文章编号：1674-5566(2018)01-0008-08　　DOI:10.12024/jsou.20170702097

团头鲂转录因子 *Oct4* 的原核表达和多克隆抗体的制备

于　淼[1,2]，方　健[1]，李玲玉[1]，潘启华[1]，薛　亭[1]，邓　羽[1]，陈　凯[1]，陈天圣[1,3]

(1. 华中农业大学 水产学院,农业部淡水生物繁育重点实验室,湖北 武汉　430070；2. 河南师范大学 水产学院,河南省水产动物养殖工程技术研究中心,河南 新乡　453007；3. 水产高效健康生产湖南省协同创新中心,湖南 常德 415000)

摘　要：为进一步分析鱼类干细胞多能性转录因子 *Oct4* 的功能,将团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) *Oct4* 进行原核表达并制备了兔抗 Oct4 多克隆抗体。采用 RT-PCR 方法从团头鲂卵巢中扩增 *Oct4* 基因的部分编码片段,插入载体 pET32a 中构建重组原核表达载体 pET32a-Ma*Oct4*；将表达载体转化大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS,经 IPTG 诱导、Ni^{2+} 亲和柱层析纯化获得分子量约 49 ku 的可溶性重组蛋白；以纯化的重组蛋白为抗原免疫新西兰兔制备抗体,通过 ELISA 法测定其效价,Western blot 鉴定其特异性。实验结果表明：该重组载体在 37 ℃,0.5 mmol/L IPTG 条件下诱导 4 h 可获得 Ma-Oct4 重组蛋白的高效表达；制备的团头鲂 Oct4 多克隆抗体能够分别与纯化的 Oct4 蛋白、原核表达的 Oct4 蛋白、团头鲂胚胎中的内源 Oct4 蛋白以及 HepG2 细胞中过表达的 Ma-Oct4：DsRed 融合蛋白特异结合。为后续深入研究团头鲂 *Oct4* 在干细胞多能性调控中的作用提供了有效的分子工具。

关键词：团头鲂；*Oct4*；原核表达；多克隆抗体；转录因子

中图分类号：S 917.4　　**文献标志码：**A

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESCs)从囊胚的内细胞团分离而来[1],具有自我更新和多向分化潜能,可用于胚胎早期发育机制、药物筛选、再生医学、细胞毒理以及转基因动物生产等多方面的研究,应用前景广阔[2]。在此过程中,一些转录因子如 *Oct4*,*Sox2* 和 *Nanog* 等对于维持 ESCs 的自我更新和多能性起着非常重要的作用。其中 *Oct4* 在维持 ESCs 自我更新和分化为特定细胞系过程中处于中心地位[3],是一种细胞全能性标志基因[4],可以促进斑马鱼(*Danio rerio*)神经系统[5]、脑部[6]、外胚层[7]等的发育和背腹轴[8]的建立,还是形成诱导多潜能干细胞唯一不可缺少的转录因子[9]。因此,*Oct4* 在干细胞多能性维持、胚胎早期发育及体细胞重编程过程中均具有非常重要的作用。

关于 *Oct4* 的研究多集中在哺乳动物[10-14],在鱼类中的研究相对较少[15-18],鱼类 *Oct4* 的相关功能尚有待深入探讨,而制备特异性强的 Oct4 抗体对于进一步研究其生物学功能十分必要。目前关于 Oct4 抗体的报道主要在人(*Homo sapiens*)[19]、小鼠(*Mus musculus*)[20]和模式鱼类青鳉(*Oryzias latipes*)[17]与斑马鱼[21],其中多使用短肽作为抗原制备抗体。由于鱼类与哺乳动物的 Oct4 蛋白相似性较低,仅为 31% ~34%,而青鳉与斑马鱼的 Oct4 蛋白相似性也只有 63%[22],现有 Oct4 抗体往往具有针对其物种抗原的特异性而无法满足不同鱼类的研究需要。HUANG 等[18]在罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和高金宁[23]在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中通过自制特异性抗体进一步研究了鱼类 *Oct4* 基因的

收稿日期：2017-07-05　　**修回日期：**2017-10-01

基金项目：国家自然科学基金(31672653,31771648)；国家重点基础研究计划(2013CB967700)；华中农业大学科技自主创新基金(2013RC014,2662015PY049)；河南省自然科学基金(102300410104)；河南师范大学青年科学基金(2013qk15)

作者简介：于　淼(1981—),女,副教授,博士,研究方向为水产动物发育生物学。E-mail:miaoyu@ htu. edu. cn

通信作者：陈天圣,E-mail:tiansheng. chen@ mail. hzau. edu. cn

功能,但在淡水鱼类中以原核表达诱导蛋白进行 Oct4 抗体的研究尚未见报道。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是我国大宗淡水鱼类之一,具有重要的经济价值和科学研究意义,获得团头鲂 Oct4 蛋白的特异性抗体可为研究鱼类 *Oct4* 基因功能提供有力工具。目前已经克隆了团头鲂 *Oct4* 基因(*Ma-Oct4*, NCBI 序列号 KY994571),本文进一步表达了 Ma-Oct4 蛋白并制备了特异性的抗体,为进一步研究鱼类 *Oct4* 的功能奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

