

一种比格犬雌二醇 β 受体剪切异构体的克隆和序列分析

孔德强, 李爱学, 曾林, 赵彦斌, 孙兆增, 胡仲明

(北京军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 分析比格犬下丘脑-垂体-性腺轴,雌二醇 β 受体剪切异构体的存在情况。方法 根据 NCBI 数据库上的比格犬雌二醇受体的基因序列,设计两对特异性引物,以比格犬的卵巢、子宫、下丘脑和垂体的总 RNA 为模板进行反转录,并利用两对特异性引物扩增比格犬雌二醇受体的基因,对其中的主要条带进行克隆测序。结果 获得了比格犬雌二醇受体的全长 cDNA 序列,对主要条带进行克隆测序的结果表明,该序列是一种比格犬雌二醇受体的剪切异构体。结论 比格犬雌二醇 β 受体剪切异构体与小鼠和人的组成有较大的不同,需要进一步系统研究。

【关键词】 比格犬; 雌二醇 β 受体; 剪切异构体; 克隆

【中图分类号】 Q955 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)07-0044-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.07.009

Cloning and sequencing of a new transcription variant of Estrogen receptor β of Beagle dogs

KONG Deqiang, LI Aixue, ZENG Lin, ZHAO Yanbin, SUN Zhaozeng, HU Zhongming

(Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

【Abstract】 Objective Analyzed the presence of transcription variant of Estrogen receptor of Beagle dogs. **Methods** According to the reported complete nucleotide sequence of estrogen receptor in NCBI, two pairs of primers were designed and synthesized. The Estrogen receptor cDNA was amplified from the total RNA of the Ovary, uterus, hypothalamus and pituitary of Beagle by reverse transcriptase PCR (RT-PCR). Then major bands were cloned and sequenced. **Results** Obtained full-length cDNA sequence of estrogen receptor of Beagle dogs, the major bands were cloned and sequenced, the results show that the sequence is an Estrogen receptor of Beagle dogs. **Conclusion** The existence of the transcription variant of Estrogen receptor of Beagle dogs, which was different from ones of Beagle dogs that had been predicted in the online database, It needs further studying.

【Key words】 Beagle dogs; estrogen receptor β ; transcription variant; cloning

雌二醇对下丘脑-垂体-性腺轴具有双向的调节作用。在卵泡生成的早期,中等水平的雌二醇就会抑制促卵泡生成素的释放,发挥负反馈调节作用;

但在发情前期,雌激素的突然上升会引起下丘脑/垂体促性腺激素释放激素的迅速增高,发挥正反馈作用,从而引起动物的发情。目前对雌二醇在下丘

[基金项目]国家自然科学基金(30970416);军事医学科学院创新基金。

[作者简介]孔德强(1978-)男,硕士生,研究方向:实验动物学。

[通讯作者]孙兆增(1977-)男,博士,副研究员,研究方向:实验动物学。

脑/垂体性腺轴发挥正负两种调节作用的机理还不清楚,对雌二醇作用的部位也不是很清楚。但越来越多的资料证实,雌二醇的正负反馈作用与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^[1-4]。

在大多数的哺乳动物,体内都存在 α 和 β 两种受体。哺乳动物的 α 和 β 两种受体在下丘脑-垂体-性腺轴都广泛存在,其中 α 受体是发现最早的一种受体。Kenney 的实验表明,雌二醇的 α 受体在负反馈作用中起主要的作用^[5],但 Lindzey 的实验表明,雌二醇的 α 受体在正负反馈作用中都起作用^[6]。 β 受体的发现相对较晚,对其功能的研究相对较少。仅有的一些资料证实,ER β 可调节个体的生殖过程,包括生殖器官的发育和生殖细胞的成熟,健康卵巢滤泡中 ER β 高表达而 ER α 无表达,胎鼠或成年鼠睾丸中均有多种细胞表达 ER β 。Hatoya 的实验证实,比格犬下丘脑、垂体和卵巢中 β 受体的表达量在由间情期到发情期的转变过程中,表达量逐渐上升,但 α 受体的变化趋势并不明显,提示 ER β 在比格犬的生殖细胞的成熟过程中同样发挥了重要的作用^[7]。

我们前期的实验证实,在比格犬的间情期末,雌二醇的正反馈作用对比格犬的发情具有重要的作用^[8],并且 Hatoya 的实验证实在比格犬的间情期末,雌二醇 β 受体的表达量变化明显,推测雌二醇 β 受体可能在雌二醇的正反馈作用中发挥重要作用。但目前对比格犬雌二醇受体的信息了解较少,因此本研究拟初步研究雌二醇 β 受体的序列组成和结构,为深入研究其在雌二醇正反馈调节中作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

4 只成年雌性比格犬,由本中心提供,实验动物合格证号 [SCXK-(军) 2002-001]。Trizol 为 Invitrogen 公司产品;反转录试剂盒 ReverTra Ace- α -为 TOYOBO 公司产品;DEPC (Promega);凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒(杭州 BioFlux 公司);LA-Taq, dNTP, Oligo (dT), pMD18-T 克隆载体, EcoRI 内切酶, Hind III 为大连宝生物公司产品;E. coli DH5 α 感受态为北京博迈德公司产品。根据比格犬雌二醇受体 β 的基因序列设计两对引物,分两段扩增其全长基因:引物 1: 5'-aagagtttctcagctgttccc-

3',引物 2: 5'-gtcgaagatttccagaattcc-3',引物 3: 5'-ggaattctggaatcttcgac-3',引物 4: 5'-aggcctgttgetcagactg-3'。

1.2 方法

1.2.1 比格犬下丘脑、垂体、卵巢和子宫总 RNA 的提取:

将 RNA 提取所用的剪刀、镊子和玻璃棒等物品 180℃ 干烤过夜;将玻璃用品用 0.1% 的 DEPC 水浸泡过夜,高压后 60℃ 烘干。选取 4 只比格犬新鲜的下丘脑、垂体、卵巢和子宫组织 20 mg,剪碎后放于 5 mL 的离心管中;将离心管置于液氮中充分冷却,用玻璃板快速研磨;研磨充分后加入 1 mL 的 Trizol。按照 Trizol 使用说明书,提取不同组织的总 RNA。

1.2.2 比格犬雌二醇 β 受体的基因全长序列的获得:

分别以提取的下丘脑、垂体、卵巢和子宫的总 RNA 为模版,以 olig(dT) 为反转录引物,进行反转录反应。反应条件为:42℃, 1 h; 95℃, 5 min; 4℃, 5 min。将下丘脑、垂体、卵巢和子宫的反转录产物混合,以 2 μ L 混合的反转录产物为模版,利用 LA Taq 酶扩增比格犬雌二醇受体 β 的基因。利用引物 1 和 2 扩增比格犬雌二醇受体 β 基因的前段序列(β_{\perp}),利用引物 3 和 4 扩增比格犬雌二醇受体 β 基因的后段序列($\beta_{\text{下}}$)。反应条件都为:预变性 95℃ 4 min; 30 个循环 95℃ 30 s, 52℃ 40 s, 72℃ 2 min; 最后 72℃ 延伸 7 min。利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果,并用凝胶回收试剂盒回收基因片段。

1.2.3 比格犬雌二醇 β 受体基因的克隆测序和序列比较:

将回收后的基因片段连接到 pMD18-T 克隆载体,并转化到 E. coli DH5 α 感受态细胞。利用 PCR 和 EcoRI 和 Hind III 双酶切结合的方法筛选阳性重组子,将阳性克隆进行测序,每段基因选择两个阳性克隆,分别双向测序。利用 DNAMAN 软件编辑测序序列,并与比格犬的基因序列进行同源性分析。

2 结果

2.1 比格犬下丘脑、垂体、卵巢和子宫总 RNA 的提取结果

成功的从四只比格犬的下丘脑、卵巢和子宫中提取的总 RNA,但垂体的总 RNA 提取都没有成功,结果见图 1。

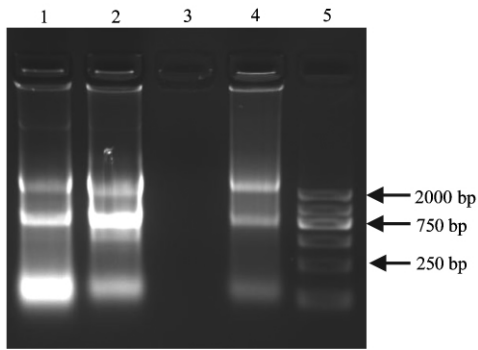


图 1 总 RNA 的提取结果

Fig. 1 The results of total RNA extraction

注: 1 2 3 4 为别为子宫、卵巢、垂体和下丘脑的提取结果 5 为 DL2000 分子量标准

Note: 1 2 3 4 represent RNA extraction results of uterus, ovary, pituitary gland, and hypothalamus,

5 DL2000 molecular standard

2.2 比格犬雌二醇受体 $\beta_{\text{上}}$ 基因片段和 $\beta_{\text{下}}$ 基因片段

以下丘脑、卵巢和子宫的混合反转录产物为模板, 利用引物 1 和 2, 成功的扩增到比格犬雌二醇受体 $\beta_{\text{上}}$ 基因片段, 其主要条带的长度约为 1100 bp; 利用引物 3 和 4, 成功的扩增到雌二醇受体 $\beta_{\text{下}}$ 基因片段, 其主要条带的长度约为 1000 bp, 四只比格犬的扩增结果相同, 结果见图 2 和图 3。

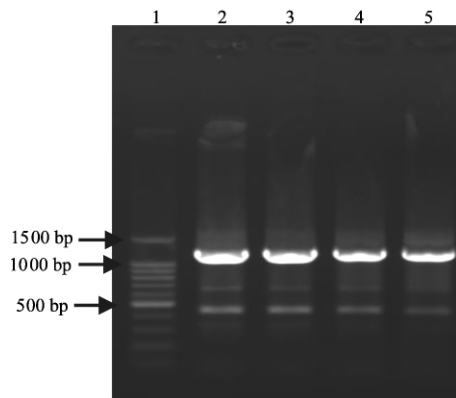


图 2 雌二醇受体 β 基因前段序列的扩增结果注: 1 为 100 bp ladder 分子量标准 2 3 4 和 5 为阳性扩增)

Fig. 2 The amplification results of anterior segment of estrogen receptor β

Note: 1 represent molecular standard of 100 bp ladder, 2 3 4 5 represents positive results

2.3 比格犬雌二醇受体 $\beta_{\text{上}}$ 基因片段和 $\beta_{\text{下}}$ 基因片段的克隆

利用 PCR 和双酶切的方法, 分别筛选出携带 $\beta_{\text{上}}$ 基因片段和 $\beta_{\text{下}}$ 基因片段的阳性重组质粒, 见

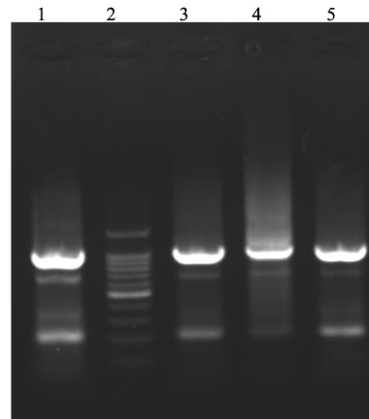


图 3 雌二醇受体 β 基因后段序列的扩增结果

注: 2 为 100 bp ladder 分子量标准, 1 2 3 和 4 为阳性扩增)

Fig. 3 The amplification results of anterior segment of estrogen receptor β

Note: 1 represent molecular standard of 100 bp ladder, 2 3 4 5 represents positive results

图 4。

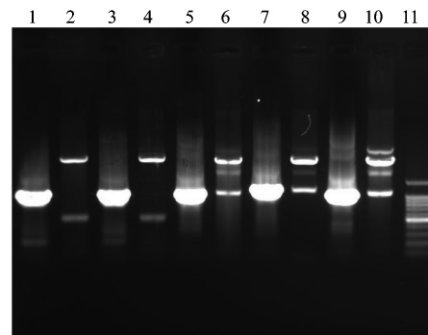


图 4 pMD18-T- $\beta_{\text{上}}$ 和 pMD18-T- $\beta_{\text{下}}$ 的酶切和 PCR 鉴定结果

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid of pMD18-T- $\beta_{\text{上}}$ and pMD18-T- $\beta_{\text{下}}$

注: 1 3 pMD18-T- $\beta_{\text{下}}$ 的 PCR 鉴定结果 2 4 pMD18-T- $\beta_{\text{下}}$ 的酶切鉴定结果; 5 7 9 pMD18-T- $\beta_{\text{上}}$ 的 PCR 鉴定结果 6 8 10 pMD18-T- $\beta_{\text{上}}$ 的酶切鉴定结果;

11 为 100 bp ladder 分子量标准

Note: 1 3 represents PCR identification of pMD18-T- $\beta_{\text{下}}$, 6 8 10 represents restriction enzyme digestion of pMD18-T- $\beta_{\text{下}}$, 5 7 9 represents PCR identification of pMD18-T- $\beta_{\text{上}}$, 6 8 10 represents restriction enzyme digestion of pMD18-T- $\beta_{\text{上}}$, 11 represent molecular standard of 100bp ladder

2.4 比格犬雌二醇受体 $\beta_{\text{上}}$ 基因片段和 $\beta_{\text{下}}$ 基因片段的测序结果

测序结果表明, 比格犬雌二醇受体 $\beta_{\text{上}}$ 基因片

段的全长为 1166 bp, β_T 基因片段的全长为 1024 bp。将两段序列进行拼接, 并利用 DNAMAN 软件分析, 其编码框序列为 1509 bp, 与 NCBI 数据库预测的 10 种剪切异构体的结构都不相同, 可能为一种新的剪切异构体。1509 bp 的编码序列与 NCBI 数据库中的基因组序列相比, 共有 5 处发生了突变, 分别为 479 处由 A→G, 导致组氨酸突变为精氨酸; 505 处由 T→C, 导致半胱氨酸突变为精氨酸; 529 处由 A→G, 导致异亮氨酸突变为缬氨酸; 624 处由 A→G, 该突变没有导致氨基酸突变, 1031 处 T→C, 导致蛋氨酸突变为苏氨酸。

3 讨论

比格犬雌二醇 β 受体可能在雌二醇的正反馈作用中发挥重要作用, 但目前对该受体结构和功能的信息了解较少。人 ER β 可以分成 ER β 1 ~ 5 五个异构型, 大鼠的 ER β 有三种异构型, 而小鼠的 ER β 有两种异构型^[9,10]。NCBI 数据库根据家犬的基因组序列和人的雌二醇受体的剪切异构体信息推测, 犬的雌二醇 β 受体可能存在多种剪切异构体。因此本试验利用两对特异性引物, 拟对比格犬雌二醇受体下丘脑、垂体、子宫和卵巢内可能存在的剪切异构体进行了克隆和序列分析。

对下丘脑、子宫和卵巢内比格犬雌二醇受体的扩增克隆结果表明, 雌二醇受体存在一种主要的剪切异构体, 其分子量的大小与 NCBI 数据库的预测不同, 但测序结果证实这是比格犬雌二醇受体的一种新的剪切异构体。

参考文献:

[1] Ordog T, Goldsmith JR, Chen MD, et al. On the Mechanism of

the Positive Feedback Action of Estradiol on Luteinizing Hormone Secretion in the Rhesus Monkey [J]. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1998, 83(11): 4047 - 4053.

- [2] Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, et al. Involvement of Central Metastin in the Regulation of Preovulatory Luteinizing Hormone Surge and Estrous Cyclicity in Female Rats [J]. Endocrinology, 2008, 146(10): 4431 - 4436.
- [3] Messinis IE. Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications [J]. Human Reproduction Update, 2006, 12(5): 557 - 571.
- [4] Klein R, Schams D, Failing K and Hoffmann B. Investigations on the Re-establishment of the Positive Feedback of Oestradiol during Anoestrus in the Bitch [J]. Reprod Dom Anim, 2003, 38: 13 - 20.
- [5] Kenney CG, Hurley LA, Pfaff L, et al. Nonclassical estrogen receptor α signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis [J]. PNAS, 2007, 104 (19): 8173 - 8177.
- [6] Lindzey J, Jayes FL, Yates MM, et al. The bi-modal effects of estradiol on gonadotropin synthesis and secretion in female mice are dependent on estrogen receptor- α [J]. Journal of Endocrinology (2006) 191, 309 - 317.
- [7] Hatoya S, Torii R, Kumagai D, et al. Expression of estrogen receptor α and β genes in the mediobasal hypothalamus, pituitary and ovary during the canine estrous cycle [J]. Neuroscience Letters 2003, 347: 131 - 135
- [8] 孙兆增, 曾林, 洪宝庆等. 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.
- [9] Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, et al. Cloning and characterisation of human estrogen receptor β isoforms [J]. Biochem Biophys Res Commun 1998; 247: 75 - 8.
- [10] Leung Y-K, Mak P, Hassan S, et al. Estrogen receptor (ER) - β isoforms: a key to understanding ER- β signaling [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 13162-7.

(修回日期) 2011-04-19