

唐会会,郑玉才,王鹏非,等. 牦牛 *PRDX5* 基因的克隆测序及其在牦牛与犏牛睾丸中的表达差异[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):53-56.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.013

# 牦牛 *PRDX5* 基因的克隆测序 及其在牦牛与犏牛睾丸中的表达差异

唐会会, 郑玉才, 王鹏非, 金素钰, 黄 林

(西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041)

**摘要:**测定牦牛 *PRDX5* 基因序列,并比较其在牦牛和雄性不育犏牛睾丸组织中的表达差异,以探究该基因与犏牛雄性不育的关系。从牦牛睾丸组织中提取总 RNA,采用 RT-PCR 技术克隆并测序获得牦牛 *PRDX5* 基因的 cDNA 序列;利用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测该基因在牦牛与犏牛睾丸组织中的表达情况。结果表明:克隆获得的牦牛 *Prdx5* 序列长 759 bp,包含长 660 bp 的 CDS 区,该序列与普通牛基因相差 4 个碱基,序列同源性和 99.47%,相差的 4 个核苷酸导致推导的氨基酸序列存在 3 个氨基酸残基差异;*Prdx5* 在牦牛和犏牛睾丸组织中均有表达,在牦牛睾丸组织中的表达量极显著高于犏牛( $P < 0.01$ ),是犏牛睾丸组织中表达量的 6 倍,提示 *Prdx5* 在犏牛睾丸组织中低水平表达可能与其雄性不育有关。

**关键词:**牦牛;杂交雄性不育;*PRDX5* 基因;基因表达;睾丸

**中图分类号:** Q785;S823.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0053-04

过氧化物氧化还原酶(Peroxiredoxin, PRDX)家族是过氧化物酶超家族成员<sup>[1]</sup>,广泛分布于原核及真核生物体内<sup>[2-3]</sup>。该家族蛋白利用其 N-端保守的 Cys 残基催化还原细胞内活性氧(ROS),从而保护细胞免受内外界环境中氧化胁迫带来的损害,是一类巯基依赖性抗氧化蛋白酶<sup>[3]</sup>。PRDX5 别称 AOEB166、PMP20、AOPP,是哺乳动物 Prx 家族中唯一的非典型 2-Cys Prx<sup>[4]</sup>,主要分布于细胞的线粒体、溶酶体、细胞质、细胞核中<sup>[5-8]</sup>。该酶不仅在免疫调控<sup>[9]</sup>、细胞凋亡<sup>[10]</sup>、信号通路调节<sup>[11]</sup>等方面发挥作用,其功能主要在于还原细胞内过量的 ROS。过量的 ROS 会引起细胞及组织损伤,对动物精子细胞更易造成损害,使精子细胞膜脂质过氧化、DNA 结构

破坏、凋亡加速,最终导致哺乳动物雄性不育<sup>[12]</sup>。据估计,约 1/4 不育男性患者精液中 ROS 水平升高<sup>[13-14]</sup>。PRDX5 能以高效的还原能力<sup>[15]</sup>保护精子免受氧化胁迫损害,因此 *Prdx5* 水平偏低可能与哺乳动物雄性不育有关。

牦牛(*Bos grunniens*)是青藏高原特有牛种,其与普通牛(*Bos taurus*)的杂交后代(犏牛)表现出 F<sub>1</sub> 至 F<sub>3</sub> 代雄性不育,这极大限制了犏牛杂种优势的固定,是牦牛杂交改良的一大难题。目前,有关犏牛雄性不育分子机制研究的相关基因如 *b-Boule*<sup>[16]</sup>、*Dmrt7*<sup>[17]</sup>、*Sycp3*<sup>[18]</sup>、*Fabp5*、*Fabp9*<sup>[19]</sup>、*Piwil1*<sup>[20]</sup>、*Bvh*<sup>[21]</sup>、*Ldhe*<sup>[22]</sup>等,主要涉及精子减数分裂阻滞、能量代谢、DNA 甲基化、转录调控等方面,但从睾丸过氧胁迫角度探究犏牛雄性不育的机制尚未见报道。对牦牛与犏牛睾丸组织蛋白质组学研究结果进行比较发现,牦牛睾丸 PRDX5 蛋白水平远高于犏牛(约 3.9 倍),过低的 PRDX5 蛋白水平可能会使犏牛睾丸组织遭受 ROS 氧化胁迫,影响精子的正常发生。本研究通过基因克隆的方法获得了牦牛 *PRDX5* 基因的完整编码区序列,并比较了牦牛与普通牛的基因序列及氨基酸序列;同时利用实时荧光定量 PCR 方法分析该基因在牦牛和犏牛

