



比格犬 ERβ₁₂₉₃ 基因真核载体的构建及其在 HEK293T 细胞中的表达和定位

甘 艺^{1,2}, 钟 睿^{2,3}, 任秀梅^{2,4}, 赵彦斌², 胡仲明², 刘 冰²,
陈 旖², 孙兆增², 曾 林², 杨焕民¹,

(1. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071;
3. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110161; 4. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062)

【摘要】 目的 观察比格犬 Myc 标签 ERβ₁₂₉₃ 重组真核表达载体在 HEK293T 细胞中的表达及定位。方法 以 pEGFP-N1-ERβ₁₂₉₃ 重组真核表达载体为模板, PCR 保真酶扩增得到 ERβ₁₂₉₃ 基因编码区全长。Myc 标签 ERβ₁₂₉₃ 重组真核载体瞬时转染 HEK293T 细胞, 运用蛋白质印迹技术 (Western blotting) 和间接免疫荧光技术 (indirect immunofluorescence, IF) 鉴定 pcDNA3.1-Myc-ERβ₁₂₉₃ 在 HEK293T 细胞中的表达和定位情况。结果 成功构建 pcDNA3.1-Myc-ERβ₁₂₉₃ 重组真核表达载体, 转染至 HEK293T 细胞中。Western blotting 检测有蛋白条带表达, 共聚焦显微镜下观察 IF 处理后的转染细胞, 荧光定位于细胞质。结论 前期实验得到比格犬 ERβ 剪切异构体 ERβ₁₂₉₃ 编码区序列, 缺失第四外显子, 导致其与配体结合能力减弱或消失, 因此目的基因编码蛋白定位在细胞中发生变化。

【关键词】 比格犬; ERβ₁₂₉₃; 蛋白定位; 第4外显子缺失

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 02-0007-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.002.002

Expression and localization of eukaryotic expression vectors of Beagles ERβ₁₂₉₃ gene in the HEK293T cells

GAN Yi^{1,2}, ZHONG Rui^{2,3}, REN Xiu-mei^{2,4}, ZHAO Yan-bin², HU Zhong-ming²,
LIU Bing², CHEN Yi², SUN Zhao-zeng², ZENG Lin², YANG Huan-min¹

(1. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
2. Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071;
3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161;
4. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062)

【Abstract】 **Objective** To construct recombinant eukaryotic expression vectors of Beagles ERβ₁₂₉₃, and identify the expression and localization of ERβ₁₂₉₃ in the human embryonic renal HEK293T cells by Western blotting and indirect immunofluorescent assay. **Methods** The ERβ₁₂₉₃ gene was amplified by PCR using pEGFP-N1-ERβ₁₂₉₃ as a template. The recombinant eukaryotic expression vector of pcDNA3.1-Myc-ERβ₁₂₉₃ was constructed, and transfected it into HEK293T cells. The expression of pcDNA3.1-Myc-ERβ₁₂₉₃ was detected by Western blot, and its localization was detected by indirect immunofluorescence assay. **Results** The expression of pcDNA3.1-Myc-ERβ₁₂₉₃ was constructed, and successfully

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

【作者简介】 甘艺(1988-), 女, 硕士生, 研究方向: 基础兽医学, E-mail: gy_szz@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; 杨焕民(1956-), 男, 博士生导师, 研究方向: 家禽生殖生理, E-mail: yanghuanmin@yahoo.com.cn。

identified in the HEK293T cells using Western blotting, and detected only in the cytoplasm using IF by laser scanning confocal microscopy. **Conclusions** In the previous experiment, the coding sequence of Beagles ER β ₁₅₉₃ splice variants has been obtained, which is lack of exon 4, and its ligand binding ability is reduced or disappeared, so that the intracellular localization of ER β ₁₂₉₃ coding protein is changed.

