

黄鳝雌激素受体 α 基因的克隆、抗体制备及初步分析

丁炜东¹ 曹丽萍¹ 曹哲明¹ 邴旭文¹ 陈克春² 胡晋鸣³

1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 无锡 214081;
2. 姜堰市水产技术指导站, 姜堰 225500; 3. 泰州市日盛生态农业发展有限公司, 姜堰 225599

摘要 对雌激素受体 α 基因的氨基酸序列进行抗原性分析, 筛选合适的基因片段进行克隆, 经 RT-PCR 扩增得到大小为 945 bp 的片段, 经测序鉴定后, 将该片段定向亚克隆于 pMAL-c2x 表达载体中, 转化至 TB1 感受态细胞中进行诱导表达。经 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 观察到有新的重组蛋白获得了表达, 采用 SDS-PAGE 和 Western blot 试验进行检测, 结果表明表达的重组蛋白的分子质量约为 78.1 ku, 表达产物占菌体总蛋白的 42.3%, 且具有免疫学活性。进一步纯化和蛋白酶切后, 得到单一的雌激素受体 α 蛋白。以该蛋白免疫小鼠制备抗体, 在免疫第 7 周时达到最大滴度 1.158 ± 0.232 。将制备的多克隆抗体进行黄鳝性腺免疫组化分析, 结果表明其能特异性地与卵巢中的激素受体 α 反应, 在细胞膜上形成褐色沉淀。

关键词 黄鳝; 雌激素受体; 原核表达; 抗血清; 免疫组化分析

中图分类号 S 961.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)04-0099-07

黄鳝 (*Monopterus albus*), 主要生活在亚洲地区, 目前中国只有 1 种, 具有较高的营养价值。自从 20 世纪 70 年代开始人工养殖以来, 野生黄鳝苗种便被大量捕捉, 同时环境污染等造成黄鳝野生资源日渐减少, 养殖苗种严重短缺。黄鳝发育周期中性逆转的现象是刘建康等^[1]首先发现的, 而后肖亚梅等^[2-3]详细研究了黄鳝性腺发生与分化的过程, 从而表明黄鳝开始发育时为雌性, 性成熟产卵后, 雄性生殖细胞开始发育, 形成间性阶段, 逐渐发育成雄性黄鳝。黄鳝性别决定基因或在基因水平上调控黄鳝性逆转一直都是研究者们关注的热点, 而性别决定又是一个涉及多基因不同时空的复杂调控过程。

性类固醇激素 (sex steroid hormone) 是维持生命、调节性腺发育, 对脊椎动物各项功能具有调节作用的重要激素。动物体内内源性类固醇激素主要有雄激素、雌激素和孕激素 3 种, 它们的生理功能都是通过雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 来实现的^[4], ER 与雌激素特异性地结合后介导雌激素应答元件 (estrogen respond elements, EREs) 调节基因的转录。硬骨鱼类的 ER 种类和生理功能等似

乎比高等脊椎动物更为复杂。首个鱼类 ER α 是由 Pakdel 等^[5]从虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 脑中分离得到的, 迄今为止, 已有 10 余种鱼类的 ER 研究报道, 但尚没有黄鳝雌激素受体的相关报道。本文通过 RT-PCR 的方法从性腺等组织中克隆到黄鳝 ER α 部分保守序列, 经原核表达、免疫小鼠等制备抗血清, 获得了黄鳝 ER α 特异性抗体, 并对雌激素受体在黄鳝性腺上的表达进行初步免疫组织化学定位, 以期对黄鳝性别发展及调控机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料、试剂及仪器

试验黄鳝购自无锡中桥菜市场, 解剖采集性腺作为试验材料。ICR 试验鼠由浙江大学实验动物中心提供。

Reverse Transcriptase、Taq polymerase、T4 DNA Ligase、PCR 产物回收试剂盒、限制性内切酶、RNA 提取试剂盒等购自大连宝生物公司, 聚丙烯酰胺、RNase 抑制剂等购自碧云天生物公司,

收稿日期: 2013-04-16

基金项目: 公益性行业科研专项 (201003076)、国家自然科学基金项目 (31200918)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2013JBFM02、2011JBFA12)、江苏省自然科学基金项目 (BK2011184)、江苏省科技支撑计划 (BE2013315) 和江苏省水产三项工程项目 (PJ2011-51)

