



# 猪 ADAR2 基因全长 cDNA 克隆、 序列特征及表达模式分析

张跃博<sup>1,2</sup>, 王立刚<sup>1</sup>, 侯欣华<sup>1</sup>, 刘欣<sup>1</sup>, 颜华<sup>1</sup>, 张龙超<sup>1\*</sup>, 王立贤<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128)

**摘要:** 旨在克隆猪作用于 RNA 的腺苷脱氨酶 2 基因(ADAR2)全长 cDNA 序列, 同时对该基因在猪不同组织中的表达规律进行探索。利用 RACE(rapid-amplification of cDNA ends)对大白猪 ADAR2 基因 mRNA 全长序列进行克隆, 并进行生物信息学分析; 用荧光定量 PCR 方法检测 35 日龄大白猪心、肝、肺、肾、脾、脑、小肠、背最长肌和背部脂肪 9 种组织中 ADAR2 的表达水平。结果表明, 猪 ADAR2 基因 cDNA 全长 6 305 bp, 共包含 12 个外显子, 编码 704 个氨基酸, 与人、黑猩猩、猕猴、长臂猿、黄牛、山羊和绵羊的 CDS 区核酸序列和氨基酸序列的一致性均在 84% 以上。该基因编码的蛋白含有 2 个双链 RNA 结合基序和一个脱氨酶结构域。猪 ADAR2 在检测的各组织中均表达, 其中在肺中的表达量最高。综上所述, 本研究成功克隆了猪 ADAR2 基因全长 cDNA 序列, 并且发现其在猪体内广泛表达, 为深入研究 ADAR2 的功能奠定了良好的基础。

**关键词:** ADAR2; 表达; cDNA 克隆; RACE; 猪

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2021)03-0620-10

## The Full-length cDNA Cloning, Sequence Characterization and Expression Pattern Analysis of Porcine ADAR2 Gene

ZHANG Yuebo<sup>1,2</sup>, WANG Ligang<sup>1</sup>, HOU Xinhua<sup>1</sup>, LIU Xin<sup>1</sup>,  
YAN Hua<sup>1</sup>, ZHANG Longchao<sup>1\*</sup>, WANG Lixian<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** This study aimed to clone the full-length cDNA of the porcine ADAR2 gene and explore its expression pattern in different tissues of pigs. Rapid-amplification of cDNA ends (RACE) was used to clone the full-length cDNA sequence of the ADAR2 gene in Large White pigs and the sequence was analyzed by bioinformatics. Real-time PCR was used to detect the ADAR2 mRNA expression in the heart, liver, lung, kidney, spleen, brain, small intestine, muscle and backfat of 35-day-old pigs. Porcine ADAR2 cDNA sequence of 6 305 bp was cloned, which contained 12 exons and encoded 704 amino acids. The nucleic acid and amino acid sequences shared a high identity (>84%) with that of other mammals including human, chimpanzee, macaque, gibbon, cow, goat and sheep. The deduced ADAR2 had two double-stranded RNA binding motifs and an adenosine deaminase domain. Real-time PCR results showed that the ADAR2 expressed in all the

收稿日期: 2020-08-06

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS02); 国家生猪产业技术体系(CARS-36); 湖南省教育厅科学研究项目(19C0902)

作者简介: 张跃博(1990-), 男, 山东武城人, 博士, 主要从事猪遗传研究, E-mail: ybzhangfd@126.com

\* 通信作者: 张龙超, 主要从事猪分子遗传育种研究, E-mail: zhlchias@163.com; 王立贤, 主要从事猪遗传育种研究, E-mail: iaswlx@263.net

detected tissues, and had the highest expression in the lung. The full-length cDNA sequence of porcine ADAR2 gene was successfully cloned, and it was widely expressed in tissues of pigs. These findings provide a solid foundation for further function study of ADAR2.

