黄河鲤*oct4*基因的克隆、表达与定位分析

刚会会，王方圆，孔娅静，于淼*

（河南师范大学水产学院，水产动物增殖和养殖工程技术科研团队，河南新乡 453007）

前言

八聚体结合转录因子4（Octamer-binding transcription factor 4, Oct4）是最重要的维持胚胎干细胞多潜能性和自我更新的关键转录因子之一，参与动物早期胚胎发育、体细胞重编程等多个过程，但该基因在鱼类中的表达与功能有待深入探索。本研究通过PCR获得黄河鲤*oct4*基因ORF序列，qRT-PCR分析其时空表达模式，并分别利用WISH和IHC方法进一步检测该基因在胚胎与卵巢中的亚细胞定位情况，以期为研究*oct4*基因在黄河鲤早期胚胎与性腺发育过程中的作用提供参考。

材料与方法

实验用鱼：黄河鲤（*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel）

实验方法：聚合酶链式反应（PCR）

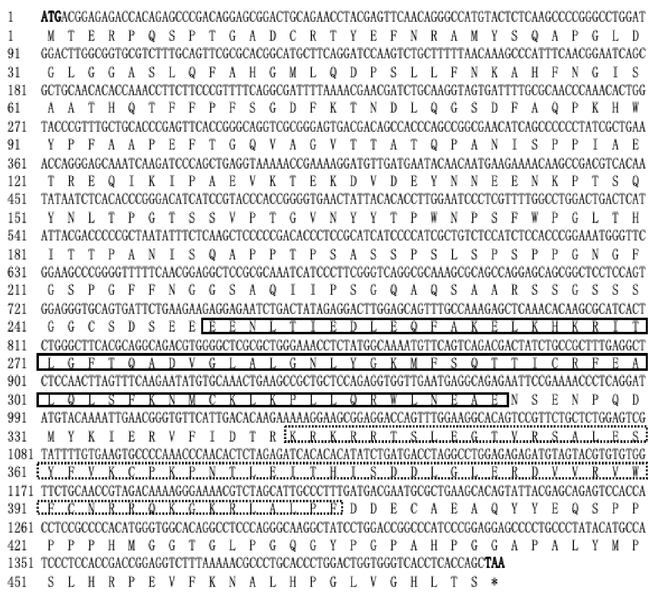
实时荧光定量PCR （qRT-PCR）

