

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.31.001

## · 基础研究 ·

## 人胚胎干细胞膜的特异多肽受体研究\*

谭之扬<sup>1,2</sup> 金磊<sup>1,2</sup> 赵文秀<sup>2</sup> 马岚<sup>2Δ</sup>

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084; 2 清华大学深圳研究生院生命与健康学部 广东 深圳 518055)

**摘要 目的:**通过多肽筛选和比较分析,找到针对人胚胎干细胞(hESC)特异结合的多肽的膜受体蛋白,为相关通路或特异膜表面蛋白下游的研究奠定基础。**方法:**首先,在前期运用噬菌体展示技术的基础上进行 ELISA 重筛选,通过对比结合强度的大小,挑选出特异性结合人胚胎干细胞的噬菌体多肽并且进行测序和合成有 poly-his 标签的多肽;然后运用 His Pull-Down 系统获得特异结合人胚胎干细胞的某一特殊噬菌体 12 肽的膜上靶分子受体蛋白;最后质谱测序后通过 Mascot 数据库和 NCBI 进行序列信息分析。**结果:**①通过 ELISA 重筛选,得到了高特异性结合人胚胎干细胞的两个噬菌体序列,其序列分别为 HGAAGWTRTGHV(HGA)和 VPATETAQAGHA(VPA)。②通过 His Pull-Down 实验得到了一个针对多肽 VPA 的特异性膜蛋白受体。③通过 MALD 质谱分析以及 NCBI 的数据库搜索分析,进一步确认这一 VPA 多肽特异性结合的潜在受体蛋白可能属于 HECT 超级家族。**结论:**寻找到一个潜在未知的人胚胎干细胞的特异表面标志物,此膜受体可与 VPA 多肽特异性结合,为人胚胎干细胞的筛选和鉴定提供了重要指标。

**关键词:**人胚胎干细胞(hESC);VPATETAQAGHA;多肽;His Pull-Down

**中图分类号:**Q28;Q291;Q516;Q71 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)31-6001-05

## Study on Receptor of Peptides Specifically Binding Human Embryonic Stem Cell Membrane\*

TAN Zhi-yang<sup>1,2</sup>, JIN Lei<sup>1,2</sup>, ZHAO Wen-xiu<sup>2</sup>, MA Lan<sup>2Δ</sup>

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China; 2 Division of Life and Health Sciences, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518055, China)

**ABSTRACT Objective:** We used phage screening and analysis to find specific membrane surface receptor on human embryonic stem cells (hESC) which can specifically bind with some unique polypeptides. Then, this study can lead to some further researches on cell signal or pathway. **Methods:** Firstly, ELISA was used to re-select the special phage peptides which are able to specifically bind hESC by comparing the binding ability between the peptide and hESC, and after sequencing, the poly-his tagged peptides were synthesized. Secondly, His Pull-Down method was used to pull down the target receptor protein which expressed on the hESC membrane and also interacted with our unique 12 peptides. Finally, sequences from mass spectrometry were further analyzed with Mascot and NCBI. **Results:** ① Two special 12 peptides binding specifically with hESC were acquired, and their sequences were HGAAGWTRTGHV (HGA) and VPATETAQAGHA (VPA). ② We obtained a potential target receptor protein for peptide VPA by His Pull-Down. ③ MALD mass spectrometry and NCBI results showed that the supposed target protein might belong to HECT super family. **Conclusions:** This study found a potential specific marker, for hESC which was able to specially bind with VPA peptide. Most importantly, this work was very useful for screening and identifying hESC.

**Key words:** Human embryonic stem cell(hESC); VPATETAQAGHA; Poly-peptide; His Pull-Down

**Chinese Library Classification:** Q28; Q291; Q516; Q71 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)31-6001-05

### 前言

人类胚胎干细胞(hESC)来源于早期胚胎囊胚中的内细胞团<sup>[1]</sup>。在体外培养时,它能分化成所有谱系的细胞,还能保持未分化状态的能力。因此,胚胎干细胞在发育生物学和临床治疗

研究中有巨大潜力。然而,应用 ES 细胞到临床领域的关键的问题是如何从其他类型的细胞分离出胚胎干细胞,并且避免潜在的风险。目前为止,鉴定和分离胚胎干细胞能够从以下几个方面着手:(1)表面标记物,以蛋白为主,包括一系列的糖脂类以及糖蛋白类的表面标记物,它们能够作为鉴定人胚胎干细胞以及

\* 基金项目:国家高技术研究发展计划(2006AA03Z359)

作者简介:谭之扬,女,硕士研究生,主要研究方向:干细胞生物学,E-mail:tan\_zhiyang@126.com

Δ 通讯作者:马岚,电话:0755-26033033,E-mail:malan@sz.tsinghua.edu.cn

(收稿日期:2014-03-31 接受日期:2014-04-23)

其全能性[HZZ1]的重要指标。其中大部分是受体或者转运蛋白,还有一些是结构蛋白以及与细胞增殖相关的蛋白,例如SSEA家族<sup>[2-4]</sup>,CD蛋白系列<sup>[5-9]</sup>,信号通路膜表面受体Frizzled(Fzd)、Smad等<sup>[10-13]</sup>,尽管这些标记物被许多实验室报道过,但是由于这些表面标记物在不同细胞系表达的质量不一样,且目前人胚胎干细胞培养代数还不多,所以这些表面标记物是否能够维持干细胞特性还有待研究。(2)核内转录因子,例如Sox2、Oct4、Nanog以及klf等<sup>[14-18]</sup>。转录以及基因分析是最早应用于鉴定胚胎干细胞特性的方法,转录分析建立在胚胎干细胞基因水平研究的基础上,但是整个遗传基因水平上仍存在许多问题。因此,转录分析只有结合其他分析工具,如全基因组转录因子结合分析和全基因组表观遗传分析,才能更好的阐释胚胎干细胞转录调控的整个系统。然而,这些标记物除了出现在胚胎干细胞中,也出现在别的细胞中,例如肾细胞、造血干细胞、畸胎瘤等,更重要的是约60%左右的标记物是和肿瘤细胞的标志物重叠的<sup>[19-24]</sup>。由于肿瘤干细胞也能无限增殖的特性,这就为胚胎干细胞进一步的研究造成了障碍。

因此,我们希望通过噬菌体展示技术和His Pull-Down亲和作用,利用能够特异性结合hESC的12肽,寻找人胚胎干细胞(hESC)独特的表面标记物,达到鉴别和分离hESC的目的,甚至为干细胞的全能性的诠释提供基础。在前期的工作当中,本实验室通过噬菌体肽库筛选出了特异性结合hESC的一系列噬菌体<sup>[25]</sup>,并且对于这一系列的噬菌体进行了测序。本研究对这一系列的噬菌体进行了重筛选和噬菌体12肽的人工合成,得到诱饵多肽,通过诱饵多肽与膜蛋白的相互结合,找到了特异结合hESC多肽的特异膜表面标记蛋白。具体的试验流程如图1。

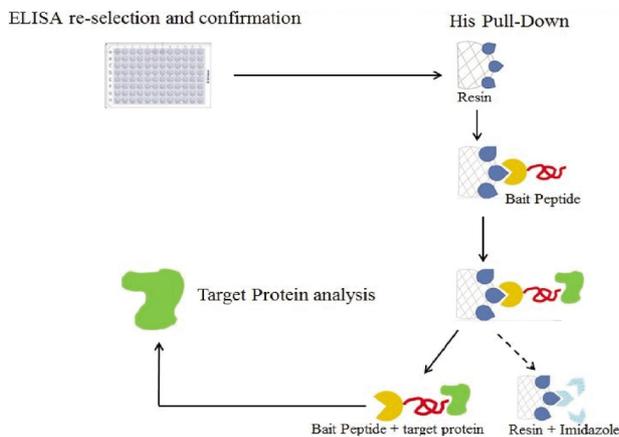


图1 实验流程图

Fig. 1 Experimental scheme

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

细胞株:hESC细胞株X-01来自于中国科学院干细胞库,滋养层细胞小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)细胞株CF-1购于上海斯丹赛公司。

培养基:DMEM/F12-Glutamax、bFGF、胶原酶IV、血清替代物(KSR)、胎牛血清(FBS)非必须氨基酸(NEAA)、双抗全部来

自于Gibico公司, $\beta$ 巯基乙醇来自sigma公司。培养基配方如下:

(1)MEF培养基:15%FBS,1%NEAA,0.1mmol/L $\beta$ -巯基乙醇,剩下用DMEM/F12-Glutamax补齐;

(2)X-01培养基:20%KSR,1%NEAA,4ng/mLbFGF,0.1mmol/L $\beta$ -巯基乙醇,剩下用DMEM/F12-Glutamax补齐。

其他试剂:BSA、多聚甲醛购于生工,HRP-M13抗体、邻苯二胺(OPD)来自GE公司,TRIzol来自Invitrogen。原始噬菌体12肽库由新英格兰生物实验室购买,His pull-down Cobalt树脂由Thermo提供,后期筛选的噬菌体为扩增产生;加poly-His(多组蛋白)标签的3个12多肽由上海强耀生物合成,引物由Invitrogen公司合成,蛋白测序由慧晶生物完成。

试剂盒:RT-PCR试剂盒购于TaKaRa,银染试剂盒由BIO-RAD公司购买,BCA蛋白浓度检测试剂盒以及膜蛋白提取试剂盒由Novagen公司购买。

材料:T25细胞培养瓶、15mL离心管BD公司提供。酶标仪由Thermo公司提供。

### 1.2 方法和步骤

1.2.1 胚胎干细胞的培养及传代 (1)在复苏X-01之前,先将CF-1快速的在37℃超净水中旋转复苏,再将冻存管中的细胞迅速吹散种植到装有MEF培养基的T25细胞培养瓶中,在37℃培养箱中生长1-2天,直到CF-1细胞贴满培养瓶底。(2)接着同样的办法,将X-01在37℃超净水中快速旋转复苏,并将其放入到盛有5mLDMEM的15mL离心管中,200 $\times$ g离心5min,将DEME吸除,并用X-01培养基(将X-01轻轻吹打成小团细胞,种植到铺有CF-1细胞的培养瓶中)。(3)每隔2天换液5mL,直到X-01细胞成长为大块的细胞团块(约10天),较为均匀的铺在T25培养瓶底达到约2.0-2.5 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞,此时将X-01进行消化以及传代或进行其他实验。(4)用胶原酶IV(1mL/10cm<sup>2</sup>)将X-01细胞消化10-15min并将消化下来的细胞200 $\times$ g离心5min,再将其分别吹散种植在三个新的铺有CF-1细胞的T25培养瓶中用于传代,或者将细胞稀释种植到96孔板中,达到约2.0-5.0 $\times$ 10<sup>4</sup>个细胞每孔(用于做ELISA)。如果需要分化的X-01细胞,直接将细胞种植在无CF-1细胞的培养瓶中(无滋养层培养)。

1.2.2 RT-PCR鉴定人胚胎干细胞特异性基因 将一瓶T25的X-01细胞(约1.0-2.0 $\times$ 10<sup>5</sup>个/mL)用1mL胶原酶IV裂解离心后,用2mLTRIzol处理细胞,并提取细胞的总RNA。用TaKaRa的RT-PCR逆转录扩增细胞的总cDNA。利用cDNA作为模板PCR扩增特异性序列,通过鉴定Sox2、Nanog、Oct4以及对照GADPH的表达(引物序列见表1),确定X-01的全能性。

1.2.3 全细胞酶联免疫法测定(ELISA) 首先,种植在96孔板中的人胚胎干细胞X-01,分化的X-01细胞以及对照细胞CF-1在37℃培养箱中培养1-2天,直到细胞盖满孔底。之后用4%的多聚甲醛固定细胞,室温放置15min。随后用PBS洗涤以及用1%的BSA37℃封闭1h后,加入之前筛选出来的噬菌体一共23组,每组三个平行试验,每孔约2 $\times$ 10<sup>4</sup>个噬菌体,37℃反应90min,之后加入HRP-M13抗体(1:5000)。最后加入底物显色液避光反应15min以及用浓硫酸终止,用酶标仪测出吸光度。

表 1 Sox2, Nanog, Oct4 及 GADPH 基因序列引物  
Table 1 Sox2, Nanog, Oct4 and GADPH primers

Primer name	Sequence 5'→ 3'
Sox2 Front	CGCCCCAGCAGACTTACACA
Sox2 Back	CTCTCTTTTGACCCCTCCCATTT
Nanog Front	TGAACCTCAGCTACAAACAGGTG
Nanog Back	AACTGCATGCAGGACTGCAGAG
Oct 4 Front	AGAAGGATGTGGTCCGAGTGTG
Oct 4 Back	CCACCCTTTGTGTTCCCAATTCC
GADPH Front	GTGGACCTGACCTGCCGTCT
GADPH Back	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT

1.2.4 提取膜蛋白以及检测膜蛋白浓度 在将一瓶生长到  $4.0-5.0 \times 10^5$  个 /mL 细胞的 X-01 细胞株进行传代后,大约 10 d 后,细胞的总数量达到  $1.0-3.0 \times 10^7$  个细胞后,用 2 mL 胶原酶 IV/ 瓶的量消化 T25 瓶中的细胞,并将其  $200 \times g, 5 \text{ min}$  离心,并用膜蛋白提取试剂盒提取总的膜蛋白。提取后的膜蛋白进行 BCA 蛋白浓度测定以及银染观察总的膜蛋白大致的种类。

1.2.5 His Pull-Down 将人工合成的 poly-his 标签 (具体合成方法见试剂说明) 的多肽按照试剂盒方法固定在 Cobalt 树脂上,随后加入适当稀释过的人胚胎干细胞(X-01)总膜蛋白,让多肽与膜蛋白之间进行亲和和结合反应,4℃ 旋转孵育过夜。最后将未结合的膜蛋白用洗涤缓冲液  $1300 \times g, 2 \text{ min}$  离心去除,用洗脱缓冲液 (咪唑) 将多肽与目标蛋白的复合物孵育 15 min 后,从树脂上  $1300 \times g, 2 \text{ min}$  离心洗脱下来,得到的目的洗脱液进行聚丙烯酰胺跑胶(SDS-PAGE)以及银染。

## 2 结果

### 2.1 人胚胎干细胞的培养

人胚胎干细胞复苏之后每个阶段的形态和大小都不尽相同,如图 2,从 A 到 C,随着培养时间的增长,细胞团块的大小逐步递增,并且逐步形成了明显的边界。分化后的细胞(采用无滋养层培养,促进人胚胎干细胞的分化)形态与未分化细胞形态有所区别,前者为狭长形且互相分散(图 2 中 D),后者(图 A-C)为球状体且相互紧密排列。

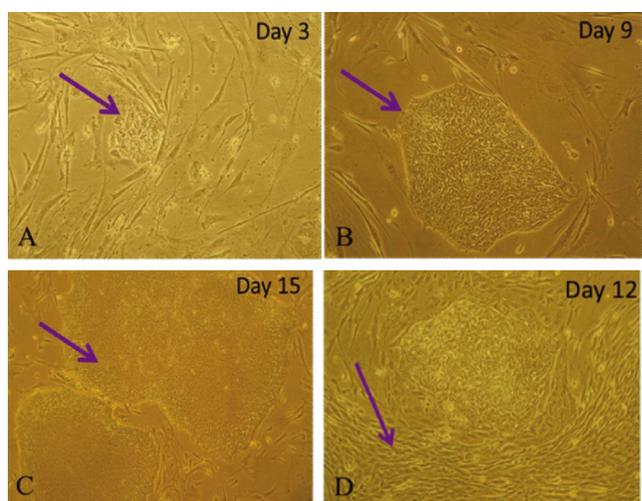


图 2 不同时期人胚胎干细胞(hESC)的形态  
Fig. 2 The shape of human embryonic stem cells in different

### 2.2 RT-PCR 鉴定人胚胎干细胞全能性

为了鉴定人胚胎干细胞的全能性,本实验对 hESC 的全能性因子,Sox2、Oct4 以及 Nanog 进行了检测,由图 3 可看出,在人胚胎干细胞中,这三个特异性基因有表达。从而证明了,在 T25 瓶中培养的 hESC 为未分化的具有全能性的人胚胎干细胞。

Marker Oct 4 Nanog Sox 2 GADPH

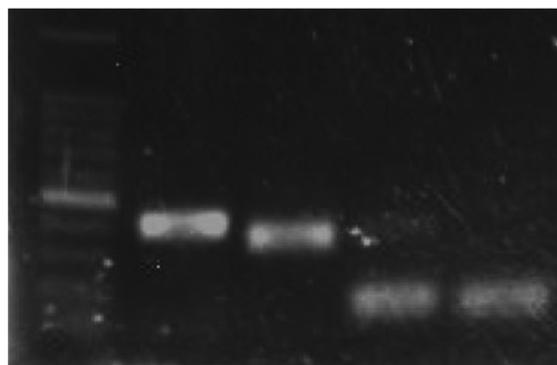


图 3 RT-PCR 结果显示  
Fig. 3 Result of RT-PCR

### 2.3 全细胞酶联免疫法测定(ELISA)

在 96 孔板中培养了 X-01 后,通过 ELISA 重新筛选对于 hESC 具有高亲和力的噬菌体,见图 4,纵向吸光度 A 表示亲和能力的大小,横向表示之前所筛选的一系列噬菌体多肽编号。由吸光度 A 的数值,可以看出,166 和 173 这两个噬菌体对于人胚胎干细胞的亲和力在筛选出来的 23 种噬菌体中处于最高的,并且通过比较未分化与分化的 hESC 结合多肽能力的差值 ( $\Delta X-01$ ,差值越大表明该多肽对人胚胎干细胞的亲和力越强) 和进行了显著性分析,其 P 值均小于 0.05,所以我们筛选这两个噬菌体并合成它们的特异性 12 肽用于后期 His Pull-Down 的研究。

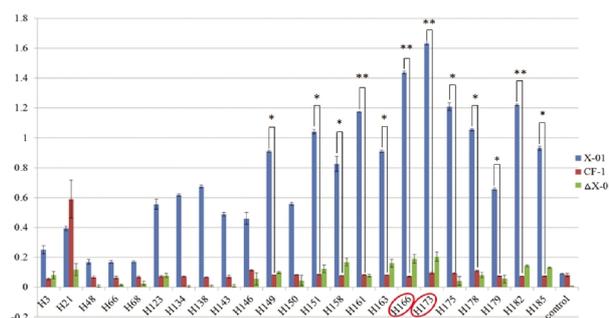


图 4 针对一系列多肽的全细胞 ELISA  
(显著性检验:\*\* 代表  $P < 0.05$ , \* 代表  $P < 0.1$ )

Fig. 4 Whole cell ELISA with a series poly-peptides  
(ANOVA test: \*\*  $P < 0.05$ ; \*  $P < 0.1$ )

### 2.4 膜蛋白的提取

用试剂盒将膜蛋白提取以后,用 BCA 标准曲线(图 5-A)检测 5 倍稀释的膜蛋白以及胞浆蛋白浓度,并且将提取的总膜蛋白和胞浆蛋白进行了 SDS-PAGE 以及银染,可以看出膜蛋白的浓度(5 倍稀释)为  $918.3384 \mu\text{g/mL}$ (图 5-B),另外在银染的聚丙烯酰胺胶上,有若干条带表明提取的膜蛋白是混合蛋白

(图 5-C,5-D)。

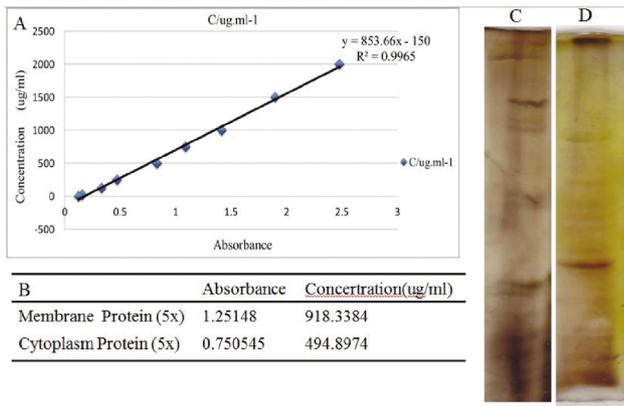


图 5 提取的人胚胎干细胞 (hESC)膜蛋白及胞浆蛋白

(A: BCA 标准曲线;B: 蛋白浓度;C:膜蛋白条带;D: 胞浆蛋白条带)

Fig.5 Extraction of hESC membrane proteins and cytoplasm proteins

(A: BCA standard curve; B: Protein concentration; C: Membrane proteins; D: Cytoplasm proteins)

### 2.5 His Pull-Down

将提取的膜蛋白与六 His 标签的两条十二多肽(表 2)进行孵育、反应以及亲和结合后,得到的洗脱后复合物的 SDS-PAGE 结果如图 6。随机序列和多肽 166 均没有捕获目标蛋白,只有多肽 173(VPA)捕获了一条目标蛋白(见红色标注)。这条蛋白可能就是潜在的人胚胎干细胞特异性的膜表面分子。

表 2 合成 his 标签的多肽序列及其他信息

Table 2 Sequence and other information of his-tagged poly-peptides

Name	Sequence N'→C'	Molecular Weight/Da	HPLC purity
random	SLHSQPRSWTAY GGG HHHHHH	2426.58	> 95%
166	HGAAWGTRTGHV GGG HHHHHH	2243.37	> 95%
173	VPATETAQAGHA GGG HHHHHH	2146.25	> 95%

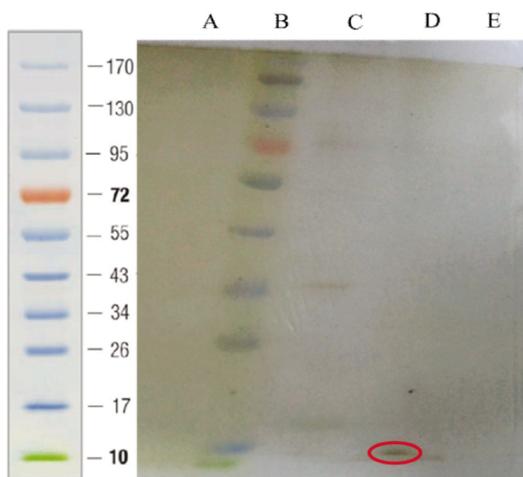


图 6 His Pull-Down 的 SDS-PAGE 电泳结果

(A: 随机多肽的靶标蛋白;B: marker;C: 未结合蛋白;D: 173 多肽的靶标蛋白;E: 166 多肽的靶标蛋白)

Fig. 6 The SDS-PAGE result of His Pull-Down

(A: Target protein of random; B: marker; C: unbinding protein; D: Target protein of 173 peptide; E: Target protein of 166 peptide)

### 2.6 质谱分析目标蛋白

通过将 SDS-PAGE 中的蛋白条带进行质谱分析以及 Mascot 数据库分析,得到了此目标蛋白与人类中一个未知蛋白有 40% 的覆盖率(见图 7-A),而且 NCBI 结果得出它属于 HECT 超级家族(见图 7-B),但是由于它是通过特异性结合人胚胎干细胞膜表面的多肽作为诱饵蛋白,使用 His Pull-Down 亲和层析方法获得,可以推断该未知蛋白是特异的表达在人胚胎干细胞膜上,可能与人胚胎干细胞的全能性这个功能相关。具体的功能需要做进一步的研究。



图 7 质谱结果搜索与 NCBI 分析

(A: Mascot 数据库分析; B: NCBI 分析)

Fig. 7 Mass spectrometry search and NCBI analysis

(A: Mascot analysis; B: NCBI analysis)

### 3 讨论

本文实验以寻找人胚胎干细胞表面特异标记物为目的,最终发现了一个潜在的表面特异分子—HECT 超级家族成员。HECT 超级家族具有多方面的功能,例如 Nedd4 家族就与线粒体遗传、细胞内吞反应的调控以及一系列跨膜蛋白和受体的聚集功能有关,同时还参与了细胞生长和繁殖的过程;HERC 家族与细胞膜运输以及囊泡转运的功能相关;还有一些其他 HECT 超家族的成员于肿瘤、DNA 损伤都有相关<sup>[26,27]</sup>。本实验所捕获到的目标蛋白是一个未知的蛋白,具体的相关功能需要进一步的研究。但由于家族蛋白的保守性,该未知蛋白可能有上述类似功能。进一步研究该蛋白功能有助于更准确地寻找人胚胎干细胞表面特异性的标记物以及研究与其相关的功能或信号传导过程。

另外,本实验中挑取了两个多肽作为诱饵蛋白,其中对于 166 多肽(HGAAWGTRTGHV),通过 His Pull-Down 方法没有成功获得它的靶标蛋白,这是该方法的不足。其原因可能是它的靶标蛋白在人胚胎干细胞中表达量很低,这样就需要培养更多的细胞以获取更多的膜蛋白,进而成功获取相应的靶标蛋白;或者它本身与人胚胎干细胞的亲和力不如 173 多肽强,在洗涤的过程中,容易洗脱,导致无法成功获得靶标蛋白。为了提高获取 166 多肽靶标蛋白成功率,可以尝试在该论文的实验方法基础上,在 His Pull-Down 实验过程的捕获靶标蛋白步骤结合光催化交联法(Photo-induced Cross-linking Method)<sup>[28]</sup>,使得

166 多肽在光的催化作用下与它的靶标蛋白形成共价交联,这样在洗涤步骤不会洗去结合力比较弱的靶标蛋白,提高了获得靶标蛋白的成功率。这个方法已经成功的用于筛选受体蛋白,比如 2012 年我国科学家李文辉研究员所带领的团队已经成功运用此方法寻找乙肝病毒的受体肝脏胆酸转运蛋白<sup>[29]</sup>。

同时,我们也应当看到,在控制胚胎干细胞分化的过程中具有不可控性,一些未完全分化和未分化的细胞对于多肽的结合能力有一些差异但不能依靠这个差异来决定分化程度,因此也需要我们更加深入的研究细胞状态或者是表面分子的细微变化,从而能够更准确的分离和应用人胚胎干细胞。

#### 参考文献(References)

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*, 1998, 282: 1145-1147
- [2] Shevinsky LH, Knowles BB, Damjanov I, et al. Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells[J]. *Cell*, 1982, 30: 697-705
- [3] Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F, et al. Stage-specific embryonic antigens (ssea-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells [J]. *The embo journal*, 1983, 2: 2355-2361
- [4] Draper JS, Pigott C, Thomson JA, et al. Surface antigens of human embryonic stem cells: Changes upon differentiation in culture [J]. *Journal of Anatomy*, 2002, 200: 249-258
- [5] Assou S, Le Carrouer T, Tondeur S, et al. A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas[J]. *Stem Cells*, 2007, 25: 961-973
- [6] Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R, et al. Gene expression in human embryonic stem cell lines: Unique molecular signature [J]. *Blood*, 2004, 103: 2956-2964
- [7] Lian QZ, Lye E, Yeo K S, et al. Derivation of clinically compliant mscs from cd105+,cd24-differentiated human escs[J]. *Stem Cells*, 2007, 25: 425-436
- [8] Puri RK, Bhattacharya B, Miura T, et al. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature[J]. *Blood*, 2004, 103: A1121-A1121
- [9] Skottman H, Mikkola M, Lundin K, et al. Gene expression signatures of seven individual human embryonic stem cell lines [J]. *Stem Cells*, 2005, 23: 1343-1356
- [10] Malbon CC. Frizzleds: New members of the superfamily of g-protein-coupled receptors[J]. *Frontiers in bioscience*, 2004, 9: 1048-1058
- [11] Paul Polakis. Wnt signaling and cancer [J]. *Genes & Development*, 2000, 22: 961-965
- [12] Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors [J]. *Genes & Development*, 2005, 19: 2783-2810
- [13] Li Z, Chen YG. Functions of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination[J]. *Experimental cell research*, 2013, 319(2): 113-119
- [14] Pesce M, Scholer HR. Control of totipotency and germline determination[J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2000, 55: 452-457
- [15] Pan G J, Chang Z Y, Scholer H R, et al. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4[J]. *Cell Research*, 2002, 12: 321-329
- [16] Koestenbauer S, Zech N H, Juch H, et al. Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells [J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2006, 55(3): 169-180
- [17] Boyer L A, Lee T I, Cole M F, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2005, 122(6): 947-956
- [18] Botquin V, Hess H, Fuhrmann G, et al. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by oct-4 and sox-2 [J]. *Genes & Development*, 1998, 12: 2073-2090
- [19] Fox N W, Damjanov I, Knowles B B, et al. Stage-specific embryonic antigen 3 as a marker of visceral extraembryonic endoderm [J]. *Developmental biology*, 1984, 103(1): 263-266
- [20] Kannagi R, Cochran N A, Ishigami F, et al. Stage-specific embryonic antigens (ssea-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells [J]. *The embo journal*, 1983, 2: 2355-2361
- [21] Yin A H, Miraglia S, Zanjani E D, et al. A novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells[J]. *Blood*, 1997, 90: 5002-5012
- [22] Wright M H, Calcagno A M, Salcido C D, et al. Brca1 breast tumors contain distinct cd44+/cd24- and cd133+ cells with cancer stem cell characteristics[J]. *Breast Cancer Research*, 2008, 10: R10
- [23] Horst D, Scheel S K, Liebmann S, et al. The cancer stem cell marker cd133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer [J]. *The Journal of Pathology*, 2009, 219: 427-434
- [24] Zhao W, Ji X, Zhang F, et al. Embryonic stem cell markers [J]. *Molecules*, 2012, 17(6): 6196-6236
- [25] Zhao W, Jin L, Yuan H, et al. Targeting human embryonic stem cells with quantum dot-conjugated phages [J]. *Scientific reports*, 2013, 3: 1343(3): 1-9
- [26] Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2009, 10(6): 398-409
- [27] Hochrainer K, Mayer H, Baranyi U, et al. The human HERC family of ubiquitin ligases: novel members, genomic organization, expression profiling, and evolutionary aspects[J]. *Genomics*, 2005, 85(2): 153-164
- [28] Preston G W, Wilson A J. Photo-induced covalent cross-linking for the analysis of biomolecular interactions [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(8): 3289-3301
- [29] Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus [J]. *eLife*, 2012, 1: e00049