菌种、载体与细胞系:感受态大肠杆菌(*Escherichia coli*)TOP10 和 BL21(DE3)pLysS 购自北京全式金生物技术有限公司;载体 pET32a、pCVpr 及人肝癌细胞系 HepG2 均由本实验室保存。

主要试剂包括胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒(Omega,美国);限制性内切酶(NEB,美国);T4 DNA 连接酶(TaKaRa,日本);蛋白制备及 Western blot 试剂包括 SDS-PAGE Gel Kit、蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、蛋白印迹膜再生液(康为世纪,北京);抗体包括 His 一抗、羊抗兔及羊抗鼠二抗(Vazyme,南京),Actin 一抗(博奥森,北京),RFP 一抗(Abbkine,美国),羊抗鼠荧光二抗(LI-COR Biosciences,美国);细胞培养及转染试剂包括 DMEM 培养基及胎牛血清(Gibco,美国),LipofectamineTM 2000(Invitrogen,美国);引物由武汉擎科生物技术有限公司合成,其他试剂均为国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　原核表达载体的构建与鉴定

使用 PCR 方法从本实验室克隆的 *Ma-Oct4* CDS 序列获得编码 C 端 235 个氨基酸的目的片段 C-*Ma-Oct4*。所用引物为 C-Ma-Oct4-F:5′-AAAGATATCTCCTCAAGTGGAGGCTGC-3′,C-*Ma-Oct4*-R:5′-TTTAAGCTTGCTGGTGAGGTGACCCAC-3′,包含酶切位点 *Eco*RⅤ和 *Hind*Ⅲ。反应条件为 94 ℃预变性 3 min,94 ℃ 20 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 70 s,25 个循环,72 ℃延伸 5 min 。将 PCR 产物与 pET32a 分别用 *Eco*RⅤ和 *Hind*Ⅲ酶切后构建重组表达载体 pET32a-Ma*Oct4*。质粒经测序正确后转化表达菌株 BL21(DE3)pLysS。

1.2.2　重组蛋白的诱导表达与表达条件优化

挑取含有 pET32a-Ma*Oct4* 质粒的单克隆接种于 LB(Amp^r, 100 μg/mL)液体培养基中,按常规方法诱导 3 h,取 1 mL 菌液离心处理后进行 SDS-PAGE 电泳分析和染色后拍照;蛋白样通过 Western blot 检测 His-*Oct4* 标签的融合蛋白。表达条件优化如下。(1)诱导前接菌浓度和菌液培养时间:将过夜培养菌液分别按以下不同浓度和培养时间组合 0.5‰ + 1 h、1% + 1 h、0.5‰ + 2 h、1% + 2 h,在 37 ℃、0.5 mmol/L IPTG 诱导 3 h 后取样;(2)诱导时间:根据优化后的(1)中条件,分别诱导 2、4、6、8 h 后取样。

1.2.3　Oct4 抗体的制备

取诱导后菌液 100 mL,经离心和 PBS 重悬沉淀后置冰浴中超声波破碎菌体,分别取全菌、上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳以鉴定蛋白表达形式。鉴定结果显示 Ma-Oct4 蛋白主要以包涵体形式表达。往包涵体中加入 8 mol/L 尿素悬浮沉淀,冰浴 2 h 后在 4 ℃以 10 000 r/min 离心 15 min,收集上清;利用高亲和性 Ni 树脂纯化,收集流穿液、洗脱液,经 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯化效果;纯化后蛋白再通过梯度透析除去咪唑,SDS-PAGE 鉴定蛋白复性效果。用复性后的纯化蛋白免疫新西兰兔产生抗体,抗体的制备与效价检测方法参照文献[24],其中效价判定标准为OD 阳/OD 阴 > 2.5。实验中的蛋白纯化和免疫等工作由上海佑隆生物科技有限公司完成。

1.2.4　Oct4 抗体的特异性检测与应用

制备不同来源的 Ma-Oct4 蛋白,采用 Western blot 方法检测多克隆抗体的反应性。将 Ma-Oct4 纯化重组蛋白逐级稀释后按上样量 450、45、4.5、0.45、0 ng 作为抗原进行进行检测;诱导表达 pET32a-Ma*Oct4* 菌液中的蛋白提取液来检测抗体;提取团头鲂 1 细胞期和 32 细胞期的胚胎蛋白溶液来测试抗体;用 pCMV-Ma*Oct4*-Red 和对照 pCMV-Puro-DsRed 质粒转染 HepG2 细胞并制备细胞蛋白提取液来检测抗体与 Ma-Oct4:DsRed 融合蛋白的反应,具体实验步骤参考文献[24]。

2 结果

2.1 原核表达载体的构建

将 PCR 扩增得到的 *Ma-Oct4* C 端 723 bp 目的序列插入到 pET32a 构建原核表达载体 pET32a-Ma*Oct4*(图 1a),经酶切后分别得到大小为 6 580 bp 和 5 344 + 1 236 bp 的预期片段(图 1b),载体经测序确认读码框无突变及移码。

