

重组人卵透明带 ZP3 蛋白在毕赤酵母中的表达

唐 键 谢琪璇* 潘善培 肖銮娟 董 鲁 张春雪 孙彩军

(暨南大学生殖免疫研究中心, 广州 510632)

摘 要 利用 *P. pastoris* 表达人卵透明带 ZP3 蛋白。设计特定引物从全长 hZP3 cDNA 上扩增含跨膜区序列的人卵透明带 ZP3 基因片段,并在 N 末端接上串联组氨酸编码序列的重组基因序列;扩增片段插入表达载体 pPIC9K 中;线性化后的重组质粒转入 *P. pastoris* 中,用高浓度 G418 筛选高拷贝菌株,然后甲醇诱导目的蛋白表达。用 SDS-PAGE 和 Western blot 分析表达产物。结果发现 *P. pastoris* 表达的人 ZP3 蛋白可以分泌到培养液中,并且可溶性好。纯化前后的重组人 ZP3 蛋白均能与兔抗猪 ZP3 蛋白抗体发生交叉反应,证实表达的目的蛋白具有反应原性。

关键词 人卵透明带 ZP3 蛋白, *P. pastoris*, 表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0758-05

卵透明带(Zona Pellucida, ZP)是哺乳动物卵细胞外包被的一层糖蛋白基质。它在介导种属特异的精卵结合、诱导精子顶体反应以及阻止多精子受精等方面起到重要作用^[1]。已知在人卵透明带蛋白的 3 种糖蛋白组分里, ZP3 首先参与精卵的识别过程^[2]。抗 ZP3 的抗体可以阻止精卵识别和结合,达到阻止受精的目的, ZP3 也就一直作为研制避孕疫苗的潜在免疫原^[3,4]。但是一个存在的问题是无法获得大量天然的人 ZP3 蛋白用于抗生育研究。分子生物学的发展为突破这一障碍提供了有利条件,利用基因重组的方法在体外表达系统中大量表达人卵透明带 ZP3 蛋白,可为免疫抗生育研究提供可靠而且成本低廉的卵透明带蛋白。Duin 首先在中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中表达了人 ZP3 蛋白^[5]。Harris^[1]等人分别在细菌、*P. pastoris*、昆虫细胞和 CHO 细胞中实验表达了人卵透明带蛋白。除在 CHO 细胞中表达出可溶性透明带蛋白外,在其他三种系统中,卵透明带蛋白积累在细胞内,且通过破碎细胞获得的透明带蛋白只能溶于 6 mol/L 尿素溶液中,这给分离纯化带来很大的困难。鉴于 CHO 细胞表达人卵透明带蛋白的成本高昂,我们期望通过一种较廉价且方便的方法获得大量的人卵透明带蛋白。通过改进引物设计和实验技术,我们在巴氏毕赤酵母(*P. pastoris*)中成功表达出了可分泌且易溶于培养液的人 ZP3 蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种:pPIC9K 和 *P. pastoris* 购自 Invitrogen 公司。含全长人 ZP3 cDNA 的 hZP3/pPIC9K 质粒由本实验室利用 Harris 博士赠送的含全长人 ZP3 cDNA 的 PBS 亚克隆制备。

1.1.2 酶及生化试剂:*EcoR* I、*Not* I 和 *Sac* I 等限制酶, T4 DNA 连接酶, Tag DNA 聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;酵母培养用 Peptone 和 YNB 购自 Gibco 公司;G418 购自广州威佳公司;蛋白质 marker 购自上海生物化学研究所;兔抗猪 ZP3 抗体本实验室自制;羊抗兔 IgG/HRP 购自 Vector Laboratories;其它试剂为国产分析纯;亲和层析柱和液相蛋白纯化系统均为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。

