

Adck 转基因果蝇品系的构建与鉴定

龙芸

广州医科大学 广东广州

【摘要】 目的 Adck 转基因果蝇品系的构建与鉴定。方法 蛋白质磷酸化是指由蛋白质激酶催化的把 ATP 的磷酸基转移到底物蛋白质氨基酸残基（丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸）上的过程，或者在信号作用下结合 GTP，是生物体内一种普通的调节方式，在细胞信号转导的过程中起重要作用。蛋白质磷酸化是调节和控制蛋白质活力和功能的最基本、最普遍，也是最重要的机制。Adck 是果蝇的蛋白编码基因，其蛋白含有 aarF 结构域，目前 Adck 在果蝇中的功能还不清楚。为进一步研究 Adck 基因的功能，我们利用 PhiC31 整合酶介导的定点转基因系统构建带 HA 标签的转基因果蝇。结果 成功构建 Adck 转基因果蝇。结论 本实验以果蝇的 cDNA 为模板扩增 Adck CDS 区，同时双酶切载体 pUAST-attB，进行重组连接，并对阳性克隆进行 PCR 鉴定及测序；将测序正确的质粒注射到果蝇的胚胎细胞，经过一系列的杂交，筛选出转基因果蝇，经其自交可获得纯合的 Adck 转基因果蝇。

【关键词】 Adck 基因；转基因果蝇

Construction and Identification of Adck Transgenic Flies

Yun Long

Guangzhou Medical University Guangzhou, Guangdong

【Abstract】 Objective Construction and Identification of Adck Transgenic Flies. **Methods** Protein phosphorylation refers to the process of transferring the phosphoryl group of ATP to the amino acid residues (serine, threonine, tyrosine) of the substrate protein catalyzed by protein kinase, or binding GTP under the action of signal, which is a common regulating mode in organisms and plays an important role in the process of cell signal transduction. Protein phosphorylation is the most basic, common and important mechanism for regulating and controlling protein activity and function. Adck is a protein-coding gene of *Drosophila*. The protein encoded by Adck contains aarF domain. At present, the function of Adck in *Drosophila* is not clear. To further study the function of Adck, we use PhiC31 integrase-mediated site-specific transgenic system to construct transgenic flies with HA tag. **Results** Successful construction of Adck transgenic flies. **Conclusion** This experiment use cDNA as the template to amplify Adck CDS, and digest vector pUAST-attB with two enzymes, and then ligase these two fragments. After that we identified positive clones by PCR. Then we injected the right plasmid into the germ cells of *Drosophila melanogaster*. After a series of crosses, we finally get Adck transgenic flies.

【Keywords】 Adck; Transgenic flies

前言

后基因组学，又称为功能基因组学，它利用结构基因组所提供的信息和产物，发展和利用新的实验手段，通过在基因组和系统水平上全面分析基因的功能，使得生物学研究从对单一基因或蛋白质的研究转向多个基因或蛋白质同时进行系统的研究。

而通过模式生物研究基因功能是其中常见的方法。众所周知，果蝇是最受欢迎的模式生物之一。科学家们通常通过某种手段使某些基因突变，从而达到让这个基因功能缺失，继而观察表型的变化，研究功能以达到传统的遗传筛选的目的^[1]。

蛋白激酶又称蛋白质磷酸化酶。是一类催化蛋

作者简介：龙芸（1997-）女，汉，湖北黄石，本科，专业：生物技术。

白质磷酸化反应的酶。它能把腺苷三磷酸（通常是 ATP）上的 γ -磷酸转移到蛋白质分子的氨基酸残基上，使蛋白质磷酸化，发挥其生理生化功能^[2]。

有许多的蛋白质的磷酸化和去磷酸化会改变其活性和性质，这些活性和性质的改变作为一种在我们体内十分普遍的信息转导和调节的方式，是起着十分重要的生物学功能的，而且这个调节方式基本上涉及了我们体内所有的生理和病理的过程，这也是为什么研究蛋白激酶有十分重要的理论意义和现实意义的原因。

