

中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)雌激素相关受体基因的克隆与分析*

黄静茹 李文杏 黄辉洋 叶海辉 李少菁

(厦门大学海洋与环境学院 厦门 361005)

提要 采用 RT-PCR、RACE、Genome Walking 等方法从中国鲎克隆得到了雌激素相关受体基因的 cDNA 全长及基因组 DNA 序列, 命名为 ttERR (GenBank 登录号为 HQ386702), 并采用生物信息学方法对其序列和编码的蛋白质的理化性质、分子系统进化关系等进行预测和推断。结果表明, ttERR 基因 cDNA 全长 2722bp, 包含一个 1413bp 的开放阅读框、626bp 的 5'-UTR 和 683bp 的 3'-UTR, 编码一个由 470 个氨基酸组成的蛋白质。ttERR 基因由 10 个内含子和 11 个外显子组成。系统发育分析表明, ttERR 属于核受体超家族第三亚族。本文为将来深入研究中国鲎 ttERR 的功能奠定了基础。

关键词 雌激素相关受体, 中国鲎, 分子克隆, 生物信息学分析

中图分类号 Q175

核受体(nuclear receptors, NR)是后生动物中存在的转录调节因子之一, 种类繁多, 功能多样, 涉及调节动态平衡、生殖、发育和新陈代谢等多个方面(Laudet *et al.*, 2002)。雌激素相关受体(estrogen related receptors, ERRs)属于核受体超家族第三亚族(NR3), 是 Giguère 等(1988)针对雌激素受体(estrogen receptors, ERs)的 DNA 结合域保守序列, 采用低严谨度杂交法筛选得到的人类新基因(ER α 和 ER β)。由于它们与雌激素受体(ERs)具有很强的同源性, 故而得名。与 ERs 不同的是, ERRs 不与天然雌激素结合, 所介导的转录是一种组成型转录, 即在无内源性配体存在的情况下可与共激活子(coactivator)作用而激活目标基因的表达, 所以被称为孤儿受体(Hong *et al.*, 1999)。虽然 ERRs 不与雌激素结合, 但却与 ERs 识别相同的靶基因位点, 参与 ERs 信号通路的调节(Bonnelye *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2001; Huss *et al.*, 2002), 同时 ERRs 还在糖脂代谢途径中起重要作用(Luo *et al.*, 2003; Carrier *et al.*, 2004)。

目前对 ERRs 的研究主要集中于哺乳动物和鱼类, 在节肢动物中仅对昆虫纲有报道, 如黑腹果蝇(*Droso-*

phila melanogaster)(Stberg *et al.*, 2003)、拟黑多刺蚁(*Polyrhachis vicina*)(Ouyang *et al.*, 2009)、黄脸油葫芦(*Teleogryllus emma*)(He *et al.*, 2010)等。有关肢口纲中 ERRs 基因的结构与功能研究未见诸报道。中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)属于节肢动物门(Arthropoda)、螯亚门(Chelicerata)、肢口纲(Merostomata)、剑尾目(Xiphosura)、鲎科(Limulidae)、东方鲎属(*Tachypleus*), 是现存肢口纲仅有 4 个种类之一(洪水根, 2011)。此种动物远在古生代寒武纪就已经出现, 与三叶虫有非常近的亲缘关系, 直到现在它的形态并无重大变化, 故被称为“活化石”, 是研究生物进化、动物生理和生物仿生的重要材料。迄今有关中国鲎分子生物学的报道尚少, 本研究对中国鲎的 ERR 基因(简称 ttERR)进行了克隆并分析, 以期为该基因的系统演化分析和功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成体中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)购于厦门市第八水产品市场, 鲎壳宽为 25—31cm。

* 国家自然科学基金资助项目, 41076081 号。黄静茹, E-mail: jingruh@yeah.net

通讯作者: 叶海辉, 博士, 教授, E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn

收稿日期: 2011-03-13, 收修改稿日期: 2011-05-29

1.1.2 主要试剂 TRIzol[®] Reagent Total RNA Isolation Reagent (Invitrogen 公司); RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司); SMART[™] RACE cDNA Application Kit (Clontech 公司); DNase I、RNase、3'-Full RACE Core Set Ver.2.0、LA Taq[®]、dNTPs、pMD19-T、DNA Marker、Genome Walking Kit (Takara 公司); E.Z.N.A 胶回收试剂盒 (Omega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中已知的昆虫 ERRs 及拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) ERR (spERR) 的基因序列和对应的蛋白质序列, 通过 Clustal X (Thompson *et al*, 1997) 比对, 在 ERRs 保守的 DNA 结合域设计了简并引物 ttF 和 ttR, 用于扩增中国鲎 ttERR 基因片段 a。将 a 片段测序后通过在 NCBI 上 Blast 确定是其它物种 ERRs 的同源序列后, 再根据 a 片段设计 RACE 特异性引物(表 1)。