1.1.3 寡核苷酸引物:根据 hZP3 的 cDNA 序列,设计下列(表 1)这对引物扩增 hZP3 第 23 位~第 408 位氨基酸序列。为便于 rhZP3 蛋白的分离和纯化,在目的蛋白的 N 端引入了编码 6 个组氨酸的基因序列,且 P1、P2 中分别加入 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点(由上海生工生物工程有限公司合成)。

表 1 引物序列
Table 1 Primer Sequences

Primer	Sequences
P1(5' primer)	5'-ATTGAATTCATCAATCAATCAATCAATCAACCCCTCTGGCTCTTGC -3'
P2(3' primer)	5'-ATTGCGGCCGCAACCAGGATAACAGCACTCAGAGTC -3'

1.2 方法

1.2.1 hZP3 目的基因片段的扩增:以 hZP3 的 cDNA 为模板, P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增。扩增条件:94℃变性 1min; 54℃退火 30s; 72℃延伸 2min。重复 30 个循环。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中分离,用试剂盒(Omega Bio-tek, Inc 产品)操作按说明书进行回收。

1.2.2 构建 pPIC9K-rhZP3 重组质粒:设计的上、下游引物中分别含有 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点,因此用上述两种限制

酶切纯化回收的目的基因片段。质粒 pPIC9K 也用这两种酶进行酶切。酶切产物用试剂盒纯化。按目的基因片段的摩尔浓度 10 倍于 pPIC9K 的比例混合两种片段,在 T4 DNA 连接酶作用下 16℃ 连接反应 12 h 以上。连接产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。连接产物转入感受态大肠杆菌,在 Amp + LB 平板上涂布,对阳性克隆进行快速 PCR 鉴定^[6],筛选出正确插入目的基因片段的转化子。挑出这样的菌落在 LB 培养液中摇瓶培养,按常规方法提取质粒。质粒测序(上海生物工程技术有限公司测序)。

1.2.3 重组质粒 pPIC9K-rhZP3 导入 *P. pastoris*:用 *Sac* I 限制酶线性化重组质粒 pPIC9K-rhZP3,电击转入 *P. pastoris*(电穿孔仪为 Bio-Rad 公司产品,操作按照仪器说明书进行)。

1.2.4 PCR 检测 rhZP3 基因的整合:在 MD 平板^[7]上挑出转化子,按 Invitrogen 公司操作手册^[7]作 PCR 检测,扩增引物为 P1 和 P2。

1.2.5 筛选 G418 高抗性 *P. pastoris* 转化子:从 MD 板上挑出转化子,划线涂布在 G418 浓度为 2.5mg/mL 的 YPD-G418 板^[7]上,29℃ 培养至单菌落出现;将长出的单菌落划线涂布在 G418 浓度为 4mg/mL 的 YPD-G418 平板^[6]上,29℃ 培养至单菌落出现。

1.2.6 rhZP3 工程菌的扩增和诱导表达:从 G418 浓度为 4mg/mL 的 YPD-G418 平板上挑取单菌落到 5mL YPD 液^[7]中,29℃ 摇瓶培养 1 d;离心后将菌体接种到 10mL BMGY 培养液^[6]中,29℃ 摇瓶培养 1 d;离心后将菌体转入 20mL BMMY 培养液^[6]中,29℃ 摇瓶培养 4 d。期间每 24 小时补充一次甲醇(终浓度为 1%)。取培养液进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.7 rhZP3 表达产物的 SDS-PAGE 分析:离心去除菌体后的培养液,取 1mL 透析、冻干,溶解于 40μL 样品溶解液后,取 20μL 在浓度为 10% 的分离胶中进行 SDS-PAGE 电泳分析。考马斯亮蓝染色后,用 Quantity One 凝胶分析软件(Bio-Rad 公司产品)分析表达蛋白的分子量、含量和纯度。

