



张爱玲, 孙显月, 卢孝璋, 等. 猪 *FAM213B* 基因 mRNA 和启动子的克隆及序列分析[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(3): 1-8.

猪 *FAM213B* 基因 mRNA 和启动子的克隆及序列分析

张爱玲^{1,2}, 孙显月², 卢孝璋², 李加琪², 张 豪²

(1 广东第二师范学院 生物与食品工程学院/广东高校应用生态工程技术开发中心, 广东 广州 510303;
2 华南农业大学 动物科学学院/广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】获得猪 *FAM213B* 基因完整 mRNA 和启动子序列, 研究猪 *FAM213B* 基因表达, 为探讨母猪妊娠的建立和胚胎发育调控机制奠定基础。【方法】通过 5'RACE 和 3'RACE 技术, 获得基因完整 mRNA 序列, 分析不同物种该基因氨基酸序列相似性; 通过 PCR 克隆启动子区, 并通过双荧光素酶报告基因载体系统转染猪子宫内膜细胞, 研究其转录活性。【结果】猪 *FAM213B* 基因 mRNA 全长 808 bp, 其中 5'UTR、CDS 区和 3'UTR 长度分别为 67、609 (含终止密码子) 和 132 bp (不含 poly A 序列), 在 17~106 位氨基酸之间存在硫氧还蛋白折叠结构域; 与猪 *FAM213B* 基因其他 2 个潜在转录本相比, 三者都包含硫氧还蛋白折叠结构域, 但蛋白三级结构存在较大差异; 猪 *FAM213B* 氨基酸序列与山羊、牛和绵羊高度相似, 相似性分别为 94.03%、93.03% 和 91.54%。克隆获得 2 261 bp (−2 231/+30) 的基因启动子序列, 将其连接至双荧光素酶报告基因载体, 转染猪子宫内膜细胞, 发现获得的启动子片段能够启动下游报告基因的转录, 在启动子区存在潜在的典型 NFκB 等转录因子结合位点。【结论】本研究获得猪 *FAM213B* 基因转录本长度为 808 bp, 其蛋白存在硫氧还蛋白折叠功能结构域, 其启动子序列 (−2 231/+30) 在猪子宫内膜细胞中具有较强的转录活性。

关键词:猪; *FAM213B* 基因; 转录; 启动子; 克隆; 子宫内膜细胞; 硫氧还蛋白
中图分类号:S828 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2017)03-0001-08

Cloning and sequence analysis of mRNA and promoter of pig *FAM213B* gene

ZHANG Ailing^{1,2}, SUN Xianyue², LU Xiaozhang², LI Jiaqi², ZHANG Hao²

(1 Biology and Food Engineering Institute, Guangdong University of Education/Guangdong Development Center of Applied Ecology and Ecological Engineering in Universities, Guangzhou 510303, China;
2 College of Animal Science, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】To obtain the complete mRNA and promoter sequences of pig *FAM213B* gene, and provide a basis for studying the mechanism of the *FAM213B* gene in regulating gestation establishment and embryo development of female pigs. 【Method】The complete mRNA sequence of the *FAM213B* gene was obtained using 5' and 3'RACE methods. The amino acid sequence similarities of different species were analyzed. The gene promoter was cloned, and its transcription activity was detected by the dual luciferase report system in porcine endometrial cells. 【Result】The mRNA of pig *FAM213B* gene was 808 bp in full length, including the 5'UTR, CDS and 3'UTR of 67, 609 (including the termination codon) and 132 bp (excluding poly A), respectively. A thioredoxin fold domain was predicted from the 17th to

收稿日期:2016-07-24 优先出版时间:2017-04-12
优先出版网址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20170412.1434.024.html>
作者简介:张爱玲(1977—),女,讲师,博士, E-mail: zhangmeixiaL@163.com; 通信作者:张 豪(1965—),男,教授,博士, E-mail: zhanghao@scau.edu.cn
基金项目:国家自然科学基金(31201771);现代农业产业技术体系专项(CARS-36)

106th amino acid residues. The obtained transcript and the other two computed transcripts all contained the thioredoxin fold domains, but the tertiary structures of three proteins were highly different. The amino acid sequence of pig FAM213B showed 94.03%, 93.03% and 91.54% similarities with those of goat, cattle and sheep, respectively. The cloned promoter sequence (−2 231/+30) of the *FAM213B* gene was linked with the dual luciferase report vector, and transfected into the endometrial cells. The promoter fragment could drive the expression of the downstream report gene. There were potential binding sites of transcription factors such as NF κ B within the promoter. 【Conclusion】The complete sequence of the transcript of pig *FAM213B* gene is 808 bp. The FAM213B protein contains a thioredoxin fold domain. The *FAM213B* promoter (−2 231/+30) has strong transcription activity in porcine endometrial cells.

