

草兔卵透明带 3(ZP3)基因的克隆及序列分析

张 浩, 韩崇选*, 郑雪莉, 吴景龙, 隋丹丹

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:根据 GenBank 中欧洲兔 ZP3 mRNA 序列设计特异性引物, 以草兔卵巢组织总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 技术首次克隆得到草兔 ZP3 cDNA 编码区, 命名为 *hZP3* (GenBank 登录号: KC447289)。生物信息学分析表明:扩增出的 *hZP3* 基因编码序列长 1 260 bp, 编码 419 个氨基酸, 包含一个完整的开放阅读框(ORF)。与欧洲兔 ZP3 基因核苷酸一致性高达 96%。预测的 ZP3 蛋白具有 ZP 家族典型特征。系统进化树显示其与欧洲兔亲缘关系最近, 其次是啮齿目动物, 符合物种进化规律。*hZP3* 基因编码区的成功克隆, 为进一步利用该基因通过免疫不育手段防治森林草兔危害提供了基础。

关键词:草兔; 卵透明带 3(ZP3); 克隆; 序列分析

中图分类号:S718.6

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2013)06-0063-06

Cloning and Sequence Analysis of *Lepus capensis* Zona Pellucida 3 cDNA

ZHANG Hao, HAN Chong-xuan*, ZHENG Xue-li, WU Jing-long, SUI Dan-dan

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this study, specific primers were designed according to the ZP3 mRNA sequence of European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in GenBank. Using total RNA isolated from hare (*Lepus capensis*) ovaries, the complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) encoding hare ZP3, named *hZP3*, was amplified by reverse transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR) for the first time (Accession number: KC447289). The *hZP3* cDNA contains an open reading frame of 1 260 nucleotides encoding a polypeptide of 419 amino acid residues. Nucleotide identity between *Lepus capensis* and *Oryctolagus cuniculus* was 96%. The predicted ZP3 amino acids had the typical characteristics of ZP family. Phylogenetic tree analysis suggested that *Lepus capensis* had the closest phylogenetic relationship with the *Oryctolagus cuniculus*, followed by rodents, in line with the laws of the evolution of species. The successful cloning of *hZP3* cDNA provided a theoretical basis for future immune-contraceptive study on hare control.

Key words: *Lepus capensis*; zona pellucida3 (ZP3); clone; sequence analysis

草兔 (*Lepus capensis*) 属兔形目 (Lagomorpha), 兔科 (Leporidae), 兔属 (*Lepus*), 真兔亚属 (*Eulagus*)^[1]。草兔作为陕西各林区共有物种, 随着枪支收缴、封山禁牧和各种造林工程的实施, 其数量剧增, 危害加剧, 严重威胁农、林、牧业的发展^[2-3]。传统的防治方法包括捕杀、物理隔离、药剂趋避、药剂毒杀等, 虽然在控制草兔种群数量或减少林木受害上能起到一定的作用, 但普遍面临着工作量大、效果不明显、专

一性差、草兔种群恢复快或存在环境安全等多种问题^[4-5]。因此, 迫切需要一种能够满足安全、经济、专一性强、持久且简单易行的防治策略。通过免疫不育手段控制有害动物已经成为目前国际研究的热点, 一方面, 不育控制能够借助某种技术手段使雄性或雌性个体绝育或干扰胚胎着床发育, 达到降低生育率, 控制种群数量的目的; 另一方面, 运用免疫手段以生殖过程中关键因子为靶抗原, 借助不育疫苗诱导机体产

收稿日期: 2013-03-25 修回日期: 2013-06-07

基金项目: 林业公益性行业科研专项 (2011404405); 国家林业局重点项目 (2012-02); 西北农林科技大学基本科研业务费 (QN2012036)。

作者简介: 张浩, 男, 在读硕士, 研究方向: 森林鼠害防治。E-mail: zhhotwe@sina.com

* 通信作者: 韩崇选, 男, 教授、研究员, 研究方向: 森林鼠害治理。E-mail: sendakingcat@qq.com

生特异性抗体,从而阻断关键因子发挥作用。由于抗原通常是自身蛋白类或核酸物质,且特异性结合,对环境无污染,对人畜等非靶标动物安全。加之其维持效果时间长,可通过特异性减活病毒等载体方便传播,被越来越多的科学家所探讨。目前,被广泛研究的靶抗原主要为生殖调控激素类抗原、精子表面特异性抗原和卵母细胞表面抗原^[6],而卵透明带 3 正是卵母细胞表面抗原的一种。

