

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00884

肾上腺脑白质营养不良蛋白慢病毒载体的构建和表达

张 林,富显果,林宇翔,兰风华,王志红*

厦门大学附属东方医院(南京军区福州总医院)实验科,福州 350025

[摘要] **目的** 构建并表达野生型及突变型肾上腺脑白质营养不良蛋白(adrenoleukodystrophy protein, ALDP)的慢病毒载体,探讨 *ABCD1* 基因突变对 ALDP 结构和功能的影响。**方法** 选择 *ABCD1* 基因的 H283R 和 P534R 两个突变,首先采用生物信息学方法,进行突变致病性及突变体结构稳定性预测;再利用分子克隆技术,将 *ABCD1* 基因克隆到 pLEX-MCS 慢病毒载体,构建野生型慢病毒载体;pLEX-*ABCD1*,定点诱变构建 2 个突变型重组载体;pLEX-*ABCD1*-H283R 和 pLEX-*ABCD1*-P534R,并与其他包装载体共转染 293T 细胞包装病毒。收集病毒并感染宿主细胞,RT-PCR 检测慢病毒感染细胞中野生型与突变型 *ABCD1* mRNA 表达,免疫荧光及蛋白质免疫印迹法分析野生型与突变型 ALDP 亚细胞定位及表达。**结果** 生物信息学预测显示 H283R 和 P534R 为 ALD 致病性突变;RT-PCR 结果显示慢病毒感染细胞中野生型与突变型 *ABCD1* mRNA 均过表达;免疫荧光及蛋白质免疫印迹结果表明,H283R 和 P534R 突变可能导致 ALDP 突变体表达量下降,但未观察到 ALDP 定位改变。**结论** 成功构建 *ABCD1* 基因慢病毒表达载体,并评估了 H283R 和 P534R 突变对 ALDP 表达及亚细胞定位的影响,为深入研究 ALD 发病机制提供了实验依据。

[关键词] *ABCD1* 基因;肾上腺脑白质营养不良蛋白;计算生物学;慢病毒属**[中图分类号]** R 349.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)07-0884-08

Construction and expression of lentiviral vector containing adrenoleukodystrophy gene

ZHANG Lin, FU Xian-guo, LIN Yu-xiang, LAN Feng-hua, WANG Zhi-hong*

Department of Experimental Medicine, Affiliated Dongfang Hospital, Xiamen University (Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command), Fuzhou 350025, Fujian, China

[Abstract] **Objective** To construct a lentiviral vector carrying the wild-type and mutant adrenoleukodystrophy gene (*ABCD1*) and to investigate the effects of *ABCD1* mutation on the structure and function of adrenoleukodystrophy protein (ALDP). **Methods** Different computational algorithms were used to predict the pathogenicity and the structural stability of ALDP mutants: H283R and P534R. Lentiviral vectors carrying wild type and mutants *ABCD1* gene were constructed with pLEX-MCS, namely, pLEX-*ABCD1*, pLEX-*ABCD1*-H283R and pLEX-*ABCD1*-P534R. The recombinant plasmids and two packaging vectors were co-transfected into 293T cells to obtain virus, and the latter was used to infect host cells. The expression of the wild type and mutant *ABCD1* mRNA in lentivirus infected cells was detected by RT-PCR. The subcellular localization and expression of the wild type and mutant ALDP were detected by immunofluorescence and Western blotting analysis. **Results** Bioinformatic prediction results showed that both mutations in this study were at conserved codons, suggesting a pathogenic nature. Overexpression of the wild type and mutant *ABCD1* mRNA was detected by RT-PCR in lentivirus infected cells. Immunofluorescence study and Western blotting analysis showed overexpression of the wild type ALDP and lower expression of the mutant ALDP, with no subcellular mislocalization of the mutant ALDP detected. **Conclusion** We have successfully constructed a recombinant lentiviral vector carrying the *ABCD1* gene and assessed the effects of the *ABCD1* mutations on the expression and localization of ALDP, providing evidence for understanding the pathogenic mechanism of ALD.

