

# 荧光标记人透明带融合蛋白质粒的构建及其在中国仓鼠卵巢细胞内的表达

王明燧<sup>1</sup>, 朱 燕<sup>2</sup>

(1. 上海交通大学附属第六人民医院生殖医学中心, 上海 200233;

2. 中南大学湘雅三医院医学检验系, 湖南 长沙 410013)

**[摘要]** 目的: 分别构建人透明带蛋白(zona pellucida, ZP)基因 ZP1、ZP2、ZP3、ZP4 与荧光蛋白基因的融合蛋白表达载体, 并在中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞和卵母细胞中表达这些荧光标记的重组融合蛋白。方法: 设计合适的 PCR 引物, 采用 GeneArt Gibson Assembly 克隆技术, 将荧光蛋白基因与人透明带基因形成融合基因片段, 用特定的双酶分别酶切中间载体 pENTR1A(no ccdB)和融合基因片段后, 用 T4 DNA 连接酶将融合基因片段连入中间载体, 再通过 Gateway 克隆技术将中间载体上的融合基因转入表达载体 pInducer20, 并对产物进行 DNA 测序。验证融合基因构建成功后, 将含透明带融合基因的质粒进行转化, 筛选阳性克隆并扩增、抽提质粒。用脂质体转染法将含融合基因的表达载体转染入 CHO 细胞, 采用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测透明带融合基因 mRNA 的表达, 用蛋白印迹法检测透明带融合蛋白的表达, 并在激光共聚焦显微镜下观察透明带融合蛋白在 CHO 细胞内的表达及分布。结果: 成功构建所需载体并转染 CHO 细胞; 经 RT-PCR 检测证实人透明带 ZP1、ZP2、ZP3、ZP4 mRNA 在 CHO 细胞中表达; 经蛋白印迹法检测证实 CHO 细胞中有重组融合蛋白质的表达; 在激光共聚焦显微镜下观察到重组融合蛋白在 CHO 细胞内表达和定位。结论: 本研究成功构建了人类透明带 4 个基因的荧光融合蛋白表达质粒, 以此为实验工具, 今后可用于诊断卵子异常导致不孕的病因机制研究。

**关键词:** 透明带基因; 荧光标记融合蛋白; 表达质粒; 中国仓鼠卵巢细胞

中图分类号: R541.7 文献标志码: A 文章编号: 1671-2870(2021)06-0557-05

DOI:10.16150/j.1671-2870.2021.06.008

## Construction of fluorescent human zona pellucida fusion protein expression vectors and expression in CHO cells

WANG Mingyi<sup>1</sup>, ZHU Yan<sup>2</sup>. 1. Reproductive Medicine Center, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China; 2. Department of Medical Laboratory Science, Third Xiangya Hospital, Central South University, Hunan Changsha 410013, China

**[Abstract] Objective:** To construct expression vectors of the fluorescent fusion proteins of all four human zona pellucida (ZP) genes respectively, and explore their expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells and oocytes *in vitro*. **Methods:** The desired fluorescent protein sequence was inserted into a specific site of the zona pellucida gene sequence using the Gibson Assembly multi-fragment one-step splicing method to form the desired fusion gene fragment, and both ends of the fragment contained a specific sticky cleavage site of the entry vector. The entry vector pENTR 1A (no ccdB) and the fusion gene fragment were digested with a specific double enzyme, and the target gene fragment was ligated into the entry vector by T4 DNA ligase. Transfer genes from entry vector into destination vector via the LR reaction of the Gateway cloning technology. The plasmids validated by DNA sequencing were amplified and transfected into CHO cells. The expression of desired fusion protein was proved by RT-PCR and Western Blot. The distribution of target proteins in cytoplasm of CHO cells was visualized by laser confocal microscopy. **Results:** The expression vectors were successfully constructed, and the expression of each ZP protein in CHO cells was detected by RT-PCR and Western blot. The laser confocal microscopy revealed the distribution of ZP proteins. **Conclusions:** In this study, we successfully constructed fluorescent fusion protein expression plasmids of human zona pellucida genes, enabling the diagnosis of infertility caused by oocyte abnormalities.