1.2.8 兔抗猪 ZP3 多克隆抗体的制备:按照本实验室的方法^[8]分离纯化猪 ZP3 蛋白,免疫新西兰白兔,制备抗血清。

1.2.9 表达产物的反应原性检测:完成 SDS-PAGE 电泳的表达产物电转移到醋酸纤维素膜(NC 膜)上,用 PBST 配制的 1% BSA 封闭 NC 膜,37℃,1h;PBST 洗涤 3 次,加入 1:100 兔抗猪 ZP3 抗体,37℃,4h;PBST 洗涤 3 次,加入 1:10 000 的 HRP-羊抗兔 IgG,37℃,1h;DAB-4HCl-H₂O₂ 底物显色。

1.2.10 表达产物的纯化及反应原性检测:将培养上清液进行亲和层析。培养上清液经 0.45μm 膜过滤后,上亲和层析柱。用磷酸缓冲液(0.02mol/L,含 0.5mol/L NaCl,pH7.4)洗去未结合蛋白,然后用 10 个柱体积的含 0~0.5mol/L 咪唑的磷酸缓冲液进行线性洗脱,分别收集穿透峰和洗脱峰组分,用 G25 脱盐柱脱盐。冻干后,进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

2 结 果

2.1 扩增 rhZP3 基因片段

从全长 hZP3 cDNA 上用引物 P1 和 P2 扩增出的 rhZP3 基因片段约为 1.2kb。该片段编码 23~408 位氨基酸的 hZP3 基因片段,即去掉了 hZP3 N 末端的前导肽序列而保留了大部分的 C 末端跨膜区序列。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,结果如 Fig.1。图中第 2 泳道里的核酸条带即为 rhZP3 基因片段。

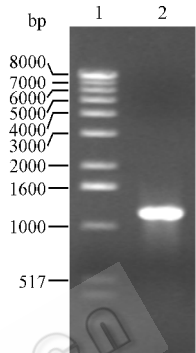


图 1 引物 P1 和 P2 扩增 hZP3
Fig.1 The result of amplifying hZP3 fragment by PCR
1. DNA marker 2. The amplified rhZP3 fragment using P1 and P2 as primers

2.2 重组质粒的构建

*Eco*R I 和 *Not* I 双酶切并纯化后的 rhZP3 和 pPIC9K 片段在 T4 DNA 连接酶作用下连接成重组质粒,将连接产物转入感受态大肠杆菌。用快速 PCR 方法鉴定 LB 平板上的转化子。将成功转入了重组质粒的大肠杆菌经摇瓶培养后提取质粒。因为质粒 pPIC9K 的分子量为 9.3kb,重组质粒 pPIC9K-rhZP3 的分子量约为 10.5kb。从 1% 琼脂糖凝胶上可以看出 pPIC9K 的迁移率稍远于 pPIC9K-rhZP3(Fig.2)。将重组质粒 pPIC9K-rhZP3 和质粒 pPIC9K 作酶切,结果如 Fig.3。

2.3 PCR 鉴定 *P. pastoris* 转化子

线性化后的重组质粒 pPIC9K-rhZP3 导入 *P. pastoris* 后,涂布在 MD 板上。MD 板是缺乏组氨酸的培养基。*P. pastoris* 含有突变的组氨酸脱氢酶基因(*his4*),这种突变阻止了 *P. pastoris* 合成组氨酸。pPIC9K 载体上含有野生型组氨酸脱氢酶基因(*HIS4*),它能与 *his4* 互补。因此转入了重组质粒 pPIC9K-rhZP3 的 *P. pastoris* 能在组氨酸缺陷的培养基(MD 板)上生长。随机挑取 3 个 *P. pastoris* 转化子,用 P1 和 P2 作引物从酵母基因组 DNA 中扩增 rhZP3,并且用整合有载体 pPIC9K 的酵母作对照,扩增结果如 Fig.4。图中可以看出 3 个转化子(lane2~4)中整合有目的基因,而对照菌(lane5)无扩增条带。



图 2 质粒 pPIC9K 和重组质粒 pPIC9K-rhZP3 的电泳分析

Fig.2 Analysis of plasmid pPIC9K and recombinant plasmid pPIC9K-rhZP3

The molecular weight of pPIC9K (lane2) was smaller than that of pPIC9K-rhZP3 (lane1)