丁炜东, 助理研究员。研究方向: 鱼类遗传育种。E-mail: dingwd@126.com

通信作者: 邴旭文, 研究员。研究方向: 特种水产养殖与育种。E-mail: bingxw@ffrc.cn

Amylose-sepharose 柱、Factor Xa、抗麦芽糖结合蛋白(MBP)单克隆抗体由 New England Biolabs (Beijing) LTD 提供。Freund's Adjuvant Complete、ELISA 板等均购自上海生工有限公司。测序用 T 载体购自大连 TAKARA 公司, pMAL-c2x 质粒、细菌 TB1 和感受态细胞 JM109 由实验室冻存。

梯度 PCR 仪购自 Eppendorf 公司, 凝胶成像系统购自柯达公司, 序列测序工作由上海博尚生物工程公司完成。酶标仪购自 BIORAD 公司。

1.2 引物合成与 PCR 扩增

采用 Primer 5.0 软件设计引物:

引物 1: 5'- gactacatgtgccctgctacaaaycartgyac -3'

引物 2: 5'- catgctgtacaggtgtccatnccytt-3'

反转录引物为上海生工生物工程公司的 oligo dT 引物。

采用试剂盒提取黄鳍性腺组织总 RNA, 以之为模板进行反转录, 以反转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 反应程序为: 94 °C, 5 min; 94 °C 45 s, 59 °C 45 s, 72 °C 1.2 min, 共进行 30 个循环, 最后 72 °C 10 min。

1.3 PCR 产物的克隆与鉴定

获得的 PCR 液经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行紫外观察, 根据片段大小切胶回收纯化符合预期大小的 PCR 产物片段, 将 PCR 纯化产物与 pMD18-T-vector 连接, 将重组产物命名为 pMD18-T-ER α , 并转化到大肠杆菌 JM109 的感受态细胞中, 用质粒提取试剂盒提取质粒, 对提取的质粒用 *EcoR* I、*Hind* III 进行双酶切挑选鉴定, 并通过测序公司进行 DNA 测序验证插入的序列及读码框的正解性。

1.4 原核表达质粒的构建

利用限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 37 °C 双酶切 pMD-18T-ER α 质粒, 电泳回收 ER α 基因片段, 同时利用相同内切酶酶切原核表达质粒 pMAL-c2x, 电泳回收线性化 pMAL-c2x 质粒, 按照 T4 DNA 连接酶的说明书构建表达质粒 pMAL-ER α , 转化 JM109 感受菌中, 随机挑选 5~10 个质粒同上进行双酶切和测序验证。

1.5 ER α 基因的诱导表达

将阳性表达质粒 pMAL-ER α 转化感受态大肠杆菌 TB1 后在含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 2 \times LB 培养基中 37 °C 振荡培养 18 h。第 2 天取预培养菌液按 1:100 接种 LB 培养基, 37 °C 继续培养 2~3 h 至吸光度值 D_{600} 为 0.6 左右, 加入 IPTG 溶液,

至终浓度达到 0.3 或 1.0 mmol/L, 继续培养 4 h, 收集菌液 5 000 r/min, 5 min, 4 °C 离心收集菌体。采用 PBS 洗涤菌体 2 遍后加入 PBS 重新混匀细胞, 加入等体积的 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液, 100 °C 裂解 5 min, 使细菌彻底裂解。裂解产物进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 最后采用 Commassie Blue Staining Kit 显色。

1.6 超声波裂解菌体

将 1 \times PBS 悬浮的菌体分装到指形管中, 置于冰浴中, 进行超声波裂解, 然后 4 °C 离心(先 600~800 r/min, 5 min, 再 1 200 r/min, 10 min)收集菌体。最后用 1 \times PBS 再次悬浮菌体。取少量裂解产物 SDS-PAGE 电泳鉴定, 剩余的裂解产物用于下一步纯化。

1.7 表达产物的初步纯化、复性

将超声波破碎之后收集到的菌体按 10 g/mL 将沉淀悬浮于缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl; 50 mmol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA; 0.1% Triton X-100; 100 mmol/L β -ME; 2 mol/L urea, pH 8.0)中进行漂洗, 离心(12 000 r/min, 4 °C、15 min)收集沉淀, 漂洗 3 遍后, 将沉淀再悬浮于 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液中漂洗 1 次, 离心收集。

1.8 ER α 重组蛋白的制备及蛋白酶切

同本文“1.5”中方法制备表达菌液, 菌液中加入溶菌酶裂解菌体, 溶菌酶质量浓度为 1 mg/mL, 冰水浴中反应 30 min, 再加入 DNA 酶和 RNA 酶, 终质量浓度均为 5 μ g/mL, 4 °C 反应 15 min, 最后 9 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清备用, 上清中含有表达的 ER α 重组蛋白。