【Key words】 Beagles; ER β ₁₂₉₃; Proteins localisation; Exon 4;

比格犬作为国际公认的实验用犬,为了达到国内医药卫生科研的实验要求,提高其繁殖效率为重中之重。雌激素由卵泡颗粒细胞分泌,作为动物体内调控生殖系统最重要的激素之一,微量的游离雌激素与雌激素受体(ER)在靶细胞结合即可促进动物发情、繁殖等机体活动。雌激素与 ER 有同等的重要性。本课题组从比格犬下丘脑-垂体-性腺轴入手,研究 ER β 及其剪切异构体的组织分布和生物学功能。孔德强等^[1]解剖发情期和间情期的比格犬,从卵巢、子宫、下丘脑、垂体四种组织中,发现了 ER β 剪切异构体。任秀梅^[2]成功克隆比格犬 ER β 及其剪切异构体编码区。ER β 由 1593 个碱基组成,编码 530aa,命名为 ER β ₁₅₉₃。该剪切异构体由 1293 个碱基组成,编码 430aa,因此命名为 ER β ₁₂₉₃。开展本次试验,讨论成功构建的 pcDNA3.1-Myc-ER β ₁₂₉₃ 重组真核表达载体在 HEK293T 细胞中的表达及定位情况,为更深层研究其同源二聚化和异源二聚化作用打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂:LA *Taq*、pMD18-T Vector、*Bam*HI、*Xho*I、T4 DNA Ligase 为 TaKaRa 品牌产品, DNA marker 2000、DNA marker 10000、无内毒素质粒小提试剂盒、GenFectinTM 基因转染试剂、2 × SDS 上样缓冲液为博迈德品牌产品,胎牛血清、DMEM 高糖培养基为 Hyclone 品牌产品,0.25% EDTA 胰酶、PBS 缓冲液为 Solarbio 品牌产品、抗 Myc 标签兔单克隆抗体(GTX115046)为 GengTex 品牌产品,DNA 胶回收试剂盒、抗 GAPDH 兔多克隆抗体(CW0101)、HRP 标记兔二抗(CW0103)为康为品牌产品, FITC 标记兔二抗(ZB0511)由中杉金桥分装产品,胰蛋白胍、NaCl、酵母粉、脱脂奶粉、多聚甲醛、聚乙二醇辛基苯基醚、甘油、碘化丙啶、牛血清白蛋白等均为国产试剂。

1.1.2 菌种及细胞株: *BMDH5 α* 感受态细胞为博迈德品牌产品、pEGFP-N1-ER β ₁₂₉₃ 和 pcDNA3.1-Myc 载体保存菌种由本实验室提供。HEK293T 细胞由本实验室冻存。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1-Myc-ER β ₁₂₉₃ 的构建及鉴定:上下游引物 5'端分别加入酶切位点 *Bam*HI 和 *Xho*II,引物序列如下: ER β ₁₂₉₃-F: 5'-gtcaggatccatggatacaaaaactctccatc-3'; ER β ₁₂₉₃-R: 5'-gtcactcgagtactgagatgtggctctctggga-3'。以 pEGFP-N1-ER β ₁₂₉₃ 重组真核表达载体为模板,PCR 高保真扩增目的片段,纯化后构建 pMD-18T-ER β ₁₂₉₃,菌液 PCR 鉴定后测序,并结合测序专业软件对测序结果进行比对。比对正确的 pMD-18T-ER β ₁₂₉₃ 与 pcDNA3.1-Myc 真核载体分别双酶切处理,目的片段回收纯化后连接并转化,经菌液 PCR 和双酶切鉴定后测序,并进行测序结果进行比对。

1.2.2 HEK293T 细胞转染:将细胞计数后适宜数量接种于 6 孔板中,高糖 DMEM 完全培养基(含有 10% FBS,无双抗)培养,置于 37℃、5% CO₂、相对湿度 95% 的恒温箱培养。细胞铺六孔板底 70% ~ 90% 时转染(接种后 24 h 之内)。将 4 μ g pcDNA3.1-Myc-ER β ₁₂₉₃ 重组真核质粒、pcDNA3.1-Myc 质粒及 10 μ L GenFectinTM 基因转染试剂分别稀释于 50 μ L 0.15 M NaCl 中,轻柔混合转染混合液,室温静置 5 min,混合液加入 HEK293T 细胞培养液中。