Key words: pig; *FAM213B* gene; transcription; promoter; cloning; endometrial cell; thioredoxin

FAM213B (Family with sequence similarity 213, member B), 又称为前列腺酰胺合成酶(Prostamide F synthase, PGFS), 属于硫氧还蛋白超家族成员, 较早在小鼠和猪的大脑中发现, 并推测在中枢神经系统起着重要的作用^[1]。FAM213B 也是前列腺素(Prostaglandin, PG)合成过程中一种重要的催化酶。PG的生物合成是一个复杂的过程, 涉及到多个酶促反应以及中间产物的形成(<http://www.kegg.jp/pathway/hsa00590>): 首先, 作为 PG 合成的起始物之一, 花生四烯酸(Arachidonic acid, ARA)在酶催化下被转变成前列腺素 H₂(Prostaglandin H₂, PGH₂), PGH₂作为一种不稳定的中间产物, 很快在 FAM213B 的作用下生成更为稳定的花生四烯酸酯或者前列腺素 E₂ α (Prostaglandin E₂, PGE₂), 以及向前列腺素 F₂ α (Prostaglandin F₂ α , PGF₂ α)的转变; FAM213B 还能够直接催化 PGH₂ 生成 PGF₂ α ^[2], 因此 FAM213B 具有双重催化作用。

在 FAM213B 催化 PG 合成过程中, PGE₂、PGH₂ 与 PGF₂ α 是重要的中间产物。PG 是哺乳动物重要的生殖激素, 参与母猪发情周期、妊娠识别和建立等生理活动。不同来源、不同类型的 PG 具有不同的生物学作用, 在动物繁殖过程中具有调节作用的主要是 PGE₂ 和 PGF₂ α ^[3]。PGE₂ 和 PGF₂ α 之所以受到关注是因为两者具有相反的生理功能, PGF₂ α 是一种溶解黄体因子^[4], 而 PGE₂ 则能够抑制黄体溶解^[5,6], 因此 PGE₂/PGF₂ α 须受到严格控制, 恰当的比例维持着母猪的发情周期和妊娠^[3,7]。较高比例的 PGE₂/PGF₂ α 对于母猪妊娠的建立和维持具有重要作用, 比如中国高繁殖力母猪梅山猪^[8]和二花脸猪^[9], 相比外种猪, 均表现较高的 PGE₂/PGF₂ α 比例。由于 PGF₂ α 具有溶解黄体作用, 因此在怀孕母猪体内, PGF₂ α 的表达量受到严格控制。从上述 PGF₂ α 的生成过程来看, FAM213B 可能间接影响 PGE₂/PGF₂ α 比例。

目前, FAM213B 作为催化 PGH₂ 直接生成

PGF₂ α 的酶相关研究较少。显然, PGH₂ 直接生成 PGF₂ α , 比 PGH₂ 生成 PGE₂ 再生成 PGF₂ α 过程更为简单, 对于 PGF₂ α 的高效快速生成具有重要意义。鉴于 PGF₂ α 的溶解黄体作用, 可以推测 FAM213B 可能在母猪的发情周期中起着重要的催化作用, 或者 FAM213B 含量在母猪怀孕阶段可能受到严格的调控。但是, FAM213B 也能够催化 PGH₂ 向 PGE₂ 的转化, 而 PGE₂ 与 PGF₂ α 对黄体具有相反的生理功能, 因此 FAM213B 的表达可能会受到更严格的调控。为了深入研究 FAM213B 在母猪 PG 合成中的作用, 本研究对母猪 *FAM213B* 基因进行了全长 mRNA 的克隆, 并在此基础上对启动子进行了克隆和转录活性的初步分析, 期望为进一步研究猪 *FAM213B* 基因的表达调控和功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

动物组织与细胞: 用于提取 DNA 和 RNA 的耳组织以及猪子宫内膜组织, 均来源于妊娠 12 d (GD12) 的第 3 胎长大杂交母猪(LL), 样品采自阳江市某猪场; 猪子宫内膜细胞的采集来源于广州市某屠宰场长大淘汰母猪。

菌株、质粒和限制性内切酶及其他: 大肠埃希菌菌株 DH5 α 和 pMD20T 载体购自 TaKaRa 公司, pGL3-Basic 载体、pRL-TK 载体、限制性内切酶购自 Promega 公司。Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DL2000 分子量标准、DNA 凝胶回收试剂盒等购自广东东盛生物技术公司; T4 DNA 连接酶、RNA 提取试剂 Trizol、反转录试剂盒、RACE kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司。无内毒素质粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司。

1.2 猪 *FAM213B* 基因完整 mRNA 序列的克隆

根据 GenBank 上公布的猪 *FAM213B* 基因(XM_005664949.2) CDS 区的序列, 设计引物, 用于完整 mRNA 序列的克隆。使用 5'-Full RACE kit 获得基因的 5'UTR 序列, 主要步骤包括: 使用烟草酸焦磷酸酶

(Tobacco acid pyrophosphatase, TAP) 去掉 mRNA 的 5'帽子结构,使用 T4 RNA Ligase 将 5'RACE Adaptor 连接到 mRNA 的 5'端后,使用5'RACE Adaptor 上的引物(p-5'Outer、p-5'Inner)与已知序列部分的引物(5'GSP1、5'GSP2)进行巢式 PCR 反应,特异性地扩增 cDNA 5'末端的全长序列,最后进行测序。3'UTR 的获得过程包括:由 ReverseTranscriptaseM-MLV (RNaseH-)将 poly(A) + RNA 反转录成 cDNA,然后再使用 TaKaRaLATaq,以反转录的 cDNA 为模板,利

用试剂盒自带引物(p-3'Outer、p-3'Inner)和已知序列部分引物(3'GSP1、3'GSP2)进行巢式 PCR 反应,上述过程均按照使用说明书进行,获得完整 3'UTR 序列。将获得序列进行拼接,获得完整 mRNA 序列,提交 GenBank,获得基因登录号。根据获得序列设计引物:p-mRNA-F 和 p-mRNA-R,以猪子宫内膜总 RNA 为模板,PCR 反应后,进行 T-A 克隆后测序,以此验证所拼接序列的正确性。具体的引物序列见表 1。

