

# 重组小鼠 Izumo 的表达及其特异性抗体对小鼠体外精卵融合的影响

王德刚/黄天华\*/谢庆东/安 刚

(汕头大学医学院生殖医学研究中心 广东  
汕头 515041)

## Expression of Recombinant Mouse Izumo and Effect of Anti-mouse Izumo Antibody on Mouse Sperm-egg Fusion *in vitro*

WANG De-gang, HUANG Tian-hua\*, XIE Qing-dong, AN Gang  
(Research Center for Reproductive Medicine, Shantou University  
Medical College, Shantou 515041, Guangdong, China)

**【摘要】**背景与目的：精子膜蛋白 Izumo 在精卵融合中起关键作用。本研究旨在表达和纯化重组小鼠 Izumo 蛋白 (mIzumo), 探讨重组 mIzumo 在小鼠体内的免疫原性及其特异性抗体对小鼠体外精卵融合的影响。材料与方法：将编码 mIzumo 蛋白的 cDNA 序列亚克隆到 pET28a(+) 原核表达载体上, 构建 pET28a(+)-mIzumo 重组质粒。在 BL21(DE3) 大肠杆菌中表达重组 6His-mIzumo 融合蛋白, 并通过 Ni<sup>2+</sup>亲和和层析纯化。使用福氏佐剂乳化纯化的 6His-mIzumo, 分别免疫雌性和雄性 C57BL/6 小鼠, 并采集免疫前和免疫后血清。用 Western Blot 和 ELISA 检测血清中抗 6His-mIzumoIgG 抗体的特异性和滴度。采用 IVF 和精卵融合试验检测血清中抗 6His-mIzumo 抗体对小鼠精卵融合的影响。结果：纯化的 6His-mIzumo 在 SDS-PAGE 凝胶上显示为约 60 kD 的单一一条带。免疫了重组蛋白的雌性和雄性小鼠都产生了抗 6His-mIzumoIgG 抗体。抗 6His-mIzumoIgG 抗体与重组蛋白, 小鼠睾丸、附睾及精子膜蛋白存在交叉反应, 免疫印迹显示为约 60kD 的特异性条带。ELISA 结果表明, 免疫 6His-mIzumo 后至少 6 周之内, 血清中的抗 6His-mIzumoIgG 抗体维持在最高水平。免疫后血清处理组的小鼠精子与去透明带卵母细胞发生胞膜融合的能力明显低于免疫前血清处理组 ( $P < 0.01$ )。结论：纯化的 6His-mIzumo 融合蛋白能够诱发雌性和雄性小鼠产生可阻断精卵融合发生的特异性血清抗体。因此, 6His-mIzumo 可作为同种异体抗原用于免疫避孕候选疫苗的研究。

**【关键词】** Izumo; 亲和层析; 精卵融合; 免疫血清; 免疫避孕

中图分类号: R169.41

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)03-0230-05

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & AIM: The sperm membrane protein Izumo was vital for sperm-egg fusion. The aim of this study was to express and purified recombinant mouse Izumo protein (mIzumo) and to assess the immunogenicity of the recombinant mIzumo and the effect of an antibody against recombinant mIzumo on mouse sperm-egg fusion *in vitro*. MATERIALS AND METHODS: The coding sequence of mIzumo was subcloned into pET28a(+). The recombinant fusion protein, 6His-mIzumo, was expressed in *E coli*. BL21(DE3) strain and purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography. Mice of both sexes were immunized with purified 6His-mIzumo combined with Freund's adjuvant. Pre-immunized and post-immunized serum samples were tested for anti-6His-mIzumo activities by Western blot and ELISA. The effect of anti-6His-mIzumo antibodies on sperm-egg fusion was detected by *in vitro* fertilization (IVF) and sperm-egg fusion assay. RESULTS: The purified 6His-mIzumo appeared as a single  $\approx 60$  kD band on SDS-PAGE. Both immunized male and female mice developed serum antibodies, which, on Western blot, cross-reacted with a single  $\approx 60$  kD protein band corresponding to mIzumo in membrane protein extracts of mouse testis, epididymis and sperm. According to ELISA, the titre of anti-6His-mIzumo antibodies remained at the highest level for 6 weeks after final immunization. The ability of post-immunized sera treated sperm to fuse with zona-free oocytes was significantly inferior to that of the sperm treated with

