

## 团头鲂转录因子*Nanog*的原核表达及其多克隆抗体制备

于淼<sup>1,2</sup>, 方健<sup>1</sup>, 李玲玉<sup>1</sup>, 薛亭<sup>1</sup>, 陈天圣<sup>1\*</sup>

(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)

**摘要:** 为深入研究鱼类干细胞多能性转录因子*Nanog*的功能, 本实验进行了团头鲂*Nanog*基因的原核表达和多克隆抗体的制备。首先, 从团头鲂卵巢克隆出*Nanog*基因的编码区, 将其连接到pET32a载体上构建原核表达载体。接着将重组载体转化至大肠杆菌BL21(DE3)pLysS, 通过异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 获得预期大小的*Nanog*重组蛋白, 并获得大量蛋白以制备抗体。最后通过ELISA检测抗体的效价和采用Western blot技术检测*Nanog*抗体的特异性。结果显示, 在37 °C, 0.5 mmol/L IPTG诱导4 h可获得*Nanog*重组蛋白的高效表达; 制备的多克隆抗体能够有效识别原核表达的*Nanog*蛋白及团头鲂肝脏和精巢的内源*Nanog*蛋白; 该抗体也可应用于检测HepG2细胞中过表达的团头鲂*Nanog*蛋白。本研究为蛋白的原核表达和特异性抗体的制备及验证提供了研究思路, 也为研究鱼类*Nanog*基因功能提供了特异性抗体。

**关键词:** 团头鲂; *Nanog*; 原核表达; 多克隆抗体; 干细胞

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

*Nanog*基因是2003年被正式命名的一种同源域转录因子, 它在维持胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)自我更新和多向分化潜能中具有非常重要的作用<sup>[1-2]</sup>。该因子属于NK家族基因, 有3个内含子和4个外显子, 其活性高低可通过可变剪接的方式来调节<sup>[3]</sup>。*Nanog*蛋白含3个功能结构域: 高度可变的N-端和C-端结构域以及相对保守的同源异型结构域<sup>[4]</sup>。相对其他转录因子, *Nanog*基因序列在不同物种中显示出较低的保守性, 人类(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)的*Nanog*蛋白相似度仅54%, 斑马鱼(*Danio rerio*)和小鼠的蛋白相似度不到17%<sup>[5]</sup>。所有物种的*Nanog*蛋白产物均含保守的同源异形结构域, 该区域能与DNA或其他蛋白相结合, 是*Nanog*基因发挥调控功能的重要结构单位<sup>[6]</sup>。尽管斑马鱼*Nanog*基因与小鼠*Nanog*基因的相似性较低, 但它依然可替换小鼠*Nanog*基因诱导多能干细胞的

形成<sup>[5]</sup>, 参与调节分裂球的分裂和生殖细胞的发育<sup>[7]</sup>。

*Nanog*基因在早期胚胎、ESCs以及原始生殖细胞中有表达<sup>[8-10]</sup>, 而在已分化的ESCs中消失<sup>[11]</sup>。斑马鱼*Nanog*基因在卵巢中开始母源性表达, 在囊胚晚期、原肠胚早期大量表达, 并在原肠胚晚期逐渐被泛素化降解<sup>[7, 12]</sup>。在没有饲养层的情况下, 高水平表达的*Nanog*基因能使人ESCs保持自我更新状态, 而缺乏*Nanog*基因的ESCs丧失其多能性<sup>[10-13]</sup>。*Nanog*基因一方面可维持小鼠内细胞团、外胚层干细胞等的全能性<sup>[14]</sup>, 阻止内胚层转录因子的大量表达从而抑制内胚层细胞的分化<sup>[2]</sup>, 另一方面又可促进晚期囊胚的发育及外胚层的形成, 它的缺失可导致胚胎死亡<sup>[15]</sup>。缺乏*Nanog*基因的小鼠胚胎不能形成外胚层, 胚胎发育在囊胚阶段终止<sup>[2]</sup>。*Nanog*与*Oct4*、*Sox2*和*Lin28*基因共转染还能使人类成体细胞重编程成为ESCs

收稿日期: 2016-09-15 修回日期: 2016-12-26

资助项目: 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); 河南省水产养殖重点学科资助

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

样的诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)<sup>[16]</sup>。因此*Nanog*基因在胚胎早期发育、多能性调控及iPS细胞诱导等方面均具有重要的作用。

研究表明, *Nanog*的DNA和蛋白质序列在很多物种中相似性较低, 已被鉴定清楚的*Nanog*同源基因较少, 采用已知的蛋白抗体很难应用于跨物种的相关研究<sup>[3, 17]</sup>。目前已有*Nanog*基因原核表达及抗体制备的相关研究, 但都集中在小鼠<sup>[18-19]</sup>、牛(*Bos taurus*)<sup>[20]</sup>、人<sup>[21]</sup>、山羊(*Capra hircus*)<sup>[22]</sup>和猪(*Sus scrofa*)<sup>[23]</sup>等哺乳动物, 鱼类中*Nanog*蛋白与抗体制备等的研究报道仅限于模式鱼类和海水鱼牙鲆(*Paralichthys olivaceus*), 其中在青鳉(*Oryzias latipes*)中用GGENCTRRTGSDSA-SDSEAH这一肽段合成了OI-*Nanog*抗体<sup>[24]</sup>, 在牙鲆中进行了Po-*Nanog*的原核表达与纯化<sup>[25]</sup>, 而在大宗淡水鱼类中采用原核表达诱导蛋白后获得有效*Nanog*抗体的研究尚未见报道。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是我国主要淡水养殖对象之一<sup>[26]</sup>, 具有重要的经济价值和科学研究的意义。团头鲂相关研究已包含遗传育种<sup>[27-28]</sup>、营养与饲料<sup>[29]</sup>、疾病与免疫<sup>[30]</sup>、性状相关基因的克隆与表达<sup>[31]</sup>、全基因组测序等。前期实验已经克隆并鉴定了团头鲂*Nanog*基因(*MaNanog*), 本研究在此基础上开展了*MaNanog*蛋白原核表达、抗体的制备与验证工作, 高效表达了*Nanog*蛋白并制备了特异性多克隆抗体, 为下一步研究*Nanog*在鱼类早期发育及多能性调控过程中的作用机制以及干细胞的鉴定等奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

菌种、载体、细胞系及实验用鱼 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pDrive、pET32a、pEGFP-N1及人肝癌细胞系HepG2均由本实验室保存; 团头鲂购自湖北鄂州武昌鱼原种场。

工具酶及主要试剂 高保真Supermix (Invitrogen, 美国); 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒(Omega, 美国); 质粒中抽试剂盒(MACH-EREY-NAGEL, 德国); Marker: 1 kb DNA Marker (Vazyme, 南京), DL10000 DNA Marker (TaKa-

