

寿光鸡腺苷酸琥珀酸裂解酶 ADSL 基因的表达与克隆化细胞株的筛选

刘长青^{1,2,3}, 张洪海⁴, 文杰², 马月辉^{2*}, 关伟军^{2*}, 唐学玺¹

(1. 中国海洋大学生命科学与技术学部, 青岛 266003; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193;

3. 蚌埠医学院生物科学系, 蚌埠 233000; 4. 曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165)

摘要: 利用 RT-PCR 与 RACE 方法检测寿光鸡心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌与胸肌 8 种组织腺苷酸琥珀酸裂解酶 (ADSL) 基因 mRNA 的差异表达水平, 构建 ADSL 基因融合表达载体 pGEX-ADSL, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 筛选阳性克隆, IPTG 诱导表达, 通过构建真核表达载体 pEGFP-ADSL, 利用脂质体介导法转染寿光鸡成纤维细胞, 并进行阳性细胞的克隆化筛选与检测。结果表明: ADSL 基因开放阅读框序列长为 1 455 bp, 编码 485 个氨基酸; 5' 端非转录调控区具有典型管家基因的特征, 在邻近起始密码子 -28 bp 处发生 C→T 突变, 该突变使该位点变为核呼吸因子 2(NRF-2) 结合位点; 经 SDS-PAGE 电泳显示, pGEX-ADSL 重组融合蛋白在分子量约为 80.5 ku 处有特异的蛋白条带出现, 与预期分子量大小一致, 等电点为 6.79, 纯化后用 Western-blot 检测为寿光鸡 ADSL 蛋白。pEGFP-ADSL 转染寿光鸡成纤维靶细胞后 24、48 和 72 h, 转染率在 26.4%~41.2% 之间, 绿色荧光均匀分布于细胞质与细胞核中, 随表达量的增加, 绿色荧光在细胞核中聚集成团块状或颗粒状, 经药物筛选和克隆化培养, 获得表达 pEGFP-ADSL 融合蛋白的阳性克隆细胞株, 经 RT-PCR 扩增与 Western-blot 检测确认 ADSL 融合蛋白基因已经整合到寿光鸡成纤维细胞的基因组中, 获得正常表达。研究结果为揭示我国优良地方鸡种的风味基因结构, 研究其生物学功能奠定基础。

关键词: 寿光鸡; 腺苷酸琥珀酸裂解酶; 基因结构; 基因表达; 基因定位

中图分类号: S831.2; Q344.13

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)07-0982-10

Expression Study and Establishment of pEGFP-ADSL Cloning Cell Lines of Shouguang Chicken Adenylosuccinate Lyase Gene

LIU Chang-qing^{1,2,3}, ZHANG Hong-hai⁴, WEN Jie², MA Yue-hui^{2*}, GUAN Wei-jun^{2*}, TANG Xue-xi¹

(1. Division of Life Sciences and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

3. Bioscience Department of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China;

4. College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

Abstract: The specific expression of ADSL gene in 8 different tissues of Shouguang chicken was investigated by RT-PCR and RACE in this study. The fusion expression vector pGEX-ADSL was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3), positive cloning screened, induced and expressed by IPTG. Eukaryotic expression vector pEGFP-ADSL was transfected into Shouguang chicken fibroblast cells using lipofectin method. The results of sequences analysis showed that the open reading frame of 1 455 nucleotides encode a protein of 485 amino acids; The promoter of chicken ADSL cDNA showed typical features of house keeping genes, there was a C-

收稿日期: 2008-05-14

基金项目: 国家自然科学基金(30100132); 国家“863”计划项目资助(2006AA10Z198; 2007AA10Z170); 山东省中青年科学家科研奖励基金(01BS12); 国家“973”计划项目(2004CB117506)

作者简介: 刘长青, (1978-) 男, 山东潍坊人, 博士, 主要从事细胞分子生物学研究, E-mail: lcq7813@hotmail.com

* 通讯作者: 关伟军, E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn; 马月辉, E-mail: Yuehui.ma@263.net

28T mutation which caused the site mutate to NRF-2 binding site. The SDS-PAGE electrophoresis results showed that there were specific bands, about 80.5 ku and an isoelectric point of 6.79, and Western-blot analysis showed that the fused protein was ADSL. After transfection 24, 48 and 72 h, transfection rate of pEGFP-ADSL were between 26.4%—41.2%, and green fluorescent could be observed in cytoplasm and nucleus well-distributed except cryptomere vesicle. Both of RT-PCR and Western-blot confirmed that the pEGFP-ADSL had been integrated into the Shouguang chicken fibroblast cell genome, and accessed to the normal fusion protein expression. This research revealed the *ADSL* gene structure of excellent native chickens of China, established the foundation for further research with its biological function.

Key words: Shouguang chicken; adenylosuccinate lyase; gene structure; gene expression; subcellular location;

随着人们生活水平的提高以及营养和健康意识的增强,人们对畜禽肉质风味的要求亦越来越高。因此改善和提高畜禽肉质风味的研究是新时期育种学家所面临的问题。有关寿光鸡、石歧杂鸡和黄羽鸡等肌肉中化学成分的研究表明:氨基酸、肌内脂肪酸(Intramuscular Fat, IMF)和肌苷酸(Inosinic acid, IMP)是影响肌肉风味的主要因素^[1-5]。其中,IMP合成酶系中至关重要的 *ADSL* 是催化嘌呤核苷酸起始合成与循环的唯一双功能酶。

自从 Jaeken 和 Berghe 在 1984 发现第一个 *ADSL* 缺陷病人开始,至今已经发现有 50 多处有致病作用的 *ADSL* 基因的点突变^[6]。所以当前国内外对影响肌苷酸生成的限速酶 *ADSL* 基因的研究还主要集中在病理、生理、免疫等领域,而其对于肌苷酸含量影响的研究尚未见报道^[7-11]。本研究在利用 RT-PCR 与 RACE 技术获得寿光鸡 *ADSL* 基因全长 cDNA 序列的基础上,通过分析 *ADSL* 基因结构以及构建原核与真核表达载体,实现了其在原核与真核细胞中的高效表达,得到以 pGEX-ADSL 表达为主的基因工程菌,确定了 *ADSL* 基因在靶细胞中的分布及亚细胞定位,为阐述 *ADSL* 基因与风味特性关联的分子机制, *ADSL* 基因的精确定位,以及不同组织、不同发育阶段的时空表达等后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

50 日龄雄性寿光鸡种鸡取自山东省寿光慈伦种鸡养殖场。

1.2 质粒与菌株

pGEX-4T-1 载体为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品, pEGFP-N3 载体为 Clontech 公司产

品, pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司, 大肠杆菌 DH5 α 、表达宿主菌 BL21(DE3)为本实验室保存。