表 1 猪 *FAM213B* 基因 mRNA 全序列和启动子克隆所用引物信息
Tab. 1 The primers for cloning the mRNA and promoter of porcine *FAM213B* gene

名称	引物序列(5'→3') ¹⁾	产物/bp
5'GSP1	GCGACACACCATGCAGCCGAAGC	
5'GSP2	CACGGCCTCCCCGGTCACTGCGTGC	
3'GSP1	TACGAAGCCTGTGGCAGGAGCAGG	
3'GSP2	GACCAGCACGGCGTGCGCCTGCTGGG	
p-mRNA-F	AGGACTGCAGGCGGAGAGGGCTG	609
p-mRNA-R	CCAGGAACCACCTTTAATGCT	
p-promoter-F	ACCACCTGAGACTGTCGCCAAC	2 261(-2 231/ +30)
p-promoter-R	GCAAGGTCCACCGTGCTCAT	
p0-promoter-F	CG ACGCGTCGACCACCTGAGACTGTCC	2 005(-2 175/ +30)
p0-promoter-R	CCC AAGCTTGGGCTCCGCACCAGCCCTCT	

1)黑框内为保护碱基,下划线为酶切位点;上游为 *Mlu* I 酶切位点,下游为 *Xho* I 酶切位点。

1.3 猪 *FAM213B* 基因启动子克隆

参照本实验室获得的猪 *FAM213B* 基因 mRNA 序列(KX444503)以及 5'调控区序列(GenBank 登录号:100134955),设计引物(表 1 引物:p-promoter-F 和 p-promoter-R),扩增获得猪 *FAM213B* 基因启动子区 2 261 bp,将此构建至 T 载体,测序后,命名为 T-FAM213B-P。以此载体为模板,以带有酶切位点的引物(p0-promoter-F 和 p0-promoter-R)扩增启动子区,PCR 扩增反应程序为:98 ℃ 预变性 1 min;98 ℃ 变性 10 s,67 ℃ 退火 10 s,72 ℃ 延伸 2.5 min,33 个循环;72 ℃ 后延伸 10 min。

将上述 PCR 扩增获得 DNA 片段用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收纯化后,用 *Mlu* I 和 *Xho* I 进行双酶切,同时对 pGL-Basic 载体进行酶切,酶切体系为:10 × Buffer 10 μL,PCR 产物或者载体 50 μL,*Mlu* I 和 *Xho* I 各 5 μL, ddH₂O 30 μL,37 ℃ 反应 3 h。将双酶切后的 DNA 片段和 pGL-Basic 载体分别用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收纯化,2 个 DNA 片段进行连接,10 μL 连接反应体系中,依次加入 1 μL Ligation Buffer,2 μL pGL3- basic 载体双酶切产物,6.8 μL 启动子片段,0.2 μL T4 DNA 连接酶,22 ℃ 连接 4 h。转化大肠埃希菌 DH5α,涂布氨苄青霉素琼脂平板,37 ℃ 过夜培养,然后挑取单克隆进行测序,阳性质粒

命名为 P0。

1.4 猪子宫内膜细胞的分离与培养

屠宰场采集卵泡期子宫,所采样品于切口处结扎后,放入冰盒,迅速带回实验室。纵向剪开子宫角,置于无菌培养皿中,用含有双抗的 PBS 中清洗数次,直至液体清亮。剪取子宫内膜上皮组织于含有双抗的 PBS 中,漂洗数次。

用眼科剪将子宫内膜上皮组织剪成 1 mm³ 大小。将剪碎的组织块转移至培养瓶中。加入 2 倍体积的 1 g · L⁻¹ 胶原酶 I,37 ℃ 水浴摇床消化,每隔 0.5 h 混摇 1 次。2.5 h 后加入等体积含 100 g · L⁻¹ FBS 的 DMEM/F12 的终止液进行终止消化。把消化液和终止液的混合液用 150 μm(100 目)细胞筛过滤,吸取滤液至离心管中,500 r · min⁻¹ 离心 5 min(沉淀主要为上皮细胞,上清主要为基质细胞)。

上皮细胞与基质细胞通过 1 000 r · min⁻¹ 离心 5 min 和 PBS 重悬后,将沉淀细胞计数,然后以 2 × 10⁵ 个细胞 · mL⁻¹ 接种于细胞培养瓶中,于 37 ℃,CO₂ 培养箱中静置培养(含体积分数为 5% 的 CO₂ 和 95% 的空气)。原代细胞在接种后 24 h 左右贴壁,约 3 ~ 5 d 达到 90 % 融合。此时,吸出培养液,用 PBS 漂洗 2 次后,加入 2.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶消化 3 ~ 5 min。在显微镜下观察,待大部分细胞变圆时,立即

http://xuebao.scau.edu.cn

加入等体积的终止液终止消化,轻轻吹打数次。将细胞悬液转移至离心管中,1 000 r·min⁻¹离心 5 min 后弃上清,再加入 5 mL PBS 重悬细胞,1 000 r·min⁻¹离心 5 min 后弃上清,接种于新的培养瓶继续培养,备用。

将上述构建好的载体用 OMEGA 无内毒素试剂盒提取后,与 pRL-TK 质粒用阳离子脂质体法转染细胞,48 h 后,用双荧光素酶报告基因系统进行 Luciferase 活性检测,收集数据分析启动子片段转录活性。