1.2.2 总 RNA 和基因组 DNA 的提取 取中国鲎卵巢组织, 参照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂使用说明提取总 RNA; 取肌肉组织按照分子克隆实验指南 (Sambrook *et al*, 2001) 提取基因组 DNA。以紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 和 DNA 的浓度及纯度。取 1 μg 总 RNA, 参照 Fermentas 的 RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明, 反转录成 cDNA 模板, -20 保存备用。

1.2.3 中国鲎 ttERR 基因全长 cDNA 的克隆和序列测定 使用简并引物 ttF/ttR, 以上述 cDNA 为模板, 扩增 ttERR 基因片段 a。PCR 产物回收纯化后与载体连接, 转化 DH5α 感受态细胞, 于含有 AMP 的 LB 平板上培养 14h, 挑取单克隆菌落, 接种于含 AMP 的

LB 培养基中, 37 过夜培养, 经菌液 PCR 鉴定转化成功的菌液样品送往上海英骏生物技术有限公司测序。将 a 片段的序列在 NCBI 上 Blast 确定是其它物种 ERRs 的同源序列后, 根据 a 片段设计 RACE 特异性引物(表 1)。

3'末端扩增使用 TaKaRa 公司的 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0, 按照试剂盒推荐的反应体系和条件, 以 tt3'R1 和试剂盒提供的 3'RACE Outer Primer 为引物进行第一次 PCR 反应。将第一次 PCR 的反应液稀释 50 倍作为模板, 以 tt3'R2 与 3'RACE Outer Primer 为引物进行第二次 PCR 反应。设计引物组: tt3'R1+ddH₂O、tt3'R2+ddH₂O、ddH₂O+3'RACE Outer Primer 作为单引物扩增对照。5'末端扩增使用 Clontech 公司的 SMART[™] RACE cDNA Application Kit, 以 tt5'R1、tt5'R2 及试剂盒提供的 NUP 为引物, 实验设计同 3'RACE 实验。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离检测, 按上述方法进行测序。测序结果拼接后得到中国鲎 ttERR 基因的全长 cDNA 序列。

根据所获得的全长 cDNA 序列设计特异引物 ttF1 和 ttR1, 以 cDNA 为模板克隆包含 ttERR 开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 的片段, 验证 RACE 实验和拼接结果的正确性。PCR 产物按上述方法进行测序。

1.2.4 基因组序列的克隆 取中国鲎基因组 DNA 做模板, 在已知 cDNA 序列中设计特异引物(表 2), 将 DNA 序列分成几个互相有重叠的片段进行扩增(图 2), 其中 F、G、H、I、J、K 片段采用常规 PCR, A、B、C、D、E、L、M、N 片段采用热不对称 PCR, 利用设计的 3 条特异性引物分别与基因组步移试剂盒 (Genome Walking Kit, TaKaRa) 提供的退火温度较低的简并引物组合, 反应体系和程序按照步移试剂盒

表 1 ttERR cDNA 克隆所用引物

Tab.1 Oligonucleotide primers used for cDNA cloning of ttERR

用途	名称	引物序列(5' 3')	退火温度(°C)
a	ttF	GAYGTBGCBSWSNGGHTTCA	50
	ttR	CKBACVCCYCTYTNAGCAT	
3'RACE	tt3'R1	ATGGAGTTGCATCATGTGAAGC	56
	tt3'R2	ATGCTTAAAGATGGGAATGCTAA	
5'RACE	tt5'R1	CACAATCATTTGATGCTGGACAT	57
	tt5'R2	ATTCTATATTTCCCTGAATTGTCCTC	
RACE 试剂盒 提供的引物	3'RACE Outer Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	
	NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
ORF	ttF1	TGTAACGAAACAGATCAGGAAGAA	55
	ttR1	TGAAATGTAAAACCCATCAAAAACAG	

注: Y=T+C; B=T+C+G; W=A+T; S=C+G; N=A+T+C+G; H=A+T+C; K=G+T; V=A+C+G

操作说明书进行, 连续进行 3 轮热不对称 PCR 扩增。PCR 产物处理同上, 克隆后测序。将所得片段拼接得到中国鲎 ttERR 的基因组 DNA 序列(genome DNA, gDNA), 与全长 cDNA 进行比对, 预测内含子的具体位置和序列。

1.2.5 序列分析和系统进化树的构建

中国鲎 ttERR 基因的全长 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库及蛋白数据库作 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析。应用 ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)确定正确的开放阅读框并推导其编码的氨基酸序列。Protparam 程序(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)预测

表 2 ttERR gDNA 克隆所用引物
Tab.2 Oligonucleotide primers used for gDNA cloning of ttERR

片段	名称	引物序列(5' 3')	产物大小(bp)	退火温度()
A	tff1	GGCTAAACTAGGTTAGTAGGCGAAT	1333	62
	tff2	GGGATGATTTTAGGTGTCGTTTG		
	tff3	TCACTGATTGAAACCGATGTTATCT		
B	ttr1	ATCTGTTTCGTTACAATCCAGTCAA	1590	62
	ttr2	CAATCCAGTCAAATAATGTTTCACT		
	ttr3	GCAACAGAAGATTTCTCAAGTCCTT		
C	tff4	CAGATTGCTGTGGTTGTGTGAC	600	60
	tff5	GTCGTCTTTCATCACCGCACA		
	tff6	CATTATTCCAACCACACTACATTCAC		
D	ttr4	CTAAATCCTTTTTTCAACACACAGC	1033	60
	ttr5	CCCAGTGATGATCTAAGTTCTTCTC		
	ttr6	CTCAACAACCAGCAAATACCATC		
E	ttr7	CTACCCACAACCTGGACCCATACT	2083	63
	ttr8	GCCATTGGTTAGTCTGATGTTGT		
	ttr9	GAAGGTGGACAGTGTGACAATGC		
F	tff7	GGCTAATTTTCACTCAAGAATCACTA	2603	55
	ttr10	TGAATCACTAACCAATACTCCAACC		
G	tff8	GTCCACCTTACCACATATCTATTC	3595	55
	ttr11	AGCCACATCTCCACATACCAAAC		
H	tff9	GGCTCAGGATTTCAATTATGGAGT	3708	57
	ttr12	CATTACATAGGTGGTCAGCACTTCT		
I	tff10	ACAGTTTTGACCCAAGACCCATT	2493	55
	ttr13	ATCCACCAGGTCCTAAGAGTAG		
J	tff11	GTCTGCTGCTTCCCACTCATCT	4491	55
	ttr14	TGAATCTTTGGTCCGTTCTGT		
K	tff12	ACAGAACTCACTTTGAATGACCAGA	4971	55
	ttr15	ATTGTGCCCAACTGCCATCA		
L	tff13	TGTCAGTCATCAGTCCACAATCAT	3179	63
	tff14	CTGGGCAGTTATCAGCCTCATT		
	tff15	CAGAAGAAGTGCTGACCACCTATG		
M	tff16	GCTTTGGCTATGAGTGAACTGAGA	1251	63
	tff17	TGAGGGTGAGTGCTTTCTGCTT		
	tff18	GTGCTGAGGGATGTGTTGGAT		
N	ttr16	ACTCCAGGGTTACATCACTCAGTAT	1717	62
	ttr17	TTGTCTAGTTTCTTCCAATTTTCC		
	ttr18	GCCTCATCTGGTCATTCAAAGTG		

注: f 表示正向引物; r 表示反向引物

氨基酸序列的物理参数; SignalP 3.0 server 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测信号肽, Protscal 程序 (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>)预测蛋白质的疏水性; PSORT Prediction 程序 (<http://psort.hgc.jp/form2.html>)基于其氨基酸序列预测蛋白质亚细胞定位; 利用功能基序在线预测网站 (<http://www.predictprotein.org>)进行功能位点搜索。Clustal X (Thompson *et al*, 1997)软件对中国鲿 ttERR、黑腹果蝇 dmERR、拟穴青蟹 spERR 和人核受体超家族第三亚族进行比对, 然后用 MEGA 5 软件 (Kumar *et al*, 2008), 采用邻位相接法(Neighbor-joining, N-J)构建系统进化树, 采用 Bootstrap 重复 1000 次计算各分支的置信度。

2 结果与分析

2.1 中国鲿 ttERR 基因全长 cDNA 和基因组 DNA 的序列特征

通过 RT-PCR 和 RACE 技术获得中国鲿 ttERR 基因的 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: HQ386702)。该基因 cDNA 全长 2722bp, 5'-UTR 为 626bp, 3'-UTR 为 683bp, 开放阅读框为 1413bp, 编码一个由 470 个氨基酸组成的蛋白质。在起始密码子附近存在翻译起始共有序列 kozak 序列: 5'-GCCATGG-3'。3'-UTR 包含一个 12bp 的多聚腺苷酸(poly A)序列和 2 个 mRNA 不稳定元件 (ATTTA), 该特征序列被认为可能与 mRNA 的降解有关 (Guhaniyogi *et al*, 2001)(图 1)。

PCR 产物克隆测序后, 经人工拼接成中国鲿 ttERR gDNA 序列。序列分析表明: 已分离得到

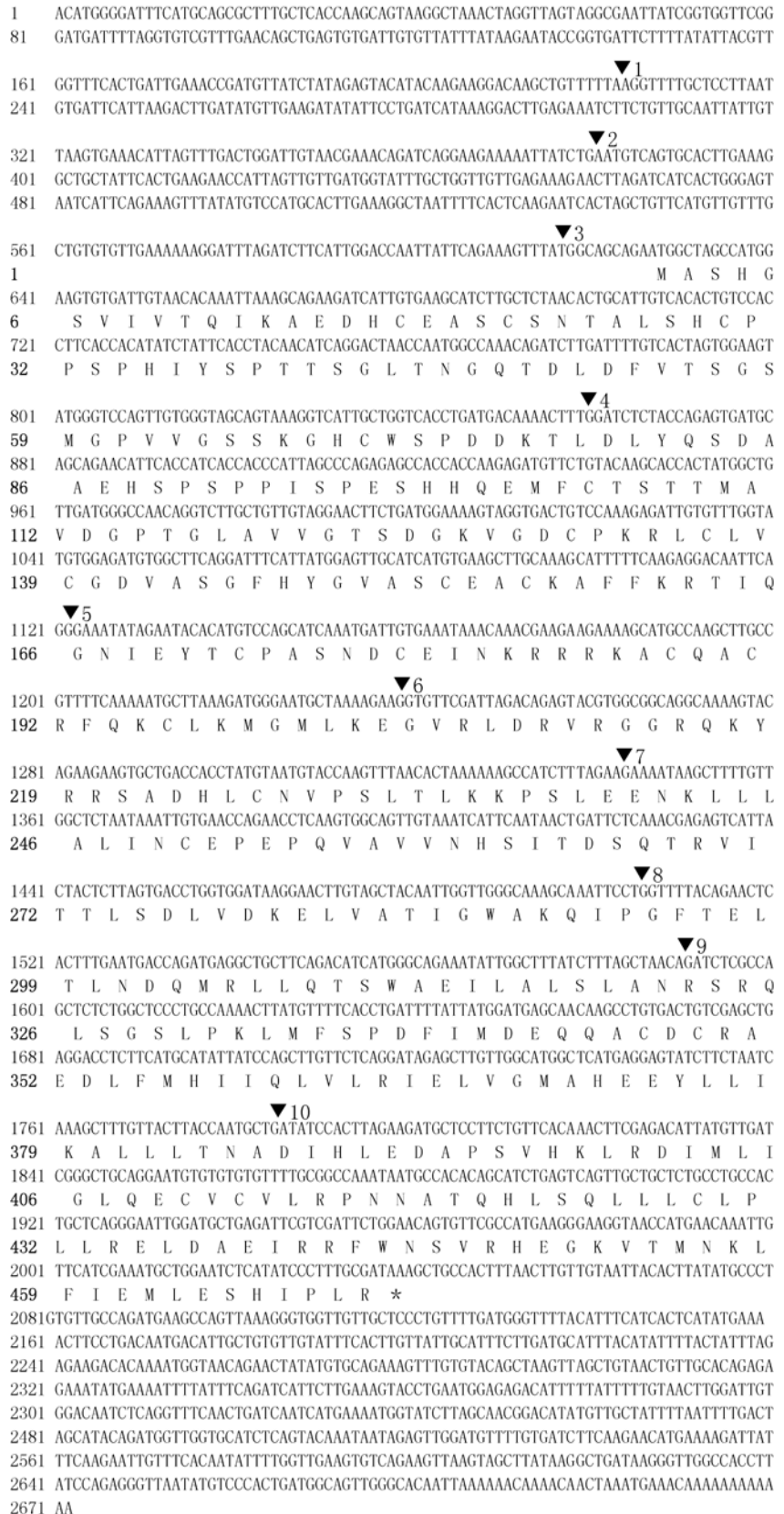


图 1 ttERR 基因 cDNA 及其推导的氨基酸序列
Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequence of ttERR gene
注: ▼表示内含子的位置

的 ttERR gDNA 长约 32kb, 由 11 个外显子和 10 个内含子构成, 外显子的 GC 含量(34.2%—45.8%)大于内含子的 GC 含量(24.8%—32.1%), 内含子的位置和长度如图 1、图 2 所示, 内含子 1 和 2 没有获得全长, 可能由于含有复杂结构及内含子较大导致步移不成功。所有剪切位点均符合 GT-AG 规律, 其中内含子 1—3 位于 5'端的先导区, 这三个内含子将 5'端先导区外显子与蛋白质编码区分开; 蛋白质编码区中的内含子 4 位于两密码子之间(插入相 0), 内含子 5、6、7、8、10 位于一个密码子的第一和第二位核苷酸之间(插入相 1), 内含子 9 位于密码子的第二和第三位核苷酸之间(插入相 2)(Sharp, 1981)。

2.2 中国鲿 ttERR 蛋白质的理化性质分析

预测中国鲿 ttERR 蛋白由 470 个氨基酸残基组成, 分子量为 52.0159kDa, 理论等电点为 6.31; 亮氨酸(Leu)含量最高为 12.1%, 色氨酸(Trp)含量最少为 0.9%; 带负电荷氨基酸残基(Asp + Glu)54 个, 带正电荷氨基酸残基(Arg + Lys)48 个; 原子总量 7281, 分子式为 $C_{2262}H_{3652}N_{644}O_{687}S_{36}$ 。信号肽预测结果显示不存在信号肽, 蛋白质亚细胞定位为细胞核(65.2%)。

利用 ExPASy 数据库的 ProtScale 工具, 对中国鲿 ttERR 蛋白序列的疏水性进行分析。整体上 ttERR 具有较强的亲水性, 但在其功能区, DNA 结合域第一个锌指结构(136—162)和配体结合域(243—465)存在多个疏水区, 这与该蛋白质家族的结构功能特性密切相关。

利用 Predictprotein 服务器对中国鲿 ttERR 蛋白序列进行功能位点分析。结果显示该蛋白序列具有多个功能位点, 包括: 三个 N 端糖基化位点(ASN_GLYCOSYLATION): 260—263 (NHSI), 321—324 (NRSR), 418—421 (NATQ); 八个酪蛋白激酶磷酸化位点(CK2_PHOSPHO_SITE): 49—52 (TDLD), 72—

75 (SPDD), 237—240 (SLEE), 262—265 (SITD), 273—276 (TLSD), 299—302 (TLND), 310—313 (SWAE), 384—387 (TNAD); 五个 N-酰基化位点(MYRISTYL): 43—48 (GLTNGQ), 64—69 (GSSKGH), 122—127 (GTSDGK), 149—154 (GVASCE), 406—411 (GLQECV); 三个蛋白激酶 C 磷酸化位点(PKC_PHOSPHO_SITE): 65—67 (SSK), 232—234 (TLK), 446—448 (SVR); 一个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点(CAMP_PHOSPHO_SITE): 234—237 (KKPS); 一个核激素受体 DNA 结合域基序(NUCLEAR_REC_DBD_1): 136—162 (CLVCGDVASGFHYGVASCEA CKAFFKR)。蛋白质的糖基化、酰基化和磷酸化均属于化学修饰, 具有重要的生物学意义。这些位点的鉴定对进一步研究蛋白质的功能、主要定位、可能的稳定性结构非常有帮助。

2.3 同源性和系统发育分析

将中国鲿 ttERR cDNA 推导的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast 搜索, 结果显示该序列与其它 ERRs 蛋白质序列同源性较高, 与黑腹果蝇、拟黑多刺蚁、黄脸油葫芦、拟穴青蟹和人的 ERR 氨基酸序列一致性分别为 43.7%、46.8%、47.8%、46.5% 和 39.2%。

利用 NCBI 在线保守区域分析软件(Marchler-Bauer *et al*, 2011)以及和黑腹果蝇 dmERR、拟穴青蟹 spERR 的比对发现, 中国鲿 ttERR 序列与其它核受体一样也包含 A/B (1—129)、C (130—223)、D (224—242)、E/F (243—470)区域。其中 C 域为 DNA 结合域, 包含两个锌指结构, 第一个锌指结构主要与特异性的 DNA 识别, 第二个锌指结构则与二聚体的形成有关, E/F 域为配体结合域, 配体依赖的转录激活由位于该区域的 AF2 介导, 这两个结构域是核受体超家族所特有的两个功能结构域, 具有高度同源性(图 3)。

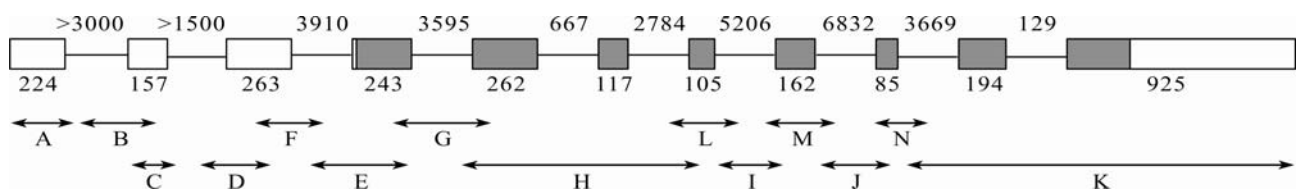


图 2 ttERR 基因结构

Fig.2 The gene structure of ttERR

注: 空心框代表不编码外显子, 灰色实心框代表编码外显子, 框与框之间的横线代表内含子, 为便于作图, 横线长度不反映内含子大小。数字表示相应的外显子和内含子的碱基个数。将 gDNA 分成互相有重叠的片段进行步移或常规 PCR, 分别用 A—N 表示, 相应引物见表 2