Adck 是果蝇的蛋白编码基因，其蛋白含有 aar F 结构域，其功能在果蝇中还不清楚。

本课题研究目标在于构建重组质粒 pUAST-Adck-HA、鉴定出 UAS-Adck 转基因果蝇品系及探索 Adck 在果蝇天然免疫中的作用。将 Adck 的 CDS 区编码序列与 pUAST 载体连接构建 pUAST-Adck-HA 重组质粒^[3]。本实验通过 PhiC31 整合酶介导的定点转基因系统来制作转基因果蝇。PhiC31 整合酶可以识别特异序列 attP 和 attB，使两段序列之间发生高效且不可逆的整合反应，在 PhiC31 整合酶作用下将含有 attB 序列的质粒注入含 attP 序列的果蝇品系。在酶的作用下发生不可逆反应，并在下一代获得 Adck 的转基因果蝇品系^[4]。

这些年来，随着研究的进展，人们对蛋白激酶有了越来越多的认识，也有很多问题仍在探索之中，例如一部分激酶的催化和调控机制的分析等，还需要进一步的研究。

材料与方法

1 材料

1.1 主要试剂

无内毒素小提中量试剂盒（TIANGEN）；胶回收试剂盒（北京全式金生物技术有限公司）；感受态细胞 DH5a（北京全式金生物技术有限公司）；PCR 试剂盒（TAKARA）；普通琼脂糖凝胶电泳 DNA 回收试剂盒（TIANGEN）；ClonExpress® Multi S One Step Cloning Kit（南京诺唯赞生物科技有限公司）。

1.2 主要仪器

移液枪（德国 eppendorf）、琼脂糖水平电泳仪（北京六一）、离心机（德国 eppendorf）、高压蒸汽灭菌器（Panasonic 松下）、电子天平（赛多利斯）、

果蝇培养箱（德国 MMM）、梯度 PCR 仪（Bio-Rad）、生物安全柜（河北慧采科技有限公司）、体视显微镜（德国蔡司）、高速冷冻离心机（德国 eppendorf）、双层可编程恒温摇床（上海智城）、紫外可见分光光度计（上海元析仪器有限公司）、冷冻混合球磨仪（莱驰）、CFX96 Real-time PCR System（Bio-Rad）

1.3 主要试剂配制

(1) LB 培养基

分别称取 10g 的胰化蛋白胨、5g 酵母提取物和 10gNaCl，置于烧杯中。后溶化，加入 633 毫升的蒸馏水于烧杯中，用玻棒搅拌，使药品全部溶化后，调 pH 用 1mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.2 后定容，将溶液倒入量筒中，加水至 950mL 后，加琼脂，加热融化，补足失水后，分装、加塞、包扎后，高压蒸汽灭菌 100Pa 灭菌 60min。

2 方法

2.1 载体构建

(1) cDNA 编码区片段的 PCR 扩增

Adck 编码序列以果蝇 cDNA 为模板通过 PCR 扩增得到。

① PCR 反应体系如下

50 μ L Reaction	
I-5TM 2X High-Fidelity Master Mix	25 μ L
10 μ M Forward Primer	2 μ L
10 μ M Reverse Primer	2 μ L
Template DNA	3 μ L
H ₂ O	18 μ L

② PCR 反应程序

98°C 预变性 3 min	} 15 个循环
98°C 变性 10 s	
65°C 退火 10 s	
每个循环-1°C	
72°C 延伸 1 min	
98°C 变性 10 s	} 20 个循环
60°C 退火 10 s	
72°C 延伸 1 min	
72°C 延伸 5 min	
12°C ∞	

③结果检测：反应结束后取 5 μ L 反应产物，1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

(2) 载体质粒提取

①柱平衡步骤：向吸附柱 CP 中加入 500 μL 的平衡液 BL，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

②取 5-15 mL 过夜培养的细菌液加入离心管中，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1 min，尽量吸取上清。

③向留有菌体沉淀的离心管中加入 500 μL 溶液 P1，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细胞沉淀。

④向离心管中加入 500 μL 溶液 P2，温和的上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。

⑤向离心管中加入 500 μL 溶液 P4，立即温和的上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀，然后室温放置 10 min 左右，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 10 min，此时在离心管底部形成沉淀。

⑥将上一步收集的上清液分次加入过滤柱 CS，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 2 min，滤液收集在干净的 2 离心管中。

⑦向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，上下颠倒混匀后转移到吸附柱 CP 中。

⑧室温 12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

⑨向吸附柱 CP4 中加入 500 μL 去蛋白液 PD，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP4 放入收集管中。

⑩向吸附柱 CP4 中加入 600 μL 漂洗液 PW，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP4 放入收集管中。

