文章编号:1000-1638(2026)05-0461-10 DOI:10.13484/j.nmgdxxbzk.20260502

基于蛋白质谱筛选牛X、Y精子差异表达蛋白*

王德政,狄安琪,宋丽爽,刘雪霏,白春玲,苏广华,李光鹏,杨 磊
(内蒙古大学生命科学学院省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室,呼和浩特 010070)

摘要:采用蛋白质组学技术,解析流式细胞仪分选得到的鲁西牛X、Y精子生物学差异并筛选性别特异性蛋白。以鲁西牛鲜精为样本,经流式分选获得高纯度X、Y精子后,分析细胞膜差异表达蛋白,共鉴定出3020种有定量信息的蛋白。其中X精子组112种蛋白表达显著上调,Y精子组95种蛋白表达显著上调。差异蛋白主要富集于氨基酸代谢和能量代谢通路,直接影响精子运动能力。本研究为阐明X、Y精子生物学差异机制提供依据,也为开发新型性别控制技术筛选出潜在靶点蛋白。

关键词:牛;X、Y精子;蛋白质谱;蛋白质组学
中图分类号:Q95-336 **文献标志码**:A

性别控制技术在畜牧业、生物育种领域意义重大,可显著提升家畜生产效率、优化遗传资源配置,并推动相关领域研究进展。在奶牛养殖中,通过该技术精准繁育母牛,既能提高牛奶产量,又可避免因雄性犊牛养殖产生的额外成本;在肉牛产业中,定向生产雄性后代可充分发挥其生长速度快、肉质优良的性别优势,实现养殖效益与牛肉品质的双重提升[1]。

目前主流的性别控制技术是通过特异性富集携带X染色体的X精子或携带Y染色体的Y精子,在受精前分离精子,使目标性别精子在精液中所占比例明显增加,从而达到精准调控后代性别的目的[2-3]。近年来,为了将X、Y精子分离,开发出了离心法、电泳法、免疫学分离等方法[4-8]。然而,这些方法普遍效果欠佳且存在稳定性差的问题,难以满足实际生产需求。此外,研究者利用CRISPR-Cas9基因编辑系统对精子进行改造,实现X、Y精子的分离[9-10]。目前,流式细胞仪分选技术较为成熟,其中Hoechst 33342是一种常用的核酸荧光染色剂,能够通过与细胞或精子中的DNA特异性结合,实现对细胞核的荧光标记[11],在奶牛、奶山羊、猪、马的生产中应用较多,分选准确率达90%以上,但是,流式细胞仪分选速度慢、分选时间长,难以保证精子活力,且会对精子造成不可逆的损伤[12-13]。

X、Y精子免疫学分离技术的核心在于挖掘两类精子的本质差异,其基因表达的特异性差异会导致X精子与Y精子的表型出现分化,从而为精准分离提供依据。现有研究通过对X、Y精子表面特异性抗原的识别,利用免疫学方法达到目标精子的靶向富集,实现高纯度性控精液的制备[4],通过将H-Y抗体与存在于Y精子质膜上的H-Y型抗原结合,根据抗原抗体反应对家畜的X精子和Y精子进行分离[5],再将得到的X精子或Y精子经体外受精或人工授精后,获得特定性别的子代。另外,有研究使

* **收稿日期**:2025-09-22;**修回日期**:2025-12-11
基金项目:内蒙古自治区青年科技英才支持项目(NJYT23138);内蒙古自治区自然科学基金项目(2023MS03004);内蒙古自治区科技重大专项(2021ZD0009);内蒙古自治区科技计划项目(2023KJHZ0028)
作者简介:王德政(1999—),男,山东济宁人,2023级硕士研究生。E-mail:18906485675@163.com
通信作者:杨 磊(1987—),男,内蒙古呼和浩特人,教授,博士。主要从事动物生殖生物技术与生物育种研究。E-mail:mrknowall@126.com

用磁珠分离X、Y精子,可实现X精子富集率达82.65%,Y精子富集率达81.43%[14]。因此,开发免疫学分选方法的关键在于寻找X精子与Y精子的差异表达蛋白(DEPs)。

为探究牛X、Y精子分离的新型靶点,以流式细胞仪分选的鲁西牛性别控制精液为实验材料,借助蛋白质组学技术解析鲁西牛X、Y精子的差异表达蛋白图谱,系统挖掘两类精子的差异性表达蛋白。研究结果不仅为阐释X、Y精子的生物学特性差异提供了理论依据,更通过鉴定与性别决定相关的候选抗原,为基于免疫学方法制备性别控制精液、实现牲畜性别精准调控奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 牛新鲜精液采集

本研究使用的实验动物和操作程序经内蒙古大学生物伦理委员会机构动物护理和使用委员会(IMU-bovine-2023-067)审查批准。精液样本采集于内蒙古大学草原家畜种质创新与繁育基地,供体为3头繁殖性能正常的鲁西牛(24~36月龄,每头公牛采集3次射精样本)。实验所用鲁西牛品种为我国地方优良黄牛品种,经数百年自然选择与定向人工选育形成稳定遗传谱系,且通过系谱档案追溯与分子标记辅助筛选,确保所选个体为同谱系后代,无外来品种基因渗入,核心功能基因区域高度保守,群体内遗传相似度高。同时严格匹配年龄,保证实验动物遗传背景均一、生理状态一致,最大程度消除遗传差异对实验结果的干扰,保障数据的准确性与可靠性。此外,严格把控牛的健康状态,所有实验牛无生殖系统疾病史、近3个月未使用任何影响生殖功能的药物;实验期间统一饲养环境,包括恒定的圈舍温度、标准化配比饲料和固定每日运动量,保障实验条件的可控性与结果的可靠性。采用假阴道法采集精液,精液采集后在10 min内迅速转运至实验室,且全程维持33 ℃。随后,将样本与预热的牛精液冷冻稀释液OptiXcell 2(023845,IMV Technologies,France)按1∶1(体积比)预稀释,于37 ℃条件下平衡5 min。取各处理样本2 μL滴加至八孔载玻片(024911,IMV Technologies,France)中,每个样本3次重复。采用配备美国HT CASA-Ceros Ⅱ计算机辅助精子分析系统的日本尼康温度控制相差显微镜(Nikon,Japan),以60 Hz采集速率(0.5 s持续时间)进行高分辨率精子运动轨迹跟踪。通过系统分析5个随机视野中至少500个精子,检测总活力、平均路径速度、直线速度和曲线速度等动力学参数和细胞密度[15],使用精子活力>95%的精液进行后续分选。

