

去 N 端信号肽和 C 端跨膜区猪卵透明带-3β 蛋白在原核系统表达的研究

徐万祥 邱德义 熊 艳 申庆祥

(上海市计划生育科学研究所,上海 200032)

顾少华 曹根涛* 应 康 谢 毅**

(复旦大学生命科学院遗传所遗传工程国家重点实验室,上海 200433)

摘 要 猪卵透明带(Zona pellucida,ZP)由生物化学和免疫学性质截然不同的三种糖蛋白(pZP1、pZP3α 和 pZP3β)组成。由于抗 pZP3β 抗体能在体外与人 ZP 发生交叉反应,因此 pZP3β 一直被认为是研制抗受精避孕疫苗的潜在抗原之一。为了能在原核系统中获得无卵巢因子污染的 pZP3β 蛋白,本文采用 PCR 方法删除了原 cDNA 中编码 5'-和 3'-端信号肽和跨膜区的 DNA 顺序。扩增的 pZP3β 基因核心片段(pZP3β^o)经 DNA 测序验证后,通过引入其两端的 *Eco*RI 和 *Sal*I 酶切位点被定向插入 pBV221 质粒 P_RP_L 启动子下游的多克隆区。SDS-PAGE 分析表明:工程菌在热诱导后能特异地表达 pZP3β 蛋白,并能在蛋白印迹实验中被兔抗 pZP IgGs 识别。

关键词 pZP3β 蛋白,基因表达,免疫印迹

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0016-04

猪卵母细胞外包绕着一层非细胞性半透明被膜-ZP,它由生物化学和免疫学性质截然不同的3种糖蛋白(pZP1、pZP3α 和 pZP3β)组成^[1,2]。由于 pZP3β 抗体能在体外抑制人精卵结合,因此它也一直被视为是研制抗受精避孕疫苗的一个潜在抗原^[3]。为了避免或减少 ZP 疫苗对卵巢功能的干扰,更准确地评价它的避孕功效和可能的副作用,通过基因工程获得无卵巢因子污染的纯净 ZP 组份蛋白,业已成为当前 ZP 研究的一个努力方向。pZP3β cDNA 已于 1994 年被克隆^[2],我们也进行过 pZP3β 的融合表达研究^[4],但也许是由于该真核基因的特殊性,至今尚未见使之以天然形式(糖基化或非糖基化)在真核或原核系统中直接表达的报道。为此本文首先在这方面作了积极的探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒:大肠杆菌 TG1 和 BL21(DE3)菌株为复旦大学遗传工程国家重点实验室保存;pZ57 质粒(克隆全长度 pZP3β cDNA 的 pBluescript 质粒)由美国 Zonagen Inc. Harris 博士赠送,是 P_RP_L

启动子表达载体 pBV220 衍生物的 pBV221 质粒,由中科院发育生物学研究所孙方臻博士惠赠。

1.1.2 工具酶和生化试剂:*Eco*RI、*Apa*I 和 *Sal*I 等限制酶以及 T4 DNA 连接酶购自 Boeringer Mannheim 公司,Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司,DNA 和蛋白质分子量标准以及羊抗兔 IgG/HRP 购自华美生物工程公司,兔抗猪 ZP IgGs 自己制备^[5]。其它生化试剂均为国产分析纯。

1.1.3 寡核苷酸引物:为了直接表达 pZP3β 蛋白,我们按已发表的 pZP3β cDNA 序列^[2],前后设计了表达不同 pZP3β 蛋白的 5 种 PCR 引物(由上海生物工程技术有限公司合成),引物序列见表 1。

表 1 设计引物序列
Table 1 Primer sequences

Primer	Sequences
FI(26-mer)	5'-GGGAATTCATGGCGCCGAGCTGGAGG-3'
RI(20-mer)	5'-CACACTCGTGCAGCCCAACC-3'
FX(26-mer)	5'-GGGAATTCCTGCAGCCCGCAGCCCGTC-3'
RX(35-mer)	5'-GGGTGCACTTATCAGGGAGCAGACTGTCTCTTC-3'
FX(29-mer)	5'-GGGAATCATGTGCAGCCCGCAGCCCGTC-3'

