



西北农林科技大学

硕士学位论文

奶山羊 *AQP7* 基因克隆及多克隆抗体制备研究

学科专业 动物遗传育种与繁殖

研究方向 动物生物技术

论文作者 李金涛

指导教师 史怀平 教授

论文提交时间 2022 年 5 月

Thesis Submitted to Northwest A & F University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for Degree of Master of Agriculture

Study on Cloning of AQP7 Gene and Preparation of Polyclonal Antibody in Dairy Goat

Major: Animal Genetics, Breeding and Reproduction Science

Research Field: Animal Biotechnology

Candidate: Li Jintao

Supervisor: Shi Huaiping

Date of submission: May, 2022

College of Animal Science and Technology

Northwest A & F University

May, 2022

分类号：S813.3
UDC：636.3
密 级：公开

学校代码：10712
研究生学号：2019050404

西北农林科技大学硕士学位论文

奶山羊 *AQP7* 基因克隆及多克隆抗体制备研究

论文作者：李金涛

指导教师：史怀平 教授

答辩委员会：

西北农林科技大学动物科技学院 孙 超 教 授（主席）

西北农林科技大学动物医学院 华进联 研究员

西北农林科技大学动物科技学院 郑惠玲 教 授

西北农林科技大学动物科技学院 王 平 副教授

西北农林科技大学动物医学院 陈华涛 副教授

答辩日期：2022.5.19

本项目由国家自然科学基金(No.31672398)资助完成

研究生学位论文的独创性声明


本人声明：所呈交的学位论文是我个人在导师指导下独立进行的研究工作及取得的研究结果；论文中的研究数据及结果的获得完全符合学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》，如果违反此规定，一切后果与法律责任均由本人承担。

尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究结果，也不包含其他人和自己本人已获得西北农林科技大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同事对本研究所做的任何贡献均已在论文的致谢中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：李金涛 时间：2022年 5月 27日

导师指导研究生学位论文的承诺

本人承诺：我的研究生 李金涛 所呈交的学位论文是在我指导下独立开展研究工作及取得的研究结果，属于我现岗职务工作的结果，并严格按照学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》而获得的研究结果。如果违反学校《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》，我愿接受按学校有关规定的处罚处理并承担相应导师连带责任。

导师签名： 时间：2022年 5月 27日

摘要

奶山羊产业是我国奶业的重要成员之一，羊奶深受消费者青睐，但其基础母羊数量与质量存在严重不足，直接影响到本产业发展。性别控制技术由于能有效控制新生动物的性别，已经在众多动物中广泛应用，然而目前在理论上证据匮乏，在奶山羊产业中应用较少，而且效果不好，需要深入研究，破解其中存在的科学问题，获得的结果将直接应用于奶山羊，推动奶山羊产业发展。

课题组前期研究发现，奶山羊 X 精子和 Y 精子存在一个显著差异的水通道蛋白 7(Aquaporin 7, AQP7)。本研究首先从奶山羊睾丸组织中克隆得到 AQP7 基因完整的 CDS 区全长，成功构建原核表达载体，表达并纯化重组蛋白，利用纯化后的重组蛋白免疫新西兰大白兔获得多克隆抗体并检测 X、Y 精子中 AQP7 蛋白的表达情况，为研究 AQP7 蛋白以及通过 AQP7 控制精子性别奠定基础。研究结果如下：

1.克隆得到奶山羊 AQP7 基因 1077 bp 序列，测序得到该基因 CDS 区全长 993 bp，共编码 330 个氨基酸。对该基因的 CDS 区进行生物信息学分析，由二级结构分析得到该蛋白 C 端二级结构丰富；TMHMM 预测该蛋白有 3 段膜外区；最终结合开放阅读框(ORF)预测结果得到适合作为抗原片段的 339bp 基因序列，克隆得到该抗原片段的基因序列。同源性分析发现该段序列与兔的同源性低，可作为免疫肽段。并分析该肽段稀有密码子比例，选择了适合表达重组蛋白的 BL21(DE3)感受态细胞。

2.构建了 pET32a(+)-AQP7 重组载体，双酶切鉴定得到 5900 bp 的载体序列条带和 339 bp 的抗原片段基因序列条带，诱导表达得到 30 kD 的 AQP7 重组蛋白，并筛选出该重组蛋白最适表达条件为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h，探索蛋白表达形式发现重组蛋白以包涵体的形式存在于沉淀中，利用 8 M 尿素破碎包涵体并变性蛋白，后用 Ni-NTA Resin 对重组蛋白进行亲和纯化，SDS-PAGE 目的条带显示纯化效果良好，对纯化后的蛋白进行梯度透析复性，复性后用 BCA 法测定 AQP7 重组蛋白的质量浓度 ≥ 2.0 mg/mL。

3.制备了奶山羊 AQP7 多克隆抗体，I-ELISA 法检测到 1:128000 的抗体效价。Western blot 检测发现，抗体在稀释 5000 倍时对抗原蛋白仍有良好的特异性识别，该抗体可以识别奶山羊睾丸组织中的 AQP7 蛋白，且在 X 精子和 Y 精子蛋白中检测到 AQP7 蛋白的差异表达，Y 精子中 AQP7 蛋白含量高；在奶山羊精子上进行免疫荧光发现，该抗体可以和精子结合，AQP7 蛋白定位于精子顶体；随后制作奶山羊睾丸组织切片并免疫荧光染色，发现该蛋白在精子发生的各阶段表达量有动态变化，且在分化为长形精子后表达量最高。

综上所述，本研究成功克隆出奶山羊 *AQP7* 基因，纯化得到 AQP7 重组蛋白，制备出奶山羊 AQP7 多克隆抗体，利用该抗体检测到 *AQP7* 基因在奶山羊 X、Y 精子上表达存在差异，为后续研究奶山羊 *AQP7* 基因提供理论基础与分子工具。

关键词：奶山羊；AQP7；精子；基因克隆；多克隆抗体

ABSTRACT

Dairy goat industry is one of the important members of China's dairy industry. Goat milk is favored by consumers, but its basic ewe quantity and quality are seriously insufficient, which directly affects the development of the industry. Sex control technology has been widely used in many animals because it can effectively control the gender of newborn animals. However, at present, there is a lack of theoretical evidence, it is less used in the dairy goat industry, and the effect is not good. It needs in-depth research to solve the existing scientific problems. The results obtained will be directly applied to dairy goats and promote the development of dairy goat industry.

The previous study of the research group found that there was a significant difference in aquaporin 7 (AQP7) between X sperm and Y sperm of dairy goats. In this study, the full-length CDS region of AQP7 gene was cloned from the testis of dairy goats. The prokaryotic expression vector was successfully constructed, and the recombinant protein was expressed and purified. The purified recombinant protein was used to immunize New Zealand white rabbits to obtain polyclonal antibody, and the expression of AQP7 protein in X and Y sperm was detected, which laid a foundation for the study of AQP7 protein and the control of sperm gender through AQP7. The results are as follows:

1. The 1077 bp sequence of AQP7 gene of dairy goat was cloned, and the total length of CDS region of the gene was 993 bp, encoding 330 amino acids. Bioinformatics analysis of the CDS region of the gene showed that the C-terminal secondary structure of the protein was rich; TMHMM predicted that the protein had three extracellular regions; Finally, combined with the prediction results of open reading frame (ORF), the 339 bp gene sequence suitable for antigen fragment was obtained, and the gene sequence of the antigen fragment was cloned. Homology analysis showed that the sequence had low homology with rabbit and could be used as immune peptide. The proportion of rare codons in the peptide was analyzed, and BL21 (DE3) competent cells suitable for expressing recombinant protein were selected.

2. pET32a (+) - AQP7 recombinant vector was constructed. 5900 bp vector sequence band and 339 bp antigen fragment gene sequence band were identified by double enzyme digestion. The 30 kD AQP7 recombinant protein was induced and expressed. The recombinant protein was induced by IPTG with the optimum expression condition of 0.5 mmol/l for 6 h. The protein expression form was explored. It was found that the recombinant

protein was expressed in the form of inclusion body in the precipitation. The inclusion body was broken and the protein was denatured with 8 M urea, The recombinant protein was affinity purified with Ni NTA resin. The target band of SDS-PAGE showed that the purification effect was good. The purified protein was renatured by gradient dialysis. After renaturation, the mass concentration of AQP7 recombinant protein was determined by BCA method ≥ 2.0 mg / ml.

3. The polyclonal antibody of milk goat AQP7 was prepared, and the antibody titer of 1:128000 was detected by I-ELISA. Western blot showed that the antibody still had good specific recognition of antigen protein when diluted 5000 times. The antibody could recognize AQP7 protein in natural testicular tissue of dairy goat, and the protein differential expression of AQP7 gene was detected in X sperm and Y sperm protein. The content of AQP7 protein in Y sperm was high; Immunofluorescence on milk goat sperm showed that the antibody could bind to sperm, and the difference of fluorescence intensity was observed in X sperm and Y sperm, indicating that AQP7 protein was located in sperm acrosome;; Then the testicular tissue sections of dairy goats were made and immunofluorescence staining showed that the expression of the protein changed dynamically in each stage of spermatogenesis, and the expression was the highest after differentiation into long sperm.

To sum up, this study successfully cloned the dairy goat AQP7 gene, purified the AQP7 recombinant protein, and prepared the dairy goat AQP7 polyclonal antibody. Using this antibody, it was detected that the expression of AQP7 gene was different on the X and Y sperm of dairy goat, which provided theoretical basis and molecular tools for the follow-up study of dairy goat AQP7 gene.

KEY WORDs: dairy goat; AQP7; Sperm; Gene cloning; Polyclonal antibody

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
主要符号对照表.....	IX
第一章 文献综述.....	1
1.1 性别控制技术.....	1
1.1.1 性别控制在畜牧生产中的意义.....	1
1.1.2 常见性别控制技术.....	1
1.2 精子发生和成熟控制.....	2
1.2.1 精子发生过程.....	2
1.2.2 精子发生中的基因调控.....	3
1.2.3 精子性染色体编码基因.....	3
1.3 X、Y 精子膜蛋白抗体的研究.....	4
1.4 水通道蛋白 7 (AQP7) 的研究进展.....	5
1.5 本研究的目的及意义.....	6
第二章 奶山羊 <i>AQP7</i> 基因克隆及生物信息学分析.....	7
2.1 试验材料.....	7
2.1.1 仪器及试剂.....	7
2.1.2 溶液的配制.....	7
2.2 试验方法.....	7
2.2.1 引物设计.....	7
2.2.2 奶山羊睾丸组织总 RNA 提取及 cDNA 合成.....	8
2.2.3 <i>AQP7</i> 基因 CDS 区全长扩增.....	8
2.2.4 克隆产物纯化.....	8
2.2.5 目的序列加 poly A 尾及测序.....	8
2.2.6 <i>AQP7</i> 蛋白生物信息学分析及抗原片段的选取.....	9
2.2.7 抗原片段基因序列的扩增.....	9
2.2.8 抗原片段基因序列的稀有密码子分析.....	9
2.3 结果与分析.....	9
2.3.1 <i>AQP7</i> 基因 CDS 区长度的克隆.....	9
2.3.2 <i>AQP7</i> 蛋白理化性质分析.....	10

2.3.3 AQP7 蛋白二级结构预测	11
2.3.4 AQP7 蛋白亲水性、抗原指数、表面可及性和跨膜结构域预测	11
2.3.5 奶山羊 AQP7 蛋白同源性分析	12
2.3.6 抗原片段基因序列的克隆	13
2.3.7 抗原片段基因序列的稀有密码子比例分析结果	13
2.4 讨论	14
2.5 小结	14
第三章 奶山羊 AQP7 重组蛋白的原核表达及亲和纯化	15
3.1 试验材料	15
3.1.1 仪器及试剂	15
3.1.2 菌株及质粒	15
3.1.3 主要溶液的配制	15
3.2 试验方法	15
3.2.1 pET-32a(+)重组载体构建及双酶切鉴定	15
3.2.2 重组蛋白的诱导表达及 Western Blot 鉴定	17
3.2.3 重组蛋白表达条件及表达形式的探索	17
3.2.4 重组蛋白的大量诱导表达及纯化	17
3.2.5 重组蛋白的透析复性	17
3.3 结果与分析	18
3.3.1 pET32a(+)-AQP7 重组质粒的鉴定	18
3.3.2 重组蛋白的鉴定	18
3.3.3 重组蛋白表达条件及表达形式的探索	20
3.3.4 重组蛋白的纯化	21
3.4 讨论	22
3.5 小结	23
第四章 奶山羊 AQP7 蛋白多克隆抗体的制备及鉴定	24
4.1 试验材料	24
4.1.1 仪器及试剂	24
4.1.2 主要溶液的配制	24
4.1.3 试验动物	24
4.2 试验方法	25
4.2.1 重组蛋白的乳化	25
4.2.2 动物免疫及抗血清采集	25

4.2.3 抗血清效价检测	25
4.2.4 多克隆抗体稀释倍数及特异性检测	25
4.2.5 奶山羊 X 精子和 Y 精子 AQP7 蛋白表达的检测	25
4.2.6 精子及睾丸组织切片免疫荧光	25
4.3 结果与分析	26
4.3.1 多克隆抗体效价评估	26
4.3.2 多克隆抗体稀释倍数的检测	26
4.3.3 多克隆抗体对睾丸组织 AQP7 蛋白的识别	27
4.3.4 AQP7 蛋白在奶山羊 X 精子和 Y 精子差异表达的检测	27
4.3.5 精子及睾丸组织切片免疫荧光检测	28
4.4 讨论	30
4.5 小结	31
结论	32
创新点	33
参考文献	34
附录	40
致谢	51
个人简历	53

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
AQP7	Aquaporin 7	水通道蛋白 7
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
IVF	In Vitro Fertilization	体外受精
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase	脂肪甘油三酯脂肪酶
G3P	Glyceraldehyde 3-phosphate	3-磷酸甘油醛
GlpT	Glycerol-3-phosphate Transporter	甘油-3-磷酸转运蛋白
AZF	Azoospermia Factor	无精子症因子
UTR	Untranslated Regions	非翻译区
CDS	Coding Sequence	编码序列
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism	单核苷酸多态性
TAG	Triacylglycerol	三酰甘油
SCF	Stem Cell Factor	干细胞因子
I-ELISA	Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay	间接酶联免疫吸附试验
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国家生物技术信息中心
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBST	Phosphate Buffer Solution Tween	磷酸盐吐温缓冲液
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
TEMED	Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯膜
TMB	Tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺

第一章 文献综述

1.1 性别控制技术

1.1.1 性别控制在畜牧生产中的意义

哺乳动物的性别控制技术是通过人为的技术手段干扰动物后代性别，打破自然界接近 1:1 的公母比例，根据畜牧生产的需要产生可以控制后代性别的一门技术。哺乳动物的性别控制技术对当今畜牧业的快速发展具有极其重大的意义。通过性别控制技术提高群体中母畜比例，对于家畜遗传改良提高，家畜繁殖效率的加快均有促进作用，进而促进家畜优良品种的繁育速度。在乳用畜种上，增加母畜的比例可以提高生产效益，且利于快速扩群，扩大产业规模。

1.1.2 常见性别控制技术

1.1.2.1 早期胚胎鉴定

早期胚胎鉴定是用细胞学、免疫学或分子生物学等现在技术手段对完成受精早期胚胎进行性别鉴定，随着 PCR 技术的发展，早期胚胎鉴定技术越发快速准确。通过早期胚胎鉴定技术可以较早地淘汰没有经济价值的后代，避免了繁殖期的浪费以及后续饲料管理消耗。但早期胚胎鉴定技术不仅需要掌握胚胎移植技术高级技术人员，同时也会对动物造成一定的损伤，因此，在大规模的畜牧生产中并不常用。

1.1.2.2 控制授精环境

家畜授精时外部环境对后代性别有重要影响，如阴道内酸碱度、日粮营养水平、输精时间等。控制授精环境的方法在研究中较好，然而其精准度不高，提高的性别比例较低。但由于其操作简单，成本较低，且对母畜基本无害等优点，在畜牧生产中有较高的应用价值。

1.1.2.3 X、Y 精子分离法

X、Y 精子分离的方法较多，本质是将人工采集的精液，在体外分离为 X 精子和 Y 精子，然后选用所需要的精子进行人工授精进而控制性别的方法。由于 Y 精子携带其特有的 Y 染色体，因此与 X 精子之间必然存在某些表型差异，这就使得应用物理、化学和生物学的方法分离它们成为可能（张光勤和李建民，2002）。有研究表明，X 精子和 Y 精子 DNA 含量的差异为 3.8%，利用流式细胞仪分选获得的 X 精子或 Y 精子纯度可达 90%（张汇东等，2015）。

目前，已知的可以实现 X、Y 精子分离的技术有多种，包括梯度离心法、免疫学分离法、流式细胞法、沉降法和电泳法等。

(1) 梯度离心法简单快捷，主要利用 X 精子的比重高于 Y 精子，通过离心的方法

可以使 X 精子快速下降,从而使 X 精子处于下层,而 Y 精子在上层(刘伯宗,1992)。但因为公畜自身或采精操作等因素使 X 精子或 Y 精子自身的差异变大,使精子分离的纯度得不到保证(张夙夙,2014),且离心过程中离心力的作用会对精子尾部造成伤害,降低精子运动能力。

(2) 免疫学分离法的原理是利用精子自身存在的差异膜蛋白,制备相应的膜蛋白抗体特异识别 X 精子或 Y 精子,以此达到分离它们的目的。特异性抗体可以获得高纯度 X 精子和 Y 精子群,操作简单、成本低,但长时间的处理会对精子造成一定的损伤(Soleymani et al.,2021)。

(3) 流式细胞法分离原理是根据 X 精子和 Y 精子上 DNA 含量的微小差异,通过 Hoechst 33342 染料激发的荧光强度来区分两种精子,该染料在通过完整的细胞膜和流式细胞术扩散后与 DNA 结合(Garner, 2009; Garner et al.,2013)。这种方法可导致 X 精子分离纯度超过 90%,流式细胞法分离 X 精子和 Y 精子只在牛上应用较多。因为流式细胞仪分离精子成本高、周期慢、技术要求高(Shen et al., 2009)等原因,只适应于牛等大型动物。