**Key words:** Zona pellucida gene; Fluorescent fusion protein; Expression plasmid; Chinese hamster ovary cells

卵母细胞的透明带,是包绕在哺乳动物卵细胞以及植入前胚胎外的厚层不溶性透明丝状带基质,是卵母细胞胞外非常重要的结构<sup>[1]</sup>。哺乳类动物的透明带厚度不一,人类卵子透明带的平均厚度大约为 17  $\mu\text{m}$ 。人透明带由 4 种分泌型糖蛋白,即透明带蛋白(zona pellucida, ZP)-1(ZP1)、-2(ZP2)、-3(ZP3)和-4(ZP4)聚合成单层膜,由 ZP1 连接在一起形成海绵样三维矩阵结构。4 种 ZP 是由生长期卵母细胞和颗粒细胞共同分泌到卵周间隙组成<sup>[2]</sup>。

人 ZP 前体的 N 端信号肽在进入粗面内质网后被内质网腔面的信号肽酶切除,其 C 端的尾部确保 ZP 在经过卵细胞内膜系统以及在胞内囊泡运输时保持独立,不在细胞内过早发生聚合。该 C 端跨膜结构域及尾部在蛋白质跨越细胞膜时被切除,ZP 的主体带域则分泌到卵母细胞外,相互聚集、组装形成完整的透明带<sup>[3]</sup>。

透明带作为哺乳动物精卵结合种属特异性的结构,提供了物质支持和调节生物学功能的作用<sup>[4]</sup>,在卵子发育、精卵识别及结合并诱发精子顶体反应、阻止多精受精、保护胚胎植入子宫前的发育等生殖生理过程中扮演着重要角色,对其结构和功能特征的研究是目前的研究热点<sup>[5]</sup>。

本研究采用基因重组及多种成熟的分子生物学技术,在体外构建了人透明带 4 种蛋白的荧光表达质粒,可供今后进一步研究 ZP 间的相互作用。用绿色荧光蛋白(ZsGreen)标记 ZP1、ZP2,红色荧光蛋白(mCherry)标记 ZP3、ZP4。采用 RT-PCR 检测基因转录,蛋白印迹法检测目的蛋白的表达,激光共聚焦显微镜观察目的蛋白在细胞内合成及分布,结果表明,这些荧光标记融合蛋白表达载体在中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞内转染成功。此实验工具,可研究 ZP 的基因表达、ZP 之间相互作用的分子机制,有助于诊断卵母细胞透明带异常导致不孕的病因。

## 材料与方 法

### 一、材料

1. 实验材料:pENTR1A(no ccdB)中间载体和 pInducer20 表达载体购自 Addgene 公司,ZP 基因购自 维真 生物 科技 有 限 公 司,感 受 态 细 胞 *E.Coli* DH5 $\alpha$  购自 TAKARA 公司,CHO 细胞为本实验室保存。

2. 实验试剂:DMEM/F12 培养基、OptiMEM 培

养基、胎牛血清、胰酶、氨苄西林、强力霉素(doxycycline, DOX)均购自 Gibco 公司;T4 DNA 连接酶,限制性内切酶 *Bam* H I、*Xho* I 和 *Xba* I 限制性内切酶、GAMM 试剂盒均购自美国 NEB 公司;DAPI、多聚甲醛、Triton X-100、DEPC 均购自 Sigma 公司;Gateway 克隆试剂盒、Trizol 购自 Life Technologies 公司;逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购自罗氏公司;PCR 引物合成、DNA 测序由擎科生物科技有限公司提供;Taq DNA 酶购自 TAKARA 公司;凝胶 DNA 回收试剂盒购自 PROMEGA 公司;无内毒素质粒试剂盒购自 QIAGEN 公司;Lipofectamine 3000 脂质体转染试剂盒购自 Invitrogen 公司;羊抗人 ZP1 抗体、鼠抗人 ZP2 抗体、兔抗人 ZP3 抗体和 ZP4 抗体均购自 SANTA 公司;驴抗羊二抗、驴抗鼠二抗、驴抗兔二抗均购自 Life Technologies 公司。

