蛋白在出生后小鼠不同发育时期睾丸中的表达情况。下图为考马斯亮蓝染色显示所用蛋白样品量。

[0025] (E) 重力沉降法分离纯化雄性小鼠各级生殖细胞并用 Western 杂交的方法检测表达情况(上图),下图为考马斯亮蓝染色显示所用蛋白样品量。A:A 型精原细胞;B:B 型精原细胞;RS:圆形精子;E1 和 E2:两份延长型精子;SP:精子;RB:残体;ST:滋养细胞;其余的缩写同 D。

[0026] 图 2. RIM-BP3 蛋白在延长型精子中的分布情况。

[0027] (A) 用针对 RIM-BP3SbcC 多克隆抗体(绿色)和针对 α -微管蛋白单克隆抗体(红色)对性成熟的野生型小鼠睾丸中的生殖细胞进行免疫荧光染色,DAPI 染色用来观察细胞核的形态。比例尺:10 μ m。

[0028] (B) RIM-BP3 敲除小鼠的睾丸生殖细胞作(A)中相同处理,观察,作为负对照。

[0029] 图 3. 小鼠中 RIM-BP3 基因的敲除。

[0030] (A) RIM-BP3 突变等位基因产生的策略。黑色方条代表该单外显子基因的编码区域。BamHI 酶切位点(B)以及用于 Southern 分析的探针和用于 PCR 检测的引物标记于图中。

[0031] (B) PCR 法和 Southern 分析法检测敲除小鼠的基因型。来源于野生型和突变型等位基因的 DNA 片段的位置标记于图的右侧。+/+,野生型;+/-,杂合型;-/-,纯合型。

[0032] (C) Western 分析证实敲除小鼠的基因型。分别用针对 RIM-BP3N 端和 C 端区域的抗体检测野生型、杂合型和纯合型小鼠睾丸中 RIM-BP3 蛋白的表达情况。以 β -肌动蛋白作为上样量参照。

[0033] 图 4. RIM-BP3 敲除小鼠附睾中成熟精子形态的异常。

[0034] (A) 扫描电镜分析。a, 突变小鼠中几乎所有的精子都呈现出异常的头部形态、脱离头部的鞭毛以及鞭毛不同程度的弯折, 比例尺: $20\ \mu\text{m}$; b 和 c, 异常的头部形态, 非典型的镰刀状; d, 野生型精子的镰刀状头部。比例尺 (b-d): $2\ \mu\text{m}$ 。

[0035] (B) 透射电镜分析。在突变小鼠的精子细胞中经常可以看到畸形的细胞核 (星号), 并且大多数还出现顶体脱离细胞核的现象 (黑色箭头)。比例尺, $1\ \mu\text{m}$ 。

[0036] 图 5. 透射电镜分析显示 RIM-BP3 敲除小鼠的精子形成异常。

[0037] (A, B) 第 5 期的精子。在突变的圆形精子中可以看到未发生融合的前顶体囊泡排列在弯曲的顶体板上方 (B)。顶体板延伸的末端用白色箭头标记。

[0038] (C, D) 第 9 期的精子。突变小鼠延长型精子中偶尔可以看到顶体断裂的现象 (D), 断裂点用箭尖标记 (D, 插图)。

[0039] (E-G) 第 11/12 期的精子。在这个时期, 异常的表型各种各样, 包括顶体的不连续 (F, 插图中的箭尖)、顶体板的变形 (F, G)、细胞核形态的不规则到精子领结构的锥形对称分布 (F)。黑色箭头表示精子领的核周环。

[0040] (H, I) 第 12/13 期的精子。被膜包裹的微管束异常地分布在核膜内 (H, 插图)。左边的核周环从边缘环的下方移位至其上方 (与右边的核周环相比, I)。

[0041] (J-L) 第 15/16 期的精子。突变的延长型精子呈现细胞核畸形、顶体脱离细胞核、膨大的核周区域中不明物质的存在等异常现象。并且这个时期顶体断裂仍然存在。箭尖, 顶体裂口。比例尺, $1\ \mu\text{m}$ 。

[0042] 图 6. RIM-BP3 蛋白与 Hook1 相互作用。

[0043] (A) 纯化并鉴定与 RIM-BP3 相互作用的蛋白质。分别用针对 RIM-BP3(N) 或 RIM-BP3(C) 抗体对野生型和 RIM-BP3 敲除小鼠的蛋白抽提物进行免疫沉淀实验, 将免疫沉淀的蛋白质进行 SDS-PAGE 和银染分析。质谱分析显示与 RIM-BP3 共沉淀的蛋白质为 Hook1, 检测到的 Hook1 肽段列在右边的方框中。

[0044] (B) 内源 RIM-BP3 和 Hook1 蛋白的免疫共沉淀实验。用针对 RIM-BP3(C) 抗体对野生型和敲除小鼠睾丸全裂解液进行免疫沉淀 (IP), 免疫沉淀物经 SDS-PAGE 分离, 用 Hook1 抗体进行 Western 杂交检测。左边两个泳道显示 0.6% 用于免疫沉淀实验的蛋白抽提物。

[0045] (C) 酵母双杂交的方法检测 RIM-BP3 与 Hook1 相互作用的区域。将 RIM-BP3 的全长和四个不同片段与 GAL4 激活结构域融合, 与 GAL4BD-Hook1 共转酵母菌株。通过观察酵母能否在 SD-L-T-A-H 营养缺陷平板上生长来判断两个蛋白是否具有相互作用能力。

[0046] (D) 通过酵母双杂交的方法检测 Hook1 与 RIM-BP3 相互作用的区域。将 Hook1 的全长和三个不同片段与 GAL4DNA 结合结构域融合, 与 GAL4AD-RIM-BP3 共转酵母菌株。若酵母克隆可以在 SD-L-T-A-H 四缺平板上生长说明二者具有相互作用。MT, 微管结合结构域; CC, 卷曲螺旋结构域; O-binding, 细胞器结合结构域。

[0047] 图 7. Hook1^{azh} 突变体不能与 RIM-BP3 相互作用。

[0048] (A) Hook1 与 Hook1^{azh} 突变体的结构示意图。

[0049] (B) Flag-RIM-BP3, HA-Hook1 和 HA-Hook1^{azh} 表达载体以不同组合共转 HEK-293T 细胞。用针对 RIM-BP3 (C) 或针对 HA 的抗体免疫沉淀全细胞裂解液, 免疫沉淀物分别用针对 HA 或针对 RIM-BP3 (C) 抗体 Western 杂交分析。

[0050] 图 8. RIM-BP3 抗体的鉴定。

[0051] 因为 RIM-BP3 的 SH3 和 FN III 结构域与 RIM-BP1 和 RIM-BP2 的同源性很高, 所以选择保守程度不高的 N 端区域 (RIM-BP3N) 和 FN III 与 SH3 间的连接区域 (RIM-BP3C) 以及 SbcC 结构域作为产生多抗的抗原区域 (图 1A)。三个抗体均通过抗原亲和纯化获得, 其特异性则通过 Western blotting 检测外源转染了 pFlag-CMV-2-RIM-BP3 的 293T 细胞裂解液来判断。针对 Flag 抗体的 Western 检测证实了带有标签的 RIM-BP3 的表达。与 Flag 抗体一样, RIM-BP3 的三个抗体均可以特异地识别 190kDa 大小的条带 (全长的 RIM-BP3 蛋白分子量大约 180kDa)。α-微管蛋白检测作为上样量多少的参照。

[0052] 图 9. 生精小管横切片的 HE 染色。

[0053] 野生型和敲除小鼠的睾丸横切片用苏木精和伊红进行染色。生精小管的时相标记在左侧。比例尺: 40 μm。与野生型相比, 突变小鼠的生精小管中, 精原细胞、精母细胞和体细胞并没有明显的变化, 而 12 期延长型精子的细胞核却明显不正常。

[0054] 图 10. Hook1 在 RIM-BP3 缺失精子的异常精子领结构上的定位情况。

[0055] (A) 用针对 α-微管蛋白单克隆抗体 (红色) 和针对 Hook1 多克隆抗体 (绿色) 对性成熟的野生型和敲除小鼠睾丸中的生殖细胞进行免疫荧光分析, DAPI 染色观察细胞核的形态。

[0056] (B) 野生型和敲除小鼠中精子领结构发育的示意图。虚线表示野生型精子细胞核或敲除小鼠精子细胞尾部的纵轴。第 9 期突变型精子的精子领结构与野生型的没有差别; 到第 11/12 期, 野生型精子的精子领结构呈不对称的梯形, 而突变型精子的则呈对称的锥形。尽管突变型精子中精子领的发育异常, Hook1 仍然能定位于精子领上。

具体实施方式

[0057] 本发明人经过广泛而深入的研究, 首次论证了 RIM 结合蛋白 3 (RIM-BP3) 在精子细胞的发育过程中发挥着非常特化的功能, 下调或剔除 RIM-BP3 会导致哺乳动物精子发育异常, 可见 RIM-BP3 对于保持正常的精子发育是必要的。因此, RIM-BP3 本身或其调节剂能够用于调节雄性哺乳动物精子发育; 并且, 可基于 RIM-BP3 对精子发育的调节作用, 筛选促进精子发育 (如用于防治不育) 或抑制精子发育 (如用于避孕) 的物质。

[0058] 如本文所用, “Rab 相互作用分子结合蛋白 3”, “RIM 结合蛋白 3”, “RIM-BP3 蛋白”, “精子领偶联蛋白”, “精子领偶联蛋白 RIM-BP3”, “精子领结合蛋白”可互换使用, 均是指具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的蛋白, 或其生物活性片段, 或其衍生的蛋白; 或是指氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列具有高于 70%, 更特别地高于 80%, 更特别地高于 90% (如高于 95%) 同源性的蛋白。

[0059] 如本文所用, 所述的“哺乳动物”特别是指兽亚纲哺乳动物, 包括但不限于: 人、小鼠、大鼠、牛、猴等。

[0060] 如本文所用, “分离的”是指物质从其原始环境中分离出来 (如果是天然物质, 原始环境即是天然环境)。如活体细胞内天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的,

但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开,则为分离纯化的。

[0061] 如本文所用和所述的“含有”、“具有”或“包括”包括了“包含”、“主要由……构成”、“基本上由……构成”、和“由……构成”;“主要由……构成”、“基本上由……构成”和“由……构成”属于“含有”、“具有”或“包括”的下位概念。

[0062] RIM-BP3 蛋白及其用途

[0063] 本发明人鉴定了一个新的精子颈偶联蛋白 RIM-BP3,该蛋白属于 RIM 结合蛋白(RIM-binding protein;RIM-BPs) 家族。RIM-BPs 家族成员中,RIM-BP1 和 RIM-BP2 蛋白被认为是突触前激活区蛋白 RIM1 和 RIM2 以及压差门钙离子通道的结合伴侣。RIM-BPs 家族三个蛋白都是多结构域的蛋白,包含 3 个 SH3 结构域、2-3 个邻近的 FN III 结构域以及 N 端和成簇结构域间蛋白特异性的区域。这些标志性的结构域以及与钙离子通道和 RIM 蛋白的相互作用提示 RIM-BPs 家族蛋白为其他调控蛋白提供了一个脚手架。在无脊椎动物和脊椎动物的进化过程中 RIM-BPs 家族蛋白的 SH3 结构域和 FNIII 结构域都非常保守。无脊椎动物中只有一个 RIM-BP 蛋白,脊椎动物中则至少存在 2 个以上的 RIM-BP 蛋白(RIM-BP1 和 RIM-BP2),其中 RIM-BP3 蛋白只存在于兽亚纲哺乳动物中。不同于 RIM-BP1 和 RIM-BP2 在脑组织中的高表达,RIM-BP3 在睾丸中高表达。到目前为止,除了一些生物信息学方面的研究,对 RIM-BP3 更深入的生物学功能还知之甚少。本发明人意外地发现,RIM-BP3 在延长型精子中与精子颈结构偶联,对于正常的精子形态形成以及雄性小鼠的生育能力都至关重要。通过亲和纯化等更深入的研究,发现 RIM-BP3 与 Hook1 可以形成复合物行使功能。

[0064] RIM-BP3 蛋白定位在精子颈(manchette)上。精子颈是一个在精子形成过程中短暂出现的结构,主要由微管构成,在精子的形态发生中发挥着重要的作用。本发明人在小鼠中进行了 RIM-BP3 的基因敲除,结果表明 RIM-BP3 蛋白的下调或缺失会引起精子头部发育的异常如核畸形(deformed nucleus)和顶体脱离(detached acrosome),最终导致雄性不育。

[0065] RIM-BP3 蛋白在兽亚纲哺乳动物中是高度保守的,例如人类 RIM-BP3 与小鼠的 RIM-BP3 具有 70% 以上的同源性;且它们存在相同且高度保守的结构域(包括 SH3 和 FNIII 等),结构域的排布也相同;且它们在蛋白高级结构上非常接近。因此,RIM-BP3 在兽亚纲哺乳动物的精子形成过程中有着相同的功能。人类 RIM-BP3 基因有 3 个拷贝,都位于染色体 22q11.21 的位置。人类 RIM-BP3 的氨基酸序列可以与 GenBank 登录号 NP_056487, XP_036936 或 XP_036942 所示的序列基本上相同。

[0066] 在本发明中,所用的 RIM-BP3 蛋白可以是天然存在的,比如其可被分离或纯化自哺乳动物。此外,所述的 RIM-BP3 蛋白也可以是人工制备的,比如可以根据常规的基因工程重组技术来生产重组 RIM-BP3 蛋白。优选的,本发明可采用重组的 RIM-BP3 蛋白。

[0067] 任何适合的 RIM-BP3 蛋白均可用于本发明。所述 RIM-BP3 蛋白包括全长的 RIM-BP3 蛋白或其生物活性片段。优选的,所述 RIM-BP3 蛋白的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO:2 所示的序列基本上相同,其编码序列例如可以与 SEQ ID NO:1 所示的序列基本上相同。

[0068] 经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的 RIM-BP3 蛋白的氨基酸序列也包括在本发明中。RIM-BP3 蛋白或其生物活性片段包括一部分保守氨基酸的替代序列,所述经氨基酸替换的序列并不影响其活性或保留了其部分的活性。适当替换氨基酸是本领域公知的技术,所述技术可以很容易地被实施并且确保不改变所得分子的生物活

性。这些技术使本领域人员认识到,一般来说,在一种多肽的非必要区域改变单个氨基酸基本上不会改变生物活性。见 Watson 等 Molecular Biology of The Gene, 第四版, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co. P224。

[0069] 任何一种 RIM-BP3 蛋白的生物活性片段都可以应用到本发明中。在这里, RIM-BP3 蛋白的生物活性片段的含义是指作为一种多肽, 其仍然能保持全长的 RIM-BP3 蛋白的全部或部分功能。通常情况下, 所述的生物活性片段至少保持 50% 的全长 RIM-BP3 蛋白的活性。在更优选的条件下, 所述活性片段能够保持全长 RIM-BP3 蛋白的 60%、70%、80%、90%、95%、99%、或 100% 的活性。