综上,在当今畜牧生产上,由于人工授精的普及,X、Y 精子分离法是性控精液的关键。雄性哺乳动物的单倍体精子只能携带一条性染色体,它们形成两种不同的精子类型(X 和 Y)。后代的性别是在精子与卵子结合期间确定的,卵子和含有 X 染色体的精子产生女性后代(XX),卵子和含 Y 染色体的精子产生雄性后代(XY)(Diskin et al.,2018; Balao et al., 2016; Heuer et al., 2017)。流式细胞术是精子工业化中最成功的方法之一。但它存在许多缺陷,例如每根吸管的精子剂量限制,对精子细胞的损害,人工授精后的受孕率较低,成本高(Suh et al., 2005; Moore et al., 2017)。因此,找到一种低成本、破坏性较小、高效且简单的精子分选方法至关重要。

1.2 精子发生和成熟控制

1.2.1 精子发生过程

睾丸有两个主要功能:外分泌功能和内分泌功能。睾丸外分泌功能的作用是产生分化成熟的配子,即精子,成熟后的精子被释放到生精小管腔内,最终储存于附睾处。此过程即为精子发生。

在精母细胞生成过程中,第一次有丝分裂使干细胞生成精原细胞。后者通过进行几次连续的有丝分裂而增殖,这导致了细线前期精母细胞的产生。随后进入减数分裂前期。生殖细胞在经历两次减数分裂之前,依次分化为不同的阶段(细线期、合线期、粗线期、双线期)。圆形精子细胞会伸长为长形精子细胞,最终形成精子的过程是精子发生的最终变化。至此,精子在精子发生的最后阶段被释放到曲细精管的管腔内。

1.2.2 精子发生中的基因调控

与精子发生、成熟和获能相关的基因已在小鼠中得到很好的分析。在遗传水平上的精确调控机制尚不清楚，但已发现有几个基因参与减数分裂前生殖细胞的增殖和分化(Ar, Etv5, Bax, Pi3k, Nano2, Ddx4, Dazl)，减数分裂本身(Spo11, Mei1, Atm, Dmc1, H2afx, Trip13, Mlh1, Mlh3, Pms2, Msh4, Msh5)，单倍体细胞及其受精的成熟和受精(Spem1, Gopc, Prm1, Prm2, Tnp1, Tnp2, Tssk6)(Miyamoto et al., 2017)。缺乏这些基因的小鼠表现为精子发生或受精失败。因此，人们认为这些基因控制着生殖细胞在减数分裂前、减数分裂中和减数分裂后的发育。一些研究专门研究了一系列构成顶端外质特化的基因。Bouchard 等人报告说，缺乏 Nectin-2 的小鼠不育(Bouchard et al., 2000)。细胞黏附分子 1(CADM1)也被阐明为雄性生育所必需的(Surace et al., 2006)。这些研究阐明顶端外质特化相关基因对生殖细胞的分化和成熟是必不可少的。

生殖细胞死亡对于正常的精子发生也很重要(Gur et al., 2021)。在胚胎发育过程中，当原始生殖细胞迁移到发育中的性腺时，出现异常迁移的生殖细胞会发生凋亡，这在很大程度上受 Bcl-xL 和 Bax 的调控。在第一波中，生殖细胞凋亡的数量增加发生在睾丸。Bax 的缺失和 Bcl-2 或 Bcl-x 的过表达消除了第一波中的细胞凋亡，导致不育的转基因小鼠精原细胞和精母细胞的积累(Damavandi et al., 2002)。此外，外源性凋亡途径也参与生殖细胞凋亡。FAS 受体和 FAS 配体在睾丸中表达，需要触发损伤诱导的生殖细胞凋亡。在实验动物模型中，FAS 的上调参与大鼠精子细胞凋亡。此外，暴露于过量的激素或激素剥夺，以及暴露于有毒物质和高温也会导致生殖细胞凋亡。

1.2.3 精子性染色体编码基因

在精子发生过程中，圆形精子细胞经历了动态的形态变化，包括核凝聚、顶体形成和精子纤毛的伸长(Oakberg, 1956)。使用基因敲除小鼠模型的研究表明，与精子发生相关的形态变化与各种基因的表达有关，包括在圆形精子细胞中的 Tekt、Tnp 和 Gba2(Roy et al., 2007)。因此，在单倍体雄性生殖细胞中，活跃的基因转录发生在染色体上，包括性染色体，其中一些对细胞生存是必不可少的(Braun et al., 1989)。利用精子细胞之间的细胞质桥梁，包括 RNA 和蛋白质在内的细胞质被共享以挽救携带 Y 染色体的精子(Y 精子) (Jasin et al., 1992)。据报道，该桥梁在精子发生的早期阶段在精子细胞中发挥作用，并在此阶段检测到高水平的 RNA 聚合酶 II(Sami et al., 2003)。然而，在精子发生的后期仍然检测到 RNA 聚合酶 II(Schmidt et al., 1995)，这表明精子的独特特征不仅可以通过 X 或 Y 染色体的存在来区分，还可以通过每条性染色体编码的不同基因的表达来区分。

然而，小鼠 Y 染色体编码不到 700 个基因，而小鼠 X 染色体编码 3000 多个基因(Ross et al., 2005; Soh et al., 2014)。X 染色体包含一些独特的基因，例如编码 Tafazzin 的 Taz

基因,它是一种被物理刺激激活的转录调节因子(Zucchi et al., 1999), XIAP 编码的是 X 连锁的凋亡抑制蛋白,它抑制了凋亡信号的激活(Deveraux et al., 1997), G6pdx 编码的是 X-连锁的葡萄糖-6-磷酸-1-脱氢酶,它催化了氧化的戊糖-磷酸途径(Mason et al., 1999)。因此, X 染色体和常染色体在调节体细胞和生殖细胞功能方面起着重要作用。然而,携带 X 染色体的精子(X 精子)和 Y 精子功能相同,在体内受精或常规体外受精(IVF)过程中, X 精子和 Y 精子没有明显差异。尽管有这些功能上的相似之处,但在 X 和 Y 精子的流动性方面已经观察到了差异(Umehara et al., 2019)。具体地说,尽管 Sarkar 等人报告说, X 精子和 Y 精子在固定液中的流动性没有区别,但在一种特殊的和流方案中, X 精子的运动,而不是 Y 精子,转移到了几乎直线的路径上(Sarkar et al., 1984)。此外,在特定的体外条件下,如低 pH、高温和高氧化应激, Y 精子的活力比 X 精子迅速降低(Shettles et al., 1970),而在高 pH 孵育条件下, X 精子的活力下降(Oyeyipo et al., 2017)。这些观察表明,在特定的体外(或体内)条件下, X 精子和 Y 精子的运动模式不同,可能与影响 X 精子或 Y 精子独特运动模式的特定基因的转录有关。

1.3 X、Y 精子膜蛋白抗体的研究

随着畜牧业的发展,人工授精技术已经熟练运用于畜牧生产,因此,性控精液更适合作为性别控制的手段。并且,通过免疫学方法分离 X、Y 精子时不需要使用染料或辐射;因此,对精子的有害影响将减少。此外,免疫学方法需要更少的时间,对精子细胞的压力也更小。

迄今为止,尚不清楚 X 和 Y 精子之间 DNA 含量的差异是否会导致基因和蛋白质的差异表达,从而导致两种细胞类型之间的其他物理、化学和功能差异(Ellis et al., 2011; Li et al., 2016)。通过相应的手段具体地鉴定 X 或 Y 精子的质膜相关蛋白(Chen et al., 2012; De Canio et al., 2014; Scott et al., 2018),其鉴定可能开发出免疫性控技术,从高效性、便利性和经济的角度来看,这可能是一种替代流式细胞仪的方案(Hanuman et al., 2018)。

H-Y 抗原是哺乳动物最早的 Y 精子特异性抗原之一,曾经在生产中进行测试;然而,它的抗原特异性较差,降低了其应用价值(Hoppe and Koo, 1984)。Souza 等人制备了针对来自牛精子的雄性特异性蛋白 19kD 的单克隆抗体,该抗体与 48.2%的精子结合(Souza et al., 1999)。Matta 等人进一步利用该抗体通过胞浆内单精子注射获得 92.3%的雌性胚胎,通过体外受精获得 80%的雌性胚胎(Matta et al., 2001)。这些研究表明精子细胞亚群中存在性别特异性抗原。Yang 等人根据 SSAbs 与性别分类 X 精子结合的偏好,产生了针对牛 X 精子(XSSAb)的性别特异性抗体(SSAbs),并将其与免疫磁珠结合以分离 X、Y 精子(Yang et al., 2014)。X 精子胞浆内单精子注射结果显示,74.3%的胚胎为雌性;然而,研究人员未能特异性地鉴定 XSSAb 及其相应的性别特异性蛋白质。

Zhang 等人发明了一种分析和鉴定非人类哺乳动物（如牛，羊，猪，兔和马）中 Y 精子的方法，方法是使用标记睾丸特异性 Y 编码蛋白，该蛋白仅在 Y 精子中表达并且位于 Y 精子的顶体中(Zhang et al., 2017)。通过这种方法分离的 Y 精子纯度至少为 82.2%。此外，与目前的商业流式细胞术 Y 精子分选方法相比，该方法显著降低了分离成本。Chowdhury 等人通过使用 WholeMom（一种针对公牛精子表位的单克隆抗体）简单而轻松地分离 X、Y 精子(Chowdhury et al., 2019)。该抗体可以与 Y 精子头部的质膜结合，由于头对头凝集，最终沉入底部；相反，X 精子可以在不与抗体结合的情况下自由游泳，最后使卵母细胞受精，从而导致性别控制。在这项研究中，X 精子和对照组之间推定受精卵，早期切割和囊胚的发生率没有显著差异。雌性和雄性 IVF 胚胎的准确率分别为 81.0%和 72.5%，而精子剂量仅为 1.7×10^6 个，这表明这种技术对精子细胞的压力较小，并且对它们进行分类更有效。开发针对 X、Y 精子膜蛋白的特异性抗体将使用免疫学方法进行精子分选提供基础(Shen et al., 2021)。

1.4 水通道蛋白 7 (AQP7) 的研究进展

甘油是生命中最常见的多元醇之一，在脂质代谢、碳水化合物代谢等重要生物途径中既是能量载体又是分子骨架。脂肪细胞甘油三酯的水解是由脂肪甘油三酯脂肪酶(ATGL)启动的，ATGL 的反应之后是激素敏感脂肪酶，主要是二酰甘油脂肪酶(Zechner et al., 2017; Smirnova et al., 2006)。水解的最后一步是由单甘油脂肪酶进行的(Zechner et al., 2017)。胞浆中产生的甘油通过 AQP7 从脂肪细胞释放到自身循环中，并被肝脏重新吸收，在那里它被甘油激酶磷酸化成 3-磷酸甘油(G3P)，进入脂质合成或糖酵解途径(Mugabo et al., 2016)。除了甘油外流，AQP7 在肾脏、肌肉、胰岛和雄性生殖系统的甘油吸收中起着关键作用(Matsumura et al., 2007; Wakayama et al., 2004; Hibuse et al., 2009; Prieto-Martínez et al., 2017)。甘油可以通过 AQP3 和 AQP7 被肌肉细胞吸收，并通过甘油脱氢酶氧化成甘油醛或由甘油激酶磷酸化成 G3P 作为能量利用(Kormann et al., 1972; van et al., 2002)。

甘油对脂膜的通透性很差，因此需要跨膜载体才能使甘油离开或进入细胞。在细菌中，例如大肠杆菌，甘油被甘油-3-磷酸转运蛋白(GlpT)和甘油促进剂(GlpF)渗透(Borgnia et al., 2001)。在真核细胞中，甘油跨膜运输主要通过水通道蛋白家族。AQP 家族有四个成员与甘油在细胞内的转运有关：AQP3、AQP7、AQP9 和 AQP10(Kreida et al., 2015)。甘油转运蛋白在控制能量代谢和细胞渗透压方面起着关键作用，因此甘油转运蛋白功能障碍可能导致异常的脂质堆积和水平衡，如 AQP3 基因敲除引起的多尿(Ma et al., 2000)，以及与 AQP7 基因单核苷酸多态(SNPs)相关的 II 型糖尿病(Prudente et al., 2007)。AQP7 在脂肪组织中高度表达，使膜对水和甘油具有渗透性(Kishida et al., 2000)。

脂肪细胞以三酰甘油(TAG)的形式储存多余的营养,并在饥饿时将其水解为游离脂肪酸(FFA)和甘油,代表了一种在食物供应波动中生存的进化策略。甘油的快速积累需要有效的清除,以防止渗透压升高引起的细胞损伤。此外,为了避免能量分子的不必要损失,需要对跨膜运输进行严格的监管。在 AQP7 基因敲除的小鼠模型中, AQP7 功能缺陷导致脂肪组织中甘油积聚,并导致成年后肥胖(Hara-Chikuma et al., 2005; Hibuse et al., 2005)。在人类研究中, AQP7 第六个跨膜螺旋 G264V 的功能缺失突变导致了一些健康问题,如高甘油尿、精神运动迟缓和血小板异常(Goubau et al., 2013; Kondo et al., 2002)。Aqp7 缺乏的其他后果包括 β 细胞功能和胰岛素分泌受损(Matsumura et al., 2007; Louchami et al., 2012),以及 AQP7 基因敲除小鼠心室肥大的高风险(Hibuse et al., 2009)。

尽管 AQP 家族之间的序列多样性很高,人类 AQP 家族中各蛋白之间的序列同源性在 17%到 41%之间,但到目前为止所确定的水-AQP 结构表现出高度保守的折叠模式,包括 AQP 同源四聚体围绕着垂直于细胞膜的四重对称轴,每个原始体由六个跨膜螺旋组成,在每个四聚体中建立四个单独的水渗透途径(Frick et al., 2014; Horsefield et al., 2008; Ren et al., 2001; Ho et al., 2009; Fu et al., 2000)。在水通道的中心区域有一个双重的 ASN-Pro-Ala(NPA)基序,它被认为是一个离子排斥孔,阻止带电原子穿过水通道。最近发表的人类 AQP10 结构揭示了一个中心通道,该通道比以前报道的水-AQPs 结构略宽,并提出了一种 pH 门控机制,通过 H80 的质子化及其与细胞内前庭 E27 的相互作用来控制该通道(Gotfryd et al., 2018)。作为生理条件下甘油的主要通道, AQP7 与 AQP10 有很高的序列同源性,特别是在 AQP10 的 pH 敏感结构域。在对表达 AQP 的酵母细胞进行的基于荧光的功能分析中, AQP7 在摄取实验中表现出 pH 门控模式,并在生理条件下显示出很强的甘油渗透活性,而 AQP10 仅在极端酸性条件下对甘油开放(Gotfryd et al., 2018)。

1.5 本研究的目 的及意义

奶山羊群体数量制约着奶山羊产业发展。产业的快速扩群以及养殖业的增效,都离不开母畜的数量,因此,利用性别控制的方法增加后代母羔的比例,可以促进奶山羊产业的发展。本研究利用前期测序得到的奶山羊差异基因 AQP7,制备多克隆抗体,验证 X、Y 精子中 AQP7 蛋白的表达差异,为后续研究 AQP7 基因提供抗体材料与理论基础。

第二章 奶山羊 AQP7 基因克隆及生物信息学分析

AQP7 是一个广泛存在于所有物种和细胞类型中的跨膜蛋白,主要功能是允许水跨细胞膜运输,此外还参与甘油、尿素和某些无机离子的运输(Prieto et al., 2017)。1997 年, AQP7 基因从大鼠睾丸 cDNA 中克隆得到。有研究表明, AQP7 基因在夏洛来牛和西门塔尔牛群体中其内含子和外显子均有不同程度的突变, 进行分析发现这些多种突变的形成与该群体牛的精液品质等存在显著相关性。此外, AQP7 在人类精子中的分布变化与卷尾精子的存在和其他形态变化呈负相关(Morette et al., 2012)。 目前为止, AQP7 在精子方面研究略有不足。而实验室前期测序发现奶山羊 X 精子和 Y 精子 AQP7 基因表达差异显著, 因此, 研究 AQP7 基因在 X 精子和 Y 精子中的作用至关重要。本试验对 AQP7 基因进行克隆并进行生物信息学分析, 为进一步研究 AQP7 蛋白功能提供基础。

2.1 试验材料

试验所用睾丸组织采自西北农林科技大学萨能奶山羊原种场健康成年公羊, 存于液氮带回实验室。由西安擎科泽西生物科技公司完成引物合成及测序。

2.1.1 仪器及试剂

试验用仪器及试剂见附录 A。

2.1.2 溶液的配置

配置具体方法见附录 B。

2.2 试验方法

2.2.1 引物设计

选择在 NCBI 中已提交的山羊(*Capra hircus*)AQP7(XM_005684061.3)mRNA 序列为模板, 使用 NCBI 的 Primer-BLAST 设计该基因的引物, 引物序列见表 2-1。

表 2-1 引物序列

Table2-1Primer sequence				
基因		引物序列	产物大小(bp)	退火温度(°C)
Gene		Primer sequence	Product size	Annealing temperature
AQP7	F	5' CCTTCAGCAGACATCTAAAAATCTC 3'	1077	58
	R	5' GATGCAGGGTCACAAATAGTCTTA 3'		

2.2.2 奶山羊睾丸组织总 RNA 提取及 cDNA 合成

剪碎并研磨 200 mg 采集的奶山羊睾丸组织，向研磨成粉末状的组织中加入 500 μ L Trizol 冰上静置 5 min，按照 Trizol 法提取睾丸组织中的总 RNA。按照 Primescript RT Reagent Kit 反转录说明书反转为 cDNA。

2.2.3 AQP7 基因 CDS 区全长扩增

以睾丸组织 cDNA 为模板，利用表 2-1 中的引物进行扩增，体系如表 2-2。

表 2-2 扩增体系

Table2-2 Amplification system

试剂 Reagent	用量 Volume(μ L)
Prime STAR Max	10.0
cDNA 模板	1.0
F(10 μ mol/L)	1.0
R(10 μ mol/L)	1.0
ddH ₂ O	7.0
Total volume	20.0