2.2 *Oct4* 重组蛋白的表达与鉴定

pET32a 载体上的标签蛋白分子量约为 23 ku[25],Oct4 目的蛋白为 235 个氨基酸,因此预期重组蛋白的分子量约 49 ku。转入 pET32a-Ma*Oct4* 载体的表达菌在 IPTG 诱导后经 SDS-PAGE 电泳分析,结果显示有约 49 ku 的预期条带;用 His 抗体进行 Western blot,能检测到约 23 ku 的空载体及 49 ku 的特异性目的条带(图 1c),说明 Oct4 融合蛋白在 BL21(DE3)pLysS 中正确表达。

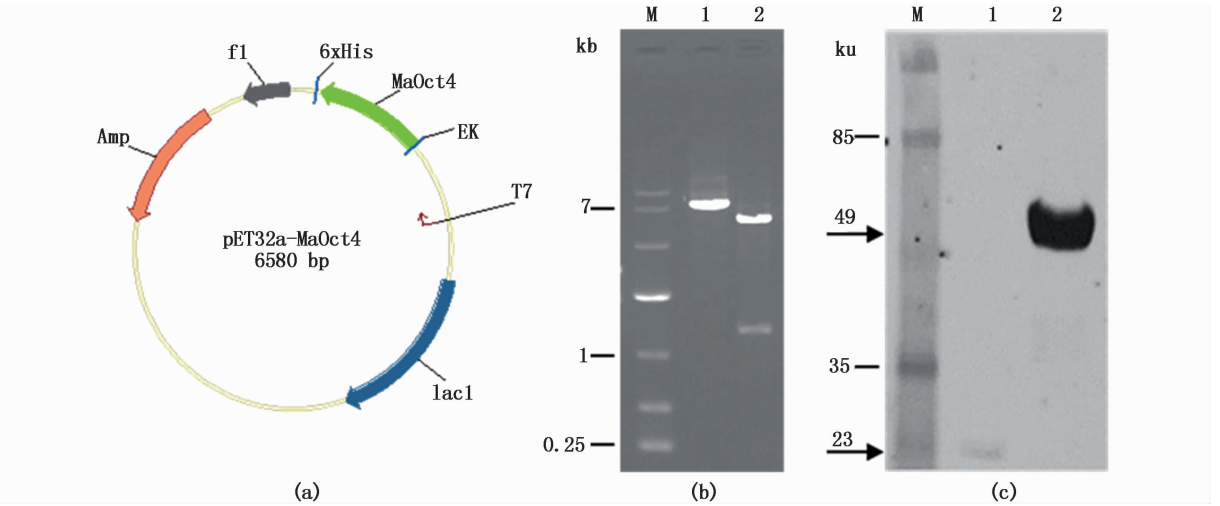

图 1 pET32a-MaOct4 原核表达载体构建及融合蛋白的表达与鉴定

Fig. 1 Construction of pET32a-MaOct4 prokaryotic expression vector and the expression and detection of the fusion protein

(a) pET32a-MaOct4 质粒图谱;(b) pET32a-MaOct4 质粒酶切鉴定,1. *Xba* Ⅰ;2. *Xba* Ⅰ + *Hind* Ⅲ;(c) Western blot 检测融合蛋白 His 标签的表达,1. pET32a 空载体对照;2. pET32a-MaOct4;M. DL10000 DNA marker 或预染蛋白 marker,箭头示目的条带

(a) map of pET32a-MaOct4 vector; (b) validation of pET32a-MaOct4 vector, 1. *Xba* Ⅰ; 2. *Xba* Ⅰ + *Hind* Ⅲ; (c) detection of His tag expression by Western blot, 1. pET32a; 2. pET32a-MaOct4; M. DL10000 DNA marker or prestained protein marker, the arrow indicates the interested bands

2.3 Oct4 重组蛋白诱导条件优化和重组蛋白的纯化

根据前期预实验结果,IPTG 浓度选用 0.5 mmol/L 诱导外源蛋白表达合适。不同接菌浓度和培养时间优化结果表明,pET32a-MaOct4 在接菌浓度 0.5‰条件下培养 2 h 后进行诱导得到的蛋白量最大并且目的蛋白相对含量最高(图 2a)。IPTG 诱导时间优化结果显示,在诱导 2、4、6、8 h 后各融合蛋白均有表达,其中诱导 4 h 目的蛋白表达量最大且占总蛋白比例最大(图 2b),而且重组蛋白主要存在于包涵体中(图 2c)。经 Ni^{2+} 亲和层析纯化和 80 mmol/L 咪唑洗脱能得到较高纯度的重组蛋白(图 2c)。实验获得纯度达 85% 的目的蛋白 5 mg 用于后续抗体的制备。

2.4 Oct4 抗体效价检测

所得兔抗团头鲂 Oct4 多克隆抗体经 ELISA 检测效价为 1∶81 000(表 1),可以进行抗原的特异性识别。

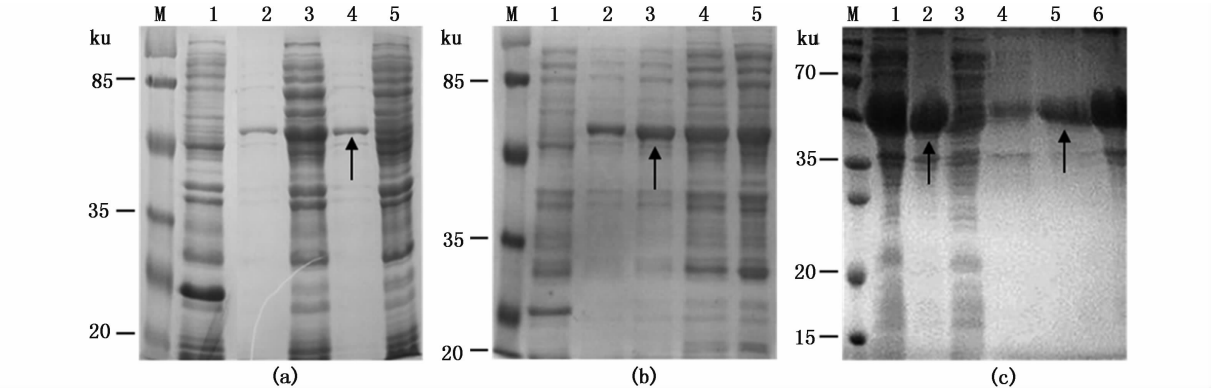

图 2　pET32a-MaOct4 融合蛋白诱导条件优化及其表达形式鉴定与纯化

Fig. 2　Optimization of expression conditions and the type and purification of pET32a-MaOct4 fusion protein

(a) 诱导前接菌浓度和摇菌时间对 pET32a-MaOct4 蛋白表达的影响,1. 空载体对照; 2. 0.5 ‰,1 h; 3. 1%,1 h; 4. 0.5 ‰,2 h; 5. 1%,2 h; (b) IPTG 诱导时间对 pET32a-MaOct4 蛋白表达的影响,1. 空载体对照;2 ~ 5. 诱导时间 2、4、6、8 h; (c) pET32a-MaOct4 融合蛋白的表达形式与纯化,1. 全菌;2. 沉淀;3. 上清;4 ~ 6. 40、80、150 mmol/L 咪唑洗脱液;M. 预染蛋白 marker,箭头表示目的条带

(a) fusion protein expression under different *E. coli* BL21 inoculation concentration and waving time before IPTG induction, 1. pET32a as control, 1%, 1 h; 2. 0.5 ‰, 1 h; 3. 1%, 1 h; 4. 0.5 ‰, 2 h; 5. 1%, 2 h; (b) pET32a-MaOct4 protein expression in BL21 under different induction time, 1. pET32a as control; 2 ~ 5. expression of protein induced in 2, 4, 6, 8 h; (c) the type and purification of pET32a-MaOct4 fusion protein, 1. total protein; 2. precipitate; 3. supernatant; 4-6. elution buffer with 40, 80, 150 mmol/L imidazole; M. prestained protein marker, the arrow indicates the interested bands

表 1　ELISA 检测 Oct4 抗体效价

Tab. 1　ELISA analysis of Oct4 antibody

稀释倍数 Dilution	1:100	1:1 000	1:3 000	1:9 000	1:27 000	1:81 000	1:243 000	空白 Blank
OD 值 Optical density	2.739	2.599	2.149	1.341	0.989	0.625	0.220	0.177

2.5　多克隆抗体特异性检测及应用

实验进一步采用 Western blot 方法检测抗体特异性。首先,所制备多克隆抗体可有效识别 Oct4 纯化重组蛋白,在 49 ku 处有预期条带且条带随蛋白浓度降低而逐渐减弱,最低检出量约为 4.5 ng(图 3a)。其次,该多抗能有效识别 pET32a-MaOct4 菌体裂解液中的目的蛋白,在约 49 ku 处检测到预期大小的特异条带(图3b)。再次,该抗体能有效识别团头鲂早期胚胎中的内源 Oct4 蛋白(分子量预计为 52 ku),Western blot 结果显示的条带与该内源蛋白大小一致(图 3c, 3d),而使用免疫前阴性血清作为抗体检测不到预期条带(图 3e)。最后将 pCVpr 和 pCMV-MaOct4-Red 质粒分别转染 HepG2(图 4a,4b)。细胞蛋白用 Oct4 多克隆抗体的杂交结果显示,转染 pCMV-MaOct4-Red 的蛋白有预期为 78 ku 的目的条带,而转染 pCVpr 及未转染质粒的蛋白提取液中仅有偏小而微弱的非特异性条带(图 4c);用 RFP 抗体检测相同的蛋白提取液,转染 pCMV-MaOct4-Red 组出现与 Oct4 多抗检测时大小一致的 78 ku 条带;转染 pCVpr 组有 pr (puro-rfp)融合表达的 48 ku 蛋白条带,而未转染组无条带(图 4d);Actin 作内参均能检测出目的条带(图 4e)。因此,以上结果均证明制备的兔抗团头鲂 Oct4 多克隆抗体能够有效识别以上几种形式的 Oct4 蛋白,可以用于后续实验。