卵透明带(zona pellucida, ZP)是哺乳动物卵子外包裹的一层糖蛋白基质,对卵子生成、精卵结合和早起胚胎发育具有重要作用^[7]。卵透明带 3 基因(ZP3)是 ZP 家族中的一员,是精子的最初受体,并使其产生顶体反应与卵质膜融合进而完成受精^[8]。已有研究表明,ZP3 蛋白能够以抗原的形式干扰精卵结合达到抗生育的作用。鉴于 ZP3 的重要功能和具有组织特异性,常被作为免疫不育的靶抗原进行研究^[9-11]。目前已有褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、布氏田鼠(*Lasiopodomys brandtii*)、草原兔尾鼠(*Lagurus lagurus*)、欧洲兔(*Oryctolagus cuniculus*)、野猪(*Sus scrofa*)、牦牛(*Bos grunniens*)、原鸡(*Gallus gallus*)等多种动物的 ZP3 cDNA 序列得到克隆,但草兔的 ZP3 基因(hZP3)未见报道。本研究根据预试验结果,以欧洲兔的 ZP3 cDNA 序列设计特异性引物,扩增克隆得到草兔 ZP3 mRNA 的编码区序列并测序,对其翻译的氨基酸序列进行初步分析预测,以期为后续 hZP3 蛋白的研究以及利用免疫不育技术防治森林草兔奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 草兔利用“下套法”采自咸阳市淳化县秦河镇东源村山区。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取试剂盒购自北京天恩泽,反转录试剂盒为 Fermentas 产品,PCR 试剂盒购自东洋纺,胶回收试剂盒选自宝赛生物,pMD19-T Vector、IPTG、X-gal 购自 TaKaRa,感受态细胞 DH 5 α 购自北京全式金,其它试剂为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 草兔卵巢总 RNA 的提取及第一链 cDNA 合成 草兔解剖后取成年未孕草兔卵巢组织于液氮中保存,取 70 mg 左右卵巢组织置于研钵中液氮研磨成粉末状,按天恩泽柱式动物 RNAout 试剂盒步骤操作提取总 RNA,按 Fermentas 反转录试剂盒说明书进行反转录,合成第一链 cDNA。

1.2.2 PCR 扩增 根据 GenBank 上已收录的欧

洲兔(*Oryctolagus cuniculus*) ZP3 基因的 mRNA 序列(NM_001195720),通过 Primer5.0 设计扩增整个 CDS 区特异性引物,委托上海生工合成。

上游引物(F1): 5'-ATGGGGCTGAGC-TACGGG-3'

下游引物(R1): 5'-TTATTGGGAAGCAGAC-CTGG-3'

以反转录合成的 cDNA 链为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 25 μ L,其中上下游引物(10 pmol $\cdot$ μ L⁻¹)各 0.5 μ L,模板链 1 μ L,ddH₂O 10.5 μ L,Quick Taq HS DyeMix 12.5 μ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,61 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 结束反应。产物以 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 pMD19-T-hZP3 重组质粒的构建 PCR 产物经 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化后,克隆到 pMD19-T 载体上,随后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,涂布于含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养 12~14 h。挑取白色菌落,接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中,过夜振荡培养。菌液 PCR 验证后,筛选阳性转化子交上海生工测序。

1.2.4 hZP3 基因生物信息学分析 用 DNA-MAN 软件将核苷酸序列翻译成氨基酸序列,用 Blast 在线工具进行相似性比较;用 MEGA5 将 hZP3 与 GenBank 上收录的其他多个物种 ZP3 相应区域进行氨基酸的多重比对,构建分子进化树;利用瑞士蛋白质分析专家系统 ExPASy (<http://www.expasy.org>),丹麦理工大学 CBS Prediction Servers(www.cbs.dtu.dk/services/)对其进行分子量、等电点、亲疏水性分析以及信号肽、跨膜区域、翻译后修饰、二级结构等信息的预测。