收稿日期 2000-05-18, 修回日期 2000-09-14。
基金项目 国家计划生育药具重点实验室和上海市计划生育委员会局管基金资助项目(97JG05022)。
* 中国科学院上海细胞生物学研究所,上海 200031。
** 通讯作者。 Tel 86-21-55520025 ; Fax 86-21-65642502。

1.2 方法

1.2.1 pZP3 β 目的基因片段的 PCR 扩增 :以在 pZP3 β 基因的信号肽起始密码 ATG 前引入 *Eco*RI 位点的 F1 和位于该基因 5'端前部单一 *Apa*I 位点后的 R1 ,作为上下游引物进行 PCR 扩增。扩增的 5'端 *Eco*RI 和 *Apa*I 片段(225bp)与双酶切自 pZ57 质粒的 3'端 *Apa*I 和 *Sal*I 大片段连接 构建成删除原 5'端非编码区的读框完整 pZP3 β cDNA。以在信号肽顺序后 5'端引入 *Eco*RI 位点的 F2 和 F3 为上游引物 ,以 RXRR 这一 furin 加工处理位点前 5'端引入 *Sal*I 和终止密码的 R2 为下游共同引物 ,分别扩增出删除 N 端信号肽和 C-端跨膜区的 pZP3 β' (不带起始密码)和 pZP3 β'' (引入起始密码)的核心片段。pZP3 β' 和 pZP3 β'' 的扩增条件 :94℃ 变性 50s ; 50℃ 退火 45s ;72℃ 延伸 1min ,重复 28 循环。

1.2.2 PCR 产物的 DNA 测序鉴定 :pZP3 β cDNA 的 5'端扩增 *Eco*RI-*Apa*I 小片段 ,在与 3'端酶切 *Apa*I-*Sal*I 大片段连接前被定向插入 pBluescript 测序载体 ,转化宿主菌后依据涂布平皿蓝白斑筛选阳性克隆 ,扩增培养后再用 QIAgene 公司的 DNA 纯化试剂盒抽提重组质粒 ,在 ABI373 A 型 DNA 测序仪上进行生物素荧光标记 DNA 序列自动分析。扩增的 pZP3 β' 和 pZP3 β'' cDNAs 在构建表达质粒前进行同样程序的 DNA 序列测定。

1.2.3 pBV221-pZP3 β'' 等重组表达质粒的构建 :删除信号肽和跨膜区顺序的 pZP3 β' 、pZP3 β'' 和仅删除原基因 5'端非编码顺序的 pZP3 β cDNAs ,都通过它们两端引入的 *Eco*RI 和 *Sal*I 位点 ,被定向插入 pBV221 质粒 P_RP_L 启动子下游的多克隆区。相关的酶切、片段回收、连接反应、重组质粒的转化和抽提以及琼脂糖电泳鉴定等操作都参经常用分子生物学方法或相应的试剂说明书进行。

1.2.4 工程菌 BL21/pBV221-pZP3 β'' 的热诱导表达 :挑单菌落接种于 3mL LB(Ap)培养液中 ,于 30℃ 振荡培养过夜 ,翌日以 1/50(V/V)的比例转接 50mL LB(Ap)培养液 ,继续培养至对数期(A₆₀₀ = 0.7~1.0) ,升温至 42℃ ,热诱导振荡培养 4~6h ,取样进行 SDS-PAGE 表达分析。

1.2.5 pZP3 β' 蛋白表达产物的 SDS-PAGE 和蛋白印迹分析 :参见文献 [5]。

2 结 果

2.1 pZP3 β' 核心片段的 PCR 扩增与测序

为了能直接表达目的蛋白 ,通过 PCR 扩增了在

5'端引入 *Eco*RI 位点和 ATG 起始密码以及 3'端引入 TGATAA 双终止密码和 *Sal*I 位点的 pZP3 β'' 核心片段(编码 pZP3 β 成熟蛋白 326 aa)。将此片段克隆插入 pBluescript(pBS)质粒 构建成 pBS-pZP3 β'' 重组质粒。DNA 测序结果表明所扩增片段未发生碱基突变(测序图未列出)。为删除 pZP3 β 基因 5'端非编码区序列扩增的 *Eco*RI-*Apa*I 小片段以及比 pZP3 β' 仅少 5'端起始密码的 pZP3 β' 核心片段(编码 325 aa)也进行了测序验证(测序图未列出)。