1.5 生物信息学分析

蛋白基本理化性质预测:<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>, ExPASy 的 ProtScal 程序;蛋白质三级结构预测:<http://swissmodel.expasy.org/>;蛋白质结构域和基序预测:<http://smart.embl-heidelberg.de> 的 UniProt 程序;序列比对工具:Kalign 和 Clustal Omega。

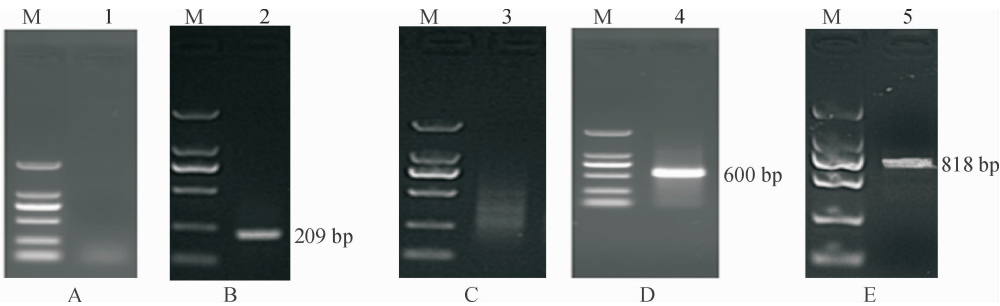
2 结果与分析

2.1 猪 FAM213B 基因完整 mRNA 序列的克隆

将提取的猪子宫内膜组织总 RNA 经过去磷酸化处理和去帽反应,连接 5'RACE adaptor 后反转录

成 cDNA,以该 cDNA 为模板,进行引物 p-5'Outer 和 5'GSP1 的 PCR 扩增,此时产物条带弥散不清,如图 1A。再以此 PCR 产物为模板,以引物 p-5'Inner 和 5'GSP2 进行 PCR 扩增,此时得到单一的目的条带 209 bp,如图 1B。将目的条带连接载体后测序,将所得序列与已知序列比对,拼接后得到了 67 bp 的 5'UTR,即转录起始位点位于 ATG 前的 67 bp 处。同样,以总 RNA 为模板,用 ployT 引物将 RNA 反转录成 cDNA,接着用 p-3'Outer 和 3'GSP1 引物进行 PCR 扩增,此时产物条带弥散不清,如图 1C。再以此为模板,以 p-3'Inner 和 3'GSP2 引物进行 PCR 扩增,此时得到单一目的条带 600 bp,如图 1D。将目的条带连接载体后测序,所得序列与已知序列比对,拼接后得到了 132 bp 的 3'UTR,以及 10 bp 的 ployA 序列。

经过测序后,以 5'UTR 和 3'UTR 序列设计引物 p-mRNA-F 和 p-mRNA-R,以长大杂母猪子宫内膜组织 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增获得完整的 mRNA 序列,并经过测序确定与 RACE 技术获得的 mRNA 序列完全一致,为 808 bp,polyA 长度为 10 bp(见图 1E)。将该序列提交 GenBank,获得登录号为: KX444503。



M 为 DL2000 Marker,从上到下为:2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp;1: 5'RACE Outer 引物扩增弥散带;2: 5'RACE Inner 引物扩增特异性条带;3:3'RACE Outer 引物扩增弥散带;4:3'RACE Inner 引物扩增特异性条带;5:FAM213B 基因 mRNA 验证扩增结果。

图 1 猪 FAM213B 基因完整 mRNA 序列的 RACE 结果

Fig. 1 The RACE results of porcine FAM213B mRNA sequence

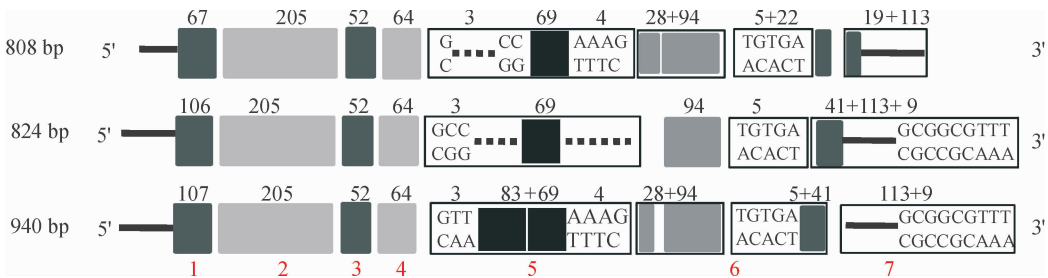
2.2 猪 FAM213B 性质以及不同转录本和蛋白质结构比较

用 ExPASy 的 ProtScal 程序分析获得猪 FAM213B 基因 mRNA CDS 编码蛋白的理化性质,发现该蛋白的分子量为 21 546. 8,等电点为 8. 87,半衰期为 30 h,不稳定系数为 61. 27(大于 40 为不稳定),为一不稳定性蛋白。用 UniProt 程序分析该蛋白的结构域,发现在 17~106 位氨基酸之间存在硫氧还蛋白折叠结构域。GO 分析表明,该蛋白作为细胞质成分,参与了氧化还原反应过程(GO:0055114),具有催化活性。

