

EFFECTO DEL DETERGENTE UTILIZADO EN LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE DE CONEJO SOBRE EL PROTEOMA RESULTANTE

Casares-Crespo, L., Fernández-Serrano, P., y Viudes-de-Castro, M.P.
CITA-IVIA. Polígono de la Esperanza, nº 100. 12400. Segorbe (Castellón).
casares_luc@gva.es

INTRODUCCIÓN

Nuevos avances en proteómica están provocando un gran impacto en nuestro entendimiento sobre cómo el espermatozoide adquiere su capacidad fecundante (Aitken & Baker, 2007). Los espermatozoides son células excepcionalmente diferenciadas y muestran grandes variaciones en su estructura genética, celular y cromática, lo cual les permite controlar la fertilidad/infertilidad, el desarrollo embrionario y la herencia (Rahman et al., 2013). Los espermatozoides son células que se utilizan como modelo para el análisis proteómico ya que pueden ser purificados en gran número e inducidos a diferentes estados funcionales (no capacitados, capacitados y acrosoma reaccionado) utilizando una serie de manipulaciones farmacológicas validadas (Aitken & Baker, 2007).

La extracción de las proteínas de membrana de los espermatozoides es la primera etapa crítica en el estudio de su proteoma, y habitualmente se lleva a cabo mediante un tampón de lisis que contiene un detergente, seguido de sonicación. Los detergentes más utilizados son el Tritón X-100 (Rajeev & Reddy, 2004; D'Amours et al., 2010; Dietrich et al., 2016), el tampón RIPA (Puri et al., 2008; Scott et al., 2015), la urea (Rajeev & Reddy, 2004; Scott et al., 2015), el dodecilsulfato sódico o SDS (Rajeev & Reddy, 2004; Cheema & Babbar, 2008) y el Tween-20 (Rajeev & Reddy, 2004).

Atendiendo a la bibliografía, no existe ningún trabajo previo en el que se estudie el mejor método de extracción de las proteínas de membrana de los espermatozoides de conejo. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue comparar la utilización de cinco detergentes (SDS, Tritón X-100, Tween-20, tampón RIPA y urea) en la extracción de las proteínas de membrana del espermatozoide de conejo y estudiar su efecto sobre la cantidad total de proteína obtenida, así como sobre el proteoma resultante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 9 machos pertenecientes a la línea R de aptitud cárnica. Los machos fueron alojados en la granja experimental del Centro de Investigación y Tecnología Animal de Segorbe (CITA-IVIA, Castellón, España). Las muestras seminales se recuperaron semanalmente a lo largo del mes de noviembre de 2016 mediante vagina artificial. Los eyaculados fueron evaluados individualmente, tomándose una alícuota para evaluar la motilidad, el estado del acrosoma y las formas anormales presentes. Sólo aquellos eyaculados con valores superiores al 70% de motilidad y con menos del 15% de formas anormales o acrosomas dañados, fueron utilizados para constituir la mezcla heterospermica. En total, se usaron 3 mezclas heterospermicas de semanas distintas, que resultaron en un total de 15 muestras (3 por cada detergente). Se midió el volumen total de la mezcla heterospermica y se dividió en cinco fracciones iguales (una para cada detergente). Los espermatozoides se obtuvieron centrifugando a 10500 rpm durante 10 minutos a 22°C. El pellet resultante se resuspendió con 500 µl de PBS frío y se volvió a centrifugar a 3600 rpm durante 10 minutos, repitiéndose esta etapa en las mismas condiciones. Finalmente, el pellet de esta tercera centrifugación fue resuspendido con 500 µl de PBS frío y se le añadieron 5 µl de un cóctel de inhibidores de proteasas y fue almacenado a -80°C hasta su uso. Las soluciones con los distintos detergentes a utilizar fueron preparadas en tampón Tris-cítrico-glucosa (pH 6.8–7.0, 300 mOsmkg⁻¹) a la siguiente concentración: 1% SDS, 1% Tritón X-100, 0,1% Tween-20 y 8 M urea. El tampón RIPA empleado fue el medio comercial RIPA Buffer de Thermo Scientific. A todas las soluciones se les añadió un 1% v/v de cóctel de antiproteasas. Las muestras fueron descongeladas y centrifugadas de nuevo a 3600 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La extracción de las proteínas de membrana se llevo a cabo resuspendiendo el pellet resultante con 500 µl de cada una de las cinco soluciones y

