

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

钟睿^{1,2}, 甘艺^{3,2}, 赵彦斌², 刘冰², 孙兆增², 朱宇旌¹,
栾新红¹, 胡仲明², 张勇¹, 曾林²

(1. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110866; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071;
3. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319)

【摘要】 目的 筛选用于比格犬 *ER β* 基因 RNA 干扰实验的细胞和检测所用引物。方法 根据比格犬 *ER β* 氨基末端区域和 DNA 结合区设计三对引物, 用阳性质粒筛选最佳引物应用于 RNA 干扰效果检测, 并利用 293T、Hela 和 vero 细胞的 cDNA 验证该引物的特异性。对这三种细胞内人 *ER β* 基因的存在情况也进行了检测。结果 经过三次重复性实验之后, 结果显示引物 C36684 扩增效率高, 且没有非特异条带, 该引物对 293T、Hela 和 vero 细胞 cDNA 扩增时同样没有非特异性条带, 但 293T 细胞中存在人的 *ER β* 基因。结论 引物 C36684 用于检测 RNA 干扰效率, 而 Hela 细胞则作为 RNA 干扰实验的细胞工具。

【关键词】 *ER β* 基因; 比格犬; 筛选引物; 细胞

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 02-0042-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.002.010

PCR primers and cell screening for the RNA interference of estrogen receptor beta in Beagles

ZHONG Rui^{1,2}, GAN Yi^{3,2}, ZHAO Yan-bin², LIU Bing², SUN Zhao-zeng², ZHU Yu-jing¹,
LUAN Xin-hong¹, HU Zhong-ming², ZHANG Yong¹, ZENG Lin²

(1. College of Veterinary and Animal Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;
2. Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071;
3. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319)

【Abstract】 Objective To screen the cells and construct primers to be used for RNA interference experiment of *ER β* gene in Beagles. **Methods** Three pairs of primers were designed according to the amino terminal and DNA binding area of *ER β* gene in Beagles, and the best primers were screened as the primers to be used to detect RNA interference effect by positive plasmid, and the cDNA from 293T, Hela and Vero cells was used to validate the specificity of the primers. The existence of homo *ER β* gene was also tested in the three cell types. **Results** After experiments repeated for three times, the results showed that they had high amplification effect and there was no nonspecific amplification by the C36684 primers. The amplification results of cDNA from 293T, Hela and Vero cells also showed that there was no nonspecific amplification by the primers, but there was homo *ER β* gene expression in 293T cells. **Conclusion** The C36684 primer pair is selected

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 31172164。

[作者简介] 钟睿(1987-)女, 硕士生, 动物营养与饲料科学专业。

[通讯作者] 曾林(1965-), 男, 博士生导师, 实验动物科学与管理; 张勇(1972-), 男, 硕士生导师, 分子营养学、饲料生物技术。

for detecting RNA interference effect, and Hela cells are selected as the tool for RNA interference experiment.

【Key words】 *ERβ* gene; Beagles; Screening primers; Cells

比格犬广泛的应用于各种医学科研,是国内外公认的实验犬^[1]。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^[2]。近来发现比格犬种群中存在不发情或者发情不孕这样的情况,影响着比格犬的生产^[3]。对于发情这一生理现象,主要受下丘脑-垂体-性腺轴来调控,其在雌激素的调节上也起着重要的作用,*ERβ*是目前普遍存在于动物体内的参与生殖调控的基因,不过对于*ERβ*是如何参与调控过程的还不是很清楚,在生殖过程中各种参与调控的基因之间的关系研究的也不是很透彻,*ERβ*较另一种调控生殖的基因*ERα*的发现晚了一段时间,不过有资料显示*ERα*和*ERβ*这两种雌激素受体序列同源性很高,对E2也有着相似的亲和性并结合着相同的DNA反应元件^[4],二者的主要差异在氨基末端区域,因此本实验主要针对*ERβ*的氨基末端设计引物。

本课题组前期已经通过克隆获得比格犬*ERβ*基因,也构建了重组真核质粒pEGFP-N1-*ERβ*,但是还要继续深入的研究*ERβ*基因的功能,需通过更为先进的实验技术来探究,RNA干扰技术就是一项目前应用较为普遍的探究基因功能的技术之一,因此本课题组拟通过应用RNA干扰技术来深入探究*ERβ*基因的功能,但是应用RNA干扰技术,就要检测干扰效率,还要应用细胞在体外筛选出干扰效果最佳的干扰序列,进而对比格犬进行基因沉默实验,从而探究*ERβ*基因的功能,如果细胞中存在*ERβ*基因,无疑会干扰实验结果,而且还要从转染效率,细胞活率等因素综合考虑应用于RNA干扰实验中的细胞,为解决这些问题,本实验需筛选出应用于检测RNA干扰效率的PCR引物,再筛选出应用于RNA干扰实验的最佳细胞。

1 材料和方法

1.1 材料

*ERβ*基因来源于本课题组前期实验人员构建的pEGFP-N1-*ERβ*重组质粒。293T、hela和vero细胞为本室冻存细胞。DMEM (Dulbecco's modified Eagle's)培养基、胎牛血清(FBS)、胰酶购自Hyclone公司^[5]。LA Taq、dNTP购自TaKaRa公司。TRIZOL购自Invitrogen公司。DEPC购自Promega公司。反转录试剂盒ReverTra Ace购自TOYOBO公司。氯

仿、异丙醇等试剂为国产分析纯试剂,均购自军事医学科学院条件处。

1.2 方法

1.2.1 比格犬*ERβ*基因引物设计:第一对引物上游C36684:5'-tattccgccgtgaccttctat-3',下游C36685:5'-cagctcttgcgtcgattcttat-3',扩增片段长度为476 bp;第二对引物上游C36686:5'-aatattccgccgtgaccttctat-3',下游C36687:5'-ggccttacatccttcacacgac-3',扩增片段长度为389 bp;第三对引物上游C36688:5'-ccttagccatccattgccagtc-3',下游同第一对引物,扩增片段长度为340 bp。引物送至博迈德生物有限公司合成。

1.2.2 比格犬*ERβ*基因引物有效性检测:采用梯度PCR法用1.2.1中设计的三对引物扩增pEGFP-N1-*ERβ*,梯度PCR每孔对应的退火温度为52.0℃、52.2℃、52.5℃、53.0℃、53.7℃、54.6℃、55.6℃、56.5℃、57.1℃、57.6℃、57.9℃、58.0℃,PCR反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性30 s;梯度52℃~58℃退火30 s;72℃延伸2 min;经过33个循环之后,72℃延伸8 min;4℃ forever,根据扩增结果选出最佳引物以及最佳退火温度。

1.2.3 比格犬*ERβ*基因引物特异性检测:采用Trizol一步法提取三种细胞的RNA后反转录,反转录步骤如下:65℃变性5 min,置于冰上;42℃ 60 min,99℃ 5 min,4℃ 5 min。得到的cDNA进一步进行PCR反应,反应程序为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s;56.5℃退火30 s;72℃延伸2 min;经过33个循环之后,72℃延伸8 min;4℃ forever,反应结束后采用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 检测细胞内人*ERβ*基因的存在情况:人*ERβ*基因引物上游C42846:5'-cacctgggcaccttctcttt ag-3',下游C42847:5'-gcagcagctcccgcactcg-3',如1.2.3中获得细胞cDNA后进行PCR反应,反应程序亦同1.2.3,反应结束后采用琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 引物有效性检测结果

用三对引物对pEGFP-N1-*ERβ*质粒进行三次重复性扩增之后,结果均显示引物C36684扩增效果最佳,现就其中一组实验结果做分析。如图1A

所示,条带均清晰,但在2 000 bp 之上有不是很明显的非特异性扩增带,第 5 条带非特异带最不明显,效果最好。图 1B 条带较清晰,但在 250 bp 和 750 bp 处有非特异性扩增条带。图 1C 条带模糊。因此选用 C36684 作为 PCR 检测 RNA 干扰效果的最佳引物,最佳温度选为 56.5℃。

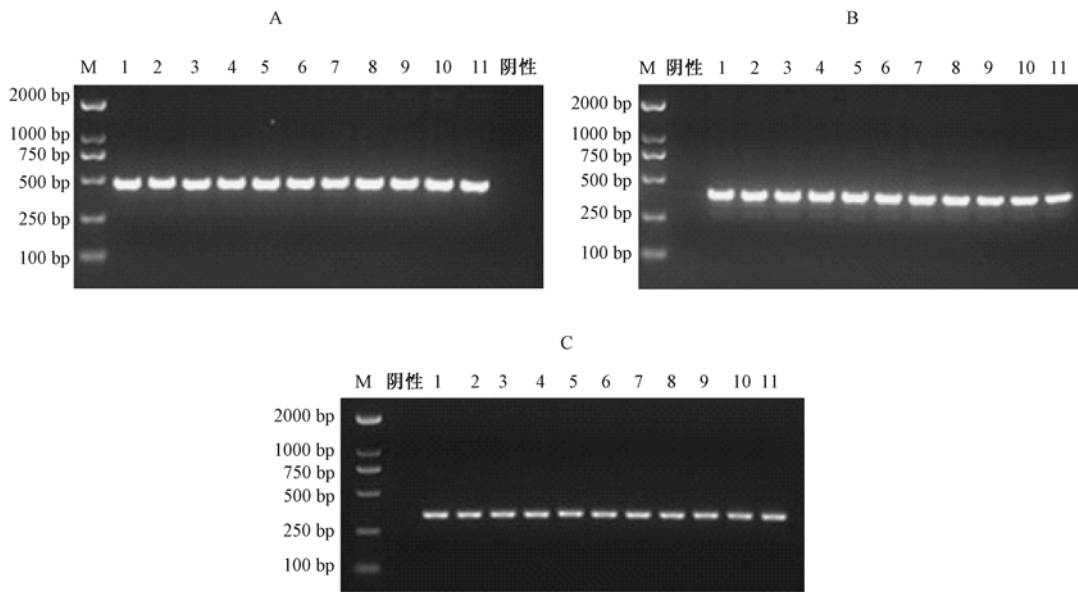
2.2 引物特异性检测结果

得到三种细胞 cDNA 后,亦用引物 C36684 经过三次反复扩增,结果显示三种细胞内没有 *ERβ* 基因。选出其中一组结果,即图 2 所示结果,三种细胞

中均未扩增出比格犬 *ERβ* 基因,说明 C36684 具有良好的特异性。

2.3 检测细胞内人 *ERβ* 基因的存在情况结果

人 *ERβ* 基因与犬 *ERβ* 基因享有着高度同源性,如果细胞内存在人 *ERβ* 基因,仍会影响实验结果,因此用引物 C42846 扩增三种细胞 cDNA,同样经过三次重复性试验后,选出其中一组实验结果,即如图 3 所示,293T 细胞内存在人 *ERβ* 基因,hela 和 vero 内不存在人 *ERβ* 基因,也就说 293T 细胞内存在 *ERβ* 基因的干扰,不能选用其作为细胞工具。



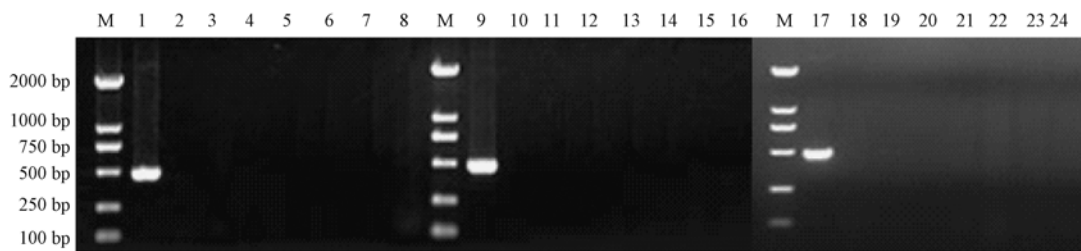
M: DL2000 DNA 分子量标准;A: C36684 扩增结果;B: C36686 扩增结果;C: C36688 扩增结果;阴性对照: 扩增模板为 ddH₂O。

图 1 三对引物扩增 pEGFP-N1-ERβ 质粒鉴定结果

M: DL2000 DNA molecular standard;A: Result of amplification by C36684;

B: Result of amplification by C36686;C: Result of amplification by C36688; Negative control; The template.

Fig. 1 Identification of pEGFP-N1-ERβ plasmids amplified by the three primers



M: DL2000 DNA 分子量标准;1、9、17: 阳性对照, 扩增模板为 pEGFP-N1-ERβ;2、10、18: 阴性对照, 扩增模板为 ddH₂O;

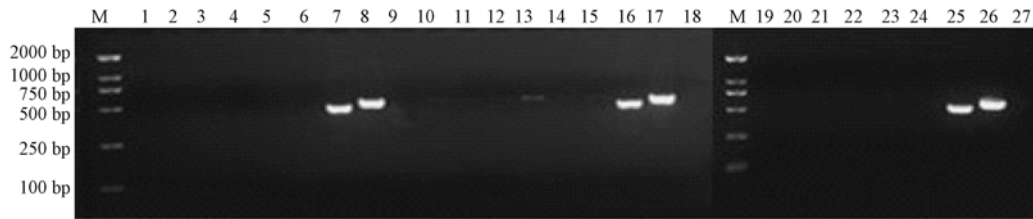
3~8: 扩增模板为 293T 细胞六组样品;11~16: 扩增模板为 hela 细胞六组样品;19~24: 扩增模板为 vero 细胞六组样品。

图 2 三种细胞 cDNA 扩增结果

M: DL2000 DNA molecular standard;1、9、17: Positive control, the template was pEGFP-N1-ERβ;2、10、18: Negative control, the template was ddH₂O;3-8: The templates were six samples from 293T cells;11-16: The templates were six samples from HeLa cells;19-24:

The templates were six samples from Vero cells.

Fig. 2 The results of amplification of cDNA from the three cell lines



M: DL2000 DNA 分子量标准; 1-6: 扩增模板为 heLa 细胞六组样品; 7、16、25: C36684 引物扩增 pEGFP-N1-ER β ; 8、17、26: C42846 引物扩增 pEGFP-N1-ER β ; 9、18、27: 阴性对照; 10-15: 扩增模板为 293T 细胞六组样品; 19-24: 扩增模板为 vero 细胞六组样品。

图 3 hER β 引物扩增三种细胞 cDNA 结果

M: DL2000 DNA molecular standard; 1-6: The templates were six samples from HeLa cells; 7, 16, 25: Amplified pEGFP-N1-ER β by C36684 primers; 8, 17, 26: Amplified pEGFP-N1-ER β by C42846 primers; 9, 18, 27: Negative control; 10-15: The templates were six samples from 293T cells; 19-24: The templates were six samples from Vero cells.

Fig. 3 Results of cDNA amplification from the three cell lines by hER β primers

3 讨论

前言已经提到 ER α 和 ER β 仅在氨基末端区域有主要差异, 因此需要针对氨基末端设计引物以显示 ER β 的特异性。ER β 的氨基末端为 12~124 aa, 共编码 339 bp, 这 339 bp 经 DNA STAR 软件分析后没有特异性的引物序列, 理论与实际发生了碰撞, 因此, 又把设计区域扩大到 DNA 结合区, ER β 的 DNA 结合区为 144~225 aa, 共编码 246 bp。把编码 ER β 氨基末端与 DNA 结合区序列经 DNA STAR 软件分析后得出该实验中的三对特异性引物序列。

本实验所涉及的三种细胞, 293T 细胞为 293 细胞派生, 为人肾上皮细胞系, HeLa 细胞源自一位美国妇女海莉耶塔·拉克斯子宫颈癌细胞的细胞系, 而 Vero 细胞为非洲绿猴肾细胞。在 NCBI 上获取人 (Gene ID: 34193698) 和猴 (Gene ID: 402766370) 的 ER β 基因, 检索结果显示 NCBI 上没有非洲绿猴的 ER β 基因序列, 所查猴源 ER β 序列为恒河猴的 ER β 序列。经 DNA STAR 软件分析后, 人与犬 ER β 序列同源率为 87.3%, 这可以从本实验图 3 中用人 ER β 基因的引物扩增出犬 ER β 基因所证实, 犬与猴的序列同源率为 87.8%, 人与猴的序列同源率为 95.3%, 分析结果显示人、犬、猴的 ER β 序列同源率很高, 但本实验并没有从 293T、HeLa 和 Vero 细胞中扩增出比格犬 ER β 基因, 恰好证明了引物特异性强, 不过也可能由于扩增的特定序列差异显著, 还有可能是 ER β 不影响肾的结构和功能, 有资料显示, ER β 基因在免疫、骨骼、心血管和中枢神经系统方面有着不同的非冗余的作用^[6], 还有资料显示, 雌激素是一种形态发生素, 其在形态发生上的作用

是在 ER β 基因敲除鼠的子宫^[7]、卵巢^[7]、乳腺^[7]、前列腺^[8]、肺^[9]和脑^[10]的结构上所证实的。但本实验并没有从 HeLa 细胞内扩增出 ER β 基因, 不知道怎样解释这一科学现象, 可是本实验却证实 293T 细胞内有 ER β 基因, 这又怎么解释呢? 在 2001 年对于小鼠大脑 ER β 的研究表明 ER β 对神经元复苏的影响作用追溯到胚胎期的第 15 天。对于子宫、阴道、前列腺及肺而言, 在胚胎期的第 9~16 天是雌激素使雄性化的影响的第一个关键阶段。第二个关键阶段为产后的 1~6 d, 这一阶段是前列腺及骨骼形成阶段^[4], 虽然没有直接说明为什么 293T 细胞内会有 ER β 基因, 不过从侧面证实 ER β 基因在胚胎时期起作用, 因此 293T 细胞内有 ER β 基因也不足为奇。既然 293T 细胞内存在 ER β 基因, 而人与犬 ER β 基因同源率有很高, 所以 293T 细胞不能用在后续 RNA 干扰实验中。那么就从 HeLa 细胞和 Vero 细胞中择一。由于 HeLa 细胞可以无限分裂并且转染效率高, 因此本实验选用 HeLa 细胞作为后续 RNA 干扰实验的细胞工具。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 任秀梅, 赵彦斌, 胡仲明, 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.
- [3] 许琴, 赵彦斌, 胡仲明, 等. 间情期与发情期比格犬子宫与卵巢组织形态学的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(7): 44-47.
- [4] Heldring N, Pike A, Andersson S, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets [J]. Physiol Rev, 2007, 87: 905-931.

(下转第 51 页)

造模后 1 d、3 d 和 7 d 心肌组织,结果发现手术后时间对心肌梗死范围无明显影响,但对心肌缺血危险区的影响较大;手术后 3~7 d,随着时间的延长心肌缺血危险区面积逐渐减少。这可为后续关于缺血/梗死类心脏疾病的病理生理以及相关药物开发研究的起始时间提供依据和指导。

综上所述,本实验主要对大鼠心肌梗死模型制备过程中麻醉、插气管、保温、手术操作、麻醉药物、染色方法以及造模后不同时间进行对比研究表明,戊巴比妥钠是三种麻醉药中更合适的麻醉药,TTC 和伊文思蓝染双重染色对心肌各区域范围评估更为准确,且在造模后(3~7)d 是开展相关研究的适宜阶段。本实验结果对大鼠心肌梗死模型制备及其评价方法的规范化以及后续研究工作提供了较好的借鉴和实践依据。

参考文献:

- [1] 尹倪,陈胜喜,罗万俊,等. 冠状动脉前降支结扎法制作大鼠急性心肌梗死模型[J]. 中国医师杂志, 2006, 8(9):1193-1195.
- [2] 雷娟,伍卫,薛声能,等. 大鼠急性心肌梗死动物模型的建立和评估[J]. 中国实用医药, 2009, 4(2):1-4.
- [3] 徐铭. 大鼠心肌梗死模型制作的影响因素[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2012, 2:48-49.
- [4] 王燕,陈光辉,尹作民,等. 大鼠心肌梗死动物模型的制备[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(6):54-57.
- [5] 梅志强,王琼,邓莉. 动物福利在研究生实验动物学教学中的应用初探[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(3):76-78.
- [6] 杨简,杨俊,丁家望,等. 大鼠心肌缺血-再灌注损伤模型的改良及实验观察[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(10):961-963.
- [7] 王波,李庆志,阎德民,等. 不同 2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色方式对心肌梗死面积检测的对比[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2011, 18(2):179-180.
- [8] 钱丽萍,朱姗姗,曾因明. 异氟烷预处理对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2006, 26(1):49-52.
- [9] Luo NF, Liu J. The protective effects of emulsified isoflurane on myocardial ischemia and reperfusion injury in rats[J]. Can J Anesth, 2009, 56(2):115-125.
- [10] 姜琳,王琛,覃琴,等. 异氟烷预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 复旦学报(医学版), 2008, 35(4):539-540.
- [11] 张阔,田枫,康爱君,等. 戊巴比妥钠、水合氯醛、氨基甲酸乙酯麻醉对雄性 SD 大鼠血液学指标的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(8):496-498.
- [12] 万汝根,王茂峰,赵升,等. 伊文思蓝染色技术快速鉴定新型隐球菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2010(9):2197-2199.
- [13] Tao L, Gao E, Jiao X, et al. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrate stress[J]. Circulation, 2007, 115(11):1408-1416.
- [14] Ran X, Wang H, Chen Y, et al. Aquaporin-1 expression and angiogenesis in rabbit chronic myocardial ischemia is decreased by acetazolamide[J]. Heart Vessels, 2010, 25(3):237-247.
- [15] Dong S, Cheng Y, Yang J, et al. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction[J]. J Biol Chem, 2009, 284(43):29514-29525.

[修回日期]2013-11-29

(上接第 45 页)

- [5] 曹玉华,严翔,刘一,等. 棕头蜘蛛猴 Atfu-B 基因 $\alpha 2$ 结构域缺失剪切异构体的表达及其细胞内定位[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(10):63-66.
- [6] Harris H. Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies[J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(1):1-13.
- [7] Förster C, Mäkelä S, Wärrä A, et al. Involvement of estrogen receptor β in terminal differentiation of mammary gland epithelium[J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2002, 99(24):15578-15583.
- [8] Weihua Z, Malela S, Andersson LC, et al. A Role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(11):6330-6335.
- [9] Morani ABR, Imamov O, Hultenby K, et al. Lung dysfunction causes systemic hypoxia in estrogen-receptor beta knockout mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(18):7165-7169.
- [10] Wang L, Andersson S, Warner M, et al. Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(5):2792-2796.

[修回日期]2013-11-25