[0070] 作为本发明的优选方式, 所述的 RIM-BP3 蛋白的生物活性片段是包含有 SH3 和 FNIII 结构域的 RIM-BP3 蛋白片段; 更特别的例如是具有 SEQ ID NO: 2 中第 830-1606 位氨基酸序列的蛋白; 经验证, RIM-BP3 蛋白的上述生物活性片段保留了全长 RIM-BP3 蛋白与 Hook1 蛋白相互作用的生物活性。

[0071] 本发明也可采用经修饰或改良的 RIM-BP3 蛋白, 比如, 可采用为了促进其半衰期、有效性、代谢和 / 或蛋白的效力而加以修饰或改良的 RIM-BP3 蛋白。所述经过修饰或改良的 RIM-BP3 蛋白可以是与天然存在的 RIM-BP3 蛋白具有较小的共同点, 但也能调节哺乳动物精子发育, 且不会带来其它不良影响或毒性。也就是说, 任何不影响 RIM-BP3 蛋白的生物活性的变化形式都可用于本发明中。

[0072] 一旦分离获得了所述蛋白的序列, 就可以用重组法来大批量地获得该蛋白。这通常是将其编码基因克隆入载体, 再转入细胞, 然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到。此外, 也可采用人工合成 (如通过多肽合成仪合成) 的方法来合成有关序列, 人工合成的方法可简便且快速地得到所需要的蛋白。

[0073] 本发明还包括了编码所述的 RIM-BP3 蛋白或其生物活性片段或衍生物的分离的核酸, 也可以是其互补链。编码 RIM-BP3 蛋白或其生物活性片段或衍生物的 DNA 序列, 可以全序列人工合成, 也可用 PCR 扩增的方法获得。在获得了编码所述的 RIM-BP3 蛋白或其生物活性片段或衍生物的 DNA 序列之后, 将其连入合适的表达载体, 再转入合适的宿主细胞。最后通过培养转化后的宿主细胞, 通过分离纯化得到所要的蛋白。

[0074] 本发明还包括了包含编码所述 RIM-BP3 蛋白或其生物活性片段或衍生物的核酸分子的载体。所述的载体还可包含与所述核酸分子的序列操作性相连的表达调控序列, 以便于蛋白的表达。所述的“操作性相连”或“可操作地连于”指这样一种状况, 即线性 DNA 序列的某些部分能够调节或控制同一线性 DNA 序列其它部分的活性。例如, 如果启动子控制序列的转录, 那么它就是可操作地连于编码序列。

[0075] 此外, 含有编码所述 RIM-BP3 蛋白或其生物活性片段或衍生物核酸序列的重组细胞也包括在本发明中。“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞包括大肠杆菌、枯草杆菌等; 例如可为大肠杆菌细胞 (E. coli), 如大肠杆菌 HMS174 (DE3)、或 BL21 (DE3)。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。

[0076] 基于本发明人的新发现, 本发明提供了 RIM-BP3 蛋白的用途, 用于制备调节雄性哺乳动物精子发育的组合物; 或用于筛选调节雄性哺乳动物精子发育的物质。例如, 所述的 RIM 结合蛋白 3 用于促进雄性哺乳动物精子的成熟或释放, 提高精子的致育能力, 促进 RIM 结合蛋白 3 与 Hook1 蛋白的相互作用, 预防精子领结构或分布异常等。例如将所述的 RIM

结合蛋白 3 用于防治哺乳动物精子发育异常,精子活性低下或不育。

[0077] RIM-BP3 的促进剂或抑制剂及其用途

[0078] 如本文所用,所述的 RIM-BP3 的促进剂包括了上调剂、激活剂、激动剂等。任何可提高 RIM-BP3 蛋白的活性、维持 RIM-BP3 蛋白的稳定性、促进 RIM-BP3 蛋白的表达、延长 RIM-BP3 蛋白有效作用时间、或促进 RIM-BP3 的转录和翻译的物质均可用于本发明,作为可用于促进雄性哺乳动物精子发育的有效物质。

[0079] 如本文所用,所述的 RIM-BP3 的抑制剂包括了下调剂、阻滞剂、阻断剂、拮抗剂等。任何可降低 RIM-BP3 蛋白的活性、降低 RIM-BP3 蛋白的稳定性、抑制 RIM-BP3 蛋白的表达、减少 RIM-BP3 蛋白有效作用时间、或抑制 RIM-BP3 的转录和翻译的物质均可用于本发明,作为可用于抑制雄性哺乳动物精子发育的有效物质。

[0080] 作为本发明的优选方式,所述的 RIM-BP3 的促进剂例如是一表达载体,所述表达载体包含一基因盒,所述的基因盒含有编码 RIM 结合蛋白 3 的基因及与之操作性相连的表达调控序列。所述表达载体在转入细胞后表达(或过表达)RIM 结合蛋白 3。

[0081] 作为本发明的优选方式,所述的 RIM-BP3 的抑制剂是(但不限于):特异性抗 RIM 结合蛋白 3 的抗体,所述的抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体,只要其对于 RIM 结合蛋白 3 具有特异性结合能力,且能够通过与 RIM 结合蛋白 3 的结合而抑制 RIM 结合蛋白 3 的活性;或特异性抑制 RIM 结合蛋白编码基因的转录或翻译的干扰分子或反义核苷酸。针对已知蛋白或已知基因的干扰分子或反义核苷酸的制备方法是本领域人员熟知的。

[0082] 本发明还提供了 RIM-BP3 蛋白的促进剂的用途。所述的 RIM 结合蛋白 3 的促进剂用于促进雄性哺乳动物精子的成熟或释放,提高精子的致育能力,促进 RIM 结合蛋白 3 与 Hook1 蛋白的相互作用或预防精子领结构或分布异常等。例如将所述的 RIM 结合蛋白 3 的促进剂用于防治哺乳动物精子发育异常,精子活性低下或不育。

[0083] 本发明还提供了 RIM-BP3 蛋白的抑制剂剂的用途。所述的 RIM 结合蛋白 3 的抑制剂用于抑制雄性哺乳动物精子的成熟或释放,降低精子的致育能力或抑制 RIM 结合蛋白 3 与 Hook1 蛋白的相互作用。例如将所述的 RIM 结合蛋白 3 的抑制剂用于哺乳动物避孕。

[0084] 筛选调节雄性哺乳动物精子发育的潜在物质

[0085] 在得知了所述的 RIM-BP3 蛋白对于调节哺乳动物精子发育的用途后,可以基于该特征来筛选通过调节 RIM-BP3 的活性或表达调节精子发育的物质。

[0086] 因此,本发明提供一种筛选可用于调节雄性哺乳动物精子发育的潜在物质的方法,所述的方法包括:将候选物质与表达 RIM-BP3 的体系接触;和检测候选物质对 RIM-BP3 的影响;若所述候选物质可提高 RIM-BP3 的表达或活性,则表明该候选物质是可用于促进哺乳动物精子发育的潜在物质;若所述候选物质可降低 RIM-BP3 的表达或活性,则表明该候选物质是可用于抑制哺乳动物精子发育的潜在物质。

[0087] 在本发明的优选方式中,在进行筛选时,为了更易于观察到 RIM-BP3 的表达或活性的改变,还可设置对照组,所述的对照组可以是不添加所述候选物质的表达 RIM-BP3 的体系。

[0088] 本发明还提供一种调节精子发育相关的复合物,所述的复合物含有 RIM-BP3 蛋白和 Hook1 蛋白,两种蛋白相互结合。本发明人通过酵母双杂交以及免疫共沉淀技术证明,RIM-BP3 蛋白和 Hook1 蛋白能够相互结合,在体内形成复合体。本发明人的发现提示

RIM-BP3 通过与 Hook1 的相互作用,在精子头的发育和功能方面发挥不可或缺的作用。

[0089] 精子头结构的组装与细胞核的浓缩和延伸以及由中心体出发的轴丝的生长同时进行 (Kierszenbaum, A.L. (2002). Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol Reprod Dev* 63, 1-4)。精子头的微管结构为囊泡运输提供了轨道,有助于将一些分子转运至鞭毛,便于重新排布的核孔复合物处核质交换的发生 (Kierszenbaum, A.L. 等 (2004). The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 271-284)。然而,囊泡有可能通过某种分子的连接先与微管结合,处于等待状态,直到微管依赖的驱动蛋白来招募这些囊泡并将其运输至目的地。Hook1 已经发现是一个联系微管与囊泡的接头分子,该蛋白与精子头结构偶联,并且发现在 azh (abnormal sperm head) 突变小鼠中该蛋白功能缺失 (Mendoza-Lujambio 等 (2002). The Hook1 gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (azh) mutant mouse. *Hum Mol Genet* 11, 1647-1658)。Hook1 属于 Hook 蛋白家族,从果蝇到哺乳动物都非常保守。之前在果蝇中对 Hook1 的研究发现该蛋白在跨膜配体的内吞或转运至多泡体的过程中发挥作用。在小鼠中 Hook1 定位于精子细胞的精子头区域,Hook1 功能的缺失导致精子细胞中微管结构的异常分布,最终导致 azh (abnormal spermatozoon head) 表型,包括头部形态异常、头部脱离鞭毛以及鞭毛的弯折等。基于以上研究,可知 Hook1 对于精子头的正常分布和功能是必不可少的,在精子的头部形态发生过程中非常重要。Hook1 的截短突变是引起小鼠 azh 表型的遗传学根源,该截短突变体丧失了与 RIM-BP3 相互作用的能力。而且,RIM-BP3 和 Hook1 的突变小鼠具有一些共同的表型,尤其是精子细胞中精子头的异位分布 (ectopic positioning),这也是造成精子头部异常的原因之一。

[0090] 作为本发明的优选方式,所述的 Hook1 蛋白的氨基酸序列可以与 GenBank 登录号 AAM74055 所示的序列基本上相同,其核苷酸序列可以与 GenBank 登录号 AF487912 所示的序列基本上相同。可与 RIM-BP3 蛋白发生相互作用的 Hook1 蛋白的生物活性片段或衍生蛋白也可用于本发明。例如,所述的 Hook1 蛋白的生物活性片段是包括了 Hook1 卷曲螺旋结构域的片段或大片段。

[0091] 基于以上新发现,本发明还提供了一种筛选调节哺乳动物精子发育的潜在物质的方法,所述方法包括:向 RIM-BP3 蛋白和 Hook1 蛋白相互作用(相互结合)的反应体系中添加待筛选的候选物,并检测 RIM-BP3 蛋白和 Hook1 蛋白相互作用情况;如果 RIM-BP3 蛋白和 Hook1 蛋白的相互作用在统计学上减弱,就表明该候选物是抑制哺乳动物精子发育的潜在物质;如果 RIM-BP3 蛋白和 Hook1 蛋白的相互作用在统计学上增强,就表明该候选物是促进哺乳动物精子发育的潜在物质。在本发明的优选方式中,在进行筛选时,为了更易于观察到 RIM-BP3 蛋白和 Hook1 蛋白相互作用的变化,还可设置对照组,所述的对照组可以是不添加所述候选物的、RIM-BP3 蛋白和 Hook1 蛋白相互作用的反应体系。

[0092] 在本发明中,检测蛋白与蛋白之间相互作用以及相互作用的强弱可采用多种本领域技术人员熟知的技术,比如 GST 沉降技术、噬菌体展示技术、酵母双杂交系统或免疫共沉淀技术。其中,酵母双杂交是一种大规模快速研究蛋白-蛋白间相互作用的方法,具有简单、稳定的优点。在本发明的一个优选例中,采用了酵母双杂交系统来鉴定 RIM-BP3 蛋白和 Hook1 蛋白的相互作用。更具体的,在酵母细胞中,一种与 DNA-结构域融合的诱饵蛋白与一

种与活化域融合的猎物蛋白相互作用。相互作用的成对分子结合于专一的序列模式,从而活化两个独立的报道基因的转录。

[0093] 在本发明的一种优选方式中,采用免疫沉淀技术来验证蛋白与蛋白之间的特异性相互作用。所述的免疫共沉淀技术的原理是:在保持蛋白-蛋白相互作用的条件下,收获和裂解细胞,从细胞提取液中特异性地免疫沉淀目的蛋白,然后通过电泳等方法分离免疫沉淀物。具有已知特性的蛋白的共沉淀,可采用抗该蛋白的抗体,通过比如 Western 印迹来检测。此外,如果细胞在裂解前已经用标记物进行过标记,则可通过放射自显影或其它免疫学技术来观察共沉淀的蛋白。

[0094] 作为本发明的优选方式,所述的方法还包括:对获得的潜在物质进行进一步的细胞试验或动物试验,以进一步选择和确定对于调节哺乳动物精子发育有用的物质。

[0095] 本发明所述的体系包括但不限于:细胞(如原核细胞(如大肠杆菌细胞),真核细胞(如 CHO 细胞,293 细胞,精子细胞)或酵母细胞)或细胞培养物体系、亚细胞体系、溶液体系、组织体系、器官体系或动物体系。

[0096] 作为本发明的优选方式,所述的方法还包括:对获得的潜在物质进行进一步的细胞实验和/或动物试验,以进一步选择和确定对于调节哺乳动物精子发育真正有用的物质。

[0097] 另一方面,本发明还提供了采用所述筛选方法获得的可用于调节哺乳动物精子发育的潜在物质。这些初步筛选出的物质可构成一个筛选库。

[0098] 组合物

[0099] 本发明还提供了一种组合物,它含有有效量(如 0.000001-50wt%;较佳的 0.00001-20wt%;更佳的,0.0001-10wt%)的所述的 RIM-BP3 蛋白,或其促进剂或抑制剂,以及药学上可接受的载体。所述的组合物可直接用于调节哺乳动物精子发育。此外,还可同时与其它治疗剂或辅剂联合使用。

[0100] 如本文所用,“药学上可接受的”的成分是适用于人和/或哺乳动物而无过度不良副反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即具有合理的效益/风险比的物质。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。

[0101] 本发明的组合物含有安全有效量的 RIM-BP3 蛋白或其促进剂或抑制剂,以及药学上可接受的载体。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。通常药物制剂应与给药方式相匹配,本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。所述的药物组合物宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量。本发明的药物制剂还可制成缓释制剂。

[0102] 本发明所述的 RIM-BP3 蛋白或其促进剂或抑制剂的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于:所述的 RIM-BP3 蛋白或其促进剂或抑制剂的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等;患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。通常,当本发明的 RIM-BP3 蛋白或其生物活性片段每天以约 0.00001-50mg/kg 动物体重(较佳的 0.0001-10mg/kg 动物体重)的剂量给予,能得到令人满意的效果。例如,由治疗状况的迫切要求,可每天给予若

干次分开的剂量,或将剂量按比例地减少。

[0103] 调节雄性哺乳动物精子发育的方法以及给药方式

[0104] 本发明提供了一种调节雄性哺乳动物精子发育的方法,包括给予受试者有效量的 RIM-BP3 蛋白或其促进剂或抑制剂。当用于调节雄性哺乳动物精子发育时,优选采用重组的 RIM-BP3 蛋白。