1.2 牛X、Y精液制备

将3头鲁西牛精液分选为X精子和Y精子,使用TALP(由95.0 mmol/L NaCl、3.0 mmol/L KCl、0.3 mmol/L NaH_2PO_4、10.0 mmol/L $NaHCO_3$、0.4 mmol/L $MgCl_2·6H_2O$、2.0 mmol/L丙酮酸、5.0 mmol/L葡萄糖、25 mmol/L乳酸钠、40.0 mmol/L HEPES、3 mg/mL BSA和30 mg/mL硫酸庆大霉素组成),将精液稀释到2×10^8个/mL,然后使用50.4 mmol/L Hoechst 33342染色,置于34 ℃水浴孵育45 min。从水浴中取出后,在TALP中加入100 μL/mL的20%蛋黄,使最终蛋黄浓度为2%。然后使用50 mm无菌细胞滤网过滤染色的精子样品,去除团块[16]。使用流式细胞分选仪(BD cytoflex,USA)进行分选。

1.3 牛X、Y精液分离效果分析

采用流式细胞术DNA定量技术,对分选出的X、Y精液进行分析[17-18]。具体操作如下:从每组样本中取100 μL精液(含精子数量不少于6×10^6个),于37 ℃条件下以400×g离心5 min,离心后将精子密度调整至1×10^6个/mL,随后用4 ℃的70%乙醇固定精子2 h。固定完成后,用磷酸盐缓冲液(PBS,P1020,Solarbio,China)对精子进行连续冲洗;接着加入核糖核酸酶A(RNase A,浓度1 mg/mL),于37 ℃条件下消化30 min;之后加入碘化丙啶(PI,浓度50 μg/mL),在4 ℃避光环境下染色30 min,样本经40 μm滤网过滤后,采用流式细胞仪(Cytoflex,Beckman Coulter,USA)进行检测,检测流速设定为30 μL/min,每个样本采集10 000个事件;最后借助FlowJo 10.8.1软件分析样本中X精子与Y精子的比例。

1.4 精子膜蛋白提取

取5 mL分选得到的X、Y精子样品在15 mL离心管中于4 ℃和600×g条件下离心5 min,然后使

用5 mL预冷的PBS洗涤精子1次，并在4 ℃和850×g条件下离心20 min。然后沿管壁加入10.11 μL蛋白酶和磷酸酶抑制剂（Thermo Fisher Scientific Inc，Waltham，MA，USA），使用精子膜蛋白提取试剂盒（Invent Biotechnologies，Plymouth，MN，USA）分离出精子质膜蛋白。随机进行3个生物学重复（X精子组：X_1、X_2、X_3；Y精子组：Y_1、Y_2、Y_3）。向每个样品中加入等体积的裂解液[4% SDS、100 mmol/L Tris/HCl（pH 7.6）、0.1 mol/L二硫苏糖醇（DTT）、5 mmol/L氟化钠、50 mmol/L β-甘油磷酸酯、1 mmol/L正钒酸钠，添加1×Halt蛋白酶和磷酸酶抑制剂]，在4 ℃和12 000×g条件下离心10 min，收集上清液用于提取蛋白质。使用二喹啉甲酸（BCA）蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。

1.5　膜蛋白处理

取等量各样本蛋白，按以下步骤进行酶解处理：先以裂解液统一各样本体积，随后加入等体积预冷丙酮，涡旋混匀后补加4倍体积预冷丙酮，于－20 ℃静置沉淀2 h。沉淀完成后，4 500×g离心5 min，弃上清，沉淀用预冷丙酮洗涤2～3次。沉淀晾干后，加入终浓度200 mmol/L的三乙基碳酸氢铵（TEAB），超声打散沉淀。按酶与蛋白质量比1∶50加入胰蛋白酶，过夜酶解。酶解产物中加入DTT至终浓度5 mmol/L，56 ℃还原30 min，随后加入碘乙酰胺（IAA）至终浓度11 mmol/L，室温避光孵育15 min。

1.6　液相色谱-质谱联用分析

酶解所得肽段经液相色谱流动相（A相）溶解后，通过NanoElute超高效液相系统实现分离。流动相A为含0.1%甲酸与2%乙腈的水溶液，流动相B为含0.1%甲酸的乙腈-水溶液，梯度洗脱程序设定如下：0～15 min，B相比例由9%线性升至24%；15～17 min，B相比例从24%升至35%；17～19 min，B相比例进一步提升至80%；19～20 min，维持80% B相洗脱，全程流速恒定为600 nL/min。超高效液相分离后的肽段注入Capillary离子源进行电离，随后导入timsTOF HT质谱仪开展数据采集。离子源电压设定为1.6 kV，肽段母离子及其二级碎片均采用飞行时间质量分析器（TOF）检测。数据采集采用数据非依赖平行累积串行碎裂（dia-PASEF）模式，一级质谱扫描范围为300～1 500 m/z，每完成1次一级扫描后进行21次dia-PASEF模式二级扫描，二级质谱扫描区间为380～1 170 m/z，按10 m/z间隔划分扫描窗口。