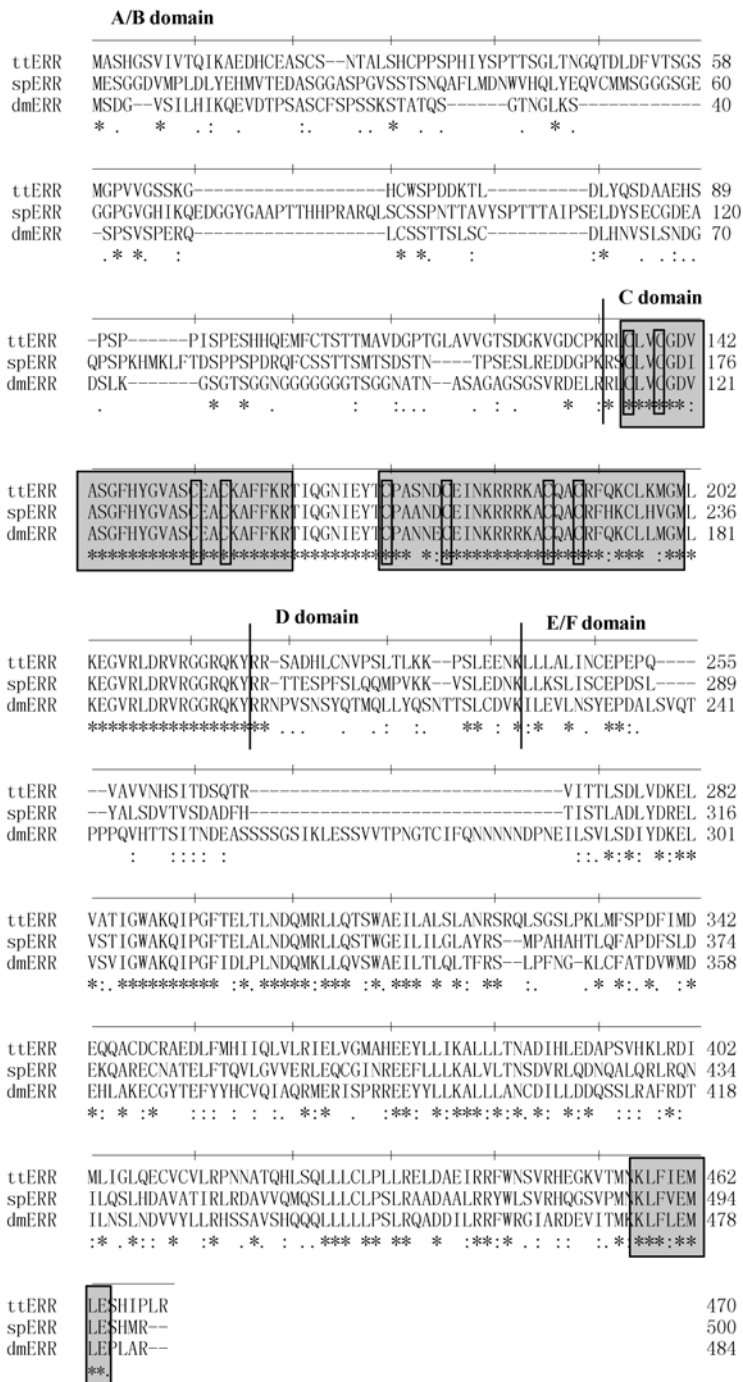


图3 中国鲎、拟穴青蟹、黑腹果蝇雌激素相关受体氨基酸序列的比对结果

Fig.3 Multiple alignment of the amino acid of ERRs from *T. tridentatus*, *S. paramamosain* and *D. melanogaster*

注: ERRs 由 A—F 域组成。*表示相同的氨基酸; : 和 . 表示氨基酸的保守性程度; -表示空缺; 位于 C 域的阴影部分为 DBD 的两个锌指结构, 方框所示为形成锌指结构的半胱氨酸; 位于 E/F 域的阴影部分为 LBD 的 AF2

比对结果显示 ttERR 的 DBD 与 dmERR、spERR 的 DBD 相似性分别为 92%和 90%, LBD 相似性分别为 50%和 52%, ttERR 与人 hERRs 的 DBD 和 LBD 相似

性也分别达 87%和 40%以上。

采用 Meg5 软件基于 N-J 法构建核受体超家族第三亚族部分序列的系统进化树。结果如图 4 所示, ttERR 首先与 dmERR 形成一支, 然后与 spERR 形成第二分支, 再与人的 ERRs 聚在一起, Bootstrap 值达 100%, 表明相对于脊椎动物其它类固醇受体, ttERR 与脊椎动物 ERRs 和无脊椎动物 ERRs 的关系更近。

3 讨论

本研究采用 RT-PCR、RACE、Genome Walking 等技术, 获得了中国鲎 ttERR 基因的全长 cDNA 序列和部分 gDNA 序列, 在肢口纲中是首次报道。本次推导得到的中国鲎 ttERR 氨基酸序列与昆虫 ERRs 相似性为 42%—48%, 与拟穴青蟹 spERR 的相似性也达 46.5%。CD 搜索显示中国鲎 ttERR 序列包含核受体超家族所特有的两个功能结构域——DNA 结合结构域和配体结合结构域, 且与其它动物的 ERRs 同源性很高, ttERR 与人 hERRs 的 DBD 和 LBD 相似性分别达 87%和 40%以上, 所以 ttERR 也属于核受体超家族第 3 亚族。系统发育分析结果也显示无脊椎动物 ERRs 与 hERRs 聚在一起, 与 hERRs 来源于同一分支(图 4)。