[0105] 本发明的 RIM-BP3 蛋白或其促进剂或抑制剂的给药方式没有特别的限制,优选是局部给药。优选的,本发明的 RIM-BP3 蛋白或其促进剂或抑制剂可通过睾丸内注射的方式给予动物。当促进剂或抑制剂是小分子化合物时也可以选用口服的方式给予动物。

[0106] 在得知了所述的 RIM-BP3 蛋白的用途后,可以采用本领域熟知的多种方法来将所述的 RIM-BP3 蛋白或其编码基因、或其促进剂给药于哺乳动物。优选的,可采用基因治疗的手段进行,比如可直接将 RIM-BP3 蛋白通过诸如注射等方法给药于受试者;或者,可通过一定的途径将携带 RIM-BP3 基因的表达单位(比如表达载体或病毒等)递送到靶点上,并使之表达活性的 RIM-BP3 蛋白。

[0107] 作为本发明的一种实施方式,可将所述的 RIM-BP3 蛋白直接给药于哺乳动物(比如人),或者,将编码 RIM-BP3 蛋白的基因通过常规的方法克隆到适当的载体(如常规原核或真核表达载体、或病毒载体如疱疹病毒载体或慢病毒载体)中,将所述的载体导入到可表达所述 RIM-BP3 蛋白的细胞中,使所述的细胞表达 RIM-BP3 蛋白。

[0108] 本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含 RIM-BP3 蛋白编码基因的序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上,以指导 mRNA 合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

[0109] 包含上述的适当基因序列以及适当启动子或者控制序列的载体,可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。本领域一般技术人员都清楚如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

[0110] RIM-BP3 蛋白的促进剂或抑制剂的给药方式主要取决于所述促进剂或抑制剂的类型和特性,这是本领域人员可以评估的。

[0111] 本发明的主要优点在于:

[0112] (1) 首次论证了 RIM-BP3 在精子细胞的发育过程中发挥着非常特化的功能, RIM-BP3 对于保持正常的精子发育是必要的。因此为雄性哺乳动物不育的防治,以及哺乳动物避孕药的研制提供了良好的靶点。

[0113] (2) RIM-BP3 的缺失、抑制或下调对哺乳动物的器官生长、发育没有不良的影响,仅影响精子的形成,因此 RIM-BP3 的抑制剂可作为良好的雄性避孕药物。

[0114] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室指南(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0115] I. 材料与方法

[0116] 哺乳动物表达载体

[0117] RIM-BP3 是没有内含子的基因,因此,全长的编码区域从小鼠 129/SvEv) 的基因组 DNA 上进行 PCR 扩增后,克隆入 pFlag-CMV-2(Sigma) 的 EcoRI/SalI 位点内,得到 pFlag-CMV2-RIM-BP3。

[0118] Hook1 cDNA 从 pDS-Red2-Hook1(获自维也纳医科大学,医学遗传系)上 PCR 扩增后,克隆入 pcDNA3-HA(Invitrogen) 的 EcoRV 酶切位点,得到 pcDNA3-HA-Hook1。

[0119] Hook1^{azh}(1-789 位核苷酸)cDNA 从 pDS-Red2-Hook1 上 PCR 扩增后,克隆入 pcDNA3-HA 的 BamHI/XhoI 酶切位点,得到 pcDNA3-HA-Hook1^{azh}。

[0120] 抗体

[0121] 为了产生针对 RIM-BP3 的特异性抗体,各个抗原区域的片段(包括 RIM-BP3(N)(RIM-BP3 蛋白第 1-416 位);SbcC(RIM-BP3 蛋白第 432-676 位)或 RIM-BP3(C)(RIM-BP3 蛋白第 1183-1420 位))(图 1A)经 PCR 扩增后装入 pET-41b(+) 载体(Novagen)的 SpeI/XhoI 位点内,产生抗原-GST 融合蛋白。抗血清的制备和亲和纯化均按照参考文献(Ge, Y. Z. 等(2004);Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. J. Biol. Chem. 279, 25447-25454)。

[0122] 单克隆抗体:抗- α -微管蛋白抗体,抗- β -肌动蛋白抗体,抗-Flag 抗体和抗-HA 抗体均购自 Sigma-Aldrich 公司。

[0123] 多克隆抗体抗人 Hook1 抗体购自 Proteintech Group 公司。荧光标记的二抗 Alexa Fluor® 488 山羊抗-兔 IgG 和 Alexa Fluor® 546 山羊抗-小鼠 IgG 购自 Molecular Probes 公司。

[0124] 生殖细胞的纯化

[0125] 按照文献报道的方法从小鼠睾丸中分离获得精子细胞(Bellve, A. R. (1993). Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. Methods Enzymol. 225, 84-113)。需要的时候,通过 2-4% BSA 梯度中的重力沉降法对各类生殖细胞进行纯化。相差显微镜下检测各种纯化好的生殖细胞的纯度。

[0126] Western 印迹分析

[0127] 根据常规方法,用温和的组织裂解缓冲液抽提各组织及纯化的生殖细胞的总蛋白。上清用 Bio-Rad Assay Reagent(Bio-Rad)测定蛋白浓度。抽提物用 SDS 上样缓冲液稀释,变性后进行常规的 SDS-PAGE 分离和 Western 印迹分析。

[0128] RIM-BP3 敲除载体的构建

[0129] 为了构建 RIM-BP3 的敲除载体,5' 和 3' 同源臂的 DNA 片段从小鼠(129/SvEv)的基因组 DNA 上进行 PCR 扩增。左臂包含了 1.2kb 的 5' 编码区(73-1248 位核苷酸)。右臂长约 3.2kb,涵盖了 3' 编码区的 2759bp 位核苷酸和 3' 端非翻译区的 435 个核苷酸。两个同源臂分别经 NotI-XhoI 和 BamHI-EcoRI 两组位点,装入 pPNT 载体上,并通过测序进行鉴定。

[0130] 制备 RIM-BP3 敲除小鼠

[0131] 敲除载体用 NotI 线性化之后电转 ES 细胞 MPI-II(129v/Pas 来源,获自德国马普生物物理化学研究所),种在不再分裂的 MEF 细胞(常规方法分离自胎鼠组织)上,用含有 G418 和 Ganciclovir 的培养基进行筛选。药物筛选 6-8 天后挑选抗药性克隆。用 3' 臂外探针通过 Southern 杂交的方法鉴定所有的 ES 抗药性克隆,结果从 225 个克隆中筛选到 2 个

发生了同源重组的阳性克隆。3'臂外探针经PCR扩增得到(正向引物:5'-GAATATTTCTGGGAGTTAAAGCATGGC-3'(SEQ ID NO:3);反向引物:5'-CTTACAAAGCATCATGGGAACACCAG-3'(SEQ ID NO:4))。阳性克隆与CD1/ICR桑椹胚聚集24小时之后,移植到假孕母鼠的子宫内。雄性嵌合小鼠先与ICR品系的雌鼠进行繁育,获得ICR/129Sv混合遗传背景下的突变小鼠。产生了高比例的咖啡色的后代的嵌合雄鼠进一步与129Sv/Pas品系的雌鼠进行繁育以获得近交突变小鼠。杂合小鼠杂交获得纯合后代。小鼠的基因型通过3'臂外探针进行Southern分析,同时也用PCR的方法进行鉴定。PCR使用的引物如下:RIM-BP3(+756):5'-ATCTTTGGCAACAGCACATTCCT-3'(SEQ ID NO:5);neo(+2297):5'-CTGCTTGCCGAATATCATGGTGG-3'(SEQ ID NO:6);和RIM-BP3(-3253):5'-TTTCTTGCTTGC GGTTTGGAGT-3'(SEQ ID NO:7)。下文中未经注明时,使用的均为ICR/129Sv混合遗传背景下的突变小鼠。

[0132] 生育能力检测和精子计数

[0133] 将8-9周的RIM-BP3纯合雄鼠与6-8周末交配过的ICR雌鼠合笼两个月,期间记录出生的窝数和产仔数。野生型和杂合型雄鼠作对照实验组。与纯合雄鼠配对并未产生后代的雌鼠随后与已证实有生育能力的雄鼠交配,若能产生后代,则认为该雌鼠生育能力正常,即纯合雄鼠生育能力做零处理,否则此组数据取消。Student's t检验用来比较不同实验组间的平均数,P值小于0.05则认为差异显著。

[0134] 根据参考文献中报导的方法并稍微修改了一下来分离抗超声的精子细胞核(代表12-16期的精子)(Yu, Y. E. 等(2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 97, 4683-4688.), 简述如下:将两只小鼠的睾丸用glass-Teflon匀浆器在包含有1mM PMSF, 1 μ g/ml 亮氨酸和1 μ g/ml 抑肽素A蛋白酶抑制剂的水中匀浆,接着超声6分钟(15秒开,15秒关)去除超声敏感的细胞。继而超声后的混合液通过80- μ m网眼过滤器将精子细胞核从组织碎片中分离出来,血细胞计数板下对其计数即可。

[0135] 免疫荧光显微镜分析

[0136] 根据参考文献的方法并将其略加修改用以制备展片样品(Kotaja, N等(2004). Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. Nat Methods 1, 249-254)。制备好的样品经冰冷的甲醇中固定10分钟、冰冷的丙酮中固定30秒,4%的多聚甲醛中固定15分钟。固定好的样品在0.5% TritonX-100中透膜15分钟,在含有0.3% Triton X-100和1% BSA的PBS中封闭至少一小时。然后就可以按照培养细胞的免疫荧光染色方法研究RIM-BP3, Hook1和 α -微管蛋白在睾丸生殖细胞中的定位情况(Ge, Y. Z. 等(2004); Chromatin targeting of de novo DNAmethyltransferases by the PWWP domain. J. Biol. Chem. 279, 25447-25454)。图片由LeicaTCS SP2激光共聚焦显微镜拍摄获得。

[0137] 电子显微镜分析

[0138] 对野生型和RIM-BP3敲除小鼠的睾丸和附睾尾部的成熟精子做电镜分析。对于成熟精子的扫描电镜分析,在0.1M磷酸缓冲液中将附睾尾部切碎使得成熟精子释放至上清中。释放出的精子经2.5%戊二醛固定,贴于多聚-L-赖氨酸处理的载玻片上,四氧化钼再固定,酒精梯度脱水,零界点干燥,喷金即可用于观察。图片在JEOL JSM-6360LV扫描电子显微镜下拍摄获得。对于透射电镜来说,样品经4%多聚甲醛和0.05%戊二醛固定,1%四

氧化锇再固定,酒精梯度脱水,Epon 812 包埋处理。包埋好的样品做超薄切片,经铅铀染色即可在 JEOL JEM-1230 透射电子显微镜下观察。

[0139] 亲和纯化 RIM-BP3 相互作用的蛋白

[0140] 从野生型和 RIM-BP 缺失的小鼠睾丸中纯化获得精子细胞,用裂解缓冲液 [50mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0.25% (w/v) 去氧胆酸钠, 1mM DTT, 1μg/ml 抑肽酶, 1μg/ml 亮肽素, 1μg/ml 抑肽素 A 和 1mM PMSF] 进行裂解。稍做超声之后,裂解物在 20,000g, 4℃ 离心 10 分钟。上清分别加入抗 -RIM-BP3(N) 或者抗 -RIM-BP3(C) 抗体, 4℃ 旋转混匀 4 小时。接着加入 Protein A-琼脂糖凝珠 (GE Healthcare), 4℃ 旋转混匀, 结合过夜。用裂解缓冲液洗四遍。凝珠上结合的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后银染分析。切出特异性的条带蛋白, 进行质谱鉴定。

[0141] 免疫共沉淀

[0142] 去除白膜的睾丸或者共转染了 pFlag-CMV2-RIM-BP3 和 pcDNA3-HA-Hook1 或者 pcDNA3-HA-Hook1^{azh} 的 HEK-293T 细胞 (ATCC) 用裂解缓冲液裂解。免疫共沉淀的操作参照文献 (Xie, Z. H. 等 (2006). Mutations in DNA methyltransferase DNMT3B in ICF syndrome affect its regulation by DNMT3L. Hum. Mol. Genet. 15, 1375-1385)。免疫沉淀复合物经常规的 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析。常规方法分离纯化出该免疫复合物。

[0143] 酵母双杂交

[0144] 为了检测 RIM-BP3 与 Hook1 蛋白参与相互作用的区域, 按照参考文献中的方法进行了酵母双杂交的实验 (Li, Y. Q. 等 (2007c). Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair. Nucleic Acids Res 35, 390-400)。RIM-BP3 或片段 (对应的氨基酸片段见图 6C) 装入 pGADT7 载体 (Clontech) 的 EcoRI/BamHI 位点, 与 GAL4 激活结构域融合。Hook1 (其全长氨基酸序列参见 GenBank 登录号: AAM74055 或片段 (对应的氨基酸片段见图 6D) 装入 pGBKT 载体 (Clontech) 的 BamHI/EcoRI 位点, 与 GAL4 DNA 结合结构域融合。两种质粒共转酵母受体菌 AH109 (购自 Clontech), 转化产物涂于 Leu、Trp、Ade 和 His 缺失的 SD 培养基上。

[0145] II. 实施例

[0146] 实施例 1. RIM-BP3 特异性地在小鼠的睾丸中表达, 在精子细胞中丰度最高

[0147] 小鼠的 RIM-BP3 是一个没有内含子的基因, 编码 1606 个氨基酸。它有三个 SH3 (Src Homology 3) 结构域和两个位于羧基端的 FNIII (fibronectin type III) 结构域 (图 1A)。这种整体上的结构域分布与 RIM-BP1 和 RIM-BP2 非常类似 (Mittelstaedt, T. and Schoch, S. (2007). Structure and evolution of RIM-BP genes: identification of a novel family member. Gene 403, 70-79)。在 RIM-BP3 的 N 端, 它有一个独特的 SbcC 结构域, 提示具有 ATP 酶的活性 (Connelly, J. C. 等 (1998). The SbcCD nuclease of Escherichia coli is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 7969-7974)。

[0148] 本发明人通过 Northern 印迹杂交的方法检测了成年小鼠各个组织中 RIM-BP3 的转录情况 (图 1B), 结果发现仅在小鼠的睾丸中能检测到一个大约 5kb 的 RIM-BP3 的转录本。而且, 该转录本的大小与生物信息学的预测和之前文献报道的结果一致。

[0149] 接下来, 本发明人通过 Western 印迹杂交的方法检测了 RIM-BP3 蛋白在各个组织

中的分布。本发明人使用的是针对 RIM-BP3 的多克隆抗体,并且这些抗体的特异性非常好(图 8)。与 Northern 印迹分析的结果一致,仅在小鼠的睾丸组织中检测到 RIM-BP3 蛋白的存在(图 1C)。而 RIM-BP3 的旁系同源体(paralog)是仅存在于脑组织中。