2　结果与讨论

2.1　牛X、Y精液分离效果鉴定

采用流式细胞仪对分选出的X、Y精液进行分析，在对照组中，X精子和Y精子的占比分别为50.5%和49.5%。在Y精子组中，Y精子占比为80.2%。在X精子组中，X精子占比为83.5%。对照组、Y精子组和X精子组流式细胞仪分析结果如图1所示。

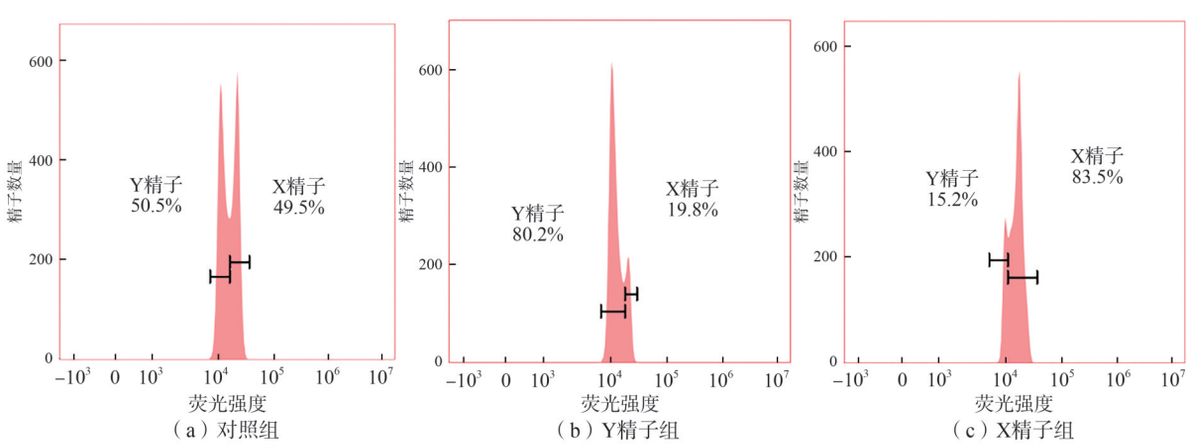
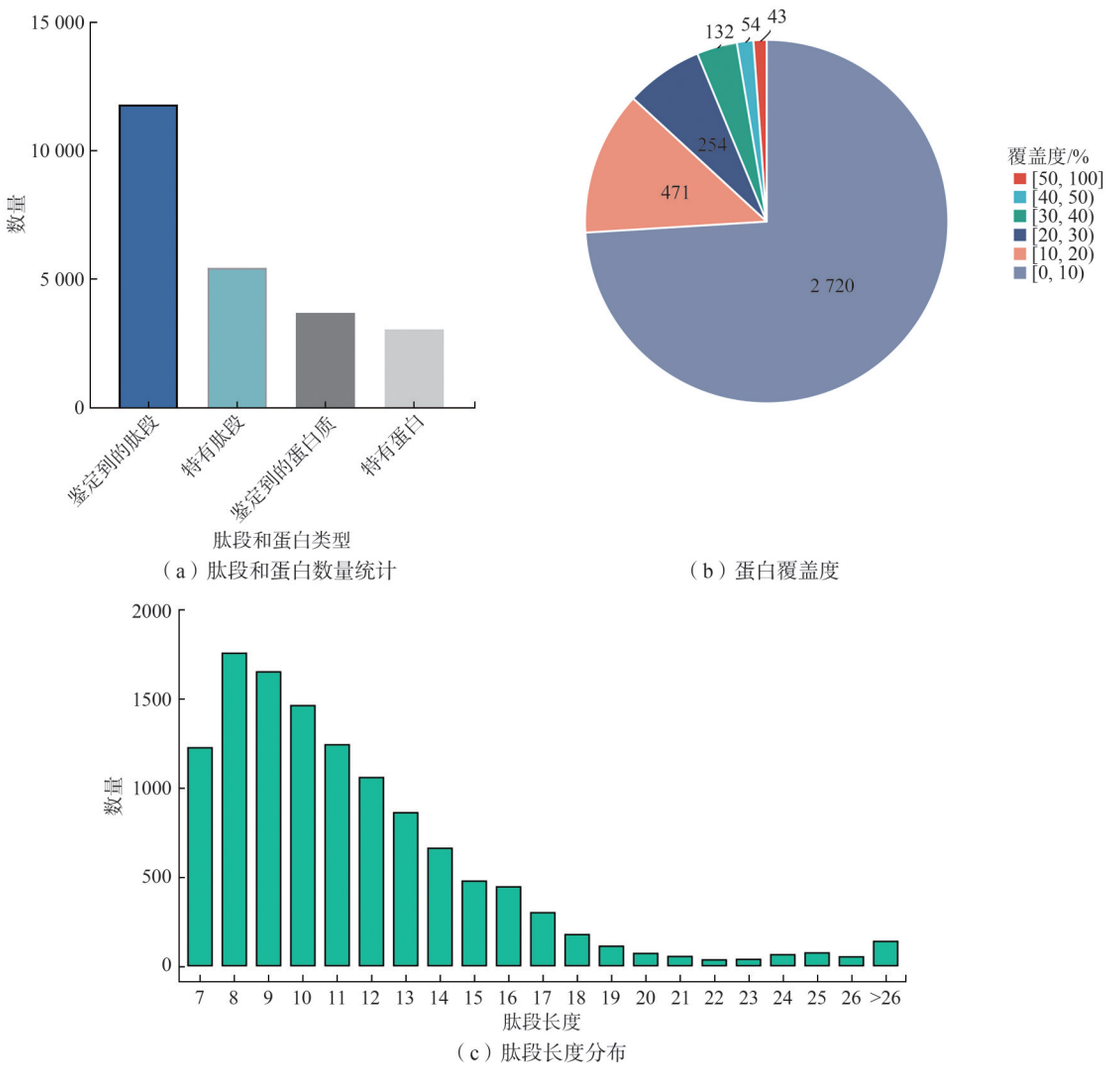


图1　流式细胞仪分析精液中X、Y精子含量

Fig. 1　Analysis of the content of X and Y sperm in semen by flow cytometry

2.2 蛋白质谱质量控制

对蛋白质谱数据进行质量控制,共鉴定出11 811个肽段,5 447个单一肽段,鉴定出3 674个蛋白,其中3 020个有定量信息,结果如图2(a)所示。蛋白覆盖度结果显示,大部分蛋白的覆盖度在30%以下,如图2(b)所示。肽段分布在7~20个氨基酸,符合基于酶解和质谱碎裂方式的一般规律,质谱鉴定到的肽段长度的分布符合质控要求,如图2(c)所示。



(a) 肽段和蛋白数量统计　(b) 蛋白覆盖度

(c) 肽段长度分布

图2 蛋白质谱质量控制

Fig. 2 Protein mass spectrometry quality control

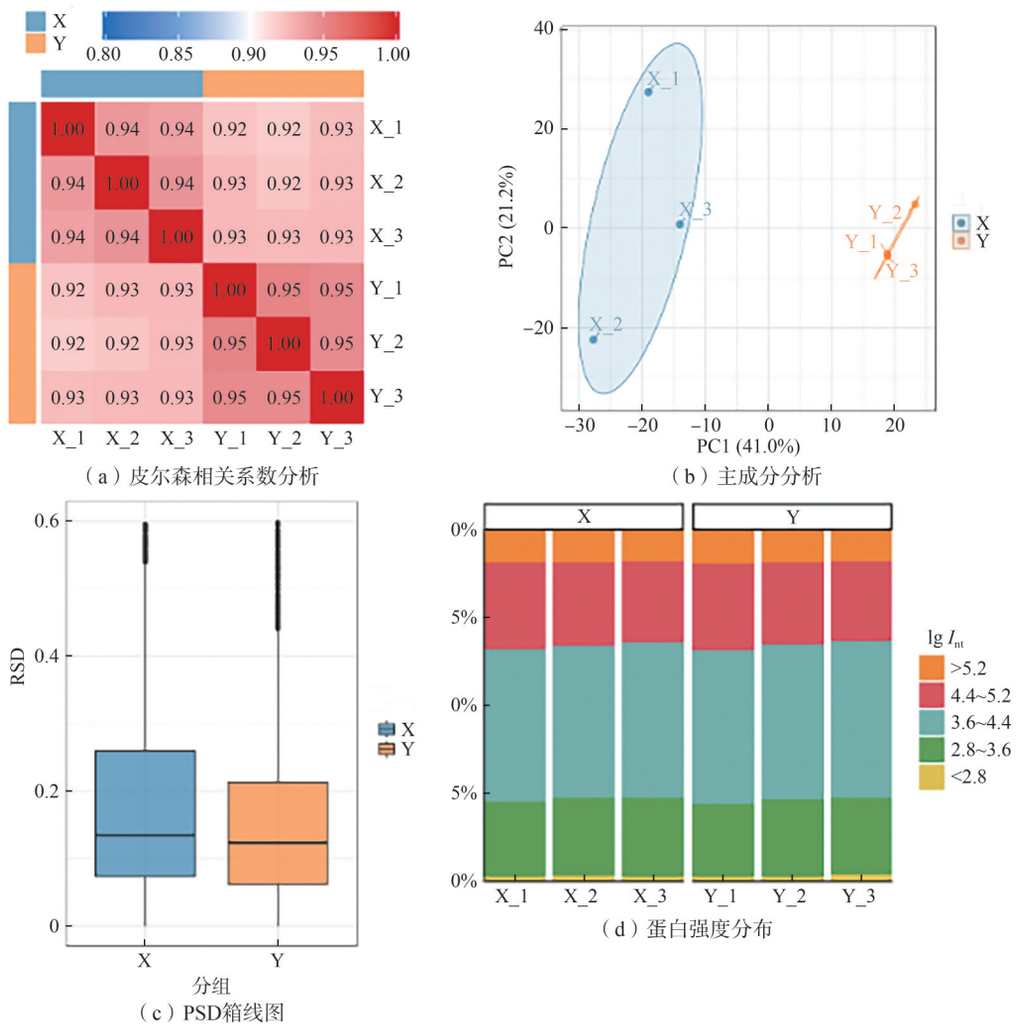
2.3 蛋白质谱定量重复性分析

基于所有样本的蛋白强度值,计算两两样本间的皮尔森相关系数以分析样本相关性,结果显示所有样本相关系数均>0.9,如图3(a)所示。以各样本蛋白相对定量值为基础进行主成分分析(PCA),并绘制可视化图谱,各组重复样本呈现明显聚集趋势,如图3(b)所示。根据各组重复样本的相对定量值计算相对标准差(RSD),并绘制箱线图,如图3(c)所示。考虑到不同样本的蛋白表达数量和表达量分布存在差异,将样本蛋白强度值$\lg I_{nt}$(I_{nt}表示样本蛋白强度)划分为多个区间,统计各区间对应的蛋白表达数量并绘制堆积柱状图,横向对比不同样本的强度值分布特征,如图3(d)所示。

2.4 鉴定牛X、Y精子差异表达蛋白

t检验结果显示,在两组以上样本中有定量信息的X精子组和Y精子组之间,207种蛋白有显著

差异表达(F_C>1.5,P<0.05)。112种蛋白在X精子组中表达上调,95种蛋白在X精子组中表达下调,如图4(a)所示。热图可视化所有显著差异表达蛋白如图4(b)所示。112个X精子表达上调的蛋白如表1所示,95个Y精子表达上调的蛋白如表2所示。



（a）皮尔森相关系数分析　（b）主成分分析

（c）PSD箱线图　（d）蛋白强度分布

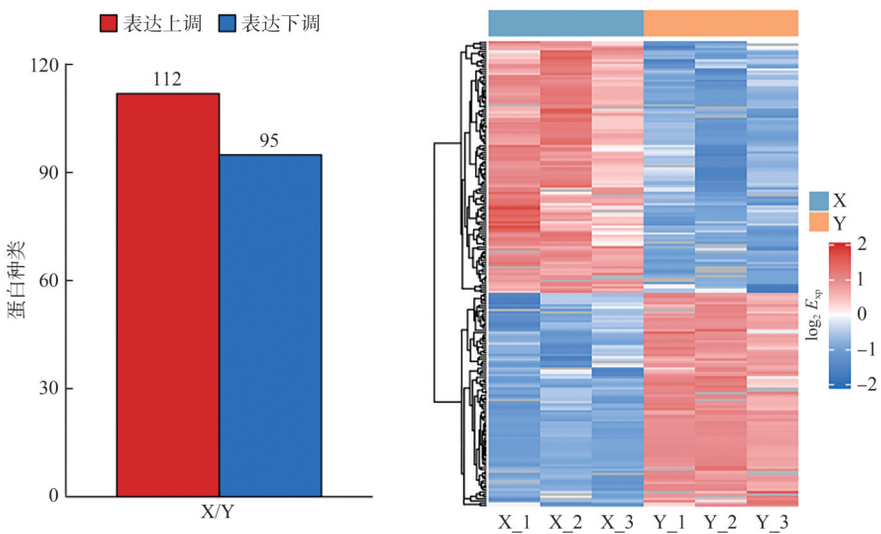
图3　蛋白质谱定量重复性和差异性分析

Fig. 3　Quantitative reproducibility and differential analysis of protein mass spectrometry

2.5　X、Y精子DEPs的GO功能富集分析和KEGG通路富集分析

为了评估这些DEPs在精子中的生物学意义,进行了GO富集分析,分别从生物学过程、细胞组成成分和分子功能方面进行了分析,如图5所示。在生物学过程方面,DEPs主要参与了细胞代谢过程、有机物质代谢过程、初级代谢过程和含氮化合物代谢等,其中P03898(*MT-ND3*)参与线粒体呼吸链(细胞代谢),A6QP15(*ADHFE1*)参与羟基酸转氢(细胞代谢),Q3ZCJ2(*AKR1A1*)参与醛酮还原和糖、脂代谢(有机物质代谢),E1BBT0(*AKR1D1*)参与类固醇还原(有机物质代谢),E1BMG9(*ALDH1L1*)参与叶酸代谢(含氮化合物代谢),A0A452DIN3(*HAAO*)参与氨基酸氧化(含氮化合物代谢),Q3T094(*ETHE1*)参与过硫化物氧化(细胞代谢)。在分子功能方面,DEPs具有蛋白质结合、离子结合、氧化还原酶活性和水解酶活性等,水解酶活性主要由E1BDI1(*DPEP3*,二肽酶)、F1MWT0(*MAN2C1*,糖苷酶)、P12820(*ACE*,肽酶)、A0A3Q1LUF9(*PSEN2*,天冬氨酸蛋白酶)、A0A3Q1M378(*GBA3*,糖苷酶)发挥;氧化还原酶活性则涉及*MT-ND3*(P03898,呼吸链电子传递)、*AKR1A1*(Q3ZCJ2,醛酮还原)、*ADHFE1*(A6QP15,羟基酸转氢)、*HAAO*(A0A452DIN3,双加氧酶)、*ALDH1L1*(E1BMG9,

脱氢酶)、*AKR1D1*(E1BBT0,酮还原)、*ETHE1*(Q3T094,双加氧酶)。在细胞组成成分方面,分类分析显示大多数DEPs与细胞内结构、细胞质、细胞器(如线粒体、纤毛、突触小泡等)相关,如*MT-ND3*、*ADHFE1*等表达于线粒体,*BBS9*表达于纤毛,*SYNGR4*表达于突触小泡等。



(a)X、Y精子蛋白表达统计图 (b)X、Y精子蛋白表达热图

图4 牛X、Y精子差异表达的蛋白数与热图分析

Fig. 4 Number of differentially expressed proteins between bovine X and Y spermatozoa and heatmap analysis

表1 X精子表达上调蛋白

Table 1 X sperm upregulated protein

蛋白登录号	蛋白功能注释	基因名称	X/Y表达丰度比值
E1BDI1	Dipeptidase 3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=DPEP3 PE=4 SV=2	*DPEP3*	29.25
A0A3Q1LMN5	MORN repeat-containing protein 5 OS=Bos taurus OX=9913 GN=MORN5 PE=4 SV=1	*MORN5*	15.48
A7MBB4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13 OS=Bos taurus OX=9913 GN=MAP3K13 PE=2 SV=1	*MAP3K13*	8.85
E1BHJ5	Bardet-Biedl syndrome 9 OS=Bos taurus OX=9913 GN=BBS9 PE=1 SV=2	*BBS9*	7.97
F1MWT0	alpha-mannosidase OS=Bos taurus OX=9913 GN=MAN2C1 PE=3 SV=2	*MAN2C1*	7.21
P12820	Angiotensin-converting enzyme OS=Bos taurus OX=9913 GN=ACE PE=1 SV=3	*ACE*	6.02
A0A3Q1M047	Maestro heat like repeat family member 2B OS=Bos taurus OX=9913 GN=MROH2B PE=4 SV=1	*MROH2B*	5.66
F1N0T8	Synaptogyrin OS=Bos taurus OX=9913 GN=SYNGR4 PE=3 SV=1	*SYNGR4*	5.58
P03898	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=MT-ND3 PE=1 SV=1	*MT-ND3*	5.52
A0A3Q1MH11	HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 4 OS=Bos taurus OX=9913 GN=HECTD4 PE=4 SV=1	*HECTD4*	5.37
E1BM47	Maestro heat like repeat family member 2B OS=Bos taurus OX=9913 GN=MROH2B PE=4 SV=2	*MROH2B*	5.27

表 1(续)

蛋白登录号	蛋白功能注释	基因名称	X/Y表达丰度比值
Q3ZCJ2	Aldo-keto reductase family 1 member A1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=AKR1A1 PE=2 SV=1	*AKR1A1*	4.98
A7E2Y6	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=MROH1 PE=2 SV=1	*MROH1*	4.29
A0A3Q1M0Y2	RLF zinc finger OS=Bos taurus OX=9913 GN=RLF PE=3 SV=1	*RLF*	3.97
A0A3Q1LUF9	Presenilin OS=Bos taurus OX=9913 GN=PSEN2 PE=3 SV=1	*PSEN2*	3.76

注:根据X/Y表达丰度比值将前15个蛋白列出。

表 2　Y精子表达上调蛋白

Table 2　Y sperm upregulated protein

蛋白登录号	蛋白功能注释	基因名称	X/Y表达丰度比值
A6QP15	Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, mitochondrial OS=Bos taurus OX=9913 GN=ADHFE1 PE=2 SV=1	*ADHFE1*	0.33
A0A452DIN3	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase OS=Bos taurus OX=9913 GN=HAAO PE=3 SV=1	*HAAO*	0.33
A0A3Q1MLX2	Regucalcin OS=Bos taurus OX=9913 GN=RGN PE=3 SV=1	*RGN*	0.33
G5E5R3	Carnitine O-octanoyltransferase OS=Bos taurus OX=9913 GN=CROT PE=1 SV=2	*CROT*	0.31
E1BMG9	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALDH1L1 PE=1 SV=3	*ALDH1L1*	0.31
E1BBT0	Aldo-keto reductase family 1 member D1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=AKR1D1 PE=3 SV=1	*AKR1D1*	0.30
A0A3Q1LJH0	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ASAP1 PE=4 SV=1	*ASAP1*	0.28
A0A3Q1LTS4	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial OS=Bos taurus OX=9913 GN=PCCA PE=1 SV=1	*PCCA*	0.27
Q3T094	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial OS=Bos taurus OX=9913 GN=ETHE1 PE=2 SV=1	*ETHE1*	0.27
Q2KIE6	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial OS=Bos taurus OX=9913 GN=HMGCS2 PE=1 SV=1	*HMGCS2*	0.25
Q0VBW4	Uncharacterized protein LOC777593 OS=Bos taurus OX=9913 GN=LOC777593 PE=2 SV=1	*LOC777593*	0.24
A0A3Q1M378	Glucosylceramidase beta 3 OS=Bos taurus OX=9913 GN=GBA3 PE=3 SV=1	*GBA3*	0.23
F1MDA3	Y+L amino acid transporter 2 OS=Bos taurus OX=9913 GN=SLC7A6 PE=3 SV=2	*SLC7A6*	0.22
A0A3Q1LLU1	von Willebrand factor OS=Bos taurus OX=9913 GN=VWF PE=4 SV=1	*VWF*	0.22
F1N7H5	mannose-1-phosphate guanylyltransferase OS=Bos taurus OX=9913 GN=GMPPB PE=3 SV=2	*GMPPB*	0.19

