

和田羊 *ESR2* 基因启动子克隆分析及其活性分析

谷若怀, 黄巧艳, 李 伟, 孙慧萍, 朱乐潇, 邢 凤*

(塔里木大学动物科学与技术学院, 农业农村部环塔里木富草资源利用重点实验室, 新疆阿拉尔 843300)

摘要: 雌激素受体 β 基因 (Estrogen Receptor Beta, *ESR2*) 参与了绵羊的卵泡发育, 但其调控机理尚不清楚。本研究以和田羊为试验对象, 以 NCBI 数据库中绵羊 *ESR2* 基因启动子区 2 871 bp 序列为模板进行克隆测序, 通过在线软件预测 *ESR2* 启动子区转录因子结合位点、CpG 岛和调控元件, 并以 *ESR2* 基因启动子区 2 871 bp 序列为模板构建 6 个连续缺失的荧光素酶载体, 利用双荧光素酶报告基因系统筛选 *ESR2* 核心启动子区。本研究成功克隆了和田羊 *ESR2* 基因启动子区 2 871 bp 的序列, 通过软件预测发现, 和田羊 *ESR2* 基因启动子区存在 4 个潜在的转录起始位点、67 个转录因子结合位点、1 个 TATA-box 以及 2 个 CpG 岛。双荧光素酶活性检测结果表明 *ESR2* 基因启动子区位于 L7 (-527~-156)。本研究结果为进一步探究绵羊 *ESR2* 基因启动子对绵羊卵泡发育的调控提供了新线索。

关键词: *ESR2*; 和田羊; 启动子; 序列分析; 核心启动子

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250328-02

雌激素受体 (Estrogen Receptor, ER) 是类固醇激素受体超家族的成员之一, 是一种配体依赖性转录因子^[1], 其主要包括雌激素受体 α (Estrogen Receptor alpha, ER- α)、雌激素受体 β (Estrogen Receptor beta, ER- β) 以及近年来新发现的 G 蛋白耦联雌激素受体 (G Protein-Coupled Estrogen Receptor), 由于 ER- α 和 ER- β 的发现时间较早, 其在全球范围内得到了广泛而深入的研究。ER- α 可以和雌激素结合并迁移至细胞内^[2], 对胚胎、乳腺和雌性繁殖周期中卵泡的生长发育都发挥着重要作用^[3-4]。ER- β 由 *ESR2* 基因编码, 其位于绵羊 7 号染色体, 对调控动物繁殖力具有关键作用。已有研

究表明 *ESR2* 基因的表达水平与动物的繁殖性能密切相关, *ESR2* 基因缺失导致大鼠卵泡颗粒细胞对促性腺激素的反应性降低^[5], 雌激素的产生减少^[6]、卵泡成熟受损^[7]、排卵失败^[8]。*ESR2* 基因还参与繁殖性状调控, 如家禽卵巢中 *ESR2* 基因的表达量与产蛋性能之间存在显著的关联性^[9], 同时 *ESR2* 基因还确定是调控猪高产仔数的关键基因之一^[10]。*ESR2* 基因也是绵羊高产的候选基因之一^[11]。

尽管 *ESR2* 基因在调控繁殖力方面的作用已被广泛研究, 但对其启动子区域的研究相对较少。启动子区域位于基因的 5' 端上游, 对基因的转录调控有着关键作用^[12]。本研究以和田羊为研究对象, 基于 NCBI 数据库中绵羊 *ESR2* 基因启动子区 2 871 bp 序列设计特异性 PCR 引物。通过 PCR 扩增、克隆测序成功获取 *ESR2* 基因启动子序列, 并运用生物信息学软件对其进行系统分析。研究初步解析了和田羊 *ESR2* 基因启动子区的序列特征和结构组成, 并成功鉴定了该基因的核心启动子区域, 为后续探究绵羊 *ESR2* 基因启动子对绵羊卵泡发

收稿日期: 2025-03-28; 修回日期: 2025-07-23

资助项目: 国家自然科学基金 (31660652); “强南”科技创新人才计划 (2022CB001-04); 塔里木大学校长基金 (TDZKC X202401); 塔里木大学研究生科研创新项目 (TDGRI2024040)

作者简介: 谷若怀 (1999-), 男, 黑龙江鹤岗人, 在读硕士研究生, 主要从事动物繁殖育种研究, E-mail: a18346865515@163.com

* 通信作者: 邢凤, 女, 教授, 主要从事动物繁殖育种研究, E-mail: xingfeng2001@126.com

matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor κ B pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 746: 96-105.

[18] Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(3): 377-388.

[19] Fathy N, Labib M A, Essam R M, et al. The interplay between

MiR-134/BDNF and LKB1/AMPK/SIRT1 accentuates the antidepressant efficacy of empagliflozin in ovariectomized rats[J/OL]. ACS Chem Neurosci, 2024, DOI: 10.1021/acschem-neuro.4c00313.

