

比格犬一种新雌激素 β 受体可变剪切体的克隆及鉴定

任秀梅^{1,2}, 赵彦斌², 孙兆增², 许 琴³, 白杰英², 刘 一²,
胡仲明², 靳 朝¹, 曾 林²

(1. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071;
3. 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 对比格犬雌激素 β 受体的新剪切体进行克隆与鉴定。**方法** 以比格犬垂体组织为模板, 用 RT-PCR 方法从垂体组织中扩增雌激素 β 受体, 电泳确定新剪切体的存在情况, 并对其进行克隆和序列测定。**结果** 利用设计的引物得到 2 条明显电泳条带, 通过测序表明其中一种为新的可变剪切体, 目前此可变剪切体尚未见报道。**结论** 得到了雌激素 β 受体的一种新的可变剪切体, 有助于研究雌激素 β 受体可变剪切体的功能及其在生殖调控过程中的作用。

【关键词】 比格犬; 雌激素受体 β ; 基因克隆; 可变剪切体

【中图分类号】 Q95-331; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)07-0036-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.007.010

Cloning and Identification of a New Alternatively Spliced Variants of Beagles Estrogen Receptor β

REN Xiu-mei^{1,2}, ZHAO Yan-bin², SUN Zhao-zeng², XU Qin³, BAI Jie-ying²,
LIU Yi², HU Zhong-ming², JIN Zhao¹, ZENG Lin²

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;

2. Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China;

3. Department of Laboratory Animals, Urumqi General Hospital, Lanzhou Military Districts, Urumqi 830000, China)

【Abstract】 Objective To clone and identify alternatively spliced variants of beagles estrogen receptor β . **Methods** By RT-PCR analysis, we identified the existence of a new splice variant of beagles estrogen receptor β using Beagles pituitary organization as a template, to determine the existence of a new spliced variant by electrophoresis and cloned and sequenced. **Results** Using primers designed to get two obvious electrophoresis with sequencing showed that one of the missing splicing, this alternatively spliced variants has not been reported. **Conclusion** We get a new estrogen receptor β , this will help to study protein-coding function of a variety of estrogen receptor variable spliced and the role in the process of reproductive regulation.

【Key words】 Beagles; Estrogen receptor β ; Cloning; Alternatively spliced variants

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(31172164); 十二五重大专项“高致病病原动物模型研究(2012ZX10004502)。

【作者简介】 共同第一作者: 任秀梅(1987-), 女, 硕士生; 研究方向: 宠物医学; 赵彦斌(1984-), 男, 博士生; 研究方向: 实验动物学, E-mail: nmzhaoyanbin@126.com。

【通讯作者】 曾林(1965-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 实验动物科学与管理, E-mail: zenglin1965@126.com; 靳朝(1961-), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 宠物医学, E-mail: dwyy2008@163.com。

近几年,对比格犬生殖调控机理和技术的研究已成为国内外的热点研究问题之一,哺乳动物的雌激素调节着生殖系统的发育以及调控发情周期^[1]。雌激素通过雌激素受体发挥其生物学作用,在大多数的哺乳动物体内都存在 ER α 和 ER β 两种雌激素受体,并且每种受体都有多种剪切异构体,除野生型 ER β 外,人还存在六种、小鼠有两种、大鼠有三种 ER β 剪切异构体,不同动物 ER β 的剪切异构体千差万别,并且这些不同剪切异构体的功能也不尽相同。目前通过对小鼠、大鼠和人的不同 ER β 剪切异构体结构和功能的研究,在动物生殖调控方面取得了长足进步,特别是在生殖系统肿瘤方面^[2]。但目前对比格犬的 ER β 及其剪切异构体的研究报道却相当匮乏,因此本实验拟通过克隆比格犬雌激素 β 受体基因,明确比格犬雌激素 β 受体可变剪接体的存在情况,为进一步明确雌激素 β 受体在生殖调控过程中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:

Trizol (Invitrogen); DEPC (Promega); 反转录试剂盒 ReverTra Ace (TOYOBO); pMD18-T 载体 (TaKaRa); 标准分子量核酸 DNA Marker2000 购自康为世纪公司; 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自杭州 BioFlux 公司。

1.1.2 菌种: 大肠菌株 TOP10 感受态细胞购自博迈德生物公司。

1.1.3 实验动物: 比格犬 4 只, 军事医学科学院实验动物中心提供 (实验动物合格证号 [SCXK-(军)2002-001]), 实验动物使用合格证号 [SYXK-(军)2007-005]。

1.2 方法

1.2.1 引物设计: 根据 NCBI 中比格犬 ER β 转录本 24(XM_861041.2) 的 mRNA 序列设计一对引物, 上游为 5'-ATGGATATCAAAACTCTCC-3', 下游为 5'-AGTGTCTCTCTGTTTACAG-3', 扩增片段长度为 371 bp。引物送往生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2.2 比格犬垂体组织总 RNA 的制备: 取 4 只比格犬垂体组织约 100 mg 用于总 RNA 的提取: 利用液氮与研磨器将样品研磨成粉末状, 将粉末转移到 DEPC 处理过的 1.5 mL 的离心管中, 加入 1 mL 的

Trizol, 然后按照试剂说明书提供的方法抽提总 RNA。抽提的总 RNA 取 2.0 μ L 测定 A260/A280 值分析纯度, 同时进行 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA 的完整性。

1.2.3 RT-PCR: 按 TOYOBO cDNA 合成试剂盒提供的方法进行 cDNA 合成和 PCR 扩增, 用逆转录酶两步法合成 cDNA 第一条链, 然后进行 PCR, PCR 扩增体积为 25 μ L, 体系如下: cDNA 1.0 μ L, Premix LA Taq 12.5 μ L, Sense primer (10 pmol/ μ L) 1.0 μ L, Antisense primer (10 pmol/ μ L) 1.0 μ L, Distilled H₂O 9.5 μ L。

PCR(降落 PCR) 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 20 个循环, 每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 45 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 20 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 雌激素 β 受体 cDNA 片段的克隆及 DNA 序列测定: PCR 大量扩增目的基因后, 1% 凝胶电泳回收纯化 PCR 产物, 采用 BioFlux 公司的胶回收试剂盒进行 PCR 产物的回收, 将目的基因连接到 pMD18-T 上, 连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 用蓝白筛选和菌液 PCR 法筛选及鉴定阳性重组子。在阳性重组子中随机挑选 5 个阳性克隆分别制备成甘油菌, 送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。测序后, 应用 NCBI BLAST 及 DNA MAN 对测序结果进行比对分析。

2 结果

2.1 比格犬垂体组织总 RNA 的制备

按 Trizol 一步法从 4 只比格犬垂体组织中提取总 RNA, 其 OD260/OD280 值分别为 1.95、2.0、2.02、1.98, 1% 甲醛变性琼脂糖电泳 (如图 1) 所示, 可清晰见到 18s 和 28s 两条核糖体 RNA 条带, 说明所提取的总 RNA 无明显的降解, 是比较完整的。

2.2 RT-PCR 扩增 ER β cDNA 片段及其序列测定

分别以 4 只比格犬垂体总 RNA 为模板进行反转录。RT-PCR 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 如图 2 泳道所示, 清晰可见 2 条片段的扩增条带。PCR 产物用胶回收试剂盒回收后, 连接到 pMD18-T 载体上, 连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 用蓝白斑筛选、菌液 PCR (如图 3) 鉴定阳

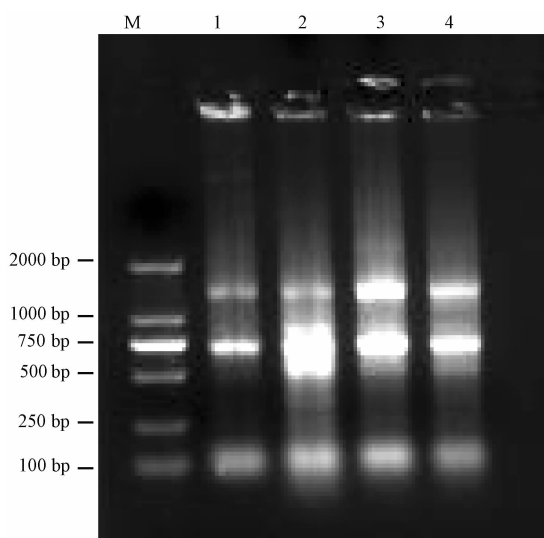


图 1 总 RNA 的甲醇变性电泳

Fig. 1 Formaldehyde denaturalized electrophoresis of total RNA

性重组子,进行测序。

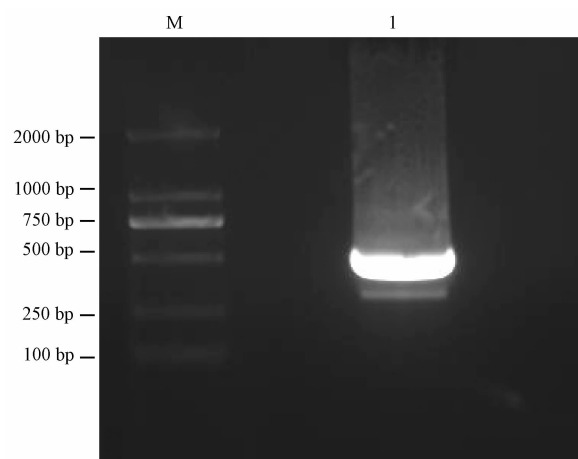
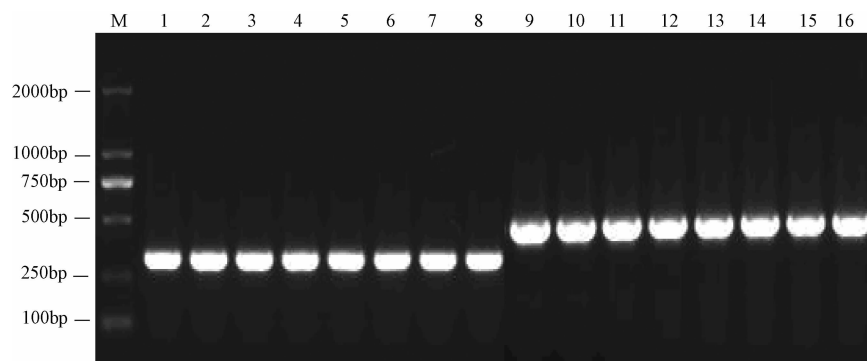
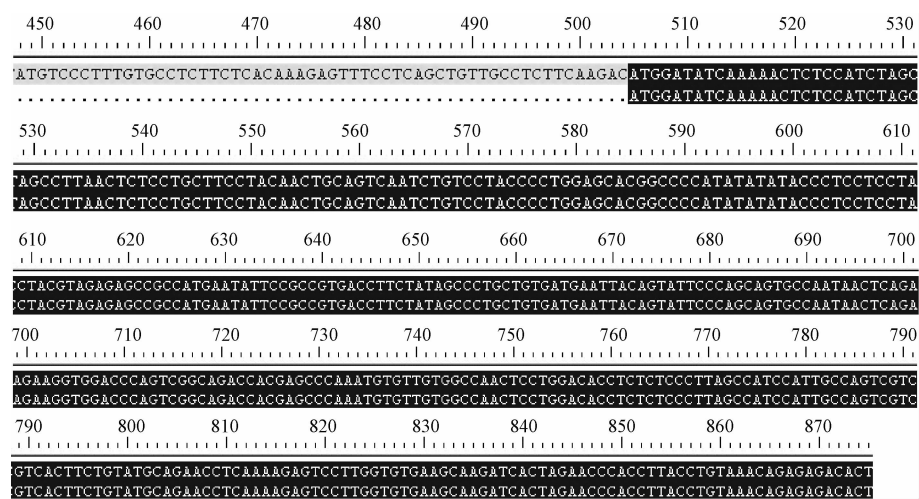
图 2 雌激素受体 β 基因的扩增结果Fig. 2 Amplification results of ER- β gene

图 3 菌液 PCR 电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of bacteria PCR

图 4 ER β 序列比对Fig. 4 The sequence alignment of the ER- β gene

2.3 正常及剪接异构体的序列比对

阳性菌液测序后,与 GeneBank 中的比格犬

ER β 序列比对,结果如图 4. 克隆得到的新异构体较已公布序列多 57 个碱基。

3 讨论

其他研究者以及我们前期的研究工作都表明,雌激素在动物的发情调控过程中发挥了重要的作用^[3]。对小鼠、大鼠和人等动物的研究表明,雌激素的正负反馈调节与其受体在不同组织的表达差异、表达水平和表达时间密切相关^[4]。雌激素受体(ER)有两种亚型,即 ER α 和 ER β 。目前对许多动物 ER α 的基因结构及功能特点了解比较多,但对 ER β 的了解相对较少,尤其对比格犬的 ER β 的研究则更少。本实验旨在克隆 ER β 基因,明确 ER β 在下丘脑-垂体-性腺轴的存在情况。实验结果显示 ER β 基因 PCR 扩增结果电泳条带不单一,有两条带,原因可能为非特异性扩增,也可能是 ER β 基因存在剪切异构体,根据大鼠、小鼠及人的相关 ER β 剪切异构体的研究发现,ER β 存在多种剪切异构体,所以我们以为扩增产物不单一的主要原因是比格犬 ER β 基因可能存在剪切异构体,孔德强等^[5] 的研究结果证实了比格犬 ER β 基因存在剪切异构体,经过验证目的带之外的电泳条带证实其为一种新的剪切异构体,但由于本实验只选了 ER β 基因部分

区段扩增,要想得到剪切体完整信息还有待进一步深入研究,为其在生殖活动中的功能研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Kutzler MA. Induction and synchronization of estrus in dogs[J]. Theriogenology, 2005, 64: 766 - 775.
- [2] Kobayashi M, Ishii H, Sakuma Y. Identification of novel splicing events and post-transcriptional regulation of human estrogen receptor α Isoforms[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 333(1): 55 - 61.
- [3] 孙兆增, 曾林等. 乙烯雌酚对间情期比格犬发情的诱导[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(11): 36 - 38.
- [4] Springwald A, Latrich C, Skrzypczak M, Goerse R, Ortmann O, Treeck O. Identification of novel transcript variants of estrogen receptor α , β and progesterone receptor gene in human endometrium[J]. Endocrine, 2010, 37(3): 415 - 24.
- [5] 孔德强, 胡仲明等. 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, 7(11): 44 - 47.

[修回日期] 2012-07-05