Ra, 日本), 预染蛋白Marker SM0441(Fermentas, 美国), 预染蛋白Marker 26616(Thermo, 美国)及预染蛋白Marker C610011(生工生物工程, 上海); 限制性内切酶(NEB, 美国); T<sub>4</sub> DNA连接酶(TaKaRa, 日本); 蛋白制备及Western blot试剂: SDS-PAGE Gel Kit、细菌蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、蛋白印记迹膜再生液CW0056A(康为世纪, 北京), 一步法动物组织活性蛋白提取试剂盒(生工生物工程, 上海), PVDF膜(Millipore, 美国), ECL化学发光试剂盒(Bio-Red, 美国); 抗体: Anti-His mAb、True-Tag Anti-GFP mAb、HRP标记羊抗兔二抗 IgG (H+L)及HRP标记羊抗鼠二抗 IgG (H+L)(Vazyme, 南京), 荧光标记羊抗鼠二抗 800 CW (LI-COR Biosciences, 美国), Rabbit anti beta-Actin (博奥森, 北京); 细胞培养及转染试剂: DMEM培养基及胎牛血清(Gibco, 美国), Lipofectamine™ 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 实验方法

团头鲂*Nanog*基因编码区的扩增 *MaNanog*基因编码区(open reading frame, ORF)扩增引物根据团头鲂*Nanog*基因序列(GenBank序列号: KU574641)设计(表1)。以团头鲂卵巢组织cDNA为模板、高保真Supermix进行PCR, 反应条件为94 °C预变性3 min; 94 °C变性20 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s, 32个循环; 72 °C终延伸10 min。PCR产物连入pDrive载体, 构建载体pDrive-*MaNanog*并测序确证。

*Nanog*原核表达载体的构建与鉴定 根据需要构建2个原核表达载体, 按*MaNanog*基因序列及pET32a载体图谱分别设计引物(表1), 其中长片段*MaNanog-L*为ORF去除终止密码子片段, 小片段*MaNanog-S*为包含同源异型结构域的片段。上下游引物均加入相应的酶切位点, 分别用此2对引物以pDrive-*MaNanog*为模板、高保真Supermix进行PCR扩增, 反应条件为94 °C预变性3 min; 94 °C变性20 s, 57 °C退火30 s, 72 °C延伸70 s, 25个循环; 72 °C终延伸5 min。

将上述*MaNanog-L* PCR产物及pET32a质粒分别用EcoR I+Hind III酶切, *MaNanog-S* PCR产物及pET32a质粒分别用EcoR I+Sal I酶切, 产物经电泳回收纯化后构建重组表达载体pET32a-*MaNanog-L*和pET32a-*MaNanog-S*。质粒酶切鉴定和测序后

表 1 实验用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primers name	引物序列(5'-3') primers sequence	用途 usage
Ma-Nanog-181F	AAAGAATTCTTTTGCTCTGCGTTCATCCGACGAA	ORF cloning
Ma-Nanog-1365R	AAATCTAGAGCAGCCAGACTCACAGCAAAGTCA	ORF cloning
Ma-Nanog-long 218F	AAAGAATTCATGGCGGATTGGAAGATACCAGTG	MaNanog-L cloning
Ma-Nanog-long 1337R	TTTAAGCTTTGTTGACCACTGGGCAGTACT	MaNanog-L cloning
Ma-Nanog-short 782F	AAAGAATTCTCTCCAGCCCGACCT	MaNanog-S cloning
Ma-Nanog-short 998R	TTTGTCGACGTATCTCTCGGTCATCCA	MaNanog-S cloning
Nanog-F-B	CGGGATCCTCTCCAGCCCGACCTCCAGC	MaNanog-S cloning
Nanog-R-X	CCGCTCGAGGTATCTCTCGGTCATCCAAC	MaNanog-S cloning

注: 下划线部分表示限制性酶切位点

Notes: the underline indicates the restriction sites

用中抽试剂盒提取备用。

**Nanog原核表达与表达条件优化** 分别将重组质粒及pET32a空载体转化至感受态大肠杆菌BL21(DE3)pLysS。从平板上挑取单克隆菌落接种于LB (Amp<sup>r</sup>, 100 μg/mL)液体培养基中, 37 °C, 200 r/min振荡培养12 h; 然后将菌液均按1%体积比置于LB (Amp<sup>r</sup>)培养基中37 °C培养2 h, 加入0.5 mmol/L TPTG诱导3 h后, 10 000 r/min离心收集菌体, 沉淀中加入蛋白上样缓冲液, 涡旋后沸水浴5 min, 离心后取上清液进行SDS-PAGE电泳分析。分离后的蛋白采用考马斯亮蓝R250染色并脱色后拍照; 蛋白样同时做Western blot以检测His标签, 具体方法: 蛋白样经电泳后, 置半干电转仪中以18 V电压转膜25 min; 加入5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 再加入一抗Anti-His mAb(1:2000)4 °C孵育过夜, Tris-HCl吐温缓冲溶液(TBS+0.1% Tween, TBST)洗膜3次, 15 min/次; 加入荧光标记羊抗鼠二抗 800 CW (1:15 000)室温避光孵育1 h, TBST洗膜3次, 10 min/次, 置双色红外激光成像系统检测绿色荧光信号并拍照。

**表达条件优化:** ①将含pET32a-MaNanog-S培养过夜菌液按10%的体积比置于LB (Amp<sup>r</sup>)培养基中37 °C培养1 h, 分别加入IPTG至终浓度0.5和1 mmol/L, 诱导3 h以优化IPTG诱导浓度。②将3种过夜培养菌液按10%体积比转入LB (Amp<sup>r</sup>)培养基中37 °C培养1 h, 加入IPTG至终浓度0.5 mmol/L, 分别诱导不同时间后取样以优化最佳诱导时间。③将3种过夜培养菌液分别按0.5%、1%、5%、10%的体积比转入LB (Amp<sup>r</sup>)培养基中37 °C培养2 h, 0.5 mmol/L IPTG诱导4 h

后取样以优化诱导前接菌浓度。

**融合蛋白表达形式鉴定** 取含pET32a-MaNanog-S诱导后菌液10 000 r/min离心10 min, 以1/10菌液体积的PBS重悬沉淀, 冰浴中超声波破碎菌体, 离心收集上清液和沉淀, 分别取全菌、上清液和沉淀进行12% SDS-PAGE分析。

**融合蛋白抗体制备与效价检测** 诱导pET32a-MaNanog-S菌体蛋白大量表达后, 取上清液用Ni琼脂糖凝胶纯化, 但Nanog蛋白不挂柱, 加入巯基乙醇后仍不挂柱, 导致蛋白纯化率非常低, 因此新设计引物Nanog-F-B和Nanog-R-X(表1), 重新构建表达载体pET30a-MaNanog, 该载体表达的Nanog蛋白能大量诱导和纯化。将纯化蛋白与等体积弗氏佐剂混合乳化均匀成“油包水”状态, 背部皮下分点注射免疫新西兰大白兔, 每点注射体积约0.1 mL; 皮下免疫3次, 每次免疫间隔时间为3周, 末次加强免疫后7 d取血, 分离血清后-20 °C保存。ELISA检测抗体效价, 在酶标仪上以450 nm/620 nm双波长读数, 阳性判定点为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。

