

草兔卵透明带蛋白 2 的克隆与原核表达

周智敏,韩崇选\*

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**哺乳动物卵透明带蛋白具有极强抗原性,产生的抗卵透明带蛋白抗体可以有效阻碍精卵结合。为了探究草兔卵透明带 2 (zona pellucida 2,ZP2)蛋白抗原性,以及定位抗原表位。根据 Gen-Bank 上欧洲兔的卵透明带 2 基因序列,设计 5'端磷酸化的反转录引物用于合成特异 cDNA 作为模板,通过普通 PCR 扩增草兔 ZP2 基因。测序获得的 2 184 bp 序列比对成功后,预测其信号肽和跨膜区域分别位于 ZP2<sup>35-56</sup> 和 ZP2<sup>698-717</sup>。将克隆获得 954 bp 的 hZP2 基因连入 pET-28a(+)的 EcoR I 和 Xho I 酶切位点之间,成功构建了重组原核表达载体 pET-28a-hZP2 后转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*,*E. coli*)BL21。重组的 *E. coli* BL21 经诱导后表达 41.17 kD 可溶性的 hZP2 融合蛋白,经优化诱导表达体系后,确定较好的诱导条件是 37℃下 0.7 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导 15 h。经 Western blot 鉴定,结果表明相对于表达 ZP2 大片段基因,hZP2 融合蛋白表达量明显提高。  
**关键词:**卵透明带;草兔;抗原表位;ZP2;诱导表达  
**中图分类号:**S764.5      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2016)02-0181-07

Gene Cloning and Prokaryotic Expression of *Lepus Capensis* Zona Pellucida Protein 2  
**ZHOU Zhi-min, HAN Chong-xuan\***  
(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Mammalian zona pellucida (ZP) has great antigenicity. After inoculating, the antibody of ZP can effectively hinder sperm-egg interaction. To understand more about the antigenicity of *Lepus Capensis* ZP2 and map its epitope, we designed a special reverse transcription primer, in which 5' ends were phosphorylated, based on ZP2 cDNA sequence of *Oryctolagus cuniculus*. The first strand of cDNA was synthesized and then acted as template to amplify the open reading frame of *Lepus capensis* ZP2 gene. ZP2 cDNA contained 2 184 nucleotides, its signal peptide and transmembrane helices was located at ZP2<sup>35-56</sup> and ZP2<sup>698-717</sup>, respectively. The hZP2 cDNA was amplified and contained 954 nucleotides. After inserting the hZP2 cDNA into pET-28a(+) plasmids, the recombinant pET-28a-ZP2 vector was then transformed into *Escherichia coli* BL21 competent cells. Temperature, IPTG concentration and time were optimized to increase the level of expression of hZP2 gene. The recombinant *E. coli* BL21 was induced and expressed dissoluble hZP2 fusion proteins, which molecular weight were 41.17 kD. Preferably, recombinant *E. coli* BL21 grew at 37℃ and was induced 15 h using 0.7 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG and then expressed more hZP2 fused proteins. The level of expression of hZP2 fusion proteins was much more than expression of ZP2f fusion proteins.  
**Key words:** zona pellucida; *Lepus Capensis*; epitope; ZP2; optimum expression

草兔 (*Lepus capensis*) 属兔形目旷兔类,广泛分布在亚欧大陆以及非洲<sup>[1]</sup>。主要栖息于田野、灌丛、草丛等林缘地带,以玉米、豆类、嫩枝及树苗等为食,因其危害农作物及苗木,被归为我国有害脊椎动物

收稿日期:2015-04-09    修回日期:2015-05-14  
基金项目:国家林业局林业公益性行业科研专项(201404405)。  
作者简介:周智敏,男,在读硕士,研究方向:草兔数量的免疫不育调控。E-mail:zhouzhimin6@gmail.com  
\* 通信作者:韩崇选,男,研究员,教授,研究方向:有害脊椎动物调控。E-mail:sendakingcat@nwsuaf.edu.cn

之一<sup>[2-3]</sup>。90 年代起,免疫不育技术被澳大利亚科学家引入并有效控制了有害脊椎动物数量<sup>[4-5]</sup>。由于免疫不育疫苗往往具有抗生育作用而不干扰经免疫的动物的其他生殖功能,如临床试验研究表明人绒毛膜促性腺激素(hCG $\beta$ )避孕疫苗不仅有抗生育作用而且不影响人月经周期及正常排卵<sup>[6]</sup>。目前,被视为有效的免疫不育的特异性抗原,主要包括生殖激素抗原、精子抗原和卵透明带(zona pellucida, ZP)抗原<sup>[7-8]</sup>。

哺乳动物卵透明带是由卵细胞分泌的外层基质,其覆盖于卵细胞外并在精卵结合中其关键作用<sup>[9]</sup>。ZP 蛋白已被作为疫苗用于接种多种动物,如兔、鼠等。研究表明接种后,ZP 蛋白可诱发哺乳动物产生相应抗体以阻断卵细胞与精子结合<sup>[10-13]</sup>。ZP 蛋白属于糖蛋白,在许多物种中其主要由 ZP1、ZP2、ZP3 3 种糖蛋白组成<sup>[12,14]</sup>。在功能上,ZP3 蛋白被认为是第一精子受体,其能够识别并结合顶体完整的精子并诱发顶体反应<sup>[15]</sup>,而后由第二精子受体 ZP2 蛋白结合已发生顶体反应的精子<sup>[16-17]</sup>,Rankin 及其同事的研究发现不同于正常 ZP 蛋白三维网状结构,ZP2 基因敲除的小鼠,由于卵细胞只有 ZP1 与 ZP3 构成的纤薄的 ZP 蛋白结构而无法结合精子并使得小鼠成功受孕,进一步证实了 ZP 蛋白结构及其功能受 ZP2 蛋白调控<sup>[18]</sup>。而 Wassarman 对小鼠的研究结果表明 ZP1 只起到连接 ZP2 与 ZP3 的作用<sup>[19]</sup>。因此,以上研究结果表明 ZP3 和 ZP2 蛋白可能成为合适的抗原。在对 ZP3 蛋白研究中发现不同于原核表达兔 ZP3 蛋白,用杆状病毒表达糖基化的兔 ZP3 蛋白接种雌兔后,雌兔体内检测到了相应抗体<sup>[12,20]</sup>。这与本实验室用大肠杆菌表达的鼯鼠 ZP3 蛋白免疫雌性小鼠获得 23% 不育率的结果不同,可能解释是在不同物种中 ZP3 蛋白的糖基化对抗原表位影响不同。然而,Skinner 和 Prasad 用兔 ZP3 或重组 ZP3 蛋白作为异源免疫疫苗接种雌兔后,雌兔出现免疫耐受<sup>[20-21]</sup>。同时目前研究表明免疫 ZP3 后,ZP3 上的 T 细胞表位能够引起自身免疫卵巢病变<sup>[22]</sup>。而 Sun 与其同事不仅证实小鼠 ZP2 蛋白的 B 表位和 T 细胞表位位于 ZP2<sup>121-140</sup>,且发现用 ZP2 蛋白接种小鼠后未出现卵巢病变,表明 ZP2 蛋白的 T 细胞表位具有隐蔽性<sup>[23]</sup>。