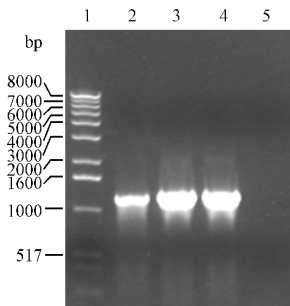


图 4 PCR 鉴定整合有 rhZP3 基因的 *P. pastoris*

Fig.4 PCR analysis of rhZP3 gene integrated into *P. pastoris* genome

1. DNA marker 2~4. rhZP3 fragments were amplified using P1 and P2 as primers from the recombinant plasmid pPIC9K-rhZP3 transformed into *P. pastoris* ;5. There was no hZP3 fragment amplified from pPIC9K transformed into *P. pastoris*

2.4 rhZP3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

从 G418 浓度为 4mg/mL 的 YPD-G418 平板上随机挑出 8 株工程菌在同样条件下培养。培养结束后培养液离心去除菌体 均取 1mL 经透析、冻干后进行 10% SDS-PAGE 电泳分析(Fig. 5)。图中第二泳道是对照表达谱,即整合了载体 pPIC9K 的 *P. pastoris* 的表达产物。它与其它 8 个整合有重组质粒的酵母在完全相同的条件下培养。从图中看出,在 43kD 以下的组分里,第 3、5~10 菌株有对照表达谱所没有的特异表达蛋白。其中第 3、5、9 三株工程菌的特异蛋白表达量较高,而第 4 株工程菌蛋白表达谱不同于其他工程菌。

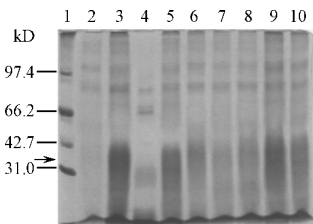


图 5 rhZP3 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE of expressed rhZP3 protein

1. Protein molecular weight marker ;2. Control *P. pastoris* expressed proteins ; 3~10. Transformed *P. pastoris* by rhZP3 gene expressed rhZP3 proteins

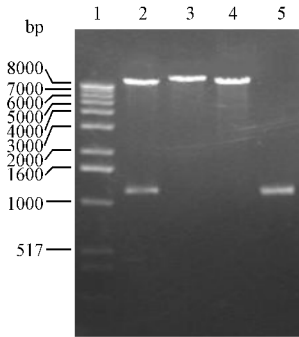


图 3 重组质粒 pPIC9K-rhZP3 的酶切分析

Fig.3 Restriction analysis of pPIC9K-rhZP3 recombinant plasmid

1. DNA marker ; 2. pPIC9K-rhZP3 digested by *Eco*R I and *Not* I ; 3. pPIC9K(rhZP3 digested by *Eco*R I ; 4. pPIC9K digested by *Eco*R I 5. The amplified rhZP3 fragment

2.5 兔抗猪 ZP3 多克隆抗体与人卵透明带的交叉反应

将兔抗猪 ZP3 蛋白的抗血清与人卵巢组织切片进行反应,可以看到该抗体与人卵透明带发生了免疫反应(Fig. 6)。图中箭头所示的深色部分即为透明带上的免疫沉淀层,证明兔抗猪透明带蛋白的抗体可与人卵透明带发生免疫交叉反应,可用于检测人卵透明带抗原。我们用游离的人卵所做的实验也得到相似的结果(图片未显示)。