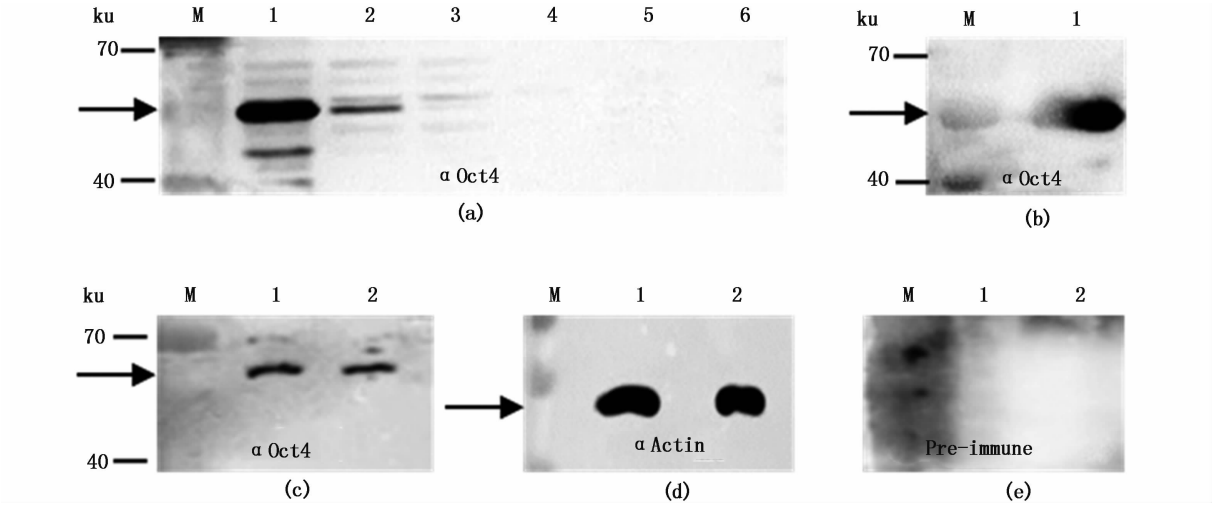

图 3 多克隆抗体特异性检测

Fig. 3 Specificity detection of the polyclonal antibody

(a) 纯化 Oct4 重组蛋白检测,1 ~ 5. 纯化蛋白上样量分别为 450、45、4.5、0.45、0 ng;6. H_2O 作阴性对照;(b) 原核诱导表达菌体蛋白检测,1. Ma-Oct4 多克隆抗体识别 pET32a-MaOct4 原核表达菌体蛋白;(c) 团头鲂胚胎内源 Oct4 蛋白检测,1. 1-cell;2. 32-cell;(d) Actin 抗体作内参;(e) 免疫前血清作阴性对照;M. 预染蛋白 marker,箭头表示目的条带

(a) the purified fusion Oct4 protein, 1-5. the loading amount was 450, 45, 4.5, 0.45, 0 ng, respectively; 6. H_2O; (b) the prokaryotic expression of protein, 1. detection of pET32a-MaOct4 protein expressed in BL21 with the Ma-Oct4 antibody; (c) the endogenous Oct4 protein, 1. 1-cell; 2. 32-cell; (d) the Actin antibody as the internal control; (e) the pre-immune serum as the negative control; M. prestained protein marker, the arrow indicates the interested bands

3 讨论

Oct4 是迄今发现最早也是最重要的维持胚胎干细胞多潜能性和自我更新的关键基因之一[12],在人和鼠的研究较为深入[3-4],但是在低等脊椎动物中的作用有明显的分歧[6,16-17]。鉴于不同物种的 *Oct4* 序列保守性偏低[14,18],本研究通过克隆团头鲂的 *Oct4* 基因,表达了原核蛋白并制备了特异性抗体。

团头鲂 Oct4 蛋白全长 472 个氨基酸残基,包括保守的 POU 结构域,选用了包含该结构域的片段(233 aa)作抗原。ARAKAWA 等[20]报道的小鼠 Oct4 单克隆抗体制备选用的肽段靠近 C 端,HUANG 等[18]则选用位于 2 个 POU 亚结构域之间的肽段 ENSENPQDMYKIERVF 制备了尼罗罗非鱼 Oct4 抗体,但有报道人工合成多肽作为免疫物质在动物体内易降解和自身免疫原性差[26]。高金宁[23]将 *Po-Oct4* 基因编码区片段连入 pET32a 载体,得到了包涵体形式的 Oct4 重组蛋白,并制备了可用于后续免疫组化分析的兔抗牙鲆 Oct4(Po-Oct4)多克隆抗体。本研究用团头鲂 Oct4 包含 POU 结构域的片段构建了原核表达载体,诱导的 Ma-Oct4 重组蛋白主要存在于包涵体中,制备的兔抗团头鲂 Oct4 多克隆抗体可识别不同来源的 Ma-Oct4 蛋白。这些抗体均为进一步分析鱼类 *Oct4* 基因的功能奠定了基础。不同的是,Po-Oct4 蛋白的最佳诱导条件为:*Transetta*(DE3)菌株,25 ℃,1 mmol/L IPTG 诱导 8 h 或更长时间,而 Ma-Oct4 蛋白的最佳诱导条件为:BL21(DE3)pLysS 菌株,37 ℃,0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h。造成这种蛋白诱导条件差异的原因较多,影响外源基因在大肠杆菌中表达的因素主要有载体类型、目的基因的量、宿主菌特征、营养状况和培养条件等[27];使用相同的原核表达体系也需要摸索不同的蛋白诱导条件,而优化的诱导条件能显著提高外源蛋白的表达[28-29]。