### 二、方法

1. 构建含 hZPN-ZsGreen/mCherry 目的基因的表达载体:参考 GenBank 中各 ZP 基因序列,按 Gibson Assembly Master Mix 说明书的引物设计规则及实验需求设计引物(见表 1),并由上海生工合成。以各 ZP 基因序列为模板,PCR 扩增获得各基因片段,再使用 Gibson Assembly Master Mix 试剂盒融合荧光蛋白基因序列和各 ZP 基因片段,并且 5' 端含 *Bam* H I 酶切位点、3' 端含 *Xho* I 酶切位点(其中 ZP4 分别为 *Bam* H I 和 *Xba* I,因为 ZP4 基因序列中含有 *Xho* I 酶切位点而不含 *Xba* I 酶切位点)。将 Gateway 克隆技术的中间载体 pENTR1A(no ccdB)和合成后的融合基因片段分别进行 *Bam* H I、*Xho* I/*Xba* I 双酶切,使其两端含有 *Bam* H I、*Xho* I/*Xba* I 黏性末端。酶切基因片段行琼脂糖凝胶电泳,凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收酶切基因片段。纯化回收后的产物,用 T4 DNA 连接酶连接,得到含目的片段的中间载体,目的片段 DNA 测序结果显示序列正确。将构建好的中间载体和含 *ccdB* 基因的 pInducer20 表达载体,用 Gateway 克隆技术,得到含目的基因 ZP-ZsGreen/mCherry 的表达载体以及含 *ccdB* 基因的副产物。

2. 目的基因载体扩增:pInducer20 载体含抗氨苄西林抗性,而副产物含致死性的 *ccdB* 基因。终产物转化至感受态细胞 *E.Coli* DH5 $\alpha$ ,涂菌于含氨苄西林的固体平板培养基,37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜后,观察克隆生长情况并挑取大小形态颜色均一的几个单克隆,分别在含氨苄西林的液体培养基中扩增,抽提

质粒后,由生物技术公司 DNA 测序验证。

表 1 ZP1~ZP4 各片段引物

名称	引物序列(5'→3')	长度 (bp)	退火 温度
<b>ZP1</b>			
片段 1	F-TAAGTGGGATCCATGGCAGGA R-TTGGACTGGGCGCTGTGCC	126	59 °C
片段 2	F-GGCACAGCGCCAGTCCAA R-CCCTTGATCCCACAGTCGTA	695	60 °C
片段 3	F-TACGACTGTGGATCAAGGG R-CACTTACTCGAGTCACTGTC	1 975	58 °C
<b>ZP2</b>			
片段 1	F-TAAGTGGGATCCATGGCGTG R-CTTGGACTGGGCTGAAAAGGCA	156	58 °C
片段 2	F-TGCCTTTCCAGCCAGTCCAAAG R-CATCGCAAGTACAGTCCG	697	59 °C
片段 3	F-GGCACTGTCACTTGGGATG R-CAGCTACTCGAGTTAGTGAT	2 098	58 °C
<b>ZP3</b>			
片段 1	F-TAAGTGGGATCCATGGAGCTGAG R-TCGCCCTTGCTCTGTACGGAGC	128	59 °C
片段 2	F-CGTCCGTACAGAGCAAGGGCGA R-TGACACTCCACCAGTACGGG	715	60 °C
片段 3	F-CCCGTACTGGTGGAGTGTCA R-GAAGTCTCGAGTTATTCCG	1 163	59 °C
<b>ZP4</b>			
片段 1	F-TAAGTGGGATCCATGTGGCTGCT R-CCTCGCCCTTGCTCACACTGGAA	102	58 °C
片段 2	F-TTCCAGTGTGAGCAAGGGCGAGG R-ACAGTGGAGCACCTTTGTACA	719	60 °C
片段 3	F-TGTACAAGGTGCTCCACTGT R-CGGCTGTCTAGATTATGAC	1 542	59 °C

注:F 为正向引物,R 为反向引物。

3. pInducer20-ZPN-ZsGreen/mCherry 质粒转染:将 CHO 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基中,转染前传至 6 孔板。当细胞汇合度达到 70%左右时,按脂质体 Lipofectamine TM 3000 标准操作流程将质粒转染至 CHO 细胞。24 h 后更换培养基,加入 DOX,诱导基因在 CHO 细胞表达;48 h 后再次更换培养基并加 DOX;72 h 后可收集细胞。