(责任编辑: 周会会)

育的调控提供了一定基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 选取新疆维吾尔自治区和田市和田惠民畜牧科技有限公司 6 月龄和田羊 34 只，颈静脉采血 10 mL，使用 EDTA-K 处理（抗凝），于 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.1.2 试剂 血液 / 细胞 / 组织基因组 DNA 提取试剂盒（DP304）、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（DP209）均购自天根生化科技（北京）有限公司；Trans DNA Marker I、Trans2K® DNA Marker、DH5α 均购自北京全式金生物技术有限公司；2x Ultra Taq PCR mix 购自上海新贝生物科技有限公司；pMD19-T vector 购自宝日医生物技术（北京）有限公司；Dual-Glo® 双萤光素酶（萤光素酶）报告基因检测系统购自普洛麦格（北京）生物技术有限公司。

1.2 DNA 提取 利用 DNA 提取试剂盒按照说明书要求提取和田羊血液基因组 DNA，DNA 浓度和纯度检测分别使用紫外分光光度计以及 2% 的琼脂糖凝胶电泳，并将检测合格的 DNA 统一浓度为 500 ng/μL。

1.3 引物设计 以 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中绵羊 *ESR2* 基因参考序列（登录号为：NC_056060.1）5'-UTR 上游 3 000 bp 为模板，使用 Primer Premier 5.0 软件设计 *ESR2* 基因特异性引物（表 1），将引物序列送至上海生工生物工程有限公司进行合成。

表 1 启动子扩增引物

引物名称	引物序列（5'→3'）	退火温度，℃	片段长度，bp
<i>ESR2</i> -1	F1: ACTTGGCCTCGTTAATGGCA R1: AGTAGGTATCCGAAGGGCCA	59	2871

1.4 和田羊 *ESR2* 基因启动子区克隆 以和田羊血液 DNA 为模板对和田羊 *ESR2* 基因进行 PCR 扩增，扩增体系为 25 μL：无菌离子水（ddH₂O）9.5 μL，2×EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μL，基因组 DNA（200 ng/μL）1 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL。PCR 扩增程序为：94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 30 s，59℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 2 min，37 个循环；72℃ 延伸 10 min。2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，对目的片段进行纯化（胶回收），按照 DNA 回收试剂盒说明书步骤进行操作，纯化后产物与 PMD19-T 载体进行连接，构成重组质粒

PMD19-T-*ESR2*，将质粒转入大肠杆菌 DH5α 中培养，过夜后进行蓝白斑菌筛选，选择白色阳性克隆子，利用菌液 PCR 对产物进行鉴定，鉴定成功选择 5 个白色阳性克隆子送至上海生工生物工程有限公司进行测序。使用 DNAMAN 9.0 对测序结果进行比对分析。

1.5 和田羊 *ESR2* 基因启动子序列生物信息学分析 利用在线生物信息学分析工具将获得的启动子序列进行结构分析：利用 JASPAR、AnimalTFDB 4.0 和 LASAGNA_Search 网站预测 *ESR2* 启动子区的转录因子结合位点；利用在线分析网站 Neural Network Promoter Prediction 预测 *ESR2* 启动子区转录起始位点；利用 FPROM 预测 TATA-box 和 CAAT-box；利用在线网站 Methprimer 2.0 和 EMBOSS cpgplot 预测 *ESR2* 基因启动子 CpG 岛。

1.6 和田羊 *ESR2* 基因核心启动子确定

1.6.1 和田羊 *ESR2* 启动子缺失片段萤光素酶报告基因载体构建 根据扩增所得的启动子全长序列构建 6 条萤光素酶载体：L1（-2527~+345）、L2（-2027~+345）、L3（-1527~+345）、L4（-1027~+345）、L5（-527~+345）、L6（-155~+345）、L7（-527~-156），萤光素酶载体由苏州金唯智生物科技有限公司构建。

1.6.2 缺失片段双萤光素酶载体的转染 将生长状态良好的 HEK-293t 细胞，以每孔 1×10⁴ 的密度接种至 96 孔板，使用无双抗完全培养基（90%DMEM+ 10% 胎牛血清）于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱培养，待细胞贴壁后，根据 Lipofectamine™3000 说明书，将目标质粒和 pRLTK 以 10:1 的比例共转染。至少进行了 3 次生物学重复实验。培养 36 h 后进行双萤光素酶检测。

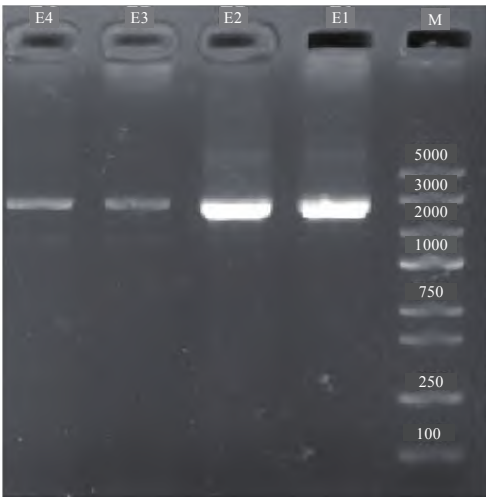
1.6.3 缺失片段的双萤光素酶检测 转染后 36 h，将 96 孔板从培养箱中取出。根据 Dual-Glo®Luciferase Assay System 说明书，对 6 个启动子缺失片段载体的双萤光素酶活性进行检测，其中萤火虫萤光素酶（F）、海肾萤光素酶（R）活性使用 Biotek Synergy H1 化学发光检测仪检测。