收稿日期:2015-06-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31240053)。

作者简介:唐会会(1995—),女,贵州六盘水人。E-mail:18224022329@163.com。

通信作者:黄 林,硕士,讲师,主要从事动物生物化学与分子遗传学研究。E-mail:huanglin200426@hotmail.com。

[8] Gazaryan I G, Lagrimini L M, Ashby G A, et al. Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases[J]. The Biochemical Journal, 1996, 313(3): 841-847.

[9] Lopes T S, Hakkaart G J, Koerts B L, et al. Mechanism of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Gene, 1991, 105(1): 83-90.

[10] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 58-61.

[11] 李 洋, 李 晖, 祝建波, 等. 重组萝卜磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶在毕赤酵母优化表达初步纯化与鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(4): 54-59.

[12] 张 毅, 屈贤铭, 杨胜利. 乳糖作为诱导剂对重组目的蛋白表达的影响[J]. 生物工程学报, 2000, 16(4): 464-468.

[13] Stewart P, Whitwam R E, Kersten P J, et al. Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(3): 860-864.

[14] Conesa A, van den Hondel C A, Punt P J. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 3016-3023.

[15] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 82-86.

[16] 许崇利, 杨 梅, 许崇波. 大肠杆菌表达系统的影响因素[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(8): 66-68.

睾丸组织中的 mRNA 水平,以探索 *PRDX5* 基因表达水平与犏牛雄性不育的关联。

1 材料与方法

1.1 材料

供试成年牦牛( $n=9$ )及犏牛( $n=7$ )的睾丸组织均于秋季采自四川省成都市青白江区屠宰场,采集后立即放入液氮速冻并送回实验室。所有样品均于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.2 方法

1.2.1 *PRDX5* 基因的克隆测序 利用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)按照其产品操作说明从睾丸组织中提取总 RNA。以牦牛总 RNA 为模板,以 Oligo(dT)18 为反转录引物,采用 RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo 公司)进行反转录合成 cDNA 第 1 链。根据已公布普通牛的 *Prdx5* 核酸序列(GenBank 登录号:NM\_174749),运用 Primer Premier 5.0 软件在该序列的 CDS 区两侧设计 PCR 特异引物,即 F:5'-TCCGCCCAGCCTTCTACCTC-3';R:5'-GAAAGGGCCG-GAGGAGGATAT-3'。以 cDNA 为模板,按照如下程序进行扩增:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,65  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s,共 35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。预期能扩增出包含 *PRDX5* 基因 CDS 区在内的 759 bp 的片段。PCR 产物采用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。RT-PCR 产物经 E. Z. N. A. TM Cycle-Pure Kit(OMEGA 公司)纯化后连接到 pMD19-T 载体(TaKaRa 公司),再转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  宿主中进行克隆。抗氨苄重组筛选后挑选出 20 个阳性单克隆进行扩大培养,经菌液 PCR 鉴定后,将含有目的片段的单克隆双

向测序,测序引物为 pUC 系列载体通用引物 M13F 及 M13R。

1.2.2 牦牛 *PRDX5* 基因的序列特征分析 在 NCBI 数据库中使用 Blast 工具将所测序列与野牦牛、普通牛的 cDNA 序列进行同源性比对,并在该数据库中比对其编码的氨基酸序列。使用蛋白质预测在线分析软件 Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html>)对 *Prdx5* 编码的氨基酸序列的二级结构进行预测。