本研究所获得的 ttERR gDNA 序列由 11 个外显子和 10 个内含子构成, 外显子 GC 含量大于内含子的 GC 含量, 表明编码区比非编码区具有更高的热稳定性。另外, 王宁等(1999)研究发现, GC 含量高的序列核苷酸替代速率低, AT 含量高的序列核苷酸替代速率高, 这也符合内含子较外显子进化速率快的原理。对已测序的昆虫基因组进行分析, 黑腹果蝇、赤拟谷盗和意大利蜜蜂的 ERR 内含子数量分别为 2、7 和 7 个, 其相应的染色体数分别为 8、20 和 32 条, 说明随着基因组增大, ERR 基因的内含子数量有增多趋势。这与 He 等(2006)根据真核生物基因内含子数据库分析结论基本吻合, 即随着基因组增大, 内含子密度(每 kb CDS 所含的内含子个数)及内含子比例(每 kb CDS 所含的内含子总 kb 数)均有增大的趋势。ttERR 基因含有 10 个内含子, 虽然目前尚

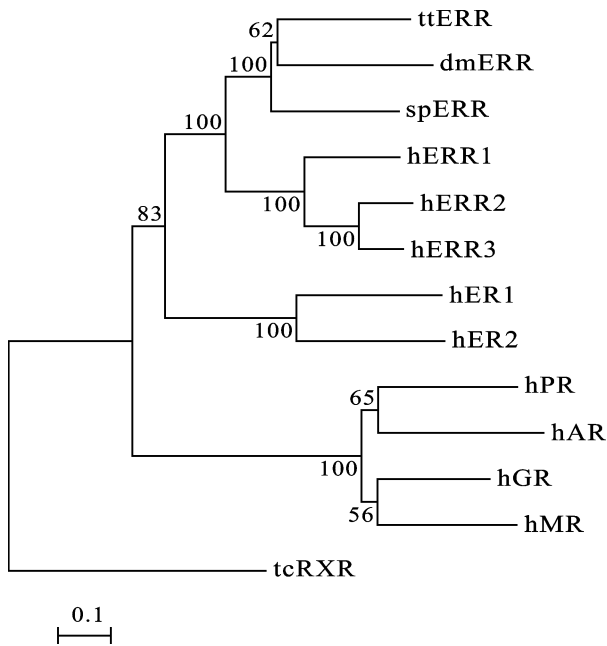


图4 基于NJ法构建的核受体超家族第三亚族系统发育树
Fig.4 Phylogram of nuclear receptor subfamily 3 receptors based on NJ method

注: 中国鲎(ttERR, ADO51071), 黑腹果蝇(dmERR, NP_729340), 拟穴青蟹(spERR, ADB43256), 人 *Homo sapiens* (hERR1, NP_004442; hERR2, NP_004443; hERR3, NP_001429; hER1, NP_000116; hER2, BAA24953; hPR, AAA60081; hAR, AAA51729; hGR, CAA26976; hMR, AAA59571); 水母 *Tripedalia cystophora* (tcRXR, AAC80008)。节点处数字表示重复 1000 次的 Bootstrap 值

未有文献报道中国鲎的染色体核型, 但可以推测中国鲎可能具有较大的基因组。在哺乳动物、线虫、昆虫、真菌和植物中, 都观察到了内含子能促进基因表达的现象, 说明内含子促进基因表达的作用是普遍存在的(Rose, 2008)。内含子还可能活跃地参与调节基因的组织特异性表达(Stemmler *et al*, 2005)。而且 Matsumoto 等(1998)发现剪接对翻译的影响与内含子的位置有关, 将内含子置于 5'-UTR 时, 翻译会被大大的刺激, 而当内含子置于 3'-UTR 时, 翻译的水平会低于无内含子的水平。故内含子的存在以及分布的 5'末端倾向性可能对蛋白质的表达具有重要意义。另外, 有研究表明内含子多态性在种质资源保护和鉴定中具有较强的实用价值(刘峰等, 2009)。本研究发现 ttERR 基因的内含子分布偏向 5'端, 5'-UTR 有 3 个内含子插入位点, 而 3'-UTR 则没有(图 2), 推测内含子对 ttERR 的表达起重要调控作用, 相关研究有待进一步开展。