1.7 统计分析 双萤光素酶的相对活性值计算公式为 F 值 /R 值。数据经过 SPSS 软件分析，结果以均值的标准误差形式展现。每个处理组至少进行了 3 次生物重复实验，以增强实验结果的准确性。统计分析采用单因素方差分析（ANOVA）方法。* 表示 *P*<0.05，差异显著；** 表示 *P*<0.01，差异极显著。

2 结果

2.1 和田羊 *ESR2* 基因启动子区序列扩增与克隆 利用和田羊基因组 DNA 作为模板，针对 *ESR2* 基因 5' 侧翼启动子序列进行 PCR 扩增。由图 1 可知，扩增序列与目的片段（2 871 bp）大小相符；对测序结果进行比对，发现目的片段与 NCBI 收录的和田羊 *ESR2* 基因相应序列相似度达 98.7%，证明成功扩增了该序列。

2.2 和田羊 *ESR2* 启动子序列生物信息学分析 克隆获得的和田羊 *ESR2* 基因启动子序列分析结果显示，启动子区存在 4 个潜在的转录起始位点。预测结果显示出 67 个转录因子结合位点，包括 NKX2-5、SPI1、ZEB1 等（表 2）。此外，分析发现和和田羊 *ESR2* 基因启动子含有 1 个 TATA-box（图 2），并且启动子区存在 2 个



M 孔为 DNA Marker，长度为 5 000 bp。E1、E2、E3、E4 为 *ESR2* 基因扩增产物重复孔，长度为 2 871 bp。

图 1 和田羊 *ESR2* 5' 侧翼启动子序列扩增产物

表 2 *ESR2* 启动子转录因子结合位点预测

转录因子	序列（5'→3'）	位置
NKX2-5	CACTCAA	-642~-636
SPI1	AGGAAGT	-105~-99
ZEB1	CACCTG; CACCTT; CACCTA	-120~-115; -408~-403; -2777~-2769
Arnt	CACGTG	-2092~-2087; -2844~-2839
GATA2	GGATA; CTTATCT; TGCTTATCTTT; CGATA; AGATA	-1143~-1139; -1599~-1595; -1692~-1686; -276~-272; -550~-546
MAX	CACGTG	-2092~-2087; -2844~-2839
Mycn	CACGTG	-2092~-2087; -2844~-2839
ETS1	CTTCCG; TATCCT; CTCCT; TTTCCT	-283~-278; -723~-718; -1619~-1614; -1786~-1781
EN1	TAATTA	-162~-157
SRY	AAACAAT	-1876~-1870
Gata1	GGATGG	-1712~-1707
Sox5	AACAATGG	-1875~-1868
YY1	GCCATC	-785~-780
FOXL1	TATACATA; ATAAACA	-1878~-1872
Prrx2	AATTA	-161~-157
MZF1	TGGGGA	-501~-496
TFAP2A	GCCCCGGGG	-2755~-2747
SPI1	GGGAAG; AGGAAG	-2365~-2360; -332~-327
FOXL1	CACCTT	-801~-796
USF1	CCCACGTGACC; CACGTGA	-2846~-2836; -2092~-2086;
ZEB1	GCTCACCTG	-2777~-2769
Nkx2-5	TTAAGTG	-2492~-2486
USF1	CACGTGA	-2844~-2838
Pax2	AGTCATGC	-1491~-1484
SP1	GCCCCCTCCCCCT	-2685~-2675
NR3C1	AGAACAACATGTTCT	-696~-682

CpG 岛 (图 3、4), 符合 CpG 岛的典型特征 (长度 > 100 bp、GC 含量 >50%、ObsCpG/ExpCpG>0.6)。

2.3 和田羊 *ESR2* 基因启动子缺失片段的双荧光素酶检测 转染 36 h 后, 检测各个缺失片段活性 (图 5A)。

结果表明, L2 (-2027~+345)、L4 (-1027~+345) 片段

活性较低, 而 L3 (-1527~+345)、L5 (-527~+345)