1.2.3 牦牛及犏牛睾丸中 *PRDX5* 基因丰度检测 采用实时荧光定量 PCR 方法对牦牛及犏牛睾丸组织中的 *PRDX5* 基因 mRNA 表达水平进行检测。根据克隆测序后的 cDNA 序列以及普通牛内参基因 *Gapdh*、18S rRNA 序列信息,采用 Primer Premier 5.0 软件分别设计定量 PCR 特异引物(表 1)。提取的总 RNA 经质量检测合格后,取 4  $\mu\text{g}$  利用上述试剂盒自带的随机六聚体引物进行反转录,合成 cDNA 作为定量模板。PCR 反应体系为:QuantiFast<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master mix(QIAGEN 公司)12.5  $\mu\text{L}$ 、上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ 、模板 1  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ ,总体积共 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 程序为:预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min;变性 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,引物退火(退火温度详见表 1)20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s,共 40 个循环。定量 PCR 检测分为牦牛组和犏牛组,组内每个样品同时检测目的基因和 2 个内参基因,每个基因设 3 个平行重复。

1.2.4 数据统计分析 每个样品的检测结果利用 2 个内参基因  $C_t$  值的几何平均数对目的基因进行校正。牦牛和犏牛组间相对表达水平使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[23]</sup>进行计算;采用 SPSS 13.0 软件对 2 组数据进行独立样本  $t$  检验分析,以  $\alpha=0.05$  作为差异显著标准。

表 1 定量 PCR 引物

基因名称	GenBank 登录号	引物序列(5'→3')	退火温度( $^{\circ}\text{C}$ )	扩增子长度(bp)
<i>Prdx5</i>	KR056094	F:TCCAGGTGGTGGCATGTCTGAC;R:GAAAGGGCCGGAGGAGGATATC	65	322
<i>Gapdh</i>	NM_001034034	F:CGATTCAACACGACACTCA;R:AGGTCCAGGGACCTTACTCCTT	60	169
18S rRNA	NR_036642	F:CTGAGAAACGGCTACCACATC;R:CAGACTTGCCCTCCAATGG	60	168

2 结果与分析

2.1 牦牛 *PRDX5* 基因的克隆测序

采用 RT-PCR 方法对牦牛睾丸组织中的 *PRDX5* 基因进行扩增,扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得 1 条特异的与预期大小相一致的 DNA 片段(图 1)。该片段经克隆测序显示其长度为 759 bp,包含长 660 bp 的完整 CDS 区,与普通牛 *PRDX5* 序列比对证实该片段为牦牛 *PRDX5* 基因序列。

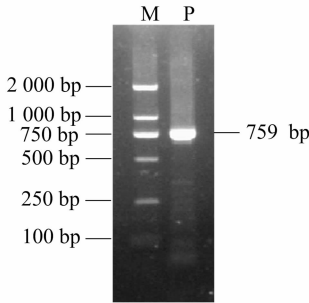
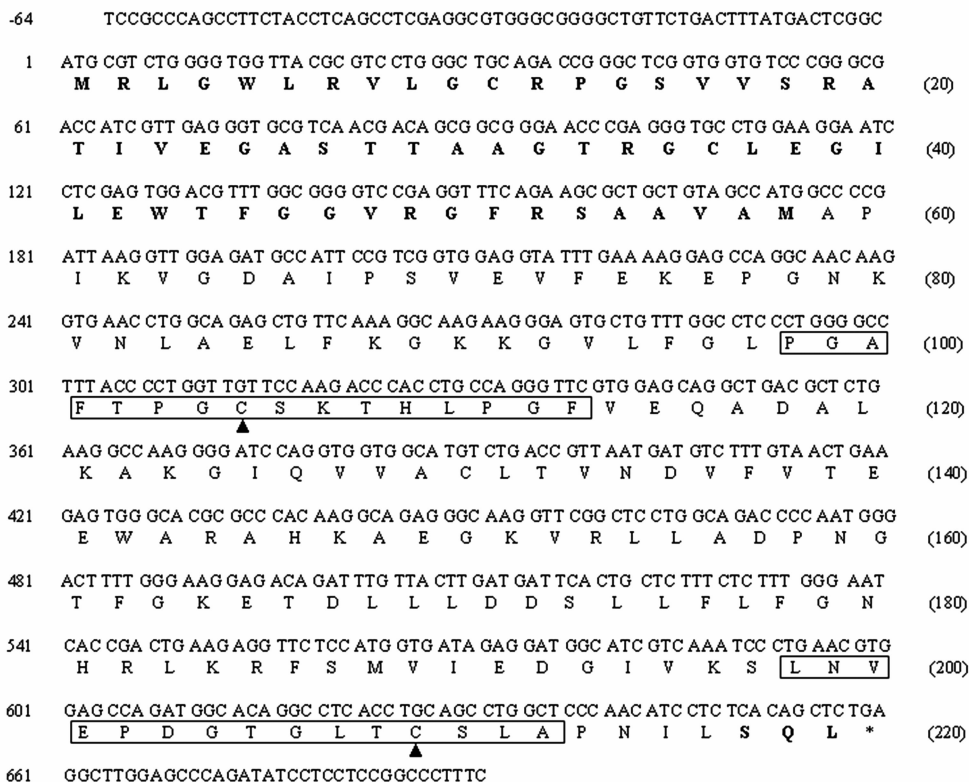