2.2 pBV221-pZP3 β'' 等重组表达质粒的构建

从测序过的 pBS-pZP3 β'' 重组测序载体上双酶切回收目的片段 ,然后在 DNA 连接酶作用下 ,将之定向插入 pBV221 载体启动子下游多克隆区 ,成功构建 pBV221-pZP3 β'' 重组表达质粒。图 1 是 pBV221-pZP3 β'' 阳性克隆经扩增培养和抽提质粒步骤后的酶切鉴定结果。另外也还构建了 pBV220-pZP3 β' 、pTSA18-pZP3 β' 和 pQE30-pZP3 β'' 重组表达质粒。

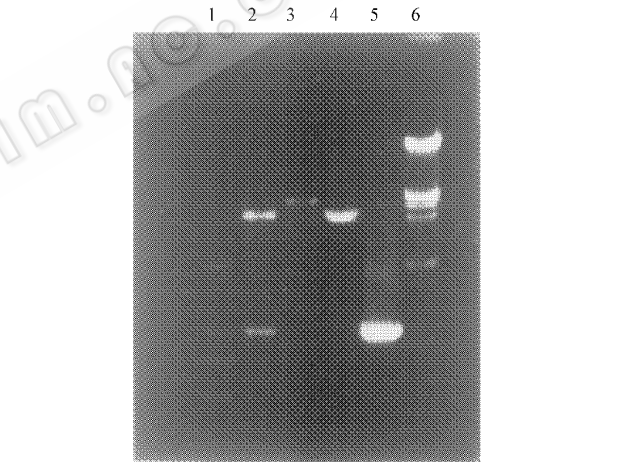


图 1 pBV221-pZP3 β'' 重组质粒的酶切分析

Fig.1 Restriction analysis of pBV221-pZP3 β'' recombinant plasmid

- 1. DNA marker 2 000 (2 000 , 1 000 , 750 , 250)D
- 2. pBV221-pZP3 β'' digested by *Eco*RI and *Sal*I
- 3. pBV221-pZP3 β'' digested by *Eco*RI
- 4. pBV221 digested by *Eco*RI
- 5. The amplified pZP3 β'' fragment
- 6. λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III marker(21 227 , 5 148 , 4 973 , 4 268 , 3 520 , 2 027 , 1 904 , 1 584 , 1 375 , 947 , 831 , 564)D

像 pZP3 β' 基因片段一样 ,pZP3 β 和 pZP3 β' 也分别与 pBV221、pBV220、pTSA18 和 pQE30 载体重组构建了表达质粒。

2.3 pBV221-pZP3 β'' 在大肠杆菌中的目的蛋白直接表达

pBV221 是 pBV220 的衍生表达质粒 [6] ,重组插

入 pBV221 P_RP_L 启动子下游的目的基因直接表达受温度变化调控。收集于 42℃ 热诱导表达的大肠杆菌 BL21(DE3)/pBV221-pZP3β⁺工程菌体 ,经裂解液破菌处理后取样进行 12% SDS-PAGE 分析 ,结果在 38 kD 处可看到有别于对照菌蛋白带谱的 pZP3β⁺特异表达蛋白带(图 2a)。

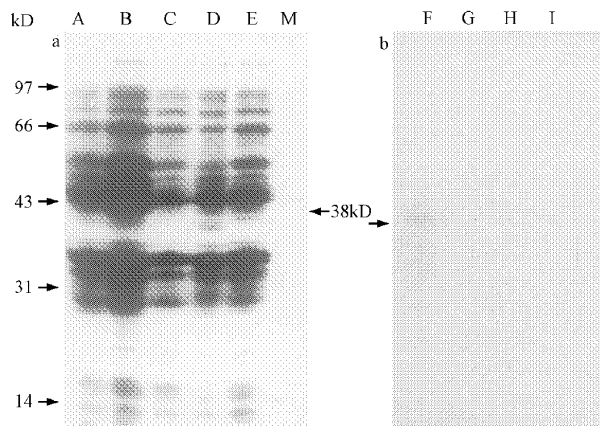


图 2 pZP3β⁺表达蛋白的 SDS-PAGE(a)和蛋白印迹分析结果(b)