1.3 主要试剂

RNA 提取 TRIzol 试剂盒购自 Invitrogen 公司; QIAquick Gel Extraction kit 凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司, cDNA 合成试剂盒、cDNA PCR 文库构建试剂盒、5'-Full RACE 试剂盒、LA PCRTM *in vitro* 克隆试剂盒等购自 TaKaRa 宝生物工程公司; M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司; *Eco*R I、*Xho*I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。

1.4 总 RNA 的抽提与 cDNA 合成

取新鲜寿光鸡心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌与胸肌等不同组织各 100 mg, 用 Trizol 试剂盒提取寿光鸡总 RNA, 用紫外分光光度计及 RNA 甲醛变性凝胶电泳对 RNA 的质量进行检测分析。参照使用 cDNA 合成试剂盒、cDNA PCR 文库试剂盒使用说明合成和扩增 cDNA, 同时使用 Oligo(dT)₁₈ 和随机引物, 保证 cDNA 合成的完整性。

1.5 3'、5'-RACE 与 5'侧翼调控区的扩增

3'-RACE 特异引物 ADSL 31: 5'-CAGATTG-GCTCMAGTGCG-3' 与 ADSL 32: 5'-GCCA-CAGAGAACATCATCAT -3'; 5'-RACE 特异引物 ADSL 51: 5'-CACAAGCAGCAGCGTTTCC-3', ADSL 52: 5'-CTGGCGTACCGCGACACC-3'; 中间序列特异引物 ADSL Z1: 5'-CTGGTGTTCGCGGTACGCC-3', ADSL Z2: 5'-ATGATGATGTTCTCTGTGGC-3'。

提取寿光鸡肝脏基因组 DNA, 利用限制性内切酶 *Hind* III 充分酶切, 根据 LA PCRTM *in vitro* 试剂盒使用说明将酶切 DNA 连接 *Hind* III 接头, 并组合使用 *ADSL* 基因 5'端特异引物 ADSL D1 (5'-

GTAGCGGGCCAGCGGGTCCT-3'), ADSL D2 (5'-GCCAGCGGGTCCTCCTCG-3')和试剂盒接头引物(Primer C1, Primer C2)进行5'侧翼调控区序列的巢式PCR扩增。

1.6 寿光鸡 ADSL 基因原核表达载体的构建与表达

根据 ADSL 基因序列 (AY706044) 和 pGEX-4T-1 多克隆位点设计特异性引物来扩增寿光鸡 ADSL 基因, ADSLF1 (5'-GAATTCATGGCGAC-CCCCTGCGCCGAGGA-3'), 起始密码子 ATG 前面, 加入 *EcoR* I 酶切位点 GAATTC, ADSLR1 (5'-CTCGAGTTA AAGTGTGCTCAATTTTC-3'), 终止密码 TAA 后面加入 *Xho* I 酶切位点 CTCGAG。定向插入脱磷酸化处理的 pGEX-4T-1 载体中, 构建融合表达载体 pGEX-ADSL, 转化感受态 BL21, PCR 筛选重组子, 测序鉴定插入片段的基因序列及插入方向。将含 pGEX-ADSL 重组质粒的 BL21 菌株经 IPTG 诱导表达后, 离心收集菌体, 上清和沉淀加入 1×SDS 上样缓冲液, 煮沸离心后进行 12% SDS-PAGE 电泳检测, 分析蛋白表达含量^[12]。

1.7 重组寿光鸡 GST-ADSL 融合蛋白的纯化与 Western-blot 检测融合蛋白

将 1 L 培养过夜的转化子菌液经 IPTG (0.1 mmol·L⁻¹), 30 °C 诱导 3~5 h, 离心收集菌体, 超声波破碎后经 Glutathione Sepharase 4B 凝胶层析柱纯化, 获得纯化的 GST-ADSL 融合蛋白。取 20 μL 对照 (空载体表达产物) 与纯化融合蛋白于 12% 的 SDS-PAGE 电泳, 电泳后转移至 PVDF 膜, 室温封闭 2 h, 加入 GST 抗体 1 : 1 000 的一抗溶液, 4 °C, 2 h。再加入二抗溶液 (HRP 标记的羊抗鼠 IgG 1 : 400), 37 °C, 1 h, DAB 显色后与 Marker 进行比对鉴定纯化产物。

1.8 寿光鸡 ADSL 基因真核表达载体的构建与脂质体介导法转染成纤维细胞

在起始密码子 ATG 前面, 加入了 *Xho* I 酶切位点 CTCGAG (ADSL F2: 5'-GAATTCATG GCGACCCCTGCGCCGAGGA-3'), 3'端引物在原有的终止密码 TAA 前面加入了 *EcoR* I 酶切位点 GAATTC (ADSL R2: 5'-CTCGAGAAGTGT-CAGCTCAATTTTCCCA-3')。定向插入处理的 pEGFP-N3 中, 构建融合表达载体 pEGFP-ADSL, 转化感受态细胞。

取寿光鸡 7 日龄胚胎, 采用组织块贴壁培养法进行体外培养、传代和冻存^[13-15]。采用脂质体介导

法^[16], 将融合表达载体 pEGFP-ADSL 转入寿光鸡体外培养成纤维细胞中。转染后 48 h, 用 DAPI 染色液对各试验细胞组进行染色以定位阳性细胞的细胞核, 观测各组阳性细胞中的荧光强度来确定融合蛋白在阳性细胞中的分布。

1.9 G418 成纤维细胞最小致死量测定与抗性细胞的筛选

将寿光鸡成纤维细胞转至 25 mL 培养瓶中, 待细胞长满, 分别按下列浓度加 G418: 0、100、200、300、400、500、600、700、800 μg·mL⁻¹, 继续培养, 观察细胞生长及死亡情况, 3 d 换液 1 次, 仍以上述浓度加 G418, 2 周内使细胞全部死亡的最小浓度即为最小致死量。采用有限稀释法进行克隆化细胞的筛选, 转染 48 h 后, 将细胞按 1 : 4 密度传代, 继续培养至细胞密度达 70%~80% 融合, 更换浓度为 800 μg·mL⁻¹ 的 G418 全培养液进行筛选, 每 3 d 换 1 次培养液, 约 10 d 后, 对照细胞大部分死亡, 观察每孔中细胞克隆的形成数及荧光表达强度。G418 培养液浓度换为 300 μg·mL⁻¹ 继续筛选培养, 基本得到 G418 抗性细胞的稳定克隆。

1.10 单克隆阳性细胞荧光蛋白基因整合、表达的检测及鉴定

从挑选扩大培养的 ADSL 阳性表达细胞培养物提取总 RNA^[13]; 利用特异引物 GFP F1 与 GFP R1 进行 PCR 扩增, 检测外源基因的表达及整合情况, 同时设计引物 GAPDH F1: (5'-ACCACAGTC-CATGCCATCAC-3') 和 GAPDH R1: (5'-TCCAC-CACCCTGTTGCTGTA-3') 扩增 GAPDH, 将其作为 RT-PCR 内参。用 pEGFP-ADSL 重组表达载体转染寿光鸡成纤维细胞, 40 h 后收集细胞进行 Western-blot 检测。一抗为小鼠抗 GFP 单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体, DAB 显色。