PCR 反应程序为 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s、58 $^{\circ}$ C 退火 5 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s，共 35 个循环。

2.2.4 克隆产物纯化

克隆产物利用 1%的琼脂糖凝胶分离 DNA(120 V 恒压电泳 30 min)，并用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收。

2.2.5 目的序列加 poly A 尾及测序

为了连接 pMD19-T 线性载体，需要对 PCR 已纯化的 DNA 序列利用 LA-Taq 酶进行加 poly A 尾反应，体系如表 2-3。

表 2-3 反应体系

Table2-3 Reaction system

试剂 Reagent	用量 Volume(μ L)
回收产物	15.8
10 \times LA Taq Buffer II	2.0
dNTP Mixture	2.0
LA-Taq	0.2
Total volume	20.0

反应程序为：(98 $^{\circ}$ C)3 min，(72 $^{\circ}$ C)20 min。

对 PCR 产物进行电泳分离和回收，方法同 2.2.4。回收产物与 pMD19-T 线性载体连接，体系为：pMD19-T 载体 0.5 μ L，回收产物 4.5 μ L，Solution I 5 μ L，总体积 10 μ L。过夜连接。

将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，具体操作见附录 C。取培养后菌液用质粒小提试剂盒提质粒，取 20 μ L 送测序。

2.2.6 AQP7 蛋白生物信息学分析及抗原片段的选取

将测序正确的序列利用在线网页(<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>)翻译为对应的氨基酸序列。用 ExPASy ProtPra 在线网站(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)分析该基因编码蛋白的理化性质。用 DNASTAR 软件下的 Protean 子软件预测该基因编码蛋白的二级结构等。用 TMHMM 在线网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)预测该基因编码蛋白的跨膜结构。用 DNAMAN 软件比对该基因氨基酸序列与兔 AQP7 蛋白氨基酸序列的同源性。并用 Edit seq 预测该基因序列的开放阅读框，选择适合作为 AQP7 蛋白的抗原片段，该抗原片段具有以下特征：是一个完整的 ORF 区，与兔 AQP7 氨基酸序列同源性较低且含有膜外蛋白区，亲水性、抗原性、表面可及性均良好。

2.2.7 抗原片段基因序列的扩增

对选取的 AQP7 蛋白抗原片段基因序列扩增，序列扩增引物序列信息见表 2-4。

表 2-4 抗原片段引物序列

Table2-4 Antigen fragment primer sequence			
	引物序列 Primer sequence	产物大小(bp) Product size	退火温度(°C) Annealing temperature
F	5' ATGAACTCGGGATATGCCATC 3'	339	58
R	5' TTAAGGGTGGTACAAGACTGAG 3'		

PCR 扩增体系同 2.2.3，模板选用 pMD19-T-AQP7 质粒，PCR 产物电泳分离纯化回收 DNA，-20 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.8 抗原片段基因序列的稀有密码子分析

利用在线网站(<https://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>)对抗原片段基因序列的稀有密码子比例进行分析，若稀有密码子多(大于 15%)的序列应该使用 Rosetta(DE3)感受态细胞进行转化，对稀有密码子较少的序列则使用 BL21(DE3)感受态细胞。

2.3 结果与分析

2.3.1 AQP7 基因 CDS 区全长的克隆

PCR 扩增得到 AQP7 基因 1077 bp 序列，其中包括 CDS 区全长 993 bp (图 2-1)，编码 330 个氨基酸。连接线性载体后测序得到 AQP7 基因 CDS 区基因序列，见附录 I。

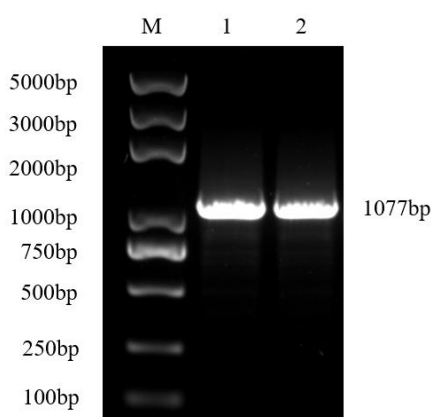


图 2-1 奶山羊 AQP7 基因 CDS 区全长的 PCR 扩增

图注：M. Trans 2K Plus DNA Marker； 1~2. PCR 扩增片段

Figure2-1 PCR amplification full-length of AQP7 gene CDS region of dairy goat

Note: M. Trans 2K Plus DNA Marker;1. PCR amplified fragment

2.3.2 AQP7 蛋白理化性质分析

由 Edit seq 软件翻译的 AQP7 蛋白氨基酸序列见附录 I。对 AQP7 基因编码蛋白质的理化分析结果见表 2-5。该蛋白带正电的氨基酸残基明显多于带负电的氨基酸残基，总平均亲水系数为 0.335，且该蛋白的不稳定系数为 35.77，因此该蛋白属于稳定疏水蛋白。

表 2-5 AQP7 蛋白理化性质分析

Table2-5 Analysis of physical and chemical properties of AQP7 protein

项目 Item	
分子式 Formula	$C_{1648}H_{2548}N_{422}O_{447}S_{17}$
相对分子量 Molecular weight	35.969kD
原子总数 Total number of atoms	5082
等电点 Isoelectric point	9.20
带负电氨基酸残基(ASP + Glu)Negatively charged amino acid residue (ASP + Glu)	18
带正电氨基酸残基(Arg + Lys) Positively charged amino acid residues (Arg + Lys)	24
不稳定系数 Instability index	35.77
总平均亲水系数 Grand average of hydropathicity	0.335

2.3.3 AQP7 蛋白二级结构预测

β -转角和无规卷曲集中处容易被免疫细胞识别，是作为抗原片段的理想位置。预测结果见图 2-2。结果显示 AQP7 蛋白 β -转角和无规卷曲集中在第 200~300 个氨基酸片段上，因此，该区域氨基酸序列可作为初步选择区域。

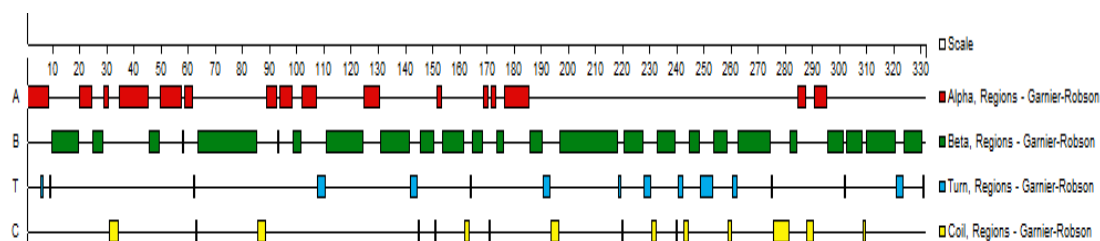


图 2-2 AQP7 氨基酸序列二级结构分布情况

Figure2-2 Secondary structure distribution of amino acid sequence of AQP7

2.3.4 AQP7 蛋白亲水性、抗原指数、表面可及性和跨膜结构域预测

用 Protean 软件和 TMHMM 在线软件分别对 AQP7 蛋白进行分析，预测结果见图 2-3 和图 2-4。结果表明该蛋白具有 6 个跨膜结构域，仅在第 150 和 230 个氨基酸附近的片段有较长的膜外区适合作为抗原片段。通过对 AQP7 蛋白亲水性、抗原指数、表面可及性等预测，并结合 ORF 预测结果（图 2-5），发现 AQP7 蛋白第 219-330 氨基酸适合作为抗原片段。

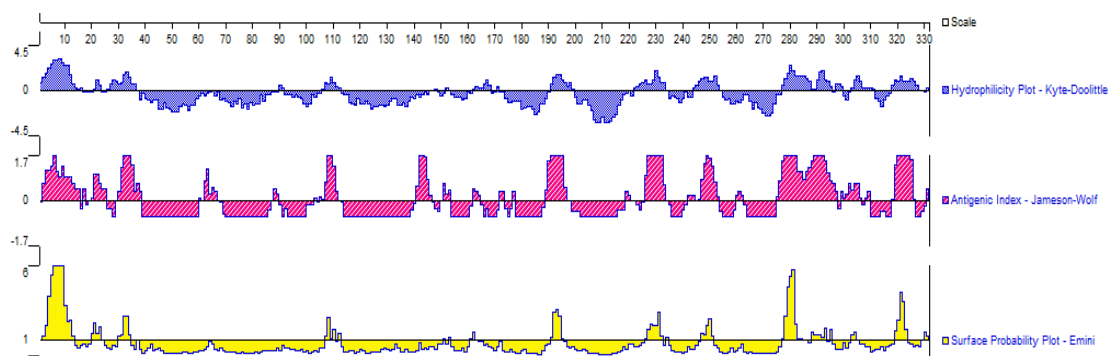


图 2-3 AQP7 蛋白亲水性、抗原指数和表面可及性预测

Figure2-4 AQP7 hydrophilicity and protein surface predictability

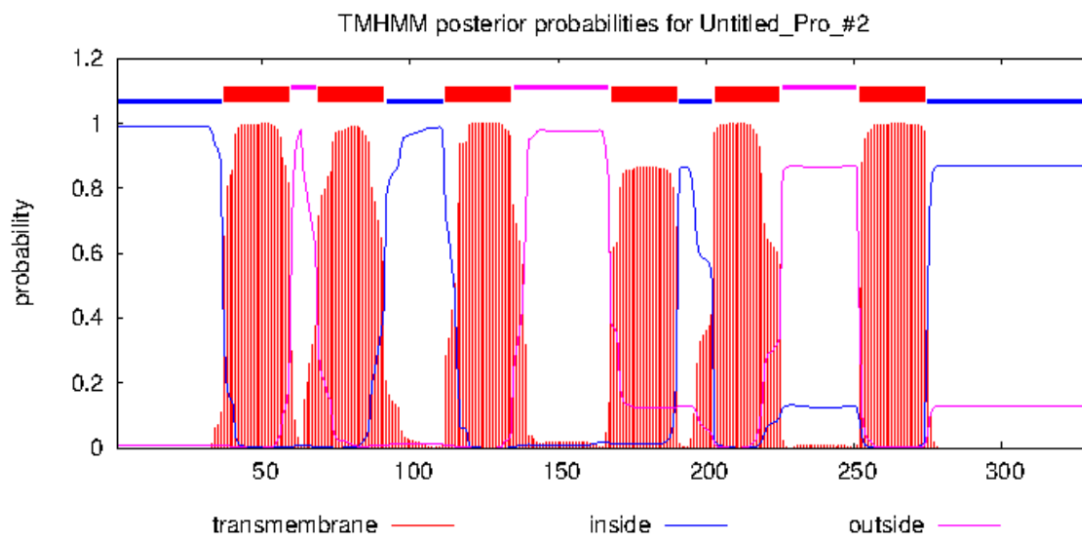


图 2-4 AQP7 蛋白跨膜结构域预测

Figure2-4 Prediction of transmembrane domain of AQP7 protein

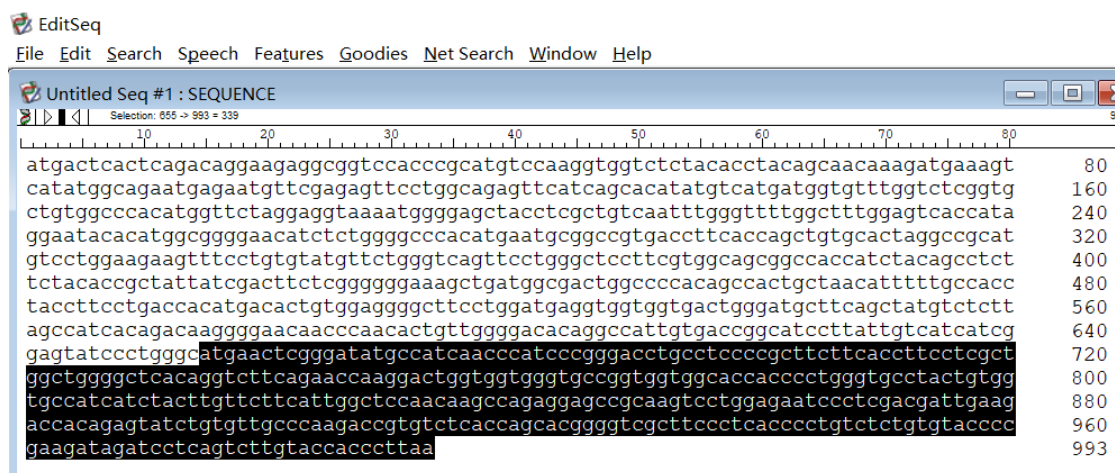


图 2-5 AQP7 开放阅读框的预测

Figure2-5 Prediction of AQP7 Open Reading Frame

2.3.5 奶山羊 AQP7 蛋白同源性分析

DNAMAN 软件比对山羊 AQP7 和兔 AQP7 的氨基酸序列同源性为 69.68%，结果（图 2-6）显示 AQP7 蛋白 C 端与兔 AQP7 同源性较低，可以用作制备兔抗的片段。综合以上分析结果最终选取 AQP7 蛋白 C 端 219-330 氨基酸作为抗原片段。抗原片段对应的基因片段为 AQP7 基因 CDS 区 3'端 655-993bp（包括 3'端终止密码子 TAA）。



图 2-6 奶山羊 AQP7 和兔 AQP7 氨基酸序列同源性比对

Figure2-6 Comparison of amino acid sequence homology between dairy goat AQP7 and rabbit AQP7

2.3.6 抗原片段基因序列的克隆

PCR 反应扩增得到奶山羊 AQP7 的抗原片段基因序列，大小为 339 bp。（图 2-7）。

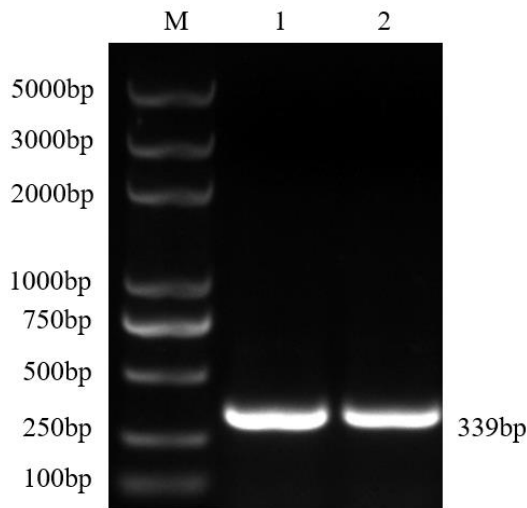


图 2-7 AQP7 抗原片段 PCR 扩增结果

图注：M. Trans 2K Plus DNA Marker；1~2. AQP7 目的抗原片段

Figure2-7 PCR amplification results of AQP7 Antigen Fragment

Note: M. Trans 2K Plus DNA Marker;1~2. AQP7 target antigen fragment

2.3.7 抗原片段基因序列的稀有密码子比例分析结果

RARE CODON CALTOR 分析得到奶山羊 AQP7 抗原片段稀有密码子共 12 个（图 2-8），在 113 个密码子中占比 10.62%，可以选择 BL21（DE3）感受态细胞进行原核表达。

ATG AAC TCG **GGA** TAT GCC ATC AAC CCA TCC **CGG** GAC CTG CCT **CCC** CGC TTC
 TTC ACC TTC CTC GCT GGC TGG GGC TCA CAG GTC TTC **AGA** ACC AAG GAC TGG
 TGG TGG GTG CCG GTG GTG GCA CCA **CCC** CTG GGT GCC TAC TGT GGT GCC
 ATC ATC TAC TTG TTC TTC ATT GGC TCC AAC AAG CCA GAG GAG CCG CAA GTC
 CTG GAG AAT **CCC** TCG **ACG** ATT GAA GAC CAC **AGA** GTA TCT GTG TTG **CCC** AAG
 ACC GTG TCT CAC CAG CAC **GGG** GTC GCT TCC CTC ACC CCT GTC TCT GTG
 TAC **CCC** GAA GAT **AGA** TCC TCA GTC TTG TAC CAC CCT TAA

图 2-8 奶山羊 AQP7 抗原片段稀有密码子比例分析结果

Figure 2-8 Analysis of rare codon ratio of AQP7 Antigen Fragment in dairy goat

2.4 讨论

本试验首次克隆得到了奶山羊 AQP7 基因的 CDS 区全长，并根据制备多克隆抗体的需要，对其进行详细的生物信息学分析，克隆得到该基因适合作为抗原片段的 339 bp 基因序列，为制备奶山羊 AQP7 多克隆抗体提供基础。

本试验利用 PCR 克隆得到奶山羊 AQP7 基因，该基因 CDS 区全长 993 bp，编码 330 个氨基酸。利用 ExPASy ProtPra 等在线软件分析该基因编码蛋白的理化性质发现，该蛋白属于稳定疏水蛋白。结果与已经报道的藏山羊 AQP7(张亚楠等, 2019)和小鼠 AQP7(Ishibashi et al., 1997)的结构一致。

基因上适合作为抗原片段的区域需要满足该蛋白肽段有较多的 β -转角和无规卷曲，且该区域的跨膜结构属于膜外区。满足以上条件的抗原片段在蛋白折叠后可以有更多的抗原决定簇暴露，更容易被动物免疫细胞识别，产生高效价的抗体(邱思源等, 2017)。有研究表明，DDX3Y 蛋白 β -转角和无规卷曲多位于肽段 N 端及 C 端，因此选择了将 N 端及 C 端基因序列整合连接到表达载体表达目的蛋白(杜伟伟等, 2021)。根据 β -转角和无规卷曲分析结果，并结合 TMHMM 在线软件得到的膜外区结果，发现 AQP7 蛋白仅在第 200-300 个氨基酸的区域适合作为抗原片段。

在分子生物学中，开放阅读框从 ATG 开始，是 DNA 序列中具有编码蛋白质潜能的序列，是一段结束于终止密码子连续的碱基序列。为了在原核宿主菌中表达蛋白，需要寻找基因上完整的开放阅读框。因此，根据抗原片段位点和 ORF 预测，最终选择了 AQP7 蛋白 C 端第 655-993 bp 的基因序列作为抗原片段。

2.5 小结

克隆得到奶山羊 AQP7 基因 CDS 区全长 993 bp，共编码 330 个氨基酸；筛选出适合作为抗原片段的 339bp 基因序列以及适合该序列表达的 BL21(DE)感受态菌株。