实验结果表明制备的团头鲂 Oct4 抗体能够有效识别纯化的 Ma-Oct4 蛋白、原核表达的 Ma-Oct4 蛋白、团头鲂胚胎内源表达的 Ma-Oct4 蛋白以及 HepG2 细胞中融合表达的 Ma-Oct4 蛋白。用团头鲂早期胚胎的蛋白提取液进行实验时能检测到约 52 ku 理论大小的条带,与用 RT-PCR 证明的团头鲂 *Oct4* 转录本在早期胚胎中表达的结果一致,这也说明了 *Oct4* 的 RNA 和蛋白都存

在于早期胚胎中;在目的条带上方还出现了非特异性条带,可能是抗体识别 Oct4 异构体或假基因所致[30-31],或者是提取液中含有免疫原区段类似的其他蛋白。本研究中通过建立融合表达 Ma-Oct4: DsRed 的细胞系来验证抗体的特异性,证实用 Oct4 抗体检测到的目的条带与 RFP 抗体识别的条带位置一致,这说明制备的抗体能特异地识别 Oct4 融合蛋白。

综上所述,本研究成功构建了团头鲂 *Oct4* 基因原核表达载体,优化了蛋白原核表达条件,获得了纯化的原核表达重组蛋白,制备了蛋白的多克隆抗体,并应用该抗体对不同来源 Oct4 蛋白进行了有效识别,这些工作为进一步研究团头鲂转录因子 *Oct4* 的功能奠定了基础。