活性较高。此外, 第二次双荧光素酶检测 (图 5B) 结

果发现, L7 (-527~-156) 片段活性显著高于 L6 (-155~+345)。结果表明, 随着 -527 bp 到 -156 bp 的缺失,

活性突然下降, 表明 -527 bp 到 -156 bp 区域可能在维持

```

-2480 CCCCAGAG AACGGCTGGG ATGAGACGAT GAGGGAGATG CACCCCACTG GACATGCTTC CCTTTTTCCT ACAGCAAAAT
-2400 GCACCGAGTC TTACTCTGAC TTCCTTTGCT TTACCAGGTG ACATTTAGCT CATCTTGCAA GCTCATCTCA TGAATGTAAT
-2320 TATAAATGCT AGTAAAGTTA ATATTACACA TCTTATATAA CTGAATTGTA ACCATCCAAA GCTTTTACCC CAAAGGAAGT
-2240 TAAAGGACTG AAGTCCCTAC CATTAGTCC TTATCGTAGG ATATTGGGA GAGGAAAAAG CCTTTCTATG TGTACCATG
-2160 TGGGTGCTTC CTTAGGTAGG TCATAGGTGA GGTGGAAGTG ACAGACCCTG CTGAAAAAAG GTACATCCAC AACGCTAGAT
-2080 TTCAGGTGCT ACTTGGCCTC GTTAATGGCA TTAAGTGTTC CAAGAATTCC TTCTTGGTTT TAGCCTTGGT TCAGGGGGAG
-2000 TTGGAACAGT CACCTTCCCC ACTCACTGCA TTCAGCTAGG CAAGTTTTC TCCCTGAGGT ACTATTATCT TTCTTGATCC
-1920 ACAGGGTGAG TCAGAAGGAA ATGTACTCAC TCCCATTTCAT TCTCTTTCCT TAATATTTCG TGTAGTGAGG TTTCCTTGAG

-1840 TGACAAACAG CTCTGTGGG TGTGTGAGG TCTTTAAAAA GAGAACATGT TGTCTGTGTG AGTGGGAATGA CTCTGAAGG
-1760 AAGCATCACA GCAAACAGGG AGCTCTAGTT CCCAGAGTTG AGCAGAAGCT TTTTTCACCG ATGGCAGGAG CCTTTAAGGT
-1680 GGGGCTTGCT TGCAGGAGAT ACATATGTTCT GGCATTCAAG ACATCTTCAT TTCCTATTGA TTGAAGCCAT GGTGCGGAAG
-1600 AAAACCGTCT TGAGCTCTCA CTGGCCTGGA TTCAAGTTCT TCTCAGCCAT TGACTGGCCA TTTTCTCAAT CATAAATAGG

-1520 GGCTAATTC AATAGAATT ACACAGAGG CTTGTTGTAG AATAAAATTA TGTATAGAAA GTGGAAAGTC ACTCAGTCAA
-1440 GTCCAACTCT TTGCGACCCC ATGGACTATA CAGTCCATGG AATTCTCCAG GCCAGAATAC TGGAGTGGGT AGCTGTTCCT
-1360 TTCTCCAGGG GATCTTCCTA TCCAGGGAT CAAACCCAGG TCTCCTACCT TGCAGGCGAA TTCATCACCA GCTGAGCTAT
-1280 GAGGGACTCC CATAGAAAGT GGAGCATGGC TAAATGCCCA ATAAGTGGTA GCTGTTTATG AAAGCATTTG TGCTACTGGG
-1200 TTCTTTTCTT ACTATGCATG ACTTCAGGTA GCTGATATAA GCTCTGTGAG CCTCTCTCTG TTACCTCTGTG TGAGAAGTGG
-1120 GGTCATGAG GATTAATGA GATGCTGTGC AAGCACTTAA TGCATTCTCT GGCAATGATG AGATACTTAA TAGATGTGAC
-1040 TTTTCTTAAC TGTTCATAA TCTTTGTCTC CTCATTGGCC CATGCATGAC TGGAAATTCCT TCATAATACT TTTTCTCTG
-960 GGATATCTGT TGACAAGTAC ACAAATGGAA CTGATTTAAA GACAAAAACA AAAACACACT ATCCTTTAAA ATTTTATCCT
-880 TAAAGTGAA TGGAGGAAAA AGCACATGGA TATTAGGTAC TGGAGAAATA CCTTGGAAAG GGAACAGGGG AGCAAAGACT
-800 GGCAAGATA AGCATTGTTG CTTCTACCAT CCTCCACAGG GTGCATCTTG CCAGCTATAC ACTATCTCTG CTAACCTTCT
-720 CAGCCTCAGC CTCAAGGACC AGGAACTCT CCCCACAGC TTGAGAAAAT CCAGGAGTCC AAGCTTTAAT GAAACTTGGA

-640 GTGAGGAGA GTACAAATTT TTGATAACCA TTGTTTATAA AGTAGGTGAC TCTCCATATT TGGAGCTGCT CTCCACCGCC
-560 TATGAGCTTG ATTCTCACA GCCCAGAGCA CACTAGCGCT CCTCTAGGCT ATTTTGGGTT AAACCAAGC ATTTAAGTCT
-480 GTAAAAAGTTT CCTTCCATAT GCCCCTTTGG TCTTCTTACA CCTGCGATCT GGAGCCGCAA AACCGTGTCC
-400 GTTTGTACAG TGTATAGATA TTAATGACTT AAATTTACTA GTGTGCACAC TGTGGGATAC TGCCTGGTCG GGTGGGTGAG
-320 AAACGTGCAG ACCTGGGAAA CTGGAATAC CACCAGGGGG CGCTCGCCTG CGGAGAGAGT TTGGTCGAGG AGCCGCGGGG
-240 GACTGGGGGG GCCTCCGAG AGAAGCACAG TACCACCTCT CCGCCTCGGA TCCCCTGGGC TCCCTTGCAG TAGATGAGCT
-160 TGAGGAGCTT CCCGGGATCT TGCTCTAGGG CGAGACGGCC TTCCCAGCCA GCCCTTGAGA GATGAGAACC TTCACCTTCC
-80 ACCTCCCGAC CCGTGCTACG AGGCTTTGCC TCTACAGGGG GACAAGGCTG CTCTTGCTGC TGGGGACTGG GCAATCCAA

1 CCCCTCACTT AAAGAGGCAG AGTCTCTAT TTAATGACAC CGAAGCAATC AGATCCTCTC GGACTCAACG TGGCTCAGGG
81 TCTGGGGAGC CGCCCGTCAA TGCGAGGCC CTAGCCCGGC AGCTTCAGTT TCAGCATCAC CTGTTAGGAA TGCACAGTCG
161 CAGGCCCGCG CCCAGATCT CCCGAATCCA AGACAGGGGA GGGCGCGCGT GTGTGCTTTG TCGCCCTGA GAGTGACAGT
241 GAGGCGTGG ACGGTGACAG CCCCTGCCCC GGGCTTCTCT ACTTCGCTCA GGTGAGCGTG GGTGGCGAGG CAGGCAGCCC
321 GGATCTCTCT GCGATCTCCC GATCGCAGGC TAGTGTTGTA CGTGGGTTCT CGGCATCTCC ACCCCGCCCC A
    
```