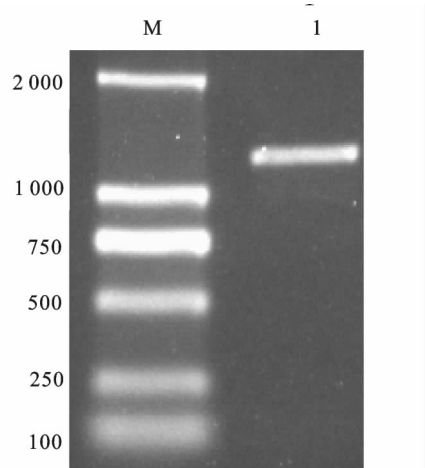
2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增

草兔卵巢总 RNA 经 Maestro Nano 微量分光光度仪测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 1.959,琼脂糖凝胶电泳清晰可见 18s rRNA 和 28s rRNA 两条带,表明质量较好。RT-PCR 扩增后电泳检测,得到约 1 300 bp 大小的 DNA 片段,与预期大小相符(图 1)。

2.2 重组载体的鉴定

经连接、转化、涂板的重组载体进行蓝白斑筛选,挑取 6 个白斑转化菌克隆,以菌液为模板进行 PCR 验证,证实克隆片段与预期大小一致(图 2)。初步断定测序载体构建成功。

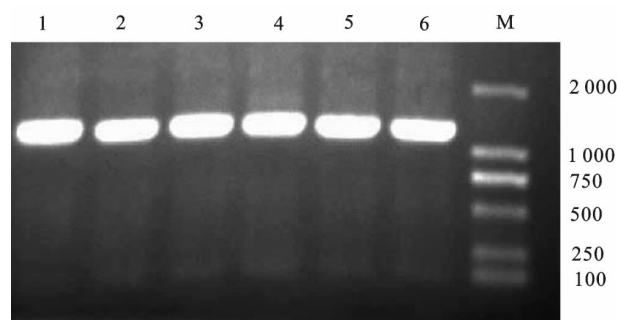


1-PCR 产物,M-DM200 DNA Marker

图 1 *hZP3* 基因 cDNA 序列的 PCR 扩增Fig. 1 PCR product of cDNA of *hZP3* gene

2.3 *hZP3* 的序列分析

测序结果显示克隆到的片段全长 1 260 bp, 编码一个完整的开放阅读框(1~1 260), 碱基组成为 A (16. 27%)、T (18. 57%)、C (34. 21%)、G (30. 95%), 共编码 419 个氨基酸, 其中亮氨酸 (Leu) 比例最高, 为 11%, 负电荷残基 (Asp+Glu) 40 个, 正电荷残基 (Arg+Lys) 31 个(图 3)。



1~6; PCR产物, M: DM2000DNA Marker, 1: 样品

图 2 MD19-T-*hZP3* 的 PCR 扩增Fig. 2 PCR product of pMD19-T-*hZP3*

ProtParam 推导氨基酸序列分子量 45 174. 4 D, 理论等电点 PI 为 5. 85, GRAVY 值为 0. 022, 可认为是疏水性蛋白。翻译后修饰预测显示具有 3 个 Thr O-糖基化位点, 位于第 154, 218, 356 位氨基酸残基 (NetOglyC3. 1); 2 个 Asn N-糖基化位点位于第 123, 145 位 (NetNGlyc1. 0); 11 个 Ser 磷酸化位点, 分别为 147, 164, 180, 185, 226, 243, 306, 341, 342, 345 位, 8 个 Thr 磷酸化位点, 位于第 40, 86, 218, 220, 230, 275, 350, 372 位, 及第 21, 28 两处的 Tyr 磷酸化位点 (NetPhos2. 0)。