参 考 文 献

王 宁, 陈润生, 1999. 基于内含子和外显子的系统发育分析

- 的比较. 科学通报, 44(19): 2095—2102
- 刘 峰, 鲁双庆, 刘 臻等, 2009. 三种鳊鱼(*Siniperca*)生长激素基因内含子多态性的比较研究. 海洋与湖沼, 40(4): 470—478
- 洪水根, 2011. 中国鲎生物学研究. 厦门: 厦门大学出版社, 3—6
- Sambrook J, Russell D W 著, 2001. 黄培堂译, 2002. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 463—470
- Bonnelye E, Merdad L, Kung V *et al*, 2001. The orphan nuclear estrogen receptor-related receptor α (Err α) is expressed throughout osteoblast differentiation and regulates bone formation *in vitro*. The Journal of Cell Biology, 153(5): 971—984
- Carrier J C, Deblois G, Champigny C *et al*, 2004. Estrogen-related receptor α (ERR α) is a transcriptional regulator of apolipoprotein A-IV and controls lipid handling in the intestine. Journal of Biological Chemistry, 279(50): 52052—52058
- Giguère V, Yang N, Segui P *et al*, 1988. Identification of a new class of steroid hormone receptors. Nature, 331(6151): 91—94
- Guhaniyogi J, Brewer G, 2001. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. Gene, 265(1—2): 11—23
- He H, Xi G, Lu X, 2010. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of an estrogen receptor-related receptor homologue in the cricket, *Teleogryllus emma*. Journal of Insect Science, 10(188): 1—16
- He M, Li J, Zhang S, 2006. Statistical characteristics of eukaryotic intron database. Frontiers of Biology in China, 1(4): 362—366
- Hong H, Yang L, Stallcup M R, 1999. Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3. Journal of Biological Chemistry, 274(32): 22618—22626
- Huss J M, Kopp R P, Kelly D P, 2002. Genes: structure and regulation—peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α (PGC-1 α) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor- α and - γ . Journal of Biological Chemistry, 277(43): 40265—40274
- Kumar S, Nei M, Dudley J *et al*, 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in Bioinformatics, 9(4): 299—306
- Laudet V, Gronemeyer H, Service S O, 2002. The Nuclear Receptor: Factsbook. Academic Press San Diego, 2—12
- Lu D, Kiriya Y, Lee K Y *et al*, 2001. Transcriptional regulation of the estrogen-inducible pS2 breast cancer marker gene by the ERR family of orphan nuclear receptors. Cancer Research, 61(18): 6755—6761
- Luo J, Sladek R, Carrier J *et al*, 2003. Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α . Molecular and Cellular Biology, 23(22): 7947—7956

- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson J B *et al*, 2011. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl.1): D225
- Matsumoto K, Wassarman K M, Wolffe A P, 1998. Nuclear history of a pre-mRNA determines the translational activity of cytoplasmic mRNA. *The EMBO Journal*, 17(7): 2107—2121
- Ouyang X H, Xi G S, Bu C P *et al*, 2009. Molecular cloning and expression of an estrogen receptor-related receptor gene in the ant *Polyrhachis vicina* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102(2): 295—302
- Rose A B, 2008. Intron-mediated regulation of gene expression. *Nuclear Pre-Mrna Processing in Plants*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 227—290
- Sharp P A, 1981. Speculations on RNA splicing. *Cell*, 23(3): 643—646
- Stberg T, Jacobsson M, Attersand A *et al*, 2003. A triple mutant of the *Drosophila* ERR confers ligand-induced suppression of activity. *Biochemistry*, 42(21): 6427—6435
- Stemmler M P, Hecht A, Kemler R, 2005. E-cadherin intron 2 contains cis-regulatory elements essential for gene expression. *Development*, 132(5): 965—976
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876—4882

CLONING AND ANALYSIS OF ESTROGEN RELATED RECEPTOR GENE FROM *TACHYPLEUS TRIDENTATUS*

HUANG Jing-Ru, LI Wen-Xing, HUANG Hui-Yang, YE Hai-Hui, LI Shao-Jing
(College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract In this paper, a homolog of ERRs (designated ttERR) was isolated from the horse crab *Tachypleus tridentatus* using RT-PCR, RACE and Genomic Walking methods. The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of ttERR were analyzed and characterized by bioinformatics methods. The results showed that the full-length cDNA of ttERR gene is 2722bp, containing a 5'-untranslated region (5'-UTR) of 626bp and a 3'-UTR of 683bp. The open reading frame of 1413bp encodes a 470-amino acid protein. The ttERR gene is composed of ten introns and eleven exons. Phylogram indicated that ttERR belongs to the NR3 group of nuclear receptors subfamily. This study may establish theoretical foundation for further understanding the functions of ttERR.

Key words Estrogen related receptor (ERR), *Tachypleus tridentatus*, Molecular cloning, Bioinformatic analysis

2011 年度《海洋与湖沼》动态

(1) 《海洋与湖沼》2011 年最新公布的总被引频次在海洋科学期刊中名列第一位; 影响因子为 1.404, 学科影响指标和综合评价总分均列海洋科学期刊首位; 综合评价总分在全国期刊中排第 18 位。

(2) 荣获 2011 年度百种中国杰出期刊奖。

(3) 荣获 2011 年度中国精品期刊奖。