

# 人芳香族氨基酸脱羧酶基因的克隆及测序

刘 军, 邢诒刚, 梁秀龄, 陶恩祥

(中山医科大学孙逸仙纪念医院神经科, 广东 广州 510120)

**摘 要:** 【目的】用 RT-PCR 法获得人类神经元性芳香族氨基酸脱羧酶(AADC)基因全序列, 并建立优化方法。【方法】从人嗜铬细胞瘤中提取组织总 RNA, 自行设计引物, 采用两步 RT-PCR 法扩增出长约 1 550 bp 的基因片段, 凝胶回收后与高效克隆 PCR 产物的新型载体 T-载体连接, 并转化入大肠杆菌, 通过蓝白斑反应筛选出重组体, 质粒提取后进行重组体的酶切鉴定及基因测序。【结果】*Bam*HI 和 *Hin*dIII 酶切证实了目的基因同克隆载体进行了有效的连接, 基因测序证实了所克隆的片段为人 AADC 基因。【结论】本实验通过对引物, *Taq* 酶的选择及反应条件的优化, 保证了扩增的有效性和特异性。新型的克隆载体明显提高了克隆效率。基因测序证实了 AADC 基因扩增的成功。本研究为 AADC 基因治疗帕金森病等多巴胺能缺乏疾病的研究打下了基础。

关键词: 芳香族氨基酸脱羧酶/遗传学; 基因扩增; 序列分析

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)06-0436-03

## Cloning and Sequencing of Human-*l*-aromatic-amino Acid Decarboxylase Gene

LIU Jun, XING Yi-gang, LIANG Xiu-ling, TAO En-xiang

(Department of Neurology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To clone human neuronal aromatic-*l*-amino-acid decarboxylase (AADC) gene by using RT-PCR, and establish an optimal reaction condition for RT-PCR. 【Methods】Total tissue RNA was extracted from human pheochromocytoma, primers were designed by computer and amplified with a segment of 1 550 bp by two-steps RT-PCR, the products were purified and then linked with the new clone vector, the recombinants were screened by blue-white plaque test. After extraction of the recombinant plasmids, enzyme cutting reaction and gene sequencing were used to identified them. 【Results】Enzymes cut by *Bam*H I and *Hin*d III demonstrated the high efficient ligation between target gene and vector, gene sequencing confirmed the former was just the human AADC gene. 【Conclusion】Optimal primers and reaction conditions, Hi-Fi *Taq* enzyme guarantee the fidelity and specificity of the PCR. New clong vector promotes the efficiency of cloning and gene sequencing demonstrated the success of human AADC gene amplification. All these make preparation for gene therapy for Parkinson's disease and other dopaminergic deficiency diseases.

**Key words:** aromatic-*l*-amino-acid decarboxylase/genetics; gene amplification; sequence analysis

芳香族氨基酸脱羧酶 (aromatic-*l*-amino-acid decarboxylase, AADC), 广泛分布于中枢及外周组织的单胺能神经元内, 同时在肝、肾、肾上腺等非单胺能组织中亦有高水平的表达, 是脑内内源性 & 外源性多巴胺合成过程中的限速酶<sup>[1]</sup>, 在脑内主要是将左旋多巴(*l*-dopa)脱羧为多巴胺(dopamin, DA),

故又称为多巴脱羧酶。其功能障碍被认为在神经变性疾病尤其是帕金森病的发病机理中起了重要的作用<sup>[2]</sup>。补充及保持该酶在脑内水平的稳定对于改善帕金森病病人的症状及延缓帕金森病治疗过程中“症状波动”出现的时间具有重要的意义。为此, 我们通过两步法 RT-PCR 法, 克隆了人类

收稿日期: 2000-12-22

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(970072); 中山医科大学“211”工程重点学科建设资助项目(199903)