**多克隆抗体特异性检测** 为了检测抗体的特异性, 实验采用了原核表达诱导的pET32a-MaNanog-S菌液、团头鲂肝脏和精巢组织蛋白提取液。一抗为所制备抗体(1:500, 22 μg/mL), 二抗为辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔抗体(1:10 000), ECL显色后置GE化学发光凝胶成像系统成像观察并拍照。另外组织蛋白检测成像之后用TBST洗去显色

液,加入蛋白印迹膜再生液室温孵育1 h去除一抗印迹,封闭后重新加入兔抗Actin一抗(1:1200)孵育,操作同上,观察同一泳道蛋白样品内参蛋白表达情况。

**多克隆抗体检测HepG2细胞外源MaNanog蛋白** 将实验室构建的pEGFP-N1和pEGFP-N1-MaNanog质粒分别转染HepG2细胞来检测Nanog融合蛋白;HepG2细胞以 $1 \times 10^6$ 个/孔接种于六孔板中,加DMEM细胞培养液置于 $37^\circ\text{C}$ ,5%二氧化碳培养箱中培养。24 h后用Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000进行转染,每孔加6  $\mu\text{L}$ 转染试剂及2  $\mu\text{g}$ 质粒,48 h后在倒置荧光显微镜下观察并拍照。另外用已筛选的稳定转染pLVX-Puro、pLVX-MaNanog及pLVX-MaNanog/pLVX-MaOct4的HepG2细胞检测过表达的MaNanog蛋白。细胞蛋白提取液分别用GFP抗体(1:750)、Nanog抗体(1:500)及Actin抗体(1:1200)进行Western blot分析,方法同上。

## 2 结果

### 2.1 Nanog基因序列的获得与原核表达载体的构建

从团头鲂卵巢中克隆获得了1217 bp的Nanog ORF序列,并获得正确的pDrive-MaNanog克隆载体。以它为模板分别扩增MaNanog-L和MaNanog-S片段(图1-a),并将扩增出的MaNanog-L片段1158 bp与pET32a构建原核表达载体pET32a-MaNanog-L(图1-b, 1-c);将扩增出的MaNanog-S片段252 bp与pET32a构建成表达载体pET32a-MaNanog-S(图1-d, 1-e)。

### 2.2 Nanog融合蛋白的表达与鉴定

转入pET32a-MaNanog-L和pET32a-MaNanog-S载体的表达菌在IPTG诱导后经SDS-PAGE电泳分析,结果显示分别有约62和29 ku的预期大小的目的条带,空载体对照有约20 ku的特异性条带(图1-f)。采用His标签的抗体进行Western blot能检测到62和29 ku的特异性条带(图1-g),这说明Nanog融合蛋白在BL21(DE3)pLysS中正确表达。

### 2.3 Nanog融合蛋白诱导条件优化

首先优化IPTG诱导浓度,结果显示在0.5和1 mmol/L的IPTG诱导条件下pET32a-MaNanog-S融合蛋白均有表达(图2-a),因此选择0.5 mmol/L的

IPTG进行诱导。其次优化IPTG诱导时间,结果表明在诱导2、4、6 h或2、4、6、8 h后各融合蛋白均有表达,其中诱导4 h时目的蛋白表达量均最高且占总蛋白比例最大(图2-b, 2-c, 2-d),所以选择4 h诱导。最后优化诱导前不同接菌浓度,结果表明pET32a-MaNanog-L在接菌浓度1‰,pET32a-MaNanog-S在5‰条件下培养2 h后进行诱导得到的蛋白量最高且比例最大(图2-e, 2-f)。

### 2.4 Nanog融合蛋白的表达形式与纯化

以上结果说明原核表达载体都能有效表达Nanog蛋白,实验中选择小片段的Nanog蛋白进行鉴定和纯化。结果显示,pET32a-MaNanog-S目的蛋白主要存在于上清液中,诱导pET32a-MaNanog-S菌体蛋白大量表达后,取上清液用Ni琼脂糖凝胶纯化,但目的蛋白不挂柱。因此新设计引物Nanog-F-B和Nanog-R-X(表1),并重新构建表达载体pET30a-MaNanog-S,经诱导后发现目的蛋白主要表达在上清液中(图3-a);后经大量诱导,Ni柱能有效吸附新载体表达的Nanog蛋白(图3-b);透析除去咪唑(图3-c),共获得纯度达90%的纯化蛋白5 mg。

### 2.5 Nanog抗体效价检测

所得团头鲂Nanog多克隆抗体经ELISA检测效价为1:243 000(表2),可以进行抗原的特异性识别。

### 2.6 多克隆抗体特异性检测及应用

为了验证抗体的特异性,采用Western blot技术对多种含有Nanog蛋白的提取液进行验证;首先,抗体可有效识别经诱导的pET32a-MaNanog-S菌体裂解液中的目的蛋白(图4-a);其次,该多抗能识别团头鲂肝脏和精巢组织中的Nanog蛋白(图4-b, 4-c);之后将pEGFP-N1和pEGFP-N1-MaNanog质粒分别转染HepG2(图5-a, 5-b),提取未转染和转染质粒的细胞蛋白,同时提取转染pLVX-Puro(对照质粒)、pLVX-MaNanog及其共转染pLVX-MaNanog和pLVX-MaOct4的细胞蛋白进行检测。Western blot结果显示,用GFP抗体检测时转染pEGFP-N1质粒的蛋白有位于26 ku的特异性预期条带,而转染pEGFP-N1-MaNanog及未转染的细胞蛋白均无条带(图5-c);用制备的Nanog抗体检测相同的蛋白提取液,转染pEGFP-N1-MaNanog(70 ku)组有明显高于转染pEGFP-N1组及未转染组细胞蛋白的