[收稿日期] 2013-12-09 **[接受日期]** 2014-06-03**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(31200932),福建省自然科学基金青年创新项目(2012J05158). Supported by National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (31200932) and the Natural Science Foundation for Young Scientists of Fujian Province (2012J05158).**[作者简介]** 张 林,硕士.现工作于三峡大学人民医院(宜昌市第一人民医院)检验科. E-mail: linleesa@foxmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0591-22859103, E-mail: xiaonvwan@163.com

[Key words] ABCD1 gene; adrenoleukodystrophy protein; computational biology; lentivirus

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(8): 884-891]

肾上腺脑白质营养不良(adrenoleukodystrophy, ALD)是一种最常见的过氧化物酶体病,呈X连锁遗传。该疾病基因——*ABCD1*基因定位于Xq28,编码的蛋白质称为肾上腺脑白质营养不良蛋白(adrenoleukodystrophy protein, ALDP)。*ABCD1*基因突变引起ALDP结构改变或功能缺陷,使患者体内极长链饱和脂肪酸(very long chain fatty acids, VLCFAs)不能进入过氧化物酶体进行 β -氧化,从而在不同组织和体液中蓄积,引起神经系统脱髓鞘和肾上腺皮质功能减退等病理改变^[1-2]。本研究通过构建野生型及突变型*ABCD1*基因的重组慢病毒,并检测ALDP在慢病毒感染宿主细胞中的表达及亚细胞定位,为探讨*ABCD1*基因突变对ALDP结构和功能的影响以及寻求基因治疗策略奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 慢病毒载体质粒 pLEX-MCS、包装质粒 pMD2.G、psPAX2 由福州总医院泌尿外科实验室王水良博士赠送;大肠杆菌 DH5 α 、XL1-Blue 和 293A 及 293T 细胞为本实验室保存;限制性核酸内切酶 (*Not* I、*Mlu* I、*Dpn* I) 购自 NEB 公司;聚乙烯亚胺(PEI)购自上海源叶生物科技有限公司;质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;小鼠抗人 ALDP 单克隆抗体购自 Chemicon 公司;兔抗人过氧化氢酶多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;FITC 标记山羊抗小鼠 IgG、TRITC 标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。引物合成、测序均由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2 突变序列的生物信息学分析 采用 ClustalW2 进行 ALDP 物种间同源基因多序列比对;采用 PhD-SNP^[3]、PolyPhen^[4]、SIFT^[5] 等不同算法预测 ALDP 氨基酸改变与疾病的关系;采用 Eris^[6]、I-Mutant^[7]、PoPMuSiC^[8] 等不同算法预测 ALDP 氨基酸改变对蛋白质结构稳定性的影响。

1.3 PCR 获取目的基因片段 使用正常人 *ABCD1*

cDNA 为模板,设计一对引物,其引物序列为:上游 (P201): 5'-ATT TGC GGC CGC ATG CCG GTG CTC TCC AGG CCC CGG-3', 划线处为 *Not* I (GC \downarrow GGCCGC) 酶切识别位点;下游 (P202): 5'-CGA CGC GTT CAG GTG GAG GCA CCC TGG AGG CCA CC-3', 划线处为 *Mlu* I (A \downarrow CGCGT) 酶切识别位点。PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

1.4 野生型重组质粒 pLEX-*ABCD1* 的构建 *Not* I、*Mlu* I 双酶切载体质粒 pLEX-MCS 及目的基因 PCR 产物, 琼脂糖凝胶电泳回收纯化目的片段。T4 DNA 连接酶作用下将双酶切后的 *ABCD1* 基因片段与载体质粒 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。CaCl₂ 法转化感受态 DH5 α 菌, 涂布含氨苄青霉素的 LB 选择平板, 37 $^{\circ}$ C 孵箱过夜。次日随机挑取阳性菌落继续扩增, 小量抽提质粒。抽提的质粒一部分经 *Not* I、*Mlu* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测; 一部分送上海生工生物工程技术有限公司进行测序鉴定。

1.5 突变型重组质粒的构建 合成定点诱变引物, 序列: H283R 上游 5'-AAG GGG GAG TAC ATG CGC TCG CGT GTG GTG GCC-3', 下游 5'-GGC CAC CAC ACG CGA GCG CAT GTA CTC CCC CTT-3'; P534R 上游 5'-GGT GTG CTC TAC AAG CGC CCA CCC CAG CGC ATG-3', 下游 5'-CAT GCG CTG GGG TGG GCG CTT GTA GAG CAC ACC-3', 划线处为诱变的碱基。以已经测序证实 *ABCD1* 基因编码区序列完全正确的重组质粒为模板, 加入诱变引物, PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 20 s, 70 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 11 min, 共 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增重组质粒全长, 分别命名为 pLEX-*ABCD1*-H283R 和 pLEX-*ABCD1*-P534R。用 *Dpn* I 内切酶除去野生型的重组质粒模板。重组突变体转化使用 XL1-Blue 感受态细胞, 突变型重组质粒的鉴定方法同野生型重组质粒。

1.6 重组慢病毒包装及病毒液收集 将 pLEX-*ABCD1*、pLEX-*ABCD1*-H283R、pLEX-*ABCD1*-

P534R 和 pLEX-MCS 质粒分别与 pMD2. G、ps-PAX2 质粒混合,PEI 法转染 293T 细胞。转染 48、72 和 96 h 后分别收获含病毒的上清:将培养液移至无菌离心管中,1 500 r/min 离心 5 min,沉淀细胞碎片,再用孔径为 0.45 μm 的一次性细胞滤器过滤去除所有的细胞及碎片,收集慢病毒上清液。