猪 FAM213B 基因定位于 6 号染色体,基因全长

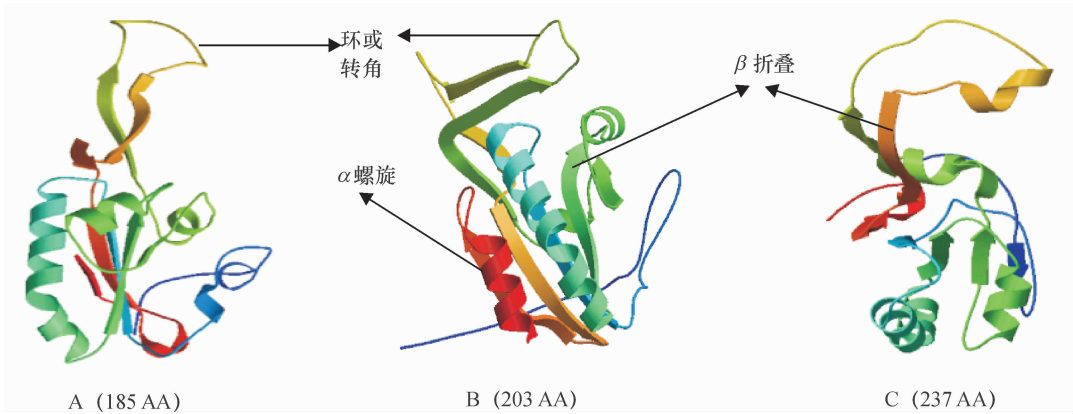
3 138bp(GenBank 登录号:NC_010448. 3), NCBI 数据库公布的猪 FAM213B 基因的 mRNA 序列有 3 个,其中 1 个序列为 609 bp(NM_001113441. 1),是一个完整的阅读框,不含非翻译区,将其序列与本研究获得的 mRNA 的 CDS 区进行比对,两者序列一致。另外 2 个序列是根据生物信息学计算得出的转录本,分别为 940 bp(XM_013998922. 1)和 824 bp(XM_005664949. 2)。鉴于人 FAM213B 基因存在多个转录本,进而将本研究获得猪 FAM213B 基因 mRNA 序列与 940 和 824 bp 转录本序列进行比较(在线软件:Kalign),结果表明所获得的 FAM213B 基因 mRNA 与另外 2 个转录本的非翻译区、CDS 区长度存在差异,

结果如图 2 所示。808、824、940 bp 的转录本 CDS 区分别长:609、555 和 711 bp,编码氨基酸数目为:203、185 和 237。进一步与基因组序列进行比对分析,发现猪 *FAM213B* 基因由 7 个外显子组成,本研究所获得的 mRNA 序列与其他 2 个较长的 mRNA 序列相比,发现在 2、3 和 4 外显子不存在差异,而在第 1、5、6 和 7 外显子存在差异,1 和 7 外显子的差异在于 UTR 长度不同;此外,本研究获得序列第 5、6 外显子分别为 69、132 bp,而 940 bp 序列第 5 外显子 159 bp,而 824 bp 序列第 5、6 外显子分别为 72 和 94 bp。



实横线:UTR;方框:编码区;虚线:该处不存在碱基;上方数字表示碱基数目,下方红色数字 1~7 表示外显子序号;808、824 和 940 bp 分别表示 3 个转录本碱基数目。

图 2 猪 *FAM213B* 基因 mRNA 不同转录本序列与结构分析
Fig. 2 The genetic structures of three transcripts of porcine *FAM213B* gene



A、B、C 分别对应于图 2 中 3 个转录本的蛋白结构,括号内数字表示 3 个转录本编码氨基酸数目。
图 3 猪 *FAM213B* 基因不同转录本的蛋白质三级结构分析

Fig. 3 The protein tertiary structures of three transcripts of porcine *FAM213B* gene

2.3 猪 *FAM213B* 蛋白质同源进化分析

通过 Clustal Omega 软件,将人(NP_689584.2)、猪(KX444503)、牛(NP_001035688.1)、山羊(XP_005690822.2)、绵羊(XP_014954752)、小鼠(NP_079858.2)、大鼠(NP_001102167.1)、斑马鱼(NP_998478.1)、爪蟾(NP_001087128.1) 9 个物种 *FAM213B* 基因开放阅读框转录所得氨基酸序列进行蛋白质同源性分析,猪与山羊、牛和绵羊有更高的相似性,相似性分别为 94.03%、93.03% 和 91.54%;与人、小鼠和大鼠相似性为 88.38%、86.57% 和 85.57%;与爪蟾、斑马鱼相似性分别为 61.19% 和

通过在线工具预测 3 个转录本蛋白质三级结构 (<http://swissmodel.expasy.org/>),结果如图 3 所示。3 个蛋白均有 α 螺旋、 β 折叠、转角等结构组成,由于 3 个转录本编码区前 108 个氨基酸序列一致,因此三级结构存在类似空间构象,主要由 α 螺旋组成;而三者的氨基酸序列、数目不一致,因此蛋白质三级结构差异较大。在这些氨基酸 44 位处为半胱氨酸(Cys⁴⁴),这是该蛋白的活性位点;同时,三者都存在硫氧还蛋白折叠结构域。

59.70%。根据氨基酸相似性分析结果,用邻接法构建 *FAM213B* 蛋白质同源进化分支图(图 4)。

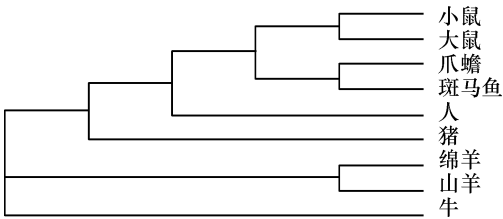


图 4 基于 *FAM213B* 蛋白质序列的聚类分析
Fig. 4 Cluster analysis based on *FAM213B* protein sequences