图 1 牦牛睾丸组织 *PRDX5* 基因的 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

2.2 牦牛 *PRDX5* 基因的序列分析

将克隆获得的牦牛 *Prdx5* 序列(GenBank 登录号:KR056094)在 NCBI 数据库中与野牦牛及普通牛进行比对,发现其与野牦牛预测序列(XM\_005894087)完全相同;与普通牛(NM\_174749.2)的相似性为 99.47%,相差 4 个碱基,其 CDS 区的 227、231、433、476 位碱基依次为 A、A、G、A,普通牛则为 G、G、A、G。4 个碱基差异导致牦牛与普通牛氨基酸序列存在 3 处差异,即牦牛的 76、145、159 位氨基酸依次为 Glu、Ala、Asn,普通牛则为 Gly、Thr、Ser,氨基酸序列相似性为 98.63%。

牦牛 *PRDX5* 基因推导的氨基酸序列含 219 个氨基酸残基,是一个肽前体,其 N-末端 Met1 至 Met58 区段为定位于线粒体的导肽,除导肽以外的肽段部分为成熟肽;成熟肽的 C-末端还存在靶向进入过氧化物酶体的 SQL 信号序列<sup>[24]</sup>。*Prdx5* 成熟肽区段共有 3 个 Cys 残基,其中 Cys47 为该酶保守的催化残基,Cys151 为还原活性必需的非典型 Cys 残基,2 个活性 Cys 残基周围高度保守的特征序列分别为“PGAFTPGC-SKTHLPGF”、“LNVEPDGTGLTCSLA”<sup>[24]</sup>(图 2)。另外,使用在线 Phyre2 蛋白预测软件对该氨基酸序列的二级结构进行



左边缘数字为核苷酸数目,右边括号中数字为编码氨基酸数目;N—末端加粗氨基酸序列为定位于线粒体的导肽区,C—末端加粗SQL残基为定位于过氧化物酶体的信号序列;催化活性Cys残基使用三角标注,活性位点所在的高度保守序列使用方框标示

图2 牦牛 *PRDX5* 基因核苷酸与推导的氨基酸序列

预测,发现牦牛 *Prdx5* 基因包含 7 个  $\alpha$ -螺旋、8 个  $\beta$ -折叠,在二级结构中的比例分别为 33%、22%。

### 2.3 牦牛和犏牛睾丸 *PRDX5* 基因 mRNA 水平比较

根据测序后的 *Prdx5* 序列及内参基因信息设计特异定量引物,定量 PCR 扩增获得的溶解曲线峰形单一,表明特异性好。所建立的所有基因标准曲线显示,扩增效率均落在 95%~105% 范围内,符合相应算法要求。定量结果分析表明,*PRDX5* 基因在牦牛和犏牛睾丸组织中均有表达,在牦牛睾丸组织中的表达量显著高于犏牛 ( $P < 0.01$ ),是犏牛睾丸组织中表达量的 6 倍(图 3)。