第三章 奶山羊 AQP7 重组蛋白的原核表达及亲和纯化

原核表达是一种高效表达目的蛋白的方法，具体是通过克隆目的基因片段，将外源目的基因，与原核表达载体连接，成功构建的表达载体并转化表达菌株，使其在大肠杆菌内表达(Brazzolotto et al., 2017)。原核表达由于其具有操作简单、迅速、经济等原因，适合大量表达目的蛋白。(Jones et al., 2016)。

AQP7 蛋白是一个跨膜蛋白，在脂肪组织中大量表达，在全身葡萄糖稳态和肥胖中起着至关重要的作用，AQP7 表达的上调和下调在调节葡萄糖和脂质稳态中很重要(Skowronski et al., 2016)，但在精子中的作用鲜有报道。而我们从实验室前期的测序结果中发现奶山羊 AQP7 蛋白在 X 精子和 Y 精子中表达量差异显著，且作为膜蛋白，更适合作为精子表面抗原。因此，通过构建原核表达载体，表达并纯化 AQP7 重组蛋白，为后续制备奶山羊 AQP7 多克隆抗体提供基础。

3.1 试验材料

3.1.1 仪器及试剂

相关仪器及试剂见附录 A。

3.1.2 菌株及质粒

大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞由西安擎科泽西生物科技有限公司购置；pET-32a(+)载体购自 Solarbio 科技有限公司。

3.1.3 主要溶液的配制

具体步骤见附录 B。

3.2 试验方法

3.2.1 pET-32a(+)重组载体构建及双酶切鉴定

利用在线网站 (http://www.detaibio.com/sms2/rest_summary.html) 分析 AQP7 抗原片段基因序列的可用酶切位点，结合 pET-32a(+)载体质粒图谱，在 AQP7 抗原片段基因序列扩增引物 5'添加 *EcoRI* 和 *HindIII* 作为酶切位点，并添加相应的保护碱基，引物序列信息见下表：

表 3-1 引物序列信息

Table3-1Primer sequence information

基因 Gene	引物序列 Primersequence(5'-3')	限制性内切酶 Endonuclease
AQP7 抗原片段	F CCGGAATTCATGTCTCTTAGCCATCACAGACAA	<i>EcoRI</i>
基因序列	R CCCAAGCTTCAATCGTCGAGGGATTCTCC	<i>HindIII</i>

以克隆得到的 AQP7 抗原片段基因序列为模板，PCR 扩增带酶切位点的 AQP7 抗原片段基因序列，反应体系同 2.2.3，反应程序同 2.2.7。用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物。

将 PCR 扩增产物与 pET-32a(+)分别进行 *EcoRI*、*HindIII* 双酶切，酶切总量为 1 μ g，酶切体系见表 3-2。

表 3-2 酶切体系

Table3-2 Enzyme digestion system

试剂 Reagent	用量 Volume(μ L)
pET-32a(+)或目的 DNA	12.0
10 \times Hbuffer	2.0
<i>EcoRI</i>	1.0
<i>HindIII</i>	1.0
ddH ₂ O	4.0
Total volume	20.0

酶切程序为 37 $^{\circ}$ C 恒温 6h。

液体回收线性 pET-32a(+)质粒及 AQP7 抗原片段，对酶切产物使用 T4 连接酶连接，反应体系见表 3-3。

表 3-3 连接体系

Table3-3 Connection system

试剂 Reagent	用量 Volume(μ L)
pET32a(+)线性载体	5.0
AQP7 抗原片段基因	3.0
T4DNALigase	1.0
10 \times Ligationbuffer	1.0
Total volume	10.0

将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，步骤同 2.2.5。菌液用无内毒素质粒小提试剂盒提取质粒，双酶切鉴定重组质粒，鉴定正确的质粒送测序，测序正确的质粒-20 $^{\circ}$ C 保存。

3.2.2 重组蛋白的诱导表达及 Western Blot 鉴定

将 pET-32a(+)质粒和测序结果正确的 pET-32a(+)-AQP7 质粒分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,铺板后挑取单克隆培养,培养后的菌液加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达蛋白,具体方法见附录 F。将未诱导表达的 pET32a(+)-AQP7 菌液作为诱导前对照;取诱导表达后的 pET32a(+)-AQP7 菌液和 pET-32a(+)菌液各 1 mL, 5000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 各用 500 μ L 超声缓冲液重悬细胞, 置于冰上超声破碎细胞(功率 30 W, 6 min, 超声 2 s 停 4 s)。考马斯亮蓝染色检测目的蛋白是否表达;成功表达蛋白后利用 Western Blot 检测目的蛋白是否融合组氨酸标签, 使用鼠 Anti-His tag 单克隆抗体作为一抗, 如果在相同大小检测到目的蛋白, 则表明成功表达融合组氨酸标签的重组蛋白。具体操作方法见附录 E。

3.2.3 重组蛋白表达条件及表达形式的探索

为了探索 AQP7 重组蛋白的最适表达条件, 分别选取了 0.1 mmol/L、0.3 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L 的 IPTG 浓度诱导 6 h, 然后选取表达量最高的诱导物浓度, 诱导 3 h、6 h 和 9 h 三个不同的时间筛选合适的时间。用筛选得到的最佳浓度及时间进行后续诱导表达。

取诱导后的 AQP7 重组蛋白菌液 1 mL, 5000 r/min 离心 6 min, 弃上清, 用 500 μ L 超声缓冲液重悬细胞, 置于冰上超声破碎细胞(功率 30 W, 8 min, 超声 2 s 停 4 s)。超声破碎结束后 8000 r/min 离心 8 min, 分离上清和沉淀, 利用 SDS-PAGE 分离蛋白, 判断重组蛋白的可溶性形式。若重组蛋白以沉淀的方式大量表达, 说明重组蛋白以包涵体的形式表达, 需要用高浓度的尿素裂解包涵体使蛋白变性为可溶形式, 方可继续进行纯化。

3.2.4 重组蛋白的大量诱导表达及纯化

诱导表达 AQP7 重组蛋白菌液 500 mL, 5000 r/min 离心 6 min 收集菌体, 用 50 mL 超声缓冲液重悬, 置于冰上超声破碎细胞(功率 60 W, 45 min, 超声 2 s 停 3 s), 破碎期间取出涡旋振荡两次。超声破碎结束后 12000 r/min 离心 10 min 收集包涵体沉淀, 加入 50 mL LE Buffer 4 $^{\circ}$ C 过夜溶解包涵体, 12000 r/min 离心 30 min, 取上清, 此时上清中为可溶性蛋白。

参考金斯瑞纯化说明书纯化在 LE Buffer 中杂蛋白, 具体操作见附录 G。纯化时分别取流出液、洗涤液、洗脱液进行 SDS-PAGE 分离蛋白, 并考马斯亮蓝染色分析纯化效果。

3.2.5 重组蛋白的透析复性

纯化后的重组蛋白采用梯度透析方法进行复性处理, 分别使用 6 M 尿素透析液复

性 14 h, 4 M 尿素透析液复性 14 h, 2 M 尿素透析液复性 12 h, PBS 透析复性液复性 12 h。利用 BCA 法检测复性蛋白浓度。

3.3 结果与分析

3.3.1 pET32a(+)-AQP7 重组质粒的鉴定

pET32a(+)-AQP7 重组质粒双酶切鉴定结果显示获得了 5900 bp 的 pET32a(+)载体片段和 339 bp 的 AQP7 抗原片段 (图 3-1)。结合对测序结果的比对, 表明已成功构建 pET32a(+)-AQP7 重组质粒。

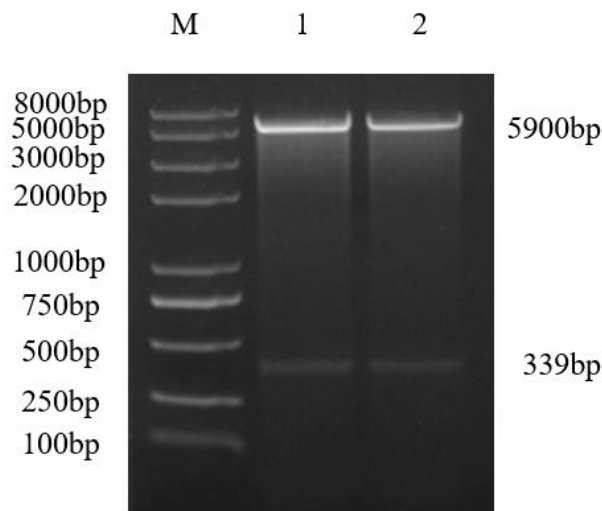


图 3-1 pET32a(+)-AQP7 重组质粒的 *EcoRI*、*HindIII* 双酶切鉴定

M. Trans 2K® Plus II DNA Ladder; 1~2.pET32a(+)-AQP7 双酶切结果

Figure3-1 Identification of pet32a (+) - AQP7 recombinant plasmid by *EcoRI* and *HindIII* double enzyme digestion

M. Trans 2K® Plus II DNA Ladder;1~2. Results of double enzyme digestion of pET32a (+) - AQP7

3.3.2 重组蛋白的鉴定

通过 SDS-PAGE 染色结果, 诱导后的重组菌液蛋白在上样泳道 5~6 出现 30 kD 大小的目的条带, 而诱导后的 pET-32a(+)空载体的菌液蛋白在上样泳道 1~2 中的相同位置没有观察到明显的重组蛋白条带, 在 19 kD 大小处有明显的 His 标签蛋白条带 (图 3-2)。

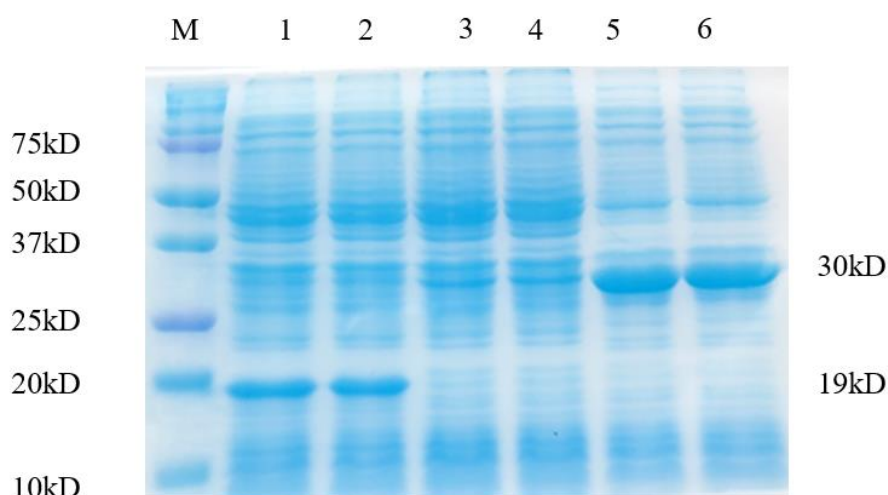


图 3-2 奶山羊 AQP7 抗原片段重组蛋白的诱导表达

M. Precision Plus protein™ Dual color Standards; 1~2.pET-32a(+)菌液诱导后;
3~4.重组菌液诱导前; 5~6.重组菌液诱导后

Figure3-20 Induced expression of AQP7 truncated antigen protein of dairy goat

M. Precision Plus protein™ Dual color Standards;1~2. After induction of pET-32a(+) bacterial solution;
3~4. Before induction of recombinant bacterial solution;
5~6. After induction of recombinant bacterial solution

Western blot 检测重组蛋白 His 标签，重组蛋白大小符合考马斯亮蓝染色结果（图 3-3），表明检测到的目的蛋白为正确表达的重组蛋白。

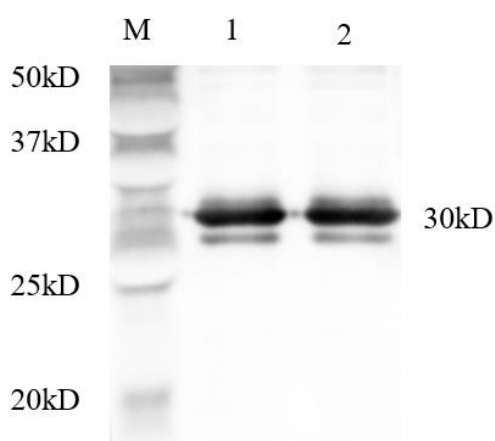


图 3-3 奶山羊 AQP7 重组蛋白 His 标签的检测

图注：M. Precision Plus protein™ Dual color Standards; 1~2.AQP7 重组蛋白

Figure3-3 Detection of His tag of AQP7 recombinant protein in dairy goat

Note: M. Precision Plus protein™ Dual color Standards;1~2. AQP7 recombinant protein

3.3.3 重组蛋白表达条件及表达形式的探索

SDS-PAGE 检测发现, 在使用不同浓度 IPTG 诱导重组菌液 6 h 时, AQP7 重组蛋白在 0.5 mmol/L 时表达量达较高, 且较 1 mmol/L 几乎没有差异 (图 3-4-a), 因此我们选择 0.5 mmol/L 的 IPTG 浓度诱导, 选择不同的诱导时间探索 AQP7 重组蛋白的表达量, 发现在 6 h 时表达量较高且直至 9 h 仍趋于稳定状态 (图 3-4-b), 因此, 最终选择了 0.5 mmol/L 的 IPTG 浓度处理 6 h 的诱导表达条件进行后续表达形式的探索及大量诱导表达。

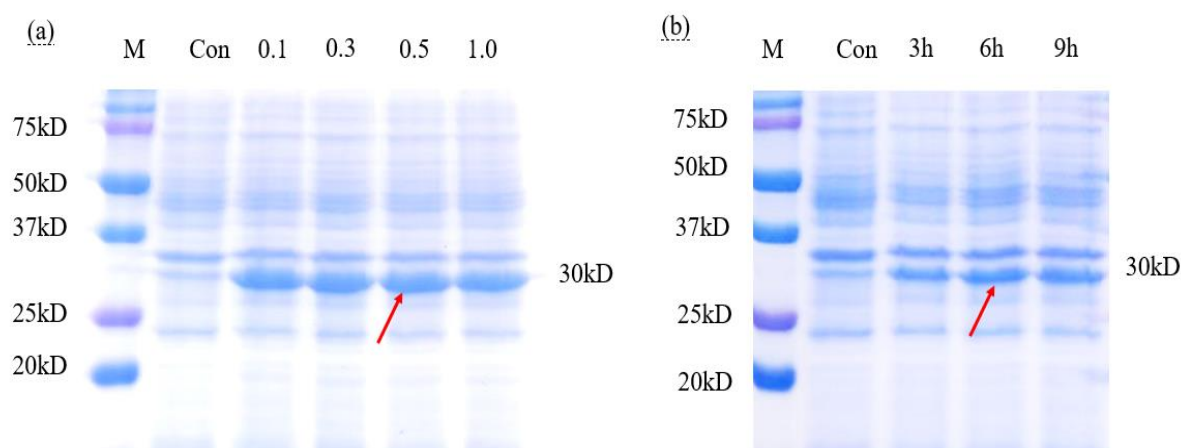


图 3-4 奶山羊 AQP7 重组蛋白表达条件的探索

图注: M. Precision Plus protein™ Dual color Standards; Con. pET32a(+)-AQP7 诱导前;

(a). 不同诱导浓度对重组蛋白表达量的影响; (b). 不同诱导时间对重组蛋白表达量的影响

Figure3-4 Study on expression conditions of AQP7 recombinant protein in dairy goat

Note: M. Precision Plus protein™ Dual color Standards; Con. Before pet32a (+) - AQP7 induction;

(a). Effects of different induced concentrations on the expression of recombinant protein;

(b). Effects of different induction time on the expression of recombinant protein

对 AQP7 重组蛋白表达形式的探索发现, AQP7 重组蛋白没有可溶形式, 是存在于沉淀中的不溶解蛋白, 此类重组蛋白通常以包涵体形式存在 (图 3-5)。

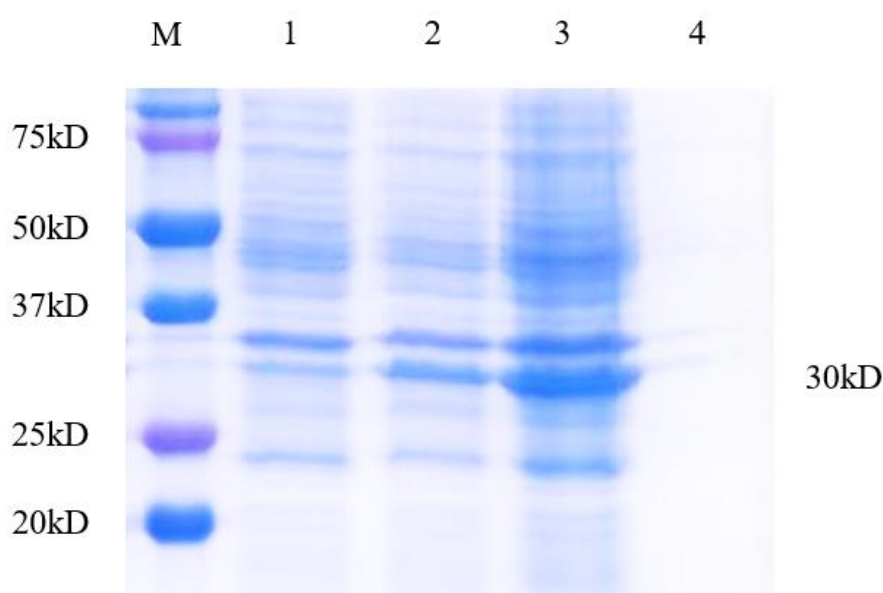


图 3-5 奶山羊 AQP7 重组蛋白表达形式的探索

图注: M. Precision Plus protein™ Dual color Standards; 1. pET32a(+)-AQP7 诱导前;
2. pET32a(+)-AQP7 诱导后; 3. pET32a(+)-AQP7 诱导后沉淀; 4. pET32a(+)-AQP7 诱导后上清

Figure3-5 Expression of AQP7 recombinant protein in dairy goat

Note: M. Precision Plus protein™ Dual color Standards; 1. Before pet32a (+) - AQP7 induction;