1.2.3 蛋白质印迹法检测目的重组真核表达载体在 HEK293T 细胞中的表达:转染 48 h 后,1 × 磷酸盐缓冲液(PBS)处理细胞表面,收集细胞于离心管,900 r/min 离心 3 min;每管加入 50 μ L complete whole-cell lysis buffer,4℃ 全速离心 20 min;取上清液至新离心管,用 BCA 法测定上清蛋白浓度;加等体积 2 × SDS 上样缓冲液,旋涡震荡;沸水浴 10 ~ 15 min,配制 10% SDS-PAGE 胶,待胶干后,每个胶孔加入等质量蛋白,体积差由 1 × SDS 上样缓冲液补齐;恒电压电泳;蛋白胶恒电流转印至 0.45 μ m PVDF 膜;蛋白膜置于湿盒中,加入 5% 脱脂奶粉封闭 0.5 ~ 1 h 后,按实验需要剪裁蛋白膜;目的蛋白膜放入抗 Myc 标签兔单抗 1:1 000 稀释液,GAPDH 蛋白膜放入抗 GAPDH 兔多克隆抗体 1:5 000 稀释液,分别孵育 4℃ 过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 7 min;

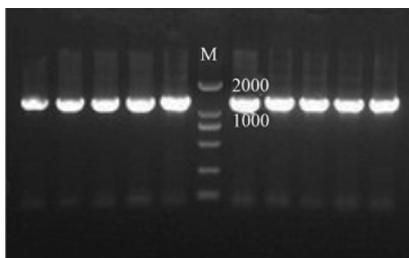
加入 HRP 标记兔二抗 1:3 000 稀释液, 室温孵育 1 h; TBST 洗膜 3 次, 每次 7 min; 待目的蛋白膜和 GAPDH 蛋白膜半干后, 按原位置拼接, 逐滴添加发光试剂盒 A/B 液等体积混合液, 反应 1 min, 去除混合液后, 即可显影。

1.2.4 激光共聚焦扫描技术检测 pcDNA3.1-Myc-ER β_{1293} 在 HEK293T 细胞中的定位: 细胞铺板之前, 在六孔板中放入适当大小的盖玻片, 转染过程同 1.2.2。以下为每孔细胞的具体操作: 转染 (24 ~ 36) h 后, 1 mL 1 × Hanks 液漂洗细胞爬片表面 2 次; 1 mL 4% 多聚甲醛 (POM, V/V) 室温固定 15 min, 1 mL 1 × Hanks 液漂洗 2 次, 每次 5 min; 1 mL 0.3% 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100), 常温孵育 10 min, 1 mL 1 × Hanks 液漂洗 2 次, 每次 5 min; 1 mL 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液封闭细胞 30 min, 0.5 mL 1:1 000 稀释的抗 Myc 标签兔 1% BSA 溶液, 室温孵育 2 h, 1 mL 1 × Hanks 液漂洗 2 次, 每次 5 min; 0.5 mL 1:1 000 稀释的 FITC 标记兔二抗 1% BSA 溶液, 37℃ 孵育 1 h, 1 mL 1 × Hanks 液漂洗 2 次, 每次 5 min; 逐滴添加 50 ng/mL 碘化丙啶 (PI), 细胞核室温漂色 10 min, 1 mL 1 × Hanks 液漂洗 2 次, 每次 5 min, 逐滴添加抗淬灭剂-50% 甘油 (V/V) 于载玻片中央, 取出爬片, 细胞面贴于载玻片, 避免有气泡产生。用激光扫描共聚焦显微镜 20 倍镜下观察荧光部位。

2 结果

2.1 pMD-18T-ER β_{1293} 菌液 PCR 鉴定

琼脂糖凝胶电泳图中有明亮的条带在约 1 290 bp 的位置 (图 1)。



M: DNA marker 2000

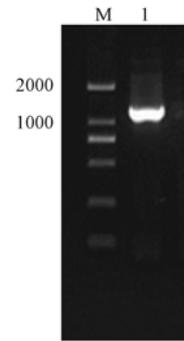
图 1 为 pMD-18T-ER β_{1293} 菌液 PCR 鉴定电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of bacteria PCR of pMD-18T-ER β_{1293}

2.2 pcDNA3.1-Myc-ER β_{1293} 的菌液 PCR 和双酶切鉴定

分别得到大小为 1 290 bp 的基因片段 (图 2-1,

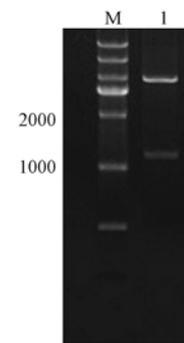
2-2)。



M: DNA marker 2 000.

图 2-1 为 pcDNA3.1-Myc-ER β_{1293} 菌液 PCR 鉴定电泳图

Fig. 2-1 Electrophoresis of bacteria PCR of pcDNA3.1-Myc-ER β_{1293}



M: DNA marker 10 000

图 2-2 为 pcDNA3.1-Myc-ER β_{1293} 质粒酶切鉴定电泳图

Fig. 2-2 Electrophoresis of restriction enzyme digestion of pcDNA3.1-Myc-ER β_{1293} plasmid

2.3 pcDNA3.1-Myc-ER β_{1293} 在 HEK293T 细胞中的表达

转染 pcDNA3.1-Myc-ER β_{1293} 有一条明显的蛋白带, 表明 pcDNA3.1-Myc-ER β_{1293} 成功表达于细胞 (图 3), 分子量约为 48 kDa。

2.4 pcDNA3.1-Myc-ER β_{1293} 在 HEK293T 细胞中的定位

pcDNA3.1-Myc-ER β_{1293} 主要表达于细胞质, 细胞核无荧光 (图 4A)。pcDNA3.1-Myc 空载体质粒表达于整个细胞 (图 4E) (图 4 见彩插 1)。

3 讨论

前期实验通过对比格犬的下丘脑、垂体、卵巢、子宫四个组织进行 RNA 提取, 并经反转录得到了 ER β_{1293} cDNA 编码区序列^[2]。ER β_{1293} 是比格犬 ER β_{1593} 缺失第四外显子的一种剪切异构体, 由 1293

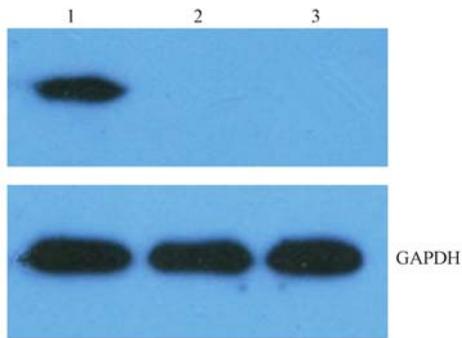


图 3 为 western blot 目的蛋白表达鉴定

Fig. 3 Identification of the target protein expression by Western blotting

个碱基组成,编码 430 个氨基酸。ER 是核受体第 3 亚家族(NR3)I 亚群——类固醇受体超家族(SHR)中的一员^[3]。雌激素通过血液循环系统扩散至靶细胞,与 ER 结合,从细胞水平调控靶基因的转录及靶器官的生物学功能。ER 有 6 个功能区-A/B、C、D、E、F 区。这些功能区从 N 端到 C 端排列,每个功能区对 ER 功能发挥都起到了特异性作用。A/B 区存在活性功能区-1(activation function-1, AF-1);C 区含有 DNA 结合结构域(DBD),DBD 中央富含半胱氨酸;E 区存在活性功能区-2(AF-2)。AF-1 为配体非依赖性转录激活功能区,当 DBD 与 DNA 结合时,AF-1 无需配体结合即可和多种转录因子协同作用,介导信号向下游蛋白传递,进一步激活靶基因。AF-2 位于 E 区的配体结合域(LBD),当与不同配体结合后,其构象因配体种类而变化,并完成 DNA 转录的激活。两者都能够大大提高转录因子的转录活性。ER 的生物学功能因各个功能区发挥作用时的构象变化而不同。迄今的研究发现,有两种亚型,分别命名为 ER α 和 ER β 。ER β 是核受体的一种,其位于 14 q 染色体,编码 530 aa 的蛋白质。而 ER β 因物种和 cDNA 序列延长或缺失,出现多种剪切异构体。目前,有文献报道,人类^[4-8] hER β 序列因羧基端被替换、第八外显子被新序列替换、外显子缺失或是只有部分序列表达,而导致编码框移位或无翻译转录起始区;小鼠^[9-11] mER β 因编码框第 5、6 外显子间插入序列或缺失第 5、6 外显子,导致 LBD 的增长或缺失;大鼠^[12-15] rER β 因 LBD 区增长、缺失第 3 外显子,而导致 DBD 区内双锌指结构的变化,最终获得了剪切异构体特有的配体结合亲和力、转录活性、二聚体形成及作用靶器官等。ER β 为 NR3 的 I 亚群中的一员,分布于细胞质中,核转

运必须与配体结合后才会发生。还有文献报道,在有激素刺激和无激素刺激条件下,ER β 的定位未发生变化,均位于细胞核内^[16]。ER β_{1293} 较 ER β 缺失第四外显子。实验结果证实,ER β_{1293} 基因定位于细胞质中,而非细胞核。Richard H. Price^[15] 曾报道 h ER β_{184} 缺失第四外显子,h ER β_{184} -GFP 表达定位于细胞质,并且丧失了与 E2 结合的能力。这种能力的丧失导致 LBD 的正常折叠的改变。本课题组前期构建 pEGFP-N1-ER β_{1593} 、pEGFP-N1-ER β_{1293} , 并通过 IF 处理转染细胞,激光共聚焦扫描验证了 ER β_{1593} -EGFP 定位于细胞核,ER β_{1293} -EGFP 定位于细胞质。^[2] 虽然 GFP 标签可产生绿色荧光蛋白,便于肉眼直接观察,但其分子量高达 27 kD,可能会影响目的基因的亚细胞定位。本实验为了更精确的定位目的基因,采用编码 8 个氨基酸的 Myc 标签,大大降低的标签对目的基因的定位影响。

所以推测,ER β 缺失第四外显子,导致其配体结合能力减弱或丧失,核转运过程受阻,导致其编码蛋白无法定位于细胞核而定位于细胞质。ER β_{1293} 定位于细胞质中的哪种细胞器尚未经试验证实,需要通过后续的试验继续探索。

参考文献:

- [1] 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,2011,7(11):44-47.
- [2] 任秀梅.比格犬 ER β 剪切异构体在下丘脑-垂体-卵巢轴的种类及其亚细胞定位[D].吉林大学硕士研究生学位论文,2013.
- [3] Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update [J]. Hum Reprod Update, 2000, 6(3):225-236.
- [4] Pike AC, Brzozowski A., Hubbard RE. et al. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor β in the presence of a partial agonist and a full antagonist [J]. EMBO J, 1999, 18(17):4608-4618.
- [5] Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor β Isoforms [J]. Biochem Biophys Res Commun. 1998, 247(1):75-78.
- [6] Omoto Y, Kobayashi S, Inoue S. et al. Evaluation of oestrogen receptor β wild-type and variant protein expression, and relationship with clinicopathological factors in breast cancers [J]. Eur J Cancer, 2002, 38(3):380-386.
- [7] Poola I, Abraha 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 [J]. FEBS Lett, 2002, 516(1-3):133-138.

(下转第 15 页)

- cardiomyopathy caused by heat stroke [J]. *Ann Emerg Med*. 2012,60(1):63-66.
- [2] Yamakawa K, Matsumoto N, Imamura Y, et al. Electrical vagus nerve stimulation attenuates systemic inflammation and improves survival in a rat heatstroke model [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56728.
- [3] Leon LR, Helwig BG. Heat stroke: role of the systemic inflammatory response [J]. *J Appl Physiol*, 2010, 109(6): 1980-1988.
- [4] Inoue H, Ikeda N, Kudo K, et al. Relationship between pulmonary fat embolism and core body temperature in rats with a severe fatty liver [J]. *Legal Med*, 2006, 8(4):210-213.
- [5] Nakagawa Y, Inoue H, Shinone K, et al. Molecular biological analysis of cardiac effect of high temperature in rats [J]. *Legal Med*. 2012,14(2):63-68.
- [6] Zhou F, Song Q, Peng Z, et al. Effects of continuous venous hemofiltration on heat stroke patients: a retrospective study [J]. *J Trauma*, 2011, 71(6):1562-1568.
- [7] Tong H, Tang Y, Chen Y, et al. HMGB1 activity inhibition alleviating liver injury in heatstroke [J]. *Trauma Acute Care Surg*. 2013, 74(3):801-807.
- [8] Leon LR, Dineen SM, Blaha MD, et al. Attenuated thermoregulatory, metabolic and liver acute phase protein response to heat stroke in TNF receptor knockout mice [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, Vol. 305 No. R1421-R1432
- [9] Rodriguez-Fernandez M, Grosman B, Yuraszek TM, et al. Modeling the intra- and extracellular cytokine signaling pathway under heat stroke in the liver [J]. *PLoS One*. 2013, 8(9):e73393.
- [10] 赵佳佳, 周京江, 胡婕, 等. 影响劳力性热射病预后的危险因素分析 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(9):515-518.
- [11] Atha WF. Heat-related illness [J]. *Emerg Med Clin N Am*. 2013, 31(4):1097-1108.
- [12] Nakagawa Y, Inoue H, Shinone K, et al. Molecular biological analysis of cardiac effect of high temperature in rats [J]. *Legal Med*, 2012, 14(2):63-68.
- [13] Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, et al. Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis [J]. *Mol Med*, 2008, 14(5-6):327-336.
- [14] Muñoz AE. Ischemic electrocardiographic changes and elevated troponin from severe heatstroke in an adolescent [J]. *Pediatr Emerg Care*, 2012, 28(1):64-67.
- [15] Wakino S, Hori S, Mimura T, et al. A case of severe heat stroke with abnormal cardiac findings [J]. *Int Heart J*, 2005, 46:543-550.

〔修回日期〕2013-12-24

(上接第 10 页)

- [8] Inoue S, Ogawa S, Horie K, et al. An estrogen receptor β isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ER α and ER β [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, 279(3):814-819.
- [9] Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor β [J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11(3):353-365.
- [10] Sladepka R, Beattyb B, Squireb J, et al. Chromosomal mapping of the human and murine orphan receptors ER α and ER β and identification of a novel human ER α -related pseudogene [J]. *Genomics*, 1997, 45(2):320-326.
- [11] Lu B, Leygue E, Dotzlaw H, et al. Functional characteristics of a novel murine estrogen receptor- β isoform, estrogen receptor- β 2 [J]. *J Mol Endocrinol*. 2000, 25(2):229-242.
- [12] Chu S, Fuller P. J. Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor β gene [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, 132(1-2):195-199.
- [13] Maruyama K, Endoh H, Sasaki-Iwaoka, et al. A novel isoform of rat estrogen receptor β with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regular of estrogen action [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 246(1):142-147.
- [14] Petersen DN, Tkalcevic GT, Koza-Taylor PH, et al. Identification of estrogen receptor β 2, a functional variant of estrogen receptor β expressed in normal rat tissues [J]. *Endocrinology*. 1998, 139(3):1082-1092.
- [15] Price R. H Jr, Lorenzon N, Handa RJ, et al. Differential expression of estrogen receptor β splice variants in rat brain: identification and characterization of a novel variant missing exon 4 [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 80(2):260-268.
- [16] Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade [J]. *Cell*, 1995, 83(6):835-839.

〔修回日期〕2013-12-02