**Key words:** ADAR2; expression; cDNA clone; RACE; swine

\* **Corresponding authors:** ZHANG Longchao, E-mail: zhlichias@163.com; WANG Lixian, E-mail: iaswlx@263.net

RNA 编辑广泛发生于细菌、真菌、病毒、动植物等,具有改变氨基酸序列、影响可变剪接、导致内含子滞留、影响 RNA 稳定性等功能<sup>[1]</sup>,为解释诸多复杂生命过程提供了一个新的研究方向。在哺乳动物中,A-to-I 型 RNA 编辑最为普遍,所占比例可达 90%以上<sup>[2-3]</sup>。研究显示,大部分 A-to-I 编辑事件位于重复元件,仅有少数发生于编码区<sup>[4-6]</sup>,预示 A-to-I 编辑的功能可能以调控基因表达为主。已报道 A-to-I 编辑在癌症、自身免疫性疾病、多种神经性疾病中发挥重要作用<sup>[7-10]</sup>。目前,决定 RNA 中腺苷发生脱氨反应的机制尚不清楚,但已知双链 RNA 结构(double-stranded RNA, dsRNA)和作用于 RNA 的腺苷脱氨酶(adenosine deaminases acting on RNA, ADARs)是 A-to-I 编辑发生的必要条件。次黄苷(inosine, I)在翻译过程中会被识别为鸟苷(guanosine, G),因此 A-to-I 编辑也称 A-to-G 编辑。

ADAR2 是 ADAR 酶家族的一员,主要存在于细胞核,具有催化 A-to-I 编辑的活性,但对特异性编辑位点的亲和力高于随机性编辑位点<sup>[11]</sup>,其编辑作用具有选择性。敲除 ADAR2 的小鼠产后出现癫痫,并会于 20~25 日龄时死亡,但若同时将 *GluR2* Q/R 位点上 A 替换为 G,小鼠的寿命表现正常<sup>[12-14]</sup>,表明 ADAR2 介导的 A-to-I 编辑具有影响机体生命活动的潜力。高通量测序分析发现,ADAR2 在人体动脉中高表达,同时有研究表明,编码区的 RNA 编辑水平在人体动脉中最高<sup>[15]</sup>,预示着 ADAR2 可能与血管疾病密切相关。此外,ADAR2 过表达的小鼠会因食欲亢进而引发肥胖<sup>[16]</sup>。猪的解剖特征、生理生化特点等与人类极为相似,可作为研究人类疾病的动物模型,其相关研究势必促进人们对自身疾病致病机理的认识。尽管如此,对猪 ADAR2 的研究仍然比较缺乏,其序列特征、表达模式尚未有相关报道。

本研究利用 RACE 技术克隆猪 ADAR2 cDNA 全长序列,并对序列特征进行分析,同时应用实时荧

光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)技术检测大白猪不同组织中 ADAR2 的表达模式,为进一步研究猪 ADAR2 的功能及其调控 A-to-I 编辑的机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究使用的 4 头大白仔猪来自中国农业科学院北京畜牧兽医研究所昌平试验基地猪场。35 日龄屠宰,采集心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉、小肠和背部脂肪组织,并经液氮速冻后于 -80 °C 冰箱保存备用。

### 1.2 RNA 提取与 cDNA 合成

使用 RNA 提取试剂盒(天根,北京)提取大白猪 9 种组织的总 RNA,并利用超微量分光光度计(NanoDrop2000)和 1% 琼脂糖凝胶电泳对 RNA 纯度、浓度和完整性进行检测。取 1 μg 质量合格的 RNA,参照 PrimeScript™ RT 反转录试剂盒(TaKaRa,日本)说明书合成 cDNA,用于克隆全长 cDNA 序列的中间片段和检测 ADAR2 在各组织中的表达情况。使用大白猪脾脏组织 RNA,根据 SMARTer RACE 5'/3'试剂盒(Clontech,日本)说明书分别合成 5'-和 3'-RACE 的 cDNA 模板,用于克隆 5'和 3'末端序列。

### 1.3 猪 ADAR2 基因全长 cDNA 序列克隆

以 GenBank 中的猪 ADAR2 mRNA 预测序列(登录号:XM\_021071524.1)为模板,利用 NCBI 中的 Primer-BLAST 工具设计用于克隆 1 164 bp 中间片段的引物(表 1)。PCR 反应体系为 25 μL,包括 12.5 μL 2× Taq PCR Master Mix,1 μL cDNA 模板,上、下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 1 μL,以及 9.5 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应条件:94 °C 3 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 60 s,35 个循环;72 °C 10 min。利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对反应产物进行检测,然后送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。以克隆获得的中间序列为模板,应用 Primer-BLAST 工具设计 5'-和 3'-RACE 所需的特异性引