1	ATGGGGCTGAGCTACGGGCTCTTCGTCTGCCTACTGCTCTGGGGAGGCTCAGAGCTGTGCTACCCCGACCGCTCTGGTTCTTGACGGGC
1	M G L S Y G L F V C L L L W G G S E L C Y P Q P L W F L Q G
91	GGGACCCGCGACCGCGCGCCCGGTGACGCGCGTGGTCTGGAGGTGTCTGGAGCGCGGCTCGTGGTCACGGTCAGCAGAGACCTTTT
31	G T R Q P A P P V T P V V V E [] L E A R L V V T V S R D L F
181	GGCACCAGGAGCTCATCCAGGAGCGGACCTCAGCCTAGGCCCGAGGGCTGCGAGCGCGGCTCCACGGACACCGTGGTCAGGTTT
61	G T G K L I Q E A D L S L G P E G [] E P Q A S T D T V V R F
271	GAGGTTGGGCTGCATGAGTGTGTAACAGTGTGACAGTGTGACGACTCCCTGGTGTACAGCTCCTTCTGCTCCATGACCCCGCGCC
91	E V G L H E C G N S V Q V T D D S L V Y S S F L L H D P R P
361	GCGGGAACCTGTCCATCTCAGACCAACCGCGCGGAGGTCCCATCGAATGTCGCTACCCAGGCAGGGCAACGTGAGCAGCGGGCG
121	A G N L S I L R T N R A E V P I E [] R Y P R Q G N V S S R A
451	ATCCTGCCGACCTGGGTGCCCTTCTGGACACAGTGTGTGAGAGGAGGCTGGTGTCTCTGCGCCTCATGGAGGCGAAGTGGAGC
151	I L P T W V P F W T T V L S E E R L V F S L R L M E A N W S
541	CGAGAAAGATGTCCCCACCTTCCACCTGGGCGACACGGCCACCTGCAGGCAGAGGTCCGACGGGACGCCACCCCGCCCTGCTGCTG
181	R E K M S P T F H L G D T A H L Q A E V R T G S H P P L L L
631	TTCTGTGGATCGTGGTGGCCACCCGACACCGGACAGCGGCTCCCTATCATACCATCGTGGACTTGCACGGCTGTCTTGTGGAC
211	F V D R [] V A T P T P D Q S G S P Y H T I V D L H G [] L V D
721	GGCCTCTCCGATGGAGCTTCCAAGTTCAAAGCCCCAGGCCGAAGCCGACGTGCTCCAGTTTATGGTGGCGGTGTCCACTTCCGCTAAC
241	G L S D G A S K F K A P R P K P D V L Q F M V A V F H F A N
811	GACTCCAGGCACACGGTCTACATCAGTGTACCTGAGGGTCACTTCTGCCCAGCAAGCCCGGACGCTCAACAAGGCTTGTCTCTTC
271	D S R H T V Y I T [] H L R V I P A Q Q A P D Q L N K A [] S F
901	AACCAGTCTCCAGCAGCTGGGTCCCGGTGGAAGGCAGTGTGACATCTGTGAGTGTGTGGCAACGGTGACTGTGACCTCATCCAGGC
301	N Q S S S S W V P V E G S A D I C E C C G N G D C D L I P G
991	TCCCCATGAACCAACCATGCTGCCCGTCTCTGTGCGAAGCCGAGGCAGTGACGGAAGAAGCAGAGCTACCGTGGGCGCGCTG
331	S P M N Q N H A A R S S V R S R R H V T E E A D V T V G P L
1081	ATCTTCTGGGGAAGGCTGGTGACCCCGCGGCACAGAGGGGCTGGCCTCCGCTGCACAGGCGACCTGGTGTGGGCTTCCGCTGGCC
361	I F L G K A G D P A G T E G L A S A A Q A T L V L G F G L A
1171	ACGGTGGTGTCTGGCTGTGGTGTGTGCTGTGGCTTGCAGGGGGTGCACACTGCTTCCACCCAGGTGTGCTTCCAATAA
391	T V V F L A V A A V V L G L A R G C H T A S H P R S A S Q *

下划线为潜在的弗林蛋白酶水解位点; 方框内为8个保守半胱氨酸残基

图 3 *hZP3* 基因 cDNA 序列和推导的氨基酸序列Fig. 3 cDNA and deduced amino acid sequences of *hZP3*

通过蛋白质序列功能位点数据库(Prosite)搜索发现该氨基酸序列 45~305 位具有典型的 ZP 家族保守性区域,其中 196~237 位符合 ZP 家族特征序列标签:[LIVMFYW]-x(7)-[STAPDNLRV]-x(3)-[LIVMFYW]-x-[LIVMFYW]-x-[LIVMFYW]-x(2)-G-[LIVMFYW]-x-[STA]-[PSLT]-x(2,4)-[DENSG]-x-[STADNQLFM]-x(6)-[LIVM](2)-x(3,4)-C,可初步断定该序列编码 ZP 蛋白。

