

银鲫 HIRA 多克隆抗体的制备及组织特异性表达分析

周 励¹ 王玉凤¹ 桂建芳²

(1. 华中师范大学生命科学学院, 遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室, 武汉 430079;

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: *Hir/ Hira* 基因家族的成员广泛存在于多种生物体中, 但有关其在生物体发育过程中的具体功能还不甚清楚。对果蝇的研究表明, *dHira* 基因产物可能在受精时精核的解凝过程和雄性原核的正常形成过程中起重要作用。本研究组前期已经分别克隆出雌核发育银鲫和两性生殖彩鲫的 *Hira* 基因(*cagHira* 和 *caHira*), 本实验在银鲫 *cagHira* 基因的特异区域, 设计一对引物, 以银鲫成熟卵母细胞总 RNA 逆转录出的 cDNA 为模板, 扩增出 *cagHira* 的特异片段。再将该片段克隆到原核表达载体 pET32a 上, 转化 BL21 (DE3) 菌株, 经诱导后表达出融合蛋白。分析表明, 该融合蛋白主要以包涵体形式表达。以纯化的融合蛋白作为抗原去免疫小鼠, 制备多克隆抗血清, 经蛋白质印迹分析检测, 该抗血清(稀释到 1:2000)与包涵体蛋白识别反应良好, 确定获得了具有高效价的特异性银鲫 CAGHIRA 多克隆抗体, 为进一步研究 HIRA 在鱼类发育和雌核生殖过程中的作用奠定了基础。对银鲫 HIRA 蛋白的组织特异性表达分析发现, 该蛋白仅在成熟卵巢组织中特异表达, 故表明 HIRA 可能对鱼类卵子发生和/或早期胚胎发育具有重要作用。

关键词: 银鲫; HIRA; 抗体制备; 组织表达

中图分类号: Q344⁺.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)03-0354-06

以特殊的雌核发育生殖方式繁衍后代的银鲫 (*Carassius auratus gibelio*), 由于其卵母细胞发育、成熟和受精有别于普通两性物种, 且具有在异源精子受精时精核不解凝, 同源精子受精时精核部分解凝等特性, 已成为独特的研究系统, 为揭示卵母细胞的发育、成熟、受精以及动物性别决定等发育生物学中的一些基本问题提供了特殊的研究材料和条件^[1-3]。

Hir/ Hira (Histone regulation) 基因是最先在酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中被鉴定出来的, 并被证明是组蛋白基因表达的负调节因子^[4]。后续的研究发现, *Hira* 基因产物包含一组保守的蛋白家族, 广泛存在于果蝇、鱼、鸡、小鼠、人类以及植物等多种生物体当中^[5-10]。HIRA 蛋白家族的 N 端有 7 个 WD 重复区, 推测借此形成一个 β 螺旋结构和两个潜在的核定位信号区, 该 β 螺旋结构与蛋白质-蛋白质互作有关^[11]。HIRA 家族的 N 端在进化上比较保守, 且能够和其他的组蛋白伴侣如: ASF-1 (染色质组装和调节复合体成员) 和 CAF-1 (染色质组装因子 1)

相互作用, 对组蛋白基因的转录和异染色质的沉默起调节作用。最近的研究表明, HIRA 蛋白的 N 端可通过调节细胞周期及细胞凋亡相关基因的表达对细胞的生长起重要的调控作用^[12]。C 端负责 HIRA 与成对的同源异型域 (Paired homeodomain)、Hir 互作蛋白 3 (Hirp3) 以及核心组蛋白的生化互作^[13, 14]。