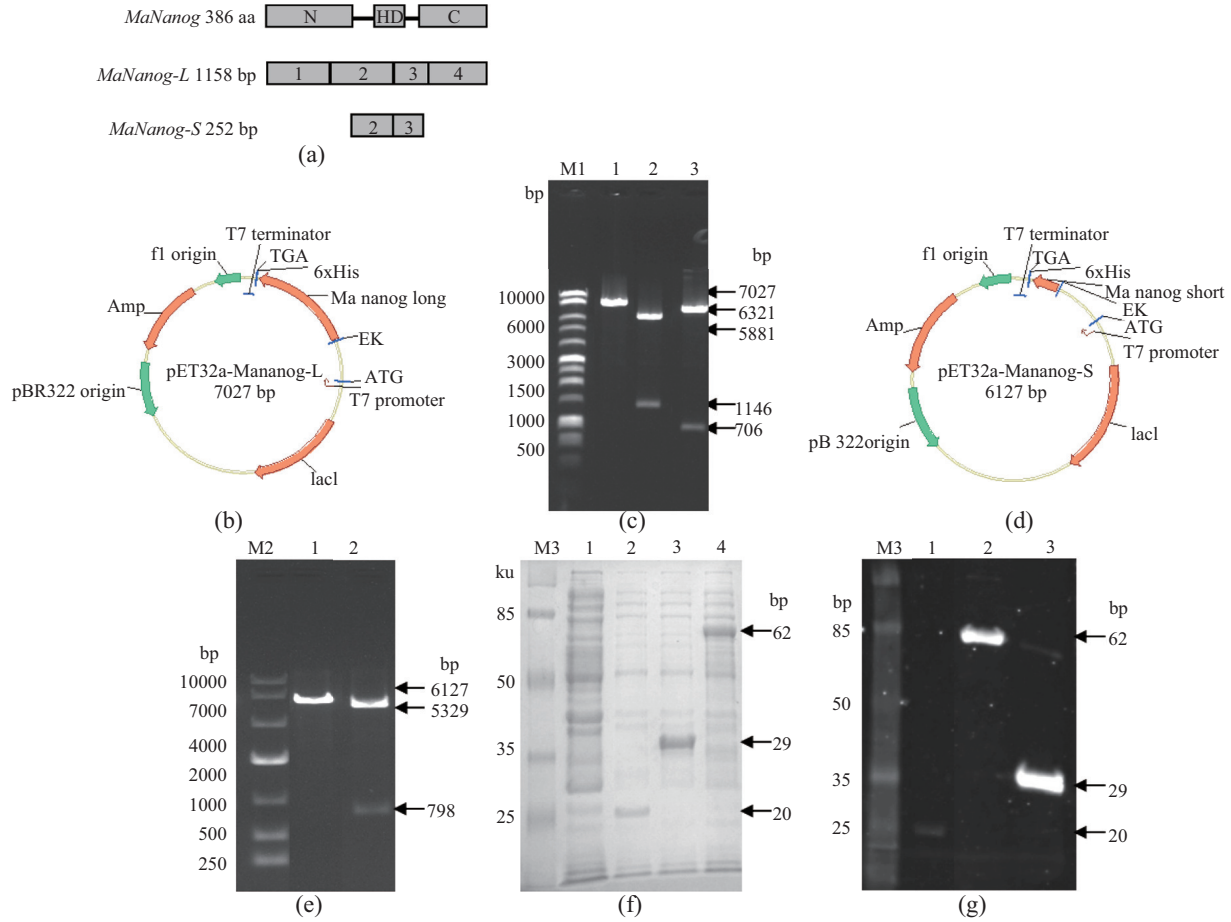


图 1 *MaNanog*原核表达载体构建及融合蛋白的表达与鉴定

(a) 目的片段 *MaNanog-L* 和 *MaNanog-S* 结构示意图; (b) pET32a-*MaNanog-L* 质粒图谱; (c) pET32a-*MaNanog-L* 质粒酶切鉴定, 1. *Not* I、2. *Eco*R I + *Hind*III、3. *Kpn* I; (d) pET32a-*MaNanog-S* 质粒图谱; (e) pET32a-*MaNanog-S* 质粒酶切鉴定, 1. *Not* I、2. *Xba* I + *Xho* I; (f) SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达, 1. 未诱导空白对照、2. pET32a 空载体对照、3. pET32a-*MaNanog-S*、4. pET32a-*MaNanog-L*; (g) Western blot 检测融合蛋白 His 标签的表达, 1. pET32a 空载体对照、2. pET32a-*MaNanog-L*、3. pET32a-*MaNanog-S*; M1. 1 kb DNA Marker、M2. DL 10 000 DNA Marker、M3. 预染蛋白 Marker

Fig. 1 Construction of *MaNanog* prokaryotic expression vector and the expression and identification of the fusion protein

(a) structural scheme of *MaNanog-L* and *MaNanog-S*; (b) map of pET32a-*MaNanog-L* vector; (c) identification of pET32a-*MaNanog-L* vector. 1. *Not* I, 2. *Eco*R I + *Hind*III, 3. *Kpn* I; (d) map of pET32a-*MaNanog-S* vector; (e) identification of pET32a-*MaNanog-S* vector, 1. *Not* I, 2. *Xba* I + *Xho* I; (f) detection of fusion protein expression by SDS-PAGE, 1. blank without IPTG, 2. pET32a, 3. pET32a-*MaNanog-S*, 4. pET32a-*MaNanog-L*; (g) detection of His tag expression by Western blot, 1. pET32a, 2. pET32a-*MaNanog-L*, 3. pET32a-*MaNanog-S*; M1. 1 kb DNA Marker, M2. DL 10 000 DNA Marker, M3. prestained protein Marker

条带(图5-d); 同时也观察到实验组细胞裂解液中 70 ku 条带下方均有微弱的非特异带出现, 说明细胞中存在非特异性蛋白; 此外, 稳定转染的 pLVX-*MaNanog* 及 pLVX-*MaNanog* 和 pLVX-*MaOct4* 细胞蛋白均有 42 ku 特异性条带, 符合预期 *Nanog* 蛋白的大小(图5-d), 同时 Actin 蛋白作为细胞的内参均能被其抗体检测(图5-e, 5-f)。因此, 以上结果均证明制备的 *Nanog* 多克隆抗体能够有效识别原核表达的 *Nanog* 蛋白、内源的 *Nanog* 蛋白和真核系统表达的 *Nanog* 蛋白, 可以用于后续研究中的蛋白检测。

### 3 讨论

*Nanog* 基因作为重要的干细胞主控基因, 在早期胚胎发育和干细胞的分化过程中有着极其重要的作用。迄今 *Nanog* 基因在鱼类干细胞和胚胎发育中的研究较少, 已鉴定的基因序列分析表明它的同源性较低, 因此跨物种的抗原蛋白不能被已知商业化的抗体进行识别。鱼类 *Nanog* 蛋白与抗体的研究更少, Camp 等<sup>[24]</sup> 制备了青鳉 *Nanog* 抗体并用于免疫组化实验, 但该抗体来源于一短肽段。用合成小肽免疫动物制备抗体的方法虽然简单, 却价格昂贵、产量较小、也易