整胚原位杂交（WISH）

免疫组织化学（IHC）

结果

1. 黄河鲤*oct4*基因序列



（大写字母：ORF；单个大写字母：蛋白；起始密码子：ATG加粗，终止密码子：TAA加粗；POUS亚结构域用黑框表示，POUHD亚结构域用黑色虚线框表示）

图1 黄河鲤*oct4*基因的核苷酸与氨基酸序列

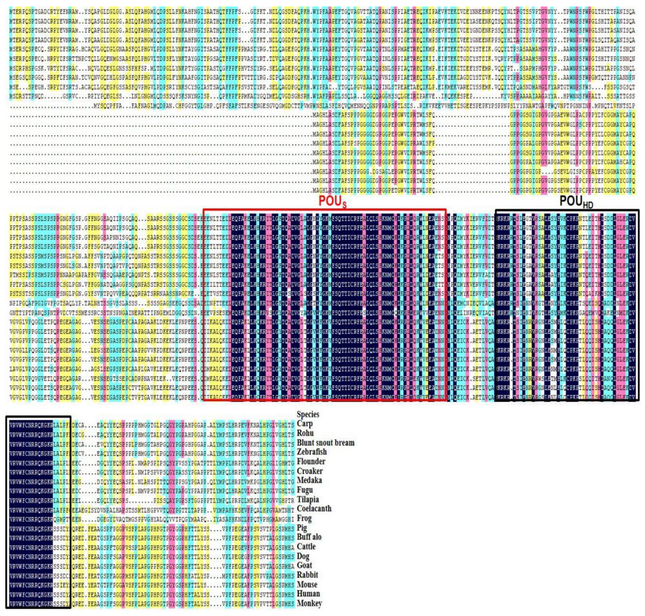


图2 Oct4同源蛋白的氨基酸多序列比对

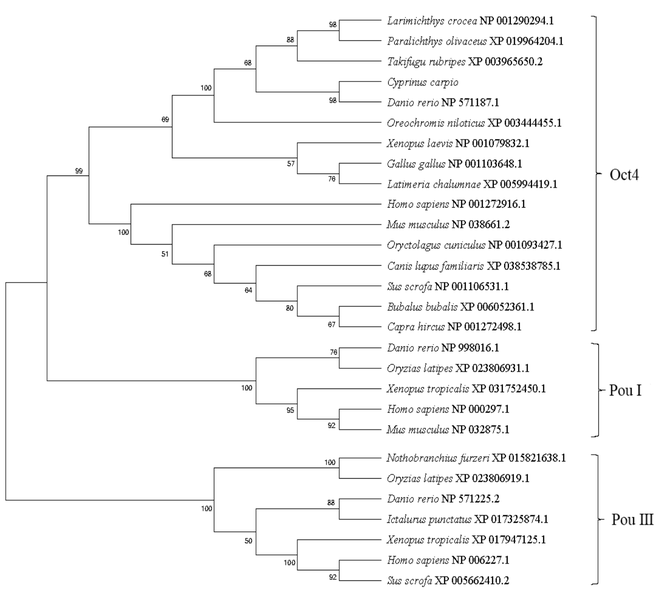
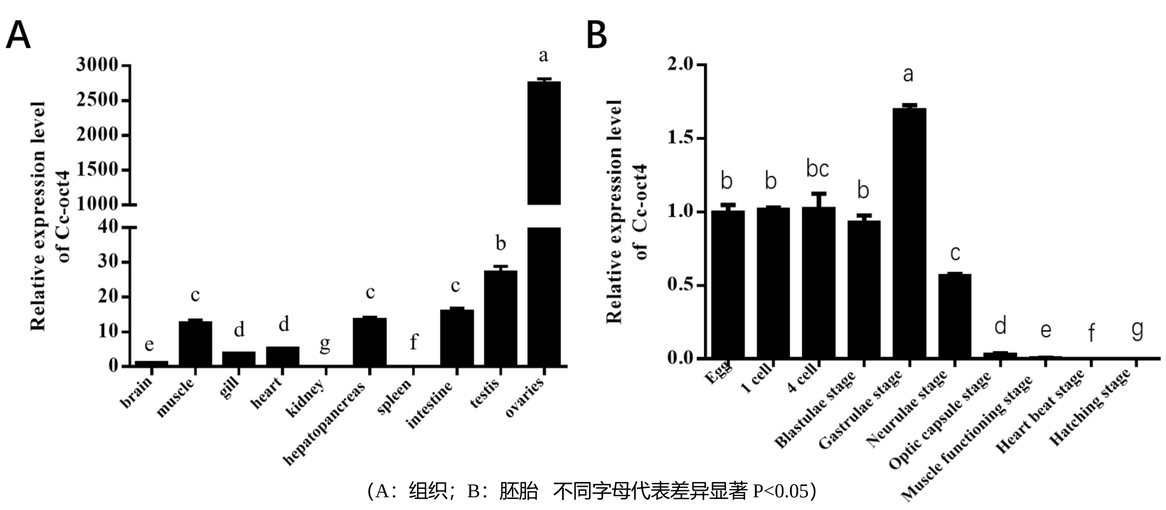


图3 Oct4蛋白的系统进化树

- 黄河鲤*oct4*基因ORF为1419 bp，编码472个氨基酸残基（图1）；Oct4蛋白属于POU家族第V亚族，包含POU_S亚结构域（位置249-323 aa）和POU_{HD}亚结构域（位置343-405 aa）（图2）；同斑马鱼的亲缘关系最近，与作为外类群的PouI和PouIII亚组蛋白拥有明显不同的分支（图3）。