对果蝇的研究表明, *dHira* 在雌性成体、未受精卵中和 0—3 时龄的胚胎中, 转录本的量很高, 之后则逐渐下降, 说明其可能对果蝇早期胚胎发育起主要作用^[5]。近期对果蝇受精过程的研究发现, 作为组蛋白 H3.3 的伴侣蛋白, DHIRA 复合体的作用可能在于, 当精子入卵后, 将 H3.3-H4 四聚体沉积到精核中, 从而使得精核解除浓缩状态, 形成雄性原核参与子代的发育过程中去^[15, 16]。考虑到在雌核发育银鲫受精时, 也有精核不解凝或解凝不完全的现象^[2, 3], 因此本研究组对雌核发育银鲫和两性生殖彩鲫 (*Carassius auratus*) 中 *Hira* 基因的功能进行了分析。我们已经分别从银鲫和彩鲫成熟卵细胞的 SMART cDNA 文库中克隆出两种鱼的 *Hira* 全长

收稿日期: 2007-10-31; 修订日期: 2008-01-21

基金项目: 国家自然科学基金(30671609); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金(2005FB20)资助

作者简介: 周励(1982—), 女, 汉族, 湖北鄂州人; 硕士; 主要从事鱼类发育生物学研究

通讯作者: 王玉凤, E-mail: yfengw@mail.ccnu.edu.cn; 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

cDNA (*cagHira* 和 *caHira*) ,半定量 RT-PCR 分析表明, *Hira* 基因在这两种亲缘关系很近的鲫鱼胚胎发育过程中表达模式不同,这些差异可能与两种鱼不同的生殖方式有关, *Hira* 基因可能在鱼类精核解凝过程中发挥重要作用^[6,17]。为进一步探讨该基因在鱼类发育和雌核生殖过程中的作用,本研究将银鲫 *cagHira* 基因 C 端的一段特异片段(Aa 497—680) 连接到原核表达载体 pET-32a 上,诱导其表达,获得纯化蛋白,免疫小鼠,制备了多克隆抗体,并分析了银鲫 HIRA 蛋白的组织特异性表达情况,发现在成熟卵巢中该蛋白大量表达。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年雌性 BALB/c 小鼠由中科院武汉病毒所提供,银鲫取自中国科学院水生生物研究所关桥试验基地。

1.2 *cagHira* 基因片段的克隆 用 SV Total RNA Isolation System (Promega 公司) 提取银鲫成熟卵母细胞的总 RNA,逆转录成 cDNA。根据 *cagHira* 基因序列 (DQ340807) 在特异性较强的 C 端区域(Aa 497—680) 设计一对引物,在 5 端和 3 端分别加入了 *EcoR* 和 *XhoI* 的酶切位点序列,引物序列为:上游引物: 5'-ctcgagTCAGATCTCTTCGGATC-3'; 下游引物: 5'-gatatcATGGATGGGGTAGGAAG-3',引物由上海生工合成。通过 PCR 扩增出目的片段,PCR 扩增的循环条件为 94 30 S,55 30 S,72 50 S。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 回收试剂盒(上海申能公司) 回收纯化,与 pMD18-T 载体(大连 Takara 公司) 连接,经筛选得到重组质粒 pMD18T-*cagHira*。用其转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,小量制备质粒 DNA,用 *EcoR* 和 *XhoI* (Takara 公司) 进行酶切检验后,送至捷瑞生物工程(上海)公司测序。

1.3 重组表达质粒的构建及诱导表达 小量制备质粒 DNA,用 *EcoR* 和 *XhoI* 切下目的片段,再亚克隆至载体 pET-32a (Novagen),重组质粒命名为 pET-32a-*cagHira*。将重组质粒导入大肠杆菌 BL21 (DE3),筛选阳性克隆。挑选单克隆到选择性培养基中,37 摇菌至对数生长期,加入诱导物 IPTG。设定 IPTG 浓度梯度(0.1、0.5、0.8、1.0 和 1.3 mmol/L) 及诱导时间梯度(2、3、4、5 和 6 h),培养物离心、沉淀后,重悬于上样缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8),2% SDS,0.1% 溴酚蓝,10% 甘油,100 mmol/L DTT),沸水中煮 3—5 min,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测。确定在 IPTG 1.0 mmol/L,37 诱导 4

h 时表达产量达到最大。将鉴定为表达阳性的菌落进行大量培养诱导,SDS-PAGE 分析。PAGE 胶用冰预冷的 0.25 mol/L KCl 溶液染色 5—10 min。出现白色目的条带后,用干净刀片准确地切下目的条带,用生理盐水研磨胶条成稀糊状,使之可以顺利通过 1 mL 的注射器针头,并用生理盐水调整蛋白的浓度约至 2 g/L。