抗原表位又称抗原决定簇,其决定了抗原的特异性,能被包括抗体、B 细胞或 T 细胞等免疫系统所识别。为了进一步证实草兔 ZP2 蛋白的 B 表位和 T 细胞表位是否与小鼠相同,并最终制备有效的

避孕肽疫苗,本研究拟通过特异 RACE 技术克隆草兔 ZP2 全长基因<sup>[24]</sup>,拟构建原核表达载体,在原核大肠杆菌中表达草兔 ZP2 基因 C 端,通过电泳分析以及 Western Blot 检测其表达情况,为进一步定位草兔 ZP2 蛋白的抗原表位奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 草兔捕自陕西渭北黄土高原区(咸阳市境内),雌性。

1.1.2 菌株与质粒 菌株:克隆菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、原核表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)购自北京全世金生物;质粒:克隆载体 pMD<sup>TM</sup> 19-T simple Vector 购自大连 TaKaRa 公司,原核表达载体 pET-28a(+)购自 Novagen 公司。

1.1.3 主要试剂 动物组织 RNA 提取试剂盒、2 $\times$ Taq MasterMix、DNA Marker、鼠抗 His 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自北京康为世纪生物科技有限公司,通用型 DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自北京天根生物技术有限公司,快速限制性内切酶 XhoI/EcoRI、DNA Maker、蛋白 Maker 购自北京全世金生物科技有限公司,RQ1 RNase-Free DNase 购自美国 Promega 公司,RevertAid<sup>TM</sup> First strand cDNA Synthesis Kit 购自美国 Fermentas 公司,DNA Ligation Kit Ver. 2.1 购自大连 TaKaRa 公司,SDS、 $\beta$ -巯基乙醇、APS、卡那霉素、甘氨酸购自美国 Amresco 公司,琼脂粉、IPTG、氨苄青霉素购自北京索来宝公司,Western Bright<sup>TM</sup> ECL /Peroxide 试剂盒购自美国 Advansta 公司。

1.2 方法

1.2.1 草兔卵巢总 RNA 的提取 野外捕获活的雌性草兔,处死后固定于已消毒的解剖台。用灭过菌剪刀沿腹中线剪开取出卵巢,放入已灭菌铝箔纸并包好放入液氮中。取 1 个卵巢在液氮中充分研磨后,按照动物组织 RNA 提取试剂盒操作流程提取卵巢总 RNA,经 RQ1 RNase-Free DNase 纯化并以其为模板,用于合成 cDNA 第一链。

1.2.2 cDNA 第一链的合成及环化 根据 NCBI 上欧洲兔(*Oryctolagus cuniculus*)的 ZP2 基因序列,设计 1 条反转录引物 RT-R: 5'- pTTAGT-GACTTAACATCATGGTCCTCTTTT-3'。RT 反应组分为:3.0  $\mu$ L 总 RNA,1.0  $\mu$ L 引物 RT-R,8.0  $\mu$ L 无核糖核酸酶的超纯水,4.0  $\mu$ L 5 $\times$ 反应缓冲液,0.5  $\mu$ L 核糖核酸酶抑制剂,2.0  $\mu$ L 10 mmol

• L<sup>-1</sup> dNTP 混合液, 1.0 μL 反转录酶。反转录反应条件为 42℃ 60 min, 70℃ 5 min。合成 cDNA 第一链后, 冰浴条件下分别加入: 2.0 μL 10× 反应缓冲液, 17.8 μL 无核糖核酸酶的超纯水, 0.2 μL Rnase H 37℃ 孵育 1 h 以降解 RNA, 最后加入 2.5 μL 0.5 mmol • L<sup>-1</sup> EDTA 以终止反应。无水乙醇沉淀纯化第一链 cDNA 后, T4 DNA 连接酶 16℃ 环化单链 cDNA, 作为 PCR 模板。

1.2.3 草兔 ZP2 基因克隆 根据欧洲兔的 ZP2 基因序列设计 1 对引物 ZP2-F: 5'-ATGCAGGT-GAGTAATTCTGGGAG-3', ZP2-R: 5'-TTAGT-GACTTAACATCATGGTCCTCTTTT-3'。25.0 μL PCR 反应体系为: 9.5 μL 超纯水, 12.5 μL 2× ES Taq 混合液, 1.0 μL 引物 ZP2-F (20 pmol • μL<sup>-1</sup>), 1.0 μL 引物 ZP2-R (20 pmol • μL<sup>-1</sup>), 1.0 μL 已环化 cDNA。反应程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 56℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环后, 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶检测后用 DNA 纯化回收试剂盒回收与目的基因片段大小相符的亮带, 连接到 pMDTM19-T 载体中后, 转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。挑选 5 管阳性克隆送往上海生工生物测序, 测序上下游引物选用 pMD<sup>TM</sup>19-T 载体的通用引物。

1.2.4 草兔 ZP2 基因的生物信息学分析 在 NCBI 的 nucleotide blast 中, 草兔 ZP2 基因序列与数据库里的核酸序列进行比对分析。利用 BioXM 软件将草兔 ZP2 基因序列翻译成氨基酸序列后, 利用 SignalP 4.1 和 TMHMM Server v. 2.0 软件预测 ZP2 的信号肽和跨膜区域。最终提交完整的草兔 ZP2 开放阅读框 DNA 序列及相关信息至 GenBank。

1.2.5 草兔 ZP2 基因原核表达载体的构建 根据草兔的 ZP2 基因序列设计 5' 端分别添加 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点(下划线部分)的 1 对引物 ZP2-f: 5'-GGAAATTCATGTTTCCTGGGAAGCTAGA-3', ZP2-r: 5'-CCTCGAGGGTCTTCACATCGAACC-3'。以阳性克隆重组 *E. coli* DH5α 为模板, 菌液 PCR 获得草兔 ZP2 基因片段, 简称 *hZP2* 基因。*hZP2* 基因连接到 pMD<sup>TM</sup>19-T 载体中后, 转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。*Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切原核表达载体 pET-28a(+), 以及从测序正确的阳性克隆提取的重组质粒 pMD<sup>TM</sup>19-T-*hZP2*, 分别回收线性 pET-28a(+) 和 ZP2 相符片段, 经 DNA 连接酶连接后转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。*Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定后, 挑选 2 管阳性克隆送往上