将上清加入平衡好的 GSTrap FF column 亲和柱, 平衡缓冲液为 1 \times PBS (见试剂说明书), 使重组蛋白与柱介质充分结合后, 缓慢加入洗脱液洗脱重组蛋白, 取少量洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

加入 Factor Xa 到纯化好的重组蛋白中至终质量浓度为 200 μ g/mL, 室温反应 4 h, 进行去除 BMP 蛋白实验, 采用过 Amylose-sepharose 亲和柱, 用平衡缓冲液洗脱即获得 ER α 前体蛋白。同样作 SDS-PAGE 电泳检测。

1.9 表达产物抗体的制备

取约 20 μ g 重组蛋白与等量的弗氏佐剂乳化后, 取 200 μ L 腹腔免疫 6 只 ICR 试验鼠, 空白组采用生理盐水作为对照组, 每隔 1 周加强免疫 1 次, 从首免 1 周后开始采血。采集的血样放置于 4 °C 冰箱

中,吸取抗血清备用。抗血清置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

用直接 ELISA 测定抗体的效价,首先用包被液稀释 ER α 蛋白至终质量浓度为 $5\text{ ng}/\mu\text{L}$,每孔加 $50\text{ }\mu\text{L}$,同时另设 2 孔加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 包被缓冲液设立空白对照孔,放置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 包被 24 h。采用 PBST(含 0.1% Tween 20 的 PBS)洗涤 3 次,每次 5 min。然后 $200\text{ }\mu\text{L}/$ 孔封闭液封闭, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭 24 h。同上洗涤后,按 $1:100$ 、 $1:200$ 倍比稀释抗血清,每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ ER α 蛋白抗血清稀释液,阴性孔加入 $1:200$ 稀释的阴性血清,空白孔加入 PBS。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,抗体与抗原反应,同上洗板 3 次后,加入酶标二抗, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。加入显色液、 $4\text{ }\mu\text{L}$ 30% H_2O_2 , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,显色 10 min 后,加入终止液终止反应。酶标仪上检测 490 nm 波长下吸光值。

1.10 免疫组化分析

采用 SuperPicTureTM 法(DAB 棕色反应法)进行免疫细胞化学反应,鼠抗黄鳍雌激素受体抗体为自制的多克隆抗体,稀释度为 $1:100$,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(碧云天生物技术研究)的稀释度为 $1:150$ 。DAB 显色试剂盒购自江苏碧云天生物试剂公司,对照实验用正常鼠血清替代第一抗体进行孵育,并进行苏木素复染,结果为阴性反应。

1.11 Western blot 分析

按照蛋白测定试剂盒的要求提取黄鳍精巢、卵巢组织的总蛋白测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳时采用 $100\text{ }\mu\text{g}$ 的上样量。 $1:500$ 稀释一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜,对照用 β -actin 一抗按说明书作 $1:3\text{ }000$ 稀释。购自 Sigma 公司的二抗按说明书作 $1\text{ }000$ 倍稀释,同样 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交 1 h。

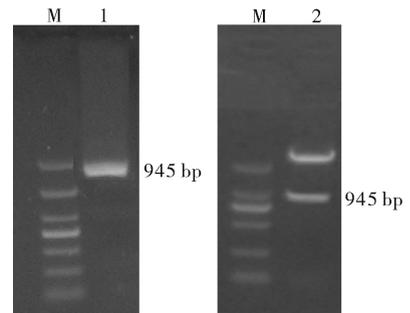
2 结果与分析

2.1 ER α 基因的 PCR 扩增与鉴定

PCR 反应结果表明扩增到约 945 bp 的目的片段(图 1),这与预期大小相符。将 PCR 产物回收纯化后连接测序质粒后,采用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切电泳,结果表明从提取的 pMD18-T-ER α 质粒中可酶切到 1 条约为 945 bp 的片段,表明成功地从黄鳍性腺中克隆到 ER α 基因,将阳性克隆 pMD18-T-ER α 质粒进行测序工作,结果进一步表明 RT-PCR 扩增到的片段为 ER α 。