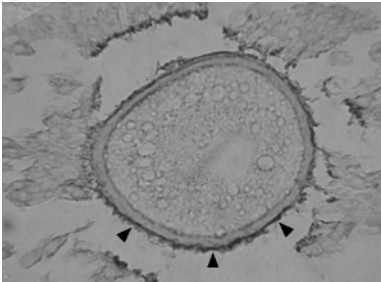


图 6 兔抗猪 ZP3 蛋白抗血清与人卵透明带反应

Fig.6 Cross-reactivity of anti-pZP3 antibodies with human ZP

The arrows show the immune-precipitation of hZP and anti-pZP3 antibodies

2.6 rhZP3 表达产物的反应原性分析

为了验证 SDS-PAGE 凝胶上的特异蛋白带是 rhZP3 蛋白,进行了 Western blot 检测。从 Fig.5 看出除第 4 株工程菌以外,其余 7 个工程菌(第 3、5~10 菌株)的表达产物相同,但是第 3 株工程菌的特异蛋白表达量最高。因此只选取第 3、4 株工程菌和第 2 株对照菌的表达产物作 Western blot 检测。取与 Fig.5 中相同样品量上样,完成 SDS-PAGE 后,将所有蛋白条带转移到醋酸纤维素膜上;1% BSA 封闭后,用兔抗猪 ZP3 抗体和羊抗兔 IgG/HRP 分别完成一抗和二抗反应。在显色剂作用下可以看到第 3 株工程菌的特异表达蛋白带呈阳性显色带(箭头所示),而第 2 和 4 株菌则无阳性显色带(Fig.7)。这表明 rhZP3 蛋白在 *P. pastoris* 中获得表达且具有反应原性。

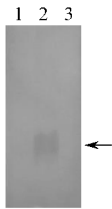


图 7 rhZP3 表达产物的蛋白印迹分析
Fig.7 Western blot of expressed rhZP3 protein

1. One transformant without expressing rhZP3 protein ;
2. One transformant expressing rhZP3 protein which could react with anti-pZP3 antibodies 3. Control *P. pastoris*

2.7 rhZP3 表达产物的纯化及反应原性分析

rhZP3 表达产物经亲和层析纯化的结果如 Fig. 8 ,前面为穿透峰 ,后面紧接着就是 rhZP3 蛋白的洗脱峰。将分别收集的穿透峰和洗脱峰组分进行 SDS-PAGE 分析 ,结果如 Fig. 9。可以看到第二泳道里有纯化的 rhZP3 蛋白(箭头所示)。将它们作免疫印迹分析(Fig. 10) ,从图中可以看出只是纯化的

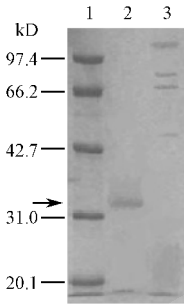


图 9 rhP3 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析
Fig.9 SDS-PAGE of the purified rhZP3 proteins

1. Protein molecular weight marker ;
2. The purified rhZP3 proteins ;
3. The flow-through fractions ;

3 讨 论

解决人卵透明带蛋白的来源是进行抗生育研究的首要问题之一。我们参照 Harris 等人的实验 ,作了技术改进后 ,所表达的 rhZP3 能够分泌于培养上清 ,且可溶性好 ,易于分离。有反应原性的组分在纯化后的产量也比较可观 ,这样的实验结果令人鼓舞 ,也有价值继续用于后续的研究中。

但在本实验中也出现了一些问题有待于我们去研究和证实。比如相较于 Harris 等人的实验结果 ,我们的表达产物能溶于培养上清 ,但其确切原因还不清楚。只是推测由于我们在扩增 hZP3 基因片段时保留了 hZP3 C 末端的大部分跨膜区序列 ,可能是这个跨膜区序列促成了 rhZP3 蛋白的分泌。还比如表达的 rhZP3 蛋白分子量不均一 ,且小于预期值。