sometiendo las muestras a 6 ciclos de 5 segundos de sonicación (amplitud del 30%) en hielo. Posteriormente, las muestras se dejaron 15 minutos en hielo y fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue almacenado a -80°C hasta su uso. La concentración proteica total de las muestras espermáticas se cuantificó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA), utilizando BSA como patrón de proteínas (Smith et al., 1985). Sin ajustar la concentración proteica se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (4-12%). Brevemente, las muestras fueron diluidas 1:1 con Tampón Laemmli 2x (Sigma-Aldrich), calentadas a 95°C durante 5 minutos y tras dejarlas enfriar se cargaron en el gel. El peso molecular fue estimado utilizando el marcador de pesos Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad). Las condiciones del SDS-PAGE fueron 250 voltios durante 3 horas. Tras completarse la electroforesis, las bandas proteicas del gel fueron visualizadas mediante la tinción con Azul de Coomassie Colloidal. El perfil proteico resultante fue analizado con el software Quantity One 1-D (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Las diferencias de concentración proteica total y de cantidad relativa de cada banda proteica en función del detergente utilizado fueron analizadas mediante un test de varianza con el paquete estadístico Statgraphics®Plus5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA). Los datos se presentan como medias mínimo cuadráticas \pm error estándar de la media.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad de proteína extraída del espermatozoide de conejo fue significativamente diferente en función del detergente empleado en la solución de lisis ($P < 0,01$). Los resultados muestran que las soluciones de SDS y urea son las que más cantidad de proteína lograron extraer, frente al resto de soluciones con las que se obtuvo la mitad e incluso menos proteína total (Tabla 1). Por otro lado, el perfil electroforético del espermatozoide de conejo resultó en múltiples bandas de distinta intensidad que oscilaron entre los 13 y los 343 kDa. En todos los detergentes se obtuvieron las mismas bandas proteicas en el gel, no se observó ninguna ausencia de banda. Para llevar a cabo el análisis con el software Quantity One 1-D se seleccionaron catorce bandas comunes en todas las muestras. En la Tabla 2 se muestran los resultados de la cantidad relativa de las bandas proteicas que resultaron significativamente distintas en función del detergente empleado ($P < 0,05$). La cantidad relativa de seis bandas proteicas resultó estadísticamente significativa entre los cinco detergentes utilizados. En dos de ellas (160 y 52 kDa), la intensidad de banda fue superior en los detergentes con SDS y urea frente al resto. Con la solución de urea se obtuvieron dos bandas proteicas con mayor cantidad relativa (90 y 49 kDa) y con la de SDS una banda con mayor intensidad (122kDa) frente al resto de detergentes. Mientras que los detergentes Tween-20, Tritón X-100 y el tampón RIPA obtuvieron mayor cantidad proteica relativa en la banda proteica de 32 kDa. Por ello, en general, con las soluciones de SDS y urea se obtuvo una mayor cantidad relativa de las bandas proteicas, lo cual concuerda con la mayor concentración de proteína total cuantificada en estos medios.