2. After pet32a (+) - AQP7 induction; 3. Precipitation after pet32a (+) - AQP7 induction;

4. Supernatant after pet32a (+) - AQP7 induction

3.3.4 重组蛋白的纯化

AQP7 重组蛋白以包涵体形式存在, 用 LE Buffer 裂解包涵体并变性蛋白。溶解后的 AQP7 变性蛋白溶液用 Ni-NTA Resin 亲和层析介质进行蛋白纯化, SDS-PAGE 分离蛋白, 考马斯亮蓝染色检测纯化效果, AQP7 重组蛋白洗脱液样品上样泳道 7-9 在蛋白分子量 30 kD 处出现明显的目的蛋白条带 (图 3-6)。BCA 法测定纯化后的 AQP7 重组蛋白质量浓度 ≥ 2 mg/mL。

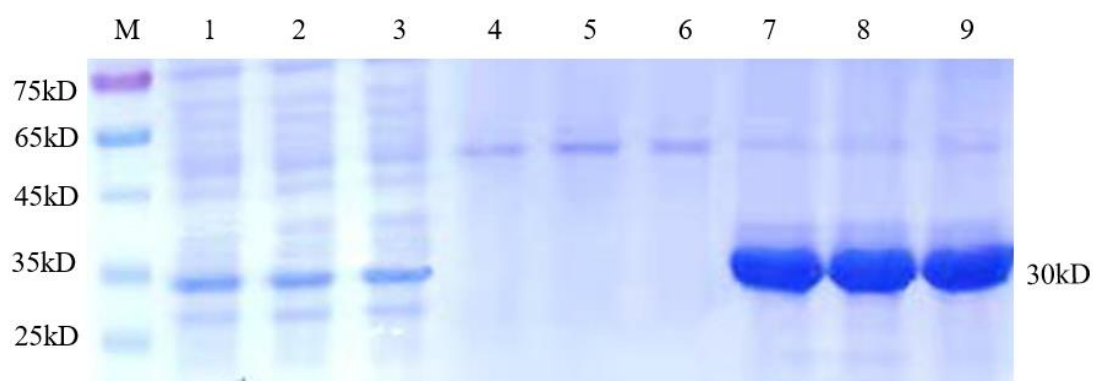


图 3-6 奶山羊 AQP7 重组蛋白的纯化

图注: M. GenStar 全新预染彩色蛋白 Marker; 1~3. AQP7 重组蛋白过 Ni-NTA Resin 流出液;
4~6. AQP7 重组蛋白过 Ni-NTA Resin 蛋白洗涤液; 7~9. AQP7 重组蛋白洗脱液

Figure3-6 Purification of AQP7 recombinant protein from dairy goat

Note: M. GenStar new pre stained color protein Marker;

1~3. AQP7 recombinant protein passed through Ni-NTA Resin effluent;

4~6. AQP7 recombinant protein Ni-NTA Resin protein washing solution;

7~9. AQP7 recombinant protein eluent

3.4 讨论

pET 系统是原核表达载体中最常用的载体之一。当充分诱导时, 大肠杆菌停止克隆, 仅表达目的蛋白; 通常只需要 3 h, 目的蛋白表达总量就会达到细胞总蛋白量的一半以上(Chen et al., 2018)。此外, 当作用于疏水蛋白时, 可以通过降低诱导物的浓度, 延长诱导时间, 转入分子伴侣等方法, 进而降低表达水平或帮助蛋白正确折叠来获得可溶性蛋白, 提高疏水蛋白的可溶部分产量。但往往对于稳定疏水蛋白来说, 不易获得可溶形式的重组蛋白。郭靖等人研究发现, HbBIN2 在 37 °C, 0.3 mmol/L IPTG 诱导 12 h 的表达量最大, 且在该条件下获得了大量可溶性蛋白(郭靖和袁红梅, 2022)。而本试验对蛋白表达条件进行了探索, 发现 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 时就可以完全表达蛋白, 但对蛋白表达形式的探索发现, 在低诱导物浓度状态下并没有检测到任何的可溶形式的蛋白, 证明该蛋白并没有进行正确折叠。

蛋白质的亲水性和疏水性决定蛋白质的溶解性。疏水性蛋白往往更容易形成包涵体。而包涵体的形成与外源目的蛋白在宿主菌中的折叠和聚集速率有关(Lorimer, 1996)。有研究表明, 原核表达系统中蛋白表达速度快, 容易错误折叠形成包涵体, 且原核表达系统中帮助蛋白折叠的分子伴侣有限, 因此, 蛋白的疏水区更容易暴露聚集形成包

涵体(Carrió and Villaverde, 2003)。生物信息学分析结果得到奶山羊 AQP7 蛋白是稳定疏水蛋白, 因此, 我们在上清中没有检测到任何可溶形式的目的蛋白, 因此, 该重组蛋白是以包涵体的形式表达。本试验选择 pET-32a(+)载体, 并根据生物信息学分析选择 BL21(DE3)感受态细胞, 成功获得高表达的目的蛋白, 蛋白表达形式为包涵体, 重组蛋白具有 His 标签, 可以与纯化柱中的 Ni 树脂结合进而纯化重组蛋白。

3.5 小结

构建了 pET32a(+)-AQP7 重组载体, 诱导表达出 30 kD 大小的 AQP7 重组蛋白, 确定了该蛋白的最适表达条件为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h, 该蛋白以包涵体的形式表达在沉淀中, 纯化并复性后测定 AQP7 重组蛋白的质量浓度 ≥ 2.0 mg/mL。

第四章 奶山羊 AQP7 蛋白多克隆抗体的制备及鉴定

免疫学方法分离 X 精子和 Y 精子的基本概念是基于 X 和 Y 精子表面的不同蛋白质, 以及得到性特异抗原(SSA)或性染色体特异蛋白(SCSP)(Blecher et al., 1999; Howes et al., 1997)、子代性特异抗原(OSSA)(Ellis et al., 2011)和 H-Y 抗原(Bennett and Boyse, 1973)的技术。免疫学方法已被应用于鉴定与透明带结合的精子抗原(Sivapurapu et al., 2003), 识别与获能相关的抗原(Mollova et al., 1999)和其他功能的抗原(Khan et al., 2009)。

Chowdhury 等人通过产生抗 Y 精子头部质膜的抗体 WholeMom 表明, 该分子只与 Y 精子结合。凝集试验表明, 经 WholeMom 抗体处理的精子中的大多数 Y-精子头通过在反应管底部沉淀的头对头连接在一起(Chowdhury et al., 2019)。在牛的精子中, 组织相容性-Y 抗原(H-Y 抗原)出现在 Y 精子的表面(Peter et al., 1993); 因此, 研究人员通过生产适当的抗体可以将 Y 精子从 X 精子中分离出来, 并使其在肉类和乳制品行业中受益。Wang 等人对小鼠精子的研究表明, DBY 或 DDX3Y, 是位于 Y 染色体上的男性特异性抗原的候选基因。这些研究人员通过生产一种抗 DBY 的单抗, 将这种抗体描述为一种多表位抗原, 可与 DBY 的雄性特异性结合, 并将其作为性别选择的一种新方法(Wang et al., 2015)。

目前, 还没有羊上关于免疫法分离 X 和 Y 精子的报道, 因此, 我们在测序中得到 X 精子和 Y 精子的差异基因 AQP7。以期制备 AQP7 多克隆抗体, 鉴定 AQP7 蛋白在 X 精子和 Y 精子中的差异表达, 为后续研究 AQP7 基因提供材料基础。

4.1 试验材料

试验用精液采自西北农林科技大学萨能奶山羊原种场, 精液由河南省鼎元种牛育种有限公司分离, 蛋白样品在本实验室提取。

4.1.1 仪器及试剂

试验所用仪器及试剂见附录 A。

4.1.2 主要溶液的配制

配置具体方法见附录 B。

4.1.3 试验动物

3 月龄雌性新西兰大耳兔, 购自成都达硕实验动物中心。

4.2 试验方法

4.2.1 重组蛋白的乳化

将 AQP7 重组蛋白样品与弗氏完全佐剂按等体积混合, 超声破碎仪超声乳化(功率 30 W, 20 min, 工作 2 s 停 3 s), 10 min 时取出涡旋振荡, 超声过程在冰上进行, 将重组蛋白乳化油状。

4.2.2 动物免疫及抗血清采集

将上述完成乳化过程的重组蛋白作为抗原, 免疫新西兰大耳兔, 免疫剂量按试验兔每千克体重 800 μg 抗原, 免疫方法采用皮下多点免疫, 16 d 后进行第二次免疫, 此时则用弗氏不完全佐剂等体积乳化重组蛋白作为抗原, 此后每 10 d 加强免疫一次, 均使用弗氏不完全佐剂乳化重组蛋白, 加强免疫后第 7 d 耳缘静脉采血, 通过 I-ELISA 法检测血清抗体效价, 当抗血清效价达到 1:64000 时, 再加强免疫一次, 之后心脏采集全血, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 3500 r/min 离心 10 min, 收集血清, 将收集到的血清分别分装到 10 mL 和 2 mL 离心管后 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。对照血清在免疫前耳缘静脉采血, 同样方法收集血清。

4.2.3 抗血清效价检测

采用 I-ELISA 法检测抗体效价, 具体操作参照附录 H。

4.2.4 多克隆抗体稀释倍数及特异性检测

用 AQP7 重组蛋白进行多克隆抗体稀释倍数的检测, 用制备的抗血清作为一抗, 羊抗兔 IgG 作为二抗, 进行 Westernblot 试验。另取睾丸组织蛋白样品进行 Westernblot 试验, 检测该抗体能否与睾丸组织中表达的 AQP7 蛋白特异性结合, 具体操作参照附录 E。

4.2.5 奶山羊 X 精子和 Y 精子 AQP7 蛋白表达的检测

取实验室前期从河南省鼎元种牛育种有限公司分离的 X 精子和 Y 精子冷冻精液, 解冻后转移到 1.5 ml 离心管中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1000 $\times\text{g}$ 条件下离心 5 min; 向离心管中加入 1ml 预冷到 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 洗涤沉淀, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1000 $\times\text{g}$ 条件下离心 5 min, 重复 3 次; 向上述沉淀中加入 200 μl 的组织蛋白裂解液, 用涡旋仪涡旋混匀, 使样品充分溶解; 冰上静置 5 min 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\times\text{g}$ 条件下离心 30 min, 上清液即为精子蛋白溶液。将所得蛋白溶液加入 5 \times 蛋白上样缓冲液, 煮沸 10 min 后进行 Westernblot 试验, 以 β -actin 利用 AQP7 基因重组蛋白抗体检测 X、Y 精子中 AQP7 基因的表达差异。

4.2.6 精子及睾丸组织切片免疫荧光

从奶山羊采集新鲜精子样本, 涂抹在载玻片上, 风干, 在 100% 甲醇中固定 10 min。样品经风干后, 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。然后用 0.5%(v/v) 的 Triton X-100/PBS

在室温下渗透 30 min。样品载玻片用 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。精子用 5%牛血清白蛋白(BSA)封闭液在 37 °C 孵育 30 min。然后用 AQP7 重组蛋白多克隆抗体以 1:100 的比例在 4 °C 孵育过夜，用 PBS 洗涤后，用 CL488 标记的山羊抗兔 IgG 和 1 μg/mL DAPI 显示抗原。睾丸组织切片制作方法见附录 D，免疫荧光流程如上，用 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 显示抗原。染色后用荧光显微镜监测和拍摄。

4.3 结果与分析

4.3.1 多克隆抗体效价评估

用 I-ELISA 方法检测多克隆抗体效价，发现在 1:128000 时 OD 值高于对照血清 1:100 时的 OD 值，而继续倍比稀释后 OD 值明显下降，低于对照血清 1:100 稀释度时的 OD 值，因此，判定 AQP7 多克隆抗体效价达到 1:128000（图 4-1），表明 AQP7 重组蛋白免疫效果良好。

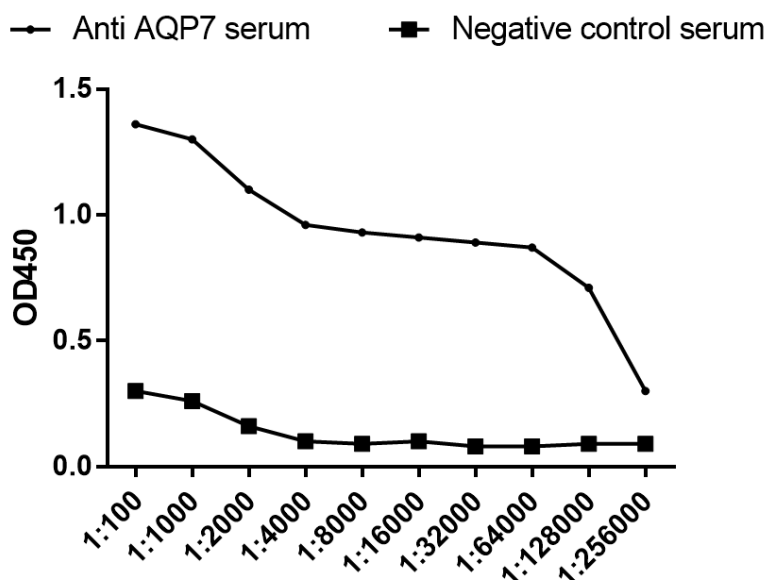


图 4-1 抗体效价检测

Figure4-1 Antibody titer detection

4.3.2 多克隆抗体稀释倍数的检测

用原核表达的 AQP7 重组蛋白与制备的奶山羊 AQP7 蛋白多克隆抗体进行 Westernblot 检测，分别按照 1000、3000 和 5000 倍稀释抗体，结果显示，除背景颜色外条带亮度没有明显改变（图 4-2）。

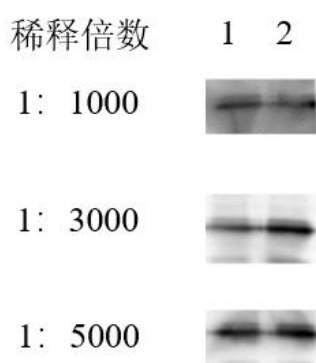


图 4-2 抗体稀释倍数检测

图注：1~2. AQP7 重组蛋白

Fig. 4-2 Antibody dilution ratio detection

Note: 1~2. AQP7 recombinant protein

4.3.3 多克隆抗体对睾丸组织 AQP7 蛋白的识别

Westernblot 检测结果发现在上样泳道 1~4 出现明显的目的条带，且条带单一，大小为 33 kD 左右（图 4-3），表明抗体能够与奶山羊睾丸组织中表达的 AQP7 蛋白特异性结合。

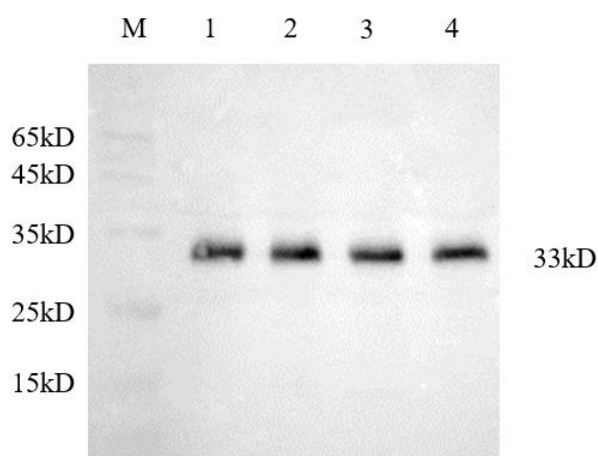


图 4-3 奶山羊 AQP7 多克隆抗体与睾丸组织 AQP7 蛋白的结合检测

图注：M. GenStar 全新预染彩色蛋白 Marker; 1~4.睾丸组织蛋白

Figure4-3 Detection of binding between dairy goat AQP7 polyclonal antibody and testicular AQP7 protein

Note: M. GenStar new pre stained color protein Marker; 1~4. Testicular tissue protein

4.3.4 AQP7 蛋白在奶山羊 X 精子和 Y 精子差异表达的检测

利用 Westernblot 检测 AQP7 蛋白在 X 精子和 Y 精子中的差异表达情况。发现 X 精子蛋白样品的 AQP7 蛋白条带和 Y 精子蛋白样品的目的条带存在明显差异，且 X 精

子表达量低（图 4-4）。说明 AQP7 蛋白在奶山羊 X 精子和 Y 精子中表达存在差异，且在 Y 精子中高表达。

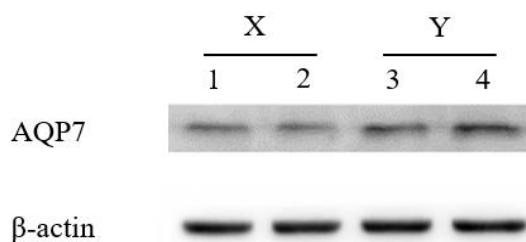


图 4-4 AQP7 蛋白在奶山羊 X 精子和 Y 精子中差异情况检测

图注：1~2.X 精子蛋白；3~4.Y 精子蛋白

Figure4-4 Detection of difference of AQP7 protein between X-sperm and Y-sperm of dairy goat

Note: 1~2. X-sperm protein;3~4. Y-sperm protein

4.3.5 精子及睾丸组织切片免疫荧光检测

取奶山羊新鲜精液进行免疫荧光检测，以制备的奶山羊 AQP7 多克隆抗体作一抗，用 CL488 标记的山羊抗兔 IgG 作为二抗，用 DAPI 染细胞核。细胞核呈蓝色（图 4-5-a），抗原呈绿色（图 4-5-b）。图 4-5-c 显示，约 50%的精子（图中红色箭头）细胞顶体有明亮的绿色荧光（图 4-5-d 和 e），而另外 50%（图中黄色箭头）则没有观察到明显的绿色荧光（图 4-5-c）。这可能证实了 X 精子和 Y 精子中 AQP7 蛋白的差异表达。