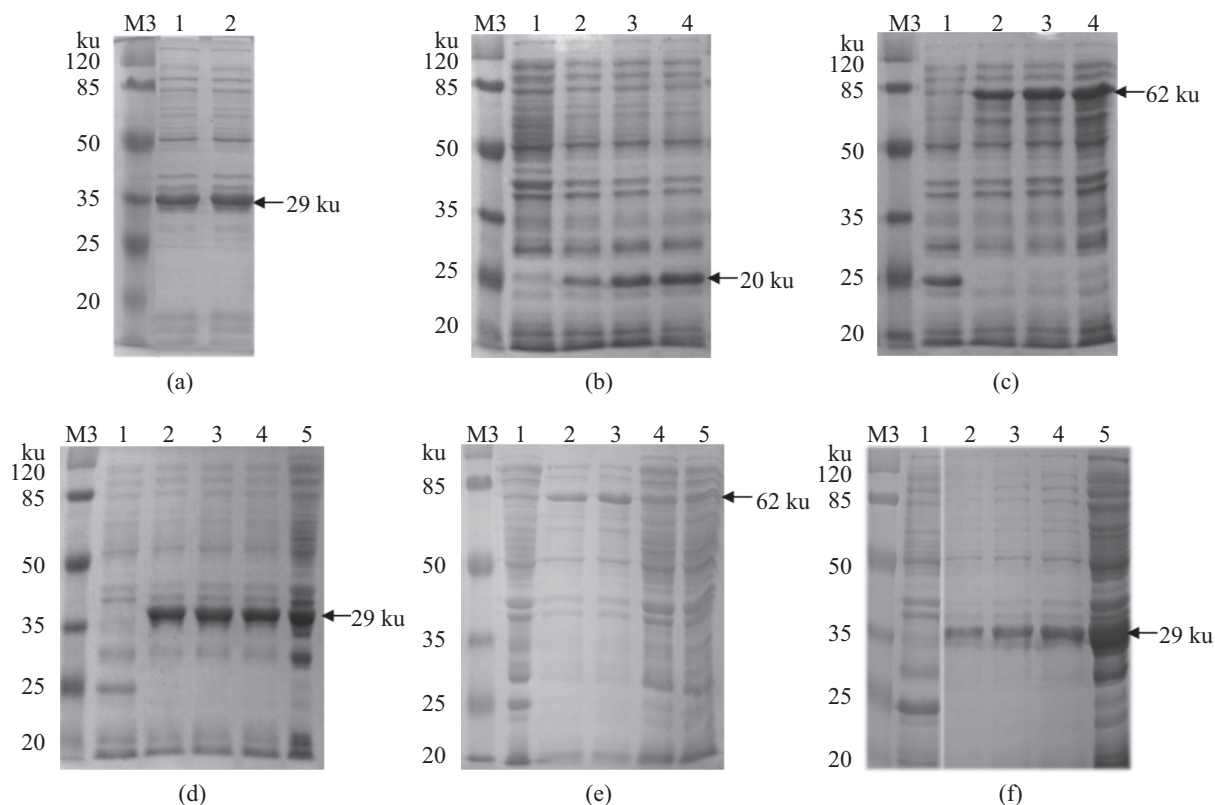


图2 不同诱导条件对His-Nanog融合蛋白表达的影响

(a) IPTG浓度对pET32a-MaNanog-S蛋白表达的影响, 1. 0.5 mmol/L、2. 1 mmol/L; (b) IPTG诱导时间对pET32a蛋白表达的影响, 1. 阴性对照、2~4. 诱导时间2、4、6 h; (c) IPTG诱导时间对pET32a-MaNanog-L蛋白表达的影响, 1. 空载体对照、2~4. 诱导时间2、4、6 h; (d) IPTG诱导时间对pET32a-MaNanog-S蛋白表达的影响, 1. 空载体对照、2~5. 诱导时间2、4、6、8 h; (e) 诱导前接菌浓度对pET32a-MaNanog-L蛋白表达的影响, 1. 空载体对照, 接菌浓度5%、2~5. 接菌浓度0.5%、1%、5%、10%; (f) 诱导前接菌浓度对pET32a-MaNanog-S蛋白表达的影响, 1. 空载体对照, 接菌浓度10%、2~5. 接菌浓度0.5%、1%、5%、10%, M3. 预染蛋白Marker

Fig. 2 His-Nanog fusion protein expression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS under different conditions

(a) pET32a-MaNanog-S protein expression in BL21 under different IPTG concentration condition, 1. 0.5 mmol/L, 2. 1 mmol/L; (b) pET32a protein expression under different induction time, 1. negative control, 2~4. expression of protein induced in 2, 4, 6 h; (c) pET32a-MaNanog-L protein expression under different induction time, 1. pET32a as control, 2~4. expression of protein induced in 2, 4, 6 h; (d) pET32a-MaNanog-S protein expression under different induction time, 1. pET32a as control, 2~4. expression of protein induced in 2, 4, 6, 8 h; (e) pET32a-MaNanog-L protein expression under different *E. coli* BL21 inoculation concentration before IPTG induction; 1. pET32a as control with *E. coli* BL21 inoculation concentration of 5%, 2~5. BL21 inoculation concentration of 0.5%, 1%, 5%, 10%; (f) pET32a-MaNanog-S protein expression, 1. pET32a as control with *E. coli* BL21 inoculation concentration of 10%, 2~5. BL21 inoculation concentration of 0.5%, 1%, 5%, 10%; M3. prestained protein Marker

产生非特异性<sup>[32]</sup>。此外, 特异性抗体是研究基因功能重要的工具之一, 而一些商业化的抗体往往重复性差, 难以达到实验所需的要求。本研究通过原核表达团头鲂Nanog蛋白, 制备了兔抗团头鲂Nanog多克隆抗体, 能够有效地检测原核表达、内源表达及真核表达的Nanog蛋白, 为团头鲂Nanog基因功能的研究提供了有力工具。

本实验采用原核表达系统, 并选用pET系列的原核表达载体, 获得了带有组氨酸标签的团头鲂Nanog蛋白。在选用大肠杆菌表达外源蛋白时, 蛋白表达量的高低受多种因素的影响, 如

表达载体的选择, 外源基因中密码子的使用, 宿主的选择及培养条件的控制等<sup>[33]</sup>。为得到大量融合蛋白制备抗体, 本实验也对原核表达条件进行了优化。由于IPTG诱导剂对细菌有毒性且价格较贵, 摸索IPTG的适宜浓度对于减少其对细菌生长的毒性、降低生产成本等均有重要意义。本实验结果表明, 2种IPTG诱导浓度下融合蛋白表达量无明显变化, 因此选用浓度较低的0.5 mmol/L作为后续实验的IPTG诱导浓度。随着诱导时间的增加, His-Nanog融合蛋白的表达量也增加, 4 h时接近最高表达量, 因此选择4 h作

