

小鼠卵 ZP3 蛋白的可溶性表达、纯化及免疫活性鉴定

孙美玉, 马正海, 李永鑫, 吕涛, 陈开旭, 张富春

新疆大学生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程国家重点实验室, 乌鲁木齐 830046

摘要: 哺乳动物卵透明带 3(Zona pellucida 3, ZP3) 在诱导获能精子发生顶体反应中发挥着重要作用, 其在大肠杆菌中主要以包涵体形式表达。本研究在大肠杆菌中诱导表达可溶性的 mZP3 融合蛋白, 并鉴定该蛋白的免疫活性。将小鼠卵透明带 3 克隆至 pMAL-p2x 质粒, 转化至大肠杆菌 BL21 表达菌中。用不同温度、不同 IPTG 浓度、不同诱导时间及不同浓度的添加剂诱导目的蛋白表达, 以筛选出 mZP3 融合蛋白可溶性表达的最佳条件。大量表达纯化后以 Western blotting 和 ELISA 检测蛋白的免疫活性。酶切鉴定及 DNA 测序表明 mZP3 已克隆入 pMAL-p2x 质粒。经优化诱导表达条件, 筛选出 mZP3 融合蛋白可溶性表达的最佳条件为: 当 A_{600} 为 0.6 时添加 0.02 mol/L 葡萄糖, 以 0.6 mmol/L IPTG 于 25°C 条件下诱导表达 4 h。ELISA 及 Western blotting 检测结果表明诱导表达的蛋白具有免疫活性。在大肠杆菌中表达并纯化获得可溶性 mZP3 蛋白, 为 mZP3 免疫不育疫苗研制及其免疫效果检测提供了可溶性抗原。

关键词: 小鼠, 卵透明带 3, 可溶性蛋白, 原核表达

Soluble expression, purification and immunoreactive identification of mouse zona pellucida 3 fusion protein

Meiyu Sun, Zhenghai Ma, Yongxin Li, Tao Lü, Kaixu Chen, and Fuchun Zhang

Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumchi 830046, China

Abstract: Mammalian zona pellucida 3(ZP3) plays an important role in the induction of capacitating sperm acrosome reaction. In this study, we obtained the soluble mZP3 fusion protein and identified its immunoreactivity. mZP3 cDNA was cloned into plasmid pMAL-p2x, and the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21. To get the soluble mZP3 fusion protein, we tried to optimize the expression conditions, including additives, IPTG concentrations, temperatures and induction duration. Then, Western blotting and ELISA were used to identify the immunoreactivity of the purified protein. Based on the optimization experiments, we concluded that the best soluble expression conditions for the mZP3 fusion protein involved incubation to an A_{600} of 0.6, addition of glucose to a final concentration of 0.02 mol/L, addition of IPTG to a final concentration of 0.6 mmol/L and then further incubation for 4 h at 25 °C. Western blotting and ELISA showed that the mZP3 fusion protein retained immunoreactivity. The fusion protein can be used as solubility antigens for developing the immunocontraception vaccines of mZP3 and detecting the immune effects of the vaccine.

Keywords: mouse, zona pellucida 3, soluble protein, prokaryotic expression

Received: January 12, 2009; **Accepted:** July 2, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 307600136), the "ChunHui Projects" of State Education Ministry of China (No. 200603).

Corresponding author: Zhenghai Ma. Tel: +86-991-8583259; Fax: +86-991-8583517; E-mail: mzhxju@xju.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 307600136), 教育部春晖计划(No. 200603)资助。