1.7 病毒感染宿主细胞及 RT-PCR 检测 ABCD1 mRNA 表达病毒感染 293A 细胞 48 h,实验共分 5 组:pLEX-ABCD1 野生型组、pLEX-ABCD1-H283R 突变型组、pLEX-ABCD1-P534R 突变型组、pLEX-MCS 空载体组及空白未感染组。将病毒液加入 DMEM 高糖培养液中,制备的混合液直接加入含 293A 细胞的培养板中。用 TRIzol 法提取未感染和慢病毒感染细胞的总 RNA,反转录成 cDNA。ABCD1 RT-PCR 引物序列:上游 5'-ACT GGC CCT GTC GTT CCG-3';下游:5'-GTT GCG GGC AAT AGT GAA G-3';内参照 GAPDH 引物序列:上游 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT -3',下游 5'-TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG-3'。按照 TaKaRa 公司试剂盒说明进行实时荧光定量 PCR,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算基因相对表达。

1.8 免疫荧光及蛋白质免疫印迹检测目的蛋白表达 免疫荧光观察 ALDP 亚细胞定位:病毒感染 48 h 的细胞通过洗涤、固定、通透、封闭后,加入兔抗人过氧化氢酶多克隆抗体(1:200)和小鼠抗人 ALDP 单克隆抗体(1:2 000),室温反应 3 h,洗涤后再加入羊抗兔 IgG-TRITC(1:500)和羊抗鼠 IgG-FITC(1:100)二抗,37℃ 避光孵育 1 h,激光共聚焦显微镜观察目的蛋白表达。

蛋白质免疫印迹检测 ALDP 的表达:用含 1% PMFS 的蛋白裂解液提取 5 组病毒感染细胞的总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天 p0012)测定蛋白浓度。从不同样品中取出等量蛋白与 5×SDS 蛋白上样缓冲液混合,并于 100℃ 变性 30 min 后,各取 20 μL 进行 10% SDS-PAGE。将蛋白转移至 PVDF 膜上,封闭后加入抗 β-actin 抗体(1:1 000)、小鼠抗 ALDP 单克隆抗体(1:2 000)与相应的膜共同孵育,洗膜。加入二抗,显色、曝光、显影定影。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 15 统计软件进行分

析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。检验水准(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 突变序列的生物信息学分析 选择单细胞生物到多细胞生物、低等脊椎动物,再到高等哺乳动物中的几种进化代表性生物,包括酵母、蠕虫、果蝇、斑马鱼、狗、牛、褐鼠、小鼠、人,将 ALDP 序列进行不同物种间蛋白序列比对,结果发现第 283 位及第 534 位(图 1)氨基酸残基在进化上绝对保守。通过 PhD-SNP、PolyPhen、SIFT 国际认可的 3 种不同算法预测 ALDP 氨基酸改变与疾病的关系,结果均提示 H283R、P534R 为致病性突变(表 1)。采用 Eris、I-Mutant 和 PoPMuSiC 国际认可的 3 种不同算法预测 ALDP 氨基酸残基改变对蛋白质结构稳定性的影响,Eris 和 I-Mutant 两种算法结果提示 H283R 突变导致蛋白质结构稳定性降低;I-Mutant 和 PoPMuSiC 两种算法结果提示 P534R 突变导致蛋白质结构稳定性降低(表 2)。综合以上结果,根据“陪审团”原则,认为突变 H283R 和 P534R 会降低 ALDP 结构的稳定性。

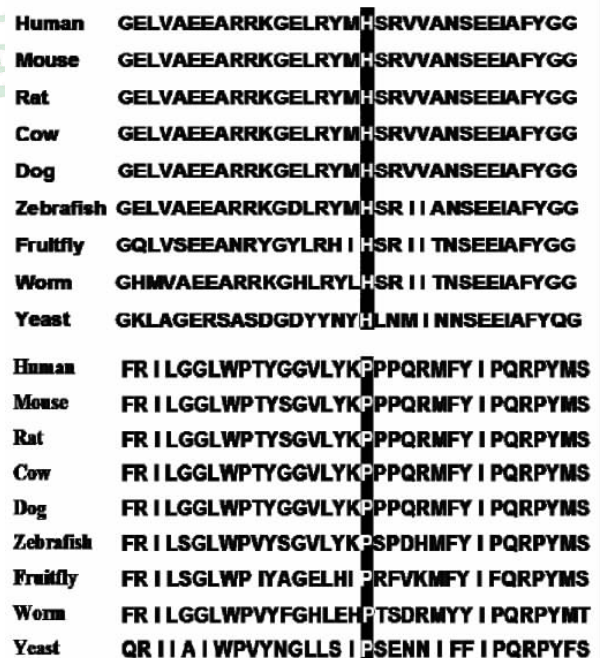


图 1 不同物种间 ALDP 序列比对

Fig 1 Ortholog alignment of adrenoleukodystrophy protein (ALDP) in different species

表 1 ALDP 突变序列致病性预测

Tab 1 Pathogenicity prediction of adrenoleukodystrophy protein (ALDP) mutants

nsSNP	PhD-SNP		PolyPhen	SIFT	
	Prediction	Reliability index	Prediction	Prediction	Score
H283R	Disease	6	Probably damaging	Affect function	0.00
P534R	Disease	6	Probably damaging	Affect function	0.00

nsSNP: Non-synonymous coding single nucleotide polymorphism

表 2 ALDP 突变体结构稳定性预测

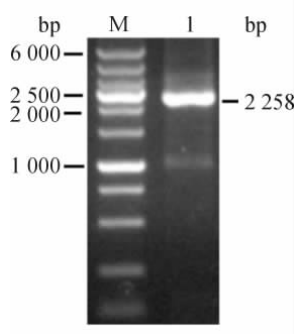
Tab 2 Stability prediction of adrenoleukodystrophy protein (ALDP) mutants

nsSNP	Eris		I-Mutant		PoPMuSiC	
	Status	$\Delta\Delta G$ (kJ · mol ⁻¹)	Status	$\Delta\Delta G$ (kJ · mol ⁻¹)	Status	$\Delta\Delta G$ (kJ · mol ⁻¹)
H283R	Destabilizing	4.35	Decrease	-1.09	Stabilizing	-5.02
P534R	Stabilizing	-7.03	Decrease	-4.64	Destabilizing	1.88

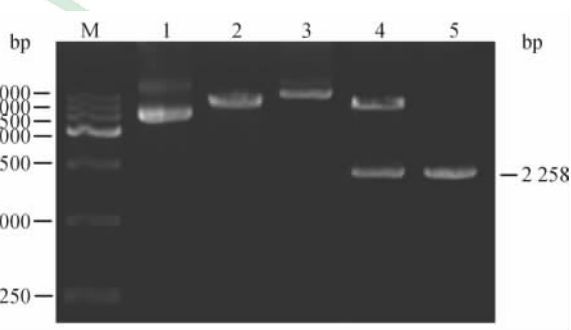
nsSNP: Non-synonymous coding single nucleotide polymorphism; $\Delta\Delta G$: Gibbs free energy

2.2 野生型重组载体的构建及鉴定 ABCD1 基因

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 2 000 ~ 2 500 bp 之间出现一条特异性区带, 与预期大小 (2 258 bp) 相符 (图 2)。重组质粒经 *Not* I 和 *Mlu* I 双酶切后, 产生两条带, 一条位于 10 000 ~ 15 000 bp 之间, 与空载体酶切后片段大小 (10 657 bp) 相符, 另一条位于 2 500 bp 附近, 与目的片段大小 (2 258 bp) 相符, 提示重组质粒含有目的基因 *ABCD1* 基因编码区全长, 空质粒则未见此条带 (图 3)。登录 GenBank 下载人 *ABCD1* 基因 cDNA (Z21876) 序列, 与 pLEX-*ABCD1* 测序结果进行比对, 可知插入片段读框和方向正确, 且酶切位点正确, 提示野生型重组载体构建成功。

图 2 *ABCD1* cDNA 的 PCR 产物电泳图Fig 2 PCR identification result of *ABCD1* cDNA

M: DNA marker; 1: PCR product of *ABCD1* gene

图 3 野生型重组质粒的 *Not* I / *Mlu* I 酶切鉴定Fig 3 Restrictive digestion of pLEX-*ABCD1* with *Not* I and *Mlu* I

M: DNA marker; 1, 2: pLEX-MCS before and after digestion, respectively; 3, 4: pLEX-*ABCD1* before and after digestion, respectively; 5: PCR product of *ABCD1*

2.3 突变型重组质粒的鉴定 人工诱变的两个 PCR 产物电泳后, 各出现一条特异性区带, 位于 10 000 ~ 15 000 bp 之间, 与预期的目的片段大小 (12 909 bp) 相符 (图 4)。突变型质粒分别命名为 pLEX-*ABCD1*-H283R 和 pLEX-*ABCD1*-P534R。测序结果与人 *ABCD1* 基因 cDNA 序列经 DNA-MEN 软件比对, 可知插入片段方向和读框正确, H283R (CAC > CGC) 和 P534R (CCC > CGC) 诱变成功, 且从 *ABCD1* 基因起始密码子到终止密码子之间未见其他突变 (图 5)。

2.4 RT-PCR 检测 *ABCD1* mRNA 表达 慢病毒感染 293A 细胞 48 h 后提取总 RNA, 经反转录成

cDNA 后,RT-PCR 检测 *ABCD1* mRNA 表达。如图 6 所示,野生型(pLEX-*ABCD1*)及突变型(pLEX-*ABCD1*-H283R、pLEX-*ABCD1*-P534R)重组慢病毒感染组的 *ABCD1* mRNA 表达水平高于空载体感染组(pLEX-MCS)和未感染组,表明转录水平野生型及突变型 *ABCD1* 过表达成功。

2.5 免疫荧光双标记分析 激光共聚焦显微镜观察病毒感染后 293A 细胞中 ALDP 表达情况及其在细胞中的定位,其中 ALDP 为绿色荧光标记,过氧化氢酶为红色荧光标记。结果发现,*ABCD1* 野生型重组慢病毒感染的细胞中绿色荧光最强(图 7A),提示野生型 ALDP 过表达;两组突变型重组慢病毒感染的细胞中绿色荧光明显减弱(图 7B、7C);空载体组与未感染组亦有细胞内源性 ALDP 表达(图 7D、7E)。定位观察发现,各组细胞中的 ALDP 绿色荧

光均呈点状分布在胞质中,与过氧化氢酶红色荧光位置基本重合,可重叠呈黄色荧光(图 8)。

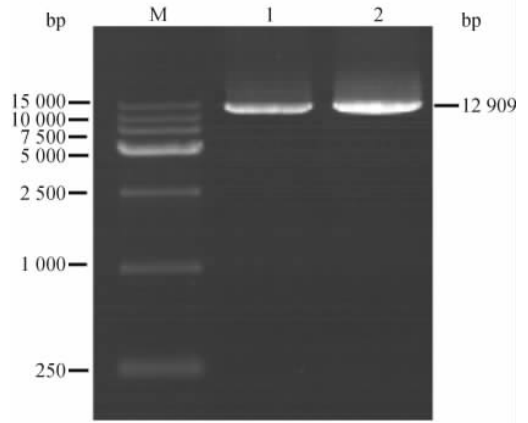


图 4 人工诱导突变体的 PCR 产物电泳图

Fig 4 PCR identification result of induced mutants

M:DNA marker; 1: pLEX-*ABCD1*-H283R; 2: pLEX-*ABCD1*-P534R

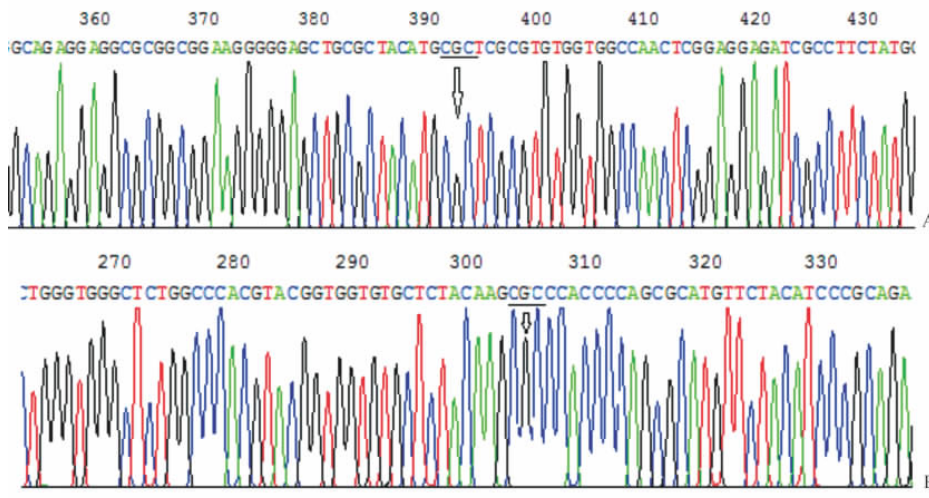


图 5 突变型重组质粒部分测序结果

Fig 5 Sequencing result of the mutated recombinant plasmids

A: pLEX-*ABCD1*-H283R(CAC>CGC); B: pLEX-*ABCD1*-P534R(CCC>CGC). The position of mutated codon is underlined and the arrows indicate the mutated bases

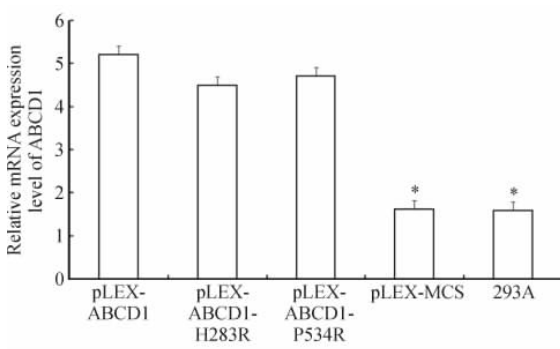


图 6 RT-PCR 检测慢病毒感染 293A 细胞 *ABCD1* mRNA 表达
Fig 6 RT-PCR analysis of *ABCD1* mRNA expression in lentivirus infected 293A cells

* $P < 0.05$ vs other 3 groups. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.6 蛋白质免疫印迹分析 如图 9 所示,野生型或突变型重组慢病毒感染 293A 细胞后进行蛋白质免疫印迹分析,结果可见:野生型 *ABCD1* 过表达慢病毒组的印迹条带最明显,说明构建的野生型 *ABCD1* 慢病毒载体可高效表达 ALDP,而突变型(pLEX-*ABCD1*-H283R、pLEX-*ABCD1*-P534R)重组慢病毒感染组 ALDP 表达量明显低于野生型组;空载体感染组(pLEX-MCS)及未感染组亦有细胞内源性 ALDP 表达,且条带亮度与突变型组无

明显差异。

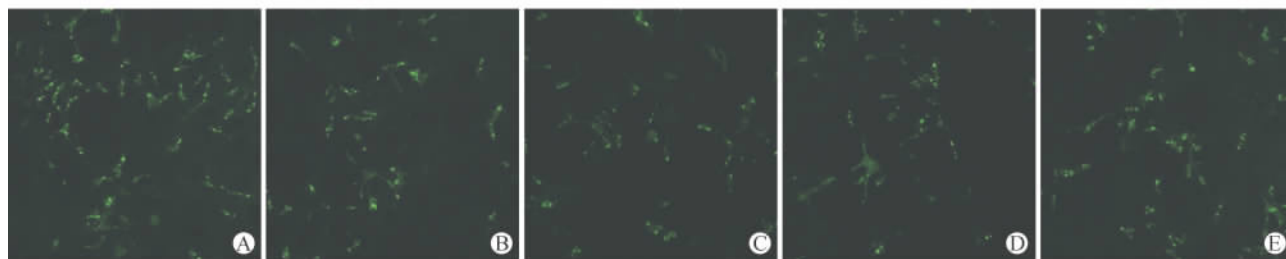


图 7 免疫荧光法检测 ALDP 在慢病毒感染 293A 细胞中的表达

Fig 7 Immunofluorescent analysis of ALDP expression in lentivirus infected 293A cells

ALDP: Adrenoleukodystrophy protein. A: pLEX-ABCD1; B: pLEX-ABCD1-H283R; C: pLEX-ABCD1-P534R; D: pLEX-MCS; E: 293A. Original magnification: $\times 200$

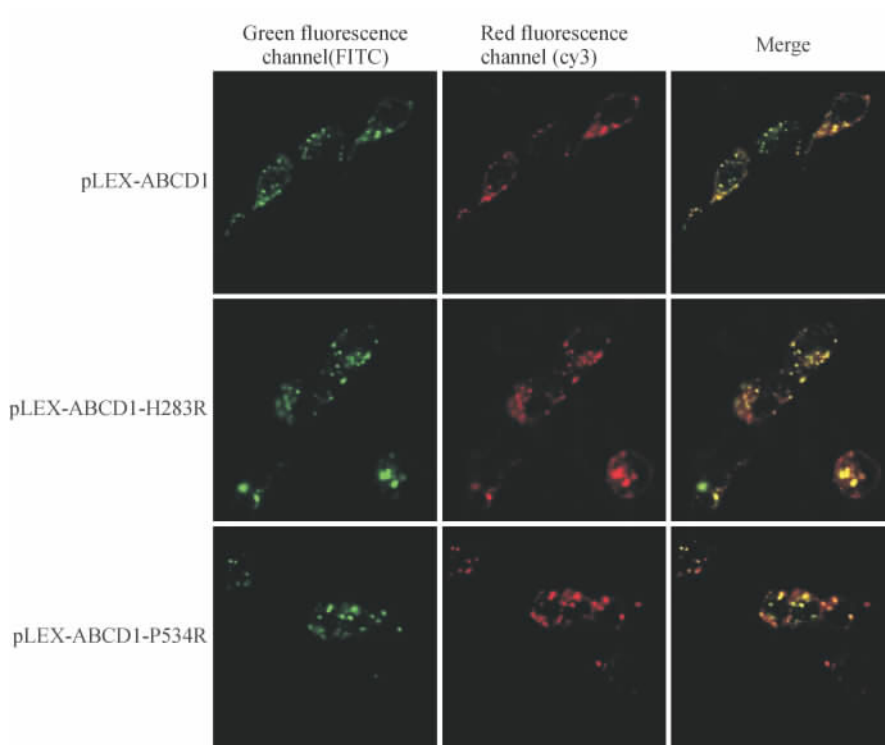


图 8 蛋白质免疫荧光法检测 ALDP 在慢病毒感染 293A 细胞中的表达与亚细胞定位

Fig 8 Immunofluorescent analysis of expression and subcellular localization of ALDP in lentivirus infected 293A cells

ALDP: Adrenoleukodystrophy protein. Original magnification: $\times 400$

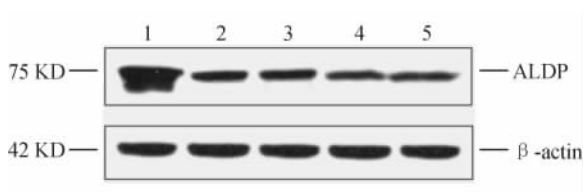


图 9 蛋白质免疫印迹法分析 ALDP 在慢病毒感染 293A 细胞中的表达

Fig 9 Western blotting analysis of ALDP expression in lentivirus infected 293A cells

ALDP: Adrenoleukodystrophy protein. 1: pLEX-ABCD1; 2: pLEX-ABCD1-H283R; 3: pLEX-ABCD1-P534R; 4: pLEX-

MCS; 5: Non-infected

3 讨论

人 ALDP 属于 ATP 结合盒(ABC)转运蛋白 D 亚类 1 号成员(ATP-binding cassette sub-family D member 1, ABCD1),是一种过氧化物酶体膜蛋白。ALDP 具备两个核心结构域:1 个位于 N 端的跨膜结构域(transmembrane domain, TMD),包含配体结合位点;1 个位于 C 端的核苷酸结合结构域(nucleotide binding domain, NBD),通过结合和水解

ATP为转运 VLCFAs 提供能量。ALDP 首先在游离的多聚核糖体上合成后运送到过氧化物酶体,然后在过氧化物酶体膜上组装成二聚体,负责将胞质中 VLCFAs 或其衍生物转运到过氧化物酶体内,并在其中进行 β -氧化。TMD 参与 ALDP 的定位^[9],还对稳定 ALDP 同源二聚体具有重要的作用^[10],并含有底物结合位点^[11],该区域的突变可能会影响 ALDP 定位、二聚体的稳定性或底物的结合与转运;NBD 的 ATP 结合区在 VLCFAs 的转运过程中起着重要作用,该结构域具有 ATP 酶活性,通过结合和水解 ATP 为转运提供能量,NBD 保守氨基酸的突变可能引起 ATP 酶活性的降低或丧失^[12-13]。

根据数据库(*www.x-ald.nl*)及文献报道,ABCD1 基因突变对 ALDP 的影响主要表现为:70% 以上的 ABCD1 基因突变导致患者细胞内的 ALDP 被蛋白酶体降解而无法检测到;另有部分突变尽管不影响 ALDP 表达量,但 ALDP 突变体却无法结合或水解 ATP^[13];部分 ALDP 突变体无法正确定位至过氧化物酶体膜上^[9];还有部分 ALDP 突变体可以到达过氧化物酶体膜上,但不能与配体结合,或无法实现二聚体化^[14-15],从而无法发挥其正常的转运功能。

本研究选择课题组发现的国际首报新突变 H283R 与 P534R,H283R 位于 TMD 跨膜 α 螺旋 4 和 5 连结区,P534R 位于 NBD 保守基序 Walker A 和 Walker B 的连接区。通过对 ALDP 物种间的同源基因序列进行多重序列比对,发现预测的两个突变氨基酸均呈高度保守,由此推测突变影响 ALDP 结构及功能的可能性大。根据 PhD-SNP、PolyPhen、SIFT 等突变致病性预测的计算结果,推测 H283R 和 P534R 为 ALD 致病性突变。由 Eris、I-Mutant 和 PoPMuSiC 等不同算法的结果可知,突变 H283R 和 P534R 可能会降低 ALDP 结构的稳定性,导致蛋白质的正常结构被破坏、蛋白质功能活性降低。

本研究利用分子克隆技术,将野生型 ABCD1 基因的编码区全长插入到载体 pLEX-MCS 上,成功构建了 ALDP 的真核重组载体:pLEX-ABCD1,并选择分别位于 ALDP 的 TMD 和 NBD 的突变:H283R 和 P534R,通过人工诱导突变获得了这 2 个突变的真核重组载体:pLEX-ABCD1-H283R 和 pLEX-ABCD1-P534R。将构建好的质粒连同包装