Fig.2 SDS-PAGE(a) and Western blot(b) of expressed pZP3β⁺ protein

M. Protein molecular weight marker

A B I. *E. coli* BL21(DE3) induced at 42℃

C H. *E. coli* BL21/ pBV221 induced at 42℃

D G. *E. coli* BL21/ pBV221- pZP3β⁺ cultured at 30℃

E F. *E. coli* BL21/ pBV221- pZP3β⁺ induced at 42℃

2.4 pZP3β⁺蛋白表达产物的抗原性分析

为了证实 SDS-PAGE 凝胶上有别于对照带谱的特异条带就是所希望的 pZP3β⁺表达产物 ,进行了 Western blot 检验。在完成 SDS-PAGE 后 ,将重复上样(样品量也相同)的一半凝胶进行考马斯亮蓝染色 ,另一半凝胶进行电转移 ,以将所有蛋白条带转印到醋酸纤维素膜上 ,然后用含 pZP3β 抗体的兔抗猪 ZP IgGs 和羊抗兔 IgG/HRP 分别完成一抗和二抗反应 ,结果在诱导的工程菌蛋白带谱栏可看到与 SDS-PAGE 染色凝胶上特异表达条带对应的阳性反应显色带 ,而所有对照蛋白带谱栏均无阳性反应信号(图 2b) ,这表明 pZP3β⁺蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)/pBV221-pZP3β⁺工程菌中获得表达且具有免疫学活性。

3 讨 论

删去 5' 端非编码顺序的全长度 pZP3α cDNA (编码 536 aa) ,以 pBV221 为载体已能在大肠杆菌中表达(另文发表) ,但同样构建的全长度 pZP3β⁺

cDNA 在 pBV221、pBV220、pTSA18 和 pQE30 载体中均未表达 ,原因可能是由于其 N 端信号和 C 端跨膜区的相对疏水性 ,与之同源的帽猴 ZP3 在原核系统内的表达研究也出现类似的结果^[7]。

由于出现在卵母细胞表面的成熟 ZP3 分子不存在 N 端信号肽和 C 端跨膜区^[8,9] ,所以本文参照文献^[7]的做法 ,也通过 PCR 方法扩增出删除这两段肽编码顺序的 pZP3β⁺核心片段 ,最终构建的 pBV221-pZP3β⁺表达质粒 ,在 BL21(DE3)宿主菌中第一次成功表达出天然 pZP3β⁺(非糖基化)蛋白。这一特异表达不仅为用 ZP 抗体的蛋白印迹所证实 ,而且表达带显示的 38 kD 电泳分子量与其推断的 36 kD 理论分子量也十分接近。这一可视的表达量还不到菌体总蛋白的 1% 水平 ,原因也许同 pZP3β⁺基因中存在多于 1/3 的大肠杆菌非偏爱密码子有关。

同以往的融合形式 ZP 蛋白表达情况一样^[4,5,7] ,pZP3β⁺的表达也存在若干降解次带 ,说明包括 ZP3 蛋白家族在内的 ZP 蛋白易被宿主菌的蛋白酶降解(在不同菌株中表达的情况都一样)。这现象与哺乳动物体内的实际需要是吻合的 ,即受精卵在输卵管内机械蠕动至子宫内某特定部位的过程中 ,包绕在它外面的 ZP 层在蛋白酶作用下降解崩溃 ,从而导致其顺利着床^[10]。

本研究令人感兴趣的另一现象是 ,不含 5' 端 ATG 起始密码子的 pZP3β⁺核心片段(原准备用于 pQE30 载体的融合蛋白表达) ,在 pBV220 和 pBV221 载体中也能表达 ,且表达产物可被 ZP IgGs 识别(资料未显示)。如果说这一表达是利用了 pZP3β 5' 端 22 aa 后的 ATG 起始密码子 ,那么该 ATG 与 pBV 载体上 SD 序列之间的距离显然过长了 ,除非该 ATG 两侧 - 20 ~ + 13 之间另外存在特别的表达调控元件。对这一现场的真正理解 ,尚有待作进一步的探讨研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Yurewicz E C , Hibler D , Fontenot G K *et al.* Nucleotide sequence of cDNA encoding ZP3α , a sperm-binding glycoprotein from pellucida of pig oocyte. *Biochim Biophys Acta* , 1993 , 1174 211 ~ 214
- [2] Harris J D , Hibler D W , Fontenot G H *et al.* cloning and characterization of cDNAs from a variety of mammalian species : the ZPA ZPB and ZPC gene families. *DNA Sequence* , 1994 , 4 361 ~ 393