哺乳动物卵透明带(Zona pellucida, ZP) 是由卵母细胞及颗粒细胞分泌并覆盖于卵母细胞及着床前受精卵外的一层基质, 在卵子发生、精子与透明带的结合、顶体反应、受精作用和胚胎植入前的发育等方面均发挥着重要的作用^[1-3], 并可阻止多精受精。ZP主要由3种糖蛋白(ZP1、ZP2和ZP3)组成, 其中ZP3在受精过程中有2个重要作用: 一是与精子专一性地结合; 二是与精子结合以后诱导精子的顶体反应。鉴于ZP3的重要功能, 人们对其结构和功能进行了广泛的研究^[1-3], 并发现同源和异源抗ZP3抗体均能够阻断精卵结合, 且已有多项研究表明重组的ZP3蛋白免疫动物后亦能诱导产生免疫不育效果^[4-6]。本研究室在前期的研究中已经在大肠杆菌表达系统中表达了小鼠ZP3(mZP3)^[7], 但诱导表达获得的mZP3融合蛋白是以包涵体形式存在的, 要获得有活性的融合蛋白, 需将包涵体蛋白质进行变性及复性处理, 操作步骤繁琐, 且得率不高。降低重组菌的生长温度, 添加可促进重组蛋白质可溶性表达的生长添加剂, 供给丰富的培养基, 提供最佳培养条件(如提供一定量的氧和适当的pH值)等均可以促进重组蛋白质可溶性表达^[8]。有研究报道^[9-12], 含麦芽糖MBP(Maltose-binding protein)标签的原核表达载体可以提高重组蛋白的可溶性表达量。本研究将mZP3 cDNA亚克隆入含MBP标签的融合表达载体pMAL-p2x, 通过探讨不同温度、不同IPTG浓度、不同诱导时间及不同浓度的添加剂诱导目的蛋白表达, 以期获得可溶性的融合蛋白, 为mZP3免疫不育疫苗研制及其免疫效果检测提供可溶性抗原。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体和菌种

pMAL-p2x载体由本室保存, 含mZP3 cDNA的质粒pGEX-4T-1/mZP3由本室构建^[13]。大肠杆菌DH5 α 和BL21由本室保存。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶EcoR I、Xho I、Hind III和Sal I、T4 DNA连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司。抗mZP3抗体由本实验室制备^[14]。辣根过氧化物酶

(HRP)标记的羊抗鼠IgG购自北京博奥森生物技术有限公司。pMAL-p2x亲和层析柱购自New England Bio-Lab。Brandford蛋白定量试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

用EcoR I和Xho I双酶切含mZP3 cDNA的质粒pGEX-4T-1/mZP3, 回收mZP3 cDNA片段, 该片段与同样酶切的pMAL-p2x用T4 DNA连接酶于16 $^{\circ}$ C连接过夜, 连接产物转化至E. coli DH5 α 中, 增菌培养后提取质粒, EcoR I和Xho I双酶切鉴定其正确性, 酶切鉴定正确的重组质粒进行DNA测序。

1.2.2 mZP3融合蛋白质的诱导表达

将测序鉴定正确的重组质粒转化BL21表达菌, 挑取单个菌落, 接种于新鲜的LB(含Amp 50 mg/L)培养基中, 于37 $^{\circ}$ C培养过夜。次日, 按1%接种于新鲜的LB(含Amp 50 mg/L)培养基中。当A₆₀₀达到0.6时, 加入0.6 mmol/L IPTG, 37 $^{\circ}$ C诱导5 h。取1 mL菌液离心收集菌体, 再用PBS洗3次, 悬于1 \times SDS样品加样液中, 置沸水浴中煮3 min。以12 000 \times g离心1 min, 取20 μ L上清液进行SDS-PAGE, 电泳结束后用考马斯亮蓝染色。

1.2.3 mZP3融合蛋白质可溶性表达条件的优化

用上述方法接种10管, 每管5 mL, 37 $^{\circ}$ C培养至A₆₀₀达到0.6时, 在不同温度条件下以不同浓度的IPTG诱导mZP3融合蛋白质表达。设计L9(3⁴)正交实验(温度设25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 3个梯度, IPTG浓度设0.2 mmol/L、0.6 mmol/L、1.0 mmol/L 3个梯度, 时间设3 h、4 h、5 h 3个梯度)优化mZP3融合蛋白可溶性表达的条件。离心收集诱导后的菌体, 用PBS洗涤3遍后, 用1 mL PBS重悬细菌沉淀, 冰浴15 min后, 超声裂解细菌至菌液变清。4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g离心后分别收集上清和沉淀, 沉淀用1 mL PBS重悬。每管样品取40 μ L加入另一新管中, 再加入40 μ L 1 \times SDS样品加样液, 置沸水浴中煮3 min。以12 000 \times g离心1 min, 取20 μ L上清液进行SDS-PAGE, 并以考马斯亮蓝染色。

1.2.4 筛选促进融合蛋白质可溶性表达的添加剂

为了提高重组蛋白质可溶性表达量, 本实验选

择了葡萄糖、盐酸甜菜碱、山梨醇、NaCl 4 种添加剂, 在 IPTG 诱导 mZP3 融合蛋白质可溶性表达的最佳条件下, 分别加入 0.02 mol/L 或 0.01 mol/L 的 4 种添加剂, 诱导并检测融合蛋白的表达。

筛选出促进融合蛋白质可溶性表达的添加剂后, 将该添加剂按 0.02 mol/L、0.06 mol/L、0.1 mol/L 3 个浓度梯度添加至最适诱导表达条件的表达菌中, 诱导并检测融合蛋白的表达。

1.2.5 mZP3 融合蛋白质的大量表达及纯化

在筛选获得的最佳条件下诱导 mZP3 融合蛋白质的表达。鉴定正确的菌种接种于新鲜的 LB(含 Amp 50 mg/L)培养基中, 于 37 °C 培养过夜, 次日按 1% 接种于新鲜的 1 L LB 培养基(含 Amp 50 mg/L)中诱导 4 h 后, 离心收集菌体, 用 PBS 洗涤 3 遍后, 用 100 mL PBS 重悬细菌沉淀, 冰浴 30 min 后, 超声裂解细菌至菌液变清。4 °C、12 000×g 离心 10 min。收集上清, 上清用 0.45 μmol/L 的滤膜过滤后加入预先处理好的 MBP 亲和层析柱中, 按 MBP 亲和层析柱说明书操作。洗脱后的液体取 40 μL 加入另一新管中, 再加入 40 μL 1×SDS 样品加样液, 置沸水浴中煮 3 min。以 12 000×g 离心 1 min, 取 20 μL 上清液进行 SDS-PAGE, 并以考马斯亮蓝染色。纯化的融合蛋白以 Bradford 法进行蛋白定量。

1.2.6 Western blotting 鉴定纯化的蛋白

纯化的 mZP3 融合蛋白经 SDS-PAGE 分离并电转移至硝酸纤维素膜。以 5 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h, 依次滴加 mZP3 免疫鼠血清(室温 2 h、PBS 洗 3 次)及羊抗鼠 IgG-HRP 血清染色(室温反应 1 h、PBS 洗涤 3 次), 最后加底物 DAB 显色并拍照。

1.2.7 ELISA 鉴定纯化的蛋白

ELISA 检测纯化后蛋白质的免疫活性, 一抗为 mZP3 免疫小鼠后的血清, 纯化的 mZP3 蛋白用抗原包被液稀释, 抗原包被量设 1、2、4、8 μg 4 个梯度, 于 4 °C 过夜, 以 1% BSA 于 37 °C 封闭 1 h, 依次滴加 mZP3 免疫鼠血清(37 °C 反应 2 h、血清按 1/100、1/200、1/400 稀释, PBS 洗 3 次)及羊抗鼠 IgG-HRP 血清染色(37 °C 反应 1 h、PBS 洗涤 3 次), 最后加底物 TMB(四甲基联苯胺)显色, 硫酸终止反应, 以酶标仪取显色后各孔的 OD 值。

2 实验结果

2.1 mZP3 原核表达质粒的构建

EcoR I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pMAL-p2x/mZP3, 得到约为 6800 bp 和 1100 bp 的 2 个条带, 与预计相符(图 1)。同时以 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pGEX-4T-1/mZP3 的 DNA 和 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的 pMAL-p2x 载体为参照。

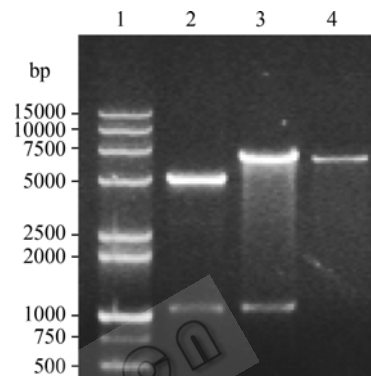


图 1 重组质粒 pGEX-4T-1-mZP3 和 pMAL-p2x-mZP3 的酶切分析

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pGEX-4T-1/mZP3 and pMAL-p2x/mZP3 by enzyme digestion. 1: DNA marker; 2: pGEX-4T-1/mZP3 digested with *EcoR* I and *Xho* I; 3: pMAL-p2x/mZP3 digested with *EcoR* I and *Hind* III; 4: pMAL-p2x digested with *EcoR* I and *Hind* III.