海生工生物测序, 测序上下游引物选用 pET-28a(+) 载体的通用引物。将成功重组的质粒 pET-28a-*hZP2* 转化原核表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 挑选 3 管阳性克隆送往上海生工生物测序。阳性克隆菌液 -20℃ 保存待用。

1.2.6 *hZP2* 基因在 *E. coli* BL21 中的诱导表达体系优化 培养测序正常的重组 *E. coli* BL21 至 OD<sub>600</sub> 为 0.6 后, 优化诱导条件: 诱导温度 (20℃、25℃、30℃、37℃), 诱导时间 (4、6、15 h), IPTG 浓度 (0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.2、1.5、2.0 mmol • L<sup>-1</sup>), 经不同诱导条件诱导后获得样品, 通过 SDS-PAGE 电泳后, 分析电泳成像结果以确定较好的诱导条件。

1.2.7 Western blot 鉴定重组 *hZP2* 融合蛋白表达 确定较好的诱导条件后, 其对应的样品经 SDS-PAGE 电泳后, 将与重组 *hZP2* 蛋白分子量大小相近条带从凝胶中转至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入按 1:5 000 稀释过的鼠抗 His 单克隆抗体, 4℃ 下孵育过夜。TBST 洗膜 4 次后, 再加入按 1:5 000 稀释过的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 37℃ 孵育 2 h。TBST 洗脱 4 次后, Western Bright<sup>TM</sup> ECL / Peroxide 试剂盒显色后拍照并观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 草兔 ZP2 基因克隆

草兔卵巢总 RNA 提取、纯化后, 紫外分光光度计测其浓度为 464.04 ng • μL<sup>-1</sup>, A260/A280 为 1.979, 进一步用 1% 琼脂糖凝胶检测(图 1A)。图中可见 28SrRNA 和 18SrRNA 条带的亮度和宽度比值近似 2:1。以反转录后环化的 cDNA 为模板, 克隆得到草兔 ZP2 基因(图 1B)。长 2 184 bp, 可编码 727 个氨基酸(图 2)。与 GenBank 数据库里的其他物种 ZP2 核酸序列相似度分别为: 欧洲兔 96%、小家鼠 84%、美国鼠兔 84%、眼镜猴 82%。比对结果初步说明被克隆的是 ZP2 基因。

### 2.2 草兔 ZP2 基因序列的生物信息学分析

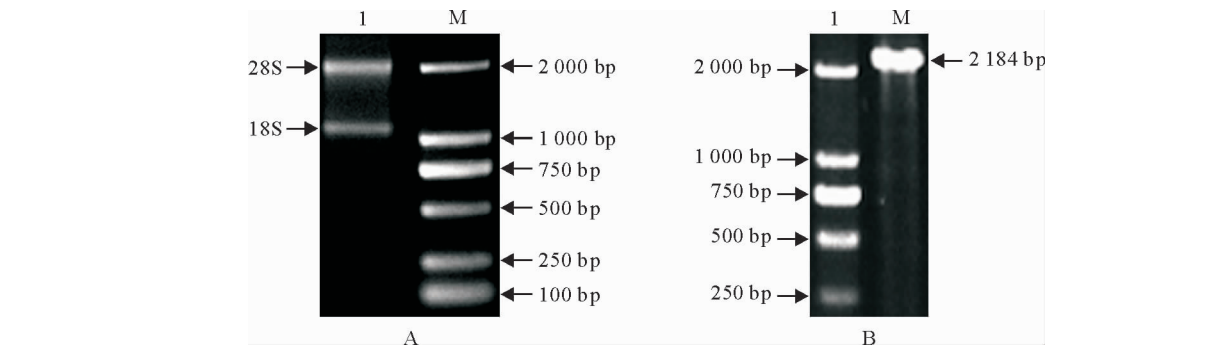
经 SignalP 4.1 和 TMHMM Server v. 2.0 软件分析 ZP2 的氨基酸序列, 预测出 ZP2 的信号肽位于 ZP2<sup>35-56</sup> 并与图 2 中下划线标出(图 2, 图 3A), 而跨膜区域位于 ZP2<sup>698-717</sup> 并与图 2 中下划线标出(图 2, 图 3B)。将完整的草兔 ZP2 开放阅读框 DNA 序列提交到 GenBank 中并获得登录号 No. KJ921615.1。

### 2.3 重组原核表达载体 pET-28a-*hZP2* 的鉴定

克隆获得 *hZP2* 基因序列长 954 bp, 编码 317

个氨基酸。*hZP2* 连入 pET-28a(+)后转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,利用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定重组 *E. coli* DH5 $\alpha$  的阳性克隆(图 4)。图上显示 pET-28a-*hZP2* 经 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切后分成两部分,其中有一略小于 1 000 bp 条带与 *hZP2* 基因大小相

符。重组 *E. coli* DH5 $\alpha$  和 *E. coli* BL21,挑选阳性克隆测序,获得序列与上述 *ZP2* 开放阅读框基因序列比对,序列完全匹配且无突变。结果表明成功获得重组载体 pET-28a-*hZP2*,且目的基因 *hZP2* 成功导入 *E. coli* BL21。