物(表 1)。参照 SMARTer RACE 试剂盒说明,分别以合成的 5'-和 3'-RACE 的 cDNA 为模板,采用巢式 PCR 扩增 5'和 3'末端序列。将获得的 PCR 产物切胶回收,克隆到 linearized pRACE 载体,挑选阳性克隆送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

#### 1.4 猪 ADAR2 生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件拼接组装获得 cDNA 序列,并分析物种间 ADAR2 的 CDS 区核苷酸序列和氨基酸序列的一致性。使用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 软件分析猪 ADAR2 蛋白质的理化性质。利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白亲-疏水性。分别使用 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 和 SWISS-MODEL (<https://www.swiss-model.expasy.org/>) 预测猪 ADAR2 蛋白质二级结

构和三级结构。ADAR2 系统进化树使用 MEGA-X 绘制。采用 NCBI 中的 Batch CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 预测 ADAR2 蛋白的结构域。

#### 1.5 荧光定量 PCR 检测

以大白猪心、肝、肺、肾、脾、脑、小肠、背最长肌和背部脂肪的 cDNA 为模板, GAPDH 作内参基因,采用 qPCR 方法检测 ADAR2 的组织表达情况。反应体系:  $2 \times$  SYBR<sup>R</sup> Premix Ex Taq II  $10 \mu\text{L}$ , cDNA  $2 \mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  上、下游引物各  $0.4 \mu\text{L}$ ,  $50 \times$  ROX Reference Dye II  $0.4 \mu\text{L}$  和 ddH<sub>2</sub>O  $6.8 \mu\text{L}$ 。反应条件:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  34 s, 40 个循环; 反应结束后分析熔解曲线。所需引物均利用 Primer-BLAST 设计(表 1)。以脂肪组织为对照,用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 ADAR2 在各组织中的表达量,并利用 SAS 9.2 的 GLM 过程进行单因素方差分析。

表 1 猪 ADAR2 基因 cDNA 克隆及 qPCR 引物

Table 1 Primers for cDNA clone and qPCR of porcine ADAR2 gene

基因 Gene	引物用途 Primer purpose	引物序列(5'→3') Primer sequence
ADAR2	中间序列克隆	F1: AGATAATAGCGCGCAGGTCC R1: GCATTGCTGATGCCACTGAG F2: AGCGCATCTCCAACATCGAG R2: CTGGGGGATTCAAAAGGGGAG
	RACE 通用引物	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT CACTCCCCTCAATGTAGCCA
	5'-RACE 特异性引物	Outer: GAGCCCTGGATGCCACACGTTCCA Inner: GATTACGCCAAGCTTGCCACCGTCCCACGTCTGGATGCT
	3'-RACE 特异性引物	Outer: AGCAGGACCAGTTCTCACTCACACCC Inner: GATTACGCCAAGCTTGCCGCATCTCCCCTTTTGAATCCCC
	荧光定量 PCR	F: CCGCCGTCTTTAACTTGCAC R: CGTCAGGTCCCCAAACTTGT
	RNA 编辑位点鉴定	F: AGACGCTGCATAAAAACCCA R: GCCCGCAGTTTTCTTAACC
GAPDH	qPCR	F: AGGGCATCCTGGGCTACACT R: TCCACCACCCTGTTGCTGTAG

#### 1.6 ADAR2 在不同猪种中的表达谱分析

在 PIGPAN (<http://animal.nwsuaf.edu.cn/code/index.php/panPig>) 的 GBrowse 中检索获得 ADAR2 在梅山、金华、八眉、荣昌、皮特兰、长白、大

白、汉普夏、巴克夏和藏猪不同组织中 RNA-seq 的表达数据,利用 TBtools<sup>[17]</sup> 绘制热图。每个品种 1 个个体,7~9 种组织,包括背最长肌、腰大肌、皮下脂肪、心、肝、脾、肺、肾和卵巢。