作者简介: 刘 军(1972-), 男, 安徽蚌埠人, 博士生, 梁秀龄, 中山医科大学附属第一医院神经科。

AADC 基因,为相关基因克隆提供方法学的基础,并为以后基因治疗帕金森病及其它多巴胺功能缺陷性疾病创造条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 TRIzol 提取组织总 RNA

取新鲜人嗜铬细胞瘤组织 75 mg 左右,加入 1 mL TRIzol(GIBCO BRL, Cat No. 15596)。以组织匀浆器打匀,制成组织匀浆。室温下放置 5 min,加氯仿 0.2 mL,振摇 15 s,置室温 2~3 min,4 °C 离心,12 000 g × 15 min,吸取上层水相,加入 0.5 mL 异丙醇,置室温 10 min,4 °C 离心,7 500 g × 5 min。移去上清,加 75% DEPC 处理乙醇 1 mL,振摇,充分洗涤沉淀。4 °C 离心,7 500 g × 5 min。弃上清,干燥,沉淀重悬于无 RNase 水 20 μL 中,-70 °C 保存备用。紫外分光光度计测得浓度为 3.744 g/L。琼脂糖凝胶电泳可见 28 s 和 18 s RNA 两条带,强度约为 2:1。

### 1.2 RT-PCR 法获得 AADC 基因

1.2.1 引物设计 应用引物设计软件 Primer Designer 自行设计引物。正义引物:5' ATG AAC GCA AGT GAA TTC CGA AG 3',前加酶切位点 5' CG AAGCTT (*Hind* III)。反义引物:5' CAC AGA CAG CTG AGT TCC ATG AAG 3',皆由宝生物工程(大连)有限公司合成,稀释浓度 20 μmol/L。

1.2.2 RT-PCR ①预变性:模板 RNA < 1 μg, RNasin 0.5 μL (20 units) (华美生物工程公司, Code No. 271191), Reserve Primer 2.5 μL (50 pmol), 灭菌去离子水定容至 20 μL。65 °C 于 PCR 仪上反应 15 min。②cDNA 的合成:取上述反应管于冰浴中加入下列试剂:5 × RAV-2 Buffer 4 μL, dNTP Mixture 4 μL, AMV Reserve Transcriptase XL 1 μL (5 units) (TaKaRa, Code No. 2620 CA)。42 °C 于 PCR 仪上反应 1 h, 99 °C 反应 5 min。所得产物用于下一步行 PCR 反应。③PCR 反应:反应液含 LA Taq 1 μL (5 U/μL, TaKaRa, Code No. Rr002D CAM), 10 × LA PCR Buffer II 10 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 10 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 16 μL, cDNA 5 μL, Forward Primer 3 μL, Reserve Primer 3 μL, 灭菌去离子水 52 μL。按以下步骤反应:95 °C 预变性 1 min; 94 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min, 反应 25 个循环; 72 °C 延伸 7 min,

取 5 μL 行琼脂糖(0.8%)电泳检验扩增结果。

### 1.3 AADC 基因重组体的构建及筛选

运用胶回收试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit, Code No. 28704),按说明回收并纯化 RT-PCR 产物。紫外分光光度仪下测定产物浓度得 0.014 4 g/L。pMD 18-T Vector 0.5 μL (0.015 pmol, TaKaRa Code No. D504 CA), AADC 4.5 μL (0.064 8 pmol), Ligation Solution I 5 μL, 16 °C 水浴反应 1 h。连接产物全量转化感受态细菌(JM 109)100 μL,冰浴 30 min,42 °C 90 s,加入普通 LB 培养基 500 μL,37 °C 摇床,100~150 r/min,45 min,取 250 μL 菌液涂布于预先以 X-Gel 40 μL 和 IPTG 4 μL 均匀涂布的含氨苄青霉素的 LB 培养板中,37 °C 培养箱内培养 20 min,倒置平板继续于 37 °C 培养箱内培养 12 h,挑取白色菌落置 5 mL LB 液体培养液中,37 °C 摇床,100~150 r/min,8~12 h。以质粒提取试剂盒(QIAGEN Plasmid Mini Kit, Code No. 12123),按说明提取质粒,限制性内切酶分析及基因测序。

## 2 结果

### 2.1 酶切鉴定

当 AADC 基因以顺方向连接置 pMD 18-T Vector,以 *Bam*HI 酶切则可切出约 400 bp 和 3 850 bp 的两个片段,以 *Hind*III 酶切则可切出 1 550 bp 和 2 700 bp 两个片段(图 1)。通过筛选选出顺方向连接的质粒。



图 1 AADC 基因重组体限制性酶切图谱分析

Fig. 1 Restrictive enzymes digestion of AADC gene recombinants

Lane 1: Recombinating plasmids of AADC gene; Lane 2: RT-PCR product of AADC mRNA; Lane 3: Recombinants digested by *Hind* III; Lane 4: Recombinants digested by *Bam*HI; Lane 5: Marker λ-Eco T 14 digest DNA

## 2.2 基因测序

由宝生物工程(大连)有限公司采用 BAI PRISM<sup>TM</sup> 377XL DNA Sequencer 测序仪进行双向测序,共进行 3 个反应。结果同基因文库中 Ichinose 所报道的序列<sup>[3]</sup>一致,包含了从起始密码子到终止密码子的全长为 1 550 bp 的 AADC cDNA。

## 3 讨论

### 3.1 克隆 AADC 基因的意义

芳香族氨基酸脱羧酶(aromatic-*l*-amino-acid decarboxylase, AADC)最先是在 1938 年从哺乳类动物的肾脏中提取到的,Sumi-Ichinose<sup>[4]</sup>于 1992 年成功证实了在人体及其他哺乳动物中仅存在唯一的一种 AADC 蛋白质,而且是由单个基因所编码的。但 AADC mRNA 却存在两种类型,目前已证实是分别由外显子 1 和外显子 2 通过与外显子 3 上特异性结合位点形成的不同的拼接所致,这两种不同的 mRNA 分别在神经组织及非神经组织中表达<sup>[5]</sup>。该酶在脑内可分别将 *l*-dopa 和左旋 5-羟色胺酸(*l*-5-hydroxytryptophan, *l*-5HTP)脱羧为多巴胺(dopamin, DA)和 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)。进一步的研究发现多数芳香族氨基酸及它们的  $\alpha$ -甲基衍生物皆可被 AADC 脱羧,如 *l*-苯丙氨酸可被脱羧为 2-苯乙胺,*l*-酪氨酸可被脱羧为 *p*-酪胺,*l*-色氨酸可被脱羧为色胺,这些产物皆可作为中枢神经递质的内源性调节因子在脑内起作用<sup>[6]</sup>。

目前的研究认为 AADC 在神经退行性疾病(如帕金森病)及精神疾病(如精神分裂症<sup>[7]</sup>)的发病以及药物(如可卡因)滥用所引起的副作用<sup>[8]</sup>中起了重要的作用。尤其是在帕金森病(Parkinson's disease, PD)中,由于黑质纹状体通路中的多巴胺能神经元变性,导致 PD 病人的脑中 AADC 的活性较正常人脑明显降低,如在尾状核头部 PD 病人的 AADC 活性较正常对照降低达 63% 以上<sup>[9]</sup>。因此,对于 PD 病人补充 AADC 以提高 *l*-dopa 转变为 DA 的效率,从而改善临床症状,则显得极为重要<sup>[10]</sup>。研究进一步表明,在使用 *l*-dopa 治疗帕金森病的过程中,由于外源性的补充左旋多巴,导致体内 DA 合成增加,从而增加了对 DA 受体的不断刺激,可启动 cAMP 依赖性蛋白激酶 A 及多种机制对 AADC 酶活性的调节,引起 AADC 酶活性的下降,AADC 酶活性的改变可引起其对于 *l*-dopa 调