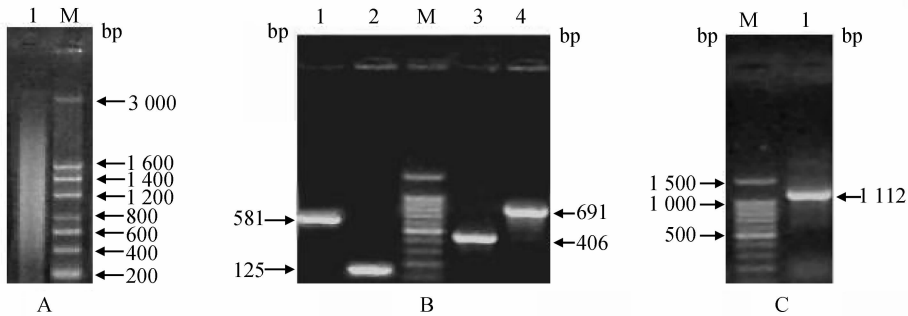
2 结 果

2.1 cDNA PCR 文库构建以及 ADSL 基因 cDNA 序列的 PCR 扩增

在获得寿光鸡 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.95~2.00 之间的总 RNA 的基础上, 构建 cDNA PCR 文库以及进行 ADSL cDNA 序列的 PCR 扩增。用 cDNA 分子两端的接头对应引物对 cDNA 混合物进行有限的扩增, 获得 cDNA PCR 文库^[17]。所构建的 cDNA PCR 文库中, cDNA 分子量在 300 bp~3 kb

之间,绝大多数在 1 000 bp 左右(图 1 A)。如图 1B 所示,3'-RACE 扩增 *ADSL* 基因 cDNA 序列 406 bp;5'-RACE 扩增其 5'端序列为 125 bp;用特异引

物 *ADSL* 51,*ADSL* 52 扩增中间序列为 1 112 bp (图 1C)。



A. 寿光鸡合成 cDNA 电泳图。B. 5'-RACE 与 3'-RACE,1,2. 5'-RACE 扩增产物;3,4. 3'-RACE 扩增产物。C. *ADSL* 基因 cDNA 中间序列

A. cDNA synthesis separated in 1% agarose gel. B. 3'-RACE and 5'-RACE,1,2. Amplified fragments of 3'-RACE;3,4. Amplified fragments of 3'-RACE. C. The middle partial sequences of *ADSL* gene

图 1 寿光鸡 *ADSL* cDNA 序列全长 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of Shouguang chicken *ADSL* full-length cDNA

2.2 全长 *ADSL* 基因 cDNA 序列

根据测序得出的 3 部分寿光鸡 *ADSL* cDNA 核苷酸序列,如图 2 所示用 DAMBE 软件拼接起全长为 1 558 bp 的 *ADSL* 基因 cDNA 序列。利用 Blastn 软件将 *ADSL* 基因 cDNA 全序列进行同源性基因检索,结果在 GenBank/EMBL/DDBJ 数据库中 *ADSL* cDNA 序列与家鼠^[18]、人类^[19]和狗分别具有 82%、78%和 80%的同源性,证明此基因为寿光鸡的 *ADSL* 基因。根据测序得出的 *ADSL* 基因核苷酸序列,利用 NCBI 与 DNASTAR 软件提供的 ORF 进行开放阅读框的判定,从 +1 到 1 455 bp 为完整阅读框,编码 485 个氨基酸。5'端非翻译区从 -28 到 -1 bp 处,3'端非翻译区为 55 bp。在 3'端非翻译区距离 Poly A 尾 14 核苷酸处,出现大多数真核生物共有的 AATAAA 转录终止信号 (AY706044)。

2.3 5'侧翼调控区分析

使用 *ADSL* 基因的 5'端特异引物与试剂盒接头引物扩增出 1 035 bp 的 *ADSL* 基因 5'侧翼调控区序列。通过 TRANSFAC 转录因子数据库与 Neural Networks Promoter Prediction 预测,寿光鸡 *ADSL* 基因 5'侧翼调控区具有一些典型的调控元件,如: Oct-1, Ap-2, GC-box, NF-AT, Sp1 和 NRF-2 等。但并没有明显的 TATA 和 CAAT 框出

现,而且在位于起始密码子 ATG 前 234 bp 的区域具有 72.65%的 GC 含量,这都与管家基因的特征相一致(图 3,AY911533),与大鼠、人类的 *ADSL* 基因启动子区的研究结果十分相似。

寿光鸡 5'侧翼调控区 -28 bp 处发生 C→T 突变,存在于所有研究的寿光鸡个体中,频率为 1。该突变使得本来不是核呼吸因子-2(NRF-2)结合位点的 CTCC 突变为 NRF-2 结合位点 CTTC。使得寿光鸡在 -19 与 -28 bp 位置上具有 2 个相邻的顺式转录调控因子,2 个潜在的 NRF-2 结合位点,在人的相同位置也具有 2 个 NRF-2 因子结合位点,寿光鸡、GenBank 以及人类野生型、突变型 *ADSL* 基因 5'侧翼区序列比较见图 4。Marie 等通过定点诱变研究,认为人类 5'侧翼调控区的 2 个 NRF-2 因子在调控 *ADSL* 基因功能方面具有重要作用^[20],这 2 个 NRF-2 因子与鸡 *ADSL* 基因的 2 个 NRF-2 因子位置相同。