2.4 猪 *FAM213B* 基因启动子克隆与双荧光素酶重组载体的构建

将 5'RACE 试验获得的 mRNA 序列的第 1 个碱基确定为 +1,通过 PCR 扩增获得 2 261 bp(-2 231/+30)的猪 *FAM213B* 基因 5'启动子序列(图 5A)。将猪 *FAM213B* 基因启动子区序列通过在线生物学软件进行分析,预测启动子区潜在的顺式作用元件和结合反式作用因子,发现 *FAM213B* 基因启动子区存在潜在的转录因子结合位点(图 5B),如典型的 TATA box、CAAT box 等顺式作用元件;存在与下列转录因子如 cAMP 应答元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)、CCAAT 增强

子结合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP)、E-box 结合因子(E-box binding factors)、核因子 κ B(Nuclear factor κ B, NF κ B)、八聚体转录因子(Octamer transcription factor-1, OCT-1)等潜在结合位点。其中,NF κ B 成员 NF κ B1 和 RelA 分别位于: -1 143/-1 132 和 -664/-655 区域(图 5A)。根据在线预测结果,以 2 261 bp(-2 231/+30)的片段(图 6A)为模板,用 p0-promoter-F 和 p0-promoter-R 引物对扩增 -2 175/+30 区域(图 6B),并将其连接构建报告基因重组载体,酶切鉴定结果符合预期(图 6C)。

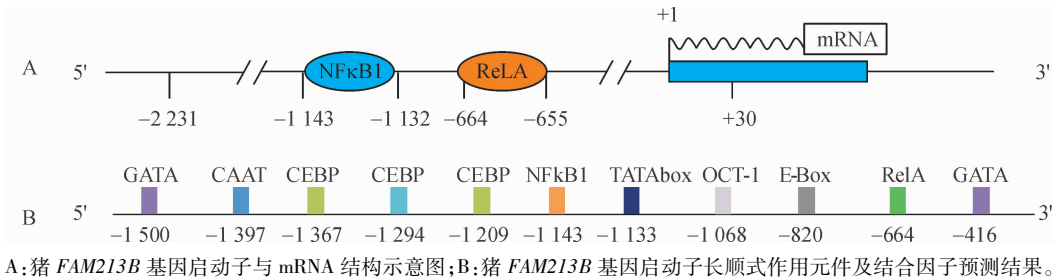


图 5 猪 *FAM213B* 基因 mRNA 结构示意图及启动子顺式作用元件与转录因子预测结果

Fig.5 The structure of the *FAM213B* mRNA and prediction of cis-acting elements and transcription factors in *FAM213B* gene promoter

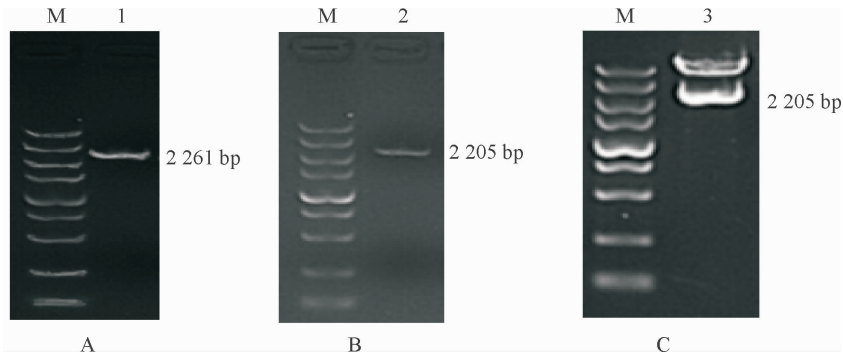


图 6 猪 *FAM213B* 基因启动子报告基因重组载体的构建

Fig.6 The bioinformatics analysis and the construction of the reporter gene recombinant vector of *FAM213B* gene promoter

2.5 猪子宫内膜细胞培养及 *FAM213B* 基因启动子活性的初步鉴定

采用胶原酶消化法,分离培养上皮细胞和间质细胞。猪子宫内膜上皮细胞大概在 24 h 左右开始贴壁并成旋涡状排列的致密单层细胞集落,采用离心的方法并不能够将上皮细胞和间质细胞完全分离,因而偶见散在的间质细胞插入性生长(图 7A)。虽然间质细胞在数小时内开始贴壁成单个生长,但并不影响启动子活性的检测。子宫内膜上皮细胞在 3~5 d 后可达到 80% 融合,上皮细胞呈梭形,边界清

楚,排列紧密,胞质呈颗粒状,胞核大而圆,铺满瓶底时,细胞集落扩大并相互融合成片(图 7B)。

采用瞬时转染方法,将猪 *FAM213B* 基因启动子报告基因重组载体 P0 转染猪子宫内膜上皮细胞,同时共转染内参 pGL-TK 质粒。分别检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性,萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶活性的比值即表示启动子片段的活性,启动子报告基因瞬时转染结果如图 8 所示:重组质粒 P0 转录活性远高于对照,表明克隆所获得片段具有启动子转录活性。

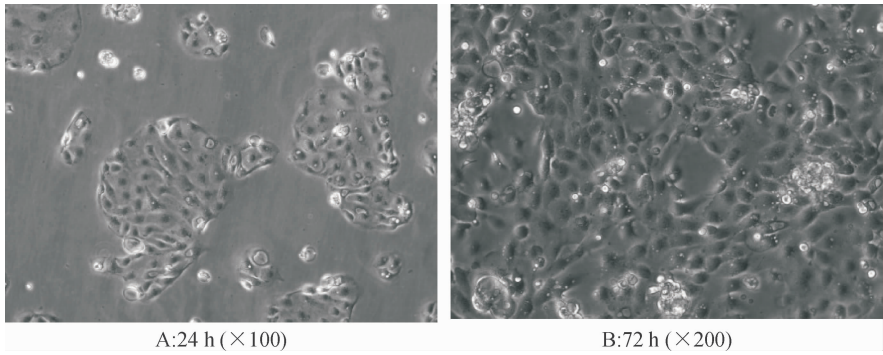


图7 猪子宫内膜上皮细胞培养形态

Fig.7 Appearance of the cultured endometrial epithelial cells

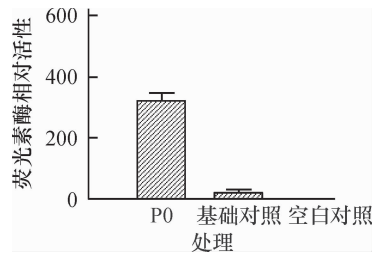


图8 *FAM213B* 基因启动子在猪子宫内膜细胞转录活性

Fig.8 The transcriptional activity of the promoter of porcine *FAM213B* gene

3 讨论与结论

3.1 猪 *FAM213B* 基因 mRNA 获得与转录本分析

前列腺酰胺合成酶 GFS 存在 3 种同工酶,分别是 PGFS I、PGFS II 和 FAM213B。前 2 种是醛酮还原酶(Aldo-keto reductase, AKR) 超家族,FAM213B 则属于硫氧还蛋白样超家族成员^[10]。FAM213B 是近年来新发现的一种氧化还原酶,这种新型酶不同于之前所报道的 PGF 酶。FAM213B 蛋白质在 NADPH 作为质子供体情况下,能直接将 PGH2 做为底物一步合成 PGF2 α ,并且 FAM213B 合成 PGF2 α 效率优于其他 PGF 酶^[1]。在通过 5'RACE 和 3'RACE 技术获得了猪 *FAM213B* 基因完整 mRNA 序列(GenBank 序列号:KX444503)的基础上,并确定了该基因的转录起始位点位于其起始密码子前 67 bp。由于 *FAM213B* 基因在人上存在多个转录本,推测在猪上该基因也可能存在多个转录本。将获得的转录本序列与 GenBank 提交的 *FAM213B* 基因其他 2 个转录本(940 bp, XM _ 013998922. 1; 824 bp, XM _ 005664949. 2)进行了基因结构和蛋白三维结构比较,发现三者 在 1 ~ 108 位氨基酸序列相同,而这在 17 ~ 106 位氨基酸之间存在硫氧还蛋白折叠功能结构域,这可能与其共同的催化功能有关。蛋白质三级结构虽然有较大差异,但是功能域形成的 α 螺旋基本一致,因此推测其不同的转录本的翻译蛋白其

催化功能是一致的。不过本研究在猪子宫内膜仅发现了 1 种转录本,其他 2 个计算模拟的转录本尚未检测到,但是这并不意味着猪 *FAM213B* 基因只有 1 种转录本。目前,发现小鼠 *FAM213B* 基因只有 1 个转录本。对人、猪、牛、山羊、绵羊、小鼠、大鼠、斑马鱼、爪蟾等 9 个物种的 *FAM213B* 氨基酸序列相似性进行分析,猪与山羊、牛和绵羊有更高的相似性。同时,猪、人和小鼠的 *FAM213B* 基因结构相似,都由 7 个外显子和 6 个内含子组成,第 2、第 3、第 4 和第 5 外显子的长度在 3 个物种相同,第 7 外显子的长度差异较大。而比较有趣的现象是在公共数据库中尚未检索到家禽如鸡、鸭等物种 *FAM213B* 基因信息。

3.2 猪 *FAM213B* 基因启动子在猪子宫内膜的转录调控

妊娠的建立需要功能性黄体持续分泌孕酮,而孕酮又可促进子宫内膜的分泌活动,这对胚胎附植及发育具有关键作用^[11],PG 与孕酮的溶解、维持密切相关。前人研究表明猪和小鼠 *FAM213B* mRNA 存在脑组织与脊髓中,而且主要在细胞质中表达,表明 FAM213B 在中枢神经系统发挥着重要的作用^[1];前期研究发现, FAM213B 在怀孕猪子宫内膜中表达^[9],推测 *FAM213B* 基因在子宫内膜中对母猪妊娠和胚胎发育起着调控作用。FAM213B 和 CBR1/2 均可以催化 PGE2 向 PGF2 α 转变^[12],但 FAM213B 也能够直接催化 PGH2 向 PGF2 α 的转变,因此推测 FAM213B 在母猪妊娠期间的低催化效率对于较高 PGE2/PGF2 α 的比率可能是必需的, *FAM213B* 基因的 mRNA 和蛋白表达量在猪子宫内膜可能会受到严格控制。因此,本研究在 RACE 技术获得完整 *FAM213B* 基因 mRNA 基础上,精准定位其转录起始位点,并且发现获得的 *FAM213B* 基因启动子序列(-2 175/+ 30)在猪子宫内膜中具有转录下游报告基因的活性。通过对猪 *FAM213B* 基因的启动子序列生物信息学分析,发现除了典型的 TATA box、