节能能力的波动,故在长期 *l*-dopa 的治疗中,病人常常出现“症状波动”<sup>[11]</sup>。因此,补充外源性的 AADC 对于保持 AADC 酶活性于稳态水平,延迟病人出现“症状波动”的时间,减低“症状波动”的程度,亦具有积极的意义。AADC 基因的克隆在国内尚未见报道,对 AADC 基因的成功克隆将有利于进一步研究其在神经组织中的表达及调控机制,并为帕金森病及其它多巴胺功能缺乏性疾病的基因治疗打下基础。

### 3.2 本研究的特点与可靠性

本试验取材于新鲜人嗜铬细胞瘤组织,嗜铬细胞瘤属于儿茶酚胺能细胞,含有丰富的 AADC,且其所表达的 AADC 是由神经元性外显子所操纵的<sup>[12]</sup>,故从该组织中获得 AADC 基因,大大方便了取材,同时又可保证其今后在神经元中的表达。

由于扩增片段较长,且 G+C 含量较高,约占 51%,因此在引物设计上适当的增加了引物片的长度,且两个引物的 T<sub>m</sub> 值接近,这有助于提高反应的稳定性及扩增的特异性。同时由于采用了“高保真”的长链 Taq 酶(LA Taq),该酶具有 3'-5' 核酸外切酶活性,在通常的 PCR 条件下,同普通 Taq 酶相比,扩增效率明显提高且错配率极低,从而进一步保证了 PCR 扩增反应中的特异度和忠实度。在 cDNA 的合成及 PCR 扩增中亦分别采用了不同条件的预变性,这对于扩增 G+C 含量较高的片段可取得良好的效果。

在 PCR 产物克隆方面选择了新型的克隆载体 pMD 18-T 载体,该载体为一种新型高效的线性克隆载体,它利用耐热性 Taq 酶反应时有在 PCR 产物的 3' 末端添加一个“A”的特性,在该载体两端添加了“T”,从而提高了连接效率,且连接时间大大缩短,只需 1 h,该载体的应用大大方便了测序。基因测序证实了所扩增的片段同基因文库中的报道相一致,充分证明了上述方法的有效性和正确性。这将为其他相关基因的克隆提供方法学的依据。

### 参考文献:

- [1] Berry M D, Juorio A V, Li X M, et al. Aromatic-*l*-amino-acid decarboxylase; a neglected and misunderstood enzyme [J]. Neurochem Res 1996, 21(9): 1075.
- [2] Ishikawa T, Dhawan V, Chaly T, et al. Clinical significance of striatal DOPA decarboxylase activity in Parkinson's disease [J]. J Neurol Med, 1996, 37(2): 216.

(下转第 450 页)

象,这与正常眼压相一致。两组角膜内皮细胞均排列整齐,角膜实质层无水肿,未见角膜损伤现象。这说明 2.5 g/L 胰蛋白酶对眼组织无明显毒副作用,应用 2.5 g/L 胰蛋白酶清除晶状体上皮细胞预防后囊混浊是安全可靠的,但临床应用尚须进一步的临床研究。

此类研究国外仅有 Nishi 等作过尝试性实验,且并没有成熟的方法在临床上应用<sup>[10, 11]</sup>。本实验旨在通过研究酶类对上皮细胞的清除作用,探索出成熟的临床应用方法,从根本上解决后囊混浊的问题,在临床上有非常广阔的应用前景。

(本文图 1, 图 2 见插页 3)