2.4 不同物种间 *ADSL* 氨基酸序列比对分析

对寿光鸡与人类(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*) *ADSL* 进行多重序列比对,分析结果表明,人类、大鼠的序列比先前研究的鸡 *ADSL* 氨基酸(NP_990860)序列多 26 个氨基酸,并且我们对寿光鸡全长 *ADSL* 基因的 cDNA 序列

```

1          CTCTCCCCCTTCGGCGCGGCGCCGCTG
13  ATGGGACCCCTCGCCGAGGAGGACCCGCTGGCCCGCTACCGCTCTCCGCTGGTGTGGCGGTACGGCGCGCCGGATGGGCTTCAAC
M A T P C A E E D P L A R Y R S P L V S R Y A S A E M G F N
103  ▲ ITCAGCGAGAGGAAGTTCGGCACTTGGCCCGCTCGCTTACCTTGGCCAGGCCGAGGATCTACTGGCTCCATCACAGAT
F S E R K K F G T W R R R L W L Y L A Q A E K S L G L P I T D
193  GAGCAGATAAAGGAGATGGAAGCAAAATCTGGACAACAITGACTTCAAGATGGCAGCGGAAGAAGAGAAGAAGCTGGCCATGATGTGATG
E Q I K E M E A N L D N I D F K M A A E E E K K L R H D V M
283  GCACAGCTTCACACCTTTGCCACTGCTGTCCCAAAGCTGCAGCCATCATTACCTTGGAGCAACTTCTTGTACGTAGGGGATAACAGC
A H V H T F A H C C P K A A A I I H L G A T S C Y V G D M T
373  GATCTGATGTCTCCGAGATGGTITTAACITGCTGCTGCCAAGCTCGCAAGGGTGATCAGCCGCTGGCCACTTTGCTGAGACACAC
D L I V L R D G F N L L L P K L A R V I S R L A D F A E T H
463  GCTGACCTGCTACTTGGCTTCACTACTACCAACTGCACAACCTCACCAGCTGTGGGAAACCGTCTGCTTGTGGATCCAGGACTTG
A D L P T L G C F T H Y Q P A Q L T T V G K R C C L W I Q D L
553  TGCATGGACCTGCACAACCTGGAGCGAGCTGGGAGCGACTTGGCTTTCGGGGTGTGAAAGCCACCCTGCACTCAAGCCAGCTTGTG
C M D L Q N L E R A R D L R L R G V K G C T T G T G T Q A S F L
643  CAGCTCTTTGAGGAGACCATAGTAAAGTTGAAAGCTGGACAGATTAGTCACTGCAAAAGGCAGGATTTAAGCGATTTACATGGTCCAG
Q L F E G D H S K V E E L D R L V T A K A G F K R S Y M V T
733  GGCCAGCTATAGTCCGAAGTGGATATTGAAAGTCTGCTGCTACTGGCCAGCTTGGGGGATCTGTTTACACAAGATTTGTACTGACAT
G Q T Y S R K V D I E V L S V L A S L G A S V H K I C T D I
823  CGCTCTTGGCAACCTGAAGGAGATAGAAGAGCCCTTTGAGAAGAACCAGATTGGCTCAAGTCTATGGCTTACAGGAGGAATCCAAAT
R L L A N L K E I E E P F E K D Q I G S S A M P Y K R N P M
913  CCCTCAGAGCGGCTGCTCACCCCTGGCTGGCCACTTGTATGACTCTGGCTGGATCCCTCCAAAACAGCTTCTGTGCACTGGTTGAGCCG
R S E R C C S L A R H L M T L V L D P L Q T A S V Q W F E R
1003 ACGTTGGATGACAGTGTACTACAGGCGCTGTGCTCCCTGGCTGAGGCTTTTCTCACGGCTGATATCATCTCTGACTACACTGCAGAACATCTCC
T L D D S A N R R V C L A E A F L T A D I T L S T L Q N T S
1093 GAGGACTCGTAGTATATCCAAGGTGATTTGACAGGAGGATCCCGCAGGAGCTGCCGTTTCATGGCCACAGAGAATATCATCTAGCCGATG
E G L V V Y P K V I D R R I R Q E L P F M A T E N I I M A M
1183 GTGAAAGCAGGGGCAATCAGCAGGACTGCCATGAGAAGATCCCTGTCTTCTCCCAAGCAGGCGCTGTTGTGTGAAACAGGAGGGGGT
V K A G C N Q Q D C H E K I R V L S Q Q A A A V V H K Q E G G
1273 GATAATGACTTCAATGGCCCGTGTCCGCTGATCTTATTTGAGCCCATCCATGAACACCTTGACAGCCCTTTGGATCCTTCCCTCTTC
D N D F I A R V R A D P Y F S P I H E H L D S L L D P S S S F
1363 ACTGGCGCTCTCTCAGCAGGTGGCAAAAGTCTTGAAGGAGGAGGCTGGACCAGCGCTGATTCATGCCAAAGCATGATGGGTGGAA
T G R A G Q V A K F L K E E A R P A L I P C Q S M M G G K
1453 ATTGAGTGACACTTTAAGAATATTCAGCAAAGCCCTTGGGTACAGGAAAATAATAAAGCCCTTATGAAACCAAAAAAAAAAAAAAAAA
I E L T L *

```

N 末段与先前研究比较增加的 26 个氨基酸用黑框标出, 2 个翻译起始位点用三角号标出。星号指终止密码子, 转录终止信号 AATAAA 用单下划线标出

The 26 amino acids increasing in the N-terminal of protein sequence comparing with previous research are shown in shaded boxes. Alternative initiation codons are shown in triangle. The star indicates the termination codon, and the polyadenylation signal is underlined

图 2 寿光鸡 ADSL 基因全长 cDNA 序列与预测氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and predicted protein product of the full-length Shouguang chicken ADSL cDNA

```

-1035 AGCTTCCTTT GCTCAGCTCT CACCCTCGCT CTGCTTCTCC CCTCCTTCTC CCGCGTGCAG TAACAGAGCA
-965 GAGGTAGGGC CGGGGGGACG TGTGGGGGGG ACGGATGGCT CAGGGTGGC CACCCAGGGC CGGGCCGCTC
-895 CACCCGCAGC CCCCAGGCA CCACACTTCC TTCCAAGGG TTCTCCATGG ACACAGAAAC TGGGCATTT
-825 AGCAGGTGCT CTCGTACGGC TGCTGCCCC CCCCTCTCC TCCCTTCTTA TATTTTATT TTACCTTTAG
-755 TATAGTGGTA CTTAAAAATCA CTGGTCACT TAAAAAAAAA AAAAGAAAAA AAAACCAACA ACAATAAAAT
-685 GTTTAAACTC TACTAATGTA CAAATAAGCT GAAATGTTG ATTTTATGTG TATTTTGGC ATAGCAGGTA
-615 CTGTATTTCT CATGCTGGAT TTAGAAAAA AAAAGAAAAA AAAAGAAAAA GAAAAAAAAG AGGAAAAAAA
-545 AAGCAAAAGC AAAAGCAAAAC AAAAAGGGTG GTGTTTTATT GGAGTGTGAC AAGTTAAGAG TAATAGGAA
-475 ATACGTCGTC GTCATTTTCAT TGAAACTGAG AGATGGTGTA ATGCATATAT ACGTTTTCTG AAGGTTTTTT
-405 TTGGGCTTTT AAACAGCTTT TTTTTTTTGG TTGTTTCGTT TCTATTTTTT TTTTTTTTTT GAAAGATATG
-335 ATTGTATTAT GTGCAACTCA GTTGCTTACA TTATAACTAC AAAATATTTT TGGTTCCTG GAAAAAAAAA
-265 AAGAAAAAAA AAGGAAAAAA AAAAAAGAAA AGACTAATAA ATGTTTGGG CTGCTAAGCA TTCACCCCTC
-195 TGCCCTCCCG CGCCTTTTCT TTGCTCCCCG CGCTCGGGC TCCGCGGC AGGGGGCGCC GTCTCCCTCT
-125 CCCCTCCCAC CGCCCCGGG CACAGCGTTG GGGGGGGG CTCGTGCGCA GGCGGAGCTC CGCCCTTTA
-55 TCCCCCGCT CGCCGGCGG CGCGGCCCTT CTCCCCCTTC CGCCGGCGG CCGTCAATG
▲ ▲