[0150] 小鼠睾丸中的生精上皮在出生后经历了一系列变化显著的发育过程。于是本发明人选取不同出生天数的未成年小鼠和成年小鼠,抽提睾丸组织的总蛋白,通过 Western 印迹杂交的方法来检测精子发生过程中 RIM-BP3 蛋白的表达情况(图 1D)。RIM-BP3 最早能被检测到是在小鼠出生后第 20 天,这正是精子细胞刚刚开始出现的时期。此后,RIM-BP3 的蛋白表达水平逐渐增强,直至小鼠性成熟。由此可以得出,RIM-BP3 主要存在于减数分裂后的雄性生殖细胞中。

[0151] 本发明人进一步探究了 RIM-BP3 存在于哪些类型的生殖细胞中。将雄性生殖细胞分离纯化出来,通过显微镜观察确保每种类型细胞的纯度都大于 90%,然后分别抽提总蛋白,通过 Western 印迹杂交进行检测。结果表明,RIM-BP3 在长形精子细胞中的表达量很高,在粗线期精母细胞和圆形精子细胞中也有较弱的表达。有趣的是,它存在于残体当中,但在成熟的精子中却检测不到(图 1E)。这些结果表明,RIM-BP3 是一个睾丸特异蛋白,主要存在于单倍体阶段,提示它在精子形成过程中发挥独特的功能。

[0152] 实施例 2. RIM-BP3 蛋白定位在精子领上

[0153] 接下来,本发明人运用小鼠生精小管的展片技术(Kotaja, N. 等(2004). Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. Nat Methods 1,249-254),通过免疫荧光的方法分析了 RIM-BP3 在发育中的精子细胞里的亚细胞定位情况。RIM-BP3 最早在第 9 期的精子细胞中出现,持续表达至第 13 期,最终在第 16 期时消失(图 2A)。通过与针对 α -微管蛋白的抗体共染,观察到 RIM-BP3 与精子领能较大面积地共定位。同时,在 RIM-BP3 敲除小鼠的样品中检测不到信号,这说明了抗体的特异性很好(图 2B)。RIM-BP3 的表达谱式与精子领的动态分布非常吻合(Clermont, Y., Oko, R. and Hermo, L. (1993). Cell biology of mammalian spermiogenesis. In: Desjardins C, Ewing LL, editors. Cell and molecular biology of the testis. New York, USA: Oxford University Press., 332-376),提示它在精子细胞发育的晚期有着非常特化的作用。

[0154] 实施例 3. RIM-BP3 基因的敲除导致雄性不育

[0155] 为了探索 RIM-BP3 在精子形成过程中的功能,本发明人通过基因敲除手段在小鼠中敲除该基因来研究其功能。通过同源重组编码 SbcC 结构域的 DNA 序列被 PGK-neomycin 序列所代替从而产生突变的等位基因(图 3A)。突变小鼠的基因型通过对鼠尾基因组 DNA 进行 PCR 或 Southern 杂交的方法鉴定(图 3B)。用针对 RIM-BP3N 端和 C 端不同区域的两个多克隆抗体(抗 RIM-BP3(N) 抗体和抗 RIM-BP3(C) 抗体)做 Western 分析进一步确定了纯合小鼠的睾丸中 RIM-BP3 蛋白的确已经消失(图 3C)。通过以上 3 种不同的方法鉴定表明本发明人已经成功地得到了 RIM-BP3^{-/-} 纯合小鼠。

[0156] 在 129Sv&ICR(ICR/129Sv) 遗传背景下,杂合型雌鼠与杂合型雄鼠交配繁殖产生的野生型(RIM-BP3^{+/+})、杂合型(RIM-BP3^{+/-})和纯合型(RIM-BP3^{-/-})小鼠符合孟德尔遗传比例(39 : 92 : 44),提示 RIM-BP3 的敲除并未导致胚胎致死。成熟的突变小鼠在生长发育方面均未看到明显异常。考虑到 RIM-BP3 在睾丸中的特异表达,本发明人决定通过检测雄性

突变小鼠与野生型雌鼠的交配情况来研究其生育能力。结果显示尽管雄性纯合小鼠的性行为正常,与其交配的雌鼠可以检测到阴栓的存在,但是它们的生育能力几乎为零。野生型可育的 ICR 雌鼠与纯合雄鼠经过两个月的交配,最终只有一只雌鼠怀孕并且只产仔一只(表 1)。杂合型雄鼠的生育能力基本正常,产仔数量与野生型的相当。为了确定雄性纯合小鼠的生育能力下降是否是因为受精失败导致的,本发明人将纯合雄鼠与超排的雌鼠交配,次日从阴栓阳性的小鼠输卵管壶腹部膨大部位收集卵细胞,通过显微镜下检查雄原核的存在与否来判断卵细胞是否受精。实验结果表明,在 129sv&ICR 遗传背景下,与正常雄鼠交配的雌鼠的卵细胞的受精率为 92.4%,而与 RIM-BP3 缺失雄鼠交配的雌鼠的卵细胞受精率降低至 9.3%(表 2)。由此可见,与 RIM-BP3^{-/-} 雄鼠交配的雌鼠卵细胞的受精率明显降低,并且这种异常不依赖于小鼠的遗传背景(129sv 遗传背景下与 RIM-BP3 缺失雄鼠交配的雌鼠卵细胞的受精率仅 2.0%)。

[0157] 表 1.8 周内 RIM-BP3 突变雄鼠的生育能力检测

遗传背景	RIM-BP3 基因型	可育小鼠数 量/总数	每对可育小鼠	每窝产鼠仔数 (平均值±标准误)
			产仔窝数 (平均值±标准误)	
[0158] 129sv&ICR	+/+	10/10	2.7±0.2	12.8±1.3
	+/-	10/10	2.9±0.1	13.5±0.8
	-/-	1/10	1	1

[0159] 表 2. 受精率的检测

遗传背景	RIM-BP3 雄鼠基因型	受精率 (%)
[0160] 129sv&ICR	+/+	92.4 (n=10)
	-/-	9.3 (n=20)
129sv	+/+	70.6 (n=4)
	-/-	2.0 (n=11)

[0161] 为了确定雄性纯合小鼠受精过程受阻是否与精子的数量和质量有关,本发明人检查了它们的生殖器官以及睾丸和附睾中的精子数量(表 3)。统计结果分析显示雄性纯合小鼠的精囊、睾丸和附睾尾部的重量与野生型和杂合型小鼠的相当,提示小鼠正常发育。睾丸中抗超声的精子细胞核数量也正常,但是附睾尾部成熟精子数量却减少了 1/3,提示 RIM-BP3 的敲除影响成熟精子的产生或从睾丸中释放。对生精小管的组织化学分析显示除了延长型精子细胞核形态的异常并未看到其它细胞形态学方面的异常。

[0162] 表 3 :RIM-BP3 突变小鼠各器官的重量及产生精子数目的检测^a

[0163]

RIM-BP3 基因型	精囊腺重量 (毫克)	睾丸重量 (毫克)	附睾尾重量 (毫克)	每毫克睾丸精子 头数目(×10 ⁴)	每毫克附睾尾精子 数目(×10 ⁴)
+/+	314±11	129±3	38±2	21±1	85±5
+/-	296±12	127±4	27±1	20±1	79±4
-/-	270±6	131±6	26±1	18±1	57±5

[0164] ^a10 只 12 周龄的小鼠用于统计分析。所有的数值均为平均值和标准误。

[0165] 实施例 4. RIM-BP3 突变小鼠附睾中成熟精子形态异常

[0166] 尽管与野生型小鼠相比, 纯合雄鼠附睾尾部的精子数量减少了一些, 但是它们几乎是完全不能生育。为了探索雄性纯合小鼠生育能力急剧下降的原因, 本发明人通过电镜的方法对附睾尾部成熟精子的形态进行初步的观察。扫描电镜结果显示, 附睾尾部几乎所有的精子头部形态各异, 非典型的镰刀状头部 (图 4A, a-c)——常与核形态的正常形成缺陷有关。并且发现有很大一部分精子的鞭毛脱离精子头部, 还有一部分鞭毛出现不同程度的弯折。为了进一步揭示异常精子的内部结构, 又进行了透射电镜分析。如本发明人所想, 纯合雄鼠的精子细胞核形态异常, 并且有 90% 左右的精子还显现出顶体脱离细胞核以及核周空间变大的现象 (图 4B)。这种亚细胞水平上结构的紊乱可以解释纯合雄鼠的受精能力降低, 并且也说明了 RIM-BP3 缺失的精子在分化与成熟过程中存在着缺陷。

[0167] 实施例 5. RIM-BP3 突变小鼠精子形成受阻

[0168] 小鼠中 RIM-BP3 的敲除所导致的雄性不育是由于精子头部形态的异常引起的。为了更加详细地研究雄性纯合小鼠精子发育过程中形态学的变化, 本发明人对睾丸切片进行了透射电镜分析。之前的组织化学分析已经显示精原细胞、精母细胞和 Sertoli 细胞的形态均正常, 只有第 12 期 (XII) 的延长型精子显示异常的细胞核形态 (图 9)。这一现象被透射电镜分析所证实。RIM-BP3 缺陷的小鼠精子细胞在顶体、顶体板、精子领和细胞核等方面都显示出各种各样的异常。最早的异常出现在第 5 期的圆形精子细胞中, 由高尔基体衍生而来的前顶体囊泡不能融合形成一个大的顶体囊泡, 并且顶体板多处弯折 (图 5B), 但是这种异常的比例并不是很高。然而, 从结构学的角度来看 RIM-BP3 的缺失对延长型精子的影响最深并导致亚细胞结构水平上各种各样的异常。大约 10% 的延长型精子出现顶体不连续的现象 (图 5D, F, K 中的箭尖), 这是早期顶体发生过程中前顶体囊泡融合缺陷所致。顶体板的弯折在后期也表现得更为剧烈, 弯折的边缘形成不正常的角度, 以致顶体形态异常, 顶体板下方的细胞核也贴合着变形的顶体板而使得其形态变得不规则 (图 5F, G)。随着精子细胞核延伸至第 10/11 期, 精子领结构的异常也变得清晰可见。敲除小鼠精子的精子领与野生型的相比呈对称分布, 形成尾端逐渐变细的锥形 (图 5F), 并且发现在某些切片中微管结构内陷, 出现在核膜内并被核膜包裹 (图 5H)。在另外一些延长型精子中还发现精子领的核周环分布异常, 位于顶体板边缘环的上方, 以致精子领结构覆盖了一部分顶体 (图 5I)。在精子形成阶段的晚期, 绝大多数浓缩的精子呈现出顶体脱离、细胞核畸形以及核周空间中不明物质的存在等异常现象 (图 5K, L)。综上所述, RIM-BP3 敲除小鼠的精子头部出现多方面的异常, 包括顶体的不连续、顶体板的弯折、精子领结构的异常分布以及变形的细胞核。

[0169] 本发明人又进一步通过对 α -微管蛋白的免疫荧光实验证实了 RIM-BP3 缺失小鼠的延长型精子中精子领的分布异常。与透射电镜分析结果相吻合, RIM-BP3 缺失的延长型精子中精子领的结构变得异常 (图 10A)。在精子分化到第 9 期, 精子领形态还正常, 钟型的微管结构包裹着卵圆形的细胞核, 然而, 当精子发育到第 11/12 期时, 不同于野生型小鼠中不对称的精子领结构, 大多数突变小鼠的精子精子领和细胞核都呈对称的锥形分布。并且突变小鼠中精子领的轴向也变得与精子细胞头部的纵轴平行, 而在野生型的精子中二者呈 45° 角 (图 10B)。这些结果提示 RIM-BP3 的缺失确实导致了精子领分布异常。

[0170] 实施例 6. RIM-BP3 蛋白与 Hook1 蛋白相互作用

[0171] 为了揭示 RIM-BP3 的缺失对精子形成过程造成的分子水平的影响, 本发明人鉴定了精子细胞中 RIM-BP3 的相互作用蛋白。用两个针对 RIM-BP3 不同区域的抗体分别去做免疫沉淀, 均能从野生型的精子细胞中共纯化到一个大约 100kDa 的蛋白, 而作为对照的 RIM-BP3 缺陷的精子细胞中则看不到该蛋白被共纯化 (图 6A)。本发明人进而对这一蛋白质进行质谱分析鉴定, 结果表明它是 Hook1。Hook1 是一个精子结合蛋白。为进一步确认 RIM-BP3 与 Hook1 的相互作用, 本发明人进而抽提小鼠睾丸的总蛋白, 进行免疫共沉淀分析。野生型睾丸抽提物中的 Hook1 能被 RIM-BP3 的抗体共沉淀下来, 而 RIM-BP3 缺陷小鼠的睾丸抽提物中的 Hook1 则不能 (图 6B)。

[0172] 发现 RIM-BP3 与 Hook1 有相互作用后, 接下来, 本发明人采用了酵母双杂交分析的方法, 构建了这两个蛋白的一系列缺失突变体来确定它们相互作用的区域。本发明人发现表达 RIM-BP3 羧基端片段 (第 830 位至 1606 位氨基酸) 的酵母可以在营养缺陷的培养基上生长 (图 6C), 表明 RIM-BP3 包含有 SH3 和 FNIII (FN3) 结构域的片段对于与 Hook1 的相互作用是必须的。类似的, 本发明人也检测了 Hook1 负责与 RIM-BP3 相互作用的区域。仅有表达 Hook1 卷曲螺旋结构域的片段 (第 165 位至 661 位氨基酸) 的酵母能在营养缺陷的培养基上生长, 但它的生长速度远远慢于表达野生型 Hook1 的酵母 (图 6D)。这些结果说明 Hook1 中部包含卷曲螺旋结构域的大片段参与了与 RIM-BP3 的相互作用。

[0173] 实施例 7. Azh 小鼠中的 Hook1 的突变体丧失了与 RIM-BP3 相互作用的能力

[0174] 电镜和免疫荧光分析结果表明 RIM-BP3 缺陷的精子细胞中精子头的分布出现了异常 (图 5 和图 10)。这些异常让本发明人想到了 azh 突变小鼠中也有类似的表型。Azh 小鼠中, Hook1 的基因组序列缺失了一段大约 2kb 的区域, 使得产生的截短突变体 Hook1^{azh} 缺少了整个羧基端部分 (图 7A)。基于 RIM-BP3 与 Hook1 在体内和体外都有相互作用, 本发明人认为, 截短的突变体 Hook1^{azh} 丧失了与 RIM-BP3 相互作用的能力, 这是导致精子头异常分布的潜在原因。因此, 本发明人使用免疫共沉淀的方法检测了 RIM-BP3 与 Hook1^{azh} 在细胞内的相互作用。正如本发明人的推断, Hook1^{azh} 突变体确实不能与 RIM-BP3 相互作用 (图 7B)。这些数据提示, azh 和 RIM-BP3 突变小鼠中均存在精子细胞发育的异常, 是 Hook1 和 RIM-BP3 共同参与的某个途径遭到了破坏而造成的。

[0175] 实施例 8. 筛选药物

[0176] 筛选例 1

[0177] 如前述方法构建 RIM-BP3 与 Hook1 蛋白相互作用的免疫共沉淀体系。将全长 RIM-BP3 编码序列装入 pFlag-CMV-2 (Sigma) 的 EcoRI/SalI 位点内。全长 Hook1 编码序列装入 pcDNA3-HA (Invitrogen) 的 EcoRV 酶切位点, 共同转染 HEK-293T 细胞 (ATCC)。

[0178] 设置以下组:

[0179] 测试组: 用候选物质处理的上述重组 HEK-293T 细胞;

[0180] 对照组: 不用候选物质处理的上述重组 HEK-293T 细胞。

[0181] 经过上述处理后, 用裂解缓冲液裂解细胞, 通过免疫共沉淀观察两种蛋白的相互作用情况。免疫共沉淀的操作参照文献 (Xie, Z. H. 等 (2006). Mutations in DNAmethyltransferase DNMT3B in ICF syndrome affect its regulation by DNMT3L. Hum. Mol. Genet. 15, 1375-1385)。免疫沉淀复合物经常规 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析。

[0182] 如果与对照组相比, 测试组中的 RIM-BP3 与 Hook1 蛋白相互作用显著变弱, 则说明

该候选物质是潜在的抑制精子发育的物质；反之，如测试组中的 RIM-BP3 与 Hook1 蛋白相互作用显著变强，则说明该候选物质是潜在的促进精子发育的物质。

[0183] 以前述制备的抗 RIM-BP3 多克隆抗体（抗 RIM-BP3(N) 抗体；抗 RIM-BP3(C) 抗体的组合）作为候选物质，处理上述 HEK-293T 细胞。结果发现，所述抗体可以与 RIM-BP3 蛋白特异性结合，从而显著地抑制了 RIM-BP3 蛋白与 Hook1 蛋白的相互结合。

[0184] 筛选例 2

[0185] 以野生型小鼠精子细胞的抽提物作为用于筛选的反应体系。设置以下组：

[0186] 测试组：用候选物质处理的精子细胞的抽提物；

[0187] 对照组：不用候选物质处理的精子细胞的抽提物。

[0188] 用候选物质处理测试组，并与对照组比较。如果与对照组相比，测试组精子细胞抽提物中 RIM-BP3 蛋白的活性显著上升 30% 以上，则说明该候选物质是潜在的促进哺乳动物精子发育的物质；反之，如测试组中的 RIM-BP3 蛋白的活性显著下降 30% 以上，则说明该候选物质是潜在的抑制哺乳动物精子发育的物质。

[0189] 以前述制备的抗 RIM-BP3 的多克隆抗体（抗 RIM-BP3(N) 抗体；抗 RIM-BP3(C) 抗体的组合）作为候选物质，处理上述精子细胞的抽提物。结果发现，所述的抗体可以与 RIM-BP3 蛋白特异性结合，从而显著地抑制了精子细胞中 RIM-BP3 蛋白的活性。

[0190] 筛选例 3

[0191] 以野生型小鼠作为筛选的反应体系。设置以下组：

[0192] 测试组：口服给予小分子化合物候选物质的野生型小鼠；

[0193] 对照组：不给予小分子化合物候选物质的野生型小鼠。

[0194] 给予候选物质后，检测测试组小鼠睾丸内精子细胞的生长和发育情况，并与对照组比较。如果与对照组相比，测试组精子细胞中精子畸形百分率显著上升 30% 以上，则说明该候选物质是潜在的抑制哺乳动物精子发育的物质；反之，如测试组中精子细胞中精子畸形百分率显著下降 20% 以上，则说明该候选物质是潜在的促进哺乳动物精子发育的物质。

[0195] 讨论

[0196] 本发明人的研究工作证明了 RIM-BP3 在精子形成过程中发挥着非常重要的作用。RIM-BP3 专一性地在小鼠的睾丸中表达，尤其在分化中的精子细胞里有较高的表达量。RIM-BP3 的基因敲除会引起雄性不育，同时，RIM-BP3 缺失的小鼠除了雄性不育之外，在发育和行为等方面没有任何异常。RIM-BP3 敲除导致的雄性不育，主要是因为精子头部的严重变形引起的。敲除小鼠的精子头部不具备典型的镰刀形状，核严重畸形，核周区域膨大，这些异常都提示核形态的正常形成 (nuclear shaping) 这一过程有缺陷。

[0197] 精子形成是一个错综复杂的过程，单倍体的圆形精子细胞必须经过这一过程才能分化形成长形的成熟精子。在该过程中，存在多种机制以保证成熟精子各种特化结构的正确形成和组装。其中，顶体-顶体板-精子领 (acrosome-acroplaxome-manchette) 这一复合物被认为在精子头部形成过程中发挥着主要的作用。在正常的精子细胞中，顶体紧密地结合在顶体板上，并通过顶体板的作用被锚定在延长型精子的核膜上。顶体板则提供了一个脚手架，能将外胞浆中 F-肌动蛋白箍环产生的外力转化成相对柔和、稳定的内力传递给精子内部。精子领是由多束微管组装而成，位于顶体板的边缘环结构下方，微管束的一端起始于核周环，另一端向尾部延伸。在精子细胞延伸过程中，边缘环和核周环的直径都会逐渐

缩小,调控精子细胞核的正常延伸。本发明人的工作表明,RIM-BP3 的敲除会引起顶体-顶体板-精子领复合物的多种异常,这些异常与精子头部畸形密切相关,证明了该复合物在精子形成过程中的重要作用。这些异常可以归纳如下:1) 圆形精子细胞中前顶体囊泡不能正常地融合,导致了长形精子细胞中顶体不连续;2) 扭曲弯折的顶体板和错误定位的顶体;3) 长形精子细胞中畸形的精子领,如呈现对称的锥形分布,错误地分布在核内,核周环错误地在边缘环的前部组装等。顶体-顶体板-精子领复合物的这些异常是造成精子细胞头部畸形的主要原因。

[0198] 那么,顶体-顶体板-精子领复合物是如何变得异常的?考虑到正常的精子细胞中 RIM-BP3 蛋白定位在精子领上,本发明人认为,RIM-BP3 敲除小鼠中精子领分布的异常应该是上游事件之一。这一观点与文献报道是吻合的,例如,在精子领结合蛋白如 E-MAP-115 以及 CLIP-170 的基因敲除小鼠模型中,或者用破坏微管的药物处理的小鼠模型中,都能看到精子领的异常分布引起的精子头部畸形。

[0199] RIM-BP3 调控微管的组装可能是通过 Hook1 来介导的。本发明人已经证明了在长形精子里 Hook1 与 RIM-BP3 稳定地结合在一起。Hook1 的氨基端部分含有一个结合微管的结构域,羧基端部分含有一个与细胞器结合的结构域。这样的结构域分布使得 Hook1 可以将精子领微管与其他的细胞器(如核膜)连接起来。RIM-BP3 缺陷的精子细胞中经常能看到精子领的分布异常,而 Hook1 仍然结合在异常分布的精子领上。这一结果提示 RIM-BP3 并不影响 Hook1 与精子领的结合,而是通过调节 Hook1 与某种细胞器的联系来锚定精子领。有趣的是,RIM-BP3 敲除小鼠的一些表型,如精子头部的异常,容易脱落的尾部,精子领的异位分布等,都与 Hook1 的缺失突变造成的 *azh/azh* 小鼠的表型非常相似。在 *azh/azh* 小鼠中,Hook1 基因上的第 10 个和第 11 个外显子缺失,使得产生的截短突变体 Hook1^{azh} 仅仅含有氨基端的微管结合区域和很少一部分的卷曲螺旋结构域。而 Hook1 的卷曲螺旋区域对于 RIM-BP3 的相互作用是必须的。截短突变体 Hook1^{azh} 丧失了与 RIM-BP3 相互作用的能力。因为 Hook1^{azh} 具有完整的微管结合区域,本发明人认为 *azh/azh* 小鼠与精子领相关的表型是因为 Hook1 与 RIM-BP3 的相互作用被破坏了造成的。RIM-BP3 和 *azh/azh* 突变小鼠的表型相似性一定程度上反映了 RIM-BP3 与 Hook1 的相互作用对于精子领在核表面的定位至关重要。作为一个接头蛋白,RIM-BP3 可能通过与 Hook1 的相互作用起到正确定位精子领的作用。

[0200] 作为一个多结构域的大蛋白,RIM-BP3 除了在精子领的发育过程中有作用之外,还参与了与精子领的功能相关的囊泡运输的过程。本发明人发现在 RIM-BP3 缺陷的长形精子细胞中,膨大的核周区域里有一些不明物质的沉积(图 5K,L)。这一现象提示了 RIM-BP3 参与了精子领上的物质运输。RIM-BP3 的缺失会造成精子领上物质运输的缺陷,影响了正常的核质交换,进而导致了本应运输到胞质小滴(cytoplasmic droplet)的残余物质滞留在核周区域。这些残余物质的存在也影响了顶体和精子领与核膜的紧密联系,使得顶体脱离,核周区域膨大。此外,圆形精子细胞中沿着顶体板排列的前顶体囊泡不能正常地融合,这一异常也可能是因为 RIM-BP3 的缺失引起的囊泡运输的缺陷造成的。

[0201] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范

围。

[0202] 序列表

[0203] <110> 中国科学院上海生命科学研究院

[0204] <120> 一种精子结合蛋白及其在精子形成过程中的作用

[0205] <130>087469

[0206] <160>7

[0207] <170>PatentIn version 3.3

[0208] <210>1

[0209] <211>4821

[0210] <212>DNA

[0211] <213> 小鼠 (Mus musculus)

[0212] <400>1

[0213]	atgacaaagg actcaccac ccccttgggt ggtggccgcg cgtcgcccaa gaagccaagc	60
[0214]	agccccggcc cagcggccgc agtgctggag gagcagagac gagagctaga aaaactacgg	120
[0215]	gcagagctgg agggcgagcg cgcgcgcggc cggtcggaac ggaggcgttt cgctaccag	180
[0216]	acgcgccagc tgcgggagtc ggctgagcag gageggcagc agctggctga ccctctgcgc	240
[0217]	tccaagtggg aggcacgacg cctccgggag ctgcggcagc tgcaggagga ggtgcagcgc	300
[0218]	gagcgtgagg ccgagatccg gcagctgctg cgctggaagg aggcagagat gcggcagctg	360
[0219]	cagcagttgc tacaccagga gcgcgatgtt gtattgcgcc aggcaaggga gcttcagcgt	420
[0220]	cagctggccc aggagctagt gaaccgtggt tactgcagcc gctcaggggc atccgaagcc	480
[0221]	tccgcggcac aatgccgctg tcgcctgcag gaagtgtggt cgctgctgcg ctgggagacc	540
[0222]	gacggcgaac aagccgcgcg catccgccac ctgcaggcgg cgctagacgt ggagcgccag	600
[0223]	ctattcctta aatacactct agagcacttc cgctggcagc cggttttacc gggacccgcg	660
[0224]	gacccccaa ccacgcattc cttggaagag ccgccctag aagcccagag taacactggt	720
[0225]	ggcaccccaa agcctgctcg tcgactcgga tccctgaaa gcctgaacac tggcgtccgg	780
[0226]	gttcattctc caaacgacct gctgcccacg cgcgccggtt ccctcgaatc tttggcaaca	840
[0227]	gcacattcct gctcactgga caacacactg aattgtctcc aggtcttctga atccgaggt	900
[0228]	agggccctg cgaccagcgc gtctattcca gacacctcca gtccccagcc gccgcctcag	960
[0229]	ctaccatcaa tacataggaa acctaattgac ctgcagaaaag aaagctccga gaacaagccc	1020
[0230]	tgcgaagcct cgacctctc gcctccgggt ctggactacc aggaactggt gaggcagaac	1080
[0231]	tcggagctgg ccgaggcatt gcaggtgctg gttcgccgct gttgtgacct gcgcgaagaa	1140
[0232]	aacttgcatc tgcggcgtaa aggtctctcc gaggaggcag gagagaaagt gaaatggctc	1200
[0233]	aaggtgaagc acgcagagct gaccgatctc gtcagcgcc ttgaagacag ggcccgaag	1260
[0234]	cttcaggaga ccaatctgag ggccatgagt gctccagtgc caggtgagag cctcgaaggt	1320
[0235]	ctggacctga gccaaagtgt tacctgccag cgtgctcagg acctgtcaga acaggtctggc	1380
[0236]	gcgctgcaag ccaaggatct acagatcgaa gcattgaggc gggagtgcc cctgctgcag	1440
[0237]	gcgcgcatcg ccgcggacct tggcagctcc tcgcatctg aagagggcgc cacgtgcgcg	1500
[0238]	caatggtgca acatcagtga cttggaccgg ctgcagcgtg agtctcagcg ggaagtgtg	1560
[0239]	cgctgcaaa gacagttgac tctacatcag agtaaagcag gcgcctgggc agacgcgggc	1620