A: TATA 盒; B: 起始密码子; C: 转录起始位点。

图 2 和田羊 *ESR2* 启动子序列与结构

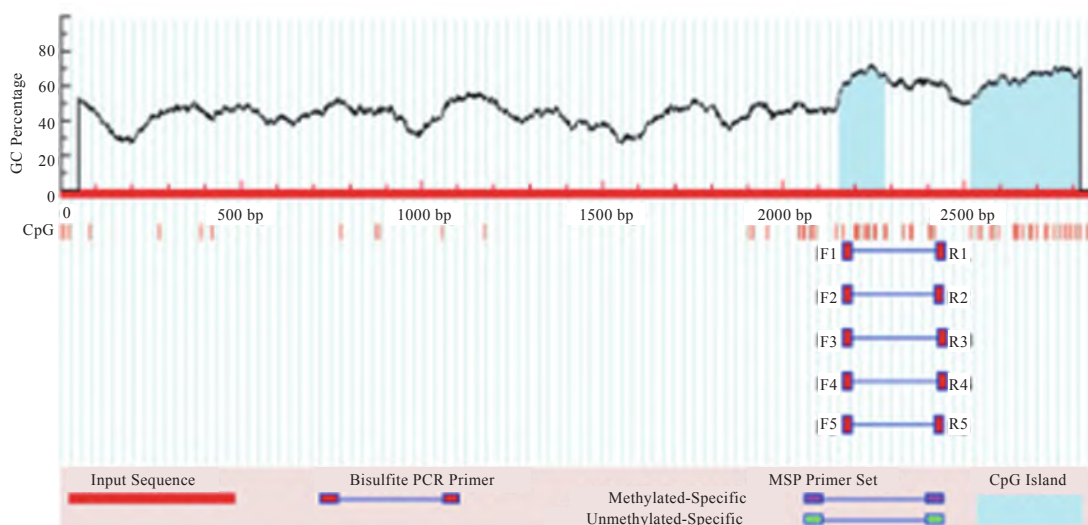


图 3 Methprimer 预测 CpG 岛

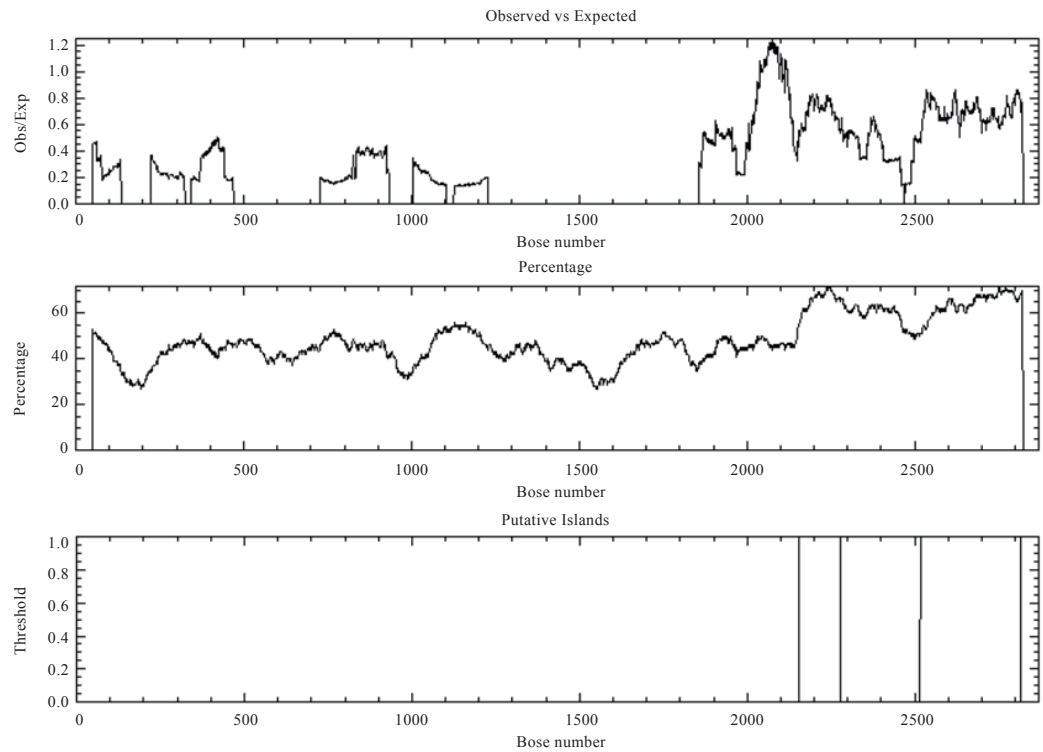
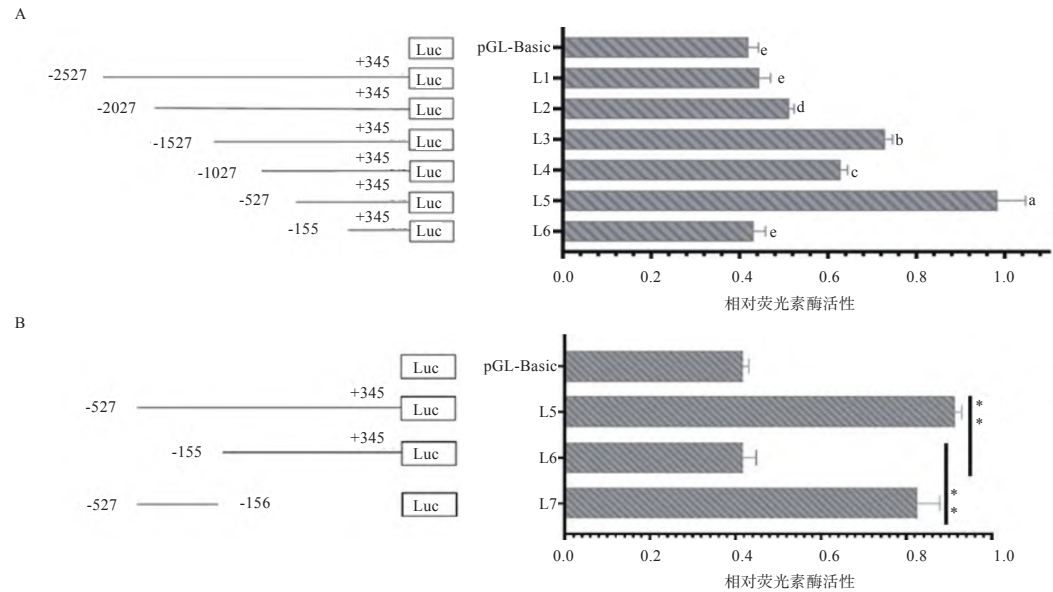


图4 EMBOSS CpGplot 预测 CpG 岛



A 为第一次双荧光素酶活性，B 为第二次双荧光素酶活性。左侧线条为缺失片段长度，右侧柱状图为双荧光素酶活性。

图5 和田羊 *ESR2* 基因启动子缺失片段活性检测

ESR2 转录活性中发挥关键作用。

3 讨论

和田羊是新疆地区的一种优良地方品种，在新疆南疆地区的畜牧业中占有重要地位^[13]。而和田羊的繁殖力相对较低，平均产羔率仅为 102.5%^[14]，远低于策勒