## 2 结果

### 2.1 猪 ADAR2 cDNA 全长序列克隆

克隆获得的 cDNA 序列片段经 DNAMAN 拼接后,得到猪 ADAR2 cDNA 全长序列,其长度为 6 305 bp,其中 5' UTR、3' UTR 和 CDS 分别为 548、3 616 和 2 115 bp,还有一个 ploy(A)尾巴;编

码 704 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA。序列已提交到 GenBank,登录号为 MW273927。利用 Ensembl 中的 BLAST/BLAT 在线工具对克隆获得的 cDNA 全长序列进行分析发现,猪 ADAR2 基因共包含 12 个外显子(图 1),各外显子长度在 75~3 796 bp 之间,仅有 1 个内含子的剪接位点序列不符合 GT-AG 法则,为 GC-AG(表 2)。

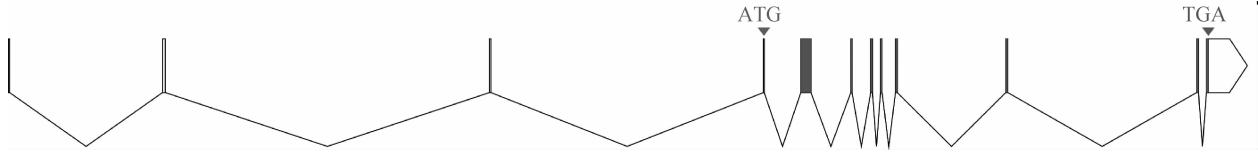


图 1 猪 ADAR2 基因结构

Fig. 1 Gene structure of porcine ADAR2 gene

表 2 猪 ADAR2 基因的剪接位点

Table 2 Splice sites of the porcine ADAR2 gene

外显子/内含子 Exon/Intron	外显子长度/bp Exon length	5'剪接供体 5' splice donor	3'剪接受体 3' splice acceptor	内含子长度/bp Intron length
1	107	gt	ag	14 185
2	257	gt	ag	30 067
3	137	gt	ag	25 279
4	75	gt	ag	3 395
5	944	gt	ag	3 696
6	115	gt	ag	1 726
7	169	gt	ag	746
8	149	gt	ag	1 238
9	169	gt	ag	10 067
10	182	gc	ag	17 516
11	179	gt	ag	737
12	3 796			

### 2.2 ADAR2 基因的序列一致性分析

核苷酸序列一致性分析表明,猪与偶蹄目家畜山羊(89.9%)、绵羊(89.7%)和牛(88.8%)的一致性最高,其次是人等灵长目动物(约 84%),与斑马鱼(69.0%)的一致性最低(表 3)。猪 ADAR2 基因预测的氨基酸序列与其他物种相应序列的一致性分析发现,猪与绵羊的一致性最高,高达 93.3%;其次是牛,为 92.0%;与斑马鱼的一致性最低,仅为 69.0%(表 3)。

### 2.3 猪 ADAR2 蛋白结构分析与系统进化树构建

预测的猪 ADAR2 蛋白共包含 10 747 个原子,

分子量是 76.35 ku,理论等电点 9.03,不稳定系数高达 48.58。蛋白质疏水性分析显示,猪 ADAR2 蛋白在第 358 位氨基酸得分最高(2.0),表明此位点疏水性最强;在第 476 位氨基酸得分最低(-3.0),表明此位点的亲水性最高。该蛋白的疏水性平均得分为-0.34,因此推测其属于亲水性蛋白(图 2A)。二级结构预测显示,ADAR2 共含有  $\alpha$ -螺旋(28.0%)、 $\beta$ -折叠(13.9%)和无规则卷曲(58.1%) 3 种二级结构(图 2B)。利用 SWISS-MODEL 在线软件获得的猪 ADAR2 三级结构构象由第 307~703 位氨基酸构成(图 2C)。