经 Blast 比对分析,草兔 ZP3cDNA 序列与欧

洲兔 ZP3 相似度最高,为 96%,与马为 80%,与草原兔尾鼠为 75%,与人为 78%。利用 MEGA5 软件将翻译的氨基酸序列与数据库中已登录的 16 种动物 ZP3 氨基酸序列进行多重比对,构建基于 Maximum likelihood 法的系统进化树,结果显示,草兔与欧洲兔先归为 1 类,亲缘关系最近,其次是啮齿目动物,与原鸡,牛等亲缘关系较远(图 4)。

用 SignalP4.0 预测信号肽结果表明,1~22 个氨基酸为信号肽,信号肽裂解点位于第 22 个氨基酸 Pro 和第 23 个氨基酸 Gln 之间(图 5)。

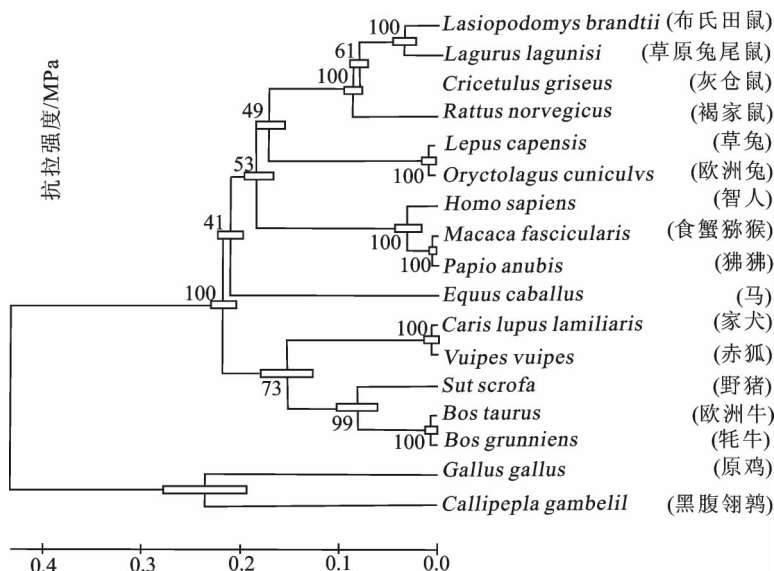


图 4 基于 Maximum likelihood 方法构建的 hZP3 与其他 16 个物种 ZP3 的系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree between hZP3 and ZP3 of other 16 species based on maximum likelihood

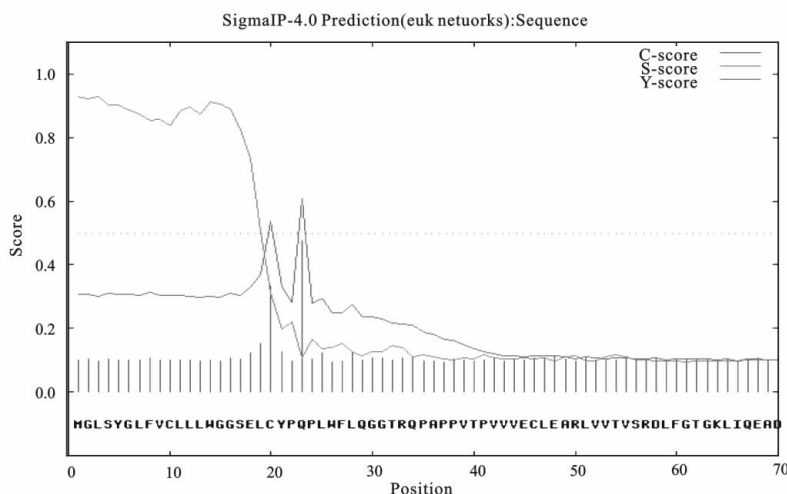


图 5 hZP3 氨基酸序列信号肽预测

Fig. 5 Signal peptide prediction of amino acid sequences of hZP3

去信号肽后 GRAVY 值为 -0.040,可认为是亲水蛋白。用 TMPred 在线工具进行跨膜区域预测表明除信号肽外,在 387~405 位还有一个跨膜区域,这与 TMHMM 预测结果(跨膜区域位于 382~405)略有差异,可能是由于算法不同在预测的精确度上存在差异。通过 SOPMA 对其进行二级结构

预测表明此氨基酸序列主要由无规则卷曲(random coil,51.31%), α -螺旋(Alpha helix,18.62%),延伸链(Extended strand,25.30%)和少量 β -转角(Beta turn,4.77%)组成。这与 Phyre2 预测的二级结构相似,通过 Phyre2 同源建模得到草兔 ZP3 三维结构模型,其结果有 264 个残基最大程度与数据库中