- 32kD deglycosylated polypeptide from porcine zona pellucidae will prevent human gamete interaction *in vitro*. *Gamete Res* , 1987 ,**18** :251~265
- [4] XU WX(徐万祥) ,QIU DY(邱德义) ,WANG J(王健) *et al.* . Expression and characterization of fused pig zona pellucida-3 β cDNA in *E. coli* . *Chinese Journal of Immunology*(中国免疫学杂志) ,1998 ,**14** (6) :420~423
- [5] XU W X(徐万祥) ,XIE Y(谢毅) ,WANG J(王健) *et al.* . Expression and identification of recombinant pig ZP3 α cDNA in *E. coli* . *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*(中华微生物学和免疫学杂志) ,1999 ,**19** (2) :137~141
- [6] Wang G ,Lin N J ,Yang K Y. High-level expression of prochymosin in *E. coli* :Effect of the ribosome binding site. *Protein Expression and Purification* ,1995 ,**6** :284~290
- [7] Kaul R ,Afzalpurkar A ,Gupta SK. Expression of bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona pellucida-3(ZP3) in a prokaryotic system and its immunogenicity. *Mol Reprod Dev* ,1997 ,**47** :140~147
- [8] Von Heijne G. A new method for predicting signal sequence cleavage site. *Nuc Acid Res* ,1986 ,**14** :4683~4690
- [9] Hosaka M ,Nagahama M ,Kim W *et al.* . Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage-catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* ,1991 ,**266** :12127~12130
- [10] XU W X(徐万祥) . Biochemistry ,biology and molecular biology of the mammalian zona pellucida. *Reproduction & Contraception*(生殖与避孕) ,1997 ,**17** :131~135

Study on the Expression of Pig Zona Pellucida-3 β Excluding N-terminus Signal Peptide and C-terminus Transmembrane-like Domain in *Escherichia coli*

XU Wan-Xiang QIU De-Yi XIONG Yan SHENG Qing-Xiang

(Shanghai Institute of Planned Parenthood Research ,Shanghai 200032 ,China)

GU Shao-Hua CAO Gen-Tao YING Kang XIE Yi*

(State Key Laboratory of Genetic Engineering ,Institute of Genetics ,School of Life Science ,Fudan University ,Shanghai 200433 ,China)

Abstract Pig oocytes are surrounded by an acellular translucent envelope-zona pellucida(pZP) ,which is comprised of three biochemically and immunologically distinct glycoproteins(pZP1 ,pZP3 α and pZP3 β). Due to the cross-reactivity of anti-pZP3 β antibodies with human ZP *in vitro* ,pZP3 β has been considered as potential one of immunogens for developing human contraceptive vaccine. In order to express pZP3 β directly in *E. coli* ,we amplified the core fragment of pZP3 β cDNA by PCR that was deleted 5'- and 3'- terminal sequences of coding for signal peptide and transmembrane-like domain. The DNA sequenced *EcoRI* and *SalI* restricted core fragment was cloned in a frame downstream of P_{RP_L} promoter in the pBV221 vector. SDS-PAGE analysis showed that pZP3 β protein was expressed especially in *E. coli* after thermal induction ,which the expression band displayed the molecular weight of about 38 kD matching with its deduced molecular weight(36.5 kD). In addition ,the specially expressed protein band on SDS-PAGE gel showed specific immunological reaction with anti-pig ZP IgGs of rabbit in Western blot.

Key words pig zona pellucida-3 β protein , gene expression , immunoblot

Received May 18 ,2000

This work were supported by two grants from National Laboratory of Contraceptives and Devices Research and Family Planning Commission of Shanghai ,China.

* Corresponding author. Tel 86-21-55520025 ; Fax 86-21-65642502 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>