收稿日期: 2007-03-26; 修订日期: 2007-04-18

作者简介: 王德刚(1980-), 男, 四川省达州市人, 硕士研究生, 研究方向: 生殖遗传学。

\* Correspondence to: HUANG Tian-hua Tel: 0754-8900845, E-mail: thuang@stu.edu.cn

pre-immune sera ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION:** The purified 6His-mIzumo could stimulate immune response in mice of both sexes and induce specific antibodies which could inhibit sperm-egg fusion *in vitro*. Therefore, as an allogeneic antigen, 6His-mIzumo could be as a candidate for development of immunocontraceptive vaccine.

【KEY WORDS】Izumo; affinity chromatography; sperm-egg fusion; immune serum; immunocontraception

哺乳动物受精时,在发生顶体反应继而穿过透明带之后,精子顶体后膜与卵细胞膜黏附并发生质膜融合使精子进入卵细胞内,这个过程叫做精卵融合<sup>[1]</sup>。精卵融合是一个多种分子参与、多种配体受体协同作用的复杂过程,虽然已在精子膜上和卵细胞膜上发现了许多与此过程相关的分子,但精卵融合分子机制仍未阐明。

2005年,日本学者 Inoue 发现了一种精子特异性膜蛋白 Izumo<sup>[2]</sup>,它在精卵融合过程中起关键作用。敲除 Izumo 基因的小鼠精子完全丧失了与卵膜融合的能力。目前,在人、大鼠、小鼠睾丸组织中已经克隆出 Izumo 的全长 cDNA 序列;通过计算机基因预测系统也在狗、猩猩、猴、牛等物种基因组中发现了编码 Izumo 蛋白的基因。

免疫避孕是一种通过激活机体免疫反应来实现避孕的抗生育方法。由于在许多不孕夫妇体内检出抗精子抗体,所以在免疫避孕研究中对精子蛋白的关注最为广泛。随着基因重组技术的迅速发展和应用,一部分精子抗原已被重组纯化用于免疫避孕疫苗的研究<sup>[3-4]</sup>。令人遗憾的是,到目前为止仍然没有找到一种精子抗原可以产生完全的抗生育作用<sup>[5]</sup>。Izumo 的发现及其在精卵融合中的关键作用,为精子蛋白作为免疫避孕靶抗原的研究提供了新的思路 and 材料。本研究采用纯化的重组小鼠 Izumo (mIzumo) 免疫 C57BL/6 小鼠,检测小鼠血清中的特异性抗体;同时用免疫后血清处理小鼠精子,检测血清特异性抗体对小鼠体外精卵融合的影响,旨在探讨重组 mIzumo 在小鼠体内的免疫原性及抗重组 mIzumo 抗体对小鼠体外精卵融合的影响,为重组 mIzumo 是否能用于免疫避孕候选抗原的研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠购于中国医学科学院实验动物研究所。8~10 周龄昆明小白鼠购于汕头大学医学院实验动物中心。

**1.1.2 pCXN2-mIzumo 重组质粒** 由日本大阪大学基因组信息研究中心 Naokazu Inoue 教授惠赠。

**1.1.3 主要试剂** 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶 (T4 DNA ligase) 购自 TaKaRa 公司,小牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP) 购自 Fermentas 公司,再生纤维素透析袋

(MWCO: 15,000) 购自 Spectrum 公司,Bradford 蛋白定量试剂盒、可溶性单组分 TMB 底物溶液购自 Tiangen 公司,福氏佐剂购自 BBI 公司,辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠 IgG 抗体、钙离子载体 A23187、Hoechst-33342 购自 Sigma 公司,Western 化学发光试剂盒购自 Santa Cruz 公司,pET28a(+) 表达载体、His·Bind 蛋白纯化试剂盒、天然膜蛋白提取试剂盒购自 Merck 公司,96 孔酶标板购自 Nunc 公司,孕马血清促性腺激素 (PMSF)、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 购自宁波激素制品有限公司,其他常规试剂均为国产分析纯。