基于 ADAR2 的氨基酸序列,应用 MEGA-X 软件构建系统进化树,以便系统性认识该蛋白在种间的差异。如图 3 所示,在进化上猪 ADAR2 与偶蹄目家畜牛、绵羊和山羊的关系最近,与氨基酸的序列一致性分析结果基本吻合。保守结构域预测发现,

所有物种的 ADAR2 都含有 2 个 dsRNA 结合基序和 1 个脱氨酶结构域。猪 ADAR2 的 dsRNA 结合基序分别位于第 82~146 和第 239~300 位氨基酸,脱氨酶结构域位于第 325~701 位氨基酸。

表 3 猪 ADAR2 基因 CDS 区核酸序列和氨基酸序列与其他物种间的一致性

Table 3 Identity of ADAR2 gene coding sequences and amino acid sequences between the pig and other species

物种 Species	GenBank 号 GenBank ID		一致性/% Identity	
	核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid	核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid
人 <i>Homo sapiens</i>	NM_001112.4	NP_0011103.1	84.4	87.7
黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	NM_001128632.3	NP_001122104.2	84.2	87.6
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	XM_015132726.1	XP_014988212.1	84.1	87.1
长臂猿 <i>Nomascus leucogenys</i>	XM_012501911.1	XP_012357365.1	84.1	87.1
牛 <i>Bos taurus</i>	XM_005202040.4	XP_005202097.1	88.8	92.0
绵羊 <i>Ovis aries</i>	XM_027961120.1	XP_027816921.1	89.7	93.3
山羊 <i>Capra hircus</i>	XM_018052159.1	XP_017907648.1	89.9	85.3
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NM_130895.3	NP_570965.2	82.5	84.6
鸡 <i>Gallus gallus</i>	NM_204240.2	NP_989571.1	73.3	77.6
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NM_131610.3	NP_571685.2	69.0	69.0

## 2.4 猪 ADAR2 基因的组织表达分析

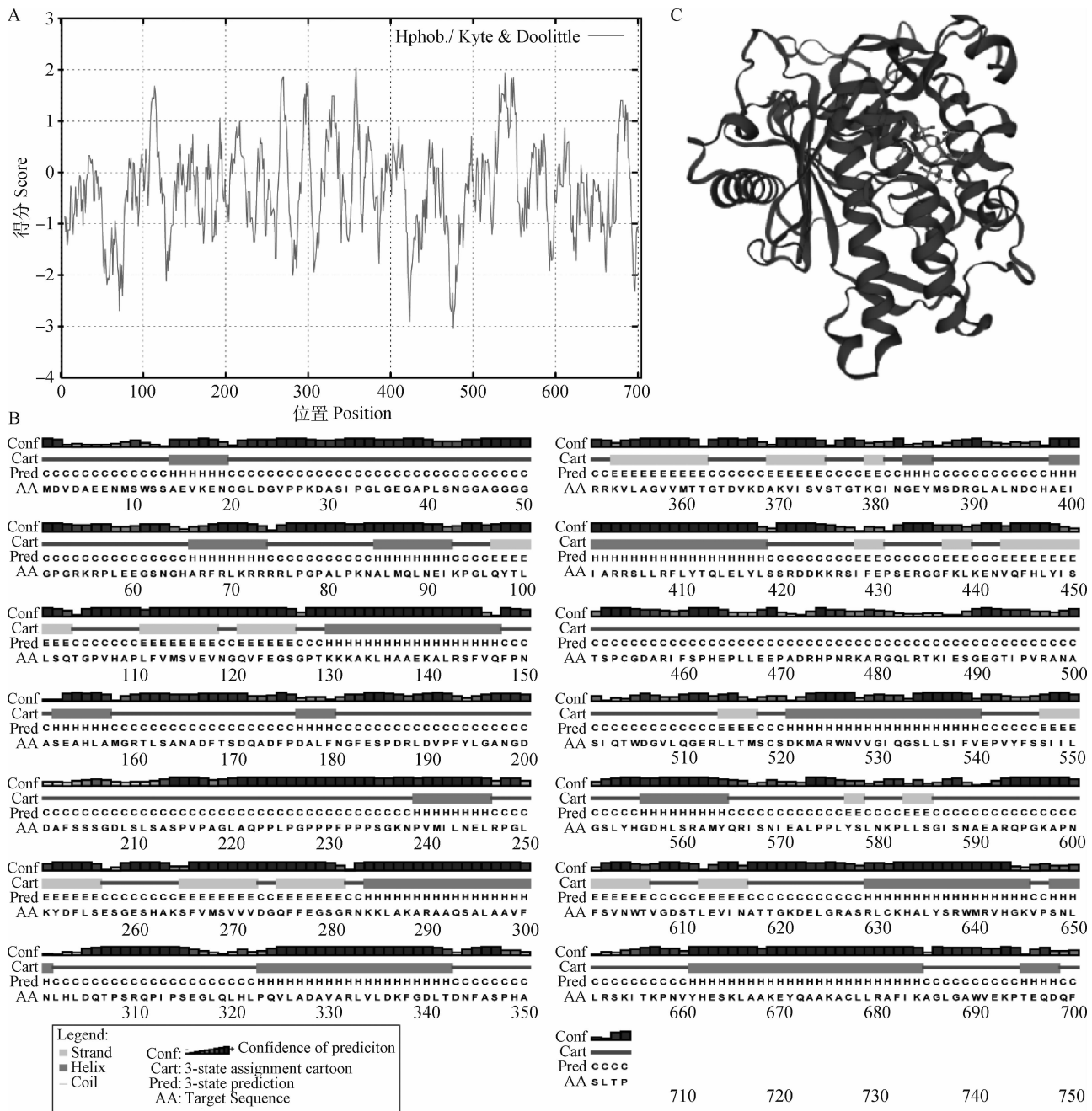
应用 qPCR 检测大白猪 9 种组织中 ADAR2 的 mRNA 表达量,结果显示,ADAR2 在被检测的所有组织中均表达;在肺中表达量最高,且显著高于其他组织;在心、肌肉和小肠中的表达量都比较低(图 4A)。利用 RNA-seq 数据绘制的 ADAR2 在不同猪种的组织表达谱表明,猪 ADAR2 具有高度的表达保守性,其在不同品种间的表达规律基本一致,均在肺中高表达(图 4B)。