注:M;DNA Maker DM 2 000,A1;草兔卵巢总 RNA,B1;*ZP2* 开放阅读框基因全长。

图 1 草兔 *ZP2* 基因开放阅读框克隆

Fig. 1 Cloning of *Lepus capensis* zona pellucida 2 gene

1	ATG	CAG	GTG	AGT	AAT	TCT	GGG	AGC	AGG	GGG	AAA	GGA	TTG	CCA	TGG	CCT	AGC	TTG	ACA	AAG	TTC	ACT	TCC	CCT	TAC	CTC	TCT	CCT	CCA	TCC	90	
1	Met	Gln	Val	Ser	Asn	Ser	Asn	Ser	Gly	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Leu	Pro	Trp	Pro	Ser	Leu	Thr	Lys	Phe	Thr	Ser	Pro	Tyr	Leu	Ser	Pro	Ser	30
91	TCT	TCT	AGC	GCC	CGT	GCA	CGG	CTG	CTT	CTC	TTC	TTC	GCT	CTT	GTG	GCT	TTG	GTG	AAC	TCC	ATA	GAT	TTT	CTT	CAG	TTG	TCA	GGT	CCT	GTC	180	
31	Ser	Ser	Ser	Ala	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Leu	Val	Ala	Leu	Val	Asn	Ser	Ile	Asp	Phe	Leu	Gln	Leu	Ser	Gly	Pro	Val	60	
181	TTC	CCA	GGA	ACT	CTC	ACC	TGT	AAC	GAA	AAT	GAA	ATA	ATA	GTA	GAG	TTT	CCC	AGC	TAT	GTT	GGC	ACC	AAG	ACA	TTG	CAC	GCA	TCT	GTG	GTA	270	
61	Phe	Pro	Gly	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Glu	Asn	Glu	Ile	Ile	Val	Glu	Phe	Pro	Ser	Tyr	Val	Gly	Thr	Lys	Thr	Leu	His	Ala	Ser	Val	Val	90	
271	GAT	CCC	CTT	GGT	GTT	GAA	ATG	CTG	AAC	TGT	ACC	TAT	ATC	CTG	GAC	CCA	GAA	AAG	CTA	ACC	TTA	AGA	GTT	CCA	TAT	AAG	GCC	TGT	ACC	AAG	360	
91	Asp	Pro	Leu	Gly	Val	Glu	Met	Leu	Asn	Cys	Thr	Tyr	Ile	Leu	Asp	Pro	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu	Arg	Val	Pro	Tyr	Lys	Ala	Cys	Thr	Lys	120	
361	CGC	GTG	CAC	GGC	GGA	CAC	CAG	ATG	AGC	ATC	AGA	GTC	ATG	AAC	AAC	AGT	GCT	GCT	TTA	AGA	CAC	ACA	GAT	GTT	GAG	TAT	CAG	TTC	TTC	TGC	450	
121	Ala	Val	His	Gly	Gly	His	Gln	Met	Ser	Ile	Arg	Val	Met	Asn	Ser	Ala	Ala	Leu	Arg	His	Thr	Asp	Val	Glu	Tyr	Gln	Phe	Phe	Cys	Lys	150	
451	CCA	GTA	GAA	CAG	ACC	CTG	GAG	TTC	TCA	AAA	TCG	GCA	GTC	TGC	ACT	AAG	GAC	TTT	ATG	TCT	CTT	CCC	TTT	CCA	CAT	ATT	CCT	ACT	GGC	TTT	540	
151	Pro	Val	Glu	Gln	Thr	Leu	Glu	Phe	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Cys	Thr	Lys	Asp	Phe	Met	Ser	Leu	Pro	Phe	Pro	His	Ile	Pro	Thr	Gly	Phe	180	
541	GGT	GAT	AGC	ACT	ATG	GTA	AAC	CAA	TCT	CAG	ATG	GGA	TGG	ATG	GTT	CAG	GTT	GGT	CAT	GGT	CCA	GGA	GCC	CAA	ACT	CTA	AGC	CTG	GAG	GAG	630	
181	Gly	Asp	Ser	Thr	Met	Val	Asn	Gln	Ser	Gln	Met	Gly	Trp	Met	Val	Gln	Val	Gly	His	Gly	Pro	Gly	Ala	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Glu	Glu	210	
631	GCC	AAA	GGA	CAA	GGA	TTT	GGT	GTT	CTG	ATT	GAT	GAC	AAC	AAG	ATG	ACC	CTC	AAT	GTG	CTA	TCC	AAT	GCC	ACT	GGA	GTG	ACT	CAC	TAT	GTG	720	
211	Ala	Lys	Gly	Gln	Gly	Phe	Gly	Val	Leu	Ile	Asp	Asp	Asn	Lys	Met	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Ser	Asn	Ala	Thr	Gly	Val	Thr	His	Tyr	Val	240	
721	GAA	GGT	ACC	AGT	CAT	CTC	CAC	ACC	GTG	TTT	CTG	AAG	CTT	TCA	TTC	GTA	TCT	CCT	GGA	CAG	AAG	ATG	ACT	TTT	TCA	TCA	CGA	GCT	ATT	TGT	810	
241	Glu	Gly	Thr	Ser	His	Leu	His	Thr	Val	Phe	Leu	Lys	Leu	Ser	Phe	Val	Ser	Pro	Gly	Gln	Lys	Met	Thr	Phe	Ser	Ser	Arg	Ala	Ile	Cys	270	
811	TTG	TCA	GGT	CCT	GTG	ACG	TGT	AAT	GCT	ACG	CAT	ATG	ACT	CTC	ACC	ATA	CCA	GAA	TTT	CCT	GGG	AAG	CTA	GAG	TCT	GTG	AGC	ATT	GAA	AAC	900	
271	Leu	Ser	Gly	Pro	Val	Thr	Cys	Asn	Ala	Thr	His	Met	Thr	Leu	Thr	Ile	Pro	Glu	Phe	Pro	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Glu	Asn	300	
901	AGG	AAC	ATT	ACA	GTG	AGC	GAG	CTG	CGT	GAC	GAG	GGG	ATT	GAT	GCA	GAA	GCA	GTA	AAT	GGC	TTA	AGA	CTG	CAT	TTT	AAC	AAA	ACT	GTT	CTC	990	
301	Arg	Asn	Ile	Thr	Val	Ser	Gln	Leu	Arg	Asp	Gln	Gly	Ile	Asp	Ala	Glu	Ala	Val	Asn	Gly	Leu	Arg	Leu	His	Phe	Asn	Lys	Thr	Val	Leu	330	
991	AGA	ACA	AAA	TTC	TCT	GAA	AAA	TGC	CTC	CAT	GAT	CAG	CTC	TAC	GTA	TCT	TCA	CTC	AAG	TTG	ACC	TTT	AAC	TTC	GAA	CTG	GAT	ACA	GTA	TCC	1080	
331	Arg	Thr	Lys	Phe	Ser	Glu	Lys	Cys	Leu	His	Asp	Gln	Leu	Tyr	Val	Ser	Ser	Leu	Lys	Leu	Thr	Phe	Asn	Leu	Glu	Leu	Asp	Thr	Val	Ser	360	