一个 ZP3 蛋白结构模板匹配,相似度 57%,置信度为 100.0%(图 6)。



图 6 hZP3 蛋白三维结构建模预测
Fig. 6 Three-dimensional (3D) structure prediction of hZP3 protein

3 结论与讨论

不育控制是通过降低种群的生育率来降低种群数量,不育个体对种群繁殖起竞争性干扰作用,同时由于占有巢穴,消耗资源,抑制种群的快速恢复^[12]。哺乳动物 ZP 蛋白是由颗粒细胞和卵母细胞共同分泌的,通常有 ZP1,ZP2,ZP3 三种糖蛋白构成^[13]。ZP3 同其他家族成员一样在结构上有一些共性,包括 N 端 22 个氨基酸的信号肽,中间 260 个氨基酸左右的保守 ZP 基序,位于 C 端跨膜区上游弗林蛋白酶切割位点(RXK/RR),以及 C 端跨膜区域和序列尾^[14]。多项研究表明 ZP3 作为精子受体是精卵结合过程中的关键因子,相应基因缺失或受到抗体抑制就会导致

不育,是免疫不育潜在的靶抗原^[9,15-16]。本研究在预实验的过程中,根据已知不同物种的 ZP3 序列的保守区设计了简并引物,扩增出 713 bp 草兔 ZP3 片段(结果未显示),经比对与欧洲兔相似度高达 98%,于是考虑以欧洲兔 ZP3 序列为模板设计整个 CDS 区的特异引物,最终扩增出草兔 ZP3 的完整编码区,并在 GenBank 登陆,序列号为 KC447289。克隆所得片段与欧洲兔保持着较高的一致性,编码 419 个氨基酸,经序列分析发现具有不同物种间 ZP3 前体蛋白都存在的共性结构,这些在结构上的共性不仅揭示着 ZP3 功能上的共性及在精卵结合中的相似作用,而且意味着 ZP3 蛋白可能拥有共同的进化起源。构建进化树也表明不同物种间 ZP3 有较高的保守型,草兔与欧洲兔亲缘关系最近,符合进化关系。与欧洲兔 ZP3 进行氨基酸比对发现有 15 个氨基酸发生变异,其中仅有 4 个为性质相似的变异。5 个变异在 C 端跨膜疏水区比较集中,可能会对 ZP3 蛋白的分泌以及装配产生影响^[17]。ZP 基序上有 4 处变异,但对结构有重要影响的 8 个保守的半胱氨酸依然存在,他们主要集中于两簇,将 ZP 基序分为两个亚区,对后续 ZP 纤维丝状蛋白的组装和亚基间的调节有重要作用^[18]。由于 N 端信号肽在分泌前会被切除,且 C 端跨膜区在 ZP3 形成前由 Furin 切除^[19],因此,成熟的 ZP3 在构成上有赖于 23~343 区间的氨基酸序列,这其间的差异,很可能通过影响蛋白的结构和翻译后修饰,从而造成欧洲兔与草兔生育上的差异。有研究表明 ZP3 的精子结合位点在低