尽管存在以上的一些问题 ,但幸运的是表达的 rhZP3 蛋白能被兔抗猪 ZP3 抗体所检测。利用兔抗猪 ZP3 抗体检测人 ZP 蛋白的主要依据是 猪 ZP3 与人 ZP3 有很高的同源性 ,猪 ZP3 的核酸序列与人 ZP3 的同源性为 80% 氨基酸同源性为 74%。由于天然人透明带很难得到 ,更难以分离纯化出

rhZP3 蛋白有反应原性 ,穿透峰里没检测出有反应活性的组分。利用 Quantity One 凝胶分析软件和蛋白纯化系统软件分析纯化的 rhZP3 蛋白的表观分子量约为 32kD ~ 34kD ,表达量不低于 20mg/L。

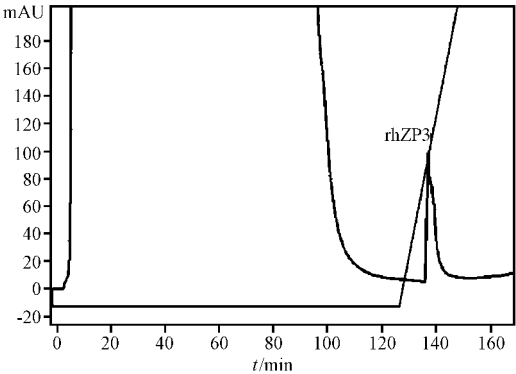


图 8 rhZP3 表达产物亲和层析
Fig.8 Purification of rhZP3 proteins by Ni-chelating affinity chromatography



图 10 rhZP3 蛋白纯化后的免疫印迹分析
Fig.10 Western blot of the purified rhZP3 proteins

1. The purified rhZP3 proteins which could make an immune reaction with anti-pZP3 antibodies ;
2. The flow-through fractions

ZP3 组分用于免疫制备抗血清。而猪 ZP 蛋白较易获得 ,又与人透明带具有免疫交叉反应性 ,所以 ,在得不到人 ZP3 抗体的情况下 ,利用猪 ZP3 抗体检测人 ZP 具有很强的实用性。我们分别利用兔抗猪 ZP3 抗体与人卵巢组织切片、游离的人卵进行免疫反应 ,均证实兔抗猪 ZP3 抗体的确可与人透明带产生免疫反应 ,证明用兔抗猪 ZP3 抗体检测人 ZP3 蛋白是可行的。由于所表达的 rhZP3 蛋白能与抗猪 ZP3 抗体反应 ,因此可以认为表达出的 rhZP3 蛋白具有人卵透明带蛋白的反应原性。此外 ,人们在抗生育研究中还发现了另一个令人兴奋的现象 ,即并非只有全长 hZP3 蛋白引起的抗体才能阻止精卵结合 ,它的某些小肽段引起的抗体同样能够阻断精卵结合。因此 ,尽管我们所获得的 rhZP3 蛋白可能不是全长 hZP3 蛋白 ,但由于它们具有反应原性 ,可以初步认定它们具有用于后续研究的实用价值。

REFERENCES(参考文献)

[1] Harris D , Seid Christopher A , Fontenot Gregory K , Liu Hui F. Expression and purification of a recombinant human zona pellucida protein

- teins. *Protein Expression and Purification* ,1999 ,**16** 298 – 307
- [2] Bigler Dora ,Chen Michellee ,Waters Susan ,White Judith M. A mode for sperm-egg binding and fusion based on ADAMs and integrins. *Trends in Cell Biology* ,1997 ,**7** 220 – 225
- [3] Paterson Margaret , Jennings Zoe A , Wilson Martin R , Atiken R John. The contraceptive potential of ZP3 and ZP3 peptides in a primate model. *Journal of Reproductive Immunology* 2002 ,**53** 99 – 107
- [4] Aitken R John. Immunocontraceptive vaccines for human use. *Journal of Reproductive Immunology* 2002 ,**57** 2002 273 – 287
- [5] Van Duin M , Polman J E M , de Breet I T M , van Ginneken K , Bunschoten H , Grootenhuis A , Brindle J , Aitken R J. Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by Chinese hamster ovary cells induces the human acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod* ,1994 ,**51** 607 – 617
- [6] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular cloning : A laboratory manual* . 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [7] Invitrogen Corporation. A manual of methods for expression of recombinant proteins. USA
- [8] XIE Q ㄨ(谢琪璇) , ZHANG J ㄢ(张江兰) , CHEN H ㄢ(陈海玲) , PAN S ㄢ(潘善培) . Separation and purification of 55kD porcine zona pellucida antigen. *Journal of Jinan University(natural science ㄨ暨南大学学报 ㄨ自然科学版)* ,1998 ,**S1** 82 – 82