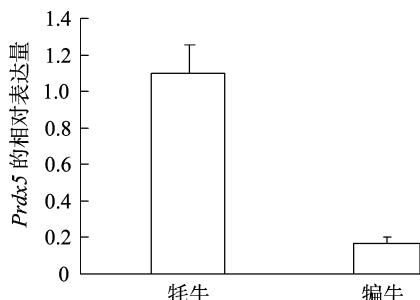


图3 牦牛与犏牛睾丸组织 *Prdx5* 相对表达量

## 3 结论与讨论

本研究成功克隆并获得了牦牛睾丸组织 *PRDX5* 基因的 cDNA 序列。牦牛 *Prdx5* 所编码的氨基酸序列与普通牛相似性为 98.63%,相差 3 个氨基酸残基,但均不位于该酶的活性

保守区内,表明该基因在进化上具有较高的保守性<sup>[2]</sup>。有差异的 3 个氨基酸残基均位于成熟肽段内;从差异氨基酸极性上看,3 个氨基酸中有 2 个在牦牛和普通牛中不变,仅 145 位氨基酸残基在普通牛中为极性的 Thr,而牦牛中为非极性的 Ala。这种极性的差异是否导致空间结构的变化,最终影响该酶在牦牛中的功能尚需进一步研究。

哺乳动物精细胞中的 ROS 对于受精、染色质浓缩、细胞膜的重构、细胞内信号通路的激活、精子获能、顶体反应是必不可少的<sup>[25]</sup>。哺乳动物精细胞膜由大量不饱和脂肪酸组成,且细胞质仅存有低浓度可抵抗 ROS 的酶,因此氧化胁迫极易导致脂质过氧化而首先破坏精子细胞膜。此外,过量的 ROS 会影响精子运动,损坏 DNA 结构,加速精细胞凋亡,引起精子数目减少、活力降低、功能损伤,最终导致雄性不育或胚胎发育异常<sup>[12]</sup>。Leyens 等研究了 *Prdx5* 在普通牛的脑、心、肾、睾丸等 22 个组织中的表达情况,结果表明 *Prdx5* 在睾丸组织中的表达量最高,且远远高于其他组织<sup>[24]</sup>,提示 *PRDX5* 基因的高表达可能与牛的繁育功能密切相关。本研究实时荧光定量 PCR 结果分析显示,*Prdx5* 在牦牛睾丸组织中的表达量是犏牛的 6 倍,这与笔者所在课题组前期蛋白质组学分析得到的结果相一致,即 *PRDX5* 蛋白在牦牛睾丸组织中的含量是犏牛的 6 倍。Knoops 等通过比较 *PRDX5* 催化过氧化氢与有机过氧化物的速率,认为 *PRDX5* 能更高速特异地还原脂质过氧化物<sup>[4]</sup>,提示 *PRDX5* 基因的表达水平可能对精子细胞膜完整性及精子的存亡具有重要意义。*PRDX5* 定位于精子的头部和线粒体膜间隙,其表达水平对精子 DNA 的完整性及精子运动

能力均产生影响<sup>[26]</sup>。此外,细胞中过量的过氧氮族(reactive nitrogen species,RNS)可使睾丸功能紊乱、促性腺激素分泌降低,从而对哺乳动物的生殖能力造成损害<sup>[27]</sup>。PRDX5 作为一种过氧亚硝基还原酶,能高速催化还原过氧亚硝基<sup>[15,28]</sup>,保护睾丸组织内细胞免遭过氮胁迫。相对于牦牛而言,犏牛睾丸组织中 *Prdx5* 基因的低表达水平可能导致精子损伤凋亡<sup>[18]</sup>,从而使睾丸组织功能紊乱、激素水平改变以致雄性不育,PRDX5 基因的表达水平可能与犏牛雄性不育有关。