注:根据X/Y表达丰度比值将前15个蛋白列出。

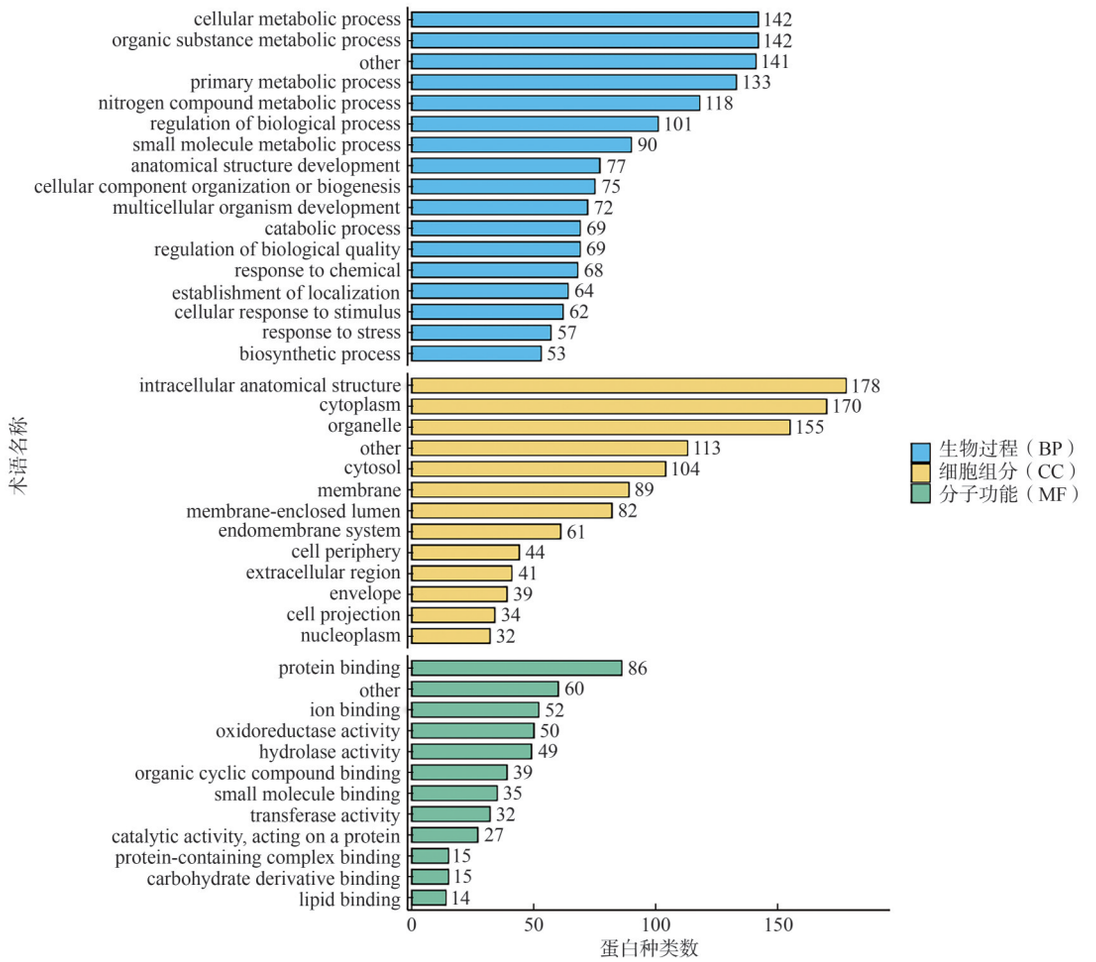


图5 X、Y精子差异表达蛋白GO富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of differentially expressed proteins in X and Y sperm

KEGG富集分析如图6所示，图中F_E为富集倍数，结果表明DEPs主要参与精氨酸生物合成、色氨酸代谢和缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸降解等氨基酸代谢过程。精氨酸是精子能量代谢ATP生成和运动能力调控的关键氨基酸，该通路的高富集表明这些DEPs是精子精氨酸代谢的核心调控因子，同时，精氨酸是合成NO的唯一前体，能够通过信号转导调节鞭毛的运动；色氨酸经色氨酸羟化酶催化生成5-羟色氨酸，再进一步生成5-羟色胺，在精子中能够促进钙离子（Ca^{2+}）内流，进而控制精子运动；缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸是精子最主要的快速供能物质，其降解速率影响精子的鞭毛运动。

3 结论

本研究通过非标定量蛋白质组学技术，系统解析了流式细胞仪分选的鲁西牛X、Y精子蛋白表达谱。研究结果表明，X、Y精子间存在显著的蛋白表达差异，这些差异蛋白主要富集于精子能量代谢通路，直接参与精子ATP生成和运动能力调控。进一步分析结果显示，差异表达蛋白显著参与精氨酸生物合成、色氨酸代谢和缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等支链氨基酸降解过程和糖代谢过程，氨基酸是精子能量供应、细胞组分合成的核心底物，这些通路的富集反映DEPs对精子氨基酸代谢的广泛调控。糖代谢是精子基础能量来源，这些通路的富集与精子的基础代谢活性直接相关，揭示了氨基酸代谢和糖代谢在X、Y精子中的差异。本研究不仅阐明了差异表达蛋白使X、Y精子运动能力出现差异的分子机制，更为后续筛选性别控制关键蛋白提供了重要的理论依据与候选靶点，为开发精准高效的家畜性别控制技术奠定了坚实基础。

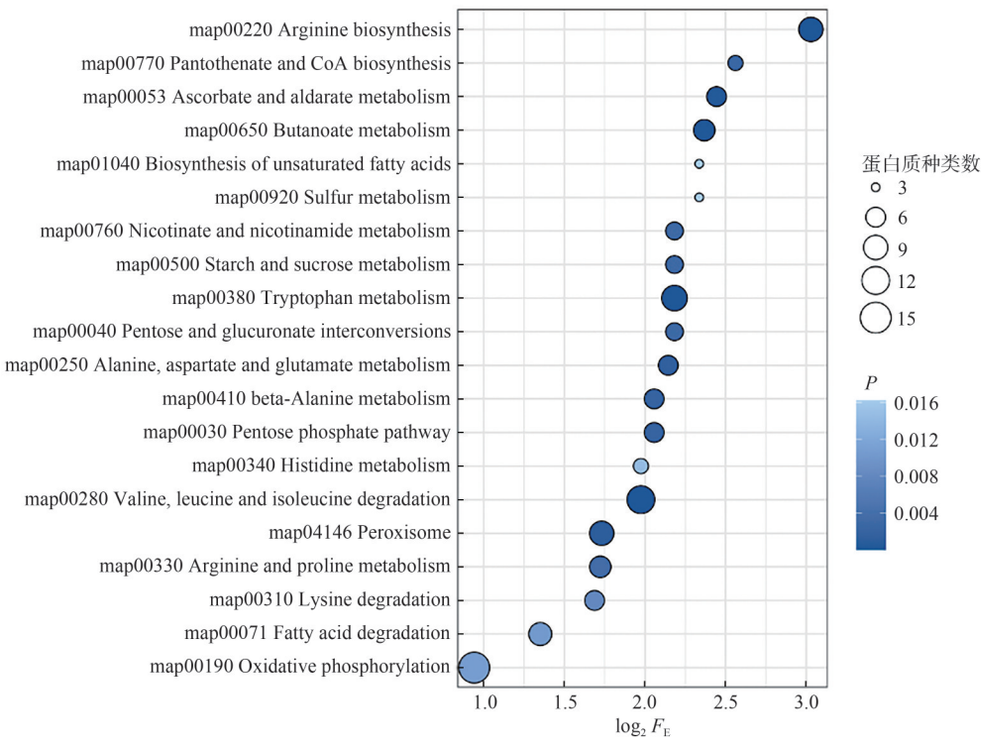


图 6　X、Y精子差异表达蛋白KEGG富集分析

Fig. 6　KEGG enrichment analysis of differentially expressed proteins in X and Y sperm

参考文献：

[1] Pahmeyer C, Britz W. Economic opportunities of using crossbreeding and sexing in Holstein dairy herds[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(9): 8218-8230.

[2] Oyeyipo I P. Linde M V D, Plessis S S D. Environmental exposure of sperm sex-chromosomes: A gender selection technique[J]. Toxicological Research, 2017, 33(4): 315-323.

[3] Xie Y H, Hu L G, Chen X X, et al. Auxiliary diagnosis based on the knowledge graph of TCM syndrome[J]. CMC-Computers Materials & Continua, 2020, 65(1): 481-494.

[4] Sang L, Yang W C, Han L, et al. An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(4): 2060-2070.

[5] Kawarasaki T, Welch G R, Long C R, et al. Verification of flow cytometorically-sorted X- and Y-bearing porcine spermatozoa and reanalysis of spermatozoa for DNA content using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique[J]. Theriogenology, 1998, 50(4): 625-635.

[6] Chen X L, Zhu H B, Wu C J, et al. Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa[J]. Journal of Proteomics, 2012, 77: 59-67.

[7] De Canio M, Soggiu A, Piras C, et al. Differential protein profile in sexed bovine semen: Shotgun proteomics investigation[J]. Molecular BioSystems, 2014, 10(6): 1264-1271.

[8] Blottner S, Bostedt H, Mewes K, et al. Enrichment of bovine X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis[J]. Journal of Veterinary Medicine, 1994, 41(6): 466-474.

[9] Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing[J]. Life Sciences, 2019, 232: 116636.

[10] Wang H Q, Wang T, Gao F, et al. Application of CRISPR/Cas technology in spermatogenesis research and male infertility treatment[J]. Genes, 2022, 13(6): 1000.

[11] Cran D G, Johnson L A. The predetermination of embryonic sex using flow cytometrically separated X and Y spermatozoa[J]. Human Reproduction Update, 1996, 2(4): 355-363.
[12] Rahman M S, Pang M G. New biological insights on X and Y chromosome-bearing spermatozoa[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2019, 7: 388.
[13] 王娜娜, 李颀菡, 马媛, 等. TLR7 和 TLR8 在家畜性控技术中的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(2): 427-437.
[14] Sringarm K, Thongkham M, Mekchay S, et al. High-efficiency bovine sperm sexing used magnetic-activated cell sorting by coupling scFv antibodies specific to Y-chromosome-bearing sperm on magnetic microbeads[J]. Biology-Basel, 2022, 11(5): 715.
[15] Ren F, Feng T Y, Niu T J, et al. Notoginsenoside R1 protects boar sperm during liquid storage at 17 ℃[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2020, 55(9): 1072-1079.
[16] Schenk J L, Suh T K, Cran D G, et al. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa[J]. Theriogenology, 1999, 52(8): 1375-1391.
[17] Champroux A, Goubely C, Henry-Berger J, et al. Three-dimensional confocal analysis of chromosome positioning coupled with immunofluorescence in mouse sperm nuclei[J]. Methods in Molecular Biology, 2021, 2198: 255-268.
[18] Welch G R, Johnson L A. Sex preselection: Laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA[J]. Theriogenology, 1999, 52(8): 1343-1352.

(责任编委 那顺布和)

Screening of Differentially Expressed Proteins in Bovine X and Y Sperm Based on Mass Spectrometry

WANG Dezheng, DI Anqi, SONG Lishuang, LIU Xuefei, BAI Chunling,
SU Guanghua, LI Guangpeng, YANG Lei
(*State Key Laboratory of Reproductive Regulation and Breeding of Grassland Livestock*, *School of Life Sciences*, *Inner Mongolia University*, *Hohhot* 010070, *China*)

Abstract: Proteomic approaches were employed to systematically investigate the biological differences between X- and Y-bearing sperm of Luxi cattle obtained by flow cytometric sorting and to identify sex-specific proteins. Fresh semen from Luxi cattle was subjected to flow cytometry to isolate high-purity X and Y sperm populations, followed by comparative analysis of sperm membrane-associated proteins. In total, 3 020 proteins with quantitative information were identified, among which 112 proteins were significantly upregulated in the X sperm group and 95 proteins were significantly upregulated in the Y sperm group. Functional enrichment analysis reveals that these differentially expressed proteins are mainly involved in amino acid metabolism and energy metabolism-related pathways, which may directly regulate sperm motility by modulating cellular energy supply. The study provides mechanistic insights into the molecular basis underlying biological differences between X and Y sperm and identifies potential target proteins for the development of novel sperm sex-control technologies.

Key words: bovine; X and Y sperm; protein mass spectrometry; proteomics