系统的两个质粒共转染 293T 细胞以包装病毒,病毒液再感染宿主细胞,RT-PCR 检测 ABCD1 mRNA 表达;野生型及突变型感染组 ABCD1 mRNA 表达均明显高于空载体组及未感染组,提示在转录水平,野生型及突变型慢病毒载体 ABCD1 过表达成功。免疫荧光及蛋白质免疫印迹结果均显示,野生型 ABCD1 慢病毒载体可高效过表达 ALDP,而两突变型组 ALDP 的表达量明显低于野生型组,与空载体组及未感染组细胞中内源性 ALDP 的表达量无明显差异。由此可见,突变型慢病毒载体在 ABCD1 基因的转录水平和翻译水平的结果不同,即在转录水平 ABCD1 基因过表达,但在翻译水平并未发现 ALDP 过表达,其表达量仅相当于细胞内源性 ALDP 水平。我们初步推测,H283R 和 P534R 突变对 ABCD1 基因转录影响较小,但可能影响转录后的蛋白质合成,主要表现为相应的 ALDP 突变体不稳定,易被蛋白酶体水解,从而难以甚至无法检测到,因此突变组检测到的 ALDP 可能主要是细胞内源性 ALDP。进一步的 ALDP 亚细胞定位结果发现,将过氧化氢酶作为定位标志,野生型及两突变型细胞中的 ALDP 与过氧化氢酶荧光表达位置重合,提示共定位于过氧化物酶体,由此可以推测这两个突变并未导致 ALDP 定位改变。

ALDP 突变体的功能学研究是探讨 X-ALD 发病机制的重要部分,本研究为进一步研究 ABCD1 基因突变对 ALDP 的影响奠定了实验基础,也将为利用慢病毒载体进行基因治疗提供实验依据。本课题组仍在不断优化实验步骤,希望得到更高滴度的病毒,同时也将继续补充与完善相关实验,如增加 ABCD1 基因突变研究的数量及类型(本课题组已发现 10 个国际首报错义突变),并进一步拓展 ALDP 功能学研究,如测定 ALDP 突变体的 ATP 酶活性、找到蛋白酶体水解 ALDP 突变体的直接证据等。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Kemp S, Berger J, Aubourg P. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822: 1465-

- 1474.
- [2] Moser H W, Mahmood A, Raymond G V. X-linked adrenoleukodystrophy[J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007, 3: 140-151.
- [3] Capriotti E, Calabrese R, Casadio R. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22:2729-2734.
- [4] Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30:3894-3900.
- [5] Ng P C, Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31:3812-3814.
- [6] Yin S, Ding F, Dokholyan N V. Eris: an automated estimator of protein stability[J]. *Nat Methods*, 2007, 4: 466-467.
- [7] Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33 (Web Server Issue): W306-W310.
- [8] Dehouck Y, Grosfils A, Folch B, Gilis D, Bogaerts P, Rooman M. Fast and accurate predictions of protein stability changes upon mutations using statistical potentials and neural networks: PoPMuSiC-2.0[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25:2537-2543.
- [9] Takahashi N, Morita M, Maeda T, Harayama Y, Shimozawa N, Suzuki Y, et al. Adrenoleukodystrophy: subcellular localization and degradation of adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) with naturally occurring missense mutations[J]. *J Neurochem*, 2007, 101: 1632-1643.
- [10] Hillebrand M, Verrier S E, Ohlenbusch A, Schäfer A, Söling H D, Wouters F S, et al. Live cell FRET microscopy: homo- and heterodimerization of two human peroxisomal ABC transporters, the adrenoleukodystrophy protein (ALDP, ABCD1) and PMP70 (ABCD3)[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282:26997-27005.
- [11] Loo T W, Clarke D M. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux[J]. *J Membr Biol*, 2005, 206:173-185.
- [12] Roerig P, Mayerhofer P, Holzinger A, Görtner J. Characterization and functional analysis of the nucleotide binding fold in human peroxisomal ATP binding cassette transporters[J]. *FEBS Lett*, 2001, 492 (1-2): 66-72.
- [13] Grtner J, Dehmel T, Klusmann A, Roerig P. Functional characterization of the adrenoleukodystrophy protein (ALDP) and disease pathogenesis[J]. *Endocr Res*, 2002, 28:741-748.
- [14] Liu L X, Janvier K, Berteaux-Lecellier V, Cartier N, Benarous R, Aubourg P. Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274:32738-32743.
- [15] van Roermund C W, Visser W F, Ijlst L, van Cruchten A, Boek M, Kulik W, et al. The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters[J]. *FASEB J*, 2008, 22: 4201-4208.