#### 参考文献:

- [1] Odlich M G, Hall S J, Worgul S L, *et al.* Posterior capsule opacification: experimental analysis [J]. *Ophthalmic Res*, 1985, 17(2): 75.
- [2] Spalton D J. Posterior capsular opacification after cataract surgery [J]. *Eye*, 1999, 13(3): 489.
- [3] Apple D J, Solomon K D, Tetz M R, *et al.* Posterior capsule opacification [J]. *Surv Ophthalmol*, 1992, 37(2): 73.
- [4] Duncan G, Wormstone I M, Liu C S, *et al.* Thapsigargin coated intraocular lenses inhibit human lens cell growth [J]. *Nat Med*, 1997, 3(9): 1026.
- [5] Tarsio J F, Kelleher P J, Tarsio M, *et al.* Inhibition of cell proliferation on lens capsules by 4197X-ricin A immunconjugate [J]. *J Cataract Refract Surg*, 1997, 23(2): 260.
- [6] Power W J, Neylan D, Collum L M. Daunomycin as an inhibitor of human lens epithelial cell proliferation in culture [J]. *J Cataract Refract Surg*, 1994, 20(3): 287.
- [7] 王翔, 李家臣, 马凤莲, 等. 应用肝素灌注预防后囊混浊的实验研究 [J]. *眼科研究*, 1999, 17(5): 341.
- [8] 吴明星, 利华明, 李绍珍, 等. 骆驼蓬总碱及其脂质体对兔晶状体上皮细胞的抑制作用 [J]. *眼科研究*, 1999, 17(4): 275.
- [9] 吴明星, 利华明, 李绍珍. 柔毛霉素、骆驼蓬总碱防治兔后发性白内障的实验研究 [J]. *中国实用眼科杂志*, 1999, 17(4): 204.
- [10] Nishi O, Nishi K, Hikida M. Removal of lens epithelial cells by dispersion with enzymatic treatment followed by aspiration [J]. *Ophthalmic Surg*, 1991, 22(8): 444.
- [11] Nishi O, Nishi K, Hikida M. Removal of lens epithelial cells following loosening of the junctional complex [J]. *J Cataract Refract Surg*, 1993, 19(1): 56.

(编辑 刘清海)

(上接第 438 页)

- [3] Ichinose H, Kurosawa Y, Titani K, *et al.* Isolation and characterization of a cDNA clone encoding human aromatic *L*-amino acid decarboxylase [J]. *Biophys Res Commun*, 1989, 164(3): 1024.
- [4] Sumi-Ichinose C, Ichinose H, Takahashi E, *et al.* Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the gene for human aromatic *L*-amino acid decarboxylase, the catecholamine and serotonin synthesis [J]. *Biochem*, 1992, 31(8): 2229.
- [5] Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Ohye T, *et al.* Tissue-specific alternative splicing of the first exon generates two types of mRNAs in human aromatic *L*-amino acid decarboxylase [J]. *Biochem*, 1992, 31(46): 11546.
- [6] Paterson IA, Juorio AV, Boulton AA. 2-Phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the central nervous system? [J]. *J Neurochem*, 1990, 55(3): 1827.
- [7] Speight G, Turic D, Austin J, *et al.* Comparative sequencing and association studies of aromatic *L*-amino acid decarboxylase in schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Mol Psychiatry* 2000, 5(3): 327.
- [8] Koob G F, Bloom F E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence [J]. *Science*, 1988, 242(4879): 715.
- [9] Kuwabara H, Cumming P, Yasuhara Y, *et al.* Regional striatal DOPA transport and decarboxylase activity in Parkinson's disease [J]. *J Nucl Med*, 1995, 36(7): 1226.
- [10] Imaoka T, Date I, Ohmoto T, *et al.* Significant behavioral recovery in Parkinson's disease model by direct intracerebral gene transfer using continuous injection of a plasmid DNA-liposome complex [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(7): 1093.
- [11] Fisher A, Starr MS. Opposite effects of glutamate antagonists and antiparkinsonian drugs on the activities of DOPA decarboxylase and 5-HTP decarboxylase in the rat brain [J]. *Brain Res* 2000, 868(2): 268.
- [12] Jahng JW, Wessel TC, Houpt TA, *et al.* Alternate promoters in the rat aromatic *L*-amino acid decarboxylase gene for neuronal and nonneuronal expression: an in situ hybridization study [J]. *J Neurochem*, 1996, 66(1): 14.

(编辑 刘清海)