4. RT-PCR 检测目的基因 mRNA 的表达:每组实验都分别设立空白对照组和转染后不加 DOX 诱导的阴性对照组。收集转染的细胞,提取总 RNA,

逆转录获取 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,凝胶电泳后,检测表达。

5. 蛋白印迹法检测目的蛋白的表达:收集贴壁细胞并悬浮,洗涤加适量的裂解液(含蛋白酶抑制剂),置于冰上充分裂解。在 4 °C 下,13 000 r/min 离心 10 min,留取上清液。蛋白定量后,在上清中加入 5×上样缓冲液,95 °C煮沸 10 min。SDS-PAGE 分离后转入聚偏氟乙烯膜,转膜后封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜;室温下再孵育 20 min;用缓冲液洗 3 次,加入相应的二抗,在 37 °C 下孵育 1 h;用缓冲液清洗 3 次后,用化学发光检测试剂盒显色。

6. 激光共聚焦显微镜观察融合蛋白的表达:转染 72 h 后,弃去培养基,磷酸盐缓冲液洗 2 遍后,加入 6 孔板中,并加固定液 1 mL,固定 20 min;加 2 mL 磷酸盐缓冲液,静置 3 min,弃去;将盖玻片平铺在暗盒的膜上,在盖玻片上滴加 100 uL 染核液染色;避光、室温孵育 5 min,加磷酸盐缓冲液,静置 3 min,重复 2 次;加封片剂,将细胞面倒扣在载玻片上,37 °C 静置 15 min;用激光共聚焦显微镜观察细胞内荧光的表达并拍照。

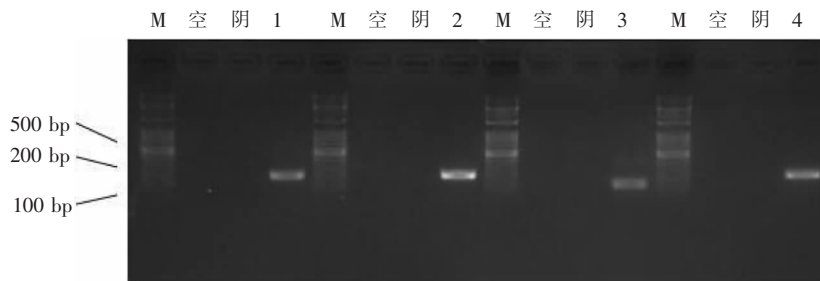
## 结 果

一、RT-PCR 检测质粒转染后细胞中 mRNA 的表达

凝胶电泳检测结果表明,未转染的细胞及未加入 DOX 诱导的 CHO 细胞无条带出现,而图 1 中条带 1~4 出现证实目的基因成功转染入细胞并成功表达。

二、质粒转染细胞后蛋白的表达

用蛋白印迹法检测质粒转染细胞的 ZP1~ZP4 表达,结果显示,特异性条带与 ZP 融合蛋白大小基本一致,为目的条带,表明 ZP 融合蛋白在 CHO 细胞中成功表达(见图 2)。



M:DNA 标记;空,未转染质粒的 CHO 细胞;阴,转染后不加 DOX 诱导的 CHO 细胞;1-4:分别转染了 ZP1、ZP2、ZP3、ZP4 荧光质粒,并加入了 DOX 诱导的 CHO 细胞。

图 1 CHO 细胞转染人 ZP-ZsGreen/mCherry 载体后目的基因的表达(琼脂糖凝胶电泳图)

### 三、荧光蛋白的表达和分布

在激光共聚焦显微镜下观察,可见在细胞质内,转染了 *ZP1*、*ZP2* 荧光融合蛋白的 CHO 细胞发出绿色荧光,转染了 *ZP3*、*ZP4* 荧光融合蛋白的 CHO 细胞发出红色荧光(见图 3)。

## 讨 论

近些年来,不孕症患者越来越多,对生殖生理的基础性研究也在不断深入。受精是哺乳动物自然生育的开始<sup>[6]</sup>。作为自然受精中重要的结构,透明带异常对生殖和发育的影响日益受到关注,国内外众多学者从形态学和功能学上对其进行了研究<sup>[6-7]</sup>。随着科技的进步,研究人员尝试使用纯化后的重组人 *ZP* 和表达人 *ZP* 的转基因动物来进行相关研究<sup>[8-9]</sup>。这些实验多为单个蛋白的研究,尚未见同时构建全部 4 种人重组 *ZP*,并研究其相互作用的报道<sup>[10]</sup>。

国外大部分关于 *ZP* 基因突变的研究,人为设定基因敲除或过表达某一基因序列,并非自然产生的基因突变<sup>[5,11-12]</sup>。对于基因突变导致透明带形态异常的患者,少数生殖医学中心进行过卵母细胞内单精子显微注射植入前遗传学诊断的联合治疗,但临床效果不明确,未见大规模报道<sup>[13-15]</sup>。Jimenez-Movilla 团队通过转基因小鼠,人为设定 *ZP2* 和 *ZP3* 基因的突变,以产生有缺陷的蛋白质,实验发现,尾

部缺失会导致 *ZP2* 和 *ZP3* 对裂解敏感以及在卵细胞质内过早地发生聚合,从而无法分泌到胞外以参与透明带的构建,导致透明带缺失<sup>[10]</sup>。基因突变如何影响透明带的结构形成,及其如何影响受精过程,还在探索中。

不同厂家生产的 *ZP* 蛋白抗体(山羊或兔来源的一抗或二抗)质量也参差不齐,在行免疫荧光实验时结果不理想,尤其是 *ZP1* 和 *ZP4* 的抗体,信号比较杂。免疫荧光实验时需要透膜封闭,加一抗和二抗,操作较繁琐,影响实验结果的不可控因素多,且实验结果不稳定。行免疫荧光实验的细胞不能继续培养,无法连续观察。当生成的 *ZP* 可自发荧光,便于边培养边观察,可以在荧光显微镜下观察细胞的生长、荧光的强度和分布后,继续培养,是一个连续动态的过程,操作简单,干扰较少,结果可靠。

本研究采用的 GAMB 一步拼接法省去了基因重组中繁杂的酶切与连接步骤,方便了操作,减少了很多不稳定因素,只需仔细设计好引物,将 *Zs-Green* 绿色荧光基因插入 *ZP1*、*ZP2* 序列的信号肽和 *ZP* 亚结构域之间, *mCherry* 红色荧光基因插入 *ZP3*、*ZP4* 序列的信号肽和 *ZP* 亚结构域之间,构建出 4 种人 *ZP* 基因的荧光表达质粒。RT-PCR 和蛋白印迹法检测证明了被转基因成功的合成和表达,激光共聚焦显微镜观察了 *ZP* 的表达和细胞内分布和定位,结果清晰直观。Gateway 克隆技术是基

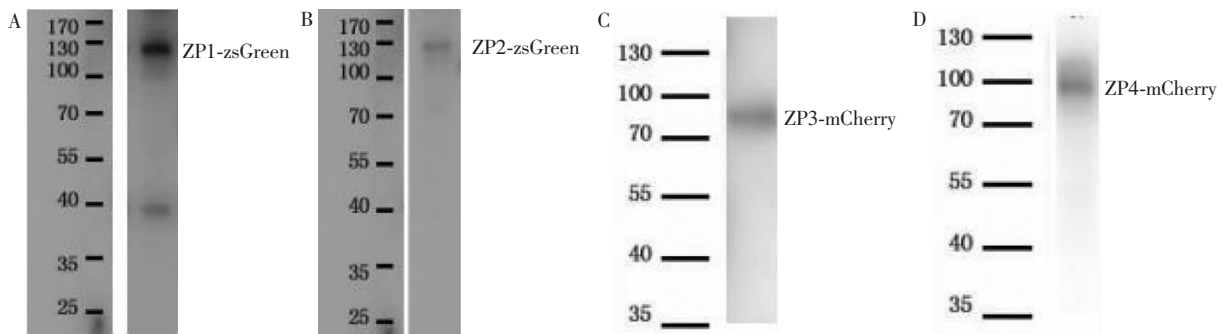
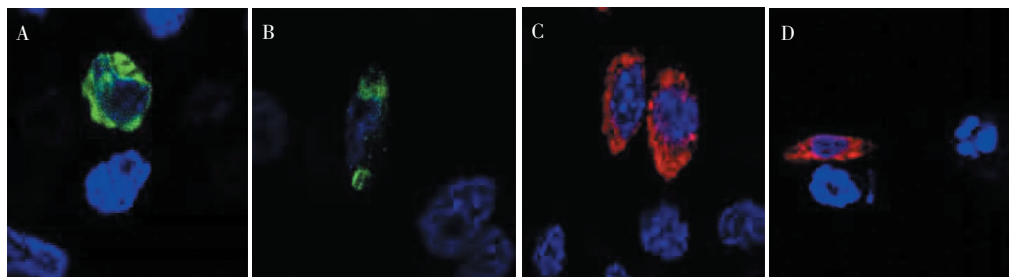


图 2 蛋白印迹法检测人 *ZP1*~*ZP4* 蛋白的表达图



A、B:转染了 *ZP*-ZsGreen 的 CHO 细胞;C、D:转染了 *ZP*-mCherry 的 CHO 细胞。蓝色荧光为 DAPI(细胞核)。

图 3 激光共聚焦显微镜下 CHO 细胞荧光染色和荧光蛋白表达

于 *E. Coli* 中  $\lambda$  噬菌体的位点特异性重组反应, 将目的基因转至入门载体后, 可以通过该技术平行转移至表达载体, 还可以在后续的研究中, 根据需要, 转移到不同的表达载体, 既高效, 又便捷。而慢病毒表达载体 pInducer20, 因为 DOX 诱导其表达, 能根据实验的需要, 在体细胞或卵母细胞内条件性表达, 且不影响细胞的功能。

本实验成功构建了同时表达 4 个 ZP 基因的荧光表达质粒, 成功转入 CHO 细胞并表达, 其条件性表达于体细胞和卵母细胞, 为进一步研究 ZP 间的相互作用, 提供了可靠、成套的实验工具。中间载体上的目的基因可灵活转入其他表达质粒。荧光质粒也可用于构建 ZP 基因突变的表达载体, 进行分子机制的探索, 诊断透明带异常导致的不孕。

#### [参考文献]

- [1] Wassarman PM, Liu C, Litscher ES. Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle[J]. *J Cell Sci*,1996,109(Pt8):2001-2004.
- [2] Gook DA, Edgar DH, Borg J, et al. Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis[J]. *Hum Reprod*,2008,23(2):394-402.
- [3] Bauskin AR, Franken DR, Eberspaecher U, et al. Characterization of human zona pellucida glycoproteins[J]. *Mol Hum Reprod*,1999,5(6):534-540.
- [4] Gupta SK. The Human Egg's Zona Pellucida[J]. *Curr Top Dev Biol*,2018,130:379-411.
- [5] Fahrenkamp E, Algarra B, Jovine L. Mammalian egg coat modifications and the block to polyspermy[J]. *Mol Reprod Dev*,2020,87(3):326-340.
- [6] Sinowatz F, Töpfer-Petersen E, Kölle S, et al. Functional morphology of the zona pellucida[J]. *Anat Histol Embryol*, 2001,30(5):257-263.
- [7] Huang HL, Lv C, Zhao YC, et al. Mutant ZP1 in familial infertility[J]. *N Engl J Med*,2014,370(13):1220-1226.
- [8] Harris JD, Seid CA, Fontenot GK, et al. Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins[J]. *Protein Expr Purif*,1999,16(2):298-307.
- [9] Chen T, Bian Y, Liu X, et al. A recurrent missense mutation in ZP3 causes empty follicle syndrome and female infertility[J]. *Am J Hum Genet*,2017,101(3):459-465.
- [10] Jimenez-Movilla M, Dean J. ZP2 and ZP3 cytoplasmic tails prevent premature interactions and ensure incorporation into the zona pellucida[J]. *J Cell Sci*,2011,124(Pt 6): 940-950.
- [11] Williams Z, Wassarman PM. Secretion of mouse ZP3, the sperm receptor, requires cleavage of its polypeptide at a consensus furin cleavage-site[J]. *Biochemistry*,2001,40(4): 929-937.
- [12] Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. Mouse zona pellucida genes and glycoproteins[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2004,105(2-4):228-234.
- [13] Dai C, Hu L, Gong F, et al. ZP2 pathogenic variants cause in vitro fertilization failure and female infertility[J]. *Genet Med*,2019,21(2):431-440.
- [14] Liu W, Li K, Bai D, et al. Dosage effects of ZP2 and ZP3 heterozygous mutations cause human infertility[J]. *Hum Genet*,2017,136(8):975-985.
- [15] Lv C, Huang HL, Yi DJ, et al. Mutant Zp1 impedes incorporation of ZP3 and ZP4 in the zona pellucida, resulting in zona absence and female infertility in rats[J]. *Biol Reprod*,2021,104(6):1262-1270.

(收稿日期:2021-04-01)

(本文编辑:张 宁)