**1.1.4 培养基** TYH 培养基的配制参见文献<sup>[3]</sup>。酸性 Tyrode's (pH2.5) 培养基的配制参见文献<sup>[7]</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 原核表达质粒的构建** 将小鼠 Izumo 蛋白编码序列从 pCXN2-mIzumo 亚克隆到原核表达载体 pET28a(+) 上,构建成 pET28a(+)-mIzumo 重组质粒,以制备带有 6 个组氨酸标签的重组小鼠 Izumo 融合蛋白 6His-mIzumo。构建流程如图 1 所示。

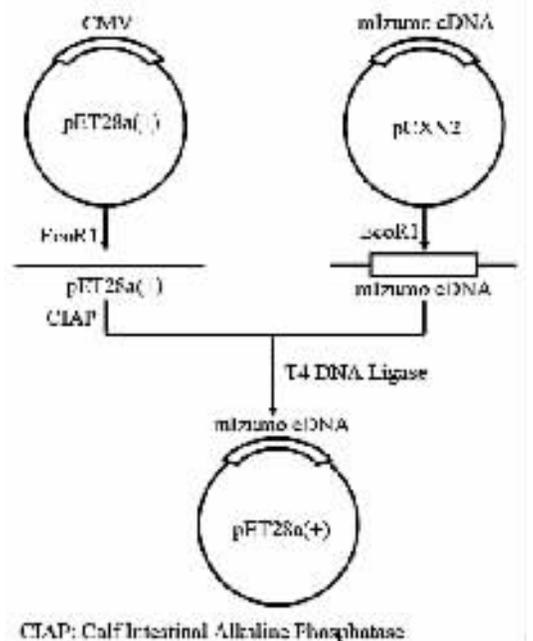


图 1 pET28a(+)-mIzumo 质粒的构建  
Figure 1 Construction of pET28a(+)-mIzumo plasmid

**1.2.2 重组小鼠 Izumo 蛋白的表达与纯化** 将 pET28a(+)-mIzumo 重组质粒转化到 BL21(DE3) 大肠杆菌中。含重组质粒的大肠杆菌于 37 °C 振荡培养至

OD<sub>600</sub> 达到 0.4~0.6, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 诱导表达 5 h, 离心收集菌液沉淀。每 100 ml 菌液沉淀重悬于 4 ml 冰预冷的 Binding Buffer (0.5 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L 咪唑, 6 mmol/L 尿素, pH7.9) 中, -30 °C 反复冻融 3 次, 冰上反复超声破碎直至悬液不粘稠。加入终浓度为 3 mmol/L 的 β- 巯基乙醇, 冰上放置 30 min。因为重组蛋白在大肠杆菌中以包涵体形式存在 (数据待发表), 故在变性条件下使用 His·Bind 蛋白纯化试剂盒纯化 6His-mIzumo, 具体步骤参见试剂盒说明书。将试剂盒纯化洗脱液装入再生纤维素透析袋中, PBS (pH7.4) 4 °C 透析过夜。透析后溶液用聚乙二醇 4 °C 浓缩。使用 Bradford 蛋白定量试剂盒对蛋白溶液定量, 具体步骤参见试剂盒说明书。蛋白溶液分装保存于 -30 °C 备用。

**1.2.3 纯化的重组蛋白免疫 C57BL/6 小鼠及血清的采集** 实验组取 3 只雌性和 3 只雄性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠, 将 100 μl 含有 25 μg 6His-mIzumo 的 PBS 溶液与 100 μl 完全福氏佐剂充分乳化, 腹腔注射抗原和佐剂的混合物。之后每隔 2 周加强免疫 1 次, 共加强免疫 3 次, 以上述方法用不完全福氏佐剂乳抗原, 再经腹腔注射。于初次免疫前、每次加强免疫前、及免疫完成后 2、4、6 周从小鼠眼底静脉丛采血, 室温放置数小时待血清析出, 离心收集血清, 分装保存于 -30 °C 备用, 每只小鼠的血清统一编号为 10w、2w、4w、6w、8w、10w、12w。

**1.2.4 Western blot 检测** 取雄性 C57BL/6 小鼠睾丸、附睾和精子, 采用天然膜蛋白提取试剂盒提取上述 3 种组织或细胞的膜蛋白以备 Western 使用, 具体步骤参见试剂盒说明书。将纯化的 6His-mIzumo 和小鼠睾丸、附睾及精子膜蛋白提取物行 SDS-PAGE, 并将蛋白转至硝酸纤维素膜上。以小鼠免疫前血清为对照, 用小鼠免疫后血清 (1:100 稀释) 和辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠 IgG 抗体 (1:1000 稀释) 对 6His-mIzumo 和小鼠睾丸、附睾及精子膜蛋白提取物进行免疫印迹分析, 用化学发光的方法显示特异性条带。