黑羊的 215.5%^[15]，这种低繁殖力的特点使得和田羊的生产效率受到限制，进而影响了当地畜牧业的可持续发展。卵泡发育是影响绵羊繁殖力的关键因素，而 *ESR2* 基因作为雌激素受体 β (*ER β*) 的编码基因，在调控卵泡发育和卵巢功能中扮演着重要角色。研究表明，*ESR2* 基因的表达水平与卵泡颗粒细胞的增殖、分化以

及激素反应性密切相关, 其功能异常可能导致卵泡发育障碍和排卵失败。Khristi 等^[16]发现 *ESR2* 的完全缺失或 DNA 结合结构域 (DNA-Binding Domain) 的缺失会导致小鼠卵巢尺寸缩小、卵泡发育受损和完全缺乏排卵。Antonson 等^[17]利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统敲除了小鼠基因组中的整个 *ESR2* 基因, 发现敲除 *ESR2* 基因会导致雌性小鼠的不育。徐颂颂等^[18]通过全基因组关联分析, 在绵羊中筛选出 *ESR2* 为卵泡生长和排卵过程中起作用的候选基因。而对于 *ESR2* 基因启动子区的结构尚不清晰。因此, 深入研究 *ESR2* 基因的调控机制, 特别是其启动子区域的功能, 对于揭示 *ESR2* 基因对绵羊卵泡发育的调控机理具有一定意义。