De la bibliografía se extrae que cada especie animal se comporta de forma diferente y algunos detergentes logran extraer más proteínas de membrana del espermatozoide que otros probablemente debido a su composición. En el caso del esperma de bovino, entre todos los detergentes probados, con el tampón RIPA se obtuvo más proteína y un mayor número de bandas en el gel 1D (Scott et al., 2015). En el caso del conejo, a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que para lograr extraer una mayor cantidad proteica de la membrana del espermatozoide, las soluciones de elección serían la de 1% SDS o la de 8 M de urea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken & Baker, 2007. *International Journal of Andrology* 31, 295-302.
- Cheema & Babbar, 2008. *Indian J.Anim.Res.* 42(4), 242-247.
- D'Amours et al., 2010. *Reproduction* 139, 545-556.
- Dietrich et al., 2016. *Journal of Proteomics* 138, 124-135.
- Puri et al., 2008. *Biology of Reproduction* 79, 1183-1191.
- Rahman et al., 2013. *International Journal of Endocrinology*,

Article ID 360986, 11 pages. • Rajeev & Reddy, 2004. Human Reproduction 19(2), 234-242. • Scott et al., 2015. 5th International Conference on Proteomics & Bioinformatics – September 1-3, 2015. Valencia, Spain. 8:8. • Smith et al., 1985. Anal. Biochem. 150:76-85.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto RTA2013-00058-00-00 del INIA. L. Casares-Crespo ha sido financiada por una beca de formación del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y el Fondo Social Europeo.

Tabla 1. Concentración proteica media de las muestras de espermatozoides en función del detergente empleado para su extracción.

Detergente	Proteína total (µg/µL)
1% SDS	2,11 ± 0,20 ^b
1% Tritón X-100	1,02 ± 0,20 ^a
0'1% Tween-20	0,71 ± 0,20 ^a
Tampón RIPA	1,16 ± 0,20 ^a
8M UREA	2,22 ± 0,20 ^b

^{a,b}: valores con distinto superíndice en la misma columna difieren significativamente al 99% (P<0,01).

Tabla 2. Cantidad o intensidad relativa (%) de las bandas diferentes significativamente del perfil proteico del espermatozoide de conejo en función del detergente empleado para su extracción.

Tamaño Banda (kDa)	Detergente					E.E.
	1% SDS	1% Tritón X-100	0'1% Tween-20	Tampón RIPA	8M UREA	
160	0,61 ^c	0,12 ^{ab}	0,07 ^a	0,27 ^b	0,56 ^c	±0,05
122	1,88 ^b	0,39 ^a	0,35 ^a	0,65 ^a	0,85 ^a	±0,20
90	25,06 ^c	19,09 ^{bc}	18,37 ^b	8,01 ^a	32,65 ^d	±1,20
52	0,46 ^b	0,07 ^a	0,07 ^a	0,06 ^a	0,48 ^b	±0,11
49	0,30 ^a	0,07 ^a	0,21 ^a	0,13 ^a	0,62 ^b	±0,09
32	0,90 ^a	2,70 ^b	2,18 ^b	2,70 ^b	0,91 ^a	±0,18

E.E: error estándar; ^{a,b,c,d}: valores con distinto superíndice en la misma fila difieren significativamente al 95% (P<0,05).

EFFECT OF THE DETERGENT USED ON THE RESULTANT PROTEOME IN THE RABBIT SPERMATOOA MEMBRANE PROTEINS EXTRACTION

ABSTRACT: New advances in proteomics are having a major impact on our understanding of how the spermatozoa acquire their capacity for fertilization. To our knowledge, sperm proteins in rabbits have not yet been studied. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of the extraction method on sperm protein concentration and proteome profile. Five different detergents were used to extract sperm proteins of rabbit males belonging to genetic line R. Results showed that the lysis buffers containing 1% SDS and 8 M urea were the best buffers to recover sperm rabbit proteins. Both the protein concentration obtained and the relative quantity of five protein bands were higher (P<0.05) in these two buffers compared to the others (1% Triton X-100, 0.1% Tween-20 and RIPA Buffer). From this study, it can be concluded that the solutions of 1% SDS and 8 M urea are the ones of choice in order to extract sperm rabbit proteins.

Keywords: sperm, proteome, extraction method, rabbit.