**1.2.5 ELISA 检测** 96 孔酶标板每孔加入 100 μl 含有 0.1 μg 重组 6His-mIzumo 蛋白的包被缓冲液 (15 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3.5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, pH9.6) 4 °C 过夜。PBS 洗板 3 次, 5% 脱脂奶粉 PBS 溶液 37 °C 封闭 1h。再洗板 3 次, 用 1.2.3 步骤于所取血清 (1:100 稀释) 于 37 °C 孵育 1 h。再洗板 6 次, 用辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠 IgG 抗体 (1:10000 稀释) 37 °C 孵育 1 h。再洗板 6 次, 100 μl 可溶性单组分 TMB 底物溶液室温孵育 30 min, 最后用 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 μl 终止显色反应。以 630 nm 为参照波长, 测定 OD<sub>450</sub>。

**1.2.6 小鼠体外精卵融合试验**<sup>[8]</sup> 取 8~10 周龄雄性昆明小白鼠, 麻醉后颈椎脱臼处死, 取远端附睾剪碎, 移至盛有 TYH 培养基的试管底部, 用上游法获得高活力精子悬液。加入终浓度为 10 μmol/L 的钙离子载体 A23187, 置于 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 培养箱 30 min。用 TYH 培养基洗 2 次。再用 TYH (1.5% BSA) 重悬精子并置于 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 培养箱精子获能 2 h。之后, 用 TYH (0.3% BSA) 培养基调整精子密度为 0.5 × 10<sup>6</sup> ~ 1 × 10<sup>6</sup> / ml, 制成 45 μl 受精液滴并覆以矿物油。实验组加入 5 μl 小鼠免疫后血清, 对照组加入 5 μl 免疫前血清, 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 孵育 30 min 以备受精之用。取 8~10 周龄雌性昆明小白鼠, 腹腔注射 10 IU PMSG 48 h 后再腹腔注射 10 IU HCG, 16~18 h 后颈椎脱臼处死, 从输卵管壶腹收集卵丘, 用含 0.1% 透明质酸酶的 TYH 去除卵丘细胞, 再用酸性 Tyrode's (pH2.5) 培养基去除卵母细胞透明带。将去透明带的卵母细胞置于含有 1 μg/ml Hoechst-33342 的 TYH 中, 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 孵育 10 min。用新鲜 TYH 洗 3 次后, 将卵母细胞加入制备好的实验组和对照组受精液滴中, 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 受精 1 h。吸出受精后的卵母细胞, 用 2.5% 戊二醛室温固定 30 min, 荧光显微镜下观察精卵融合情况。发生融合的精子核在紫外光下发蓝光, 没有发生融合的精子则没有。

## 2 结果

### 2.1 原核表达质粒 pET28a (+)-mIzumo 的鉴定

重组质粒用 EcoR I, BamH I, Nhe I / Stu I 酶切可分别得到 1209 bp、1097 bp 和 1178 bp 的特异性片段 (图 2)。重组质粒测序结果显示, pET28a (+)-mIzumo 重组质粒可以正确表达 mIzumo。说明 pET28a (+)-mIzumo 重组质粒构建成功。

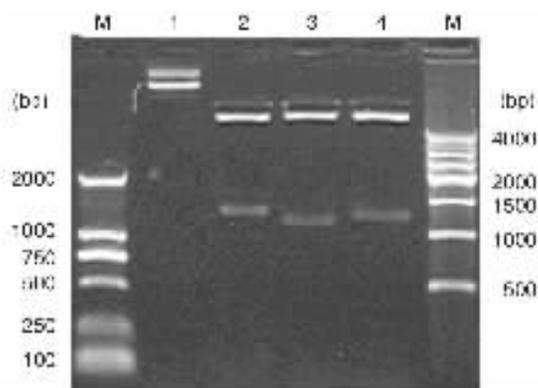


图 2 重组质粒 pET28a (+)-mIzumo 的酶切鉴定  
Figure 2 Identification of recombinant pET28a (+)-mIzumo plasmid.  
M: DNA marker; 1: pET28a (+)-mIzumo plasmid; 2: EcoR I digest;  
3: BamH I digest; 4: Nhe I / Stu I digest.