本研究克隆了和田羊 *ESR2* 基因启动子区 2 871 bp 的序列并利用分析软件对 *ESR2* 候选启动子区进行了生物信息学分析, 和田羊 *ESR2* 基因启动子区存在 4 个潜在的转录起始位点, 转录因子结合位点共 67 个。含有 1 个 TATA-box 和 2 个 CpG 岛。双荧光素酶检测结果显示 *ESR2* 基因启动子区位于 L7 (-527~-155)。

基因启动子在基因转录起始中起着至关重要的作用, 通常通过与顺式作用元件结合, 调控转录因子的结合和转录起始复合物的形成^[19-20]。本研究发现 1 个 TATA-box 和 2 个 CpG 岛。TATA-box 可以和 (TBP) 特异性结合, 对转录起始复合物的形成起到决定性作用, 且 TATA-box 还具有基因表达调控和与增强子结合等作用^[21]。而多数 DNA 甲基化发生在 CpG 岛, 其会影响转录因子与序列的结合^[22], 从而对基因的表达产生影响^[23]。

转录因子 (Transcription Factors, TFs) 是基因表达调控的关键角色, 它们通过与 DNA 上的特定序列——启动子或增强子区域相结合, 调节 RNA 聚合酶的活性, 进而促进或抑制基因的转录过程^[24-25]。本研究通过 JASPAR 和 animalTFDB 预测发现 67 个转录因子结合位点。在这些转录因子中有一些可能与卵巢的生长发育相关, 有研究表明 FOXL2 与 ER β 之间存在直接的相互作用, 它能够抑制 ER β 的配体依赖性转录激活功能^[26]。这说明 FOXL2 可能通过与 *ESR2* 序列结合从而影响 ER β 配体依赖性转录激活功能, 进一步影响卵巢的生长发育。此外, 已鉴定的核心启动子区 L7 (-1527~-1028) 序列通过 JASPAR 和 animalTFDB 预测转录因子结合位点发现其片段中存在 OTX2 的结合位点, 有研究表明转录因子 OTX2 通过抑制原始生殖细胞转录因子的表达,

限制了外胚层细胞进入生殖系的过程, 从而调控生殖细胞的早期发育^[27]。

启动子的识别与功能鉴定是解析基因转录调控机制的核心环节^[28]。在此过程中, 荧光素酶分析法作为研究启动子核心区及调控区域功能的重要手段^[29-30], 其双荧光素酶报告基因检测系统通过同时引入萤火虫荧光素酶 (pGL3) 和肾荧光素酶 (pRL-TK), 以两者的活性比值来确定基因表达水平。该方法的优势在于利用内参基因 (pRL-TK) 对实验数据进行标准化校正, 可有效规避因细胞活性差异、转录效率波动及转染效率不均等非特异性因素引入的系统误差, 从而显著提升实验结果的可靠性与准确性。本试验通过双荧光素酶报告系统发现, 缺失片段 L5 (-527~+345) 活性最高, 而缺失到 L6 (-155~+345) 时活性骤然下降, 第二次双荧光素酶检测显示 L7 (-527~-156) 活性显著高于 L6 (-155~+345), 并且一般核心启动子区位于上游前 500 bp, 因此 *ESR2* 基因的核心启动子在 L7 (-527~-156)。

本研究首次克隆并分析了和田羊 *ESR2* 基因启动子区, 揭示了其在基因表达调控中的潜在作用。通过生物信息学分析和双荧光素酶检测, 明确了核心调控区域, 并发现了与卵泡发育相关的转录因子结合位点。然而, 仍需实验验证转录因子的结合及其对基因表达的影响。研究为改善和田羊繁殖性能提供了理论支持, 并为绵羊卵泡发育的机制研究提供了新的方向, 对遗传改良具有重要意义。

4 结 论

本研究成功克隆了和田羊 *ESR2* 基因启动子区序列, 其序列长度为 2 871 bp, 包含 1 个 TATA-box 和 2 个 CpG 岛。通过预测发现, 该序列还包括 67 个转录因子结合位点。鉴定了 *ESR2* 核心启动子区为 -527~-155。本研究通过对和田羊 *ESR2* 基因启动子序列的初步分析, 为 *ESR2* 基因对绵羊卵泡发育的调控提供了一定的理论基础和新的线索。

参考文献:

- [1] Schwabe J W R, Teichmann S A. Nuclear receptors: the evolution of diversity[J]. Sci STKE, 2004, (217): pe4.
- [2] Jensen E V, Suzuki T, Kawashima T, et al. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus[J]. Proc Natl Acad Sci U.S.A, 1968, 59(2): 632-638.
- [3] Dorling A A, Todman M G, Korach K S, et al. Critical role