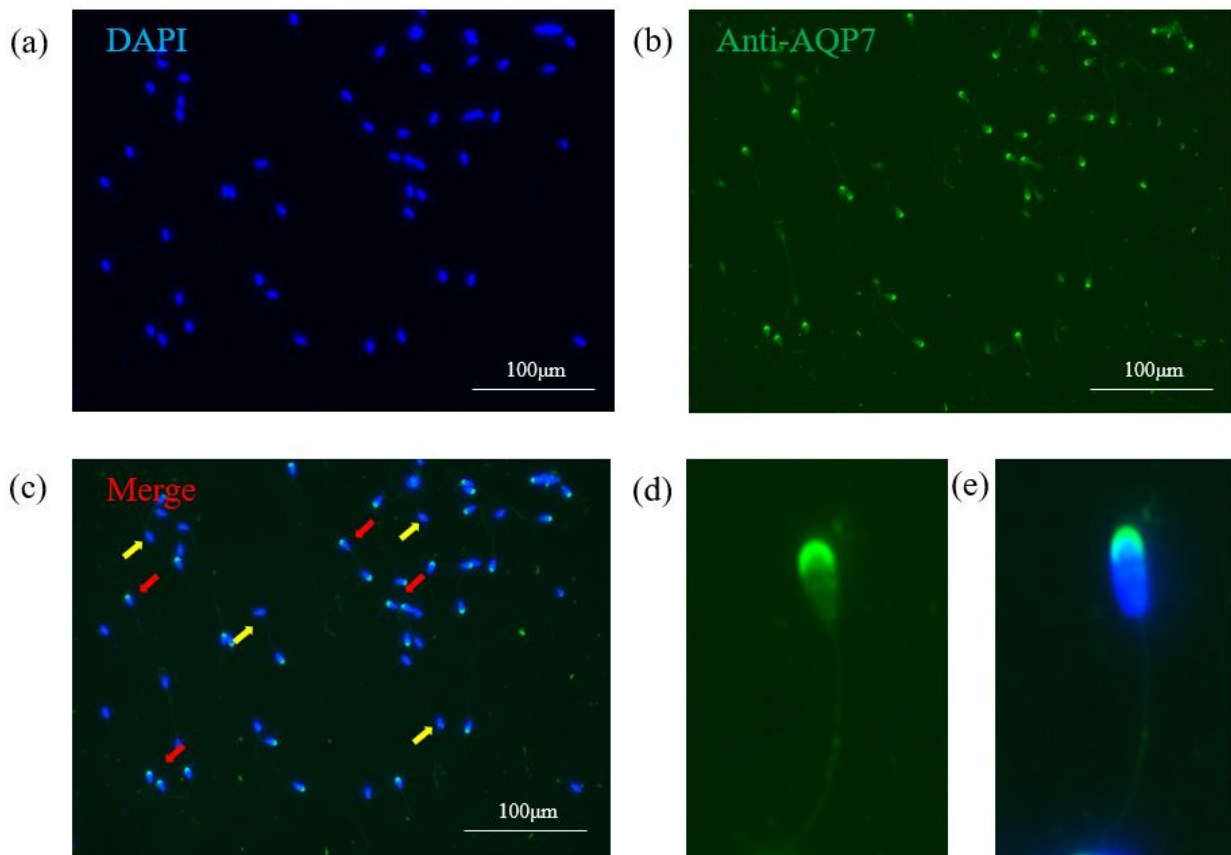


图 4-5 精子免疫荧光检测

图注: (a):DAPI 染色的精子细胞核; (b): AQP7 多克隆抗体染色的精子细胞;

(c): (a)和(b)的合并结果; (d)和(e): AQP7 在成熟精子中的定位。

Figure4-5 Immunofluorescence detection of sperm

Note: (a) : DAPI stained sperm nuclei; (b) : sperm cells stained with AQP7 polyclonal antibody;

(c) : merged results of (a) and (b); (d) And (e): localization of AQP7 in mature sperm.

睾丸组织切片结果如图 4-6，在精子发生过程中，AQP7 蛋白的表达量不断发生变化，Sg 时期可以检测到该蛋白的表达，PS 时期表达量有所增加，至 SS 时期表达量下降，几乎检测不到 AQP7 蛋白，而在 ST 时期又出现 AQP7 蛋白表达，且在分化为长形精子后，AQP7 蛋白表达量较分化前各阶段都明显的升高。

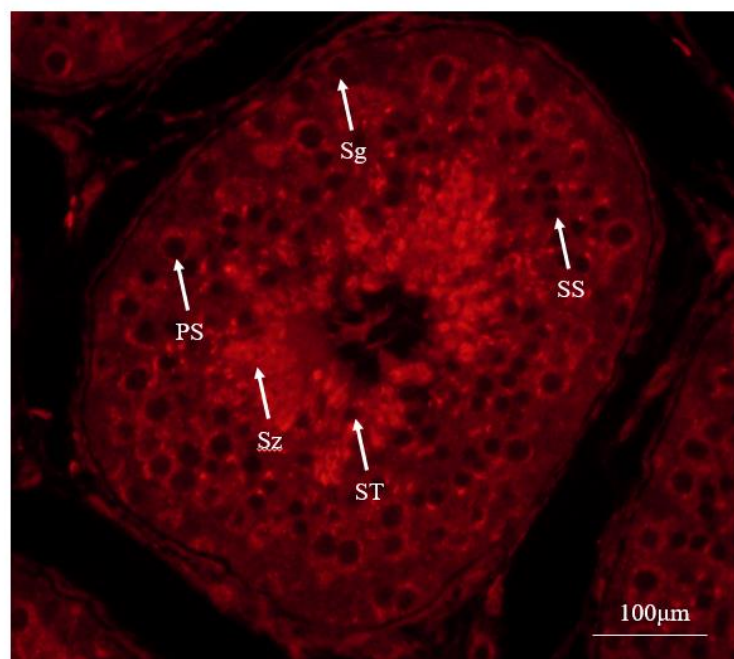


图 4-6 睾丸组织切片免疫荧光检测

图注：Sg：精原细胞；PS：初级精母细胞；SS：次级精母细胞；ST：圆形精子细胞；Sz：精子

Figure 4-6 Immunofluorescence detection of testicular tissue sections

Note: Sg: spermatogonia; PS: primary spermatocyte;

SS: secondary spermatocyte; ST: sperm cell; Sz: sperm

4.4 讨论

本试验制备了兔抗 AQP7 多克隆抗体，用于鉴定 AQP7 蛋白在 X、Y 精子上的差异表达，为分离 X 精子和 Y 精子提供基础。目前，还没有相关报道证明 AQP7 基因在精子性别鉴定和分离方面有作用。基于 X、Y 精子表面特异性蛋白的免疫学方法适用于 X、Y 精子的分离。但课题组前期测序没有发现奶山羊 X、Y 精子特异性蛋白，因此，我们从 X、Y 精子差异显著的蛋白中选择了跨膜蛋白 AQP7 并制备其多克隆抗体。结果显示，奶山羊 AQP7 多克隆抗体效价可达 1:128000。同时，对其稀释浓度进行检测，

发现在 1000 倍、3000 倍和 5000 倍时检测到的目的条带没有明显的变化。Choi 等人研究发现,随着免疫次数的增加,抗体效价会明显增加(Choi et al., 2017; Leitner et al., 1997)。本试验加强免疫为 4 次,为正常免疫次数,但抗体效价高于先前的奶山羊 DDX3Y 抗体。原因可能是对试验兔所用的免疫剂量(800 $\mu\text{g}/\text{kg}$)高于前人使用的剂量(每只 800 μg)。因此,免疫次数和免疫剂量的增加均为影响抗体效价的因素。

为了验证多克隆抗体是否对奶山羊 AQP7 蛋白有特异性识别,提取了睾丸组织蛋白,检测奶山羊 AQP7 多克隆抗体作一抗对该蛋白的特异性识别,结果表明奶山羊 AQP7 多克隆抗体可以与睾丸组织中的 AQP7 蛋白结合,得到的目的条带单一且整齐,表明该抗体可作为奶山羊 AQP7 蛋白研究的分子试剂。同时,为了验证前期测序结果的准确性,我们提取已经分离的奶山羊 X 精子和 Y 精子蛋白,用奶山羊 AQP7 多克隆抗体作为一抗检测 X 精子和 Y 精子的 AQP7 蛋白表达差异,结果同测序结果一样,AQP7 蛋白在 Y 精子上高表达。

制备奶山羊 AQP7 多克隆抗体的最终目的是为了研究精子的性别控制。因此,我们对奶山羊新鲜精液进行免疫荧光染色,发现 AQP7 蛋白在大概一半的精子高表达,另一半精子上低表达,这可能是 X 精子和 Y 精子 AQP7 蛋白的差异。且在 AQP7 蛋白高表达的精子中,强的荧光效应显示奶山羊 AQP7 蛋白定位于精子顶体,本试验的结果为进一步通过 AQP7 蛋白分离或控制精子性别奠定了基础。

4.5 小结

1. 制备出奶山羊 AQP7 多克隆抗体,抗体效价为 1:128000,且稀释 5000 倍时对抗原蛋白仍有良好的特异性识别。
2. 成功检测到 33kD 的奶山羊睾丸组织 AQP7 蛋白,且在 X 精子和 Y 精子蛋白中检测到 AQP7 蛋白的表达差异。
3. AQP7 蛋白主要定位于精子顶体,且在精子发生的各阶段表达量呈动态变化。

结论

1. 克隆得到奶山羊 *AQP7* 基因 CDS 区全长共 993 bp。筛选出适合作为抗原片段的 339bp 基因序列以及适合该序列表达的 BL21(DE)感受态菌株。
2. 成功构建 pET-32a(+)-*AQP7* 重组载体，纯化得到 *AQP7* 重组蛋白。制备出奶山羊 *AQP7* 多克隆抗体，效价可达 1:128000。
3. 利用奶山羊 *AQP7* 多克隆抗体检测到奶山羊睾丸组织中表达的 *AQP7* 蛋白，该蛋白在 Y 精子上高表达，主要定位于精子顶体，且在精子发生各阶段表达量呈动态变化。

创新点

利用制备的奶山羊 AQP7 多克隆抗体发现奶山羊 X 精子和 Y 精子中 AQP7 蛋白表达存在差异，在 Y 精子中高表达，为进一步通过 AQP7 蛋白分离精子或控制后代性别提供了分子手段。

参考文献

- 杜伟伟, 代邦国, 钟玉玲, 史怀平. 2021. 奶山羊 DDX3Y 蛋白多克隆抗体的制备[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 49(01): 1-9+16.
- 郭靖, 袁红梅. 2022. 橡胶树蛋白激酶 HbBIN2 的基因克隆、蛋白表达纯化及酶活分析[J/OL]. 热带作物学报: 1-11.
- 刘伯宗. 1992. 山羊胚胎一步冷冻试验[D]. 杨凌: 西北农业大学.
- 邱思源, 罗军, 晏原, 朱江江, 马功珍. 2017. 奶山羊 SCD 的多克隆抗体制备与鉴定[J]. 农业生物技术学报, 25(07): 1111-1118.
- 张光勤, 李建民. 2002. 哺乳动物 XY 精子分离技术的研究进展[J]. 河南农业大学学报, 36(2) : 168-171.
- 张汇东, 高一龙, 温海. 2015. 性别控制技术的研究进展及在工作犬繁育中的应用[J]. 中国工作犬业, (6) : 9-12.
- 张凤凤. 2014. 哺乳动物 XY 精子分离技术的研究[J]. 畜牧与饲料科学, 35(7-8):56-57.
- 张亚楠, 王永, 朱江江, 许晴, 林亚秋. 2019. 藏山羊 AQP7 基因克隆和不同组织器官差异表达分析 [J]. 西南农业学报, 32(08): 1956-1960.
- Balao da Silva C M, Ortega-Ferrusola C, Morrell J M, Rodriguez Martinez H, Pena F J 2016. Flow Cytometric Chromosomal Sex Sorting of Stallion Spermatozoa Induces Oxidative Stress on Mitochondria and Genomic DNA [J]. *Reprod Domest Anim*, 51 (1): 18-25.
- Bennett D, Boyse E A 1973. Sex ratio in progeny of mice inseminated with sperm treated with HY antiserum [J]. *Nature*, 246(5431): 308.
- Blecher S, Howie R, Li S, Detmar J, Blahut L J T 1999. A new approach to immunological sexing of sperm [J]. *Theriogenology*, 52(8): 1309-1321.
- Borgnia MJ, Agre P 2001. Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:2888-93.
- Bouchard M J, Dong Y, McDermott B M Jr, Lam D H, Brown K R, Shelanski M, Bellve A R, Racaniello V R 2000. Defects in nuclear and cytoskeletal morphology and mitochondrial localization in spermatozoa of mice lacking nectin-2, a component of cell-cell adherens junctions[J]. *Mol Cell Biol*, 20(8):2865-2873.
- Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ, Brinster RL, Palmiter RD 1989. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid [J]. *Nature*; 337.6205: 373.
- Brazzotto X, Igert A, Guillon V, Santoni G, Nachon F 2017. Bacterial Expression of Human Butyrylcholinesterase as a Tool for Nerve Agent Bioscavengers Development [J]. *Molecules*, 22(11):1828.
- Carrell D T, Aston, K I 2013. Spermatogenesis Volume 927 || Sex-Sorting Sperm Using Flow Cytometry/Cell Sorting[J]. *Methods in Molecular Biology*, (Chapter 26): 279–295.
- Chen X, Zhu H, Wu C, Han W, Hao H, Zhao X, Du W, Qin T, Liu Y, & Wang D 2012. Identification of

- differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa [J]. *Journal of Proteomics*, 77: 59-67.
- Chen Y, Niu X, Lin Y, Liu X 2018. Prokaryotic expression, purification and preparation of rat polyclonal antibody against *Escherichia coli* ZipA [J]. *Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 34(10): 942-948.
- Choi E J, Lee H S, Noh J Y, Song J Y, Cheong H J, Shin O S, Lee H, Jeong M, Kim W J 2017. Humoral and Cellular Immunogenicity Induced by Avian Influenza A (H7N9) DNA Vaccine in Mice [J]. *Infect Chemother*, 49(2): 117-122.
- Chowdhury M M R, Xu L G, Kong R, Park B Y, Mesalam A, Joo M D, Afrin F, Jin J I, Lim H T, Kong I K 2019. In vitro production of sex preselected cattle embryos using a monoclonal antibody raised against bull sperm epitopes [J]. *Anim. Reprod. Sci*, 205: 156-164.
- Damavandi E, Hishikawa Y, Izumi S-i, Shin M, Koji T 2002. Involvement of Bax redistribution in the induction of germ cell apoptosis in neonatal mouse testes[J]. *Acta Histochem Cytochem*, 35(6): 449-459.
- De Canio M, Soggiu A, Piras C, Bonizzi L, Galli A, Urbani A, & Roncada P 2014. Differential protein profile in sexed bovine semen: Shotgun proteomics investigation [J]. *Molecular BioSystems*, 10(6): 1264-1271.
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases [J]. *Nature*. Nature Publishing Group, 388: 300-304.
- Diskin M G 2018. Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle [J]. *Animal*, 12 (s1): s75-s84.
- Ellis P J, Yu Y, & Zhang S 2011. Transcriptional dynamics of the sex chromosomes and the search for offspring sex-specific antigens in sperm [J]. *Reproduction*, 142(5): 609-619.
- Frick A, Eriksson UK, de Mattia F 2014. X-ray structure of human aquaporin 2 and its implications for nephrogenic diabetes insipidus and trafficking [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 6305-10.
- Fu D, Libson A, Miercke LJ 2000. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity [J]. *Science*, 290:481-6.
- Garner, D L 2009. Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X-and Y-chromosome bearing mammalian sperm[J]. *Theriogenology*, 71 (1): 11-21.
- Gotfryd K, Mósca A F, Missel J W 2018. Human adipose glycerol flux is regulated by a pH gate in AQP10 [J]. *Nat Commun*, 9: 4749.
- Goubau C, Jaeken J, Levtchenko EN 2013. Homozygosity for aquaporin 7 G264V in three unrelated children with hyperglyceroluria and a mild platelet secretion defect [J]. *Genet Med*, 15: 55-63.
- Gur F M, Timurkaan S, Taskin E, Guven C, Gur H E, Senturk M, Dastan S, Nurdinov N, Unalan A, Cankut S, Tatyuz I 2021. Thymoquinone improves testicular damage and sperm quality in experimentally varicocele-induced adolescent rats[J]. *Andrologia*, 53(5): e14033.
- Hanuman P Y, Sangram K S, Shabir A L, Nadeem S, Ajeet S, Uma K V, Rubina K B, & Tushar K M 2018. Advances in sperm sexing in bovines [J]. *Journal of Experimental Zoology, India*, 21(1): 1-9.
- Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T 2005. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient

- mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation [J]. *J Biol Chem*, 280: 15493-6.
- Heuer C, Kendall D, Sun C, Deeb J, Moreno J, Vishwanath R 2017. Evaluation of conception rates of sex-sorted semen in commercial dairy farms over the last five years [J]. *J Dairy Sci*, 100 (E-Supplement 2): 198.
- Hibuse T, Maeda N, Funahashi T 2005. Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:10993-8.
- Hibuse T, Maeda N, Nakatsuji H 2009. The heart requires glycerol as an energy substrate through aquaporin 7, a glycerol facilitator [J]. *Cardiovasc Res*, 83: 34-41.
- Ho J D, Yeh R, Sandstrom A 2009. Crystal structure of human aquaporin 4 at 18 Å and its mechanism of conductance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 7437-42.
- Hoppe P C, Koo G C 1984. Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized in vitro [J]. *Reprod Immunol*, 6 (1): 1-9.
- Horsefield R, Nordén K, Fellert M 2008. High-resolution x-ray structure of human aquaporin 5 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:13327-32.
- Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F, Sasaki S 1997. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea [J]. *J Biol Chem*, 272(33):20782-6.
- Jasin M, Maria, Zalamea P 1992. Analysis of Escherichia coli beta-galactosidase expression in transgenic mice by flow cytometry of sperm [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 10681-10685.
- Jones M D, Chan A C, Nomellini J F, Murphy M E, Smit J 2016. Surface-layer protein from *Caulobacter crescentus*: expression, purification and X-ray crystallographic analysis [J]. *Acta Crystallographica Section F-structural Biology and Crystallization Communications*, 72(9): 677-680.
- Khan S A, Suryawanshi A R, Ranpura S A, Jadhav S V & Khole V V 2009. Identification of novel immunodominant epididymal sperm proteins using combinatorial approach [J]. *Reproduction*, 138(1): 81-93.
- Kishida K, Kuriyama H, Funahashi T 2000. Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 275: 20896-902.
- Kondo H, Shimomura I, Kishida K 2002. Human aquaporin adipose (AQPap) gene Genomic structure, promoter analysis and functional mutation [J]. *Eur J Biochem*, 269: 1814-26.
- Kormann A W, Hurst R O, Flynn T G 1972. Purification and properties of an NADP⁺-dependent glycerol dehydrogenase from rabbit skeletal muscle [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 258: 40-55.
- Kreida S, Törnroth-Horsefield S 2015. Structural insights into aquaporin selectivity and regulation [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 33: 126-34.
- Leblond C P, Clermont Y S 1952. permiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid? technique [J]. *Am J Anat*, 90: 167-215.
- Leitner W W, Seguin M C, Ballou W R, Seitz J P, Schultz A M, Sheehy M J, Lyon J A 1997. Immune responses induced by intramuscular or gene gun injection of protective deoxyribonucleic acid

- vaccines that express the circumsporozoite protein from *Plasmodium berghei* malaria parasites [J]. *Journal of Immunology*, 159(12): 6112-6119.
- Li C J, Wang D, & Zhou X 2016. Sperm proteome and reproductive technologies in mammals [J]. *Animal Reproduction Science*, 173: 1-7.
- Louchami K, Best L, Brown P 2012. A new role for aquaporin 7 in insulin secretion [J]. *Cell Physiol Biochem*, 29: 65-74.
- Ma T, Song Y, Yang B 2000. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 4386-91.
- Mason P J, Stevens D, Diez A, Knight S W, Scopes D A, Vulliamy T J 1999. Human Hexose-6-phosphate Dehydrogenase (Glucose 1-Dehydrogenase) Encoded at 1p36: Coding Sequence and Expression [J]. *Blood Cells, Mol Dis Academic Press*, 25: 30-37.
- Matsumura K, Chang BH-J, Fujimiya M 2007. Aquaporin 7 is a beta-cell protein and regulator of intracellular glycerol content and glycerol kinase activity, beta-cell mass, and insulin production and secretion [J]. *Mol Cell Biol*, 27: 6026-37.
- Miyamoto T, Minase G, Shin T, Ueda H, Okada H, Sengoku K 2017. Human male infertility and its genetic causes[J]. *Reprod Med Biol*, 16(2): 81-88.
- Mollova M, Djarkova T, Ivanova M, Stamenova M, & Kyurkchiev S 1999. Isolation and biological characterization of boar sperm capacitation-related antigen [J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 42(4): 254-262.
- Moore S G, Hasler J F 2017. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science [J]. *J Dairy Sci*, 100 (12): 10314-10331.
- Moretti E, Terzuoli G, Mazzi L, Iacoponi F, Collodel G 2012. Immunolocalization of aquaporin 7 in human sperm and its relationship with semen parameters [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 58: 129-135.
- Mugabo Y, Zhao S, Seifried A 2016. Identification of a mammalian glycerol-3-phosphate phosphatase: role in metabolism and signaling in pancreatic beta-cells and hepatocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113: E430-9.
- Oakberg E F 1956. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal [J]. *Am J Anat Wiley-Blackwell*, 99: 391-413.
- Oyeyipo I P, van der Linde M, du Plessis S S 2017. Environmental Exposure of Sperm Sex-Chromosomes: A Gender Selection Technique [J]. *Toxicol Res*, 33: 315-323.
- Peter A, Jones P & Robinson J 1993. Fractionation of bovine spermatozoa for sex selection: A rapid immunomagnetic technique to remove spermatozoa that contain the HY antigen [J]. *Theriogenology*, 40(6): 1177-1185.
- Prieto-Martínez N, Vilagran I, Morató R 2017. Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze-thawing procedures [J]. *Andrology*, 5:1153-64.
- Prudente S, Flex E, Morini E 2007. A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with obesity and related metabolic abnormalities [J]. *Diabetes*, 56:1468-74.
- Ren G, Reddy V S, Cheng A 2001. Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in

- vitreous ice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 1398-403.
- Ross M T, Grafham D V, Coffey A J, Scherer S, McLay K, Muzny D 2005. The DNA sequence of the human X chromosome [J]. *Nature* Nature Publishing Group, 434: 325-337.
- Roy A, Lin Y-N, Agno J E, DeMayo F J, Matzuk M M 2007. Absence of tektin 4 causes asthenozoospermia and subfertility in male mice [J]. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21: 1013-1025.
- Sami V, Jorma T; Martti P 2003. Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing [J]. *Molecular biology of the cell*, 14: 2768-2780.
- Sarkar S, Jolly D J, Friedmann T, Jones O W 1984. Swimming behavior of X and Y human sperm [J]. *Differentiation*, 27: 120-5.
- Schmidt E E, Schibler U 1995. High accumulation of components of the RNA polymerase II transcription machinery in rodent spermatids [J]. *Development*, 121.
- Seidel G E, Jr 2012. Sexing mammalian sperm-where do we go from here? [J]. *J Reprod Dev*, 58 (5): 505-509.
- Shen D, Zhou C, Cao M, Cai W, Yin H, Jiang L, & Zhang S 2021. Differential Membrane Protein Profile in Bovine X- and Y-Sperm [J]. *Journal of proteome research*, 20(6): 3031-3042.
- Shettles L B 1970. Factors Influencing Sex Ratios [J]. *Int J Gynecol Obstet*, 8: 643-647.
- Skowronski M T, Skowronska A, Rojek A, Oklinski M K & Nielsen S 2016. Prolonged Starvation Causes Up-Regulation of AQP1 in Adipose Tissue Capillaries of AQP7 Knock-Out Mice [J]. *International journal of molecular sciences*, 17(7): 1101.
- Smirnova E, Goldberg E B, Makarova K S 2006. ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells [J]. *EMBO Rep*, 7: 106-13.
- Soh Y Q, Shirleen, Jessica A, Tatyana P, Brown L G, Graves T, Minx P J 2014. Sequencing the mouse Y chromosome reveals convergent gene acquisition and amplification on both sex chromosomes [J]. *Cell*, 159: 800-813.
- Soleymani B, Mansouri K, Rastegari-Pouyani M, Parvaneh S, Khademi F, Sharifi Tabar M, Mostafaie A 2021. Production of monoclonal antibody against recombinant bovine sex-determining region Y (SRY) and their preferential binding to Y chromosome-bearing sperm [J]. *Reprod Domest Anim*, 56(2): 270-277.
- Souza C, Matta M, Cruz G, Alves E W, Kanashiro M, Silva J 1999. Monoclonal Antibody against Male-Specific Protein of 19 KDa from Bovine Spermatozoa: A Successful Methodology for Immunosexing [J]. *Rev Bras Zootec*, 28: 74-78.
- Suh T K, Schenk J L, Seidel G E, Jr 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm [J]. *Theriogenology*, 64 (5): 1035-48.
- Surace E I, Strickland A, Hess R A, Gutmann D H, Naughton C K 2006. Tslc1 (nectin-like molecule-2) is essential for spermatozoa motility and male fertility[J]. *J Androl*, 27(6):816-825.
- Umehara T, Tsujita N, Shimada M 2019. Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexing sperm [J].

- PLoS Biol, 17(8): e3000398.
- van Hall G, Sacchetti M, Rådegran G 2002. Human skeletal muscle fatty acid and glycerol metabolism during rest, exercise and recovery [J]. *J Physiol*, 543: 1047-58.
- Wakayama Y, Inoue M, Kojima H 2004. Expression and localization of aquaporin 7 in normal skeletal myofiber [J]. *Cell Tissue Res*, 316: 123-9.
- Wang N, Tan Q, Yuan A & Xue L 2015. Artificially generated male-specific rabbit antibody against DBY-multi-epitope fusion protein and its immunoreactive examination [J]. *Acta Veterinaria*, 65(3): 328-338.
- Yang W C, Sang L, Xiao Y, Zhang H L, Tang K Q, Yang L G 2014. Tentative identification of sex-specific antibodies and their application for screening bovine sperm proteins for sex-specificity [J]. *Mol Biol Rep*, 41 (1): 217-223.
- Yildiz Y, Matern H, Thompson B, Allegood JC, Warren RL, Ramirez DMO 2006. Mutation of beta-gluco-sidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility [J]. *J Clin Invest American Society for Clinical Investigation*, 116: 29852994.
- Zechner R, Madeo F, Kratky D 2017. Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 671-84.
- Zhang S, Liu F, Zhou H, Shangguan A, Yang L, Nan L, Liang Q 2017. A method for analysing and identifying mammalian Y-sperm typing by one marker protein [J]. Patent CN, 106544411A.
- Zhao M, Shirley C R, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R 2004. Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development [J]. *genesis Wiley-Blackwell*, 38: 200-213.
- Zucchi I, Jones J, Affer M, Montagna C, Redolfi E, Susani L 1999. Transcription Map of Xq27: Candi-dates for Several X-Linked Diseases [J]. *Genomics Academic Press*, 57: 209-218.

附录

附录 A 试验仪器及试验试剂

PE2400 PCR 仪购自 Bio-Rad 公司 (美国); 电泳仪及电泳槽购自六一仪器厂 (北京); 全自动凝胶成像分析系统 JY04S-3C 购自北京君意东方电泳设备公司; ND-2000 紫外/可见分光光度计购自 Nanodrop 公司 (美国); HZP-250 全温振荡培养箱购自精宏实验设备有限公司 (上海); 离心机及超低温冰箱购自 Thermo 公司 (美国); SDS-PAGE 配胶槽、电泳槽、电泳仪、Western 转膜仪, 购自 Bio-Rad 公司 (美国); JY88-IIN 超声波细胞破碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司; PVDF 膜购自 Millipore 公司 (美国); BCATM Protein Assay Kit 购自 Thermo 公司 (美国); High Affinity Ni-NTA Resin 购自南京金斯瑞生物科技有限公司; 透析袋购自索莱宝科技有限公司; 酶标仪购自 Molecular Devices 公司 (美国); 96 孔细胞培养板购自 NEST。

试验试剂

一、基因克隆试验试剂

Primer star Max DNA 聚合酶、LA-Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III、T4 DNA 连接酶、Primescript RT Reagent Kit RNA 反转录试剂盒、DNA Marker, 购自大连宝生物公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、高纯质粒小提中量试剂盒, 购自天根生化科技有限公司; 其余化学试剂均为国产分析纯试剂。

二、原核表达及纯化试验试剂

5×变性蛋白电泳上样缓冲液购自索莱宝; DNA 限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III、T4 DNA 连接酶、异丙基-β-d-硫代半乳糖苷(IPTG), 购自大连宝生物公司; Anti-His tag 鼠单克隆抗体、山羊抗鼠 IgG HRP, 购自 CWBIO 公司; 蛋白 Marker 购自 Genstar 及 BIO-RAD; 其余化学试剂均为国产分析纯试剂。

三、抗体制备及检测试验试剂

β-Actin 鼠单克隆抗体、山羊抗鼠 IgG HRP、山羊抗兔 IgG HRP, 购自 CWBIO 公司; TMB 底物显色试剂由天根生物有限公司购置; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂, 购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 其余化学试剂均为国产分析纯试剂。

附录 B 主要溶液配置用量及步骤

(1) 50×TAE 电泳缓冲液:

试剂 Reagent	用量 Volume
三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242.0g
冰醋酸(GlacialAceticAcid)	57.1mL
己二胺四己酸(Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	37.2g
7 双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL

(2) 1%琼脂糖凝胶:

试剂 Reagent	用量 Volume
琼脂糖(Agarose)	0.2g
1×TAE 电泳缓冲液	20mL
0.5μg/μL 溴化乙锭(EB)	1μL

(3) LB 液体培养基:

试剂 Reagent	用量 Volume
酵母提取物(Yeastextract)	5.0g
胰蛋白胍(Tryptone)	10.0g
氯化钠(NaCl)	10.0g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL

(4) LB 固体培养基:

试剂 Reagent	用量 Volume
酵母提取物(Yeastextract)	5.0g
胰蛋白胍(Tryptone)	10.0g
琼脂(Agar)	7.5g
氯化钠(NaCl)	10.0g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL

(5) AMP (100mg/mL):

试剂 Reagent	用量 Volume
氨卞青霉素钠(Ampicillinsodium)	1g
双蒸水(ddH ₂ O)	10mL

(6) 超声缓冲液:

试剂 Reagent	用量 Volume
三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-cl)	15.76g
磷酸二氢钠(Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	1.56g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL

(7) LE Buffer:

试剂 Reagent	用量 Volume
三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-cl)	15.76g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	1.56g

尿素(Urea)	480g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL
(8) 洗涤缓冲液:	
试剂 Reagent	用量 Volume
三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-cl)	1.576g
磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	15.601g
咪唑(Imidazole)	0.681g
尿素(Urea)	480g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL
(9) 洗脱缓冲液:	
试剂 Reagent	用量 Volume
三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-cl)	1.576g
磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	15.601g
咪唑(Imidazole)	17.019g
尿素(Urea)	480g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL
(10) R-250 考马斯亮蓝染色液:	
试剂 Reagent	用量 Volume
甲醇(Methanol)	250mL
冰醋酸(GlacialAceticAcid)	50mL
考马斯亮蓝	1.25g
R-250(CoomassiebrilliantblueR250)	
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 500mL
(11) 考马斯亮蓝脱色液:	
试剂 Reagent	用量 Volume
甲醇(Methanol)	300mL
冰醋酸(GlacialAceticAcid)	100mL
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL
(12) 5×Tris-Gly 电泳缓冲液:	
试剂 Reagent	用量 Volume
三羟甲基氨基甲烷(Tris)	15.1g
甘氨酸(Glycine)	94.0g
十二烷基硫酸钠(SDS)	5.0g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL
(13) 10%分离胶(5mL):	
试剂 Reagent	用量 Volume
1.5mol/LpH8.8 三羟甲基氨基甲烷(Tris)	1300μL
30%丙烯酰胺(Acrylamide)	1700μL
10%十二烷基硫酸钠(SDS)	50μL
10%过硫酸铵(APS)	50μL
四甲基乙二胺(TEMED)	2μL
双蒸水(ddH ₂ O)	1900μL

(14) 5%浓缩胶(3mL):

试剂 Reagent	用量 Volume
1.5mol/LpH8.8 三羟甲基氨基甲烷(Tris)	380 μ L
30%丙烯酰胺(Acrylamide)	500 μ L
10%十二烷基硫酸钠(SDS)	30 μ L
10%过硫酸铵(APS)	30 μ L
四甲基乙二胺(TEMED)	3 μ L
双蒸水(ddH ₂ O)	2100 μ L

(15) 转膜缓冲液:

试剂 Reagent	用量 Volume
三羟甲基氨基甲烷(Tris)	3.03g
甘氨酸(Glycine)	14.42g
甲醇(Methanol)	200ml
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL

(16) 6M 尿素透析复性液:

试剂 Reagent	用量 Volume
三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-cl)	15.76g
磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	1.56g
尿素(Urea)	360g
谷胱甘肽还原型(G-SH)	0.31g
谷胱甘肽氧化型(GSSH)	0.61g
甘氨酸(Glycine)	10g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL

(17) 4M 尿素透析复性液:

试剂 Reagent	用量 Volume
三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-cl)	15.76g
磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	1.56g
尿素(Urea)	240g
谷胱甘肽还原型(G-SH)	0.31g
谷胱甘肽氧化型(GSSH)	0.61g
甘氨酸(Glycine)	10g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL

(18) 2M 尿素透析复性液:

试剂 Reagent	用量 Volume
三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-cl)	15.76g
磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	1.56g
尿素(Urea)	120g
谷胱甘肽还原型(G-SH)	0.31g
谷胱甘肽氧化型(GSSH)	0.61g
甘氨酸(Glycine)	10g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL

(19) PBS 透析复性液:

试剂 Reagent	用量 Volume
氯化钠 (NaCl)	8g
氯化钾 (KCl)	0.2g
十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	3.63g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.24
谷胱甘肽还原型(G-SH)	0.31g
谷胱甘肽氧化型(GSSH)	0.61g
甘氨酸(Glycine)	10g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL

(20) 组织蛋白裂解液(RIPA buffer):

试剂 Reagent	用量 Volume
RIPA 裂解液	800 μ L
1 \times 蛋白酶抑制剂	100 μ L
1 \times 磷酸酶抑制剂	100 μ L

(21) 磷酸盐吐温缓冲液(PBST):

试剂 Reagent	用量 Volume
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	0.28g
氯化钾(KCl)	0.2g
氯化钠(NaCl)	4g
吐温-20(Tween-20)	5.0mL
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL

(22) 抗原包被液:

试剂 Reagent	用量 Volume
碳酸钠(Na_2CO_3)	1.576g
碳酸氢钠(NaHCO_3)	15.601g
双蒸水(ddH ₂ O)	定容至 1000mL

(23) I-ELISA 检测封闭液:

试剂 Reagent	用量 Volume
脱脂奶粉	5g
磷酸盐吐温缓冲液(PBST)	100mL

(24) I-ELISA 检测终止液:

试剂 Reagent	用量 Volume
浓硫酸	43.4mL
双蒸水(ddH ₂ O)	374.6mL

(1) 50×TAE 电泳缓冲液: 称取 Tris 和 Na₂EDTA·2H₂O 于 1000 mL 烧杯中, 加入 600 mL 双蒸水, 充分搅拌均匀, 于通风橱中加入冰醋酸并搅拌, 加双蒸水于容量瓶定容至 1000 mL, 颠倒混匀, NaOH 调节 PH 到 8.3, 移至细口瓶中 4℃ 保存备用。1×TAE 电泳缓冲液用双蒸水稀释 4℃ 保存后备用。

(2) 1%琼脂糖凝胶: 称取琼脂糖于 200 mL 锥形瓶中, 加入 1×TAE 电泳缓冲液, 于微波炉加热煮沸两次至琼脂糖彻底融化, 水浴冷却至 50℃ 左右, 加入 EB, 轻柔混匀倒入插好梳子的制胶槽中, 让其自然冷却凝固备用。