#### 参考文献:

- [1] Rhee S G, Kang S W, Chang T S, et al. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases[J]. IUBMB Life, 2001, 52(1/2): 35–41.
- [2] Knoops B, Loumaye E, van der Eecken V. Evolution of the peroxiredoxins[J]. Subcellular Biochemistry, 2007, 44: 27–40.
- [3] Chae H Z, Robison K, Poole L B, et al. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain; alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(15): 7017–7021.
- [4] Knoops B, Goemaere J, van der Eecken V, et al. Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2011, 15(3): 817–829.
- [5] Seo M S, Kang S W, Kim K, et al. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(27): 20346–20354.
- [6] Declercq J P, Evrard C, Clippe A, et al. Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 311(4): 751–759.
- [7] Knoops B, Clippe A, Bogard C, et al. Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(43): 30451–30458.
- [8] Yamashita H, Avraham S, Jiang S, et al. Characterization of human and murine PMP20 peroxisomal proteins that exhibit antioxidant activity *in vitro*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(42): 29897–29904.
- [9] Sensi M, Pietra G, Molla A, et al. Peptides with dual binding specificity for HLA-A2 and HLA-E are encoded by alternatively spliced isoforms of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 5[J]. International Immunology, 2009, 21(3): 257–268.
- [10] Kropotov A, Gogvadze V, Shupliakov O, et al. Peroxiredoxin V is essential for protection against apoptosis in human lung carcinoma cells[J]. Experimental Cell Research, 2006, 312(15): 2806–2815.
- [11] Choi H I, Chung K J, Yang H Y, et al. Peroxiredoxin V selectively regulates IL-6 production by modulating the Jak2-Stat5 pathway[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2013, 65: 270–279.
- [12] Walczak J R, Wolski J K, Slowikowska H J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility[J]. Central European Journal of Urology, 2013, 66(1): 60–67.
- [13] Aitken R J, de Iuliis G N, Finnie J M, et al. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria[J]. Human Reproduction (Oxford, England), 2010, 25(10): 2415–2426.
- [14] Agarwal A, Nallella K P, Allamaneni S S, et al. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature[J]. Reproductive BioMedicine Online, 2004, 8(6): 616–627.
- [15] Trujillo M, Clippe A, Manta B, et al. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007, 467(1): 95–106.
- [16] Li B, Ngo S, Wu W, et al. Identification and characterization of yak (*Bos grunniens*) *b-Boule* gene and its alternative splice variants[J]. Gene, 2014, 550(2): 193–199.
- [17] 金 帅, 郭 宪, 包鹏甲, 等. 牦牛和犏牛 *Dmrt7* 基因序列分析及其在睾丸组织中的表达水平[J]. 中国农业科学, 2013, 46(5): 1036–1043.
- [18] 屈旭光, 李齐发, 刘振山, 等. 牦牛、犏牛睾丸组织中 *SYCP3* 基因 mRNA 表达水平研究[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(8): 1132–1136.
- [19] 付 伟, 黄 林, 刘文静, 等. 牦牛和雄性不育犏牛睾丸 *FABP5* 和 *FABP9* 基因 mRNA 水平及能量代谢相关酶活力的比较[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(4): 561–567.
- [20] Gu Y, Li Q, Pan Z, et al. Molecular cloning, gene expression and methylation status analysis of PIWIL1 in cattle-yaks and the parental generation[J]. Animal Reproduction Science, 2013, 140(3/4): 131–137.
- [21] Luo H, Zhou Y, Li Y, et al. Splice variants and promoter methylation status of the Bovine Vasa Homology (*Bvh*) gene may be involved in bull spermatogenesis[J]. BMC Genetics, 2013, 14: 58.
- [22] Huang L, Jin S, Xu Y, et al. Quantitation of alternative splicing variants of lactate dehydrogenase *C* gene in testes of adult yak, sexually immature yak calf and sterile male hybrid of yak[J]. Canadian Journal of Animal Science, 2012, 92(3): 291–296.
- [23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [24] Leyens G, Donnay I, Knoops B. Cloning of bovine peroxiredoxins – gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and Primate peroxiredoxins[J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 2003, 136(4): 943–955.
- [25] Pons R H, Sion B, Saez F, et al. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility[J]. Gynécologie Obstétrique & Fertilité, 2009, 37(6): 529–535.
- [26] O'flaherty C, de Souza A R. Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner[J]. Biology of Reproduction, 2011, 84(2): 238–247.
- [27] Doshi S B, Khullar K, Sharma R K, et al. Role of reactive nitrogen species in male infertility[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2012, 10: 109.
- [28] Dubuisson M, van der Stricht D, Clippe A, et al. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase[J]. FEBS Letters, 2004, 571(1/2/3): 161–165.