2.黄河鲤*oct4*基因的时空表达

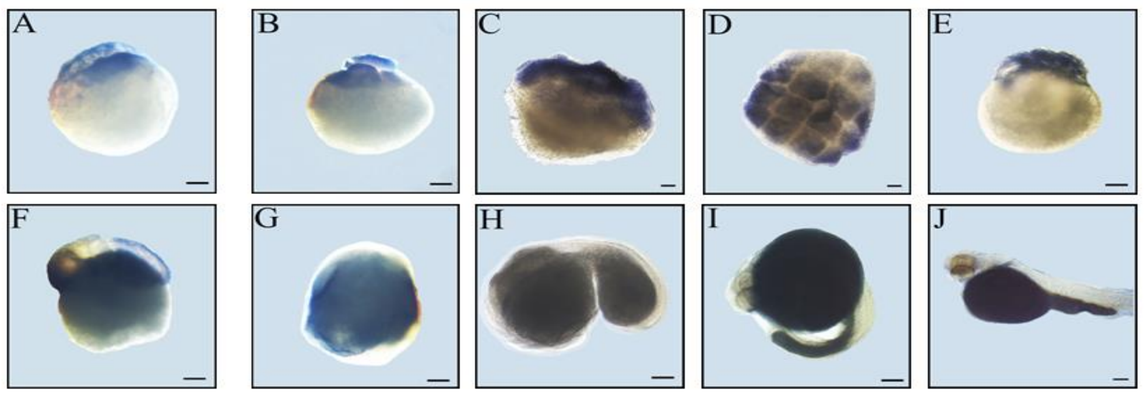


（A：组织；B：胚胎 不同字母代表差异显著 P<0.05）

图4 *oct4*基因在黄河鲤不同组织中以及不同发育期胚胎中的相对表达量

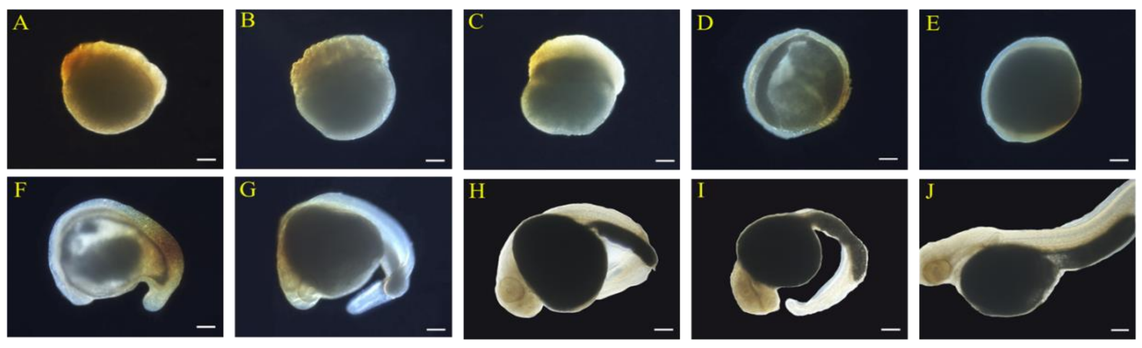
- 在组织中，*oct4* 基因在性腺特别是卵巢中的表达量最高，在脑、肌肉、鳃、心脏、肝胰腺和肠中也有表达，而在肾和脾中几乎不表达（图4A）；
- 在胚胎中，*oct4*基因在卵子、早期胚胎的1细胞期至神经胚期均有表达，其中原肠胚期表达量最高，而在眼囊期低表达，之后几乎不表达（图4B）。

3.黄河鲤*oct4*基因在胚胎与卵巢中的亚细胞定位



（A：2细胞期；B： 4细胞期；C：16细胞期1；D：16细胞期2；E：多细胞期； F：原肠胚期；G：神经胚期；H：尾芽期；I：心跳期；J：出膜期。蓝紫色示oct4 mRNA阳性信号；标尺=200 μm）

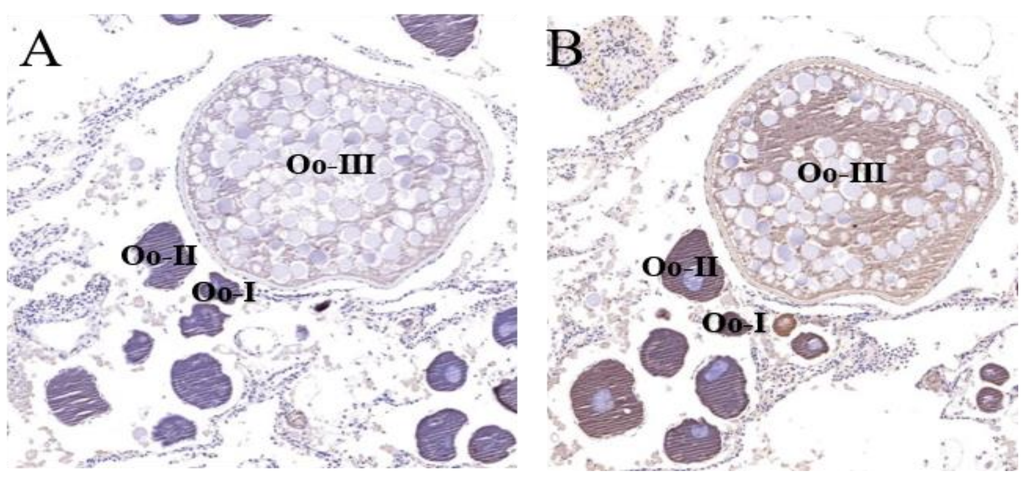
图5 *oct4*基因在黄河鲤胚胎不同发育阶段表达的检测结果



（A：32细胞期；B：多细胞期；C：囊胚期；D：神经胚期；E：胚孔封闭期； F：尾芽期；G：肌肉效应期； H：心跳期；I：出膜前期；J：出膜期；标尺=200 μm）

图6 *oct4*基因在黄河鲤胚胎不同发育阶段表达的阴性对照检测结果

- 在胚胎中，蓝紫色的*oct4*基因阳性信号在2细胞期至神经胚期胚胎中均有表达（图5A-G），且阳性信号分布于各期细胞分裂球中，而之后的尾芽期、心跳期和出膜期均未检测到阳性信号（图5H-J）；在对照组中（正义探针），各发育期胚胎中均无明显的阳性信号（图6A-J）。这表明在黄河鲤胚胎中，*oct4*基因主要表达于胚胎早期发育阶段。



（A：对照组；B：处理组，棕色示Oct4蛋白在黄河鲤卵巢中的表达与分布；Oo-I：I期初级卵母细胞；Oo-II：II期初级卵母细胞； Oo-III：III期初级卵母细胞）

图7 Oct4蛋白在黄河鲤卵巢中的表达情况

- 在卵巢中，Oct4蛋白主要分布在I期、II期和III期卵母细胞的细胞质中，且随着卵母细胞的发育其表达量逐渐下降（图7）。

结论

- 上述结果表明：黄河鲤*oct4*基因主要在胚胎早期发育阶段和性腺特别是卵巢中表达，并在其中发挥一定作用。