(3) LB 液体培养基: 称取酵母提取物、胰蛋白胨、氯化钠于 1000 mL 烧杯中, 加进 800 mL 双蒸水充分混匀, 加双蒸水定容至 1000 mL, 高压灭菌锅灭菌后 4℃ 保存备用。LB 固体培养基配置、灭菌及保存步骤同 LB 液体培养基。

(4) 氨卞青霉素(100 mg/mL): 称取 1g 氨卞青霉素钠, 加双蒸水定容至 10 mL, 0.22 μm 无菌过滤塞过滤, 每管 1 mL 分装后-20℃ 保存备用。

(5) 超声缓冲液: 称取 Tris-cl、NaH₂PO₄·2H₂O 于 1000 mL 烧杯中, 加入 600 mL 双蒸水, 充分搅拌均匀, 加双蒸水于容量瓶定容至 1000 mL, 颠倒混匀, NaOH 调节 PH 到 8.0, 移至细口瓶中 4℃ 保存保存备用。洗涤缓冲液、洗脱缓冲液配置步骤同超声缓冲液。超声缓冲液 (含 8 mol/L 尿素) 配置需添加尿素, 配置过程同超声缓冲液。

(6) R-250 考马斯亮蓝染色液: 于通风橱中量取相应体积的甲醇和冰醋酸于 1000 mL 烧杯中, 加入考马斯亮蓝 R-250, 混合均匀, 加双蒸水于容量瓶定容至 500 mL, 颠倒混匀, 移至细口瓶中室温保存备用。

(7) 考马斯亮蓝脱色液: 于通风橱中量取相应体积的甲醇和冰醋酸于 1000 mL 烧杯中, 加双蒸水于容量瓶定容至 1000 mL, 颠倒混匀, 移至细口瓶中室温保存备用。

(8) 5×Tris-Gly 电泳缓冲液: 称取 Tris、甘氨酸、SDS 于 1000 mL 烧杯中, 加入 600 mL 双蒸水, 充分搅拌均匀, 加双蒸水于容量瓶定容至 1000 mL, 颠倒混匀, 移至细口瓶中 4℃ 保存备用。1×Tris-Gly 电泳缓冲液用双蒸水稀释后 4℃ 保存备用。

(9) 转膜缓冲液: 称取 Tris、甘氨酸、于 1000 mL 烧杯中, 加入 600 mL 双蒸水, 充分搅拌均匀, 于通风橱中加入甲醇, 加双蒸水于容量瓶定容至 1000 mL, 颠倒混匀, 移至细口瓶中 4℃ 保存备用。

(10) 10%分离胶(5mL): 量取 1.5 mol/L pH8.8 Tris、30%丙烯酰胺、10% SDS、

10% APS 于 20 mL 烧杯中搅拌均匀，于通风橱中加入 TEMED，再次搅拌均匀，将配好的 10%分离胶加入配胶槽中，加异丙醇压实，室温让其自然凝固。5%浓缩胶(3mL)配置步骤同 10%分离胶，将配好的 5%浓缩胶加入已凝固的 10%分离胶的配胶槽中，插入试验所需孔径的梳子，室温让其自然凝固备用。

(11) IPTG: 2.4 g IPTG 溶于 100 mL ddH₂O 水中，0.22 μm 无菌过滤塞过滤，每管 10 mL 分装后-20℃保存备用。

(12) Western blot 封闭缓冲液: 2.5 g 脱脂牛乳粉，加进 50 mL TBST 充分搅拌直到彻底溶解，置于 4℃ 冷藏保存，现用现配。

(13) 组织蛋白裂解液(RIPA buffer): 通风橱中吸取 RIPA 裂解液、10×蛋白酶抑制剂、10×磷酸酶抑制剂于 2 mL 离心管中，移液枪吹打混匀，现用现配。

(14) 磷酸盐吐温缓冲液(PBST): 称取 KH₂PO₄、Na₂HPO₄、KCl、NaCl 于 1000 mL 烧杯中，加入 600 mL 双蒸水，充分搅拌均匀，加入 Tween-20 再次搅拌均匀，加双蒸水于容量瓶定容至 1000 mL，颠倒混匀，移至细口瓶中 4℃保存保存备用。

(15) 抗原包被液: 称取 Na₂CO₃、NaHCO₃ 于 1000 ml 烧杯中，加入 600 ml 双蒸水，充分搅拌均匀，加双蒸水于容量瓶定容至 1000 mL，调节 pH 至 9.6，移至细口瓶中 4℃保存保存备用。

(16) ELISA 封闭液: 称取脱脂奶粉于 100 mL 烧杯中，加入 50 mL TBST, 充分搅拌均匀，加 TBST 于容量瓶定容至 100 mL，移至细口瓶中 4℃保存保存备用。

(17) ELISA 终止液: 500 mL 细口瓶入双蒸水，于通风橱量取浓硫酸缓慢加入预先加有双蒸水的细口瓶，4℃保存保存备用。

附录 C 大肠杆菌 Top10 感受态菌株转化步骤

(1) 从-80℃冰箱取出一管大肠杆菌 Top10 感受态菌株，冰浴缓慢融化，取融化的菌液各 50 μL 加入 15 mL 离心管，各离心管加入 10 μL 连接产物(pMD19-T-AQP7)，移液枪轻柔吹打混匀，冰浴 30 min。

(2) 冰浴后的混合物 42℃热激 90 s，再冰浴 2 min。

(3) 冰浴后的混合物中各加入 950 μL LB 液体培养基，摇床 37℃，200 rpm/min 振荡培养 45 min。

(4) 培养后的菌液 4000 rpm/min 离心 5 min，于超净台中各吸弃 900 μL 上清，移液枪轻柔吹打混匀管底菌液。

(5) 混匀的菌液各小心吸取 50 μL 接种于含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上，37℃倒置过夜培养。灭菌涂布棒均匀涂布菌液，37℃倒置培养过夜。

(6) 次日挑取各 LB 固体培养基上的单克隆菌落于 10 mL 含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37℃、200 r/min 振荡培养 12 h。

(7) 取培养后菌液 200 μL 送杨凌奥科生物科技有限公司测序。测序结果正确的菌液用高纯质粒小提中量试剂盒提取质粒-80℃冰箱保存备用。

附录 D 睾丸组织切片制作步骤

(1) 组织固定：剪取 1 cm³ 的睾丸组织用 4%多聚甲醛固定，24 h 后换成 75%无水乙醇 2 次后，可长期保存。

(2) 脱水：根据无水乙醇可置换组织内的水分的原理，将睾丸组织经过连续梯度的无水乙醇，75%无水乙醇 1 h；85%无水乙醇 1 h；95%无水乙醇 1 h；100%无水乙醇 I 1 h；100%无水乙醇 II 过夜，使脱水效果更好。

(3) 透明：将睾丸组织块依次浸泡在无水乙醇和二甲苯 1:1 混合液，30 min；二甲苯 I，30 min；二甲苯 II，20 min（根据组织透明情况可适当调整时间）。

(4) 透蜡：将睾丸组织块依次浸泡在二甲苯和石蜡 1:1 混合液，30min；石蜡 I 1 h；石蜡 II 过夜。

(5) 包埋：将石蜡溶液注入包埋框中，待框底稍有凝固时，将透蜡完成的睾丸组织块放入框中并做好标记，待石蜡凝固，取出蜡块。

(6) 切片：将修理好的蜡块进行切片，切片厚度为 5 μm；在 42℃展片机中展开后，用载玻片捞起，置于 42℃烤片机中烤 24 h 后，收入切片盒中备用。

附录 E SDS-PAGE 及 Western Blot 步骤

SDS-PAGE

(1) SDS-PAGE 凝胶配制: 将凝胶槽玻璃板对齐夹紧后放置在制胶架上, 先灌注 10%分离胶, 异丙醇压实后, 弃尽多余异丙醇, 再灌注 5%浓缩胶, 插上合适孔径的上样梳, 室温让凝胶自然凝固。

(2) SDS-PAGE 凝胶电泳: 待凝胶自然凝固后将其安装于电泳槽中, 加入 5×Tris-Gly 电泳缓冲液, 拔掉上样梳, 每孔加入适量蛋白样品, 盖上电泳槽盖, 蛋白样品 80 V 恒压跑浓缩胶, 当指示剂跑至浓缩胶与分离胶边界处, 电压改为 120 V, 当指示剂跑出凝胶后停止电泳。

(3) 考马斯亮蓝 R-250 染色及脱色: 小心切取凝胶, 适量加考马斯亮蓝 R-250 染色液于摇床 200 r/min 振荡染色 20 min, 双蒸水洗去残留的染色液, 加适量脱色液于摇床 200 r/min 振荡脱色至蛋白条带清晰可见, 检测是否有目的条带。

Western Blot

(1) 配胶及电泳步骤同 SDS-PAGE。

(2) 切胶及 PVDF 膜处理: 将浓缩胶切除, TBST 清洗凝胶后将凝胶与剪好的海绵板浸泡于转膜液中。剪取比凝胶略大的 PVDF 膜, PVDF 膜甲醇处理 10 s, 浸泡于转膜液中。

(3) 转膜: 按由正极到负极依次为海绵板、PVDF 膜、凝胶、海绵板的顺序将海绵板、PVDF 膜、凝胶置于转膜仪上盖上转膜仪盖, 16 V 恒压转膜 35 min。

(4) 洗膜及封闭: 转膜完成后取出 PVDF 膜用 TBST 冲洗 3 次, 每次 5 min, 加入 50 g/L 封闭液, 摇床室温封闭 1 h, 封闭完成后 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。

(5) 抗体孵育: 封闭液稀释后的一抗常温孵育膜 1 h, 转入 4℃继续孵育过夜, 之后 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min。封闭液稀释后的二抗常温孵育膜 15 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 8 min;

(6) 蛋白显影: PVDF 铺于照胶仪上, 除尽膜下气泡, 膜上均匀滴加显色液, 黑暗反应 2 min, 调整曝光时间检测是否有目的条带。

附录 F 大肠杆菌 BL21 感受态菌株转化及诱导表达步骤

- (1) 转化产物接种于提前倒好的含氨苄青霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 固体培养平板上。
- (2) 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置过夜培养, 次日挑取单克隆菌落于 10 mL 含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 12 h。
- (3) 取培养后的菌液各 150 μL , 分别接种于 15 mL 含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 液体培养基中。
- (4) 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养至对数期 (600 nm 处吸光值为 0.4-0.6)。
- (5) 剩余菌液加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡诱导表达 6 h。

附录 G Ni-NTA Resin 亲和纯化步骤

- (1) 首先进行 Ni-NTA Resin 亲和层析介质层析柱填充, 轻轻颠倒翻转瓶子几次, 使介质混合均匀。
- (2) 吸取 2 mL 介质加入到柱子中, 让介质自由沉降, 并放干储存液。
- (3) 加入 20 mL 超声缓冲液平衡层析介质。
- (4) 之后过柱纯化, 将含粗蛋白样品的超声缓冲 40 mL 上样至柱中, 流速控制为 0.5-1 mL/min, 收集流出液(流穿液)以待后续分析。
- (5) 加入 40 mL 洗涤缓冲液以 1 mL/min 的流速洗涤柱子以去除杂蛋白, 收集流出液以待后续分析。
- (6) 用 20 mL 的洗脱缓冲液以 0.5-1 mL/min 的流速洗脱目的蛋白, 收集洗脱液待后续分析。

附录 H I-ELISA 检测方法

用抗原包被液稀释抗原质量浓度至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 96 孔板每孔加 100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被, 每孔加 150 μL 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1.5 h。将免疫兔血清及对照兔血清 (阴性对照) 按 1:100、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000、1:128000 和 1:256000 稀释度稀释后按每孔 100 μL 加入封闭后的 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2h, 洗涤后每孔加入 1:2000 稀释后的山羊抗兔 IgG-HRP 100 μL 反应 1 h, 洗涤后 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光 TMB 显色 10min, 之后加入终止液, 于 450nm 处测吸光值(OD450), 当对照兔血清 1:100 稀释度对应的吸光值小于免疫兔血清稀释度对应的吸光值时, 将免疫组血清的上一个稀释度确定为抗血清效价。

附录 I AQP7 基因序列及氨基酸序列

AQP7 基因 CDS 区全序列

ATGACTCACTCAGACAGGAAGAGGCGGTCCACCCGCATGTCCAAGGTGGTCTCTACACCTAC
AGCAACAAAGATGAAAGTCATATGGCAGAATGAGAATGTTTCGAGAGTTCCTGGCAGAGTTC
ATCAGCACATATGTCATGATGGTGTGTTGGTCTCGGTGCTGTGGCCCACATGGTTCTAGGAGGT
AAAATGGGGAGCTACCTCGCTGTCAATTTGGGTTTTGGCTTTGGAGTCACCATAGGAATACA
CATGGCGGGGAACATCTCTGGGGCCACATGAATGCGGCCGTGACCTTCACCAGCTGTGCAC
TAGGCCGCATGTCCTGGAAGAAGTTTCCTGTGTATGTTCTGGGTGAGTTCCTGGGCTCCTTCG
TGGCAGCGGCCACCATCTACAGCCTCTTCTACACCGCTATTATCGACTTCTCGGGGGGAAAG
CTGATGGCGACTGGCCCCACAGCCACTGCTAACATTTTTGCCACCTACCTTCCTGACCACATG
ACACTGTGGAGGGGCTTCCTGGATGAGGTGGTGGTACTGGGATGCTTCAGCTATGTCTCTT
AGCCATCACAGACAAGGGGAACAACCCAACACTGTTGGGGACACAGGCCATTGTGACCGGC
ATCCTTATTGTCATCATCGGAGTATCCCTGGGCATGAACTCGGGATATGCCATCAACCCATCC
CGGGACCTGCCTCCCCGCTTCTTCACCTTCCTCGCTGGCTGGGGCTCACAGGTCTTCAGAACC
AAGGACTGGTGGTGGGTGCCGGTGGTGGCACCACCCTGGGTGCCTACTGTGGTGCCATCAT
CTACTTGTCTTCATTGGCTCCAACAAGCCAGAGGAGCCGCAAGTCCTGGAGAATCCCTCGA
CGATTGAAGACCACAGAGTATCTGTGTTGCCAAGACCGTGTCTCACCAGCACGGGGTCGCT
TCCCTCACCCCTGTCTCTGTGTACCCCGAAGATAGATCCTCAGTCTTGTACCACCCTTAA

AQP7 蛋白氨基酸序列

MTHSDRKRRSTRMSKVVSTPTATKMKVIWQENENVREFLAEFISTYVMMVFGLGAVAHMVLGGK
MGSYLAVNLGFGFGVTIGIHMAGNISGAHMNAAVTFTSCALGRMSWKKFPVYVLGQFLGSFVAA
ATIYSLFYTAIDFSGGKLMATGPTATANIFATYLPDHMTLWRGFLDEVVVTGMLQLCLLAITDKG
NNPTLLGTQAIVTGILIVIIGVSLGMNSGYAINPSRDLPFRFFTFLAGWGSQVFRTKDWVWPVVA
PPLGAYCGAIIYLFFIGSNKPEEPQVLENPSTIEDHRVSVLKTVSHQHGVASLTPVSVYPEDRSSVLY
HP

致谢

时光荏苒须当惜，风雨阴晴勤值历。在不知不觉中我已走过了硕士生涯的三年，初入西农，度过了半年懵懂的研究生生活，就经历了半年的居家全民抗疫，又度过了兵荒马乱的研二，迎来了专心科研的研三。好像没有在学校经历多久，就已经到了硕士生涯结束的时期。回首这三年的科研学习经历，从初到西农时对科研的憧憬向往到现在可以独立进行科研工作的思考和探索，期间收获颇多。三年的研究生生活教会了不仅学到了很多知识，也让我明白了很多道理，成长了许，接下来的路又是一个崭新的开始，在这美好的毕业季，我要向在这三年生活中给予我指导和帮助的老师同学们致以真挚的感谢和崇高的敬意！

首先感谢我的导师史怀平教授。感谢老师在三年前接受了当时那个忐忑、彷徨、冒失的我做您的学生，很荣幸能成为您的学生。感谢老师这三年里在课题上的指导和支持，在生活上的关心与包容。史老师认真严谨的工作态度，不知疲倦的工作精神，积极的生活态度都让我十分敬佩，激励着我学习进步。在实验室工作之余史老师带领我们深入奶山羊生产一线，亲身指导示范，一手抓理论一手抓实践，培养我的一线生产技能，引导着我学习进步，使我最终成为一名合格的奶山羊科研工作者。

衷心感谢团队中罗军教授、郑惠玲教授、王平副教授、李聪副教授以及田慧彬老师在实验中给予的悉心指导，你们的无私帮助是我试验顺利完成的保障。衷心感谢学院各位老师开题论证中提出的意见和建议。衷心感谢陈德坤教授、许信刚副教授在免疫学方面给予的指导和帮助。是各位老师宝贵的意见和无私的帮助使得我可以顺利开展试验。衷心感谢西农萨能奶山羊原种场席功科师傅在奶山羊生产繁育技能上对我的帮助和指导，使我积累了诸多一线实践经验。

衷心感谢黄炼、何环山、牛慧敏、黄江涛、邬娇、邵钺馨、朱露、杜伟伟、钟玉玲、曲赫选等师兄师姐在试验中的指导和帮助。祝愿你们前程似锦。

衷心感谢我的同门高文昌、藏赛鸽、刘颖、李冰寒、刘闻一、王丽敏、张娴、谢洋洋、岳子婷、张建鹏、韦庆旭在三年硕士生涯中给予我的帮助和鼓励。我将牢记与你们在一起共同奋斗的快乐时光。

衷心感谢宗学阳、申家宁、白淑赢、李纯、张华文、田博文、李翔、杨康琪以及任亚伦等师弟师妹在我试验中的帮助。希望你们在科研学习中取得丰硕成果。

特别感谢我的父母、亲人多年来对我的支持和鼓励，你们是我温馨的港湾，愿我早日成为你们坚实的后盾。

这三年真的发生了很多事情，但至少我们都走过来了，未来是美好的。奋斗仍是

最有意义的答案，现在我要迎着光的方向继续前行。

最后，再次向所有在我学习和生活中给予过我帮助的人致以由衷的感谢和诚挚的祝福。

李 金 涛

2022 年 5 月