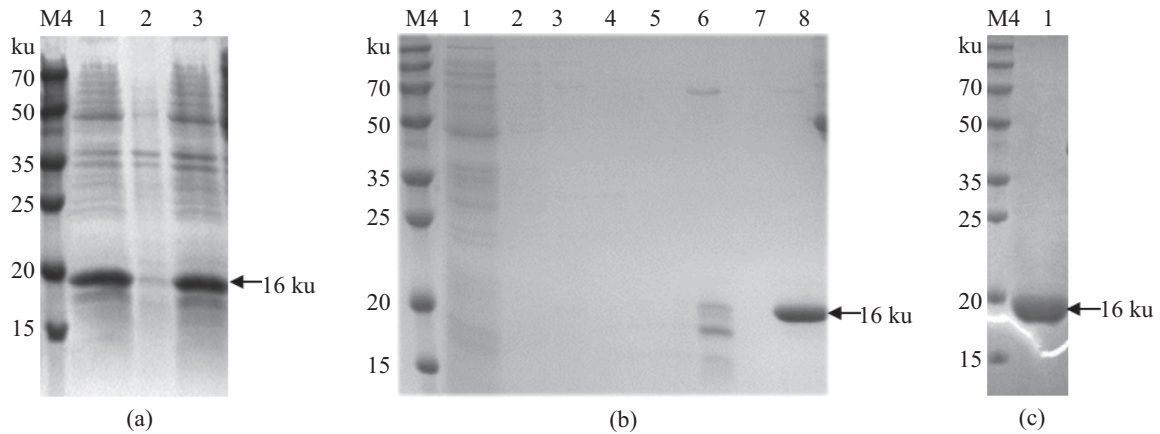


图 3 pET30a-MaNanog-S融合蛋白的表达形式与纯化

(a) pET30a-MaNanog-S融合蛋白的表达形式, 1. 全菌、2. 沉淀、3. 上清液; (b) SDS-PAGE检测pET30a-MaNanog-S融合蛋白的纯化效果, 1. 流穿液、2. 洗涤液、3~8. 20/40/80/200/400/500 mmol/L咪唑洗脱液; (c) SDS-PAGE检测pET30a-MaNanog-S融合蛋白的透析效果, 1. 透析后蛋白; M4. 预染蛋白Marker

Fig. 3 The type and purification of pET30a-MaNanog-S fusion protein

(a) the type of pET30a-MaNanog-S fusion protein, 1. total protein, 2. precipitate, 3. supernatant; (b) the purification detection of pET30a-MaNanog-S fusion protein by SDS-PAGE, 1. flow-through, 2. washing buffer, 3-8. elution buffer with 20/40/80/200/400/500 mmol/L imidazole; (c) the dialysis detection of pET30a-MaNanog-S fusion protein by SDS-PAGE, 1. the protein after dialysis, M4. prestained protein Marker

表 2 ELISA检测Nanog抗体效价

Tab. 2 ELISA analysis of Nanog antibody

稀释倍数	dilution	OD值	optical density
1 : 100		2.306	
1 : 1000		2.579	
1 : 3000		2.795	
1 : 9000		2.493	
1 : 27 000		2.633	
1 : 81 000		1.775	
1 : 243 000		0.999	
空白	blank	0.228	

为优化的诱导时间。诱导前接种菌液浓度关系到诱导时机, 对蛋白表达量影响较大。一般报道细菌在对数生长期即 $A_{600\text{ nm}}=0.6$ 附近时生长状态良好易于诱导合成外源蛋白<sup>[33]</sup>。提前诱导菌体太早外源蛋白产量低, 而诱导太迟菌体过老也不利于蛋白的表达。本实验中发现以不同接菌浓度进行IPTG诱导对蛋白表达量影响明显, 其中pET32a-MaNanog-L在1%、pET32a-MaNanog-S在5%接菌比例下培养2 h后进行蛋白诱导表达状况最佳, 而此时它们的 $A_{600\text{ nm}}$ 值均远小于常见的0.6, 这可能与细菌的种类、培养基中混浊物质成分等相关。

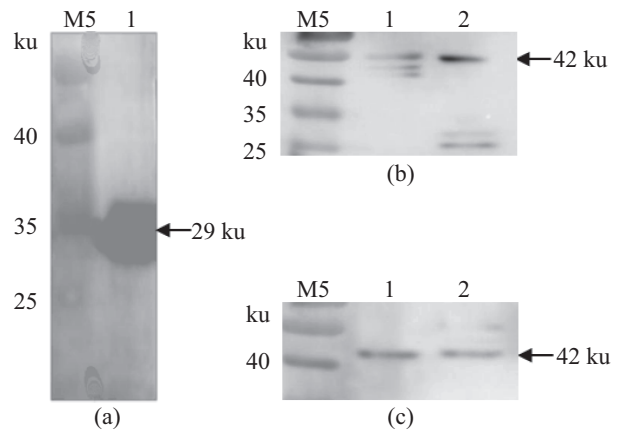


图 4 多克隆抗体特异性检测

(a) 原核诱导表达菌体蛋白检测, 1. MaNanog多克隆抗体识别 pET32a-MaNanog-S原核表达菌体蛋白; (b) 团头鲂肝脏和精巢组织蛋白检测, 1. 肝脏、2. 精巢; (c) Actin抗体作内参, 1~2顺序同上; M5. 预染蛋白Marker

Fig. 4 Specificity detection of the polyclonal antibody

(a) specificity detection using protein expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS, 1. detection of pET32a-MaNanog-S protein expressed in BL21 with the MaNanog antibody; (b) specificity detection using the liver and testis protein of Ma with the MaNanog antibody, 1. liver protein, 2. testis protein; (c) the Actin antibody as the internal control, M5. prestained protein Marker

胞内表达的重组蛋白, 在细胞质中或以可溶的形式存在, 或聚集成不溶的包涵体, 或同时以可溶和包涵体两种形式存在<sup>[34]</sup>。实验中将所得pET32a-MaNanog蛋白进行表达形式分析, 结