Score	Expect	Hetbod	Identities	Positives	Caps
826 bits(2134)	0.0	Compositional matrix adjust.	404/419(96%)	408/419(97%)	0/419(0%)
Query 1	MGLSYGLFVCLLLWGGSELCYPQLWF	LQGGTRQPAPVTPVVVECLEARLVVIVSRDLF			60
Sbjct 1	MGLSYGLFVCLLLWGGSELCYPQLWF	QGGTRQPAPVTPVVVECLEARLVVIVSRDLF			60
Query 61	GTGKLIQEADLALGPEGCEPQASTDTVVRFEVGLHECGNSVQVLDLDSLVYSSFLHHDPRP	GTGKLIQEADLALGPEGCEPQASTDVVRFEVGLHECGNSVQVLDLDSLVYSSFLHHDPRP			120
Sbjct 61	GTGKLIQEADLALGPEGCEPQASTDTVVRFEVGLHECGNSVQVLDLDSLVYSSFLHHDPRP	GTGKLIQEADLALGPEGCEPQASTDTVVRFEVGLHECGNSVQVLDLDSLVYSSFLHHDPRP			120
Query 121	AGNLSILRTNRAEVPICECRYPRQGNVSSRATLPTWVPFWTTVLSEERLVFSLRLMEANWS	AGNLSILRTNRAEVPICECRYPRQGNVSSRATLPTWVPFWTTVLSEERLVFSLRLMEANWS			180
Sbjct 121	AGNLSILRTNRAEVPICECRYPRQGNVSSRATLPTWVPFWTTVLSEERLVFSLRLMEANWS	AGNLSILRTNRAEVPICECRYPRQGNVSSRATLPTWVPFWTTVLSEERLVFSLRLMEANWS			180
Query 181	REKMSPTFHLGDTAHLQA EVRTGSHPLLFLVDRCVATPTPDQSGSPYHTIVDLHGCLVD	REKMSPTFHLGDTAHLQA EVRTGSHPLLFLVDRCVATPTPDQSGSPYHTIVDLHGCLVD			240
Sbjct 181	REKMSPTFHLGDTAHLQA EVRTGSHPLLFLVDRCVATPTPDQSGSPYHTIVDLHGCLVD	REKMSPTFHLGDTAHLQA EVRTGSHPLLFLVDRCVATPTPDQSGSPYHTIVDLHGCLVD			240
Query 241	GLSDGASKFKAPR PKPDVLQFMVAVFHFANDSRHTVYITCHLRVIPAQQAPDQLNKACSF	GLSDGASKFKAPR PKPDVLQFMVAVFHFANDSRHTVYITCHLRVIPAQQAPDQLNKACSF			300
Sbjct 241	GLSDGASKFKAPR PKPDVLQFMVAVFHFANDSRHTVYITCHLRVIPAQQAPDQLNKACSF	GLSDGASKFKAPR PKPDVLQFMVAVFHFANDSRHTVYITCHLRVIPAQQAPDQLNKACSF			300
Query 301	NQSSSWVPVEGSADICECCGNGDCDLIPGSPMNQNHAAARS SVRSRRHVTEADVTVGPL	NQSSSWVPVEGSADICECCGNGDCDLIPGSPMNQNHAAARS SVRSRRHVTEADVTVGPL			360
Sbjct 301	NQSSSWVPVEGSADICECCGNGDCDLIPGSPMNQNHAAARS SVRSRRHVTEADVTVGPL	NQSSSWVPVEGSADICECCGNGDCDLIPGSPMNQNHAAARS SVRSRRHVTEADVTVGPL			360
Query 361	I FLGKAGDPAGTEGLASAAQATLVLGFG LATVVF LAVA AVLGLARG HTASHPRSA SQ	I FLGKAGDPAGTEGLASAAQATLVLGFG LATVVF LAVA AVLGLARG HTASHPRSA SQ			419
Sbjct 361	I FLGKAGDPAGTEGLASAAQATLVLGFG LATVVF LAVA AVLGLARG HTASHPRSA SQ	I FLGKAGDPAGTEGLASAAQATLVLGFG LATVVF LAVA AVLGLARG HTASHPRSA SQ			419

(Query-草兔, Sbjct-欧洲兔; +表示性质相似的氨基酸变异)

图 7 草兔与欧洲兔 ZP3 氨基酸序列比对

Fig. 7 ZP3 amino acid sequence alignment between hare and European rabbit

聚糖上,多肽主要对诱导顶体反应起重要作用^[20-21]。草兔与欧洲兔相比在 ZP 序列上有保守的两个 Thr O-糖基化位点(154, 356)和两个 N-糖基化位点(123, 345)多了 1 个 218 位的 Thr O-糖基化位点,少了 1 个 178 位的 N-糖基化位点,此外还存在一些磷酸化位点的差异,这些修饰后结构的差异可能是导致生殖季节草兔繁殖力高于欧洲兔的原因^[22]。二级结构预测显示 ZP3 前体蛋白主要包括无规则卷曲,延伸链,α-螺旋和少量 β-转角,对于三级结构的预测目前只能通过与已知结构蛋白序列同源性比对来完成。本研究通过 RT-PCR 技术首次得到了草兔 ZP3 基因的完整编码区序列,不仅丰富了我国物种的基因资源,也为后续蛋白表达抗体制备奠定了基础。