⑪向吸附柱 CP4 中加入 600 μL 漂洗液 PW，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。

⑫将吸附柱 CP4 重新放回收集管中，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 2 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

⑬将吸附柱 CP4 置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 100-300 μL 洗脱缓冲液 TB，室温放置 2 min，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1 min 将质粒溶液收集到离心管中。

(3) PCR 产物纯化

①柱平衡步骤：向吸附柱 CA2 中加入 500 μL 平衡液 BL，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1 min，

倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

②将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶电泳中切下放入干净的离心管中，称取重量。

③向胶块中加入等倍体积溶液 PN，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置，其间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解。如果还有未溶的胶块，可继续放置几分钟或再补加一些溶胶液，直至胶块完全溶解。

④将上一步所得溶液加入到一个吸附柱 CA2 中，室温放置 2 min，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CA2 放入收集管中。

⑤向吸附柱 CA2 中加入 600 μL 漂洗液 PW，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CA2 放入收集管中。

⑥重复操作步骤 5。

⑦将吸附柱 CA2 放回收集管中，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 2 min，尽量除尽漂洗液。将吸附柱 CA2 置于室温放置数分钟，彻底地晾干，以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。

⑧将吸附柱 CA2 放到一个干净离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加适量洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 min。12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 2 min 收集 DNA 溶液。

(4) 载体质粒双酶切

①载体用以下条件进行双酶切

试剂	Vector	EcoR I	Xba I	10 \times Buffer	H ₂ O
用量(μL)	3(2 μg)	2	2	5	38

②37 $^{\circ}\text{C}$ ，酶切 1h

③酶切后取 2 μL 的样品，电泳检测酶切是否成功。

(5) 双酶切后的载体片段用试剂盒割胶回收

①柱平衡步骤：向吸附柱 CA2 中加入 500 μL 平衡液 BL，12000 rpm ($\sim 13400 \times g$) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

②将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶电泳中切下放入干净的离心管中，称取重量。

③向胶块中加入等倍体积溶液 PN，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置，其间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解。如果还有未溶的胶块，可继续放置几分钟或再补加一些溶胶液，直至胶块完全溶解。

④将上一步所得溶液加入到一个吸附柱 CA2

中，室温放置 2 min，12000 rpm (~13400×g) 离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CA2 放入收集管中。

⑤向吸附柱 CA2 中加入 600 μL 漂洗液 PW，12000 rpm (~13400×g) 离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CA2 放入收集管中。

⑥重复操作步骤 5。

⑦将吸附柱 CA2 放回收集管中，12000 rpm (~13400×g) 离心 2 min，尽量除尽漂洗液。将吸附柱 CA2 置于室温放置数分钟，彻底地晾干，以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。

⑧将吸附柱 CA2 放到一个干净离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加适量洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 min。12000 rpm (~13400×g) 离心 2 min 收集 DNA 溶液。

(6) 连接

①根据公式计算重组反应所需 DNA 量。

②于冰上配制以下反应体系：

组分	重组反应
线性化载体	6 μL
插入片段	6 μL
5×CE MuLtiS Buffer	4 μL
Exnase MuLtiS	2 μL
ddH ₂ O	2 μL

(7) 转化

①在冰上解冻克隆用的感受态细胞。

②取 10 μL 重组产物加入到 50 μL 感受态细胞中，轻弹管壁混匀，冰上静置 30 min。

③42℃水浴热激 45 sec 后，立即置于冰上冷却 2-3 min。

④加入 900 μL LB 培养基（不加抗生素），37℃摇菌 1 h（转速 200 - 250 rpm）。

⑤将氨苄抗性的 LB 平板固体培养基在 37℃培养箱中预热。

⑥3500 rpm 离心 5 min，弃掉 800 μL 上清。用剩余培养基将菌体重悬，用无菌涂布棒在含有氨苄抗性的平板上轻轻涂匀。

⑦37℃培养箱中倒置培养 12 - 16 h。

(8) 重组子鉴定

挑 5 个单克隆送擎科公司测序。

2.2 果蝇显微注射

注射地点：珠海联合华益科技有限公司

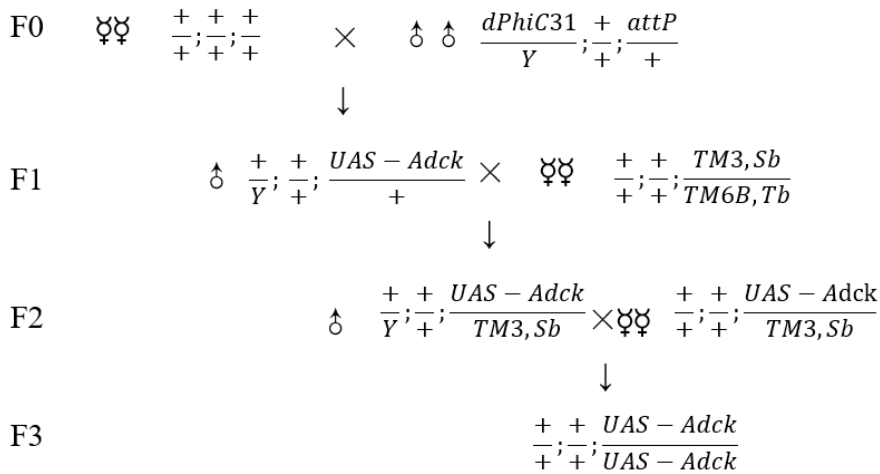
果蝇品系：dPhiC31; y¹M{3xP3-RFP-3xP3-GFP-vas-int.Dm}ZH-2Aw*

注射方法：向果蝇胚胎的生殖腺细胞注射质粒

2.3 鉴定工作

(1) 杂交图谱

此杂交目的是为了筛选出 Adck 转基因果蝇。首先将注射回来的雄果蝇与野生型处女蝇进行杂交，在后代中挑取红眼雄果蝇与平衡子果蝇进行杂交，得到带平衡子的转基因果蝇。经带平衡子的转基因果蝇自交后，得到 Adck 纯合转基因果蝇。



(2) 鉴定步骤

①单果蝇基因组提取：先要提取的一只果蝇放

到 40μL SB buffer 与 0.4μL 蛋白酶 K 的混合液中，后拿到粉碎机把果蝇粉碎掉，然后把粉碎混合物放

在 37°C 下 30min，最后将粉碎混合物放至电磁炉用 95°C 煮沸 5min。

②果蝇基因组 PCR，反应体系如下

50 μL Reaction	
I-5™ 2X High-Fidelity Master Mix	25 μL
10 μM Forward Primer	2 μL
10 μM Reserve Primer	2 μL
Templete DNA	3 μL
H ₂ O	18 μL

PCR 反应程序：

95°C 预变性 5 min
 95°C 变性 30 s
 58°C 退火 30 s
 72°C 延伸 1 min
 72°C 延伸 5 min
 4°C ∞

} 35 个循环

Forward primer: 5'-GATCCGCGGAATTGAGTCCA

Reverse primer: 5'-CCACCACTGCTCCCATTCAT

③挑单克隆测序

测序引物: Forward primer: 5'-GATCCGCGGAATTGAGTCCA

Reverse primer: 5'-CCACCACTGCTCCCATTCAT

3 结果

3.1 酶切载体

构建质粒的时候选用的载体为 pUAST-attB，酶切的时候选用的位点是 EcoRI和 XbaI。pUAST-attB 的理论大小为 8489bp。酶切载体的琼脂糖凝胶电泳分析图如下。从左到右第一条泳道为 Marker。第二条泳道为阴性对照组，是未经处理的载体。第三条泳道为实验组，实验组是酶切后的载体。其中第三条带位置大约在 8000bp 左右，与理论值相符，提示双酶切载体成功。酶切载体电泳的时候，因为超螺旋带是完整的，且结构紧密，所以它的位置位于最前。而第二条泳道是线性条带，即为环状双链 DNA 的两条链全都断开了，所以导致其分子构象发生了变化，因此不如超螺旋紧密，所以位置的就比超螺旋带靠后一些。第三条泳道是开环带，开环带即环状双链 DNA 其中的一条链断开，所以位置是最靠后

的。

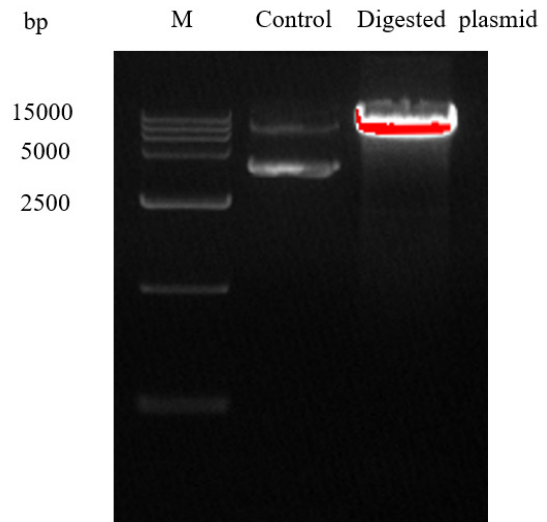


图 1 酶切载体琼脂糖凝胶电泳分析图

注：从左到右第一条泳道为 Marker；第二条泳道为未被酶切的载体作阴性对照组；第三条泳道为实验组

3.2 Adck 的 CDS 区 PCR 后琼脂糖凝胶电泳回收

通过以 cDNA 为模版，PCR 扩增出 Adck 编码序列。Adck 的理论值大小为 1557bp，琼脂糖凝胶电泳电泳显示，特异性扩增的 PCR 产物位置在 1500bp 左右，与理论值相符，提示 Adck 的 CDS 区扩增成功。

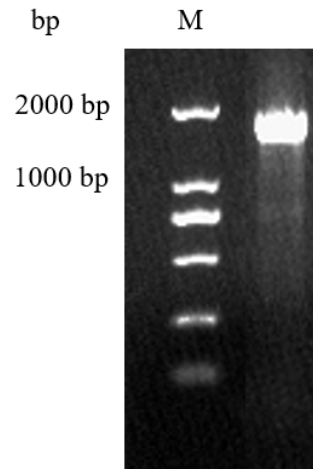


图 2 Adck 的 CDS 区 PCR 后琼脂糖凝胶电泳分析图

注：从左到右第一条泳道为 Marker；第四条泳道为特意扩增出的 Adck 的 CDS 区

3.3 重组质粒的测序结果图

我们选择与 EcoRI 与 XbaI 之间插入带 HA 标签蛋白的 Adck 序列，送于广州擎科生物科技有限公司

测序，测序结果与数据库对比未发现点突变和移码突变。所构建的 pUAST-Adck-HA 重组质粒与理论相符，提示重组质粒构建成功见图 3。

3.4 重组质粒的检测结果图

重组质粒构建完成后送珠海联合华益科技有限公司进行注射，将注射回来的果蝇进行杂交筛选出

Adck 转基因果蝇，将得到的转基因果蝇取单果蝇破碎，并取其基因组做 PCR，该图为 PCR 后的琼脂糖凝胶电泳结果图，图中可以看到从左到右第二条泳道特意扩增出的单一条带，提示重组质粒成功被整合到果蝇中。

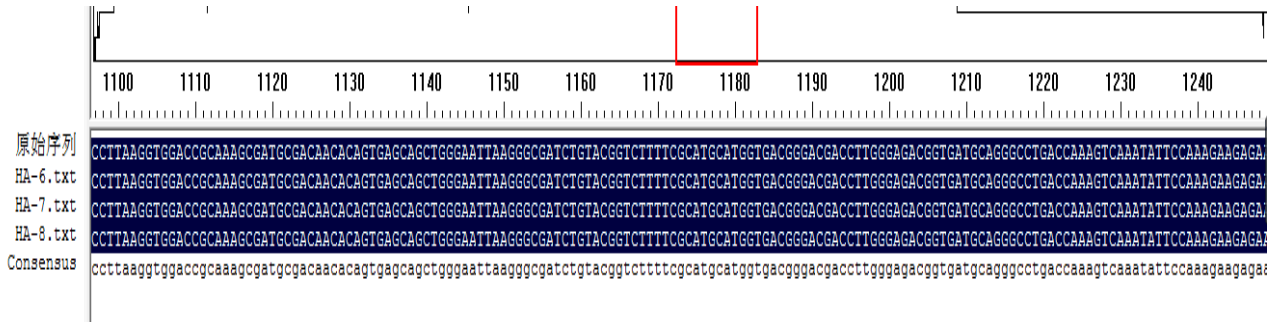


图 3 重组质粒测序结果图

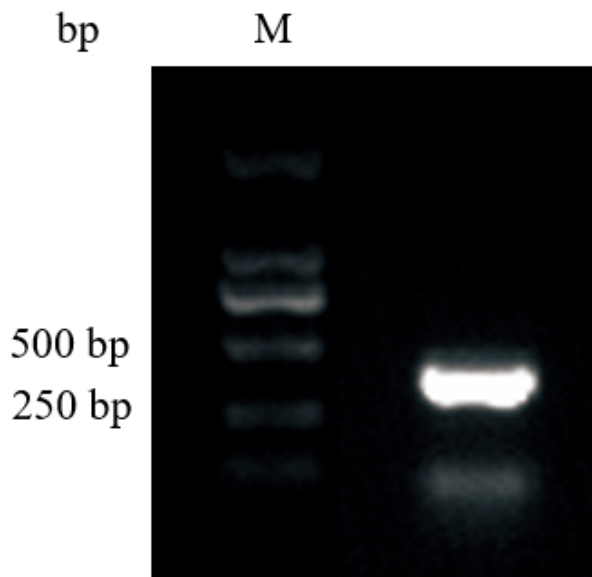


图 4 重组质粒的琼脂糖凝胶电泳检测分析图

注：从左到右第一条泳道为 Marker；第二条泳道为重组质粒

4 讨论

实验主要分为三部分，即载体构建，显微注射和鉴定工作。

实验中使用的 mini-white 标记基因来自于野生型红眼果蝇，带有自身的启动子。一旦整合入果蝇基因组，mini-white 的表达可以使 W¹¹¹⁸ 果蝇眼色从白变红，因此可以通过观察子代的眼色有没有变红，即可得知目的基因是否已整合入果蝇基因组且处于

可表达的区域。由于位置效应对 mini-white 表达的影响，转基因果蝇的眼色从淡红到桔红到深红不等，但通常不会出现野生型果蝇的鲜红眼色。此外，如果 P[w+, pUAST-Adck-HA] 整合入果蝇基因组，但所处的区域 mini-white 无法表达或表达量很低，这部分转基因品系则无法通过观察眼色筛选出来。

5 结论

将 Adck 编码序列克隆至 pUAST 载体中，构建

pUAST-*Adck*-HA 重组质粒, 并显微注射到果蝇胚胎中, 后筛选出转基因果蝇品系, 我们成功构建了 *Adck* 转基因果蝇品系。

参考文献

- [1] Cullen JK, Abdul Murad N, Yeo A, *et al.* AarF Domain Containing Kinase 3 (ADCK3) Mutant Cells Display Signs of Oxidative Stress, Defects in Mitochondrial Homeostasis and Lysosomal Accumulation. *PLoS One* 2016 ;11 (2):e0148213.
- [2] Wheeler B, Jia Z. Preparation and characterization of human ADCK3, a putative atypical kinase. *Protein Expr Purif* 2015 Apr;108 13-17.
- [3] Lolin K, Chiodini BD, Hennaut E, *et al.* Early-onset of ADCK4 glomerulopathy with renal failure: a case report. *BMC Med Genet* 2017 Mar;18 (1):28.
- [4] Atmaca M, Gulhan B, Korkmaz E, *et al.* Follow-up results of patients with ADCK4 mutations and the efficacy of CoQ10 treatment. *Pediatr Nephrol* 2017 Aug;32 (8):1369-1375.
- [5] 徐金静, 方力群, 赵春慧, 等. β 淀粉样蛋白对阿尔茨海默病转基因果蝇认知功能的影响. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2013(04): 13-17.
- [6] 李清华, 江泓, 易继平, 等. Hsp22 对 SCA3/MJD 转基因果蝇神经保护作用研究. *生物化学与生物物理进展*, 2008(12): 1-3.
- [7] 徐天宏, 任婧, 徐荣, 等. *SNF1A* 转基因果蝇的构建. *复旦学报(自然科学版)*. 2003(02): 1-4.
- [8] 王峰, 梁蕙, 戴良题, 等. *dRaf1* 转基因果蝇的构建与表型分析. *南开大学学报(自然科学版)*. 2018(02): 1-2.

收稿日期: 2022 年 3 月 9 日

出刊日期: 2022 年 6 月 14 日

引用本文: 龙芸, *Adck* 转基因果蝇品系的构建与鉴定 [J]. *科学发展研究*, 2022, 2(1):46-52
DOI: 10.12208/j.sdr.20220012

检索信息: 中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS