

文章编号 1006-8147(2022)06-0598-04

论著

Smarcad1 重组蛋白表达及多克隆抗体验证

秦万昌, 黄书奇, 胡德庆

(天津医科大学基础医学院细胞生物学系, 天津 300070)

摘要 目的:建立稳定的实验室多克隆抗体制备流程,选择 Smarcad1 作为目的基因进行重组蛋白表达纯化与多克隆抗体制备,并对其进行特异性验证。**方法:**以本实验室的 pcDNA3.1-Flag-Smarcad1 质粒作为模板,构建 pET-16b-Smarcad1-F1 原核表达质粒。表达 Smarcad1-F1 蛋白,并纯化。利用蛋白质免疫印迹,蛋白质免疫共沉淀和免疫荧光实验检测抗体特异性。**结果:**PCR 鉴定结果显示,成功构建 pET-16b-Smarcad1-F1 表达质粒。蛋白表达纯化实验中,考马斯亮蓝染色检测,相较于诱导前,加入 IPTG 后 Smarcad1 蛋白成功诱导表达,且纯化出分子量为 27 kD 的目的蛋白。Western 印迹证明,制备的抗体能够特异性识别内源性 Smarcad1 蛋白。蛋白质免疫共沉淀实验显示,相较于对照组,制备的抗体能够与 Smarcad1 蛋白结合。免疫荧光实验检测所制备抗体的特异性,结果显示制备的抗体可以特异性识别内源性 Smarcad1 蛋白。**结论:**成功构建了 Smarcad1 原核表达质粒,利用原核蛋白表达纯化出 Smarcad1 蛋白,利用该蛋白制备的抗体可以特异性识别内源性 Smarcad1 蛋白,为后续原核表达蛋白及多克隆抗体制备提供思路。

关键词 基因克隆;原核蛋白表达与纯化;多克隆抗体制备

中图分类号 R3

文献标志码 A

Expression and polyclonal antibody verification of Smarcad1 recombinant protein

QIN Wan-chang, HUANG Shu-qi, HU De-qing

(Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To establish a stable laboratory polyclonal antibody preparation process, to select Smarcad1 as the target gene for recombinant protein expression purification and polyclonal antibody preparation, and to verify its specificity. **Methods:** The pcDNA3.1-Flag-Smarcad1 plasmid in our laboratory was used as the template to construct the pET-16b-Smarcad1-F1 prokaryotic expression plasmid. Smarcad1-F1 protein was expressed and purified. Antibody specificity was detected using Western blotting, protein co-immunoprecipitation and immunofluorescence experiments. **Results:** PCR identification results showed that the pET-16b-Smarcad1-F1 expression plasmid was successfully constructed. In the protein expression purification experiment, Coomassie brilliant blue staining showed that compared with before induction, the Smarcad1 protein was successfully induced to express after adding IPTG, and the target protein with a molecular weight of 27 kD was purified. Western blotting proved that the prepared antibody could specifically recognize the endogenous Smarcad1 protein. The protein co-immunoprecipitation experiment showed that, compared with the control group, the prepared antibody could bind to the Smarcad1 protein. The specificity of the prepared antibody was detected by immunofluorescence experiments, and the results showed that the prepared antibody could specifically recognize the endogenous Smarcad1 protein. **Conclusion:** The Smarcad1 prokaryotic expression plasmid is successfully constructed, and the Smarcad1 protein is purified by prokaryotic protein expression. The antibody prepared from this protein can specifically recognize the endogenous Smarcad1 protein, which provides ideas for the subsequent prokaryotic expression protein and polyclonal antibody preparation.

Key words gene cloning; prokaryotic protein expression and purification; polyclonal antibody preparation

染色质重塑复合物可以通过水解 ATP 释放能量,使组蛋白与 DNA 之间的构象发生改变,从而使暴露的 DNA 处于可以被结合的状态,达到调控基因表达的作用^[1]。现已知共有 4 种染色质重塑复合物,分别为交换型转换缺陷和蔗糖不发酵型(yeast mating type switch/sucrose non-fermentable, SWI/SNF)染色质重塑复合物、模拟开关型(imitation

switch, ISWI)染色质重塑复合物、解旋酶 DNA 结合型(chromodomain helicase DNA-binding, CHD)染色质重塑复合物、拟南芥型染色质重塑复合物(inositol auxotrophy, INO80)^[2]。Smarcad1 属于 SWI/SNF 家族,其可以通过水解 ATP 释放能量发挥染色质重塑的作用^[3]。有报道指出, Smarcad1 包含有一个 ATP 结合结构域以及双核定位信号^[4-5]。因此在 DNA 复制过程中, Smarcad1 能够维持染色质沉默状态^[6],在胚胎的早期发育中,其通过调节不同组蛋白修饰来维持胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)多能性^[7]。获

基金项目 国家自然科学基金(31872825)

作者简介 秦万昌(1992-),男,硕士在读,研究方向:医学细胞生物学;通信作者:胡德庆, E-mail: hudq@tmu.edu.cn。

得较高纯度以及较大蛋白量的 Smarcad1 是对其生物学性质进行深入研究的关键。由于原核表达系统具有表达水平高、培养周期短、操作简单、抗污染能力强、经济性高等特点,因此是实验室蛋白质表达优先选择的表达系统。所制备的高质量蛋白能够被应用于多个方面,其中利用蛋白免疫动物制备特异性多克隆抗体能够很大程度上保证实验的可重复性。因此本文旨在通过构建原核表达质粒后使用原核系统对 Smarcad1 蛋白进行体外表达、分离与纯化,为 Smarcad1 蛋白相关的生物化学实验提供足量的高质量蛋白质,并利用此蛋白制备多克隆抗体,从而为揭示 Smarcad1 在早期胚胎发育过程中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 Rosetta 感受态、DH5 α 感受态、pcDNA3.1-Flag-Smarcad1 质粒、pET16b 质粒为本实验室所保存。T4 连接酶购买自 TransGen 公司,质粒小提试剂盒购自 Vazyme 公司。Nde I 限制性内切酶、XhoI 限制性内切酶以及 Western 印迹显色试剂盒均购自 Thermo 公司。胶回收试剂盒购自 Vazyme 公司。鼠源、兔源 IgG 二抗购自 Santa Cruz biotechnology。序列合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。氯化钠、酵母粉、蛋白胨均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。Ni-NTA 购自 BBI 公司。考马斯 R250 购自索莱宝公司。抗体制备由武汉爱博泰克生物科技有限公司完成。293T、B16、V6.5 细胞均为本实验室所保存,用于检测 Smarcad1 抗体在不同细胞系中的结合目的蛋白能力。

1.2 方法

1.2.1 构建重组表达质粒 确定合适的 Smarcad1 片段作为抗原片段,根据抗原预测选择 Smarcad1 的第 1 至 132 位氨基酸为目的片段,设计引物,上游引物:5'-GGAATTCATATGATGAATCTTTTCAACT-TGGA-3',下游引物:5'-AAACTCGAGTCAGGATTC-TTCATCTTCAGATG-3',使用 pcDNA3.1-Flag-Smarcad1 质粒作为模板进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR),产生一条约 400 bp 的目的条带,将此条带进行胶回收,使用 Nde I、XhoI 对胶回收产物进行双酶切,对双酶切产物进行纯化回收。同时,使用 Nde I、XhoI 对 pET-16b 载体进行双酶切,得到酶切产物后进行胶回收。将所得胶回收产物与酶切产物进行连接转化至 DH5 α 感受态,37 $^{\circ}$ C 孵育过夜,待单克隆菌落形成后,挑菌至空 LB 培养基进行菌落 PCR,鉴定出阳性菌液后,进行质粒小提,将所提质粒进行测序得到 pET-16b-