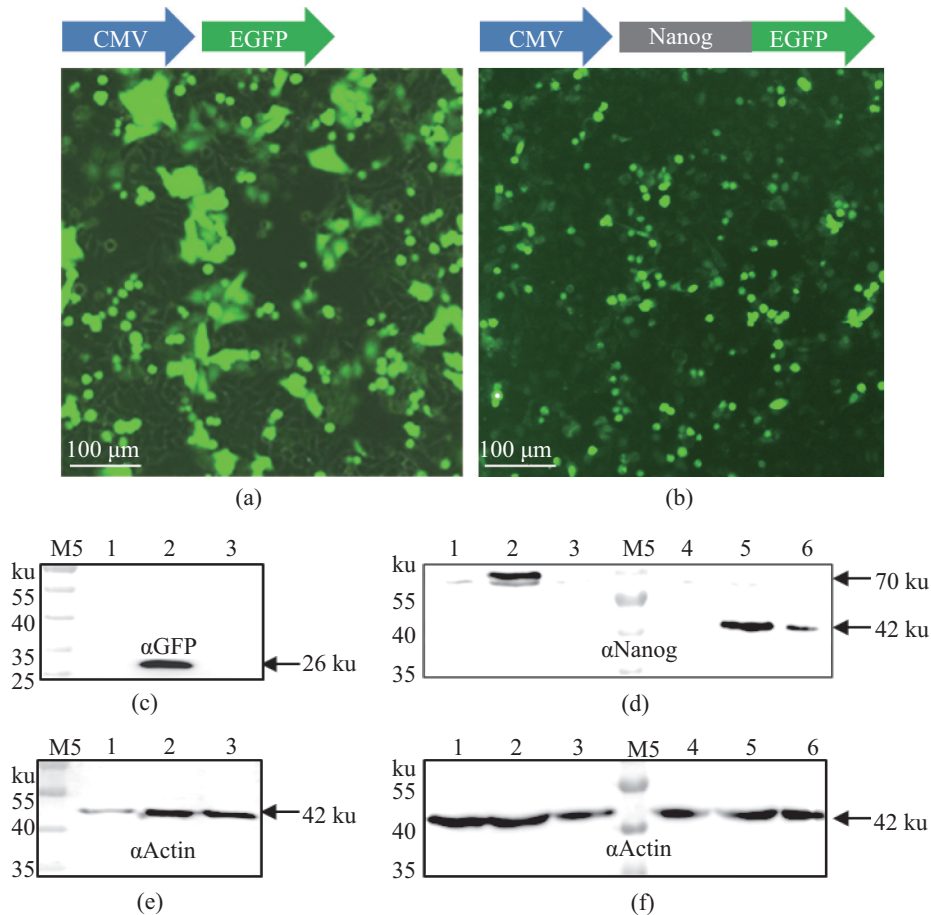


图 5 多克隆抗体应用于转染细胞蛋白检测

(a) pEGFP-N1质粒转染HepG2细胞后表达绿色荧光图像；(b) pEGFP-N1-MaNanog质粒转染HepG2细胞后表达绿色荧光图像；(c) GFP抗体识别HepG2细胞蛋白，1.未转染对照、2.pEGFP-N1、3.pEGFP-N1-MaNanog；(d) Nanog多克隆抗体识别HepG2细胞蛋白，1.pEGFP-N1、2.pEGFP-N1-MaNanog、3.未转染对照、4.pLVX-Puro、5.pLVX-MaNanog、6.pLVX-MaNanog+pLVX-MaOct4；(e-f) Actin抗体作内参；M5.预染蛋白Marker

Fig. 5 Detection of protein from transfected cells using the polyclonal antibody

(a) the merge image of HepG2 after being transfected with pEGFP-N1; (b) the merge image of HepG2 after being transfected with pEGFP-N1-MaNanog; (c) HepG2 protein detection using GFP antibody, 1. control, 2. pEGFP-N1, 3. pEGFP-N1-MaNanog; (d) HepG2 protein detection using the MaNanog polyclonal antibody, 1. pEGFP-N1, 2. pEGFP-N1-MaNanog, 3. control, 4. pLVX-Puro, 5. pLVX-MaNanog, 6. pLVX-MaNanog+pLVX-MaOct4; (e-f) Actin antibody as the internal control; M5. prestained protein Marker

果显示其主要存在于上清液中，pET30a-MaNanog亦主要以上清液形式存在，而小鼠pGEX-KG-Nanog则以包涵体形式存在<sup>[19]</sup>，猪pET32a-Nanog也以包涵体形式表达<sup>[23]</sup>，这可能与目的蛋白的理化特性及大肠杆菌的细胞质原核表达环境条件等有关。后续蛋白分离纯化过程中，采用pET32a表达的Nanog蛋白不能利用Ni柱分离，而采用pET30a表达的Nanog蛋白却能有效回收，它们都属于pET系列带有His标签的表达载体，但是纯化的效果差异很大，这说明了不同的表达载体对于同一蛋白的纯化可能有影响，更换表达载体利于蛋白的提纯。

实验也证实了获得的抗体能识别原核表达

的和组织内源表达的Nanog蛋白。应用制备的多克隆抗体与原核表达诱导的菌体蛋白进行免疫印迹，在约29 ku处出现了一条明显的目的条带，表明其特异性识别原核表达的Nanog菌体蛋白；团头鲂肝脏和精巢组织蛋白实验检测到了理论大小的目的条带，而非特异性条带可能是由于Nanog异构体或假基因存在亦被抗体识别所致<sup>[35]</sup>，或者提取液中含有免疫原区段类似的其他蛋白，结果说明兔抗Nanog多克隆抗体可识别组织中内源表达的Nanog蛋白。在诸多的文献中，同一抗原获得的抗体在不同的实验室或者不同厂家之间存在重复性差和非特异性效应，这也可能是内源表达的蛋白多存在不同的剪接体而



产生大小不一的目的条带。在本实验中还建立了单独和融合表达*Nanog*基因的细胞系, 用*Nanog*多抗检测到融合表达蛋白约70 ku的预期条带和单独转染*Nanog*后约为42 ku的目的条带, 表明该抗体能有效地识别外源表达的*Nanog*蛋白。此外, GFP抗体仅在转染空载体的细胞中检测到26 ku的EGFP蛋白, 而*Nanog*与EGFP融合转染细胞中未检测到EGFP融合蛋白。在本团队的其他实验中也有类似现象出现, 即当构建的融合蛋白表达载体目的基因与EGFP的N端相连时, GFP抗体检测不出EGFP蛋白表达, 而融合部位在C端时可被检测, 其具体原因尚不得而知。

综上所述, 本研究成功构建了团头鲂*Nanog*的原核表达载体, 优化了其蛋白表达条件, 获得了纯化的抗原, 制备了能特异性识别原核表达和真核表达*Nanog*蛋白的多克隆抗体, 为后期深入研究鱼类*Nanog*的功能奠定了基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Chambers I, Colby D, Robertson M, *et al.* Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2003, 113(5): 643-655.
- [ 2 ] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, *et al.* The homeoprotein *Nanog* is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells[J]. *Cell*, 2003, 113(5): 631-642.
- [ 3 ] Das S, Jena S, Levasseur D N. Alternative splicing produces *Nanog* protein variants with different capacities for self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(49): 42690-42703.
- [ 4 ] Theunissen T W, Silva J C R. Switching on pluripotency: a perspective on the biological requirement of *Nanog*[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2011, 366(1575): 2222-2229.
- [ 5 ] Theunissen T W, Costa Y, Radziskeuskaya A, *et al.* Reprogramming capacity of *Nanog* is functionally conserved in vertebrates and resides in a unique homeodomain[J]. *Development*, 2011, 138(22): 4853-4865.
- [ 6 ] Jauch R, Ng C K L, Saikatendu K S, *et al.* Crystal structure and DNA binding of the homeodomain of the stem cell transcription factor *Nanog*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 376(3): 758-770.
- [ 7 ] Tian J, Chng S C, Ong J, *et al.* Cloning and functional study of *Nanog* in zebrafish[J]. *Developmental Biology*, 2011, 356(1): 234.
- [ 8 ] Wang S H, Tsai M S, Chiang M F, *et al.* A novel NK-type homeobox gene, *ENK* (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells[J]. *Gene Expression Patterns*, 2003, 3(1): 99-103.
- [ 9 ] Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, *et al.* *Nanog* expression in mouse germ cell development[J]. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5(5): 639-646.
- [ 10 ] Yasuda S Y, Tsuneyoshi N, Sumi T, *et al.* *NANOG* maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer[J]. *Genes to Cells*, 2006, 11(9): 1115-1123.
- [ 11 ] Wu D Y, Yao Z. Isolation and characterization of the murine *Nanog* gene promoter[J]. *Cell Research*, 2005, 15(5): 317-324.
- [ 12 ] Schuff M, Siegel D, Philipp M, *et al.* Characterization of *Danio rerio Nanog* and functional comparison to *Xenopus Vents*[J]. *Stem Cells and Development*, 2012, 21(8): 1225-1238.
- [ 13 ] Darr H, Maysar Y, Benvenisty N. Overexpression of *NANOG* in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features[J]. *Development*, 2006, 133(6): 1193-1201.
- [ 14 ] Silva J, Nichols J, Theunissen T W, *et al.* *Nanog* is the gateway to the pluripotent ground state[J]. *Cell*, 2009, 138(4): 722-737.
- [ 15 ] Cavaleri F, Schöler H R. *Nanog*: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra[J]. *Cell*, 2003, 113(5): 551-552.
- [ 16 ] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [ 17 ] Ezech U I, Turek P J, Reijo R A, *et al.* Human embryonic stem cell genes *OCT4*, *NANOG*, *STELLAR*, and *GDF3* are expressed in both seminoma and breast carcinoma[J]. *Cancer*, 2005, 104(10): 2255-2265.
- [ 18 ] 林艳丽, 曹立雪, 吴晓洁, 等. 小鼠*Nanog*基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2005(S1): 257-259.
- [ 19 ] 李军. *Nanog*基因的原核表达、蛋白纯化及抗体制备[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- Li J. Prokaryotic expression, purification of *Nanog* gene