```

图 3 寿光鸡 ADSL 基因 5' 调控区序列及启动子调控元件预测

Fig. 3 Sequence of the 5' flanking region of Shouguang chicken ADSL gene and prediction of promoters

```

SC-ADSL      C G C G C G G C C C T T T C T C C C C C T T C C G C C G C C G C C G T C A T G
GenBank-ADSL C G C G C G G C C C C T T C T C C C C C T T C C G C C G C C G C C G T C A T G

Human WT-ADSL A G G T T T C C G C T T C C G C T C T T C C C T G G T C C A G T C C A C C C T G
Human MUT-ADSL A G G T T T C C G C C T T C C G C T C T T C C C T G G T C C A G T C C A C C C T G
  
```

图 4 寿光鸡、GenBank 以及人类野生型、突变型 ADSL 基因 5'侧翼区序列比较

Fig. 4 The comparisons of Shouguang chicken, GenBank, wild type and mutation type of human being in ADSL 5' flanking region

研究结果证实,ADSL 基因 5'端在过去认为的起始密码子(M2)前面具有另外一个起始密码子(M1)(图 5)。

2.5 寿光鸡 ADSL 基因的表达情况

ADSL在包括心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌和胸肌

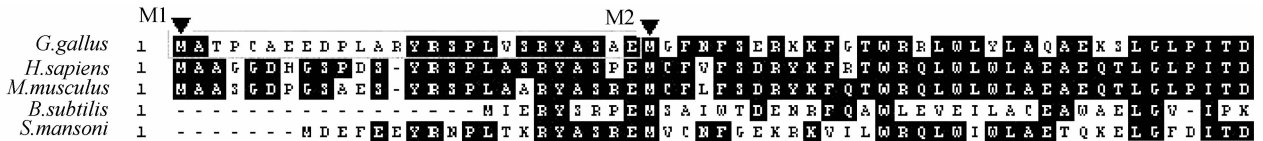
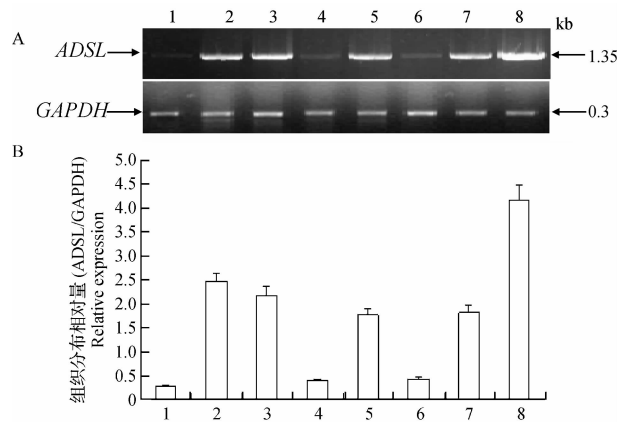


图 5 不同物种间 ADSL 氨基酸序列的多重序列比对图

Fig. 5 Comparison of the ADSL amino acid sequences from five species



A. 寿光鸡 ADSL 在 8 种组织和器官中的差异表达; B. ADSL 基因在 8 种组织差异表达量的比较, 1. 心, 2. 肝, 3. 脾, 4. 肺, 5. 肾, 6. 脑, 7. 腿肌, 8. 胸肌

A. Expression of ADSL in a panel of tissues from Shouguang chicken; B. Comparative levels of expression of ADSL in 8 tissues. 1. Heart; 2. Liver; 3. Spleen; 4. Lung; 5. Kidney; 6. Brain; 7. Leg muscle; 8. Breast muscle

图 6 寿光鸡 ADSL 在 8 种组织中的差异表达

Fig. 6 The result of differential expression of ADSL mRNA in Shouguang chicken 8 tissues

2.6 重组寿光鸡 ADSL 的表达及 Western-blot 检测

SDS-PAGE 结果表明(图 7A),寿光鸡 ADSL 融合表达载体 pGEX-ADSL 菌株经 IPTG 诱导后,在分子量 80.5 ku 处有一条特异蛋白条带。未经诱导的菌株无此蛋白带,含空载体的菌株经 IPTG 诱

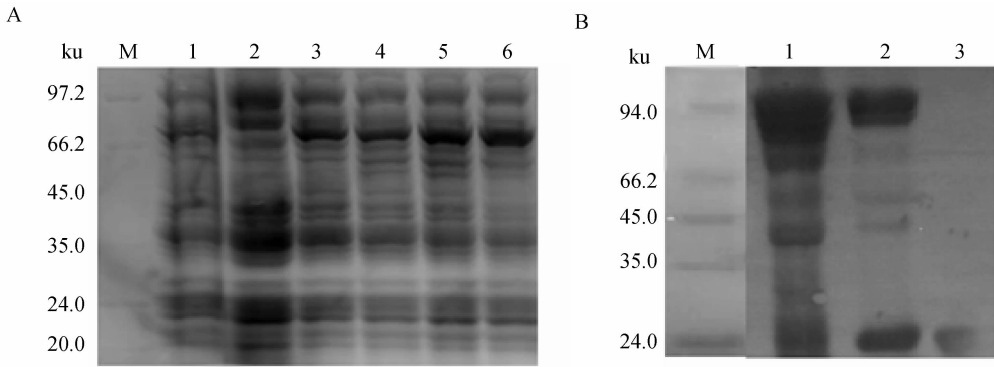
等 8 种器官或组织中表达情况见图 6 所示,ADSL 表达最多的是胸肌,其次是肝脏、脾、肾和腿肌,而心、肺和脑中表达量较低。

导后也没有此蛋白带,未经诱导的 pGEX-ADSL 菌株表达了此蛋白,但其含量为总蛋白含量的 3.4%。随着 IPTG 诱导时间的延长,该特异蛋白带的表达量相应增加,5 h 表达量最高,占有所有蛋白总表达量的 23.6%,诱导 3 h 后融合蛋白表达量差异不大,可见 1% IPTG 诱导表达 3 h 后即可获得 pGEX-ADSL 良好的表达。pGEX-ADSL 菌株在宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)特异表达了重组蛋白-ADSL,融合蛋白的分子量约为 80.5 ku,与预期的分子量大小基本一致(GST 26 ku 与寿光鸡 ADSL 54.5 ku 融合)。

将纯化得到的融合蛋白 pGEX-ADSL 进行 Western-blot 检测,利用 GST 单克隆抗体检测 pGEX-ADSL 重组融合蛋白的表达情况。结果显示,纯化的寿光鸡 pGEX-ADSL 重组融合蛋白能特异性结合 GST 单克隆抗体,融合蛋白 pGEX-ADSL 在 PVDF 膜上呈现 2 条显色带,分子量分别为 80.5 和 26 ku,推测 80.5 ku 应为 pGEX-ADSL 融合蛋白,26 ku 蛋白条带为纯化过程中断裂下来的蛋白 GST,此结果与 SDS-PAGE 电泳结果一致(图 7B)。