2.2 mZP3 融合蛋白质的表达

将测序鉴定正确的重组质粒 pMAL-p2x-mZP3 转化至 BL21 表达菌中并诱导外源基因表达, 在诱导菌总蛋白和菌体上清中均增加了约 77 kD 的蛋白条带(图 2), 与预计的由 41 kD MBP 标签和 36 kD mZP3 组成的融合蛋白的大小一致, 说明 mZP3 融合蛋白在大肠杆菌中获得表达, 且部分表达的融合蛋白以可溶的形式存在。

2.3 mZP3 融合蛋白表达条件的优化

为获得大量的可溶性目的蛋白, 优化了 mZP3 融合蛋白质的诱导表达条件。用不同的温度、IPTG 浓度、诱导时间诱导 mZP3 融合蛋白质表达, 结果表明在 0.6 mmol/L IPTG 浓度下, 25 °C 诱导 4 h 为 mZP3 融合蛋白质诱导表达的最佳条件(图 3)。

2.4 筛选可促进可溶性重组蛋白质的添加剂

为促进可溶性 mZP3 融合蛋白的表达, 选择 4 种添加剂: 葡萄糖、盐酸甜菜碱、山梨醇和 NaCl; 结果表明, 添加 0.02 mol/L 葡萄糖可显著促进 mZP3

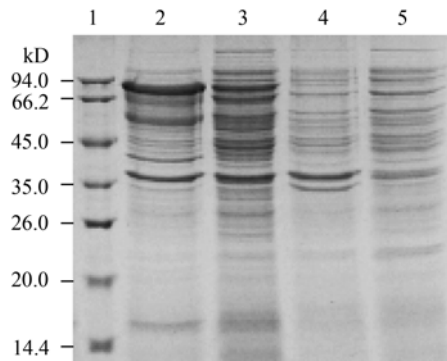


图 2 IPTG 诱导 mZP3 融合蛋白在大肠杆菌中的表达
 Fig. 2 Expression of mZP3 fusion protein in *E. coli* after IPTG addition. The cultures of *E. coli* transformed with pMAL-p2x/mZP3 were analyzed by SDS-PAGE stained with Coomassie blue. 1: protein marker; 2: the whole cell extract following IPTG induction; 3: the supernatant of the culture following IPTG induction; 4: the whole cell extract prior to induction; 5: the whole cell extract of *E. coli* transformed with empty PMAL-p2x following IPTG induction.

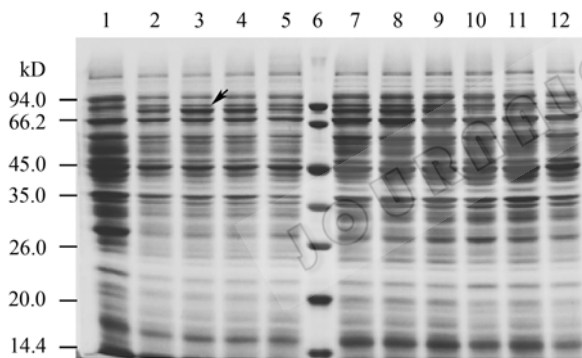


图 3 mZP3 融合蛋白表达条件的优化
 Fig. 3 Optimization of the expression conditions of mZP3 fusion protein. The cultures of *E. coli* transformed with pMAL-p2x/mZP3 were analyzed by SDS-PAGE stained with Coomassie blue. 1: the whole cell extract prior to induction; 2: the whole cell extract following induction with 0.2 mmol/L IPTG for 3 h at 25 °C; 3: the whole cell extract following induction with 0.6 mmol/L IPTG for 4 h at 25 °C; 4: the whole cell extract following induction with 1.0 mmol/L IPTG for 5 h at 25 °C; 5: the whole cell extract following induction with 0.2 mmol/L IPTG for 3 h at 25 °C; 6: protein maker; 7: the whole cell extract following induction with 0.2 mmol/L IPTG for 3 h at 30 °C; 8: the whole cell extract following induction with 0.6 mmol/L IPTG for 4 h at 30 °C; 9: the whole cell extract following induction with 1.0 mmol/L IPTG for 5 h at 30 °C; 10: the whole cell extract following induction with 0.2 mmol/L IPTG for 3 h at 37 °C; 11: the whole cell extract following induction with 0.6 mmol/L IPTG for 4 h at 37 °C; 12: the whole cell extract following induction with 1.0 mmol/L IPTG for 5 h at 37 °C.

融合蛋白的可溶性表达, 可溶性 mZP3 融合蛋白的量占可溶性总蛋白的 15.2%, 而添加盐酸甜菜碱、山梨醇和 NaCl 时, 可溶性 mZP3 融合蛋白的量分别占可溶性总蛋白的 1.3%、6.8%和 6.4%(图 4)。

调整添加葡萄糖的浓度, 结果表明增加葡萄糖浓度后, 融合蛋白的表达量并没有明显的变化(图 5), 故选择添加 0.02 mol/L 葡萄糖以促进融合蛋白的可溶性表达。

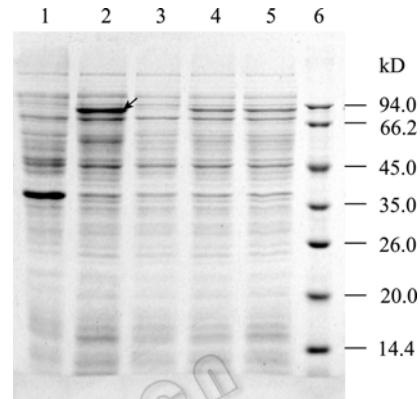


图 4 添加剂对 mZP3 融合蛋白可溶性的影响
 Fig. 4 Effect of solubility of mZP3 fusion protein upon additives. The cultures of *E. coli* transformed with pMAL-p2x/ mZP3 were analyzed by SDS-PAGE stained with Coomassie blue. 1: the whole cell extract prior to induction; 2-5: the whole cell extract following induction with 0.6 mmol/L IPTG for 4 h at 25 °C, and separately addition of glucose, acidol, sorbic alcohol or NaCl to a final concentration of 0.02 mol/L; 6: protein maker.

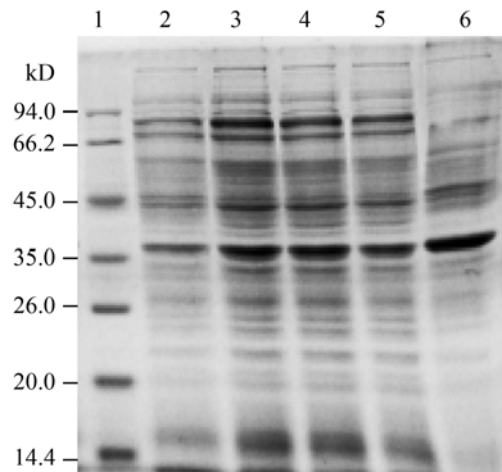


图 5 不同浓度葡萄糖对 mZP3 融合蛋白可溶性的影响
 Fig. 5 Effect of solubility of mZP3 fusion protein upon different concentration of glucose. The cultures of *E. coli* transformed with pMAL-p2x/mZP3 were analyzed by SDS-PAGE stained with Coomassie blue. 1: protein marker; 2-5: the whole cell extract following induction with 0.6 mmol/L IPTG for 4 h at 25 °C, and separately addition of glucose to different final concentration of 0.02 mol/L, 0.06 mol/L or 0.1 mol/L; 6: the whole cell extract prior to induction.

2.5 mZP3 融合蛋白质的纯化及免疫活性鉴定

在 mZP3 可溶性融合蛋白最佳诱导条件下, 添加 0.02 mol/L 葡萄糖。诱导表达后收集菌体, 超声波粉碎后收集上清并经 MBP 亲和层析柱纯化, SDS-PAGE 表明纯化获得 77 kD 的融合蛋白, 但在该条带下有另外几个条带(图 6), 说明部分融合蛋白发生降解。纯化蛋白定量后表明 1 L 菌液可获得 4 mg 纯化蛋白质。以小鼠抗 mZP3 抗体为一抗的 Western blotting 表明纯化的 mZP3 融合蛋白能被 mZP3 抗体特异性地识别(图 7); 以纯化抗原为包被抗原进行的 ELISA 结果表明抗原包被量与抗原抗体反应强度呈正相关(图 8), 以上均说明纯化获得的 mZP3 融合蛋白具有很好的免疫原性。

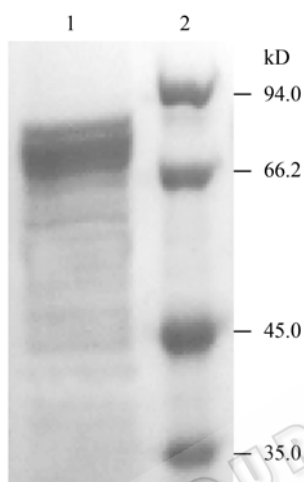


图 6 SDS-PAGE 分析亲和层法纯化的 mZP3 融合蛋白
Fig. 6 SDS-PAGE analysis of mZP3 fusion protein purified by affinity chromatography. 1: mZP3 fusion protein purified with affinity chromatography; 2: protein marker.

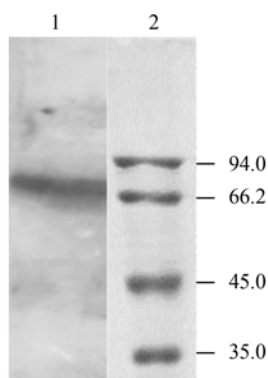


图 7 mZP3 融合蛋白的 Western blotting 分析
Fig. 7 Western blotting analysis of mZP3 fusion protein. 1: the immunoreaction of the mZP3 fusion protein with the anti-mZP3 antibody was determined; 2: protein marker.

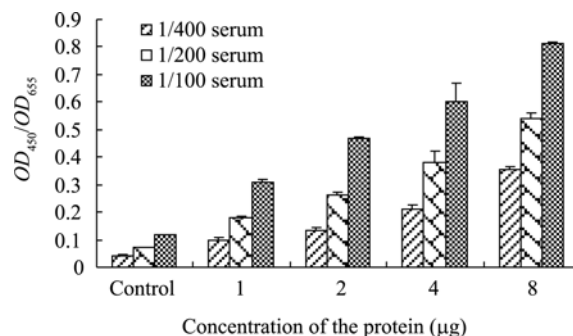


图 8 ELISA 鉴定 mZP3 融合蛋白的免疫活性
Fig. 8 Immune activity of mZP3 fusion protein analyzed by ELISA. The mZP3 fusion protein was diluted and tested with anti-mZP3 antibody in an ELISA.

3 讨论

ZP3 作为精子初级受体介导了精卵结合, 并引发顶体反应, 在受精过程中起着关键作用。ZP3 相对分子质量较小且免疫原性强, 其抗体可有效地阻断精卵结合和哺乳动物的生殖过程, 是免疫不育研究和利用免疫不育技术控制有害动物种群数量的理想靶抗原^[4-6]。近年, 人们趋向于利用 ZP3 重组蛋白、DNA 疫苗和病毒载体疫苗开展免疫不育研究。Borillo 等^[15]的研究表明 ZP3 两个 B 细胞表位的抗体能够影响 ZP 蛋白的组装, 以这 2 个表位短肽的混合物免疫小鼠可导致 ZP 的异常, 从而有效地抑制了卵子受精。Choudhury 等^[16]以表达 ZP 多个表位嵌合蛋白的质粒为 DNA 疫苗免疫小鼠, 能诱导机体产生与 ZP 特异性结合的抗体, 该抗体能有效地阻断 ZP3 与获能精子的结合。Hardy 等^[17]将 ZP3 抗原决定簇与多个其他免疫不育抗原的决定簇融合表达纯化后免疫小鼠, 获得了明显的抗生育效果。最近有研究表明, 表达小鼠 ZP3 的重组鼠巨细胞病毒免疫小鼠后, 不仅能够成功地在实验室和野外诱导小鼠不育^[18], 而且导致 BALB/c 鼠的永久性不育^[19]。

本室已经克隆获得小鼠的 ZP3 基因, 并在原核表达系统中得到表达, 但表达的 mZP3 融合蛋白以包涵体形式存在^[7], 要得到有活性的目的蛋白质, 需将包涵体蛋白质进行变性及复性处理, 操作步骤繁琐, 且得率不高。降低重组菌的生长温度是减少包涵体形成的最常用方法, 较低的生长温度降低了无活性聚集体形成的速率和疏水相互作用, 从而可

减少包涵体的形成^[20]。在诱导表达过程中, 培养基中适当增加添加剂可促进重组蛋白质可溶性表达, 如培养 *E. coli* 时添加高浓度的多醇类、蔗糖或非代谢糖可以阻止分泌到周质的蛋白质聚集, 且适度浓度范围内添加这些添加剂不会影响细胞的生长、蛋白质的合成或运输。另外, 乙醇、低分子量的巯基或二硫化物和 NaCl 等添加剂可促进外源蛋白在大肠杆菌中的正确折叠, 从而促进外源蛋白可溶性表达^[21]。大肠杆菌自身合成或从培养基中吸收一些相容性溶质(Compatible solute)和抗渗透压物质, 如: 甜菜碱、脯氨酸、海藻糖(Trehalose)等^[22], 可提高目的蛋白表达的可溶性和促进目的蛋白的正确折叠; 加入山梨糖醇等则可以稳定蛋白天然结构。Spangfort 等^[23]将 HIV 中 T 淋巴细胞受体 CD4 与麦芽糖融合表达(LB 培养基, 30 °C), 获得了可溶性表达产物。Girish 等^[12]在表达细胞间转运蛋白 MP 及 Giris 等^[24]在表达双联病毒复制起始蛋白 Rep 时, 将其亚克隆至 pMAL 载体上, 诱导蛋白表达时添加了 0.2% 的葡萄糖, 提高了重组蛋白的可溶性表达。任永明等^[25]在培养基中加入甜菜碱和山梨醇, 在高渗下成功地可溶性表达了抗膀胱癌免疫毒素 BDI(scFv)-PE38, 研究还发现葡萄糖的加入对外源蛋白的表达量有显著影响, 提示葡萄糖可能参与了基因表达的调控。

本研究构建了含有 MBP 标签的 mZP3 融合表达载体 pMAL-p2x/mZP3, 以期获得可溶性的 mZP3 融合蛋白。实验中以不同温度、时间、IPTG 浓度诱导目的蛋白的表达, SDS-PAGE 检测(图 3)表明 ZP3 融合蛋白可溶性表达的最佳条件为 A_{600} 达到 0.6 时, 在 0.6 mmol/L IPTG 的诱导下, 25°C 表达 4 h。

实验证明降低温度可以促进 pMAL-p2x/mZP3 蛋白的可溶性表达。为了提高目的蛋白的可溶性表达, 在筛选出 mZP3 融合蛋白可溶性表达条件的基础上, 选择葡萄糖、盐酸甜菜碱、山梨醇和 NaCl 为添加剂, 诱导表达的结果(图 5)表明葡萄糖可促进 mZP3 融合蛋白的可溶性表达, 葡萄糖的最佳浓度为 0.02 mol/L。基于以上筛选获得的条件, 在大肠杆菌中大量诱导表达了 mZP3 融合蛋白, 超声后的上清经 MBP 亲和层析柱纯化获得了 mZP3 融合蛋白,

SDS-PAGE 表明在 77 kD mZP3 融合蛋白条带之下出现几个较小的条带, 增加洗脱液盐浓度并没有明显改善, 说明 mZP3 融合蛋白发生了部分降解。

Western blotting 的结果(图 7)表明纯化获得的 mZP3 融合蛋白具有免疫原性; 以纯化抗原为包被抗原进行的 ELISA 表明抗原包被量与抗原抗体反应强度呈正相关(图 8), 以上均说明纯化获得的 mZP3 融合蛋白具有很好的免疫原性, 能够作为蛋白免疫和免疫检测用抗原, 为小鼠 mZP3 不育疫苗的研究提供了抗原。

REFERENCES

- [1] Wassarman PM, Litscher, ES. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int J Dev Biol*, 2008, **52**(5/6): 665-676.
- [2] Martinova Y, Petrov M, Mollova M, *et al.* Ultrastructural study of cat zona pellucida during oocyte maturation and fertilization. *Anim Reprod Sci*, 2008, **108**(3/4): 425-434
- [3] Chiu PC, Wong BS, Chung MK, *et al.* Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 2008, **79**(5): 869-877.
- [4] Paterson M, Jennings ZA, Wilson MR, *et al.* The contraceptive potential of ZP3 and ZP3 peptides in a primate model. *J Reprod Immunol*, 2002, **53**(1/2): 99-107.
- [5] Smith LM, Lloyd ML, Harvey NL, *et al.* Species-specificity of a murine immunocontraceptive utilising murine cytomegalovirus as a gene delivery vector. *Vaccine*, 2005, **23**(23): 2959-2969.
- [6] Chalabi S, Panico M, Sutton-Smith M, *et al.* Differential O-glycosylation of a conserved domain expressed in murine and human ZP3. *Biochemistry*, 2006, **45**(2): 637-647.
- [7] Zhang FC, Qian D, Ling RY, *et al.* Expression and antiserum preparation of the mouse zona pellucida 3 glycoprotein. *Biotechnology*, 2002, **12**(4): 11-13
张富春, 钱东, 林仁勇. 等. 鼠透明带 3(ZP3)融合蛋白表达以及抗血清制备. *生物技术*, 2002, **12**(4): 11-13.
- [8] Dukkipati A, Park HH, Waghay D, *et al.* BacMam system for high-level expression of recombinant soluble and membrane glycoproteins for structural studies. *Protein Expr Purif*, 2008, **62**(2): 160-170.
- [9] Walcher P, Cui X, Arrow JA. *et al.* Bacterial ghosts as a delivery system for zona pellucida-2 fertility control vaccines for brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Vaccine*, 2008, **26**(52): 6832-6838.
- [10] Yan RQ, Li XS, Yang TY, *et al.* Structures and homology modeling of chicken major histocompatibility complex protein class I (BF2 and beta2m). *Mol Immunol*, 2006, **43** (7): 1040-1046.
- [11] Dekker B, Keen H, Lyons S, *et al.* MBP-annexin V

- radiolabeled directly with iodine-124 can be used to image apoptosis *in vivo* using PET. *Nucleic Med Biol*, 2005, **32**(3): 241–252.
- [12] Radhakrishnan GK, Splitter GA, Usha R. DNA recognition properties of the cell-to-cell movement protein (MP) of soybean isolate of Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV-Sb). *Virus Res*, 2008, **131**(2): 152–159.
- [13] Li J, Jin H, Zhang A, *et al.* Enhanced contraceptive response by co-immunization of DNA and protein vaccines encoding the mouse zona pellucida 3 with minimal oophoritis in mouse ovary. *J Gene Med*, 2007, **9**(12): 1095–1103.
- [14] Zhang Y, Li YJ, Liu F, *et al.* The immunocontraceptive effects of *Lagurus lagurus* and *Mus musculus* zona pellucida 3 DNA vaccine. *J Mol Cell Biol*, 2007, **40**(5): 301–308.
张钰, 李轶杰, 刘菲, 等. 草原兔尾鼠和昆明白小鼠卵透明带3DNA疫苗免疫不育效果的研究. *分子细胞生物学报*, 2007, **40**(5): 301–308.
- [15] Borillo J, Coonrod SA, Wu J, *et al.* Antibodies to two ZP3 B cell epitopes affect zona pellucida assembly. *J Reprod Immunol*, 2008, **78**(2): 149–157.
- [16] Choudhury S, Ganguly A, Chakrabarti K, *et al.* DNA vaccine encoding chimeric protein encompassing epitopes of human ZP3 and ZP4: immunogenicity and characterization of antibodies. *J Reprod Immunol*, 2009, **79**(2): 137–147.
- [17] Hardy CM, Beaton S, Hinds LA. Immunocontraception in mice using repeated, multi-antigen peptides: immunization with purified recombinant antigens. *Mol Reprod Dev*, 2008, **75**(1): 126–135.
- [18] Gorman S, Lloyd ML, Smith LM, *et al.* Prior infection with murine cytomegalovirus (MCMV) limits the immunocontraceptive effects of an MCMV vector expressing the mouse zona-pellucida-3 protein. *Vaccine*, 2008, **26**(31): 3860–3869.
- [19] O’Leary S, Lloyd ML, Shellam GR, *et al.* Immunization with recombinant murine cytomegalovirus expressing murine zona pellucida 3 causes permanent infertility in BALB/c mice due to follicle depletion and ovulation failure. *Biol Reprod*, 2008, **79**(5): 849–860.
- [20] Xie Y, Wetlaufer DB. Control of aggregation in protein refolding: the temperature-leap tactic. *Protein Sci*, 1996, **5**(3): 517–523.
- [21] Georgiou G, Valax P. Expression of correctly folded protein in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1996, **7**(2): 190–197.
- [22] Roberts MF. Osmoadaption and osmoregulation in archaea. *Front Biosci*, 2000, **5**: 796–812.
- [23] Spangfort MD, Ipsen H, Sparholt SH, *et al.* Characterization of purified recombinant Betv1 with authentic N-terminus, cloned in fusion with maltose-binding protein. *Protein Expr Purif*, 1996, **8**(3): 365–373.
- [24] Girish KR, Palanivelu S, Kumar PD, *et al.* Refolding, purification and characterization of replication-initiator protein from soybean-infecting geminivirus. *J Virol Methods*, 2006, **136**(1/2): 154–159.
- [25] Ren YM, Zhang MS, He D, *et al.* Compatible-solute-supported periplasmic expression of recombinant immunotoxins and the effects of glucose thereby. *Hereditas*, 2003, **25**(1): 40–44.
任永明, 张明生, 何丹, 等. 相容性溶质支持下重组免疫毒素的周质腔可溶表达及葡萄糖对其表达的影响. *遗传*, 2003, **25**(1): 40–44.