2.2 表达质粒 pMAL-ER α 的构建

采用 *EcoR* I 和 *Hind* III $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 双酶切阳性克隆 pMD18-T-ER α 、电泳、纯化后获得线性化的 ER α 基因,采用同样的方法酶切 pMAL 载体,然后将 ER α 基因与线性化载体 pMAL 按说明书进行连接试验,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,试剂盒提取质粒并双酶切后进行 1% 的凝胶电泳,双酶切分析结果(图 1)表明表达质粒中可切出大小约为 945 bp 的条带,表明成功地将 ER α 基因插入到 pMAL 表达载体中。



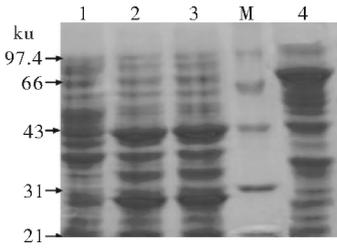
M:DNA marker; 1:RT-PCR 产物 The product of RT-PCR; 2:*EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切 pMD18-T-ER α 质粒 Double restriction enzyme digestion of plasmid pMD18-T-ER α with *EcoR* I and *Hind* III.

图 1 黄鳍 ER α 基因 RT-PCR 扩增和限制性酶切分析

Fig. 1 ER α gene amplified by RT-PCR and analyzed by restriction enzyme digestion

2.3 融合蛋白的表达及鉴定

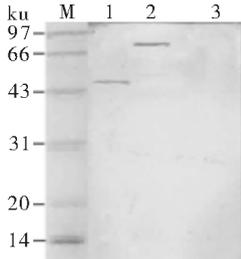
将阳性克隆 pMAL-ER α 质粒转化感受菌 TB1 菌株后,采用 0.3 、 1.0 mol/L IPTG 诱导菌株 4 h,离心收集菌体,加上样缓冲液 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下裂解细菌,进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果表明空载体的细菌裂解物中只有 1 条分子质量约为 42.5 ku 的表达条带(图 2 泳道 2、3),而转入表达质粒的细菌总蛋白裂解物中表达的蛋白质的分子质量约为 78.1 ku (图 2 泳道 4)。由于 ER α 蛋白分子质量约为 35.6 ku ,而 pMAL 表达质粒中 MBP 分子质量为 42.5 ku ,因此获得的融合蛋白的分子质量应约为 78.1 ku 。SDS-PAGE 电泳结果符合这一预期,表明重组蛋白表达质粒经 IPTG 诱导后,融合蛋白得到了表达,而未转入表达质粒的细菌没有蛋白表达。经软件分析目的蛋白表达量约为细菌表达蛋白总量的 42.3% 。采用 MBP 蛋白的抗体进行的 Western blot 试验可清晰看到 2 条蛋白条带,分子质量分别为 42.5 和 78.1 ku (图 3 中泳道 2、3)。



M: 蛋白质分子质量标记 Protein marker; 1: *E. coli* TB1; 2-3: TB1/pMAL 分别经 0.3、1.0 mol/L IPTG 诱导产物 The induced expression of TB1/pMAL with 0.3 and 1.0 mol/L IPTG concentration; 4: TB1/pMAL-ER α 经 0.3 mol/L IPTG 诱导产物 The induced expression of TB1/pMAL-ER α with 0.3 mol/L IPTG concentration.

图 2 鉴定大肠杆菌中 ER α 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed ER α fusion protein in *E. coli* TB1



M: 蛋白质分子质量标记 Protein marker; 1: TB1/pMAL 诱导表达的 MBP 蛋白 MBP protein expressed from TB1/pMAL; 2: TB1/pMAL-ER α 诱导表达的重组蛋白 Recombinant protein expressed from TB1/pMAL-ER α ; 3: 诱导的 TB1 裂解物 The lysis product of *E. coli* TB1.

图 3 蛋白免疫印迹

Fig. 3 Western blot analysis of expression of pMAL-c2x and pMAL-ER α

2.4 表达蛋白的酶切与纯化

采用溶菌酶裂解表达菌液后收集上清,过预先准备好的 Amylose-sepharose 亲和柱,收集洗脱液,经 SDS-PAGE 电泳检测,只有分子质量为 78.1 ku 左右的单一条带,表明纯化后所得的融合蛋白为 MBP-ER α 融合蛋白。采用 Factor X 酶切融合蛋白 4 h 后,进行 SDS-PAGE 电泳检测可见 2 条分子质量分别为 42.5 ku 的 MBP 和分子质量为 35.6 ku 的 ER α 蛋白。再次过柱纯化后,获得 ER α 重组蛋白。

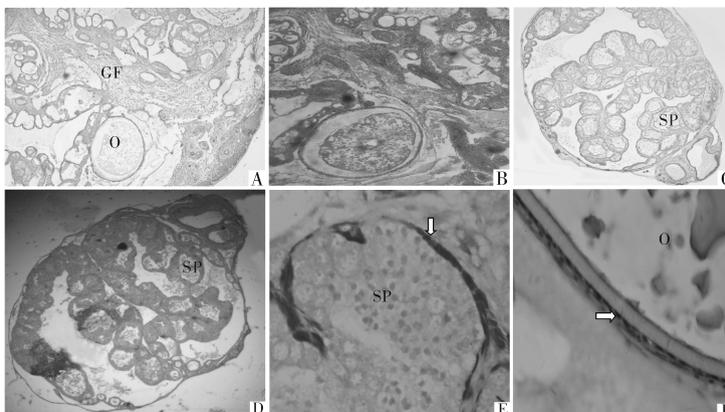
2.5 抗血清制备结果

对小鼠腹腔免疫重组蛋白 1 周后,运用酶联免疫试验进行检测,结果表明重组蛋白免疫 1 周后即可诱导抗体产生,并随着时间推迟抗体滴度逐渐增高,在第 7 周时抗体滴度达到最高值,为 1.158 ± 0.232 ,而对照组不产生抗体,检测结果为 0,统计分析结果表明免疫组与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。

2.6 免疫组化和 Western bolt 结果分析

应用免疫组化 SuperPicTureTM 法 (DAB 棕色反应法) 染色的切片,背景无色或浅棕色。ER α 免疫反应阳性物质呈深浅不等的棕色和棕黄色颗粒 (图 4A、C 中所示),主要定位于细胞膜上 (如图 4E、F 中所示),细颗粒状,而在对照组中,细胞的细胞核被苏木素复染成淡蓝紫色 (图 4B),未出现棕色颗粒阳性信号,与预想结果一致。再次说明 ER α 抗体是特异性的。

本试验通过 Western blot 检测了 ER α 基因在黄鳍精巢和卵巢中蛋白水平的表达情况,采用灰度分析软件 UnScanIt gel 6.1 对图 5 A 进行半定量

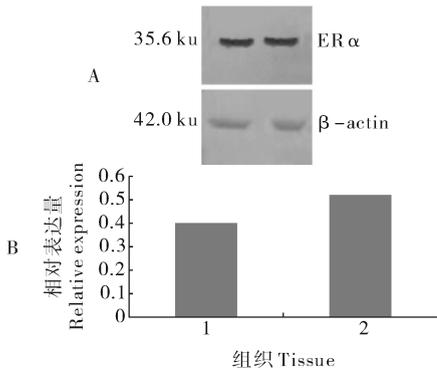


A: 卵巢 Ovary; B: 卵巢对照 Ovary negative control; C: 精巢 Spermmary; D: 精巢对照 Seprmary negative control; E: 精母细胞 Spermatocyte; F: IV 时相卵母细胞 Oocyte in stage IV; O: 卵 Egg; GF: 生殖褶 Gonopores; SP: 精小囊 Spermatozoa.

图 4 鼠抗 ER α 多克隆抗体进行黄鳍性腺免疫组化分析

Fig. 4 Immunohistochemical analysis of mouse polyclonal antibodies against ER α

分析得出泳道中 ER α 蛋白与对应 β -actin 的灰度比值, 并据此制备基因表达结果的柱型图 (图 5B), 试验结果表明, ER α 蛋白在黄鳝精巢和卵巢中均有表达, 精巢中的表达比卵巢中强。



A. 基因蛋白水平的表达 (Western blot) ER α protein expression (Western blot); B. 基因蛋白表达的半定量分析 Semi-quantitative results of ER α protein expression; 1: 卵巢 Ovary; 2: 精巢 Spermmary.