[0240]	agacccagca caccctcgga gataactcgg caccaggtgc aggcgctgga acgcgagttg	1680
[0241]	ggtttacagc ggcgggaatg cgaggaactg agcgttcagg cagccgcagc tgagcggcgc	1740
[0242]	tacgaggaga cagaggcaca actgcaggcc gcgctgcaca aaggcgccag gctgtcagag	1800
[0243]	gagaatgcac ggctgcaggc cctggccaac tggatgaaga agatggcaga tgagaacagc	1860
[0244]	aatgtttccc ggcagcaaag tcacacgagg cagaggcagg aactcgaagc cactagcctg	1920
[0245]	ctggctgagc agctgctgca acaagaggga tatgcgcaag acaggcggca gcagctgcag	1980
[0246]	cactacaaga ataaagccct aagtgcactt aggacttccg ggaaagagat gcaggggttg	2040
[0247]	caatttcagc ctggccaccc ctgagagaca tcagagacca cccaagcttc agagtcccaa	2100
[0248]	gccagggata gcgggagacc cacgttcaaa acaaaatctg aagaacgtgt attacctttg	2160
[0249]	cctaccaggg acatacagcc tcctgcttgt ctctcccagc aggagaatcc agttatcggt	2220
[0250]	gaggaaccag ctgctggccc ccaagtgtca gacagaaatt caactagtca gtctctggac	2280
[0251]	tccaaaccgc aagccaagaa aaccagttca cagtcaaatt cctcctcaga ggtagagtc	2340
[0252]	atgtgggcta cagtgccatc ttgcctttct ttggacatgg acacagcaag tgaagtggat	2400
[0253]	gatttagaac cagacagtat gtccactccc ctggaaatga ggagccttga ggctcccatc	2460
[0254]	attcccaagc tcaagctett cttggctaga tctagctaca atccatttga agggcctagt	2520
[0255]	gagcattgtc aaggcaagct gcccctcaca gctggggact atgtctatgt ttttggggac	2580
[0256]	atggatgagg atggcttcta tgaaggggag cttgtgaatg ggcagcgagg gctagtcccc	2640
[0257]	tccaacttag tggaaccgat ttcaggaagc cctattctga accacctatt cctcaagtcc	2700
[0258]	cctgacattg gtccactgc actaccagct gggcacagca aagtcttgaa gaaaggcagc	2760
[0259]	ttattacttg gggaagtaca ggagagaggt ctgtgtcagg taggaagggt agactctaag	2820
[0260]	acagatatgg cagcagagag tttgaaaacc aagacagaag cctgttggtt gggcttgaaa	2880
[0261]	tcaagcttgg aggagcagag cttctccaga cccctcctgg aggccaaagg cgcattctgt	2940
[0262]	ctggcccca tggaactaca gctgcagaat gtcacggcta cctccgccac cattacctgg	3000
[0263]	gcctctggca gcaatagata tccgcatgtg gtgtacctag atgatgaaga gcatactctg	3060
[0264]	actccctcag gtgtgaacca ctacaccttt caaggcctac atcctggcac gtgttaccgg	3120
[0265]	gtgagggtgg gggtagact acctagggac ctactacagg tgctctggga aacaacgtcc	3180
[0266]	tccactctaa cttttgatac accttttagca ggccccctg acccccctct ggatgtgctg	3240
[0267]	gtggaacacc atgcctctcc ggggtgtcta gtggtcagtt ggctccctgt gaccatagac	3300
[0268]	tcagctgggt cctccaatgg agtgcaggtc actggetatg ctgtgtatgt agatggcttc	3360
[0269]	aaggtgaccg aagttgccga cggcactgct ggaaacaccc tgttggaatt ttctcagett	3420
[0270]	caggttcccc tatcctgcca gaaggtttca gtgagaacca tgctactgta tggcgagtct	3480
[0271]	ctggattcag taccggtca aatccccgag gacttcttct cctgctgccc attcctagga	3540
[0272]	gtcctccct ttaactacac agatggtaac ctttccctg tctgtcacca gaagctggta	3600
[0273]	caagcttctc tgggtgccaa gtccagtcct cgtggccctg gaaactgtgg ggagccccag	3660
[0274]	gcgaagtttc tagaagcatt ccctgaagaa catccaagga agcatttgc actgtccagc	3720
[0275]	ctgagctcag atggaacaaa tagccaagct caggggcccc cagaagcctg gaagggtac	3780
[0276]	gagaaggacc tgtcctttca gaagagtcac cagaaccaca agccacctct tctctttggc	3840
[0277]	cagtctgggg tagaggaagg acatgcccc cacaatgca tcagtgggag tctgtctcca	3900
[0278]	ggatttgtcc atctctctc agaaattgga catggaaaaa tacgttgttg ggagaagcct	3960

[0279]	ggccttgaga aagcccttct tcaaaatcaa tatgccccga tgggtcccacc tcaccagcaa	4020
[0280]	gggtccagcc agtgccaacc agctgacttc catcatgttt ttgaggagaa ggaggccctg	4080
[0281]	tgttttgatt ctcagggcac agagaagcca gagcaaagaa agaacaagtc ccaaaatgga	4140
[0282]	cagagacaag ggactcccgg aagcaagaga gagtgtcag tgctatgccc agcaccaacc	4200
[0283]	aacaaagtca ttaagatgac aagtggtagc ccagaccagc tggagactga cgcaaacaat	4260
[0284]	ccagtcaggg tcttcttggc cctctttgac catagccccc ttgtaatatc tgtcaactca	4320
[0285]	gaagctgcag aagaagagct ggccttccag aaagggcagc tgctgagggt atggggttca	4380
[0286]	ctggatctcc atggcttcta ccacggagag tgcaatggac acctgggcaa aatccccggg	4440
[0287]	cacctggtag ttgaggtaga ggtgggcaca caacagactg atgggaggtg gcatctgcca	4500
[0288]	gcacaaggcc atctgcttctc tgagactcaa cgtgaagact tggagggtct aaccaattcc	4560
[0289]	cagggatctt acatgcctca agggaaactcc agaacaccca cactgtggac cccaaagaca	4620
[0290]	atggtggcag ctctggacta cgateccagg gatggtagag caggggtcca ggcaaagggc	4680
[0291]	aagctggtat tgagagctgg agatgtagtc acagtttatg ggcctgtgga tgataaggga	4740
[0292]	ttctactatg gtgagtatgg tggacacagg ggcttggtcc cageccacct gctggatgac	4800
[0293]	ttgcctgtcc atggagagta a	4821
[0294]	<210>2	
[0295]	<211>1606	
[0296]	<212>PRT	
[0297]	<213> 小鼠 (Mus musculus)	
[0298]	<400>2	
[0299]	Met Thr Lys Asp Ser Pro Thr Pro Leu Gly Gly Gly Arg Ala Ser Pro	
[0300]	1 5 10 15	
[0301]	Lys Lys Pro Ser Ser Pro Gly Pro Ala Ala Ala Val Leu Glu Glu Gln	
[0302]	20 25 30	
[0303]	Arg Arg Glu Leu Glu Lys Leu Arg Ala Glu Leu Glu Gly Glu Arg Ala	
[0304]	35 40 45	
[0305]	Arg Gly Arg Ser Glu Arg Arg Arg Phe Ala Thr Gln Thr Arg Gln Leu	
[0306]	50 55 60	
[0307]	Arg Glu Ser Ala Glu Gln Glu Arg Gln Gln Leu Ala Asp His Leu Arg	
[0308]	65 70 75 80	
[0309]	Ser Lys Trp Glu Ala Arg Arg Leu Arg Glu Leu Arg Gln Leu Gln Glu	
[0310]	85 90 95	
[0311]	Glu Val Gln Arg Glu Arg Glu Ala Glu Ile Arg Gln Leu Leu Arg Trp	
[0312]	100 105 110	
[0313]	Lys Glu Ala Glu Met Arg Gln Leu Gln Gln Leu Leu His Gln Glu Arg	
[0314]	115 120 125	
[0315]	Asp Val Val Leu Arg Gln Ala Arg Glu Leu Gln Arg Gln Leu Ala Gln	
[0316]	130 135 140	
[0317]	Glu Leu Val Asn Arg Gly Tyr Cys Ser Arg Ser Gly Ala Ser Glu Ala	

[0318]	145	150	155	160
[0319]	Ser Ala Ala Gln Cys Arg Cys Arg Leu Gln Glu Val Leu Ala Leu Leu			
[0320]		165	170	175
[0321]	Arg Trp Glu Thr Asp Gly Glu Gln Ala Ala Arg Ile Arg His Leu Gln			
[0322]		180	185	190
[0323]	Ala Ala Leu Asp Val Glu Arg Gln Leu Phe Leu Lys Tyr Ile Leu Glu			
[0324]		195	200	205
[0325]	His Phe Arg Trp Gln Pro Ala Leu Pro Gly Pro Ala Asp Pro Gln Ala			
[0326]		210	215	220
[0327]	Thr His Ser Leu Glu Glu Pro Pro Leu Glu Ala Gln Ser Asn Thr Gly			
[0328]		225	230	235
[0329]	Gly Thr Pro Lys Pro Ala Arg Arg Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn			
[0330]		245	250	255
[0331]	Thr Gly Val Arg Val His Ser Pro Asn Asp Leu Leu Pro Thr Arg Ala			
[0332]		260	265	270
[0333]	Gly Ser Leu Glu Ser Leu Ala Thr Ala His Ser Cys Ser Leu Asp Asn			
[0334]		275	280	285
[0335]	Thr Leu Asn Cys Ser Gln Ala Ser Glu Ser Glu Val Arg Ala Pro Ala			
[0336]		290	295	300
[0337]	Thr Ser Ala Ser Ile Pro Asp Thr Ser Ser Pro Gln Pro Pro Pro Gln			
[0338]		305	310	315
[0339]	Leu Pro Ser Ile His Arg Lys Pro Asn Asp Leu Gln Lys Glu Ser Ser			
[0340]		325	330	335
[0341]	Glu Asn Lys Pro Cys Glu Ala Ser Thr Ser Ser Pro Pro Gly Leu Asp			
[0342]		340	345	350
[0343]	Tyr Gln Glu Leu Val Arg Gln Asn Ser Glu Leu Ala Glu Ala Leu Gln			
[0344]		355	360	365
[0345]	Val Leu Val Arg Arg Cys Cys Asp Leu Arg Glu Glu Asn Leu His Leu			
[0346]		370	375	380
[0347]	Arg Arg Lys Gly Phe Ser Glu Glu Ala Gly Glu Lys Val Lys Trp Leu			
[0348]		385	390	395
[0349]	Lys Val Lys His Ala Glu Leu Thr Asp Leu Ala Gln Arg Leu Glu Asp			
[0350]		405	410	415
[0351]	Arg Ala Arg Lys Leu Gln Glu Thr Asn Leu Arg Ala Met Ser Ala Pro			
[0352]		420	425	430
[0353]	Val Pro Gly Glu Ser Leu Glu Gly Leu Asp Leu Ser Gln Val Phe Thr			
[0354]		435	440	445
[0355]	Cys Gln Arg Ala Gln Asp Leu Ser Glu Gln Ala Gly Ala Leu Gln Ala			
[0356]		450	455	460

[0357] Lys Asp Leu Gln Ile Glu Ala Leu Arg Arg Glu Cys His Leu Leu Gln
 [0358] 465 470 475 480
 [0359] Ala Arg Ile Ala Ala Asp Leu Gly Ser Ser Ser His Pro Glu Glu Gly
 [0360] 485 490 495
 [0361] Ala Thr Cys Ala Gln Trp Cys Asn Ile Ser Asp Leu Asp Arg Leu Gln
 [0362] 500 505 510
 [0363] Arg Glu Ser Gln Arg Glu Val Leu Arg Leu Gln Arg Gln Leu Thr Leu
 [0364] 515 520 525
 [0365] His Gln Ser Lys Ala Gly Ala Trp Ala Asp Ala Gly Arg Pro Ser Thr
 [0366] 530 535 540
 [0367] Pro Ser Glu Ile Thr Arg His Gln Val Gln Ala Leu Glu Arg Glu Leu
 [0368] 545 550 555 560
 [0369] Gly Leu Gln Arg Arg Glu Cys Glu Glu Leu Ser Val Gln Ala Ala Ala
 [0370] 565 570 575
 [0371] Ala Glu Arg Arg Tyr Glu Glu Thr Glu Ala Gln Leu Gln Ala Ala Leu
 [0372] 580 585 590
 [0373] His Lys Gly Ala Arg Leu Ser Glu Glu Asn Ala Arg Leu Gln Ala Leu
 [0374] 595 600 605
 [0375] Ala Asn Trp Met Lys Lys Met Ala Asp Glu Asn Ser Asn Val Ser Arg
 [0376] 610 615 620
 [0377] Gln Gln Ser His Thr Arg Gln Arg Gln Glu Leu Glu Ala Thr Ser Leu
 [0378] 625 630 635 640
 [0379] Leu Ala Glu Gln Leu Leu Gln Gln Glu Gly Tyr Ala Gln Asp Arg Arg
 [0380] 645 650 655
 [0381] Gln Gln Leu Gln His Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Ser Asp Leu Arg Thr
 [0382] 660 665 670
 [0383] Ser Gly Lys Glu Met Gln Gly Leu Gln Phe Gln Pro Gly His Pro Ser
 [0384] 675 680 685
 [0385] Glu Thr Ser Glu Thr Thr Gln Ala Ser Glu Ser Gln Ala Arg Asp Ser
 [0386] 690 695 700
 [0387] Gly Arg Pro Thr Phe Lys Thr Lys Ser Glu Glu Arg Val Leu Pro Leu
 [0388] 705 710 715 720
 [0389] Pro Thr Arg Asp Ile Gln Pro Pro Ala Cys Leu Ser Gln Gln Glu Asn
 [0390] 725 730 735
 [0391] Pro Val Ile Val Glu Glu Pro Ala Ala Gly Pro Gln Val Ser Asp Arg
 [0392] 740 745 750
 [0393] Asn Ser Thr Ser Gln Ser Leu Asp Ser Lys Pro Gln Ala Lys Lys Thr
 [0394] 755 760 765
 [0395] Ser Ser Gln Ser Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Ser Met Trp Ala Thr

[0396]	770	775	780
[0397]	Val Pro Ser Cys Leu Ser Leu Asp Met Asp Thr Ala Ser Glu Val Asp		
[0398]	785	790	795
[0399]	Asp Leu Glu Pro Asp Ser Met Ser Thr Pro Leu Glu Met Arg Ser Leu		
[0400]	805	810	815
[0401]	Glu Ala Pro Ile Ile Pro Lys Leu Lys Leu Phe Leu Ala Arg Ser Ser		
[0402]	820	825	830
[0403]	Tyr Asn Pro Phe Glu Gly Pro Ser Glu His Cys Gln Gly Lys Leu Pro		
[0404]	835	840	845
[0405]	Leu Thr Ala Gly Asp Tyr Val Tyr Val Phe Gly Asp Met Asp Glu Asp		
[0406]	850	855	860
[0407]	Gly Phe Tyr Glu Gly Glu Leu Val Asn Gly Gln Arg Gly Leu Val Pro		
[0408]	865	870	875
[0409]	Ser Asn Leu Val Glu Pro Ile Ser Gly Ser Pro Ile Leu Asn His Leu		
[0410]	885	890	895
[0411]	Phe Leu Lys Ser Pro Asp Ile Gly Pro Thr Ala Leu Pro Ala Gly His		
[0412]	900	905	910
[0413]	Ser Lys Val Leu Lys Lys Gly Ser Leu Leu Leu Gly Glu Val Gln Glu		
[0414]	915	920	925
[0415]	Arg Gly Leu Cys Gln Val Gly Arg Val Asp Ser Lys Thr Asp Met Ala		
[0416]	930	935	940
[0417]	Ala Glu Ser Leu Lys Thr Lys Thr Glu Ala Cys Trp Leu Gly Leu Lys		
[0418]	945	950	955
[0419]	Ser Ser Leu Glu Glu Gln Ser Phe Ser Arg Pro Leu Leu Glu Ala Lys		
[0420]	965	970	975
[0421]	Gly Ala Phe Cys Leu Ala Pro Met Glu Leu Gln Leu Gln Asn Val Thr		
[0422]	980	985	990
[0423]	Ala Thr Ser Ala Thr Ile Thr Trp Ala Ser Gly Ser Asn Arg Tyr Pro		
[0424]	995	1000	1005
[0425]	His Val Val Tyr Leu Asp Asp Glu Glu His Ile Leu Thr Pro Ser		
[0426]	1010	1015	1020
[0427]	Gly Val Asn His Tyr Thr Phe Gln Gly Leu His Pro Gly Thr Cys		
[0428]	1025	1030	1035
[0429]	Tyr Arg Val Arg Val Gly Val Gln Leu Pro Arg Asp Leu Leu Gln		
[0430]	1040	1045	1050
[0431]	Val Leu Trp Glu Thr Thr Ser Ser Thr Leu Thr Phe Asp Thr Pro		
[0432]	1055	1060	1065
[0433]	Leu Ala Gly Pro Pro Asp Pro Pro Leu Asp Val Leu Val Glu His		
[0434]	1070	1075	1080

[0435]	His	Ala	Ser	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Val	Ser	Trp	Leu	Pro	Val	Thr
[0436]		1085					1090					1095			
[0437]	Ile	Asp	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Asn	Gly	Val	Gln	Val	Thr	Gly	Tyr
[0438]		1100					1105					1110			
[0439]	Ala	Val	Tyr	Val	Asp	Gly	Phe	Lys	Val	Thr	Glu	Val	Ala	Asp	Ala
[0440]		1115					1120					1125			
[0441]	Thr	Ala	Gly	Asn	Thr	Leu	Leu	Glu	Phe	Ser	Gln	Leu	Gln	Val	Pro
[0442]		1130					1135					1140			
[0443]	Leu	Ser	Cys	Gln	Lys	Val	Ser	Val	Arg	Thr	Met	Ser	Leu	Tyr	Gly
[0444]		1145					1150					1155			
[0445]	Glu	Ser	Leu	Asp	Ser	Val	Pro	Ala	Gln	Ile	Pro	Glu	Asp	Phe	Phe
[0446]		1160					1165					1170			
[0447]	Ser	Cys	Cys	Pro	Phe	Leu	Gly	Ala	Pro	Pro	Phe	Asn	Tyr	Thr	Asp
[0448]		1175					1180					1185			
[0449]	Gly	Asn	Pro	Phe	Pro	Val	Cys	His	Gln	Lys	Leu	Val	Gln	Ala	Ser
[0450]		1190					1195					1200			
[0451]	Leu	Gly	Ala	Lys	Ser	Ser	Pro	Arg	Gly	Pro	Gly	Asn	Cys	Gly	Glu
[0452]		1205					1210					1215			
[0453]	Pro	Gln	Ala	Lys	Phe	Leu	Glu	Ala	Phe	Pro	Glu	Glu	His	Pro	Arg
[0454]		1220					1225					1230			
[0455]	Lys	His	Leu	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Asp	Gly	Thr	Asn	Ser
[0456]		1235					1240					1245			
[0457]	Gln	Ala	Gln	Gly	Pro	Thr	Glu	Ala	Trp	Lys	Gly	Tyr	Glu	Lys	Asp
[0458]		1250					1255					1260			
[0459]	Leu	Ser	Phe	Gln	Lys	Ser	Pro	Gln	Asn	His	Lys	Pro	Pro	Leu	Leu
[0460]		1265					1270					1275			
[0461]	Phe	Gly	Gln	Ser	Gly	Val	Glu	Glu	Gly	His	Ala	Pro	His	Ile	Cys
[0462]		1280					1285					1290			
[0463]	Ile	Ser	Gly	Ser	Pro	Ala	Pro	Gly	Phe	Val	His	Leu	Ser	Ser	Glu
[0464]		1295					1300					1305			
[0465]	Ile	Gly	His	Gly	Lys	Ile	Arg	Cys	Trp	Glu	Lys	Pro	Gly	Leu	Glu
[0466]		1310					1315					1320			
[0467]	Lys	Ala	Leu	Leu	Gln	Asn	Gln	Tyr	Ala	Pro	Met	Val	Pro	Pro	His
[0468]		1325					1330					1335			
[0469]	Gln	Gln	Gly	Ser	Ser	Gln	Cys	Gln	Pro	Ala	Asp	Phe	His	His	Val
[0470]		1340					1345					1350			
[0471]	Phe	Glu	Glu	Lys	Glu	Ala	Leu	Cys	Leu	Asp	Ser	Gln	Gly	Thr	Glu
[0472]		1355					1360					1365			
[0473]	Lys	Pro	Glu	Gln	Arg	Lys	Asn	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Gln	Arg	Gln

[0474]	1370	1375	1380
[0475]	Gly Thr Pro Gly Ser Lys Arg	Glu Cys Ser Val Leu	Cys Pro Ala
[0476]	1385	1390	1395
[0477]	Pro Thr Asn Lys Val Ile Lys	Met Thr Ser Gly Ser	Pro Asp Gln
[0478]	1400	1405	1410
[0479]	Leu Glu Thr Asp Ala Asn Asn	Pro Val Arg Val Phe	Leu Ala Leu
[0480]	1415	1420	1425
[0481]	Phe Asp His Ser Pro Leu Val	Ile Ser Val Asn Ser	Glu Ala Ala
[0482]	1430	1435	1440
[0483]	Glu Glu Glu Leu Ala Phe Gln	Lys Gly Gln Leu Leu	Arg Val Trp
[0484]	1445	1450	1455
[0485]	Gly Ser Leu Asp Leu His Gly	Phe Tyr His Gly Glu	Cys Asn Gly
[0486]	1460	1465	1470
[0487]	His Leu Gly Lys Ile Pro Gly	His Leu Val Val Glu	Val Glu Val
[0488]	1475	1480	1485
[0489]	Gly Thr Gln Gln Thr Asp Gly	Arg Trp His Leu Pro	Ala Gln Gly
[0490]	1490	1495	1500
[0491]	His Leu Leu Ser Glu Thr Gln	Arg Glu Asp Leu Glu	Gly Leu Thr
[0492]	1505	1510	1515
[0493]	Asn Ser Gln Gly Ser Tyr Met	Pro Gln Gly Asn Ser	Arg Thr Pro
[0494]	1520	1525	1530
[0495]	Thr Leu Trp Thr Pro Lys Thr	Met Val Ala Ala Leu	Asp Tyr Asp
[0496]	1535	1540	1545
[0497]	Pro Arg Asp Gly Arg Ala Gly	Val Gln Ala Lys Gly	Lys Leu Val
[0498]	1550	1555	1560
[0499]	Leu Arg Ala Gly Asp Val Val	Thr Val Tyr Gly Pro	Val Asp Asp
[0500]	1565	1570	1575
[0501]	Lys Gly Phe Tyr Tyr Gly Glu	Tyr Gly Gly His Arg	Gly Leu Val
[0502]	1580	1585	1590
[0503]	Pro Ala His Leu Leu Asp Asp	Leu Pro Val His Gly	Glu
[0504]	1595	1600	1605
[0505]	<210>3		
[0506]	<211>26		
[0507]	<212>DNA		
[0508]	<213>引物		
[0509]	<400>3		
[0510]	gaatatttcg ggagttaaag catggc		
[0511]	<210>4		
[0512]	<211>26		

[0513]	<212>DNA	
[0514]	<213> 引物	
[0515]	<400>4	
[0516]	cttacaaagc atcatgggaa caccag	26
[0517]	<210>5	
[0518]	<211>23	
[0519]	<212>DNA	
[0520]	<213> 引物	
[0521]	<400>5	
[0522]	atctttggca acagcacatt cct	23
[0523]	<210>6	
[0524]	<211>23	
[0525]	<212>DNA	
[0526]	<213> 引物	
[0527]	<400>6	
[0528]	ctgcttgccg aatatcatgg tgg	23
[0529]	<210>7	
[0530]	<211>23	
[0531]	<212>DNA	
[0532]	<213> 引物	
[0533]	<400>7	
[0534]	tttcttggct tgcggtttgg agt	23

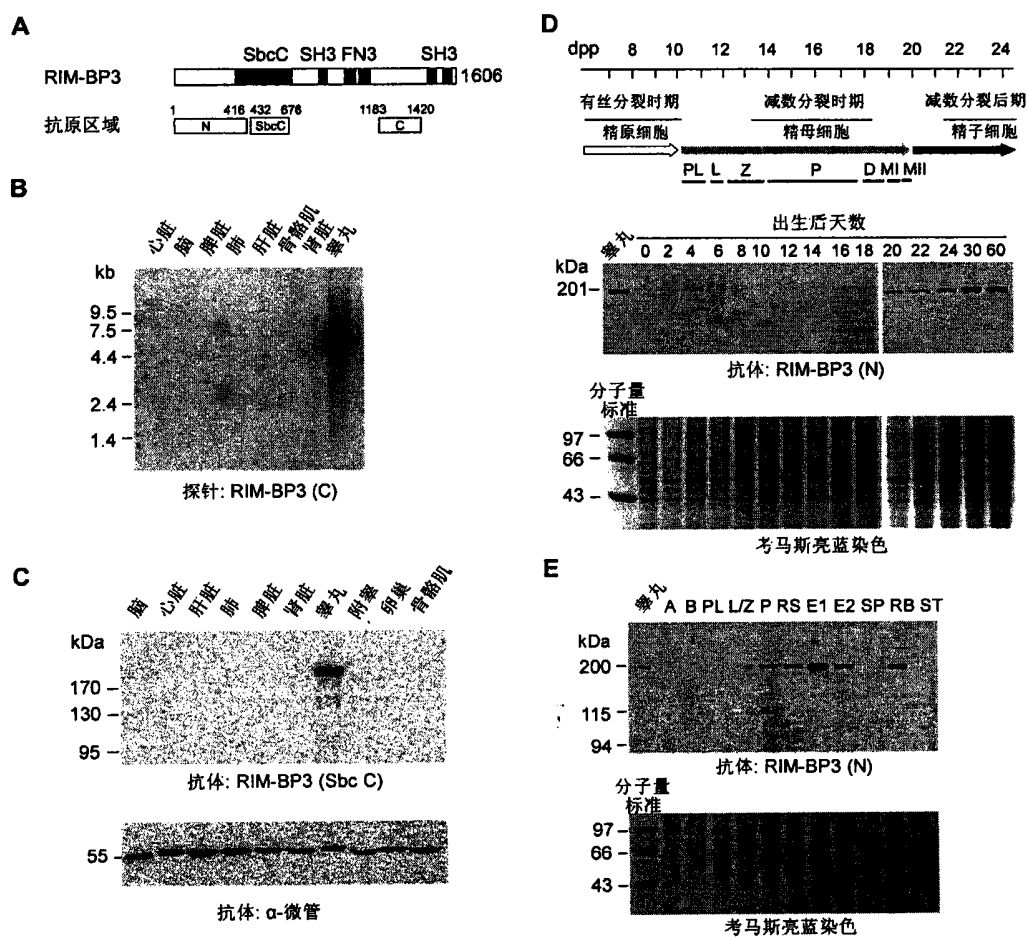


图 1

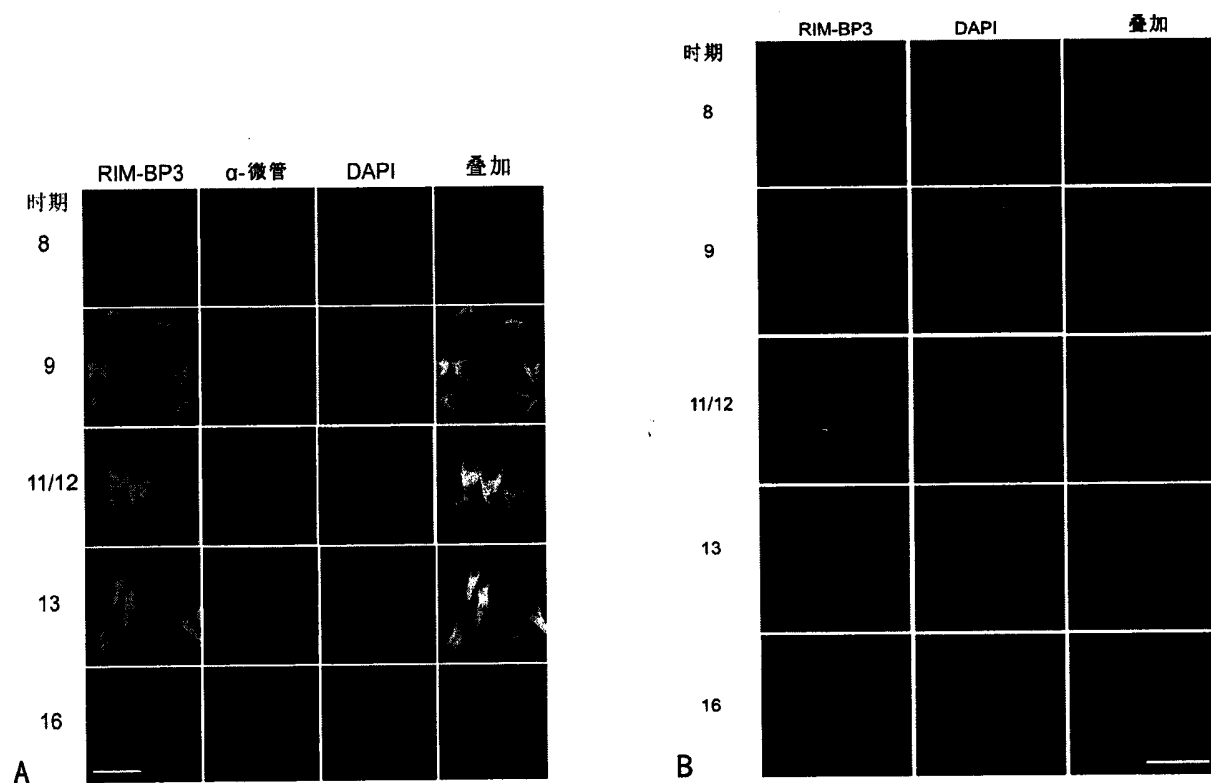


图 2

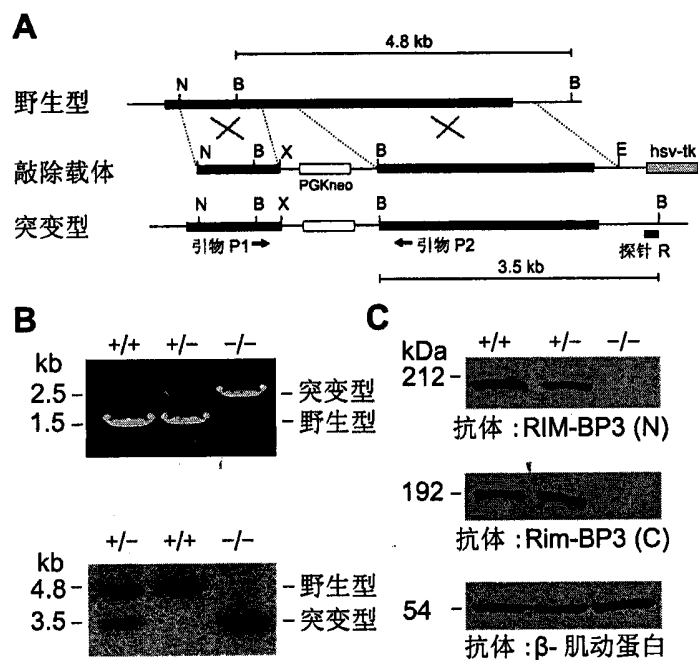


图 3

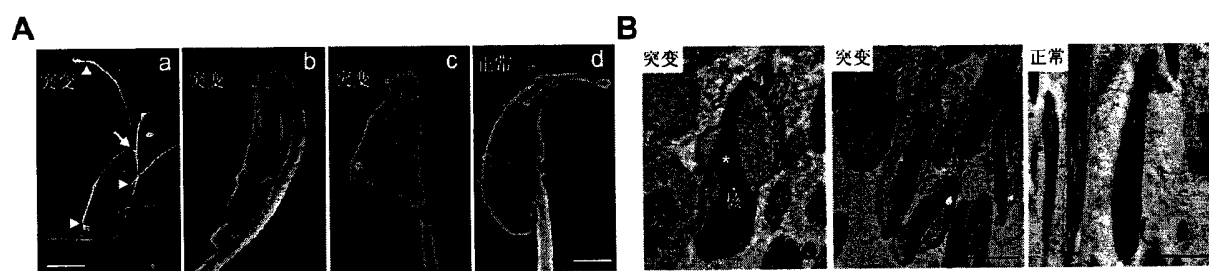


图 4

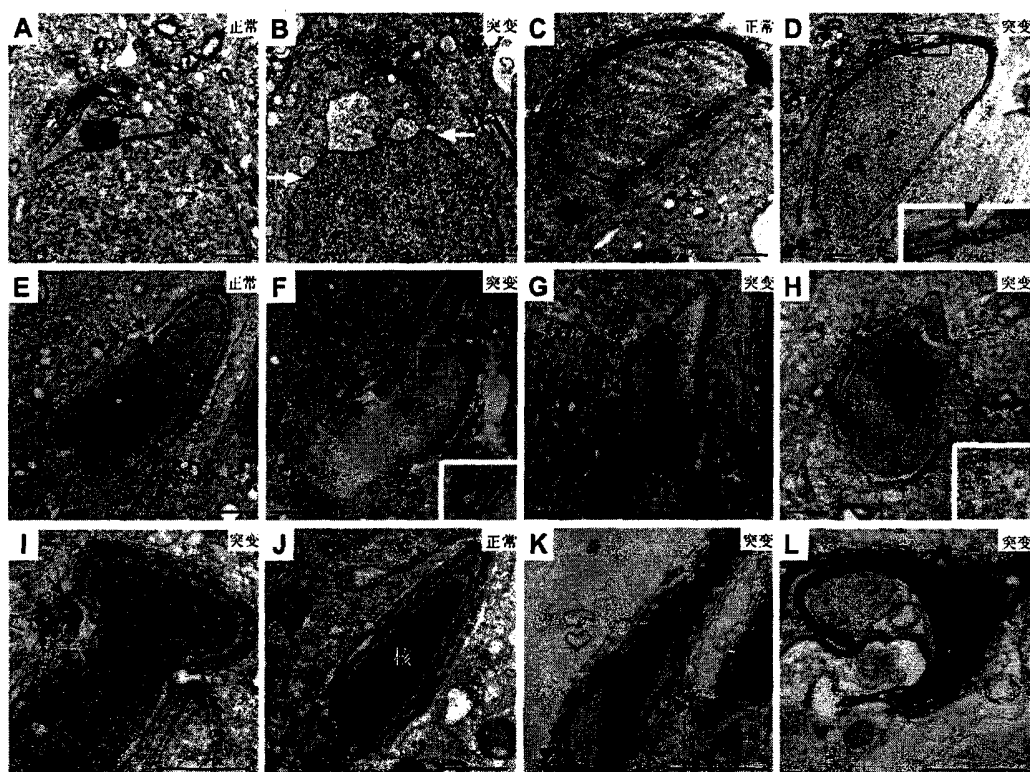


图 5

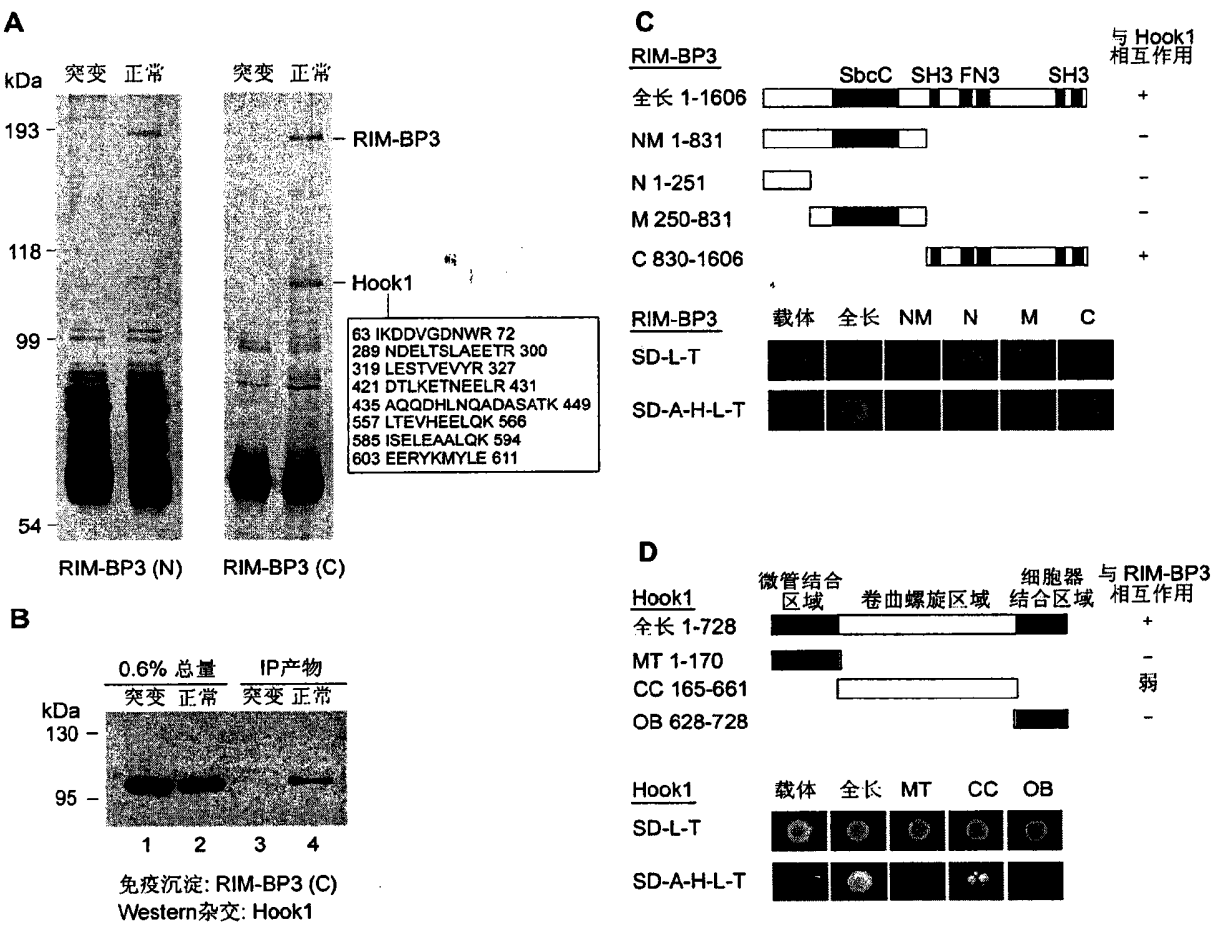


图 6

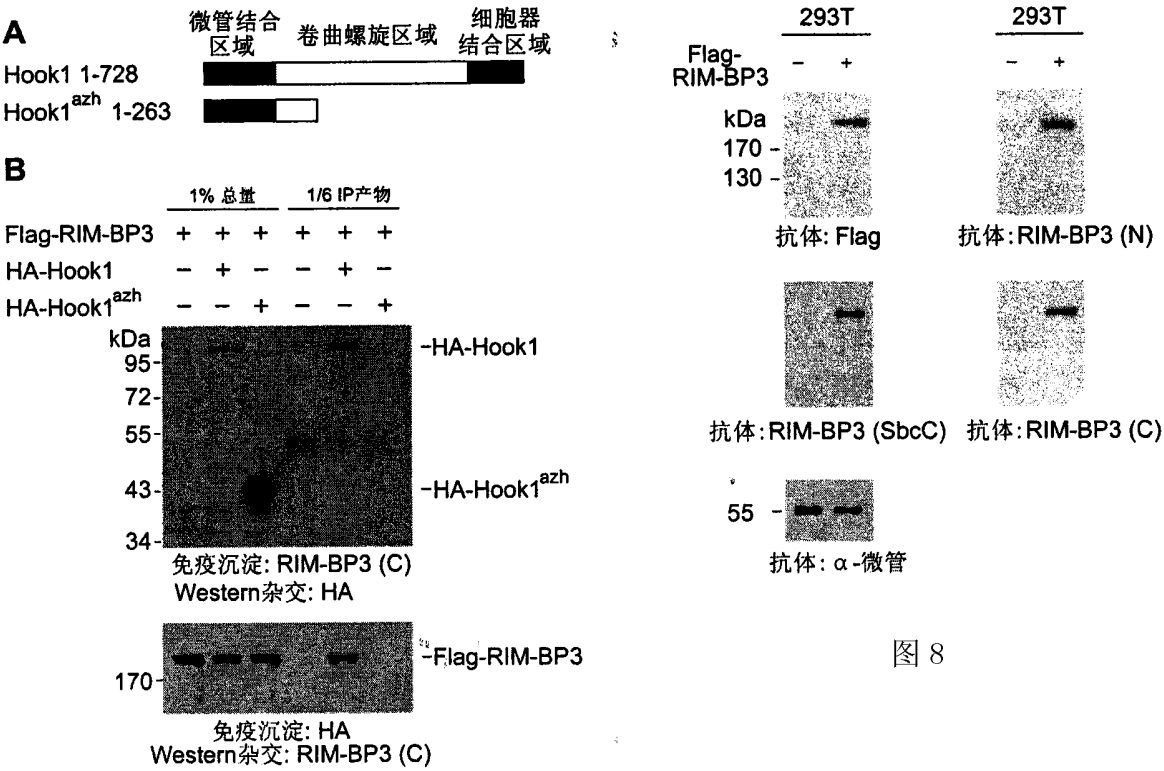


图 7

图 8

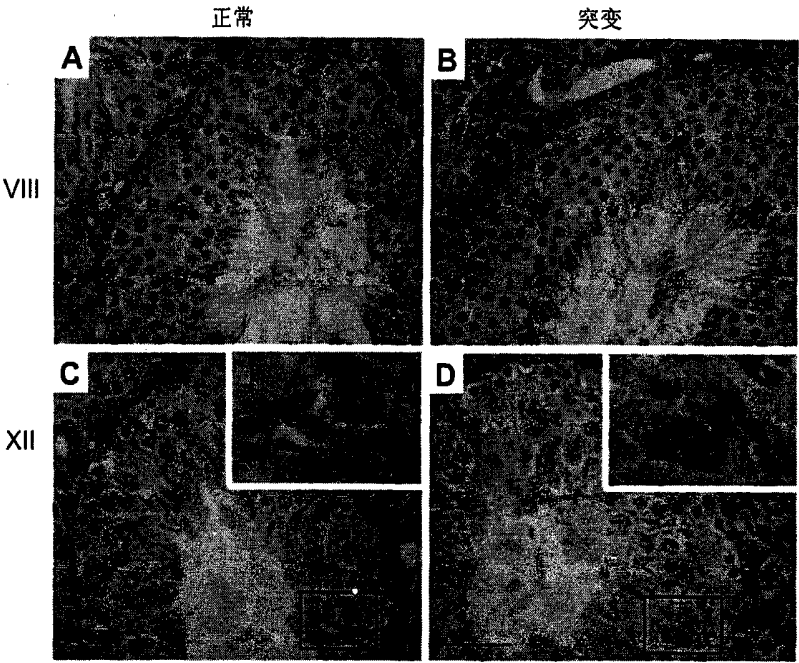


图 9

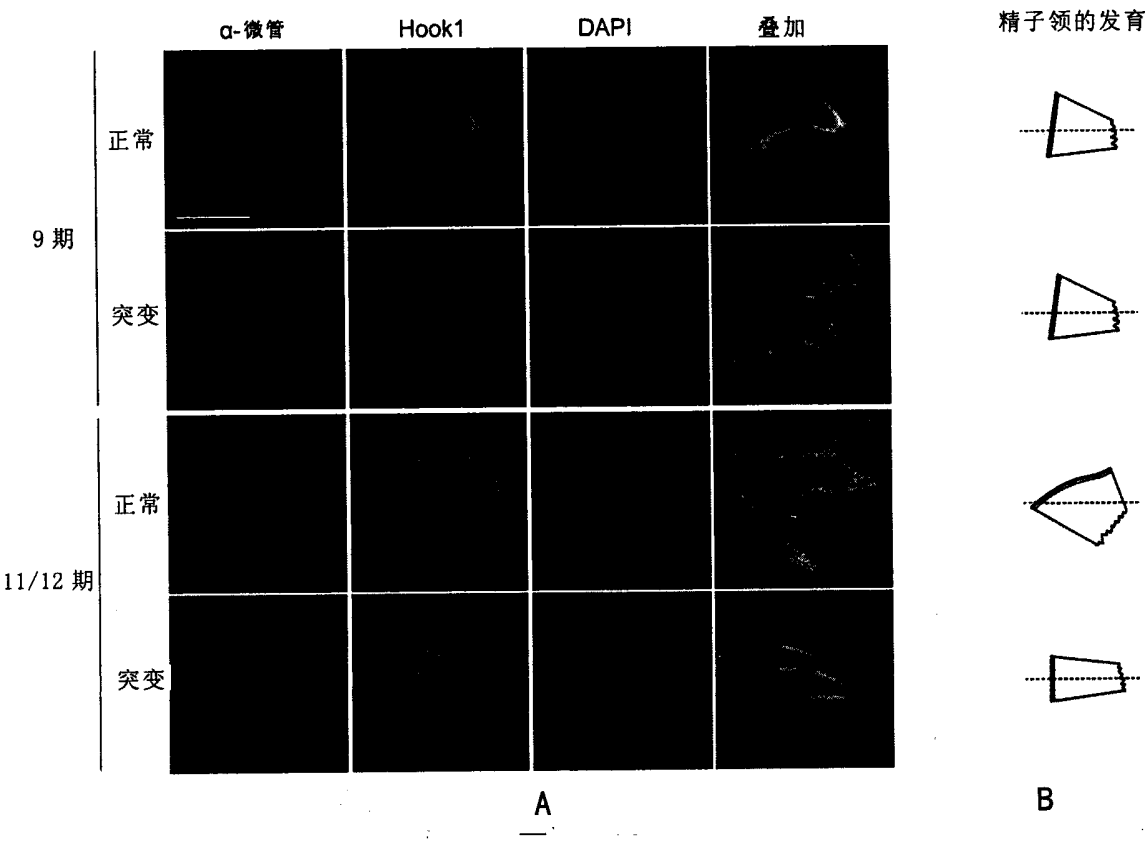


图 10