1.4 多克隆抗体的制备 对 10 只雌性的 6—8 周龄的 BALB/c 鼠进行腹腔注射免疫。每次抗原用量为 100 μ g/只。第一次基础免疫后,间隔两周加强免疫,每次加强免疫间隔一周,共加强三次。小鼠末次免疫一周后眼眶放血,收集血液于 37 静置 1 h 后,再在 4 下静置过夜后,室温 1600 r/min 离心 10 min,吸取上层的多抗血清,分装于 -80 保存备用。

1.5 蛋白质印迹(Western blot)检测 蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶(溶于 TBST 中) 封闭 1 h,以 1:2000 的比例加入抗银鲫 HIRA 的多克隆抗体,与膜杂交反应 1 h,TBST 多次漂洗,再加 HRP 标记的羊抗鼠二抗(武汉凌飞科技有限公司) 杂交 1 h,经 TBST 漂洗和 TBS 漂洗后,用 NBT/BCIP 显色。

1.6 银鲫 HIRA 蛋白的组织特异性检测 于 2006 年 3—4 月份取成熟银鲫各组织,提取蛋白质。将组织与蛋白质抽提液 EB buffer (100 mmol β -磷酸甘油,20 mmol EGTA,15 mmol MgCl₂,20 mmol HEPES,1 mmol DTT,2 mmol PMSF,10 μ g/mL leupeptin,10 μ g/mL aprotinin,10 μ g/mL pepstatin,10 μ g/mL chymostatin) 按体积比 1:10 的比例混合后在预冷的匀浆器中充分匀浆,于 4 下 15000 r/min 离心 10 min 后,取上清,在上清中加入等体积的上样缓冲液,沸水煮 5 min。Western blot 检测方法同 1.5,以抗 α -tubulin 抗体(Santa Cruz 公司) 检测银鲫各组织中 α -tubulin 的表达为内参,检测 HIRA 在银鲫各组织中的表达情况。实验经三次生物学重复。

2 结果

2.1 CAGHIRA 基因片段扩增及重组质粒鉴定

以银鲫成熟卵母细胞总 RNA 为模板,用特异性引物进行 RT-PCR 扩增,结果得到约 550 bp 的条带。该产物经酶切后与 pMD18-T 载体连接,得到 pMD18-T-*cagHira* 质粒,序列测定结果证实,核苷酸序列与预计的一致。通过 *EcoR* 和 *XhoI* 双酶切,将银鲫的 *cagHira* cDNA 片段从重组质粒 pMD18-T-*cagHira* 亚克隆至原核表达载体 pET-32a

中。重组质粒 pET-32a- *cagHira* 经 *EcoR* 和 *XhoI* 双酶切鉴定,得到了一条约 550bp 的 *cagHira* cDNA 条带(图 1),证实 *cagHira* cDNA 片段已插入原核表达载体中。

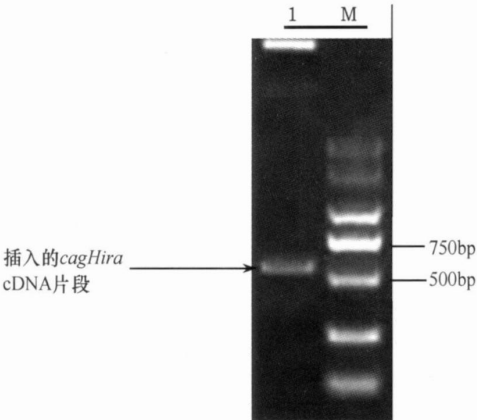


图1 重组表达质粒 pET-32a- *cagHira* 的双酶切鉴定
Fig. 1 Identification of recombinant expression plasmid pET-32a- *cagHira* by digestion using *EcoR* and *XhoI*
1:经 *EcoR* 和 *XhoI* 双酶切后的 pET-32a- *cagHira* ;
M:DNA 分子量标准 D2000
1: pET-32a- *cagHira* digested by *EcoR* and *XhoI* ;
M:DNA molecular weight marker

2.2 银鲫 HIRA 融合蛋白的诱导表达、纯化

将重组质粒 pET-32a- *cagHira* 转化 *E. coli* BL21 (DE3),以不同 IPTG 终浓度、诱导不同时间检测蛋白表达情况,结果显示在 IPTG 浓度为 1.0mmol/L,于 37 诱导 4h 时表达产量达到最大。IPTG 诱导表达后,获得一个约 34kD 的特异蛋白条带,与推测的大小一致。收集菌体,超声裂解后 SDS-PAGE 分析上清和沉淀,发现该蛋白主要存在于沉淀的包涵体中(图 2)。切下特异的蛋白条带纯化,产物经 SDS-PAGE 分析,证明获得了专一的目的蛋白(图 3)。

2.3 抗银鲫 HIRA 多克隆抗体的制备及鉴定

纯化的融合蛋白用生理盐水调整其浓度约 2g/L,以此作为免疫原制备了鼠抗银鲫 HIRA 多克隆抗体。以免疫前的小鼠血清作为阴性对照,CAGHIRA 免疫的小鼠血清做不同稀释后,进行 Western blot 检测,结果表明,以稀释 2000 倍的比例得到的多克隆抗体检测效果好,仅在免疫后的小鼠血清中检测出明显单一条带,没有非特异性条带出现,阴性对照中没有出现任何条带(图 4),说明所获得的多克隆抗血清与目的蛋白识别良好,特异性较高,能够产生抗原-抗体特异性反应。

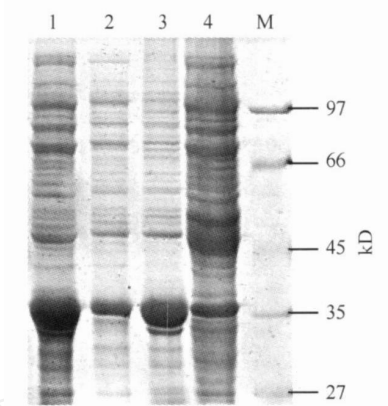


图2 SDS-PAGE 分析 *cagHira* C 端结构域的原核表达
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of prokaryotic expression of the C-terminal domain of *cagHira*
M:蛋白分子量标记;1:诱导后的菌液裂解液;2:诱导后经超声破碎的菌液上清;3:诱导后经超声破碎的菌液沉淀;4:未诱导的菌液裂解液
M: Protein molecular weight marker; 1: Lysate of bacteria induced by IPTG; 2: Supernatant of the lysed bacteria induced by IPTG; 3: Precipitate of the lysed bacteria induced by IPTG; 4: Lysate of control bacteria without induction by IPTG

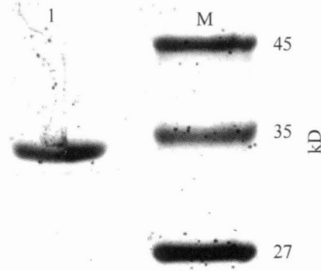


图3 SDS-PAGE 分析纯化的融合蛋白
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified CAGHIRA/ His fusion protein
M:蛋白分子量标准; 1:纯化的融合蛋白
M: Protein molecular weight marker; 1: CAGHIRA/ His fusion protein after purification

2.4 银鲫 HIRA 蛋白的组织特异性表达分析

于繁殖季节,提取银鲫成熟卵巢、脑、心脏、肝、脾、肾、肌肉、成熟精巢等组织的蛋白,用所制备的抗体进行 western blot 分析,以 α -tubulin 蛋白的表达为内参,检测 CAGHIRA 在银鲫各组织中的表达情况。结果表明,CAGHIRA 蛋白仅在银鲫卵巢中大量表达,而在其他组织中只有组成型的微弱表达(图 5)。

3 讨论

关于 *Hira* 基因在发育过程中的功能方面的报道大多来自于对脊椎动物的研究。原位杂交实验表

明,在鸡和小鼠的胚胎发育过程中,*Hira* 在原肠后期表达,其表达的位置主要在由神经嵴发育而来的头部神经褶、鳃弓等区域,以及体节、肢芽等部位^[7,8]。进一步的研究表明,*Hira* 是小鼠胚胎发育所必需的,因为 *Hira* 基因的突变导致小鼠胚胎原条扭曲,脊索发育异常,神经管的前后轴发育畸形,所有的胚胎都在发育至第 10 天或第 11 天时死亡^[18]。*Hira* 基因位于人类染色体的 22q11 区,该区域含有一个与许多先天性疾病,如迪格奥尔格综合症(DGS)等有关的关键区,是引起 DGS 等出生缺陷病的主要候选基因^[6]。*Hira* 基因在鱼类发育过程中的功能研究方面,除了本研究组近期的一些初步工作外^[6,17],还未见其他报道。本研究在前期银鲫和彩鲫 *Hira* 基因克隆以及时空转录表达分析的基础上,通过构建原核表达银鲫 HIRA 蛋白的载体,诱导重组蛋白表达,用纯化的蛋白免疫小鼠,获得了银鲫 HIRA 的多克隆抗体。在构建原核表达载体时,我们采用基因特异性片段,即银鲫 CAGHIRA 与其他 HIRA 家族成员同源性较低的核苷酸序列,由这段序列表达出来的蛋白制备的抗体特异性强。蛋白质印迹分析证实了抗体的特异性,抗体经系列梯度稀释后检测发现,在较低浓度(1 2000)下即可检测到目的条带,且无明显的非特异性(图 5),证实了这种抗体的高亲和性和结合银鲫 HIRA 的特异性,为深入研究 HIRA 在鱼类发育和雌核生殖过程中的功能奠定了基础。

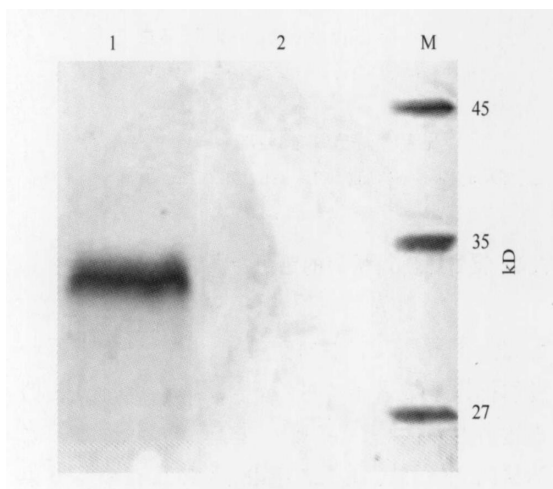


图 4 Western blot 检测抗体特异性

Fig. 4 Western blot analysis of the specificity of the prepared antibody
M:蛋白分子量标准;1:免疫后小鼠血清;2:免疫前小鼠血清
M:Protein molecular weight marker;1:Serum from the mouse after immunization;2:Serum from the mouse before immunization

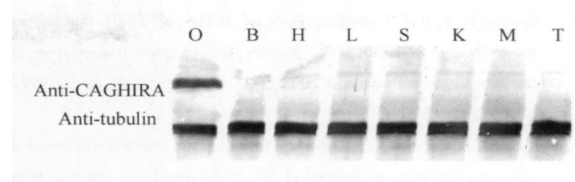


图 5 Western blot 检测银鲫 CAGHIRA 组织表达情况(以 α -tubulin 蛋白的表达为内参)

Fig. 5 Gbel cap CAGHIRA expression in various tissues(α -tubulin was used as loading control)

O:卵巢;B:脑;H:心脏;L:肝;S:脾;K:肾;M:肌肉;T:精巢
O:Ovary;B:Brain;H:Heart;L:Liver;S:Spleen;K:Kidney;
M:Muscle;T:Testis

虽然用 RT-PCR 的方法检测果蝇 *dHira* mRNA 转录水平时发现,*dHira* 不仅主要在卵巢中转录表达,而且在精巢中也大量转录^[16],但是我们前期 RT-PCR 检测 *Hira* mRNA 在银鲫不同组织转录水平的结果表明,*cagHira* 的转录本仅在卵巢中大量表达,而在精巢中没有表达^[17]。在本研究中,蛋白组织特异性表达分析结果表明,在银鲫成熟卵巢、脑、心脏、肝、脾、肾、肌肉、成熟精巢等组织中,CAGHIRA 蛋白仅在成熟卵巢中特异表达(图 5),这与我们前期 RT-PCR 的检测结果一致,这从另一方面证明了本次制备的抗体的实用性。同时该结果进一步说明,HIRA 可能在鱼类卵子发生和早期胚胎发育过程中具有重要的作用,而对精子的发生没有影响。这与果蝇中的研究结果不一致,因为 *Hira* 可能在无脊椎动物的精子发生过程中是具有一定的功能的。进一步的研究将从比较 HIRA 蛋白在银鲫和彩鲫受精过程和胚胎发育过程中的动态及抑制 HIRA 表达入手,更深入地探讨其在鱼类发育和雌核生殖过程中的作用。

参考文献:

- [1] Wang Y F, Yang Z G, Yang S T, et al. Comparative study on the changes of MPF kinase activity during oocyte maturation *in vitro* in gynogenetic crucian carp and amphimictic crucian carp [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2000, 46(1): 71—80
- [2] Ge W, Shan S X, Jiang Y G. Fertilization biology of gynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*), with a discussion on the reproductive modes of the naturally gynogenetic crucian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, 16(2): 97—100 [葛伟,单仕新,蒋一珪.雌核发育银鲫的受精生物学研究-天然雌核发育银鲫繁殖方式的讨论.水生生物学报,1992,16(2): 97—100]
- [3] Li C J, Gui J F. Comparative studies on *in vitro* sperm decondensation and pronucleus formation in egg extracts between gynogenetic and bisexual fish [J]. *Cell Research*, 2003, 13(3): 159—169

- [4] Spector M S, Raff A, DeSilva H, *et al.* Hir1p and Hir2p function as transcriptional corepressors to regulate histone gene transcription in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, **17**(2) :545—552
- [5] Kirov N, Shtilbans A, Rushlow C. Isolation and characterization of a new gene encoding a member of the HIRA family of proteins from *Drosophila melanogaster* [J]. *Gene*, 1998, **212**(2) :323—332
- [6] Du X Z, Wang Y F, Gui J F. Sequence cloning and expression analysis of *Hira* gene in color crucian carp *carassius auratus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(2) :220—225 [杜新征, 王玉凤, 桂建芳, 彩鲫 *hira* 基因片段的克隆及表达分析. 水生生物学报, 2007, **31**(2) :220—225]
- [7] Roberts C, Daw S C, Halford S, *et al.* Cloning and developmental expression analysis of chick Hira (Chira), a candidate gene for DiGeorge syndrome [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, **6**(2) :237—245
- [8] Wilming L G, Snoeren C A, van Rijswijk A, *et al.* The murine homologue of HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is expressed in embryonic structures affected in human CATCH22 patients [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, **6**(2) :247—258
- [9] Pizzuti A, Novelli G, Ratti A, *et al.* Isolation and characterization of a novel transcript embedded within HIRA, a gene deleted in DiGeorge syndrome [J]. *Mol Genet Metab*, 1999, **67**(3) :227—235
- [10] Phelps-Durr T L, Thomas J, Vahab P, *et al.* Maize rough sheath2 and its Arabidopsis orthologue ASYMMETRIC LEAVES1 interact with HIRA, a predicted histone chaperone, to maintain *knox* gene silencing and determinacy during organogenesis [J]. *The Plant Cell*, 2005, **17**: 2886—2898
- [11] Neer E J, Schmidt C J, Nambudripad R, *et al.* The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins [J]. *Nature*, 1994, **371**:397—400
- [12] Ahmad A, Kikuchi H, Takami Y, *et al.* Different roles of N-terminal and C-terminal halves of HIRA in transcription regulation of cell cycle-related gene that contribute to control of vertebrate cell growth [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(11) :32090—32100
- [13] Lorain S, Quivy J P, Monier-Gavelle F. Core histones and HIRIP3, a novel histone-binding protein, directly interact with WD repeat protein HIRA [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(9) :5546—5556
- [14] Magnaghi P, Roberts C, Lorain S, *et al.* HIRA, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional co-repressors, interacts with Pax3 [J]. *Nat Genet*, 1998, **20**(1) :74—77
- [15] Loppin B, Docquier M, Bonneton F, *et al.* The maternal effect mutation *sesame* affects the formation of the male pronucleus in *Drosophila melanogaster* [J]. *Dev Biol*, 2000, **222**(2) :392—404
- [16] Loppin B, Bonnefoy E, Anselme C, *et al.* The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus [J]. *Nature*, 2005, **437**(7063) :1386—1390
- [17] Du X Z, Zhou L, Zhao H B, *et al.* Identical sequences but different expression patterns of *Hira* gene in gynogenetic and gonochoristic crucian carps [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, (In press)
- [18] Roberts C, Sutherland H F, Farmer H, *et al.* Targeted mutagenesis of the Hira gene results in gastrulation defects and patterning abnormalities of mesendodermal derivatives prior to early embryonic lethality [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**(7) :2318—2328

PREPARATION OF POLYCLONAL ANTIBODY AND ANALYSIS OF SPATIAL EXPRESSION OF HIRA PROTEIN IN GIBEL CARP

ZHOU Li¹, WANG Yu-Feng¹ and GUI Jian-Fang²

(1. Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract : *Hir/ Hira* (Histone regulation) genes were first identified in yeast as negative regulators of histone gene expression. It has been confirmed that HIRA is a conserved family of proteins present in various animals and plants. The function of *Hira* gene in the development still remains unclear. It was shown that during *Drosophila* fertilization, the male pronucleus remain abnormally condensed in eggs laid by *Hira* mutated females, indicating that HIRA complex may have a role in decondensation of sperm nucleus and the formation of male pronucleus after fertilization. Gibel carp *Carassius auratus gibelio* is a unique triploid species that has two different reproduction modes: allogynogenetic reproduction and gonochoristic reproduction. It has a similar phenotype of abnormal male pronucleus to that in *Hira* mutated *Drosophila*. In order to analyse the function of *Hira* gene in fish development and in gynogenesis, we have previously cloned the full-length cDNA of *Hira* homologs from gynogenetic gibel carp (*cagHira*) and gonochoristic colored crucian carp (*caHira*), respectively, and analyzed the spatial and temporal transcriptional expression. An anti-CAGHIRA polyclonal antibody was now prepared and subsequently used to investigate the expression of this protein in different tissues of gibel carp. The cDNA fragment encoding 184 amino acids (Aa 497—680) of *cagHira* was cloned and inserted into a prokaryotic expression vector pET-32a. Then the recombinant protein approximately similar to the expected size was induced to express and was purified. The anti-CAGHIRA polyclonal antibody was prepared by immunization of mice using this purified fusion protein. The specific recognition of anti-CAGHIRA polyclonal antibody was further verified by western blot analysis of the serum from pre- and post-immunized mice. The preparation of CAGHIRA antibody will greatly facilitate further study of *Hira* function in fish development and in gynogenesis. The CAGHIRA protein expression in various tissues was then analyzed using this new prepared antibody by western blot. The result showed that CAGHIRA was specifically expressed in ovary. No obvious band was observed in brain, heart, liver, spleen, kidney, muscle and testis tissues. The result is consistent with the detection by RT-PCR and suggests that HIRA may play an important role in oogenesis and/or early embryogenesis.

Key words : *Carassius auratus gibelio*; HIRA; Antibody preparation; Tissue expression