Smarcad1-F1 质粒。

1.2.2 重组蛋白的原核表达与纯化 选择 Rosetta 感受态作为表达菌株,将 pET-16b-Smarcad1-F1 转化至 Rosetta,待单克隆菌落形成后,挑菌至 LB AMP+ 摇床中培养,37 $^{\circ}$ C,220 r/min,7 h,菌液浑浊后,将菌液接种至 500 mL LB AMP+ 摇床中培养,220 r/min,37 $^{\circ}$ C,4 h,取 1 mL 菌液作为诱导前样本,4 h 后,加入 200 μ mol IPTG 进行诱导,设置摇床条件为 16 $^{\circ}$ C,12 h,220 r/min,诱导完成后取 1 mL 菌液作为诱导后样本。随后,离心收集全部菌体,加入裂解液,以 30 s 运行,30 s 暂停,40%能量,总时间 6 min 进行超声,将超声后悬液离心,分离上清与沉淀。在上清中加入 Ni-NTA 进行孵育,2 h 孵育结束后,离心收集镍珠,对镍珠清洗后进行洗脱,得到洗脱液(Elution1、Elution2、Elution3)。将洗脱液加入超滤管进行超滤,最终收集蛋白。

1.2.3 蛋白的检测与抗体制备 选择不同阶段的蛋白进行 SDS-PAGE 后进行考马斯亮蓝染色,将蛋白送至武汉爱博泰克生物科技有限公司,免疫实验动物(兔),约 45 d 后得到免疫前血清,以及含有 Smarcad1 特异性抗体的免疫后血清。

1.2.4 Western 印迹检测抗体特异性 分别收集 293T、B16、V6.5 细胞蛋白,以及在 V6.5 中敲低 Smarcad1 的表达作为阴性对照,293T 中过表达 Smarcad1 作为阳性对照,进行 Western 印迹检测:配制 8% 分离胶,4% 浓缩胶的 SDS-PAGE 凝胶。加入 1 \times Running Buffer 没过玻璃板,在胶孔内加入一定量的蛋白液,利用电泳进行蛋白分离。蛋白电泳结束后,进行转膜,切去浓缩胶,制作转膜装置。加入 1 \times Trans Buffer。转膜结束后,将膜做好标记,放于 5% 牛奶的 TBST 中,封闭 1 h。随后清洗膜,配一抗,1:2 000 稀释抗体,将膜放于一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。一抗后,使用 TBST 漂洗膜,置于摇床摇洗 5 min,共 3 次。使用 TBST 配制二抗,1:10 000 稀释,敷二抗,室温,45 min。将膜置于摇床上用 TBST 漂洗 5 min,3 次。随后配制曝光液,将曝光液覆盖在膜表面,曝光,记录。

1.2.5 Co-IP 检测抗体特异性 在 293T 细胞中感染 pcDNA3.1-Flag-Smarcad1 质粒,48 h 后蛋白表达,收集细胞使用裂解液进行裂解,随后超声使蛋白充分释放,离心后收集上清,取一定量上清作为对照。在细胞上清中加入 ProteinA/G beads,再分别加入 IgG 以及 Smarcad1 特异性抗体进行免疫共沉淀,4 $^{\circ}$ C 孵育,随后离心,分别收集沉淀,以 Flag 抗体进行 Western 印迹。

1.2.6 免疫荧光检测抗体特异性 在 6 孔板内接种一定量 B16 细胞,待细胞生长至 80% 愈合率后,使用 4% 多聚甲醛进行固定,随后,进行打孔透化以及 BSA 封闭,封闭结束后,使用 Smarcd1 抗体作为一抗进行孵育,一抗孵育结束后进行二抗孵育以及 DAPI 染色,封片,最后使用荧光显微镜进行拍照。

2 结果

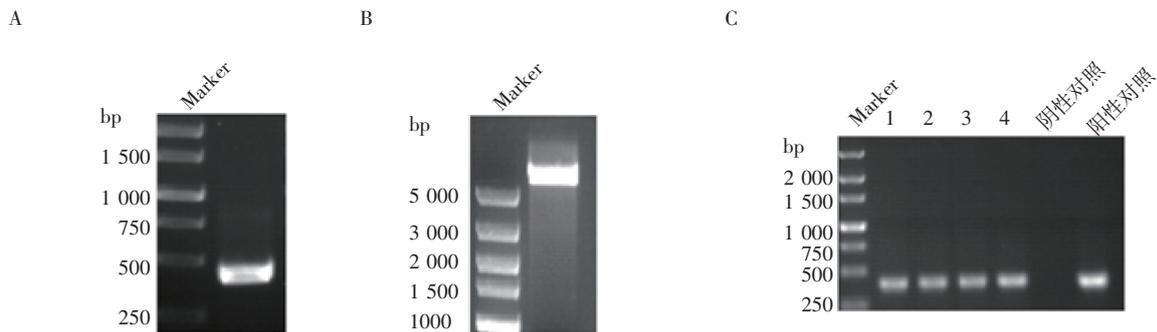
2.1 重组表达质粒 pET-16b-Smarcd1-F1 的构建 选取 Smarcd1 第 1 至 132 位氨基酸作为目的基因,进行 PCR 扩增,结果产生 399 bp 的目的片段(图 1A),成功得到目的基因片段。利用 Xho I、Nde I 对 pET-16b 载体进行双酶切,得到酶切产物,为一条约 6 000 bp 的目的条带(图 1B),连接转化后进行菌落 PCR 鉴定,结果检测出多个阳性菌落克隆,目的条带位置符合预期(图 1C)。表明重组表达质粒

pET-16b-Smarcd1-F1 构建成功。

2.2 Smarcd1 蛋白的表达纯化 考马斯亮蓝染色后,结果显示相较于诱导前,诱导后产生明显目的蛋白,此蛋白在上清液与沉淀中均有分布,洗脱后,目的蛋白纯度明显增加,并且其分子量大小为 27 kD,符合预期蛋白分子量,说明 Smarcd1-F1 蛋白成功诱导表达纯化,见图 2。

2.3 抗体特异性验证

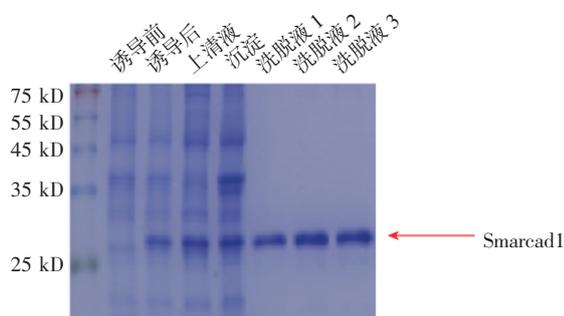
2.3.1 Western 印迹检测抗体特异性 Western 印迹验证制备的抗体能否结合目的蛋白,结果显示,相较于阴性对照组,此抗体能够识别 B16 细胞以及 V6.5 细胞中 Smarcd1 蛋白,不能识别 293T 细胞中目的蛋白,可能与 293T 细胞 Smarcd1 蛋白表达水平较低有关。此结果说明制备的目的抗体能够应用于 Western 印迹实验,且目的条带清晰(图 3)。



注:A:利用 PCR 克隆 Smarcd1 的第 1 至 132 位氨基酸序列,目的条带位置为 399 bp;B:双酶切 pET-16b 载体,目的条带为 6 000 bp;C:菌落 PCR 验证阳性克隆,阴性对照,水作为模板;阳性对照,pcDNA3.1-Flag-Smarcd1 质粒作为模板

图 1 原核表达质粒 pET-16b-Smarcd1-F1 的构建

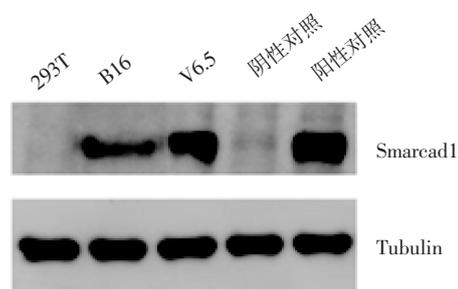
Fig 1 Construction of prokaryotic expression plasmid pET-16b-Smarcd1-F1



注:红色箭头所指位置为 Smarcd1 蛋白

图 2 Smarcd1 蛋白的表达纯化

Fig 2 Expression purification of Smarcd1 protein



注:Tubulin:内参蛋白

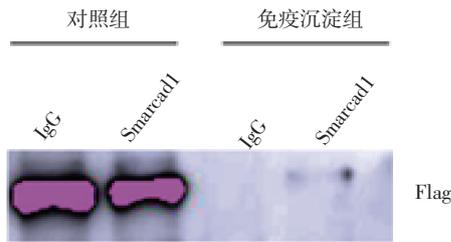
图 3 Western 印迹检测抗体特异性

Fig 3 Western blotting detection of antibody specificity

2.3.2 Co-IP 检测抗体特异性 利用免疫共沉淀实验检测该目的抗体特异性,结果显示相较于 IgG 组,制备的目的抗体能够识别细胞内 Smarcd1 蛋白,成功沉淀出目的蛋白,说明此抗体可以与 Smarcd1 蛋白相互作用(图 4)。

2.3.3 免疫荧光检测抗体特异性 为进一步验证此目的抗体的特异性,在 B16 细胞中进行免疫荧光实验,结果显示 Smarcd1 抗体能够识别细胞内目的蛋白,荧光显微镜下呈绿色荧光,且此蛋白主要定位于细胞核内,表明此抗体能够特异性识别细胞内

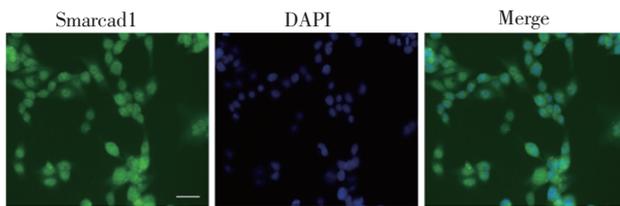
源性 Smarcd1 蛋白,再次验证了制备的 Smarcd1 抗体的特异性(图 5)。



注: IgG: 免疫前血清, 作为阴性对照

图 4 Co-IP 检测抗体特异性

Fig 4 Co-IP detection of antibody specificity



注: DAPI: 核膜染色; Merge: 融合图像; scale bar=25 μm

图 5 免疫荧光检测抗体特异性

Fig 5 Immunofluorescence detection of antibody specificity

3 讨论

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)是一类具有自我更新以及发育多能性的细胞,最初由 Evans 等^[8]从小鼠囊胚的内细胞团中分离而来,并且其可以发育成为包括生殖细胞在内的任何细胞^[9],虽然 Smarcd1 的表达贯穿细胞的整个发育阶段,但其表达的高峰主要集中于内细胞团以及囊胚阶段^[10-11],缺失了 Smarcd1 的细胞会表现出严重的形态学改变,并且使细胞倾向于逃离自我更新状态,展示了 Smarcd1 极强的对细胞发育过程的控制作用。在以往的报道中, Dongding 等^[12]发现 Smarcd1 通过其 CUE domain 与 KAP1 结合在 Oct4、Nanog 等多能性基因上,从而维持了 mESC 的多能性。内源性逆转录病毒是构成哺乳动物基因组的重要组成部分, Smarcd1 同样能够与之结合发挥抑制作用^[13]。因此已有充分证据表明 Smarcd1 作为一个多能性转录因子在 ESC 的早期发育中具有重要作用,但其对多能细胞染色质环境的调控仍知之甚少。

为进一步研究 Smarcd1 在胚胎发育过程中的作用机制,本研究利用原核表达系统体外表达纯化出 Smarcd1 蛋白,并成功制备出特异性较高的 Smarcd1 多克隆抗体。相较于单克隆抗体,多克隆抗体能够识别任一抗原上的多个表位,在抗体制备中成本相对低廉且制备速度较快,制备过程较单克隆抗体更加简单。并且由于多克隆抗体可识别多个表位,因此有利于蛋白质免疫共沉淀和蛋白质染色

质免疫沉淀实验获得更好的结果^[14-15],这为后续检测 Smarcd1 在染色质上的结合情况打下良好基础,有利于研究 Smarcd1 在染色质水平所发挥的功能。而且实验室自己制备抗体除了可以弥补商品化抗体不足的缺点外,还能够保证在多次实验中所用抗体的一致性,排除了商品批号等问题带来的误差,提高了实验的可重复性,本研究也为后续实验室制备多种蛋白以及多克隆抗体提供借鉴。

综上所述,本研究基于 Smarcd1 在胚胎发育中具有重要作用,为了进一步探究其具体作用机制,在实验室条件下,利用原核表达系统纯化出纯度较高、免疫原性较好的目的蛋白。使用此目的蛋白制备多克隆抗体,具有特异性高、亲和能力强等优点,为进一步研究 Smarcd1 在不同领域中的作用奠定基础,同时也为其他蛋白的体外表达纯化提供了思路,通过这一方式,大大降低实验室消耗,稳定实验结果,有利于实验室长期发展。

参考文献:

- [1] CLAPIER C R, IWASA J, CAIRNS B R, et al. Mechanisms of ac-tion and regulation of ATP -dependent chromatin -remodelling complexes[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(7): 407-422.
- [2] CURTIS C D, DAVIS R B, INGRAM K G, et al. Chromatin-remodeling complex specificity and embryonic vascular development[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(23): 3921-3931.
- [3] FLAUS A, MARTIN DMA, BARTON G J, et al. Identification of multi-ple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(10): 2887-2905.
- [4] SCHOOR M, SCHUSTER-GOSSLER K, GOSSLER A. The Etl-1 gene encodes a nuclear protein differentially expressed during early mouse development[J]. Dev Dyn, 1993, 197(3): 227-237.
- [5] ADRA C N, DONATO J L, BADOVINAC R, et al. SMARCD1, a novel human helicase family-defining member associated with ge-netic instability: cloning, expression, and mapping to 4q22-q23, a band rich in breakpoints and deletion mutants involved in several human diseases[J]. Genomics, 2000, 69(2): 162-173.
- [6] ROWBOTHAM S P, BARKI L, NEVES-COSTA A, et al. Maintenance of silent chromatin through replication requires SWI/SNF-like chromatin remodeler SMARCD1[J]. Mol Cell, 2011, 42(3): 285-296.
- [7] XIAO S, LU J, SRIDHAR B, et al. SMARCD1 contributes to the regulation of naive pluripotency by interacting with histone citrullination[J]. Cell Rep, 2017, 18(13): 3117-3128.
- [8] EVANS, M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripoten-tial cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(5819): 154-156.
- [9] MARTELLO G, SMITH A. The nature of embryonic stem cells[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014, 30: 647-675.
- [10] LOH Y H, WU Q, CHEW J L, et al. The Oct4 and Nanog tran-scription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells[J]. Nat Genet, 2006, 38(4): 431-440.

(下转第 608 页)

疗、组织和动物疾病建模等诸多方面。

在本实验中,利用 CRISPR 技术实现基因组定点编辑,在 mESCs 中构建 mPGCs 分化的报告基因系统,为 PGCs 提供稳定、可靠和安全的标记方法,有助于后续进一步探究 PGCs 分化的分子机制,也可促进对早期胚胎发育过程的理解以及不孕不育等相关疾病的研究。

参考文献:

- [1] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. *Nature*, 1981, 292 (5819): 154–156.
- [2] SMITH A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum [J]. *Development*, 2017, 144 (3): 365–373.
- [3] LAWSON K A, MENESES J J, PEDERSEN R A. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo [J]. *Development*, 1991, 113 (3): 891–911.
- [4] ZHAO J, YAO K, YU H, et al. Metabolic remodelling during early mouse embryo development [J]. *Nat Metab*, 2021, 3 (10): 1372–1384.
- [5] YANG M, YU H, YU X, et al. Chemical-induced chromatin remodeling reprograms mouse ESCs to totipotent-like stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29 (3): 400–418, e13.
- [6] KITADATE Y, JORG D J, TOKUE M, et al. Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche [J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24 (1): 79–92, e6.
- [7] WANG M, LIU X, CHANG G, et al. Single-cell RNA sequencing analysis reveals sequential cell fate transition during human spermatogenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23 (4): 599–614, e4.
- [8] YAN Y, WANG Q. BMP Signaling: lighting up the way for embryonic dorsoventral patterning [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 799772.
- [9] GUGLIELMI L, HELIOT C, KUMAR S, et al. Smad4 controls signaling robustness and morphogenesis by differentially contributing to the Nodal and BMP pathways [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 6374.
- [10] FANG F, ANGULO B, XIA N, et al. A PAX5–OCT4–PRDM1 developmental switch specifies human primordial germ cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20 (6): 655–665.
- [11] SAITOU M, YAMAJI M. Primordial germ cells in mice [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4 (11): a008375.
- [12] NAKAMURA T, ARAI Y, UMEHARA H, et al. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9 (1): 64–71.
- [13] HAN L S, REN C, LI L, et al. Embryonic defects induced by maternal obesity in mice derive from Stella insufficiency in oocytes (vol 50, pg 432, 2018) [J]. *Nat Genet*, 2018, 50 (5): 768.
- [14] MIKEDIS M M, DOWNS K M. PRDM1/BLIMP1 is widely distributed to the nascent fetal-placental interface in the mouse gastrula [J]. *Dev Dynam*, 2017, 246 (1): 50–71.
- [15] WOLFE A D, RODRIGUEZ A M, DOWNS K M. STELLA collaborates in distinct mesendodermal cell subpopulations at the fetal-placental interface in the mouse gastrula [J]. *Dev Biol*, 2017, 425 (1): 44–57.
- [16] FANG F, ANGULO B, XIA N, et al. A PAX5–OCT4–PRDM1 developmental switch specifies human primordial germ cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20 (6): 655–665.
- [17] VINCENT S D, DUNN N R, SCIAMMAS R, et al. The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse [J]. *Development*, 2005, 132 (6): 1315–1325.
- [18] SHIN S W, VOGT E J, JIMENEZ–MOVILLA M, et al. Cytoplasmic cleavage of DPPA3 is required for intracellular trafficking and cleavage-stage development in mice [J]. *Nat Commun*, 2017, 8 (1): 1643.
- [19] FARSHCHIAN M, MATIN M M, ARRANANT O, et al. Suppression of dsRNA response genes and innate immunity following Oct4, Stella, and Nanos2 overexpression in mouse embryonic fibroblasts [J]. *Cytokine*, 2018, 106: 1–11.
- [20] OHINATA Y, SANO M, SHIGETA M, et al. A comprehensive, non-invasive visualization of primordial germ cell development in mice by the Prdm1–mVenus and Dppa3–ECFP double transgenic reporter [J]. *Reproduction*, 2008, 136 (4): 503–514.

(2022–04–30 收稿)

(上接第 601 页)

- [11] EFRONI S, DUTTAGUPTA R, CHENG J, et al. Global transcription in pluripotent embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2 (5): 437–447.
- [12] DONG D, BERGMAIER P, SACHS P, et al. The CUE1 domain of the SNF2-like chromatin remodeler SMARCD1 mediates its association with KRAB-associated protein 1 (KAP1) and KAP1 target genes [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293 (8): 2711–2724.
- [13] SACHS P, DING D, BERGMAIER P, et al. SMARCD1 ATPase activity is required to silence endogenous retroviruses in embryonic stem cells [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1335.
- [14] COLLATZ M, MOCK F, BARTH E, et al. EpiDope: a deep neural network for linear B-cell epitope prediction [J]. *Bioinformatics*, 2021, 37 (4): 448–455.
- [15] SIDNEY J, PETERS B, SETTE A. Epitope prediction and identification—adaptive T cell responses in humans [J]. *Semin Immunol*, 2020, 50: 101418.

2021–12–31 收稿)