Expression of Recombinant Human Zona Pellucida-3 Protein (rhZP3) in *Pichia pastoris*

TANG Jian XIE Qi-Xuan* PAN Shan-Pei XIAO Luan-Juan

DONG Lu ZHANG Chun-Xue SUN Cai-Jun

(Center for Reproductive Immunology Research , Jinan University , Guangzhou 510632 , China)

Abstract Human Zona Pellucida(ZP) ,which is a complex matrix surrounding oocytes is comprised of three immunologically distinct glycoproteins(hZP1 ,hZP2 and hZP3). Because hZP3 possesses the sperm receptor activity and the acrosome-inducing activity , it has long been used as a candidate antigen to develop an immunocontraceptive vaccine . However , a large amount of native hZP3 protein is unavailable . It is an effective way to express hZP3 protein directly *in vitro* . Nevertheless , it had been reported that the rhZP3 protein produced in *Pichia pastoris* was not secreted but accumulated in the cells and could only be purified after being solubilized by strong denaturants . More unfortunately , after purification the final product required 6mol/L urea to maintain solubility . An improved project was advanced with the aim to express secreted and soluble rhZP3 protein in yeast . In this study , the fragment of hZP3 cDNA coding for aa 23 ~ 408 ,which the N-terminal leader was removed and most of the C-terminal transmembrane-like domain was reserved , was amplified by two PCR primers including *EcoR* ㄢ and *Not* I sites respectively and a His6 codon cassette was added to 5'-terminal . The hZP3 insert was incorporated into expression vector pPIC9K . The resulting recombinant yeast expression vector was designated pPIC9K-rhZP3 . Linearized pPIC9K-rhZP3 was transformed into *Pichia pastoris* . After G418 selection , the recombinant *Pichia pastoris* strains were identified by PCR and the rhZP3 was expressed following the manufacturer 's protocol . Following induction with methanol , the rhZP3 protein was secreted and dissolved into the culture supernatant . SDS-PAGE and Western blot analyses showed that the apparent molecular weight of the expressed rhZP3 proteins in yeast was smaller and a little size heterogeneity than native ones ; after purified with Ni-chelating affinity chromatography , the final product 's apparent molecular weight was about 32 ~ 34KD and their yield more than 20mg/L . We supposed that the C-terminal transmembrane-like domain be useful for secretion of rhZP3 into the culture supernatant and the expressed rhZP3 protein be incompletely digested by proteinases of *Pichia* into shorter fragments which all were glycosylated inhomogeneously . Fortunately , the fragments of rhZP3 protein can be recognized in Western blot by the polyclonal antibodies to porcine ZP3 which has showed a cross-reactivity with human ZP *in vitro* . It will be expected that the rhZP3 protein expressed in *Pichia pastoris* not only has immunogenicity , say , it can rise antibodies *in vivo* to prevent spermatozoa-ovum binding , but also does not contain ovarian factors that might be the cause of undesired side effects , e . g . ovaritis and can be used as a safe immunogen in human antifertility vaccine research .

Key words human Zona Pellucida-3 Protein , *Pichia pastoris* , expression

Received : 06-05-2003

This work was supported by Guangdong Natural Science Foundation(No.31883) and Science & Technology Project of Guangdong(No.2003B30501) .

* Corresponding author . Tel 86-20-85220235 ; Fax 86-20-85220468 ; E-mail ㄨxgx@jnu.edu.cn

ㄨ中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn