

比格犬雌激素受体 β 四个剪接异构体的发现

许 琴^{1,2}, 董 翔², 李建瑛², 许永华², 任秀梅¹, 赵彦斌¹, 白杰英¹, 孙兆增¹, 曾 林¹, 胡仲明¹

(1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 兰州军区乌鲁木齐总医院动物实验科, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 在比格犬下丘脑-垂体-性腺轴上筛查雌激素受体 β 的剪接异构体。**方法** 针对 ER β mRNA CDS 序列的八个外显子, 两两外显子依次组合设计引物, 运用 PCR 法, 以比格犬下丘脑、垂体、卵巢、子宫组织 cDNA 为模板扩增相应序列, 测序后在 NCBI 网站比对, 确定是目的基因后, 用 DNAMAN 软件比对分析及手工校对, 获得 ER β 的剪接异构体。**结果** 获得了比格犬 ER β 的四个剪接异构体, 分别是第 4 外显子完整缺失的 ER β 剪接异构体 (缺失 300 bp), 部分第 4 与部分第 5 外显子组合缺失的两个组合型缺失的 ER β 剪接异构体 (各缺失 334 bp, 265 bp), 以及第七外显子完整缺失的 ER β 剪接异构体 (缺失 181 bp)。第 4 外显子完整缺失的剪接异构体和第 7 外显子完整缺失的剪接异构体获得了全长编码序列, 另两个剪接异构体为部分编码序列。**结论** 研究获得了比格犬 ER β 的四个剪接异构体, 为后续研究其在比格犬生殖调控中的作用机制打下了基础。

【关键词】 比格犬; 雌激素受体 β ; 剪接异构体

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 11-0033-08

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.011.007

Discovery of four splicing isoforms of Beagle estrogen receptor β

XU Qin^{1,2}, DONG Xiang², LI Jian-ying², XU Yong-hua², REN Xiu-mei¹, ZHAO Yan-bin¹,
BAI Jie-ying¹, SUN Zhao-zeng¹, ZENG Lin¹, HU Zhong-ming¹

(1. Experimental Animal Centre, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

2. Department of Animal Experiment, Urumqi General Hospital, Lanzhou Military District, Urumqi 830000, China.)

【Abstract】 Objective To screen the splicing isoforms of estrogen receptor β in the Beagle hypothalamic - pituitary - gonadal axis. **Methods** For ER β mRNA CDS sequence of eight exons, primers were designed confined to the CDS sequences of two sequential exons. Beagle hypothalamus, pituitary, ovary and uterus tissue cDNA were used as template, and corresponding sequences were amplified by PCR. PCR products were sequenced and aligned in the NCBI web site. The correct gene was then analyzed with DNAMAN comparative analysis software and handwork checking up, thus got the ER β splicing isoforms of Beagle. **Results** Four beagle ER beta splicing isomers were obtained: exon 4 complete skipping ER β isomer (300 bp missing), two kind of Beagle ER β isoforms with partial exon 4 and partial exon 5 complicated missing (isoform I 334 bp missing and isoform II 265 bp missing), and exon 7 complete missing ER β splicing isoforms (181 bp missing). Exon 4 complete skipping and exon 7 complete missing isomers had been obtained full length coding sequence, and the other two splicing isomers were partial coding sequence. **Conclusion** This project gained four ER β splicing isomers of Beagle, and that will lay an important foundation for further study of their roles in the Beagle reproductive regulation mechanism.

【Key words】 Beagles; Estrogen receptor β ; Splicing isoforms

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31172164; 31372271)。国家技术支撑计划 (2011BAI15B03)。

[作者简介] 许琴 (1974 -), 女, 博士, 专业: 实验动物生理生化, Email: xuqin740831@163.com。

[通讯作者] 胡仲明, 研究方向: 实验动物生理生化, Email: huzhongming2005@sina.com。

作为标准实验动物,比格犬在医药、公共卫生、生命科学以及军事医学研究领域得到了广泛的应用。但随着实验动物化时间的延长以及长期的封闭群繁殖饲养,我国比格犬种群中出现了不同程度的繁殖障碍。为解决上述生产中遇到的问题,对比格犬生殖生理进行研究很有必要。雌激素通过其受体在下丘脑-垂体-卵巢轴对雌性动物的生殖机能进行着周期性的调控。雌激素受体有三种亚型 α 、 β 、 γ (Estrogen receptor α , β , γ , ER α , ER β , ER γ), 其中 ER γ 仅存在于鱼类^[1]。有研究表明在不同生殖周期中,ER α 、ER β 的表达水平,表达时间及组织表达部位不同^[2],并且 ER α 敲除小鼠雌性不育,雄性繁殖力严重下降,ER β 敲除小鼠雌性与雄性能够繁殖,但产仔率降低,窝产仔数明显减少,并且已有研究表明 ER β 是一种雌激素依赖性肿瘤的抑制因子^[3-5],为了解 ER β 在比格犬下丘脑-垂体-性腺轴发挥的调控作用,研究团队自 2011 年以来,对比格犬生殖内分泌轴上 ER β 的剪接异构体存在情况进行了筛查^[6-7],发现了 ER β 的四个剪接异构体,现总结报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要仪器

PCR 扩增仪 (PTC-2000, BIO-RAD), 高速冷冻离心机 (3-18K, SIGMA), -80℃ 超低温冰箱 (NU-9483E, NUAIRE), 微量分光光度计 (NanaDrop 2000, Thermo), 核酸电泳仪 (ESP1001, amersham pharmacia biotech), 紫外凝胶成像仪 (ACI, UVP), 180℃ 干烤手术器械一套,移液器一套 (Eppendorf)。

1.1.2 主要试剂

Trizol 购自 Invitrogen 公司, DEPC 购自 Promega 公司, ReverTra-Ace 反转录试剂盒购自 TOYOBO 公司, pMD18-T Vector, LA Taq 酶, dNTPmix, 2 × GC buffer 购自大连宝生物公司 TaKaRa 产品, 标准分子量核酸 DNA Marker DL-2000 购自康为世纪公司, DNA 片段凝胶回收试剂盒, 质粒提取试剂盒为博迈德公司 BioFlux 产品, 其它试剂均由军事医学科学院条件处提供, 为进口分装或国产分析纯试剂。

1.1.3 菌种及实验动物

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自博迈德生物公司。

雌性价格犬 11 只 (9 只间情期犬, 编号为 1-9

号; 2 只发情期犬, 编号为 F1, F2), 18~20 kg, 由军事医学科学院实验动物中心提供【SCXK (军) 2012-001】, 取材在军事医学科学院实验动物中心实验室内进行【SYXK (军) 2012-005】。

1.2 实验方法

1.2.1 组织标本的获取

取材器械包高压灭菌后, 180℃ 干烤 8 h 以上备用, 组织冻存管 0.1% DEPC 水处理后高压灭菌备用。实验动物用速眠新 II 注射液 (1.5 mL/支), 按照 0.08~0.1 mL/kg 体重肌肉注射, 待动物麻醉瘫痪后, 颈动脉放血处死动物, 迅速留取下丘脑、垂体、子宫、卵巢组织标本, 于冻存管中液氮冻存。

1.2.2 引物设计

根据 NCBI 网站公布的比格犬雌激素受体- β mRNA CDS 区序列 (犬 ESR2 mRNA 24 转录本, gene 1968 bp, CDS 区 1593 bp, Gene ID: 403639) 设计两对引物: 真核 ER β -F: CCCAAGCTTATGGATATCAA AACTCTCCATCTAGCC; 真核 ER β -R: CGCGGATCCTCACTGAGATGTGGTCTTCTGGGAGC, 用于扩增全长序列。经限制性内切酶分析后, 在犬 ER β 一对引物的上游引入 Hind III, 下游引入 BamH I 内切酶位点, 为构建真核表达重组子, 在引物的下游均去除了终止密码子 TGA。

筛查比格犬 ER β 可能存在的两两外显子缺失的剪接异构体, 设计引物如下:

1.2.3 下丘脑、垂体、卵巢、子宫组织总 RNA 的提取

采用 Trizol 一步法提取比格犬下丘脑、垂体、卵巢、子宫总 RNA。微量分光光度计测定 A260、A280 的吸光度值, 准确定量总 RNA 的浓度和纯度。取 1 μ g RNA 用于 1% 琼脂糖电泳, 以检测 RNA 的完整性。将 RNA 储存于 -80℃ 冰箱备用。按照 ReverTra Ace (TOYOBO) 试剂盒操作说明书, 将总 RNA 反转录为 cDNA, 反转录产物保存于 -20℃ 冰箱中。

1.2.4 PCR 扩增 ER β 基因

ER β 基因扩增: 模板为 7 丘 (即 7 号犬下丘脑) cDNA, 扩增体系 25 μ L 如下: PCR 反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s; 56℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 2 min; 33 个循环; 最后延伸 8 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖电泳查看结果。

ER β 可能的两个外显子缺失筛查 PCR 反应: 模板为 ER β 全长 PCR 产物, 引物为针对可能的两个外显子缺失所设计, 反应体系同 ER β 基因扩增体系。

引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度	针对的外显子
Exon 1-3F	ATGGATATCAAAAACCTCTCCA	555 bp(1-555)	1/2/两者
Exon 1-3R	GCATATGTAATCATTATG		
Exon1-4F	CCTGTAAACAGAGAGACACTG	408 bp(352-759)	2/3/两者
Exon1-4R	GGTCACGTGCCACCACTT		
Exon2-5F	TGGTCCTGTGAAGGATGTAAGGCC	477 bp(490-966)	3/4/两者
Exon2-5R	GAGCTCCACAAAGCCTGGAAT		
Exon3-6F	GTGAAGTGTGGCTCCCGGAGA	459 bp(643-1101)	4/5/两者
Exon3-6R	CCCCTCATCCCTGTCCAG		
Exon4-7F	TTCACCGAGGCCTCCATG	411bp(865-1275)	5/6/两者
Exon4-7R	CTTCGGGCTGCTCTCCGCCTCCTG		
Exon 5-8F	GACCACCCGGCAAGCTCATC	432 bp(1045-1476)	6/7/两者
Exon 5-8R	CAGCAGCAGGTCGTAGACTGGGAC		
Exon6-8F	TCCGTAGAAGGAATTCTGGAA	402 bp(1105-1506)	7/8/两者
Exon6-8R	CCCGCGGAGTGTGTGCGC		
Exon7-8F	AAGGCCATGGTCTCTCACTCC	393 bp(1201-1593)	7/8/两者
Exon7-8R	TCACTGAGATGTGCTCTTCTG		

PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s;56℃退火 30 s;72℃延伸 30 s;33 个循环;最后延伸 8 min。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳查看结果。

1.2.5 PCR 扩增产物的纯化

PCR 扩增产物的纯化按照康为世纪公司 DNA 胶回收试剂盒回收相应目的片段,按照试剂盒说明书进行。纯化后的 PCR 产物与 pMD-18T 载体连接,16℃连接过夜。连接产物参照博迈德公司 DH5α 感受态细胞操作步骤进行转化。菌液 PCR 鉴定阳性克隆。初步鉴定为阳性的菌液,提取质粒送北京中科西林测序部测序鉴定。

2 实验结果

2.1 比格犬下丘脑、垂体、卵巢、子宫组织总 RNA 的提取

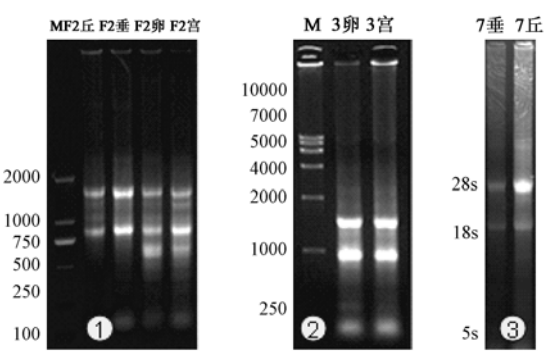
比格犬下丘脑、垂体、卵巢、子宫组织总 RNA 提取(图 1),ERβ 的扩增及菌液鉴定(图 2)。

比格犬下丘脑、垂体、卵巢、子宫组织总 RNA 的浓度测定结果见表 1。

表 1 下丘脑、垂体、卵巢、子宫总 RNA 浓度
Tab.1 Total RNA concentration of hypothalamus pituitary ovary and uterus of beagle dog

犬号/组织	总 RNA 浓度 ng/μL	A260/A280	A260/A230
F2 犬			
下丘脑	1714.8	1.98	1.94
垂体	1161.7	1.97	1.99
卵巢	3489.5	1.99	1.94
子宫	4611.4	1.96	1.78
3 号犬			
卵巢	711.2	1.99	2.07
子宫	806.4	1.98	1.68
7 号犬			
垂体	209.7	2.00	1.98
下丘脑	795.8	1.95	2.33

由图 1 及表 1 中结果可见,提取的组织总 RNA



注:①F2 犬下丘脑、垂体、卵巢、子宫,
M: DL2000 DNA 标准分子量;②3 号犬卵巢与子宫,
M: DL10000 DNA 分子量标准;③7 号犬垂体与下丘脑。

图 1 比格犬组织总 RNA

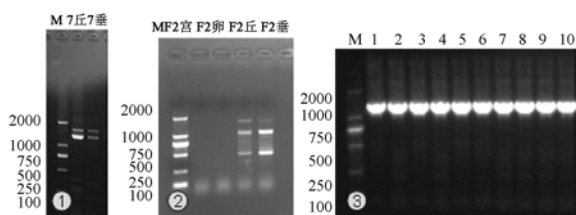
Note:① from F2 dog, M: DL2000 DNA Marker;
② from NO. 3 dog, M: DL10000 DNA Marker;
③ from NO. 7 dog.

Fig.1 Total RNA of hypothalamus, pituitary, ovary and uterus of Beagles

1% 琼脂糖电泳中 28s 和 18s 两条核糖体 RNA 条带清晰可见,比较完整,浓度测量纯度较高,满足后续基因扩增的要求。经过预实验确定,以 F2 丘(F2 犬下丘脑 cDNA)为模板扩增 ERβ mRNA,以 F2 垂(F2 发情期犬垂体)、7 丘(7 号犬下丘脑)cDNA 为模板进行 ERβ 可能存在的两个外显子缺失剪接异构体的筛查。

2.2 ERβ 基因测序结果

以 7 号犬下丘脑、垂体,2 号发情犬(F2)下丘脑、垂体为模板进行扩大体积扩增,均在 1000 bp ~ 2000 bp 之间有两条带,经比对两条带都是比格犬 ERβ 24 转录本 mRNA 序列,产物长度分别为 1593 bp、1293 bp(比对结果此文未列出)。分析 ERβ₁₅₉₃ 与 ERβ₁₂₉₃ 的 mRNA 序列,后者在 ERβ₁₅₉₃ 第一外显



注:①7 号犬下丘脑,垂体;② F2 犬子宫,卵巢,下丘脑,垂体;③PCR 扩增产物菌液鉴定 7 号犬垂体与下丘脑;①②③中 M 均为 DL2000 DNA 分子量标准。

图 2 比格犬 ERβ 的扩增与鉴定

Note:① From hypothalamus, pituitary, ovary and uterus of F2 dog; ② From ovary and uterus of No. 3 dog, pituitary and hypothalamus of No. 7 dog; ③ Identification of ERβ clones; M in ①②③ are the labels of DL2000 DNA Marker.

Fig. 2 ERβ genes PCR and identification of Beagles

子 ATG 起始密码子之前增加 63 bp 碱基,为载体序列,并且在第 656-955 位缺失 300 bp,所缺失部分

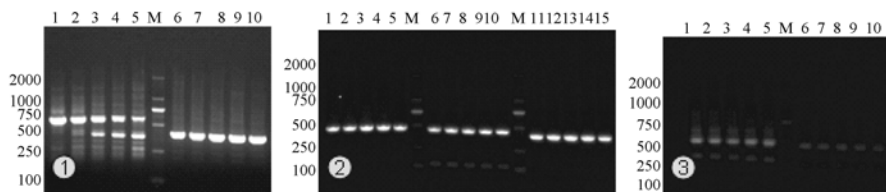
恰好是 ERβ₁₅₉₃ 的第四外显子的完整部分,推测是 ERβ₁₅₉₃ 的一个剪接异构体。

2.3 ERβ 可能的两两外显子缺失筛查结果

2.3.1 引物筛查及可能的的外显子缺失异构体片段的筛查

所有引物以相同的模板,根据引物的 T_m 值,设计温度梯度进行温度梯度 PCR,根据扩增产物对引物进行筛查(图 3)。

由扩增电泳图可知,Exon1-4 在 48℃~58℃, Exon2-5 在 51℃~61℃, Exon4-7 在 52℃~64℃ 的温度梯度内的扩增产物均为单一条带,或主带之外有非常弱的非特异扩增带(如 1-4),但不能后用于后续的回收纯化连接及转化,所以不能用于后续的可能的的外显子缺失型的剪切异构体的筛查,Exon1-3, Exon3-6, Exon5-8, Exon6-8 可用于后续的筛查。用后面的这四对引物,由其最适扩增条件进行新一轮扩增(图 4-①)。

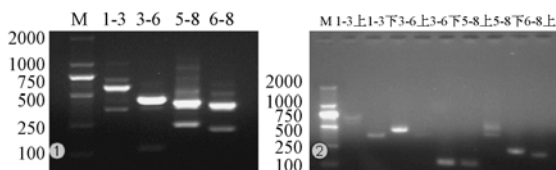


注:①引物 1-3,1-4 温度梯度筛查:1~5 由引物 Exon1-3 扩增,6~10 由引物 Exon1-4 扩增;②引物 2-5,3-6,4-7 温度梯度筛查:1~5 由引物 Exon2-5 扩增,6~10 由引物 Exon3-6 扩增,11~15 由引物 Exon4-7 扩增;③引物 5-8,6-8 温度梯度筛查:1~5 由引物 Exon5-8 扩增,6~10 由引物 6-8 扩增。M. DM2000 DNA 标准分子量。

图 3 针对两两外显子组合的引物温度梯度 PCR 筛选

Note:①1~5 from primer Exon1-3, 6~10 from primer Exon1-4; ②1~5 from primer Exon2-5, 6~10 from primer Exon3-6, 11~15 from primer Exon4-7; ③1~5 from primer Exon5-8, 6~10 from primer Exon6-8; M. DM2000 DNA marker.

Fig. 3 Temperature gradient PCR screening of primers for assorted ERβ Exons



注:1-3,3-6,5-8,6-8 为引物代码,M. DM2000 DNA 标准分子量。

图 4 Exon1-3, Exon3-6, Exon5-8, Exon6-8 PCR 产物及纯化

Note:1-3, 3-6, 5-8, 6-8 represent primers, M. DM2000 DNA marker.

Fig. 4 PCR products from primer Exon1-3, Exon3-6, Exon5-8 and Exon6-8 and their purification

Exon1-3 扩增产物主带为 555 bp,与预期结果一致,主带之上、之下各有一条可回收的非特异带;1

-3 上、1-3 下;Exon3-6 扩增产物主带为 459 bp,与预期结果一致,主带之下有一条可回收的非特异带;3-6 下;Exon5-8 扩增产物主带为 432 bp,与预期结果一致,主带之下有一条明显的非特异带;5-8 下;Exon6-8 扩增产物主带为 402 bp,与预期结果一致,主带之下也有一条明显的非特异带;6-8 下。将所扩增出的条带进行回收纯化(见图 4-②),并测序比对鉴定。

2.3.2 ERβ 外显子缺失异构体片段的测序比对

由四对引物回收纯化后的产物,测序后在 NCBI 网站上进行比对,均为比格犬 ERβ mRNA 部分 CDS 序列,经 DNDMAN 软件比对和手动校对后,获得了比格犬 ERβ 的 4 个剪接异构体的部分序列。

Exon3-6 引物所辖定的主带序列与 3-6 下产

物 125 bp 运用 DNAMAN 软件比对后,有部分错码,经手动校对,结果发现部分第 4 外显子与部分第 5 外显子缺失,缺失 334 bp,缺失段为第 4 外显子 289

bp(阴影标示)和第 5 外显子 45 bp(下划线标示),是比格犬 ER β 的一种剪接异构体形式,比对结果见图 5,图 6。

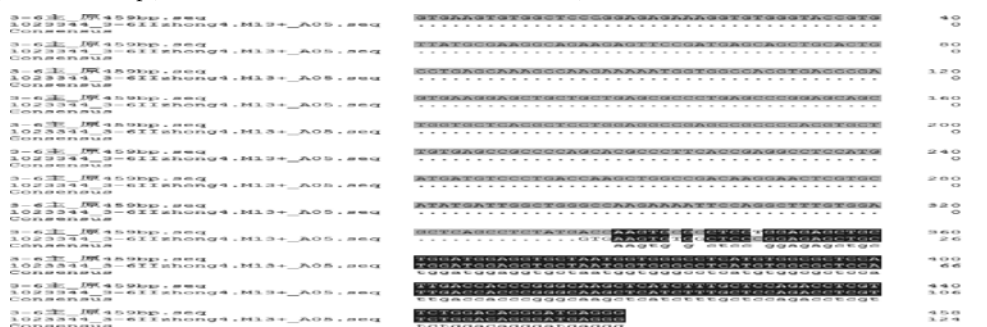


图 5 部分第 4 与部分第 5 外显子缺失的 DNAMAN 比对

Fig. 5 Partial 4th and partial 5th exons deletion analysed with DNAMAN software



图 6 部分第 4 与部分第 5 外显子缺失的手动比对

Fig. 6 Partial 4th and partial 5th exons deletion analysed with manual alignment

Exon3 - 6 主带与 3 - 6 下 194 bp 产物运用 DNAMAN 软件比对后有部分乱码,经手动校对发现 265 bp 缺失,缺失段为部分第四外显子(163 bp,阴影标示部分)与部分第五外显子(102 bp,下划线标示部分)。结果发现是另一种部分第 4 与部分第 5 外显子组合缺失型的比格犬 ER β 剪接异构体形式,比对结果见图 7,图 8。

Exon3 - 6 主带与 3 - 6 下 159 bp 产物运用 DNAMAN 软件比对后也出现部分乱码,经手动校对

发现 300 bp 缺失,缺失段为完整的第 4 外显子序列,结合 ER β 主基因的扩增,及 ER β_{1293} 的出现可判定 ER β 第四外显子缺失是比格犬 ER β 基因的又一种剪接异构体形式,图 9,图 10。

Exon5 - 8 主带(432 bp)与 5 - 8 下回收产物(251 bp)运用 DNAMAN 比对时也出现部分序列乱码,经手工校对后发现了比格犬 ER β 的第 4 种剪接异构体,选择性剪接发生在第 7 外显子上,缺失 181 bp,是第 7 外显子编码序列的完整缺失,比对结果见

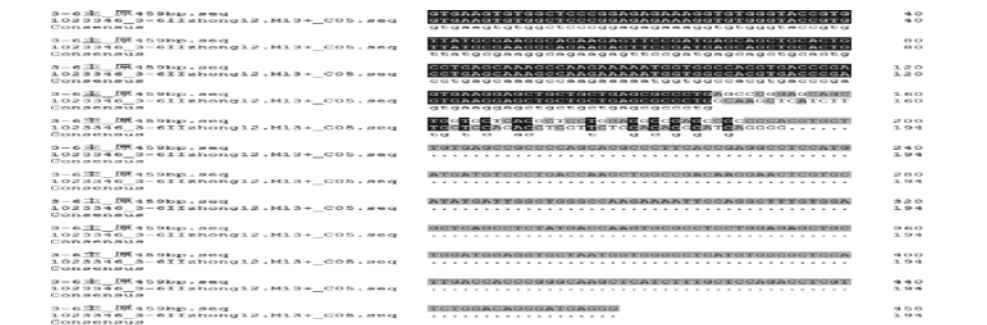


图 7 部分第 4 与部分第 5 外显子缺失的 DNAMAN 比对

Fig. 7 Partial 4th and partial 5th exons deletion analysed with DNAMAN software

```

3-6主_原459bp.seq      GTGAAGTGTG GCTCCCGGAG AGAAAGGTGT GGGTACCGTG TTATGCGAAG
3-6IIzhong12.M13+.seq  GTGAAGTGTG GCTCCCGGAG AGAAAGGTGT GGGTACCGTG TTATGCGAAG

GCAGAAAGAGT TCGATGAGC AGCTGCACCTG CCTGAGCAAA GCCAAGAAAA ATGGTGCCCA
GCAGAAAGAGT TCGATGAGC AGCTGCACCTG CCTGAGCAAA GCCAAGAAAA ATGGTGCCCA

CGTGACCGCA GTGAAGGAGC TGCTGCTGAG CGCCCTGAGC CCGGAGCAGC TGGTGCTCAC
CGTGACCGCA GTGAAGGAGC TGCTGCTGAG CGCCCTGAGC CCGGAGCAGC TGGTGCTCAC

GCTCCTGGAG GCGGAGCCGC OCCACGTGCT TGTGAGCCGC OCCAGCAGC CCTTCACGA
GCTCCTGGAG GCGGAGCCGC OCCACGTGCT TGTGAGCCGC OCCAGCAGC CCTTCACGA

GGCTTCCATG ATGATGTCC TGAOCAGCT GCGCGACAG GAACTCGTGC ATATGATTGG
GGCTTCCATG ATGATGTCC TGAOCAGCT GCGCGACAG GAACTCGTGC ATATGATTGG

CTGGGCCAAG AAAATTCAG GCTTTGTGA GCTCAGCCTC TATGACCAAG TCGGCTCTCT
CTGGGCCAAG AAAATTCAG GCTTTGTGA GCTCAGCCTC TATGACCAAG TCGGCTCTCT

GGAGAGCTGC TGGATGAGG TGCTAATGCT GGGCCTCATG TGGGCTCCA TTGAOACCC
GGAGAGCTGC TGGATGAGG TGCTAATGCT GGGCCTCATG TGGGCTCCA TTGAOACCC

GGCAAGCTC ATCTTTGCTC CAGACCTCGT TCTGGACAGG GATGAGGGG +
--GCAAGCTC ATCTTTGCTC CAGACCTCGT TCTGGACAGG GATGAGGGG +

```

图 8 部分第 4 与部分第 5 外显子缺失的手动比对

Fig. 8 Partial 4th and partial 5th exons deletion analysed with manual alignment

图 9 第四外显子完整缺失 DNAMAN 软件比对

Fig. 9 4th exon complete deletion analysed with DNAMAN software

```

3-6主_原459bp.seq      GTGAAGTGTG GCTCCCGGAG AGAAAGGTGT GGGTACCGTG TTATGCGAAG
3-6IIzhong12.M13+.seq  GTGAAGTGTG GCTCCCGGAG AGAAAGGTGT GGGTACCGTG TT-----

GCAGAAAGAGT TCGATGAGC AGCTGCACCTG CCTGAGCAAA GCCAAGAAAA ATGGTGCCCA
GCAGAAAGAGT TCGATGAGC AGCTGCACCTG CCTGAGCAAA GCCAAGAAAA ATGGTGCCCA

CGTGACCGCA GTGAAGGAGC TGCTGCTGAG CGCCCTGAGC CCGGAGCAGC TGGTGCTCAC
CGTGACCGCA GTGAAGGAGC TGCTGCTGAG CGCCCTGAGC CCGGAGCAGC TGGTGCTCAC

GCTCCTGGAG GCGGAGCCGC OCCACGTGCT TGTGAGCCGC OCCAGCAGC CCTTCACGA
GCTCCTGGAG GCGGAGCCGC OCCACGTGCT TGTGAGCCGC OCCAGCAGC CCTTCACGA

GGCTTCCATG ATGATGTCC TGAOCAGCT GCGCGACAG GAACTCGTGC ATATGATTGG
GGCTTCCATG ATGATGTCC TGAOCAGCT GCGCGACAG GAACTCGTGC ATATGATTGG

CTGGGCCAAG AAAATTCAG GCTTTGTGA GCTCAGCCTC TATGACCAAG TCGGCTCTCT
CTGGGCCAAG AAAATTCAG GCTTTGTGA GCTCAGCCTC TATGACCAAG TCGGCTCTCT

GGAGAGCTGC TGGATGAGG TGCTAATGCT GGGCCTCATG TGGGCTCCA TTGAOACCC
GGAGAGCTGC TGGATGAGG TGCTAATGCT GGGCCTCATG TGGGCTCCA TTGAOACCC

GGCAAGCTC ATCTTTGCTC CAGACCTCGT TCTGGACAGG GATGAGGGG +
GGCAAGCTC ATCTTTGCTC CAGACCTCGT TCTGGACAGG GATGAGGGG +

```

图 10 第四外显子完整缺失的手动比对

Fig. 10 4th exon complete deletion analysed with manual alignment

图 11 第七外显子完整缺失的 DNAMAN 软件比对

Fig. 11 7th exon complete deletion analysed with DNAMAN software sequence alignment

图 11, 图 12。

Exon6-8 主与 6-8 下比对也发现了第七外显

子(181 bp)的完整缺失,是 ERβ 基因的第七外显子完整缺失型剪切异构体,比对结果见图 13。经 5'、3'

```

5-8原_432bp.seq GACCAACCGG GCAAGCTCAT CTTTGCTCCA GACCTCGTTC TGGACAGGGA
5-8原_432bp.seq GACCAACCGG GCAAGCTCAT CTTTGCTCCA GACCTCGTTC TGGACAGGGA

TGAGGGGAAA TGCGTAGAAG GAATTCGGA AATCTTCGAC ATGCTCTTGG CAACAACCTTC
TGAGGGGAAA TGCGTAGAAG GAATTCGGA AATCTTCGAC ATGCTCTTGG CAACAACCTTC

AAGGTTTGGT GAGTTAAAC TCCAACACAA AGAGTATCTC TG TGTCAGG CCATGGTCTT
AAGGTTTGGT GAGTTAAAC TCCAACACAA AGAGTATCTC TG TGTCAGG CCATGGTCTT

CCTCAACTCC AGTATGAOC CTCTGCTGC CGCGGCGCAG GAGCGGAGAG GCAGCCGGAA
CCTCAACTCC A-----

GCTGAGCCAC TTGCTCAAG GGTGAOCGA CGCGCTGCTC TGGTGATCC CCAAGAGCGG
-----

GATTGCTCC CAGCAGCAGC CGTGCCTT GGCACACCTC CTGATGCTCC TCTCGCACTT
-----

GAGACAGGCC AGTAACAAGG GCATGGAACA CTGCTCAAC ATGAAGTGCA AAAACGTGGT
-----
--TAACAAGG CATGGAACA CTGCTCAAC ATGAAGTGCA AAAACGTGGT

CCAGTCTAC GAOTGCTGC TG
CCAGTCTAC GAOTGCTGC TG

```

图 12 第七外显子完整缺失的手动比对

Fig. 12 7th exon complete deletion analysed with manual sequence alignment

```

3.022223 6-8XIA6.M13+_H10.SEQ 40
6-8原402bp.SEQ 40
Consensus 40
3.022223 6-8XIA6.M13+_H10.SEQ 80
6-8原402bp.SEQ 80
Consensus 80
3.022223 6-8XIA6.M13+_H10.SEQ 120
6-8原402bp.SEQ 120
Consensus 120
3.022223 6-8XIA6.M13+_H10.SEQ 160
6-8原402bp.SEQ 160
Consensus 160
3.022223 6-8XIA6.M13+_H10.SEQ 200
6-8原402bp.SEQ 200
Consensus 200
3.022223 6-8XIA6.M13+_H10.SEQ 240
6-8原402bp.SEQ 240
Consensus 240
3.022223 6-8XIA6.M13+_H10.SEQ 280
6-8原402bp.SEQ 280
Consensus 280
3.022223 6-8XIA6.M13+_H10.SEQ 320
6-8原402bp.SEQ 320
Consensus 320
3.022223 6-8XIA6.M13+_H10.SEQ 360
6-8原402bp.SEQ 360
Consensus 360
3.022223 6-8XIA6.M13+_H10.SEQ 400
6-8原402bp.SEQ 400
Consensus 400
3.022223 6-8XIA6.M13+_H10.SEQ 440
6-8原402bp.SEQ 440
Consensus 440

```

图 13 第 7 外显子完整缺失(引物 Exon6-8)

Fig. 13 7th exon complete deletion (Primer Exon6-8)

RACE 获得了比格犬 ERβ 第七外显子缺失剪切异构体的全长编码序列 ERβ₁₂₅₇,因第七外显子的缺失使主基因发生了移码突变,翻译提前终止(测序结果此文未列出)。

结合 DNAMAN 软件比对及手动校对结果,应用所涉及的两两筛查引物,本实验共筛查出了比格犬 ERβ 的四个剪接异构体,分别为:第 4 外显子完整缺失型剪接体;第 4 外显子缺失 289 bp 与第 5 外显子缺失 45 bp(总计缺失 334 bp)的组合缺失型剪接体 I;第 4 外显子缺失 163 bp 与第 5 外显子缺失 102 bp(总计缺失 265 bp)的组合缺失型剪接体 II;第 7 外显子完整缺失型剪接体。对第 4 外显子完整缺失及第 7 外显子完整缺失的剪接异构体,研究小组通过 5'-3'RACE 获得了全长序列,并构建了真核表达重组子,对其表达及功能进行了系列的研究^[8-9],而对于第 4 与第 5 外显子部分缺失的两种组合型缺失剪接异构体,本研究仅发现了部分编码序列,并非全长 CDS 序列。

3 讨论

比格犬 ERβ 位于 8 号染色体上(XM_861041.2, gene ID:403639),全长 1968 bp, CDS 区 1593 bp,编码 530 个氨基酸(aa)^[10]。本实验在扩

增比格犬 ERβ 全长序列时在主带之下有一条明显条带,将两条带均回收纯化克隆,得到两个产物,一为 ERβ₁₅₉₃,另一为 ERβ₁₂₉₃,前者是比格犬野生型的 ERβ,后者是比格犬 ERβ 的一种剪接异构体,其第四外显子完整缺失。

针对 ERβ 的每一个外显子,两两顺次组合设计引物(每对引物包含两个完整的外显子),进行扩增,对只能扩增出单一条带的引物进行剔除,而对除目的条带外,还能扩增出比较明显的可以回收的非特异条带(也可能是 ERβ 的一种剪接异构体)的引物,进行扩大体积扩增并回收纯化克隆产物,测序后在 NCBI 网站比对,结果确定是目的基因的,再与主带进行比对分析,如此我们得到了第 4 外显子完整缺失的 ERβ 剪接异构体(缺失 300 bp),部分第 4 与部分第 5 外显子组合缺失的两个组合型缺失的 ERβ 剪接异构体(各缺失 334 bp,265 bp),以及第七外显子完整缺失的 ERβ 剪接异构体(缺失 181 bp),根据实验分析,及其它种属的相关文献报道^[11-16],比格犬 ERβ 还存在其它形式的剪接异构体,但因在不同的生理条件或者病理条件、不同的发育时期、不同的组织或不同的细胞内,其表达时期及表达水平不同,所以对这些情况还需进行扩大碱基序列再次排查,该项工作课题组其它研究成员

正在进行。

本研究中扩增出的比格犬 ER β mRNA CDS 区第七外显子(181 bp)完整缺失,导致 ER β 阅读框移位,使其在终止密码子之前引入了 10 个非 ER β 编码的氨基酸残基。该发现与 Fitzgerald SD 在 ER α 上的发现相似^[17]。García Pedrero 等^[18]在多种正常组织和肿瘤中分离出了 ER α 的一种剪切异构体 ER Δ E7, ER Δ E7 第七外显子完整缺失,失去了与 p160 辅激活因子(如 SRC-1, AIB1)的雌激素依赖性的相互作用,ER Δ E7 能以激素依赖的形式与 ER α 和 ER β 形成异源二聚体。本研究发现第七外显子完整缺失的 ER β 剪接异构体,所缺失的相应氨基酸编码序列为 409 – 469aa,是野生型 ER β 配体结合区 298 – 469aa 中的部分序列,部分配体结合序列的缺失,是否引起该剪接异构体配体结合能力及信号转导途径的改变,以及缺失序列之后掺入的十个氨基酸残基与野生型 ER β 的配体结合区是否具有同源性等,对此还需进一步进行实验验证。

参考文献:

- [1] Gamba L, Cubedo N, Ghysen A, *et al.* Estrogen receptor ESRI controls cell migration by repressing chemokine receptor CXCR4 in the zebrafish posterior lateral line system[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(14):6358 – 6363.
- [2] Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, *et al.* Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta [J]. *Endocrinology*, 1997, 138(3):8632 – 8701.
- [3] Couse JF, Curtis Hewitt S, Korach KS. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 74:287 – 296.
- [4] Kregge JH, Hodgin JB, Couse JF, *et al.* Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15677 – 15682.
- [5] Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, *et al.* From the cover: abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:14737 – 14741.
- [6] 孔德强,李爱学,曾林,等. 一种比格犬雌二醇 β 受体剪切异构体的克隆和序列分析[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(7):44 – 47.
- [7] 任秀梅,赵彦斌,孙兆增,等. 比格犬一种新雌激素 β 受体可变剪切体的克隆及鉴定[J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(7):36 – 39.
- [8] 甘艺,钟睿,任秀梅,等. 比格犬 ER β_{1293} 基因真核载体的构建及其在 HEK293T 细胞中的表达和定位[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(2):7 – 10, 15.
- [9] 钟睿,甘艺,赵彦斌,等. 比格犬雌激素 β 受体 RNA 干扰实验细胞及 PCR 检测引物的筛选[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(2):42 – 45, 51.
- [10] www.ncbi.nlm.nih.gov
- [11] Poola I, Abraham J, Liu A. Estrogen receptor β splice variant mRNAs are differentially altered during breast carcinogenesis [J]. *J Steroid Biochem Mol Bio*, 2002, 182:169 – 179.
- [12] Poola I, Abraham J, Baldwin K, *et al.* Identification of ten exon deleted ER β mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues; alternate splicing pattern of estrogen receptor β mRNA is distinct from that of estrogen receptor α . *FEBS Lett*, 2002, 516: 133 – 138.
- [13] Friend K, Ang L, Shupnik M. Estrogen regulates the expression of several different estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 93:5925 – 5930.
- [14] Gunawan A, Kaewmala K, Uddin MJ, *et al.* Association study and expression analysis of porcine ESRI as a candidate gene for boar fertility and sperm quality[J]. *Anim Reprod Sci*, 2011, 128(1 – 4):11 – 21.
- [15] Griffin C, Flouriot G, Buck VS, *et al.* Identification of Novel Chicken Estrogen Receptor- α Messenger Ribonucleic Acid Isoforms Generated by Alternative Splicing and Promoter Usage [J]. *Endo*, 1998, 139(11):4614 – 4625.
- [16] Oliveira AG, Dornas RA, Mahecha GA, *et al.* Occurrence and cellular distribution of estrogen receptors ER α and ER β in the testis and epididymal region of roosters [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2011, 170(3): 597 – 603.
- [17] Fitzgerald SD, Allred D, *et al.* Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors [J]. *Cancer Res*, 1992, 52:483 – 486.
- [18] García Pedrero, Zuazua Pedro, Martínez-Campa Carlos, *et al.* The Naturally Occurring Variant of Estrogen Receptor (ER) ER Δ E7 Suppresses Estrogen-Dependent Transcriptional Activation by Both Wild-Type ER α and ER β [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(7):2967 – 2976.

[修回日期]2014-10-20