图 5 ER α 蛋白在黄鳝性腺组织中的表达

Fig. 5 Protein expression of ER α in *Monopterus albus* gonadl tissues

3 讨论

类固醇激素 17- β 雌二醇 (estradiol, E₂) 是动物体内与生殖、代谢、内环境稳定、细胞增殖、分化、凋亡、炎症反应等多种生理功能相关的调节因子。雌激素受体是保证 E₂ 行使这些功能的介导。雌激素受体 α (ER α) 是 1986 年 Green 等^[6] 从人乳腺癌细胞中纯化分离得到的, 是最先被研究的一种雌激素受体。在硬骨鱼类的研究中, 首个 ER α 是从虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[7] 中分离得到的。迄今为止已经在金鱼 (*Carassius auratus*)^[8-9]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[10-12]、金头鲷 (*Sparus auratus*)^[13-15]、日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)^[16]、欧鲷 (*Solea solea*)^[17]、舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[18] 和奥利亚罗非鱼^[19] 等鱼中进行了 ER α 基因的克隆和组织表达等方面的研究和报道。目前黄鳝的 ER α 还没有文献报道, 因此, 我们根据其他鱼类 ER α 基因的序列, 设计了 1 对简并引物, 从黄鳝的卵巢中克隆到 ER α 基因的部分比较保守的序列, 同源比对表明该序列与其他鱼类的 ER α 基因具有较高的同源性, 因此, 可确认该基因就是黄鳝的 ER α 基因。为研究 ER α 在黄鳝性腺发育和性逆转中的作用, 我们将 ER α 克隆到表达载体 pMAL-c2x 中进行了体外表达, 经 SDS-

PAGE 和 Western blot 实验验证表明 ER α 基因得到了较好的表达。

相关研究表明大肠杆菌中外源基因表达的蛋白主要以包涵体形式存在, 为了得到活性较强、表达量高的可溶性蛋白, 需要对包涵体进行一系列的变性和复性的过程, 才能获得有一定活性的目的蛋白, 本研究采用的原核表达系统为商品化的 pMAL-c2x 载体, 该载体带有利于纯化的 MBP 蛋白, 该标签蛋白很容易被蛋白酶切割从而分离, 同时其商品化的 GSTrap FF column 纯化柱纯化效率很高, 因此, 我们得到了较纯的重组表达蛋白。丁炜东等^[20] 在罗非鱼 GnRH 蛋白的表达中也使用了该表达载体, 表明该表达系统具有较好的应用效果。在本研究中, 使用带有该表达系统获得的重组蛋白免疫小鼠后, 可以得到效价较高的多克隆抗血清, 经 Western blot 检测该抗血清能够很好地识别 ER α 蛋白, 表明其具有较好的免疫特异性。当然在原核表达系统中表达真核基因也存在一定的风险, 如转录后不能进行糖基化等修饰作用, 从而导致真核生物的基因在原核表达系统中不表达或者表达后没有生物活性, 如对虾白斑综合症病毒的结构蛋白 VP28, 其野生型蛋白分子质量为 28 ku, 原核表达的 VP28 蛋白的分子质量为 22 ku, 造成差异的原因可能是野生型具有糖基化修饰等作用, 而原核表达的 VP28 蛋白的翻译后修饰却是不完全的^[21]。其次是各种原核表达系统对密码子的利用具有选择性, 从而使得外源基因在原核表达系统中无法表达, 难以获得试验结果。但在本试验的进行过程中却没有受到这些不利因素的影响, 重组蛋白具有很好的抗原性, 最终获得了抗血清。

采用制备的多克隆抗体进行免疫组化定位初步研究, 结果表明 ER α 在黄鳝卵巢、精巢组织切片中均呈阳性反应, 说明我们制备的多克隆抗血清可以与黄鳝 ER α 蛋白发生免疫反应, 进一步观察可以发现卵巢中卵母细胞膜、卵母细胞核等各期中均呈免疫阳性反应。Sar 等^[22] 研究结果表明 ER α 在大鼠卵巢的膜细胞、间质细胞和生发上皮中表达, 这与我们的结果相似, 表明 ER α 可在黄鳝卵母细胞膜上表达。当然 ER α 不仅可在细胞膜上表达, 而且也可能在核和胞浆上表达, 如 Hammes 等^[23] 的研究结果表明 ER α 可同时在细胞膜、细胞核、胞浆上表达, 方永强等^[24-25] 对鲮鱼精巢进行 ER α 免疫组织化学观察时发现 ER α 主要定位在精原细胞、初级精母细胞

和次级精母细胞上,核质和精子细胞与精子则呈免疫阴性。王连顺^[26]的研究表明大泷六线鱼精巢各个时期的次级精母细胞、精子细胞、精子、退化吸收期的初级精母细胞都有反应。另外,Spinto 等^[27]研究肝和卵巢两种组织中 ER α 的表达情况时发现 ER α 主要在精巢中表达。同时,Bouma 等^[28]分析报道了 ER α 仅表达在大麻哈鱼的睾丸间质成纤维细胞(间质细胞的前体细胞)上,认为雌激素的一个功能就是使前体细胞分化为成熟间质细胞。Western blot 半定量分析结果也表明,ER α 在黄鳍精、卵巢中均有表达,且在精巢中的表达量要略大于卵巢中。