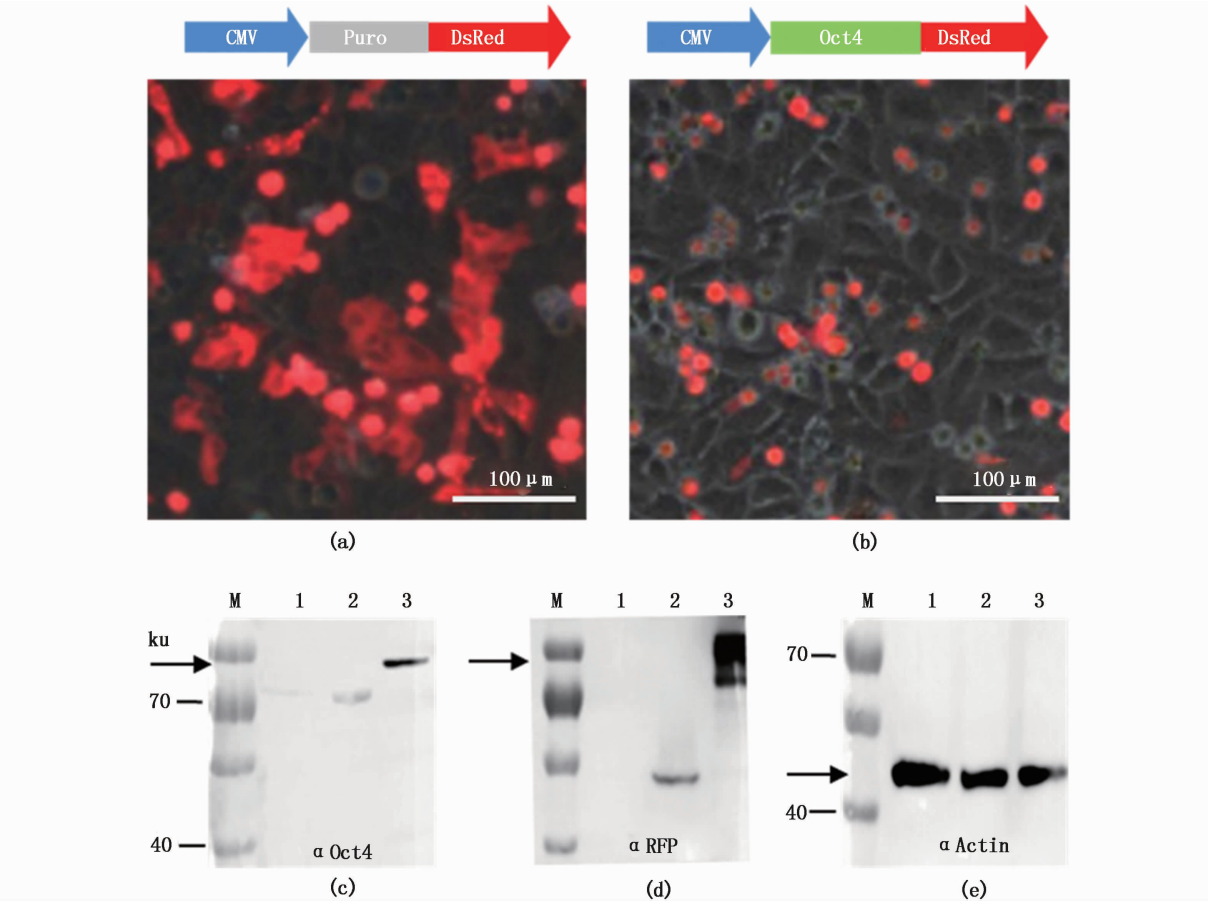

图 4　多克隆抗体应用于转染细胞蛋白检测

Fig. 4　Detection of protein from transfected cells using the polyclonal antibody

(a) pCVpr 质粒转染 HepG2 细胞后表达红色荧光图像;(b) pCMV-MaOct4-Red 质粒转染 HepG2 细胞后表达红色荧光图像,标尺 = 100 μm;(c) Oct4 多克隆抗体检测; 1. 未转染阴性对照; 2. pCVpr; 3. pCMV-MaOct4-Red; (d) RFP 抗体检测; (e) Actin 抗体作内参; M. 预染蛋白 marker,箭头表示目的条带

(a) the merge image of HepG2 after transfected with pCVpr; (b) the merge image of HepG2 after transfected with pCMV-MaOct4-Red, scale bars = 100 μm; (c) HepG2 protein detection using the Ma-Oct4 polyclonal antibody; 1. Negative control; 2. pCVpr; 3. pCMV-MaOct4-Red; (d) RFP antibody detection; (e) Actin antibody as the internal control; M. prestained protein marker, the arrow indicates the interested bands

参考文献:

[1] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(5819): 154-156.

[2] NIKOLSKII N N, GABAI I A, SOMOVA N V. Human embryonic stem cells: Problems and perspectives[J]. Cell and Tissue Biology, 2007, 1(5): 375-383.

[3] PARDO M, LANG B, YU L, et al. An expanded Oct4 interaction network: implications for stem cell biology, development, and disease[J]. Cell Stem Cell, 2010, 6

(4): 382-395.

[4] PESCE M, SCHÖLER H R. Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development[J]. Stem Cells, 2001, 19(4): 271-278.

[5] REIM G, BRAND M. *Spiel-ohne-grenzen/pou2* mediates regional competence to respond to Fgf8 during zebrafish early neural development[J]. Development, 2002, 129(4): 917-933.

[6] PARVIN M S, OKUYAMA N, INOUE F, et al. Autoregulatory loop and retinoic acid repression regulate *pou2/pou5f1* gene expression in the zebrafish embryonic brain [J]. Developmental Dynamics, 2008, 237(5): 1373-1388.

[7] KOTKAMP K, MÖSSNER R, ALLEN A, et al. A Pou5f1/Oct4 dependent Klf2a, Klf2b, and Klf17 regulatory sub-network contributes to EVL and ectoderm development during zebrafish embryogenesis[J]. Developmental Biology, 2014, 385(2): 433-447.

[8] BELTING H G, WENDIK B, LUNDE K, et al. Pou5f1 contributes to dorsoventral patterning by positive regulation of *vox* and modulation of *fgf8a* expression[J]. Developmental Biology, 2011, 356(2): 323-336.

[9] KIM J B, ZAEHRES H, WU G M, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors[J]. Nature, 2008, 454(7204): 646-650.

[10] SCHÖLER H R, HATZOPOULOS A K, BALLING R, et al. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor[J]. The EMBO Journal, 1989, 8(9): 2543-2550.

[11] OKAMOTO K, OKAZAWA H, OKUDA A, et al. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells[J]. Cell, 1990, 60(3): 461-472.

[12] TAKEDA J, SEINO S, BELL G I. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues[J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20(17): 4613-4620.

[13] MITALIPOV S M, KUO H C, HENNEBOLD J D, et al. Oct-4 expression in pluripotent cells of the rhesus monkey[J]. Biology of Reproduction, 2003, 69(6): 1785-1792.

[14] NORDHOFF V, HÜBNER K, BAUER A, et al. Comparative analysis of human, bovine, and murine *Oct-4* upstream promoter sequences [J]. Mammalian Genome, 2001, 12(4): 309-317.

[15] TAKEDA H, MATSUZAKI T, OKI T, et al. A novel POU domain gene, zebrafish pou2: expression and roles of two alternatively spliced twin products in early development[J]. Genes & Development, 1994, 8(1): 45-59.

[16] YE H, DU H, CHEN X H, et al. Identification of a *pou2* ortholog in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* and its expression patterns in tissues, immature individuals and during embryogenesis[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2012, 38(4): 929-942.

[17] LIU R, LI M Y, LI Z D, et al. Medaka Oct4 is essential for pluripotency in blastula formation and ES cell derivation[J]. Stem Cell Reviews and Reports, 2015, 11(1): 11-23.

[18] HUANG X H, ZHAO Y, LIU L Y, et al. Characterization of the POU5F1 homologue in Nile tilapia: from expression pattern to biological activity [J]. Stem Cells and Development, 2016, 25(18): 1386-1395.

[19] 刘善荣. 人胚胎生殖系细胞的分离与体外培养[D]. 上海: 第二军医大学, 2003.
LIU S R. Isolation and *in vitro* cultivation of human embryonic germ cell[D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2003.

[20] ARAKAWA T, YOSHIMI T, AZUMA M, et al. Production of a monoclonal antibody specific for Pou5f1/Oct4 [J]. Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, 2013, 32(3): 229-231.