### 2.2 重组 6His-mIzumo 蛋白的表达与纯化

转化了 pET28a(+) -mIzumo 重组质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) 经 IPTG 诱导表达后, 菌体裂解物行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示诱导后的菌体裂解物在约 60 kD 处有一特异性条带(图 3)。在变性条件下, 经 His·Bind 蛋白纯化试剂盒得到纯化的 6His-mIzumo, SDS-PAGE 电泳示约 60 kD 的单一特异条带(图 3)。说明成功得到了纯化的 6His-mIzumo, 以备免疫小鼠之用。

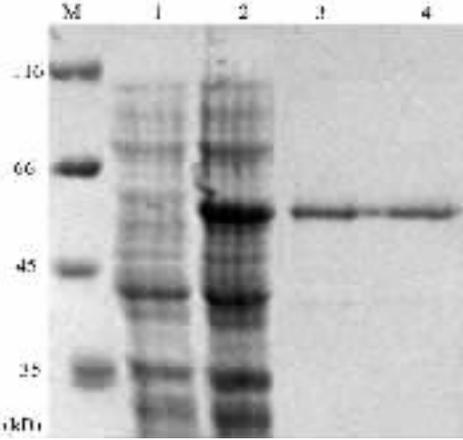


图 3 纯化的重组 6His-mIzumo 蛋白的 SDS-PAGE 结果。

Figure 3 SDS-PAGE pattern of purified recombinant 6His-mIzumo. M: protein molecular weight marker; Lane 1: bacterial lysate without IPTG induction; Lane 2: bacterial lysate with IPTG induction for 6 h; Lane 3 & 4: the purified recombinant 6His-mIzumo.

### 2.3 Western blot 检测结果

免疫印迹分析结果显示: 所有的免疫后血清与 6His-mIzumo 及小鼠睾丸、附睾及精子膜蛋白提取物反应, 均在约 60 kD 处出现特异性条带, 而免疫前血清未出现任何特异性条带(图 4)。说明免疫了 6His-mIzumo 的小鼠产生的抗体不仅能特异的识别重组蛋白, 还能与小鼠睾丸、附睾及精子膜蛋白中的 Izumo 蛋白发生特异的交叉反应。

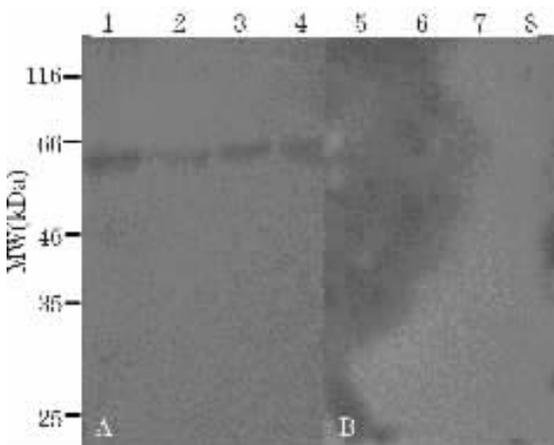


图 4 免疫后血清和免疫前血清的 Western blot 结果

Figure 4 Western blot pattern of post-immune and pre-immune serum. Lane 1 & 5: purified 6His-mIzumo; Lane 2 & 6: protein extracts of mouse testis; Lane 3 & 7: protein extracts of mouse epididymis; Lane 4 & 8: protein extracts of mouse sperm; Membrane A: probed with post-immune serum; Membrane B: probed with pre-immune serum.