CAAT box 等顺式作用元件外,还存在其他的一些潜在转录因子结合位点,如 E-box、NF κ B、OCT-1 等,而这些因子也决定了 *FAM213B* 基因在猪子宫内膜中的表达规律。例如,母猪的妊娠建立类似一种炎性过程^[13],而炎性因子 NF κ B 对于妊娠相关基因的表达则具有促进或者抑制作用,在该启动子-1 143 和-664 位点预测到了 NF κ B1 和 RelA 结合位点,NF κ B1 和 RelA 均为 NF κ B 家族成员^[14]。有研究表明,分泌期人类子宫 NF κ B1 和 RelA 表达上调^[15];RelA 表达量在胚胎植入窗口期表达量也会升高^[13]。有文献报道,在母猪胚胎植入前 NF κ B 就被开始被激活^[16],NF κ B 常常作为转录因子激活炎性相关基因的表达^[17]。

本研究发现 *FAM213B* 基因的启动子上存在潜在的 NF κ B 和 RelA 结合位点,推测 *FAM213B* 基因可能会受到 NF κ B 的调控,不过需要进行深入研究。总之,初步检测到所获启动子片段具有转录活性,而且发现与母猪妊娠密切相关的潜在顺式作用元件,这些结果为进一步分析猪 *FAM213B* 基因转录活性区域、特异性转录因子结合位点鉴定等研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] MORIUCHI H, KODA N, OKUDA-ASHITAKA E, et al. Molecular characterization of a novel type of prostamide/prostaglandin F synthase, belonging to the thioredoxin-like superfamily[J]. J Biol Chem, 2008, 283(2): 792-801.
- [2] KOMOTO J, YAMADA T, WATANABE K, et al. Prostaglandin F₂alpha formation from prostaglandin H₂ by prostaglandin F synthase (PGFS): Crystal structure of PGFS containing bimatoprost[J]. Biochemistry, 2006, 45(7): 1987-1996.
- [3] WACLAWIK A, ZIECIK A J. Differential expression of prostaglandin (PG) synthesis enzymes in conceptus during peri-implantation period and endometrial expression of carbonyl reductase/PG 9-ketoreductase in the pig[J]. J Endocrinol, 2007, 194(3): 499-510.
- [4] CHRISTENSON L K, FARLEY D B, Anderson L H, et al. Luteal maintenance during early pregnancy in the pig: Role for prostaglandin E₂[J]. Prostaglandins, 1994, 47(1): 61-75.
- [5] ZIECIK A J. Old, new and the newest concepts of inhibition of luteolysis during early pregnancy in pig[J]. Domest Anim Endocrinol, 2002, 23(1/2): 265-275.
- [6] GADSBY J E, LOVDAL J A, BRITT J H, et al. Prostaglandin F₂ alpha receptor concentrations in corpora lutea of cycling, pregnant, and pseudopregnant pigs[J]. Biol Reprod, 1993, 49(3): 604-608.
- [7] WEEMS C W, WEEMSY S, RANDEL R D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals[J]. Vet J, 2006, 171(2): 206-228.
- [8] BAZER F W, THATCHER W W, MATINAT-BOTTEF, et al. Composition of uterine flushings from Large White and prolific Chinese Meishan gilts[J]. Reprod Fertil Dev, 1991, 3(1): 51-60.
- [9] ZHANG H, WANG S, LIU M, et al. Differential gene expression in the endometrium on gestation day 12 provides insight into sow prolificacy[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 45.
- [10] SUZUKI-YAMAMOTO T, TOIDA K, SUGIMOTO Y, et al. Colocalization of prostaglandin F(2alpha) receptor FP and prostaglandin F synthase-I in the spinal cord[J]. J Lipid Res, 2009, 50(10): 1996-2003.
- [11] ZIECIK A J, WACLAWIK A, KACZMAREK M M, et al. Mechanisms for the establishment of pregnancy in the pig[J]. Reprod Domest Anim, 2011, 46(Suppl 3): 31-41.
- [12] WACLAWIK A, JABBOUR H N, BLITEK A, et al. Estradiol-17beta, prostaglandin E₂ (PGE₂), and the PGE₂ receptor are involved in PGE₂ positive feedback loop in the porcine endometrium[J]. Endocrinology, 2009, 150(8): 3823-3832.
- [13] KING A E, COLLINS F, KLONISCH T, et al. An additive interaction between the NF κ B and estrogen receptor signalling pathways in human endometrial epithelial cells[J]. Hum Reprod, 2010, 25(2): 510-518.
- [14] LINDSTROM T M, BENNETT P R. The role of nuclear factor kappaB in human labour[J]. Reproduction, 2005, 130(5): 569-581.
- [15] LAIRD S M, TUCKERMAN E M, CORK B A, et al. Expression of nuclear factor kappaB in human endometrium; role in the control of interleukin 6 and leukaemia inhibitory factor production[J]. Mol Hum Reprod, 2000, 6(1): 34-40.
- [16] MATHEW D J, SELLNER E M, GREEN J C, et al. Uterine progesterone receptor expression, conceptus development, and ovarian function in pigs treated with RU 486 during early pregnancy[J]. Biol Reprod, 2011, 84(1): 130-139.
- [17] INOUE J, GOHDA J, AKIYAMA T, et al. NF-kappaB activation in development and progression of cancer[J]. Cancer Sci, 2007, 98(3): 268-274.

【责任编辑 庄 延】