本试验采用 RT-PCR 方法克隆了黄鳍性腺中 ER α 基因,选取其具有较强抗原性的氨基酸片段相对应的 cDNA 序列作为模板克隆到长约 945 bp 的序列,并将其克隆到 pMAL-c2x 原核表达系统中,采用 IPTG 诱导,过柱纯化后,获得了 ER α 表达蛋白。免疫小鼠后,制备了较高滴度的抗血清,并初步进行了免疫组化研究,表明该抗血清能特异地与黄鳍性腺中的 ER α 蛋白结合,在卵母细胞膜上呈阳性反应,为进一步研究 ER α 在黄鳍性逆转中的作用打下了基础。

参 考 文 献

- [1] 刘健康,顾国彦. 鱈鱼性逆转时生殖腺组织的改变[J]. 水生生物学报,1951,2(1/2):85-109.
- [2] 肖亚梅. 黄鳍繁殖生物学研究:黄鳍生殖腺的早期发生及其结构变化[J]. 湖南师范大学自然科学学报,1993,16(4):346-349.
- [3] 肖亚梅,刘荡. 黄鳍由间性发育转变为雄性发育的细胞生物学研究[J]. 水产学报,1995,19(4):297-301.
- [4] 卞倩. 雌激素受体及其介导的基因表达与调控[J]. 国外医学妇产科学分册,2002,29(6):348-351.
- [5] PAKDEL F,DELAUNAY F,DUCCOURET B,et al. Regulation of gene expression and biological activity of rainbow trout estrogen receptor [J]. Fish Physiol Biochem,1997,17:1-6.
- [6] GREEN S,CHAMBON P. A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors [J]. Nature,1986,324:615-617.
- [7] SKILLMAN A D,NAGLER J J,HOOKE S E,et al. Dynamics of 17 α -ethynylestradiol exposure in rainbow trout:absorption,tissue distribution,and hepatic gene expression pattern [J]. Environ Toxicol Chem,2006,25(11):2997-3005.
- [8] YAN Z,LU G,HE J. Reciprocal inhibiting interactive mechanism between the estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to 17 β -estradiol and benzo[a]pyrene [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol,2012,156(1):17-23.
- [9] NELSON E R,HABIBI H R,CHOI C Y,et al. Functional significance of nuclear estrogen receptor subtypes in the liver of goldfish [J]. Endocrinology,2010,151(4):1668-1676.
- [10] BARDET P L,HORARD B,ROBINSON-RECHAVI M,et al. Characterization of estrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. J Mol Endocrinol,2002,28(3):153-163.
- [11] BARDET P L,OBRECHT-PFLUMIO S,THISSE C,et al. Cloning and developmental expression of five estrogen-receptor related genes in the zebrafish [J]. Dev Genes Evol,2004,214(5):240-249.
- [12] LASSITER C S,KELLEY B,LINNEY E. Genomic structure and embryonic expression of estrogen receptor beta (ERbeta) in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Gene,2002,299(1/2):141-151.
- [13] PINTO P I,TEODOSIO R,SOCORRO S,et al. Structure,tissue distribution and estrogen regulation of splice variants of the sea bream estrogen receptor alpha gene [J]. Gene,2012,503(1):18-24.
- [14] PASSOS A L,PINTO P I,POWER D M,et al. A yeast assay based on the gilthead sea bream (teleost fish) estrogen receptor beta for monitoring estrogen mimics [J]. Ecotoxicol Environ Saf,2009,72(5):1529-1537.
- [15] PINTO P I,PASSOS A L,MARTINS D M,et al. Characterization of estrogen receptor beta in sea bream (*Sparus auratus*): phylogeny,ligand-binding,and comparative analysis of expression [J]. Gen Comp Endocrinol,2006,145(2):197-207.
- [16] JENG S R,PASQUIER J,YUEH W S,et al. Differential regulation of the expression of cytochrome P450 aromatase,estrogen and androgen receptor subtypes in the brain-pituitary-ovarian axis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) reveals steroid dependent and independent mechanisms [J]. Gen Comp Endocrinol,2012,175(1):163-172.
- [17] CAVIOLA E,DALLA-VALLE L,BELVEDERE P,et al. Characterisation of three variants of estrogen receptor beta mRNA in the common sole,*Solea solea* L. [J]. General and Comparative Endocrinology,2007,153(1/2/3):31-39.
- [18] HALM S,MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ G,RODRÍGUEZ L,et al. Cloning,characterisation,and expression of three oestrogen receptors (ERalpha,ERbeta1 and ERbeta2) in the European sea bass,*Dicentrarchus labrax* [J]. Mol Cell Endocrinol,2004,223(1/2):63-75.
- [19] 兰滔,卢迈新,杨丽萍,等. 奥利亚罗非鱼雌激素受体两种亚型 cDNA 的克隆、组织分布及雌激素对其表达的影响[J]. 水产学报,2010,34(1):8-18.
- [20] 丁炜东,曹丽萍,吴婷婷. 奥利亚罗非鱼促性腺激素释放激素 cDNA 的原核表达及其免疫原性研究[J]. 生物工程学报,2006,22(4):561-567.
- [21] 赵新颜,魏聪,戴玲芬,等. 对虾白斑综合症病毒结构蛋白 VP28 的原核表达和性质研究[J]. 水生生物学报,2004,28(3):234-