2.7 外源基因表达靶细胞的培养

本试验进行了寿光鸡成纤维细胞的体外培养(图 8),细胞冻存个体数达 22 个,冻存支数达 151 支,每支细胞含量为 $3 \sim 5 \times 10^6$ /mL,为外源基因在细胞中的表达提供了良好的靶细胞。



A. 寿光鸡 *ADSL* 基因原核诱导表达 SDS-PAGE 分析, 1. BL21 菌液表达产物; 2 IPTG 诱导表达 pGEX-4T-1 菌株表达产物; 3-6. pGEX-ADSL 诱导 1、2、3 和 5 h 效果图; B. Western-blot 鉴定 pGEX-4T-ADSL 重组融合蛋白的表达, 1. 未纯化 pGEX-ADSL 融合蛋白 Western-blot 检测结果; 2. 纯化 pGEX-ADSL 融合蛋白 Western-blot 检测结果; 3. GST 对照蛋白 Western-blot 检测结果; M. 蛋白质相对分子质量标准

A. SDS-PAGE analysis of recombinant pGEX-ADSL fusion proteins, 1. The total proteins of BL21; 2. Total proteins of BL21 containing pGEX-4T-1 induced with IPTG; 3-6. Total proteins of BL21 containing ADSL on 1, 2, 3 and 5 h after induction with IPTG. B. Western-blot analysis of recombinant pGEX-ADSL fusion proteins, 1. Lysates from recombinant fusion protein pGEX-ADSL; 2. Purified lysates from recombinant fusion protein pGEX-ADSL; 3. Lysates from GST positive control; M. Protein marker

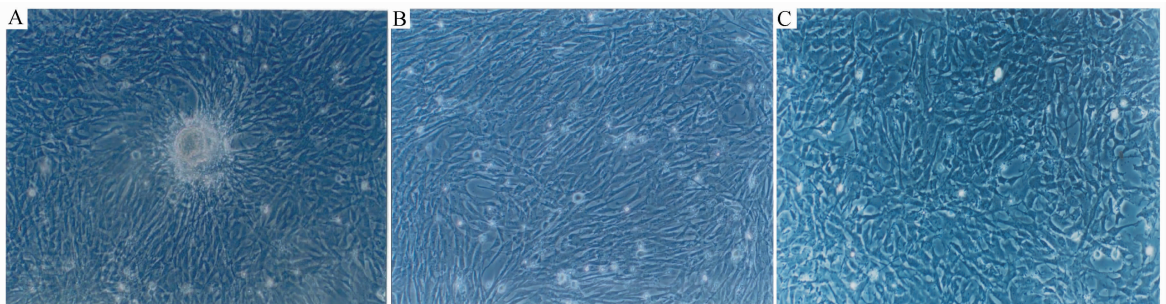
图 7 寿光鸡 *ADSL* 基因原核诱导表达及 Western-blot 检测

Fig. 7 SDS-PAGE and Western-blot analysis of recombinant pGEX-ADSL fusion proteins expressed in the *Escherichia coli* BL21 (DE3)

2.8 ADSL 在转染细胞中的亚细胞定位与克隆化细胞的筛选

脂质体介导法转染后 24、48 和 72 h, 转染率在 26.4%~41.2% 之间, 采用荧光共聚焦显微镜观察绿色荧光在寿光鸡成纤维细胞中的分布, 以确定 ADSL-GFP 融合蛋白在细胞中的分布和亚细胞定位。结果发现, 转染空载体 pEGFP-N3 的阳性对照组中, 绿色荧光均匀的分布于整个细胞, 呈弥散分

布, 说明仅有 GFP 表达; 而在转染融合基因 ADSL-pEGFP-N3 的细胞中, 转染 24 h 后, 寿光鸡成纤维细胞中开始出现绿色荧光, 绿色荧光均匀分布于整个细胞, 在转染 48 h 后, 细胞核内绿色荧光较强, 而细胞质中绿色荧光较弱, 说明 ADSL-GFP 融合蛋白在寿光鸡成纤维细胞内均有分布, 当表达量高时, 在细胞中聚集成团块状或颗粒状(图 9)。



A. 寿光鸡原代培养细胞; B. 寿光鸡继代培养细胞; C. 寿光鸡复苏后细胞

A. Primary cultured cells of Shouguang chicken; B. Subcultured cells of Shouguang chicken; C. Shouguang chicken cultured cells after recovery

图 8 寿光鸡成纤维细胞的培养(40×)

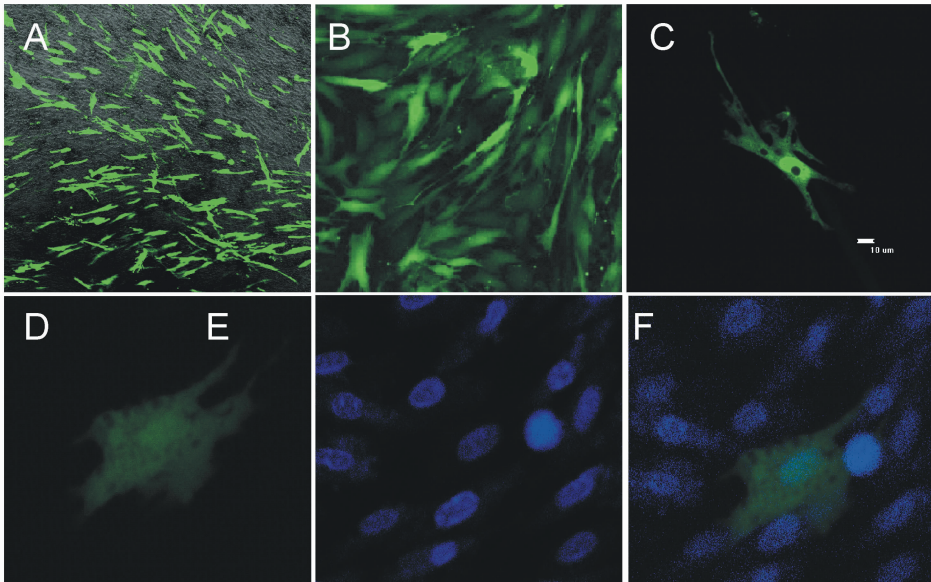
Fig. 8 Fibroblast cell culture of Shouguang chicken(40×)

在细胞转染 48 h 后, 将细胞以 1:4 的比例传代, 传代 3~4 h 待细胞贴壁后, 开始用最小致死量

800 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 G418 全培养基进行药物抗性筛选, 筛选 3~4 周后, 获得多个阳性细胞克隆。挑选