[21] LIPPOK B, SONG S, DRIEVER W. Pou5f1 protein expression and posttranslational modification during early zebrafish development[J]. Developmental Dynamics, 2014, 243(3): 468-477.

[22] SÁNCHEZ-SÁNCHEZ A V, CAMP E, GARCÍA-ESPAЙA A, et al. Medaka Oct4 is expressed during early embryo development, and in primordial germ cells and adult gonads [J]. Developmental Dynamics, 2010, 239(2): 672-679.

[23] 高金宁. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)干细胞多能性相关转录因子 Oct4、Nanog 和 Sox2 的克隆与分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
GAO J N. Isolation and characterization of the transcriptional factors in maintaining pluripotency of stem cells in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.

[24] 李玲玉, 方健, 于淼, 等. 青鳉 prdm14 的原核表达、多克隆抗体制备及其应用[J]. 水生生物学报, 2017, 41(4): 748-754.
LI L Y, FANG J, YU M, et al. Prokaryotic expression, preparation and application of anti-prdm14 polyclonal antibody of medaka (*Oryzias latipes*) prdm14 [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(4): 748-754.

[25] 朱芳, 邓思, 罗立新. 分选酶 A 在 pET32a(+)原核表达载体中的表达和鉴定[J]. 生物技术通报, 2011(6): 218-222.
ZHU F, DENG S, LUO L X. Expression and identification of sortase A in pET32a (+) expression vector [J]. Biotechnology Bulletin, 2011(6): 218-222.

[26] 杨洁, 黄迎春, 刘军锋, 等. 一种适用于短肽制备抗体的亲和纯化方法[J]. 中华预防医学杂志, 2007, 41(6): 499-501.
YANG J, HUANG Y C, LIU J F, et al. An affinity purification method suitable for preparing short peptide antibody[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2007, 41(6): 499-501.

[27] 高慧, 孙建义, 刘明启. 影响大肠杆菌中外源基因表达的因素[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006(5): 64-65.
GAO H, SUN J Y, LIU M Q. Factors affecting the expression of exogenous genes in *Escherichia coli*[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2006(5): 64-65.

[28] 吴任, 谢数涛, 孙勇, 等. 凡纳滨对虾热休克蛋白 70 的原核高效表达[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 305-309.
WU R, XIE S T, SUN Y, et al. High level prokaryotic expression of heat shock protein 70 in *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 305-309.

[29] 毛明光, 温施慧, 姜志强, 等. 太平洋鳕神经坏死病毒衣壳蛋白(CP)的原核表达及条件优化[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(2): 117-123.
MAO M G, WEN S H, JIANG Z Q, et al. Prokaryotic expression and condition optimization of nervous necrosis virus capsid protein(CP) in Pacific cod *Gadus macrocephalus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(2): 117-123.

[30] PAPAMICHOS S I, KOTOULA V, TARLATZIS B C, et al. *OCT4B1* isoform: the novel *OCT4* alternative spliced variant as a putative marker of stemness[J]. Molecular Human Reproduction, 2009, 15(5): 269-270.

[31] WANG X, DAI J W. Concise review: isoforms of *OCT4* contribute to the confusing diversity in stem cell biology[J]. Stem Cells, 2010, 28(5): 885-893.

Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of Oct4 protein in *Megalobrama amblycephala*

YU Miao[1,2], FANG Jian[1], LI Lingyu[1], PAN Qihua[1], XUE Ting[1], DENG Yu[1], CHEN Kai[1], CHEN Tiansheng[1,3]

(1. *Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding*, *Ministry of Agriculture*, *College of Fisheries*, *Huazhong Agricultural University*, *Wuhan* 430070, *Hubei*, *China*; 2. *College of Fishery*, *Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation*, *Henan Normal University*, *Xinxiang* 453007, *China*; 3. *Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries in Hunan Province*, *Changde* 415000, *China*)

Abstract: To understand the potential function of pluripotency-associated gene *Oct4* in blunt-snout bream (*Megalobrama amblycephala*), the present study investigated the prokaryotic expression of the recombinant Oct4 protein and generated the rabbit anti-Oct4 polyclonal antibody. Firstly, the expression vector pET32a-MaOct4 was constructed by inserting the C-terminal coding region of *Ma-Oct4* into pET32a. Then the expression vector was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, and the recombinant Oct4 protein was induced by IPTG. After optimization of expression conditions, the protein was largely induced and purified to immunize the New Zealand rabbits. Subsequently, the titer and specificity of the generated antibody were assayed by ELISA and Western blot. The recombinant Oct4 protein was highly induced by 0.5 mmol/L IPTG for 4 h at 37 ℃. The polyclonal anti-Oct4 antibody effectively recognized the purified recombinant Ma-Oct4 antigen, the induced Ma-Oct4 protein in *E. coli*, the endogenous Ma-Oct4 protein from the fish embryos, and the overexpressed Ma-Oct4:DsRed fusion protein in HepG2 cells. In conclusion, this research provided an effective antibody to study the potential function of *Oct4* in blunt-snout bream.

Key words: blunt-snout bream (*Megalobrama amblycephala*); *Oct4*; prokaryotic expression; polyclonal antibody; transcription factors