- 239.
- [22] SAR M, WELSCH F. Differential expression of estrogen receptor- β and estrogen receptor- α in the rat ovary [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(2): 963-971.
- [23] HAMMES S R, LEVIN E R. Extranuclear steroid receptors: nature and actions [J]. *Endocr Rev*, 2007, 28: 726-741.
- [24] 方永强, 赵维信, 魏华. 文昌鱼类固醇激素水平与性腺发育相关性的研究[J]. *科学通报*, 1993, 38(8): 744-746.
- [25] 方永强, 张为民, 翁幼竹. 17β -雌二醇促进鲮鱼性腺发育的作用机制: 雌激素受体的定位[J]. *台湾海峡*, 2003, 22(4): 422-425.
- [26] 王连顺. 大泷六线鱼繁殖内分泌生理功能及 GH 基因部分序列的克隆[D]. 青岛: 中国海洋大学图书馆, 2007.
- [27] SPINTO P I, TEODOSIO R, SOCORRO S, et al. Structure, tissue distribution and estrogen regulation of splice variants of the sea bream estrogen receptor alpha gene [J]. *Gene*, 2012, 503(1): 18-24.
- [28] BOUMA J, NAGLER J J. Estrogen receptor-protein localization in the testis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during different stages of the reproductive cycle [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65: 60-65.

Cloning and polyclonal antibody preparation of estrogen receptor α gene from swamp eel, *Monopterus albus*

DING Wei-dong¹ CAO Li-ping¹ CAO Zhe-ming¹
BING Xu-wen¹ CHEN Ke-chun² HU Jin-ming³

1. *Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;*
2. *Jiangyan Fishery Technical Guidance Station, Jiangyan 225500, China;*
3. *Taizhou Risheng Ecological Agriculture Ltd, Jiangyan 225599, China*

Abstract To study the function of the estrogen receptor α ($ER\alpha$) gene, the recombinant pMAL- $ER\alpha$ was constructed and expressed in TB1 *E. coli*. Partial cDNA encoding $ER\alpha$ was amplified from total RNA of swamp eel (*Monopterus albus*) ovary by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The analysis of the sequence data indicated that the cDNA fragment was 945 bp in length, encoding 315 amino acid residues. The amplified cDNA fragment was cloned into the prokaryotic expression vector, pMAL-c2x and the recombinant plasmid was then transformed into *E. coli* TB1. $ER\alpha$ -MBP fusion protein was obtained after the IPTG addition into the growth media. SDS-PAGE analysis showed that the $ER\alpha$ -MBP was expressed after induction by IPTG for 4 h. A protein band of 78.1 ku appeared on SDS-PAGE gel and was identified by Western blot. The production of the recombinant protein was about 42.3% of total bacteria protein. After purification and cleavage of the fusion protein, purified $ER\alpha$ protein was obtained. Then the purified protein was used to immunize ICR mice to produce anti- $ER\alpha$ antibody. This purified protein could significantly elicit specific antibody response in immunized mice compared with the control groups, and the titers against $ER\alpha$ reached the peak (1.158 ± 0.232) at the 7th week. The immunohistochemical analysis showed that the polyclonal antibody can induce specific reaction with $ER\alpha$ receptor in ovary and produced brown precipitation on the ovary cell membrane.

Key words swamp eel; estrogen receptor α ; prokaryotic expression; polyclonal antibody; immunohistochemical analysis