表达强烈的克隆进行了扩大培养,目前传了 7~10 代,这些细胞表达荧光强度仍然强烈,获得表达

pEGFP-ADSL 融合蛋白基因的寿光鸡成纤维细胞株(图 9B)。



A. pEGFP-ADSL 在寿光鸡成纤维细胞中的表达(40×); B. pEGFP-ADSL 阳性细胞株集落(100×); C. pEGFP-ADSL 在成纤维细胞中分布(150×); D. pEGFP-ADSL 在成纤维细胞中表达(400×, 488 nm 激发); E. 使用 DAPI 对转染绿色荧光蛋白细胞进行细胞核染色(400×, 405 nm 激发); F. 为 D、E 两个图片在共聚焦显微镜的结合图(400×)

A. The expression of pEGFP-ADSL in Shouguang chicken fibroblast cell. B. pEGFP-ADSL cell line colony. C. The cellular localization of pEGFP-ADSL(150×). D. The pEGFP-ADSL location in cell(400×, excited at 488 nm). E. Nuclei stained with DAPI (400×, excited at 405 nm). F. The overlying images produced by merging two signals together (400×)

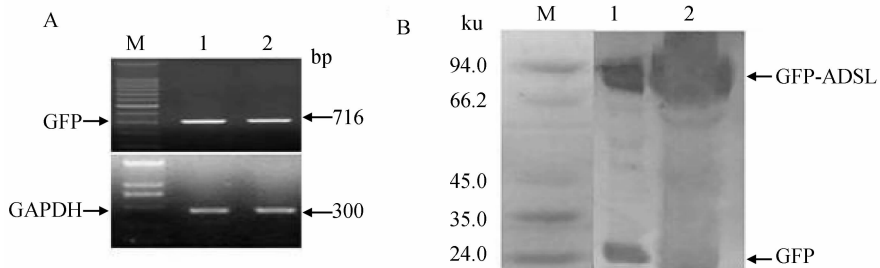
图 9 ADSL 融合蛋白在转染细胞中的亚细胞定位

Fig. 9 The subcellular location of pEGFP-ADSL fusion protein in Shouguang chicken fibroblast cells

2.9 成纤维细胞中表达重组融合蛋白的检测

因寿光鸡成纤维细胞本身不表达 GFP,而构建的 *ADSL* 基因的真核表达载体上带有 *GFP* 基因,根据 *GFP* 基因序列设计特异引物,利用 Trizol 提取克隆细胞的总 RNA,以提取的总 RNA 为模板,进行 PCR 扩增检测,获得了一条 716 bp 左右的片段,与设计的引物预期扩增的片段大小相符,而没有转染的空白对照组没有目的条带出现,说明 3 种

荧光蛋白基因都已经整合到寿光鸡成纤维细胞的基因组染色体上,从 RNA 水平上证实了荧光蛋白基因在寿光鸡成纤维细胞中能够正常的转录、表达(图 10A)。利用 GFP 单克隆抗体检测 pEGFP-ADSL 重组融合蛋白的表达情况。结果显示,在寿光鸡成纤维细胞中表达的重组融合蛋白能特异性结合 GFP 单克隆抗体,融合蛋白在 83.5 ku 处具有明显的条带,空白对照组无特异条带(图 10B)。



A. RT-PCR 检测重组融合蛋白的表达; B. Western-blot 鉴定重组融合蛋白的表达

A. Analysis of GFP expression in transfected BJEM/EGFP-N3-ADSL cells by semi-quantitative RT-PCR; B. Western-blot of the expression of recombinant fusion protein pEGFP-ADSL in Shouguang chicken fibroblasts

图 10 寿光鸡 pEGFP-ADSL 克隆细胞株 RT-PCR 与 Western-blot 检测

Fig. 10 The detection of the expression of *ADSL* gene in transfected cells by RT-PCR and Western-blot

3 讨论

3.1 全长 *ADSL* 基因 cDNA 序列及其编码氨基酸序列分析

有关人类 *ADSL* 基因是从 M1 还是 M2 起始翻译曾经存在过争议,Stanislav 等在 *E. coli* 中克隆并表达了人类 *ADSL* 基因,发现,从 M1 起始翻译的蛋白质是可溶的,稳定的,并且具有 *ADSL* 酶活力;而从 M2 起始翻译的蛋白质是不溶的,不具有 *ADSL* 酶活力^[21]。鸡 *ADSL* 酶氨基酸残基在此位置上与人类^[20]、大鼠^[18] *ADSL* 酶高度的序列同源性也强有力地支持了鸡 *ADSL* 基因应该从第一个起始密码子 M1 起始翻译。因此,鸡的 *ADSL* 酶具有 485 个氨基酸残基,而人类和大鼠都具有 484 个氨基酸残基。

3.2 *ADSL* 基因 5'侧翼调控区的研究

位于寿光鸡 5'侧翼调控区-28 bp 处发生 C→T 突变,使得本来不是 NRF-2(核呼吸因子 2)结合位点的 CTCC 突变为 NRF-2 结合位点 CTTC,而且在-18 bp 处具有另外 1 个潜在的 NRF-2 结合位点。在人类 *ADSL* 基因 5'侧翼调控区靠近起始密码子(ATG)处也具有 2 个类似相邻的 NRF-2 结合位点。Marie 等对一名 *ADSL* 缺陷病人的研究发现,其第 1 个 NRF-2 结合位点发生了突变(CTTC→CTCC)^[19],他认为:这 2 个潜在的 NRF-2 结合位点的突变在很大程度上会引起 *ADSL* 缺陷;NRF-2 结合位点在嘌呤核苷酸生物合成途径基因调控上起到重要作用。本研究证实的-28 bp 处发生 C→T 突变也恰好位于寿光鸡 5'侧翼调控区第 1 个 NRF-2 结合位点,这与 Marie 等的研究结果相似。如果以 GenBank 上 NW_062009 相关序列为野生型,那么该突变使寿光鸡 5'侧翼调控区存在 NRF-2 结合位点,可能会增强寿光鸡 *ADSL* 基因的转录。

3.3 pEGFP-*ADSL* 在细胞中的定位

采用荧光共聚焦显微镜观察绿色荧光在寿光鸡成纤维细胞中的分布发现,在转染空载体 pEGFP-N3 的阳性对照组中,绿色荧光均匀的分布于整个细胞,呈弥散分布,说明仅有 GFP 表达;而在转染融合基因 pEGFP-*ADSL* 的细胞中,转染 24 h 后,寿光鸡成纤维细胞中开始出现绿色荧光,均匀分布于整个细胞内;在转染 48 h 后,细胞核内绿色荧光明显增强,而细胞质中绿色荧光较弱,说明 pEGFP-*ADSL* 融合蛋白在寿光鸡成纤维细胞均有分布,但细胞核

内较多,当表达量高时,在细胞中聚集成团块状或颗粒状。可见荧光蛋白对于外源基因 *ADSL* 的分布及定位没有明显的影响,然而在其它细胞系中 GFP 的分布可能会影响外源基因的分布,因此利用 GFP 作为报告基因分析融合蛋白产生的荧光之前,首先研究各种所需报告基因荧光蛋白在一个未知的细胞系的定位特点尤为重要^[22]。

3.4 寿光鸡成纤维细胞 pEGFP-*ADSL* 阳性细胞株的建立与重组融合蛋白检测

在阳性细胞抗性筛选的过程中,有少部分细胞虽然没有观察到荧光的表达,但在药物抗性筛选过程中一直能够存活,可能是由于细胞内存在相关的限制性内切酶类,将转入细胞内的荧光蛋白基因编码区随机切开,但抗性基因部分却没有被破坏,使其具有抗药性却不表达荧光。因此,共聚焦显微镜能观察到荧光表达,并不能证实荧光蛋白基因已经整合到细胞基因组染色体上,必须进行克隆培养。本研究中,挑取了荧光蛋白基因转染稳定表达,荧光强度高的细胞,利用有限稀释法对阳性细胞进行稀释培养,G418 抗性筛选 3~4 周,可见明显的抗性细胞集落,获得了稳定表达 pEGFP-*ADSL* 的阳性表达成纤维细胞株。RT-PCR 结果显示,在空白对照组和空载体组中均有 0.6 kb 的扩增带,且强度相似,一方面表明正常寿光鸡成纤维细胞中有 *ADSL* 基因的表达,另一方面也排除了载体对转染带来的影响;而与空载体组和空白对照组相比,重组转染组却有 *ADSL* 的过量表达,说明转染是成功的,实现了 pEGFP-*ADSL* 重组融合蛋白在成纤维细胞中的表达。Western-blot 检测结果显示,在寿光鸡成纤维细胞中表达的重组融合蛋白能特异性结合 GFP 单克隆抗体,融合蛋白在 83.5 ku 处有明显的条带,转染空载体 pEGFP-N3 的阳性对照组的 GFP 蛋白在 29 ku 处显带,空白对照组无特异条带,从蛋白质水平也证实了 pEGFP-*ADSL* 重组融合蛋白在寿光鸡成纤维细胞中的表达。

本研究获得的寿光鸡 *ADSL* 基因阳性细胞株,一方面为寿光鸡转基因动物克隆提供了重要的试验材料;另一方面对于鉴定 *ADSL* 基因是否是控制寿光鸡风味特性优良的主效基因,为实现育种理论和关键技术新突破等具有一定指导作用。

参考文献:

[1] BLACKBURN H, LEBBIE SHB, VAN DER ZIJPP

- AJ. Animal genetic resources and sustainable development[C]. 6WCGALP/FAO Symposium (Volume 28), Armidale, Australia, 1998.
- [2] 陈国宏,侯水生,吴信生,等. 中国部分地方鸡肌肉肌苷酸含量研究[J]. 畜牧兽医学报,2000,31(3):211-215.
- [3] 郭新颜,孙宝国,宋焕禄. 天然鸡肉香精的制备与评价[J]. 精细化工,2000,8:16-18.
- [4] 黄梅南,孙树侠,郭丹滨,等. 我国优质黄羽鸡风味理化特性研究(综述)[C]//中国农业科学院畜牧研究所主编,优质黄羽鸡品系选育和配套研究论文集. 北京:中国农业科技出版社,1996:198-206.
- [5] 陈继兰,赵桂苹,郑麦青,等. 快速与慢速肉鸡脂肪生长与肌苷酸含量的比较[J]. 中国家禽,2002,(8):16-18.
- [6] JAEKEN J, VAN DEN BERGHE G. An infantile autistic syndrome characterized by the presence of succinylpurines in body fluids[J]. *Lancet*, 1984, 2: 1058-1061.
- [7] CASTRO M, PETREZ-CERDA C, MERINERO B, et al. Screening for adenylosuccinate lyase deficiency: clinical, biochemical and molecular findings in four patients[J]. *Neuropediatrics*, 2002, 33(4): 186-189.
- [8] VAN DEN BERGH F, VINCENT MF, JAEKEN J, et al. Residual adenylosuccinase activities in fibroblasts of adenylosuccinate-deficient children; parallel deficiency with adenylosuccinate and succinyl-AICAR in profoundly retarded patients and non-parallel deficiency in a mildly retarded girl [J]. *J Inherit Metab Dis*, 1993, 16:415-424.
- [9] VAN DEN BERGHE G, VINCENT MF, JAEKEN J. Inborn errors of the purine nucleotide cycle; adenylosuccinate deficiency [J]. *J Inherit Metab Dis*, 1997, 20(2): 193-202.
- [10] VERGIS J M, BULLOCK K G, FLEMING K G, et al. Human 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase. A bifunctional protein requiring dimerization for transformylase activity but not for cyclohydrolase activity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(11): 7727-7733.
- [11] BULLOCK K G, BEARDSLEY G P, ANDERSON K S. The kinetic mechanism of the human bifunctional enzyme ATIC (5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase) a surprising lack of substrate channeling [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(25): 22168-22174.
- [12] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂等译. 第3版. 北京:科学出版社,2002:1128-1132.
- [13] 关伟军,马月辉,丁 鸿,等. 小尾寒羊耳组织成纤维细胞系的建立与生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(5):511-516.
- [14] FRESHNEY R I. Culture of animal cells: A manual of basic technique [M]. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 2000: 149-175.
- [15] 马月辉,周向梅,关伟军,等. 用胶原酶消化法培养德宝矮马耳缘组织成纤维细胞初探[J]. 中国农业科学,2005,38(6): 1282-1288.
- [16] 关伟军,刘长青,娜日苏,等. 6种荧光蛋白基因在蒙古羊成纤维细胞中的表达[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(11):1141-1148.
- [17] 李晶泉,袁晓东,汤敏谦. 微量RNA的cDNA PCR文库的构建[J]. 遗传,2001,23(2): 147-150.
- [18] WONG LJ, O'BRIEN WE. Characterization of the cDNA and the gene encoding murine adenylosuccinate lyase[J]. *Genomics*,1995,28(2):341-343.
- [19] MARIE S, CUPPENS H, HEUTERSPREUTE, et al. Mutation analysis in adenylosuccinate lyase deficiency: eight novel mutations in the re-evaluate full ADSL coding sequence[J]. *Human Mutation*, 1999, 13:197-202.
- [20] MARIE S, RACE V, NASSOGNE M C, et al. Mutation of a nuclear respiratory factor binding site in the 5' untranslated region of the ADSL gene in three patients with adenylosuccinate lyase deficiency [J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 71: 14-21.
- [21] STANISLAV K, HANA H, BLANKA S, et al. Human adenylosuccinate lyase (ADSL), cloning and characterization of full-length cDNA and its isoform, gene structure and molecular basis for ADSL deficiency in six patients [J]. *Human Molecular Genetics*, 2000, 10:1501-1513.
- [22] 冯 红,徐文琳,战 锐,等. pEGFP-N1质粒转染小鼠心肌细胞的分布及效率[J]. 中国应用生理学杂志,2005,21(1):112-115.