- and preparation of antibody[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2007 (in Chinese).
- [20] 郑喜邦. 稳定表达牛Nanog基因的成纤维细胞制作、多能性分析及转基因克隆胚胎构建[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- Zheng X B. Preparation of stably Nanog-expressing fibroblast cells, analysis of their pluripotency and construction of transgenic cloned embryos[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2008 (in Chinese).
- [21] 张经余, 王爱娥, 李美香, 等. 人NANOGP8蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(3): 30-35.
- Zhang J Y, Wang A E, Li M X, *et al.* Prokaryotic expression and preparation of polyclonal antibody of human NANOGP8[J]. *China Biotechnology*, 2009, 29(3): 30-35(in Chinese).
- [22] Zheng X B, Cen X M, Wang L X, *et al.* Cloning, expression and purification of Nanog protein from *Capra hircus* in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2013, 12(2): 201-207.
- [23] 王传振, 刘晓鹏, 崔怡, 等. 猪转录因子Nanog高效表达、多克隆抗体制备及其应用[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(1): 35-43.
- Wang C Z, Liu X P, Cui Y, *et al.* High level expression, preparation and application of Anti-Nanog polyclonal antibody of porcine (*Sus scrofa*) Nanog protein[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(1): 35-43(in Chinese).
- [24] Camp E, Sánchez-Sánchez A V, García-España A, *et al.* Nanog regulates proliferation during early fish development[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(9): 2081-2091.
- [25] 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 (in Chinese).
- [26] 高泽霞, 王卫民, 蒋恩明, 等. 团头鲂种质资源及遗传改良研究进展[J]. 华中农业大学, 2014, 33(3): 138-144.
- Gao Z X, Wang W M, Jiang E M, *et al.* Research advances on germplasm resources and genetic improvement of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(3): 138-144(in Chinese).
- [27] Zou S M, Li S F, Cai W Q, *et al.* Establishment of fertile tetraploid population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1-4): 155-164.
- [28] 罗伟. 团头鲂EST-SSR的开发及在育种中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- Luo W. EST-SSR markers development and application in selective breeding of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [29] Li X F, Liu W B, Jiang Y Y, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels in practical diets on growth performance and body composition of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings[J]. *Aquaculture*, 2010, 303(1-4): 65-70.
- [30] Nielsen M E, Høi L, Schmidt A S, *et al.* Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China?[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 46(1): 23-29.
- [31] Huang C X, Wei X L, Chen N, *et al.* Growth differentiation factor 9 of *megalobrama amblycephala*: molecular characterization and expression analysis during the development of early embryos and growing ovaries[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(1): 193-203.
- [32] 许国双, 陈香美, 孙雪峰, 等. 小鼠抗人Nanog多克隆抗体的制备及其鉴定[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(5): 413-415.
- Xu G S, Chen X M, Sun X F, *et al.* Preparation and identification of mouse polyclonal antibody against human Nanog[J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2006, 31(5): 413-415(in Chinese).
- [33] 隋广超, 胡美浩. 影响大肠杆菌中外源基因表达的因素[J]. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21(2): 128-132.
- Sui G C, Hu M H. Factors influencing the expression of foreign genes in *E. coli*[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1994, 21(2): 128-132(in Chinese).
- [34] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, 9(5): 497-501.
- [35] Booth H A F, Holland P W H. Eleven daughters of *NANOG*[J]. *Genomics*, 2004, 84(2): 229-238.

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

YU Miao<sup>1,2</sup>, FANG Jian<sup>1</sup>, LI Lingyu<sup>1</sup>, XUE Ting<sup>1</sup>, CHEN Tiansheng<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, College of Fishery, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** To investigate the function of the pluripotency transcription factor *Nanog* in fish, this study examined the prokaryotic expression of the recombinant *Nanog* protein and generation of the rabbit anti-*Nanog* polyclonal antibody in blunt-snout bream. Firstly, *MaNanog* coding sequence was obtained from the ovary organ, and the full-length open reading frame or the partial fragment containing the homeodomain was inserted into the pET32a vector, respectively. Then the vectors were transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, and the recombinant *Nanog* proteins were induced by IPTG. After optimization of expression conditions, the *MaNanog*-S protein was induced on a large scale and applied to antibody generation. Subsequently, the specificity of the antibody was examined by ELISA and Western blot. Results showed that the recombinant *Nanog* protein was highly expressed with 0.5 mmol/L IPTG induction for 4 h at 37 °C. The polyclonal antibody could identify effectively the induced *Nanog* protein in *E. coli*, the endogenous *MaNanog* protein in adult organs, and the ectopic expressed *MaNanog* proteins in HepG2. Taken together, these results provided the research methods for prokaryotic expression of protein and preparation of specific antibodies, and also provided an effective tool to investigate the function of *Nanog* gene in fish.

**Key words:** *Megalobrama amblycephala*; *Nanog*; prokaryotic expression; polyclonal antibody; stem cell

**Corresponding author:** CHEN Tiansheng. E-mail: tiansheng.chen@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** National Key Basic Research Program of China (2013CB967700); Huazhong Agricultural University Scientific & Technological Self-innovation Foundation (2013RC014, 2662015PY049); the Natural Science Foundation of Henan Province (102300410104); the Youth Science Fund Project of Henan Normal University (2013qk15); the Key Subjects of Fishery in Henan Province