### 2.4 ELISA 检测结果

以纯化的 6His-mIzumo 为抗原, 检测血清中抗 6His-mIzumo IgG 抗体的出现和随时间变化的趋势。结果显示, 免疫了 6His-mIzumo 的雌性和雄性 C57BL/6 小鼠均能产生特异的血清抗 6His-mIzumo IgG 抗体; 第一次加强免疫后 2 周, 血清抗 6His-mIzumo 抗体滴度开始上升, 第二次加强免疫后 2 周达到最大, 并一直持续到末次免疫后 6 周(图 5)。说明末次免疫 6His-mIzumo 后至少 6 周之内, 小鼠血清中的抗 6His-mIzumo IgG 抗体维持在最高水平。

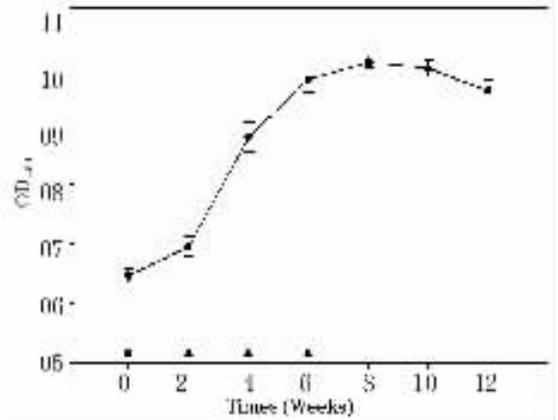


图 5 不同时间采集的 6His-mIzumo 免疫小鼠血清的 ELISA 结果  
Figure 5 ELISA result of the sera collected at different time from the mice ( $n=6$ ) immunized with 6His-mIzumo. Arrowheads indicated the date when each immunization was given.

### 2.5 小鼠体外精卵融合试验结果

免疫后血清处理组, 精卵融合率(发生精卵融合的卵母细胞/总的卵母细胞数)为 2.9%, 融合指数(发生精卵融合的卵母细胞表面的平均融合精子个数)为 1.0, 两个指标均明显低于免疫前血清组( $P < 0.01$  表 1)。说明免疫后血清中存在的抗 6His-mIzumo 抗体可以阻断小鼠体外精卵融合。

表 1 免疫后和免疫前血清处理的小鼠精子的精卵融合率和融合指数  
Table 1 The fusion rate and fusion index of mouse sperm treated with post- and pre-immune sera respectively.

Sera	Total eggs	Fused eggs	Fused sperm	Fusion rate (%)	Fusion index ( $\bar{x} \pm s$ )
Post-immune	103	3	3	2.9	1.0 $\pm$ 0.0
Pre-immune	127	73	185	57.5	2.5 $\pm$ 0.2

## 3 讨论

mIzumo 是在小鼠睾丸组织和精子中特异表达的 I 型膜蛋白, 属于免疫球蛋白超家族<sup>[2]</sup>, 其编码基因位于小鼠第 7 号染色体上。根据 mIzumo 的全长 mRNA 序列分析可知, 其前体蛋白由 397 个氨基酸组成, 氨基端(1-21)有信号肽序列, 羧基端(320-340)有疏水性的跨膜区序列。mIzumo 可能的功能域是细胞外免疫球蛋

白样结构域(161-251)。在此结构域中,Asn204是潜在的N连接糖基化位点,Cys182和Cys233形成分子内二硫键。同源性分析显示,mIzumo的氨基酸序列与人类的存在57%的同源性。因此,对于mIzumo相关功能和特性的研究,有助于精卵融合机制和免疫避孕疫苗的研究。

我们成功地构建了可以表达重组小鼠Izumo蛋白的原核表达质粒pET28a(+)-mIzumo。在此重组质粒中,mIzumo的氨基端被融合了6His纯化标签。利用6His能与镍离子特异性结合的特性,我们成功地得到了纯化的重组蛋白6His-mIzumo。在实验中,我们发现重组蛋白以包涵体的形式存在于大肠杆菌细胞质中,这可能是由于mIzumo是膜蛋白,在其羧基端存在一个疏水性的跨膜区序列。同样的情况在原核表达其他膜蛋白的实验中也曾发生过<sup>[11-12]</sup>。因此,我们采用高浓度尿素作为变性剂,纯化重组蛋白得到的重组蛋白6His-mIzumo在10% SDS-PAGE胶上表现为约60 kD的单一一条带,这比通过其氨基酸序列推算的分子量(49kD)略大,但是我们所得到的蛋白的确是Izumo蛋白,因为在Western印迹中,所有6His-mIzumo抗血清能够特异的识别小鼠睾丸、附睾及精子蛋白提取物中同样约60kD的蛋白。这种分子量上的差别可能与蛋白电泳凝胶的浓度和使用的分子Marker有关,这些因素可能都会影响蛋白质分子在电泳时的迁移率<sup>[11]</sup>。

在我们的实验中,所有免疫了6His-mIzumo的雌性和雄性小鼠均产生了特异的IgG体液免疫应答。根据以6His-mIzumo为包被抗原的ELISA结果,特异地针对6His-mIzumo的IgG免疫应答开始出现于初次免疫后2周,特异性IgG抗体滴度维持最高水平至少到末次免疫后6周。同样的由重组同种异体抗原诱导的小鼠免疫应答变化规律在其他研究中也有所报道<sup>[11-12]</sup>。这说明了,原核表达的重组mIzumo对小鼠具有很强的免疫原性,可以激活小鼠免疫系统产生特异性IgG抗体。

在Western印迹分析中,6His-mIzumo抗血清均能识别小鼠睾丸、附睾及精子蛋白提取物中同样大小的蛋白质。这说明mIzumo可能在小鼠精子生成时就已经表达于精子膜上了,而不是在附睾中成熟时才表达的;同时也证明了,免疫6His-mIzumo能够诱导小鼠产生与天然mIzumo蛋白存在交叉反应的IgG抗体。我们进一步采用IVF和精卵融合试验检测了6His-mIzumo抗血清对小鼠体外精卵融合的作用。结果显示,6His-mIzumo抗血清几乎完全阻断了精卵融合的发生,且抗血清对精子活动力没有明显影响。这说明6His-mIzumo抗血清中的特异性抗体在体外可以阻断体外精卵融合从而导致受精失败。

综上所述,我们得到的重组mIzumo免疫小鼠后,可

以激活小鼠免疫系统产生能够阻断体外精卵融合的特异性IgG抗体。该结果显示Izumo蛋白有作为免疫避孕疫苗靶抗原的可能性,但免疫重组mIzumo在活体动物身上能否也起到抗生育的作用尚需进一步探索,这将是我们要开展的工作。

## 参考文献:

- [1] Yanagimachi, R. Mammalian Fertilization [M]. In: Knobil E, Neill J. the physiology of reproduction. New York: Raven press, 1994: 245-254.
- [2] Inoue N, Ikawa M, Isotani A, et al. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs[J]. *Nature*, 2005, 434: (7030) 234-238.
- [3] Naz RK, Zhu X. Recombinant fertilization antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice[J]. *Biol Reprod*, 1998 59(5): 1095-1100
- [4] Gaudreault C, Montfort L, Sullivan R. Effect of immunization of hamsters against recombinant P26h on fertility rates. *Reproduction*, 2002 123(2): 307-313.
- [5] Naz RK. Contraceptive vaccines. *Drugs*, 2005 65(5): 593-603.
- [6] Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T. Studies on the fertilization of mouse egg *in vitro* [J]. *Jpn J Anim Reprod*, 1971, 16(1), 147-151.
- [7] Nicolson GL, Yanagimachi R, Yanagimachi H. Ultrastructural localization of lectinbinding sites on the zona pellucida and plasma membranes of mammalian eggs[J]. *J cell Biol*, 1975, 66(2): 263-274.
- [8] Conover JC, Gwatkin RBL. Pre-loading of mouse oocytes with DNA-specific fluorochrome (Hoechst 33342) permits rapid detection of sperm-oocyte fusion[J]. *J Reprod Fertil*, 1988 82(2): 681-690.
- [9] Charbonnier F, Kohler T, Pechere JC, et al. Overexpression, refolding, and purification of the histidine-tagged outer membrane efflux protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Protein Expr Purif*, 2001 23(1): 121-127.
- [10] Shaw AZ, Miroux B. A general approach for heterologous membrane protein expression in *Escherichia coli*: the uncoupling protein, UCP1, as an example[J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 228(1): 23-35.
- [11] Hardy CM, Mobbs KJ. Expression of recombinant mouse sperm protein sp56 and assessment of its potential for use as an antigen in an immun contraceptive vaccine[J]. *Mol Reprod Dev*, 1999 52(2): 216-224
- [12] Hardy CM, ten Have JF, Mobbs KJ, et al. Assessment of the immun contraceptive effect of a zona pellucida 3 peptide antigen in wild mice[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2002 14(3-4): 151-155.