1081	ACA	GTG	ATT	AAT	CCC	GAG	TGC	CTT	TGT	GAC	TCA	CCA	GCT	TCT	ATA	GTT	TCA	GGT	GAG	CTT	TGT	ACC	CAG	GAT	GGG	TTT	ATG	GAC	TTT	GAG	1170	
361	Thr	Val	Ile	Asn	Pro	Glu	Cys	Leu	Cys	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Val	Ser	Gly	Glu	Leu	Cys	Thr	Gln	Asp	Gly	Phe	Met	Asp	Phe	Glu	390	
1171	GTC	TAC	ACC	CAC	CAA	ACC	AAA	CCA	GCT	CTC	AAC	TTG	GAT	ACC	CTC	AGG	GTA	GGA	AGT	TCA	TCC	TGC	CAA	CCT	GTC	TTT	AAG	GCT	CAG	TCG	1260	
391	Val	Tyr	Thr	His	Gln	Thr	Lys	Pro	Ala	Leu	Asn	Leu	Asp	Thr	Leu	Arg	Val	Gly	Ser	Ser	Ser	Cys	Gln	Pro	Val	Phe	Lys	Ala	Gln	Ser	420	
1261	CAG	GGG	CTG	GTA	AGG	TTT	CAC	ATA	CCT	CTG	AAT	GGA	TGT	GGA	ACA	ATA	CAC	AAG	TTT	GAA	GAT	GAG	AAA	GTC	ATT	TAT	GAA	AAT	GAA	GTA	1350	
421	Gln	Gly	Leu	Val	Arg	Phe	His	Ile	Pro	Leu	Asn	Gly	Cys	Gly	Thr	Ile	His	Lys	Phe	Glu	Asp	Glu	Lys	Val	Ile	Tyr	Glu	Asn	Glu	Val	450	
1351	CAT	GCT	CTC	TGG	GAA	AAT	CTT	CCT	CCA	AGC	AAA	ATA	TCC	AGA	GAT	AGT	GAA	TTC	AGA	ATG	ACA	GTG	AAG	TGC	TAT	TAC	ATC	AGA	GAT	GAC	1440	
451	His	Ala	Leu	Trp	Glu	Asn	Leu	Pro	Pro	Ser	Lys	Ile	Ser	Arg	Asp	Ser	Glu	Phe	Arg	Met	Thr	Val	Lys	Cys	Tyr	Tyr	Ile	Arg	Ser	Asp	480	
1441	ATG	CTA	CTC	AAT	GCC	AAT	ATC	AAA	AGT	CTT	TCT	CCT	CCT	GTC	GCC	TCA	GTG	AAG	CCA	GGT	CCA	CTT	GCT	TTG	AGC	CTG	CNA	ACC	TAC	CCA	1530	
481	Met	Leu	Leu	Asn	Ala	Asn	Ile	Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Pro	Val	Ala	Ser	Val	Lys	Pro	Gly	Pro	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	510	
1531	GAT	GAG	TCC	TAT	CTG	CAG	CCT	TAC	AGG	GTC	AAT	GAG	TAC	CCT	ATA	GTG	AAA	TAC	CTC	CGC	CAA	ACA	ATT	TAC	ATG	GAA	GTG	AGA	GTC	CTA	1620	
511	Asp	Glu	Ser	Tyr	Leu	Gln	Pro	Tyr	Arg	Val	Asn	Glu	Tyr	Pro	Ile	Val	Lys	Tyr	Leu	Arg	Gln	Pro	Ile	Tyr	Met	Glu	Val	Arg	Val	Leu	540	
1621	AAT	AGA	AAT	GAC	CCC	AAT	ATC	AAG	CTG	GCC	CTA	GAT	GAC	TGC	TGG	GCA	ACA	TCT	TCC	AAG	GAC	ACA	GCA	TCT	CTC	CCC	AAA	TGG	AGT	ATT	1710	
541	Asn	Arg	Asn	Asp	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Ala	Leu	Asp	Asp	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser	Lys	Asp	Pro	Ala	Ser	Leu	Pro	Pro	Lys	Thr	Ser	Ile	570
1711	GTC	ATG	GAT	GGC	TGT	GAG	TAT	AGC	CTG	GAC	AAC	TAT	CAA	ACT	AAC	TTT	CAC	CCA	GTT	GGC	TCC	TCT	GTG	ACC	CAT	CCT	GAG	CAC	TAC	CAG	1800	
571	Val	Met	Asp	Gly	Cys	Glu	Tyr	Ser	Leu	Asp	Asn	Tyr	Gln	Thr	Asn	Phe	His	Pro	Val	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	His	Pro	Glu	His	Tyr	Gln	600	
1801	AGG	TTT	CAT	GTG	AAG	ACC	TTT	GCC	TTT	GTA	TCA	GAG	GCC	CAA	GCA	CTC	TCT	AGC	CTG	GTC	TAC	TTT	CAC	TGC	AGT	GCC	TAT	ATC	TGC	AAT	1890	
601	Arg	Phe	Asp	Val	Lys	Thr	Phe	Ala	Phe	Val	Ser	Glu	Ala	Gln	Ala	Leu	Ser	Ser	Ser	Leu	Val	Tyr	Phe	His	Cys	Ser	Ala	Leu	Ile	Cys	Asn	630
1891	CAA	TAC	TCT	CCT	GAC	TCT	CCC	TTG	TGC	TCT	GTG	ACT	TGC	TCT	GGG	TCA	TCT	AGA	CAT	AGG	CGA	GCC	ACA	GGG	AAC	ATT	GAA	GAG	GAG	AGA	1980	
631	Gln	Tyr	Ser	Pro	Asp	Ser	Pro	Leu	Cys	Ser	Val	Thr	Lys	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Arg	His	Arg	Ala	Thr	Gly	Asn	Ile	Glu	Glu	Glu	Arg	660	
1981	GTG	ACA	GCC	AGC	CTC	CCA	GGA	CCC	ATT	CTC	CTG	TTA	CCG	AAT	GGC	TCT	TCC	TTC	AGA	GGT	GTT	GGA	ACT	TCC	AGG	CAG	ACT	GGG	ATC	GCT	2070	
661	Val	Thr	Ala	Ser	Leu	Pro	Gly	Pro	Ile	Leu	Leu	Leu	Pro	Asn	Gly	Ser	Ser	Phe	Arg	Gly	Val	Gly	Ala	Asp	Ser	Lys	Glu	His	Gly	Met	Ala	690
2071	GGA	GAT	GTT	GCT	TCT	AAA	ACA	ATG	GCT	GCT	GTG	GCT	GCC	TTA	GCA	GGT	GTA	GTG	GCA	ACT	CTA	GCC	TTC	ATC	AGT	TAC	CTG	TGT	AAA	AAG	2160	
691	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Lys	Thr	Met	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Val	Val	Ala	Thr	Leu	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Leu	Cys	Lys	Lys	720	
2161	AGG	ACC	ATG	ATG	TTA	AGT	CAC	TAA																								
721	Arg	Thr	Met	Met	Leu	Ser	His	*																								

图 2 草兔 *ZP2* 开放阅读框核苷酸序列及其编码氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *L. capensis* *ZP2*

2.4 *hZP2* 基因的诱导表达体系优化

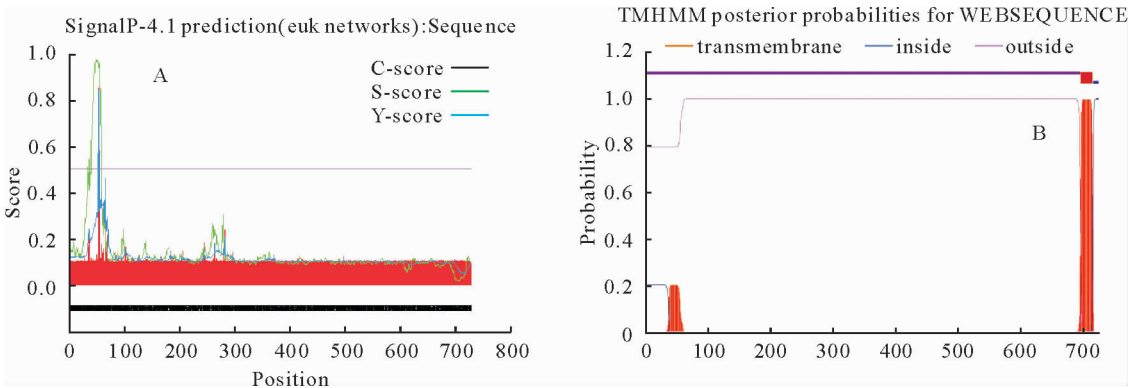
经不同诱导条件诱导后,离心收集菌样进行细胞裂解并离心;上清即为 *E. coli* BL21 表达的总蛋白样品,上样后经过 SDS-PAGE 电泳并成像(图 5)。图上显示不同于对照组,导入 pET-28a-*hZP2*

载体的 *E. coli* BL21 能够诱导表达分子量大小近似 41.17 kD 的条带,表明 *hZP2* 融合表达蛋白具有可溶性。且 1 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 诱导 4 h 后,30℃ 与 37℃ 下条带比其他温度的更亮;6 h 后,30℃ 下条带最亮。而 15 h 后,30℃ 1 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 与 37℃



0.2 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 下条带亮度相近。相同条件下,诱导 15 h 后条带比 6 h 及 4 h 的都亮。37℃ 诱

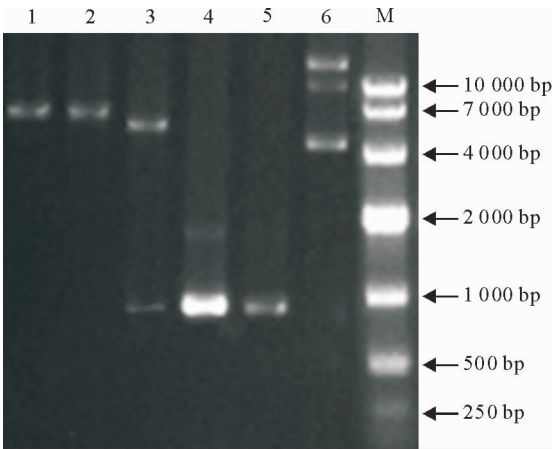
导 15 h 后,0.7 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 诱导 *E. coli* BL21 表达的目的蛋白条带最亮。



注:A:ZP2 氨基酸序列的信号肽预测,B:ZP2 氨基酸序列的跨膜区预测。

图 3 ZP2 氨基酸序列的信号肽和跨膜区域预测

Fig. 3 Signal peptide and transmembrane helices prediction of *L. capensis* ZP2



注:M:DNA Marker DM 10 000,1:pET-28a-hZP2 的 *Xho* I 单酶切,2:pET-28a-hZP2 的 *Eco*R I 单酶切,3:pET-28a-hZP2 的 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切,4:未酶切的 *hZP2* 基因,5:*hZP2* 基因的 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切,6:未酶切的 pET-28a-hZP2。

图 4 重组原核表达载体 pET-28a-hZP2 的双酶切鉴定

Fig. 4 Analysis of recombinant pET-28a-hZP2 expression vector by restriction enzyme digestion

2.5 hZP2 基因表达产物的 Western blot 检测

pET-28a(+)载体酶切位点上方有一 6×His 标签,hZP2 基因连入 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切位点后,使得 hZP2 基因 N 端带有 6×His 基因标签,因此 hZP2 融合蛋白作为抗原,能够用鼠抗 His 单克隆抗体进行抗原抗体反应鉴定 hZP2 融合蛋白的表达(图 6)。克隆去除 ZP2 基因信号肽以及跨膜区的 ZP2f 基因,相同条件诱导表达后的蛋白条带明显较 hZP2 融合蛋白暗,而 0.7 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 诱导表达目的蛋白条带较 0.2 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 诱导表达目的蛋白条带粗些,0.2 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 诱导 ZP2f 融合蛋白条带极浅。表明 hZP2 融合蛋白成功表达。

3 结论与讨论

根据欧洲兔的 ZP2 基因序列设计引物无法直接扩得草兔 ZP2 基因开放阅读框全长基因,而设计引物扩增 ZP2 基因 C 端的条带极亮,推测上游引物与草兔 ZP2 基因的 N 端匹配度不高。利用 5'端磷酸化的下游引物合成 cDNA 第一链后,用 Rnase H 水解 DNA:RNA 杂交链上 RNA 后,纯化 cDNA 后经环化作为模板<sup>[24]</sup>。这一步骤去除其他杂 cDNA 干扰,甚者只留下 ZP2 的 cDNA,从而提高克隆成功率。但由于草兔 ZP2 基因有 2 184 bp,所以 PCR 产物条带仍极浅且浓度不足 20 ng · μL<sup>-1</sup>,无法直接送样测序。多次切胶回收并连接克隆载体 pMD<sup>TM</sup>19-T 后转化入 *E. coli* DH5α 才成功获得阳性克隆,通过菌液 PCR 最终获得亮条带并测序成功获得草兔 ZP2 开放阅读框核实序列。

不同物种 ZP2 蛋白分子量大小有所不同,但普遍由 700 多个氨基酸组成。欧洲兔和人类的 ZP2<sup>92-99</sup>表位肽序列:LDPEKLTL,该表位被认为可作为不育免疫抗原,其对应于草兔的 ZP2<sup>104-111</sup>[25]。陈享<sup>[26]</sup>等证实小鼠经 ZP2<sup>121-140</sup>表位肽免疫后,有 50% 雌鼠出现不育。同时,研究表明小鼠的 ZP2<sup>541-555</sup>表位肽诱发的抗体能够阻碍精子受体与卵透明带结合<sup>[27]</sup>。遗憾的是,在欧洲兔与本试验克隆的草兔 ZP2 氨基酸序列中都未发现与小鼠 ZP2<sup>121-140</sup>和 ZP2<sup>541-555</sup>表位肽相同的序列。如图 6 显示,利用 *E. coli* BL21 表达 ZP2 大片段基因时,表达量低;而对于分子量小的 hZP2 蛋白的表达量则明显提高。为了找到草兔 ZP2 基因的抗原表位,并进一步证实是否只有 LDPEKLTL 氨基酸序列可

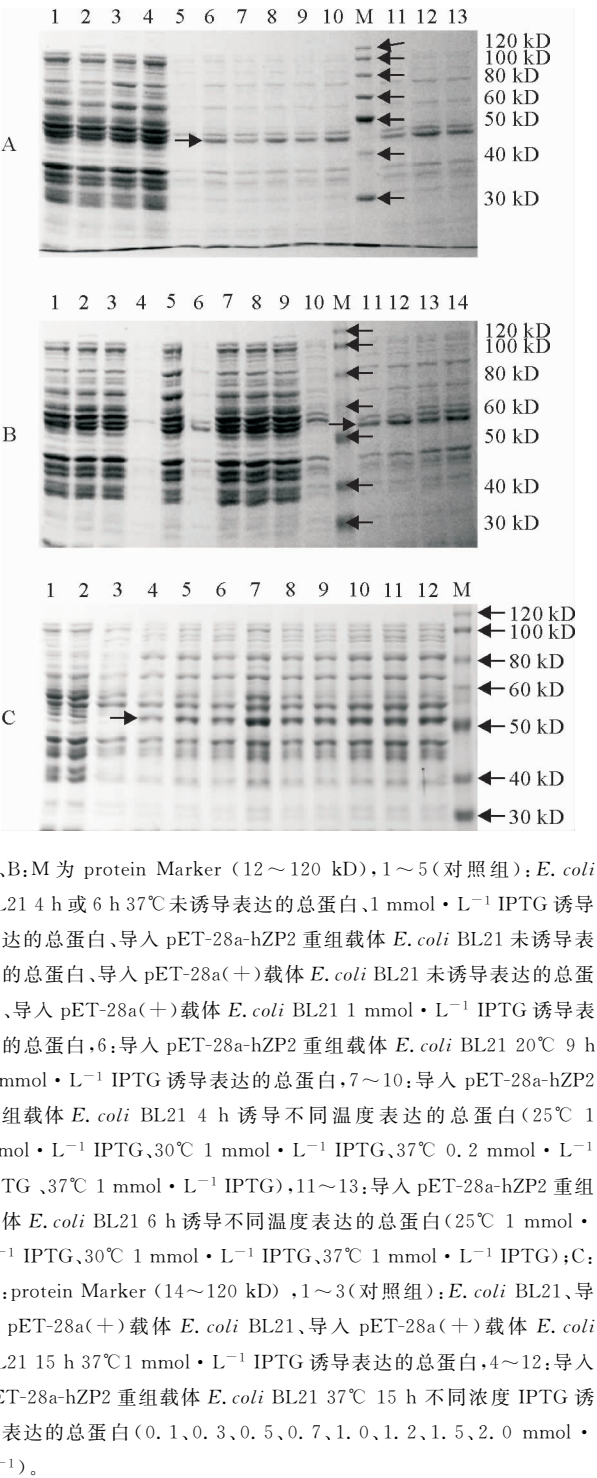


图 5 电泳分析 *E. coli* BL21 诱导表达的总蛋白

Fig. 5 Electrophoretic analysis proteins prepared from the induced recombinant *E. coli* BL21

作为适合抗原表位,同时因为 *E. coli* BL21 不仅有完备的载体系统且能够高效表达多种重组蛋白<sup>[28]</sup>。本试验选取 ZP2 基因的下游序列,将其插入 pET-28a(+ )载体后导入 *E. coli* BL21。由于目的基因是通过酶切位点连接插入载体,所以选择酶切位点前,通过 BioXM 软件分析了目的基因序列以避免选到自身拥有的酶切位点。常用的限制性内切酶以其较

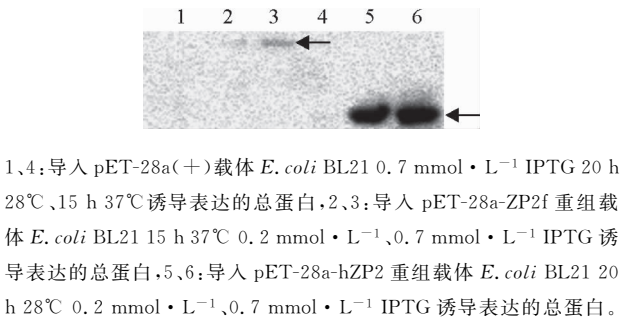


图 6 Western blot 检测融合蛋白的表达

Fig. 6 Western blot analysis of fused protein expression

清楚反应体系而备受青睐,且为了不影响限制性内切酶对酶切位点的识别,2 个酶切位点序列不仅不能重叠还需有一定间隔<sup>[29]</sup>。影响 *E. coli* BL21 中外源基因表达的因素除了重组载体的质量,还有诱导温度、IPTG 诱导剂浓度以及诱导时间等<sup>[30]</sup>。如图 5 显示经诱导表达条件优化,确定较好的诱导条件是 37℃ 下 0.7 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 诱导 15 h。而诱导表达的蛋白主要以可溶形式存在,这有利于后期蛋白的纯化。

对于兔 ZP3 蛋白的研究表明,原核表达兔 ZP3 蛋白无翻译后修饰,所以免疫雌兔后没有抗体产生<sup>[21]</sup>。然而 Sun<sup>[23]</sup> 和陈亨<sup>[26]</sup> 等的研究结果表明用原核表达 ZP2<sup>121-140</sup> 表位肽免疫小鼠后可以检测到对应抗体。本试验优化了重组 *E. coli* BL21 的诱导表达条件,表达目的蛋白 hZP2 融合蛋白的产率能够满足纯化后作为免疫抗原,以用于后期免疫雌兔,检测其不育效率,以此确定对于原核表达 ZP2 蛋白是否可以作为合适抗原。

参考文献:

[1] 李惠萍,张放,韩崇选. 陕西草兔头骨形态的地理学分化[J]. 西北林学院学报,2011,26(1):109-112.

LI H P, ZHANG F, HAN C X. Geographical differentiation in skull morphology of *Lepus capensis* in Shaanxi Province[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(1): 109-112. (in Chinese)

[2] 韩崇选,吕复扬,卜书海,等. 陕西林区啮齿动物群落多样性研究[J]. 西北林学院学报,2004,19(3):99-104.

HAN C X, LU F Y, BU S H, et al. A study on community diversity of harm forest-rodents in Shaanxi [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2004, 19(3): 99-104. (in Chinese)

[3] 张浩,韩崇选,郑雪莉,等. 草兔卵透明带 3(ZP3) 基因的克隆及序列分析[J]. 西北林学院学报,2013,28(6):63-68.

ZHANG H, HAN C X, ZHENG X L, et al. Cloning and sequence analysis of *lepus capensis* Zona Pellucida 3 cDNA [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(6): 63-68. (in Chinese)

[4] COWAN P E, TYNDALE-BISCOE C H. Australian and new

- zealand mammal species considered to be pests or problems [J]. *Reprod Fertil Dev.*, 1997, 9(1): 27-36.
- [5] MCGUIRE B, RUSSELL K D, MAHONEY T, *et al.* The effects of mate removal on pregnancy success in prairie voles (*Microtus ochrogaster*) and meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) [J]. *Biology of Reproduction*, 1992, 47(1): 37-42.
- [6] 李大金. 我国生殖免疫学研究回顾及展望[J]. *中国免疫学杂志*, 2004, 20(1): 18-22.
- [7] KERR L E, PATERSON M, AITKEN R J. Molecular basis of sperm-egg interaction and the prospects for immunocontraception [J]. *J. Reprod Immunol.* 1998, 40(2): 103-118.
- [8] 石建莉, 徐晨. 免疫节育抗原的研究进展[J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(2): 171-177.
- SHI J L, XU C. Progress in the study of immunocontraceptive antigens [J]. *National Journal of Andrology*, 2006, 12(2): 171-177. (in Chinese)
- [9] EPIFANO O, DEAN J. Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception [J]. *Reprod Fertil Dev.*, 1994, 6(3): 319-330.
- [10] GU W, HOLLAND M, JANSSENS P, *et al.* Immune response in rabbit ovaries following infection of a recombinant myxoma virus expressing rabbit zona pellucida protein B [J]. *Virology*, 2004, 318(2): 516-523.
- [11] TSUNODA Y, CHANG M C. In vivo and in vitro fertilization of hamster, rat, and mouse eggs after treatment with anto-hamster ovary antiserum [J]. *J. Exp. Zool.* 1976, 195(3): 409-416.
- [12] DUNBAR B S, AVERY S, LEE V, *et al.* The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression [J]. *Reprod Fertil Dev.*, 1994, 6(3): 331-347.
- [13] MILLAR S E, CHAMOW S M, BAUR A W, *et al.* Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long-term contraception in female mice [J]. *Science*, 1989, 246 (4932): 935-938.
- [14] HARRIS J D, HIBLER D W, FONTENOT G K, *et al.* Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families [J]. *DNA Seq.* 1994, 4(6): 361-393.
- [15] WASSARMAN P M. Profile of a mammalian sperm receptor [J]. *Development*, 1990, 108(1): 1-17.
- [16] BLEIL J D, WASSARMAN P M. Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm [J]. *J. Cell Biol.*, 1986, 102(4): 1363-1371.
- [17] BLEIL J D, GREVE J M, WASSARMAN P M. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs [J]. *Dev. Biol.*, 1988, 128(2): 376-385.
- [18] RANKIN T L, COLEMAN J S, EPIFANO O, *et al.* Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs [J]. *Dev. Cell.* 2003, 5(1): 33-43.
- [19] WASSARMAN P M. Zona pellucida glycoproteins [J]. *Ann. Rev. Biochem.* 1988, 57: 415-442.
- [20] PRASAD S V, MUJTABA S, LEE V H, *et al.* Immunogenicity enhancement of recombinant rabbit 55-kilodalton zona pellucida protein expressed using the baculovirus expression system [J]. *Biol. Reprod.*, 1995, 52 (5): 1167-1178.
- [21] SKINNER S M, NIU E M, BUNDMAN D S, *et al.* Use of immunoaffinity purified antibodies to zona pellucida to compare alloimmunization of male and female rabbits [J]. *J. Reprod. Immunol.* 1987, 12 (2): 81-92.
- [22] RHIM S H, MILLAR S, ROBEY F, *et al.* Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the mouse zona pellucida [J]. *J. Clin. Invest.*, 1992, 89(1): 28-35.
- [23] SUN W, LOU Y H, DEAN J, *et al.* A contraceptive peptide vaccine targeting sulfated glycoprotein ZP2 of the mouse zona pellucida [J]. *Biol. Reprod.*, 1999, 60(4): 900-907.
- [24] 李秋莉, 高晓蓉, 范琦, 等. 反向嵌套 PCR 法高效扩增辽宁碱蓬甜菜碱醛脱氢酶 cDNA 5' 末端序列 [J]. *高技术通讯*, 2001, 11: 17-19.
- LI Q L, GAO X R, FAN Q, *et al.* Rapid amplification of 5' cDNA end of *S. Liaotungensis* betaine aldehyde dehydrogenase by inverse nested PCR [J]. *High Technology Letters*, 2001, 11: 17-19. (in Chinese)
- [25] HASEGAWA A, HAMADA Y, SHIGETA M, *et al.* Contraceptive potential of synthetic peptides of zona pellucida protein (ZPA) [J]. *Reprod. Immunol.*, 2002, 53(1-2): 91-98.
- [26] 陈享, 曾海涛. 透明带多表位疫苗载体的构建及抗生育研究 [J]. *热带医学杂志*, 2005, 4(5): 182-184.
- CHEN X, ZENG H T. The effect of zona pellucida polypeptide vaccines on fertility [J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2005, 4(5): 182-184. (in Chinese)
- [27] HINSCH E, HAGELE W, BOHLE R M, *et al.* Evaluation of ZP2 domains of functional importance with antisera against synthetic ZP2 peptides [J]. *J. Reprod. Fertil.*, 1998, 114(2): 245-251.
- [28] DUMON-SEIGNOVERT L, CARIOT G, VUILLARD L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL 21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3) [J]. *Protein Expr. Purif.*, 2004, 37(1): 203-206.
- [29] 蒋素华, 王洁琼, 袁秀云, 等. 蓍脊兰 SeAP1-like 基因的克隆与表达载体构建 [J]. *河南农业科学*, 2015, 44(1): 105-109.
- JIANG S H, WANG J Q, YUAN X Y, *et al.* Cloning and construction of expression vector of SeAP1-like gene from *Se-direa japonica* [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2015, 44(1): 105-109. (in Chinese)
- [30] EBRAHIMI S M, TEBIANIAN M. Heterologous expression, purification and characterization of the influenza A virus M2e gene fused to mycobacterium tuberculosis HSP70359610 in prokaryotic system as a fusion protein [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(6): 2877-2883.