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] 王明春,张芳保,韩崇选,等. 草兔对黄土高原主要造林树种的危害特征[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(11): 42-45.
WANG M C, ZHANG F B, HAN C X, et al. Harmful characteristics of *Lepus capensis* to major afforestation tree species in the Loess Plateau[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2010, 38(11): 42-45. (in Chinese)
- [3] 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)
- [4] 王明春,韩崇选,杨学军,等. 草兔对幼树的选择危害及其防治技术研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(12): 52-56.
WANG M C H, HAN C H X, YANG X J, et al. Selective damage of rabbit to tree seedlings and its control techniques[J]. Jour. of Northwest Sci-Tech Univ. of Agri. and For.: Nat. Sci. Ed., 2004, 32(12): 52-56. (in Chinese)
- [5] 刘裕,张红叶,于春伟. 林木兔害综合防治技术[J]. 现代农业科技, 2012(22): 126-128.
- [6] 孙美玉,马正海,张富春. 免疫不育疫苗的研究进展[J]. 生命科学, 2009, 21(4): 574-578.
SUN M Y, MA Z H, ZHANG F C. Process in the research on immunocontraceptive vaccines[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2009, 21(4): 574-578. (in Chinese)
- [7] WASSARMAN P M, MORTILLO S. Structure of the mouse egg extracellular coat, the *Zona pellucida*[J]. Int. Rev. Cytol., 1991, 130: 85-110.
- [8] WASSARMAN P M, JOVINE L, LITSCHER E S. A profile of fertilization in mammals[J]. Nature Cell Biology. 2001, 3(2): E59-E64.
- [9] HARDY C M, HAVE J F T, PEKIN J, et al. Contraceptive responses of mice immunized with purified recombinant mouse zona pellucida subunit 3 (mZP3) proteins[J]. Reproduction. 2003, 126(1): 49-59.
- [10] MACKENZIE S M, MCLAUGHLIN E A, PERKINS H D, et al. Immunocontraceptive effects on female rabbits infected with recombinant myxoma virus expressing rabbit ZP2 or ZP3[J]. Biology of Reproduction. 2006, 74(3): 511-521.
- [11] OLEARY S, LLOYD M L, SHELLAM G. R. 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[J]. Biology of Reproduction. 2008, 79(5): 849-860.
- [12] 刘汉武,周立,刘伟,等. 利用不育技术防治高原鼠兔的理论模型[J]. 生态学杂志. 2008, 27(7): 1238-1243.
LIU H W, ZHOU L, LIU W, et al. Theoretical model of *Ochotona curzoniae* control via contraception[J]. Chinese Journal of Ecology. 2008, 27(7): 1238-1243. (in Chinese)
- [13] RANKIN T, DEAN J. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat[J]. Reviews of Reproduction, 2000, 5(2): 114-121.
- [14] KIEFER S M, SALING P. Proteolytic processing of human zona pellucida proteins[J]. Biology of reproduction. 2002, 66(2): 407-414.
- [15] LIU C, LITSCHER E S, MORTILLO S, et al. Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996, 93(11): 5431-5436.
- [16] PATERSON M, JENNINGS Z A, WILSON M R, et al. The contraceptive potential of ZP3 and ZP3 peptides in a primate model[J]. Journal of Reproductive Immunology. 2002, 53(1-2): 99-107.
- [17] JOVINE L, QI H Y, WILLIAMS Z, et al. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins[J]. Nature Cell Biology. 2002, 4(6): 457-461.
- [18] HAN L, MONNE M, OKUMURA H, et al. Insights into egg coat assembly and egg-sperm interaction from the X-ray structure of full-length ZP3[J]. Cell. 2010, 143(3): 404-415.
- [19] LITSCHER E S, QI H Y, WASSARMAN P M. Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes[J]. Biochemistry. 1999, 38(38): 12 280-12 287.
- [20] WASSARMAN P M, LITSCHER E S. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida [J]. Int. J. Dev. Biol. 2008, 52(5-6): 665-676.
- [21] LITSCHER E S, WILLIAMS Z, WASSARMAN P M. Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals[J]. Molecular Reproduction and Development. 2009, 76(10): 933-941.
- [22] 卢欣,申守义,高尚文. 草兔的年龄鉴定和种群结构分析[J]. 兽类学报. 1994, 14(3): 176-183.
LU X, SHEN S Y, GAO S H W. Determination of age and analysis of population structure in cape hare (*Lepus capensis*) [J]. Acta Theriologica Sinica, 1994, 14(3): 176-183. (in Chinese)