- for estrogen receptor alpha in negative feedback regulation of gonadotropin-releasing hormone mRNA expression in the female mouse [J]. *Neuroendocrinology*, 2003, 78(4): 204-209.
- [4] Dupont S, Krust A, Gansmuller A, *et al.* Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes[J]. *Development*, 2000, 127(19): 4277-4291.
 - [5] Deroo B J, Rodriguez K F, Couse J F, *et al.* Estrogen receptor β is required for optimal cAMP production in mouse granulosa cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2009, 23(7): 955-965.
 - [6] Emmen J M A, Couse J F, Elmore S A, *et al.* In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER) α and ER β null mice indicate a role for ER β in follicular maturation[J]. *Endocrinol*, 2005, 146(6): 2817-2826.
 - [7] Hegele-Hartung C, Siebel P, Peters O, *et al.* Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(14): 5129-5134.
 - [8] Vanderhyden B. Molecular basis of ovarian development and function[J]. *Front Biosci*, 2002, 7: d2-d6.
 - [9] Niu X, Tyasi T L, Qin N, *et al.* Sequence variations in estrogen receptor 1 and 2 genes and their association with egg production traits in Chinese Dagou chickens[J]. *Vet Med Sci*, 2017, 79(5): 927-934.
 - [10] Laliotis G P, Marantidis A, Avdi M. Association of BF, RBP4, and ESR2 genotypes with litter size in an autochthonous pig population[J]. *Anim Biotechnol*, 2017, 28(2): 138-143.
 - [11] Wang K, Li Q, Niu Z, *et al.* Using Whole-Genome sequencing data reveals the population structure and selection signatures for reproduction traits in Duolang sheep[J]. *Animals*, 2025, 15(23): 3466.
 - [12] Lemon B, Tjian R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(20): 2551-2569.
 - [13] 国家畜禽遗传委员会. 中国畜禽遗传资源志·羊志 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 136.
 - [14] Chen H Y, Shen H, Jia B, *et al.* Differential gene expression in ovaries of Qira black sheep and Hetian sheep using RNA-Seq technique[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): 0120170.
 - [15] 於建国, 董红, 季跃光, 等. 和田羊品种资源现状与保护利用措施 [J]. *草食家畜*, 2011(2): 7-9.
 - [16] Khristi V, Chakravarthi V P, Singh P, *et al.* ESR2 regulates granulosa cell genes essential for follicle maturation and ovulation[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 474: 214-226.
 - [17] Antonson P, Apolinário L M, Shamekh M M, *et al.* Generation of an all-exon ESR2 deleted mouse line: effects on fertility[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 529(2): 231-237.
 - [18] Xu S S, Gao L, Xie X L, *et al.* Genome-wide association analyses highlight the potential for different genetic mechanisms for litter size among sheep breeds[J]. *Front Genet*, 2018, 9: 118.
 - [19] Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation[J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2004, 40: 1-22.
 - [20] Hernandez-Garcia C M, Finer J J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements[J]. *Plant Sci*, 2014, 217: 109-119.
 - [21] Kim Y, Geiger J H, Hahn S, *et al.* Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex[J]. *Nature*, 1993, 365(6446): 512-520.
 - [22] Zhao X, Li J, Zhao S, *et al.* Regulation of bta-miRNA29d-3p on lipid accumulation via GPAM in bovine mammary epithelial cells[J]. *Agriculture*, 2023, 13(2): 501.
 - [23] Oh Y M, Mahar M, Ewan E E, *et al.* Epigenetic regulator UHRF1 inactivates REST and growth suppressor gene expression via DNA methylation to promote axon regeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(52): E12417-E12426.
 - [24] Weidemüller P, Kholmatov M, Petsaluki E, *et al.* Transcription factors: bridge between cell signaling and gene regulation[J]. *Proteomics*, 2021, 21(23-24): 2000034.
 - [25] He H, Yang M, Li S, *et al.* Mechanisms and biotechnological applications of transcription factors[J]. *Synth Syst Biotechnol*, 2023, 8(4): 566-577.
 - [26] Hirano M, Wache-Hiraike O, Fu H, *et al.* The emerging role of FOXL2 in regulating the transcriptional activation function of estrogen receptor β : an insight into ovarian folliculogenesis[J]. *Reprod Sci*, 2017, 24(1): 133-141.
 - [27] Zhang J, Zhang M, Acampora D, *et al.* OTX2 restricts entry to the mouse germline[J]. *Nature*, 2018, 562(7728): 595-599.
 - [28] Haberle V, Lenhard B. Promoter architectures and developmental gene regulation[C]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 57: 11-23.
 - [29] Wang J, Lang B, Zhu H, *et al.* Cloning and transcriptional activity analysis of the porcine cofilin 2 gene promoter[J]. *Gene*, 2014, 547(2): 280-287.
 - [30] Annicotte J S, Schoonjans K, Haby C, *et al.* An E-box in pGL3 reporter vectors precludes their use for the study of sterol regulatory element-binding proteins[J]. *Biotechniques*, 2001, 31(5): 993-994, 996.

(责任编辑: 赵楠)