## 3 讨论

随着高通量测序成本的不断下降以及相关分析软件的快速开发,已知的 RNA 编辑位点数目大幅增加,现已鉴定出 450 多万个人类的 A-to-G 编辑位点<sup>[18]</sup>。ADAR 酶催化 A-to-G 编辑发生,该酶家族主要包括 ADAR1、ADAR2 和 ADAR3。目前,仅发现 ADAR1 和 ADAR2 具有脱氨酶催化活性,但有报道称,ADAR3 可以通过竞争性结合 dsRNA 从而性也超过 80%。ADAR2 具有一个核定位信号,其

抑制 ADAR1 和 ADAR2 的催化功能<sup>[19]</sup>。经查询发现,NCBI 数据库中仅有猪 ADAR2 的不完整预测序列,在一定程度上阻碍了其功能的进一步解析。

通过 RACE 技术,本研究克隆获得了猪 ADAR2 基因的全长 cDNA,其长度为 6 305 bp,可编码 704 个氨基酸,与人(701 个)、鼠(701 个)、鸡(701 个)和斑马鱼(707 个)的 ADAR2 氨基酸序列长度比较一致<sup>[20]</sup>。本研究克隆获得的序列比 NCBI 中预测的 mRNA 序列(XM\_021071524.1, 5 803 bp)在长度上增加了 502 bp,但编码的氨基酸却减少了 9 个。BLAT 分析显示,猪 ADAR2 基因含有 12 个外显子,多于 NCBI 中的预测结果(9 个),并且仅有 1 对剪接供体和受体不符合 GT-AG 法则。据统计,哺乳动物中 GT-AG 剪切位点对占 99.24%,GC-AG 占 0.7%,AT-AC 占 0.05%<sup>[21]</sup>,说明非 GT-AG 的剪切位点虽少但也是存在的。对于 ADAR2 CDS 区核苷酸序列而言,猪与同为偶蹄目家畜的牛、羊间的一致性最高(>88%),与人和鼠间的一致性主要位于细胞核中<sup>[22-23]</sup>,与其催化脱氨功能相符,



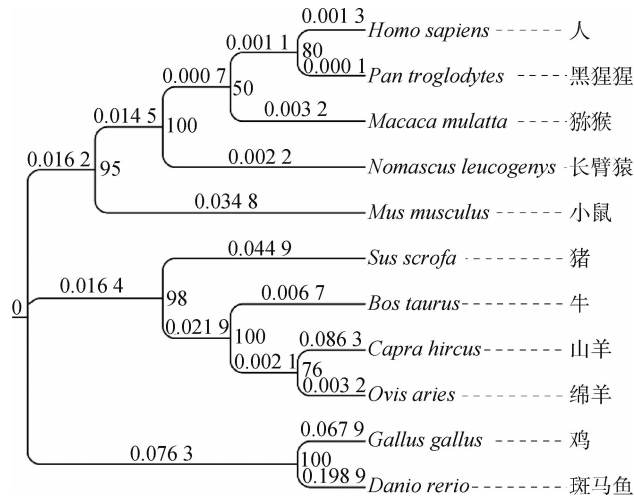
A. 亲疏水性分析; B. 二级结构预测; C. 三级结构预测  
 A. Hydrophilic-hydrophobic property prediction; B. Secondary structure prediction; C. Tertiary structure prediction

图 2 猪 ADAR2 蛋白疏水性与结构分析

Fig. 2 Hydrophobicity and structure analysis of the porcine ADAR2 protein

但在未成熟的神经元中却位于细胞质<sup>[24]</sup>。本研究未在猪 ADAR2 中预测到任何有利于其穿透细胞膜的跨膜结构和信号肽,但发现与信号肽跨膜功能有关的  $\alpha$ -螺旋含量较高<sup>[25]</sup>。疏水性分析发现,该蛋白亲水性较强,可能有利于其通过亲水性核质交换通道——核孔,由细胞质转运到细胞核,从而对新生成的 RNA 进行编辑。多个物种间保守结构域的预测

显示,ADAR2 蛋白在结构上高度保守,均具有 2 个 dsRNA 结合基序和 1 个脱氨酶活性结构域,其中猪与哺乳动物人、黑猩猩、猕猴、长臂猿、牛、羊和小鼠的序列间具有高度一致性(>84%),表明 ADAR2 在哺乳动物中高度保守,推测猪 ADAR2 也具有 RNA 编辑的功能。ADAR2 蛋白的系统进化树分析发现,猪能够与其他物种聚到一起,为 ADAR2 的物种

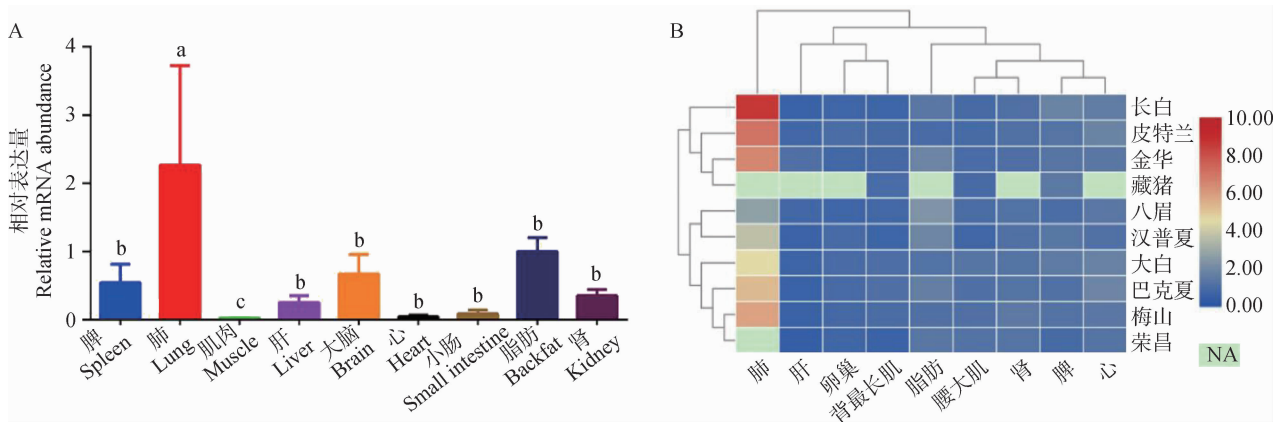


自展值和分支长度分别列于节点右侧和分支上侧

The bootstrap values and branch lengths are showed on the right of each node and above each branch, respectively

图3 ADAR2 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of ADAR2



A. ADAR2 在大白猪 9 种组织中的表达分析:字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),字母相同表示差异不显著( $P > 0.05$ ); B. ADAR2 在不同猪种不同组织的 RNA-seq 表达差异

A. Expression analysis of ADAR2 in 9 tissues of Large White pigs: the different letters indicate statistically significant difference ( $P < 0.05$ ), the same letter indicates no statistically significant difference ( $P > 0.05$ ); B. The RNA-seq expression difference of ADAR2 in different tissues of different pig breeds

图4 猪 ADAR2 的组织表达分析

Fig. 4 Tissue expression analysis of porcine ADAR2

间保守性提供支持。

ADAR2 基因表达于生物体的多种组织,已报道其在大脑中的表达量较高<sup>[26]</sup>。本研究同样发现,ADAR2 mRNA 在检测的 9 种大白猪组织中均表达,但不同的是其在肺组织中的表达量最高,在鸡中也发现了同样的现象<sup>[27]</sup>,并且该表达模式在猪种间高度保守。ADARs 介导的 RNA 编辑可以将内源性双链 RNA 标记成“自我”的分子,当外源微生物入侵时,免疫系统能够准确地识别“自我”和“非我”,

对入侵病原体的外源 RNA 启动免疫<sup>[28-30]</sup>。肺是机体气体交换的重要场所,易受病原微生物感染。同时,前期的研究发现,ADAR1 在肺中也高表达<sup>[31]</sup>。因此,ADAR2 在肺中高表达可能是肺部抗感染的需要。

ADAR2 既能与自身形成同源二聚体,又可与另一具有催化活性的酶 ADAR1 形成异质二聚体,其二聚体化可能是催化活性所必需的<sup>[32]</sup>。对 ADARs 底物偏好性研究发现,不同蛋白的 RNA 底

物具有明显差异<sup>[33]</sup>,其中 ADAR2 主要负责非重复编码区位点的编辑<sup>[15]</sup>。ADAR2 催化的 A-to-G 编辑通常具有位点特异性,如 *GluR2* Q/R 位点上的 A-to-G 编辑<sup>[34-35]</sup>,且可以通过自编辑对自身活性进行负调控<sup>[36]</sup>。ADAR2 基因敲除小鼠的生存时间长于 ADAR1 敲除小鼠,通常在出生数周内死于癫痫<sup>[13]</sup>。但如果同时将 *GluR2* Q/R 位点上的 A 变换为 G,敲除鼠可继续存活<sup>[13]</sup>,表明该位点的编辑对于个体的生存是必须的。Terajima 等<sup>[37]</sup>报道,在敲除 ADAR2 的小鼠中,由于 RNA 编辑的缺失导致生成的内源性 miRNA let-7 g 减少,从而间接引起靶基因 *Cry2* 表达量的上调,表型上出现运动节律缩短,说明 ADAR2 可以通过调节 miRNA 的表达影响正常的生理活动。随后的研究发现,ADAR2 在光照引起的生物钟相移中发挥重要作用<sup>[38]</sup>。在正常人的脑胶质细胞中 ADAR2 极弱表达,但在高恶性胶质瘤中则明显表达<sup>[39]</sup>。同时,也有研究报道,ADAR2 在恶性胶质瘤中的表达量并无明显变化,但酶活性出现下降<sup>[40]</sup>,可能是由于 ADAR1 与 ADAR3 表达量提高,与 ADAR2 竞争性结合编辑底物造成的<sup>[41]</sup>。ADAR2 的失调在癌症的发生发展中具有重要意义,已发现多个 ADAR2 介导的 RNA 编辑的缺失与癌症的发展密切相关。因此,还需深入挖掘 ADAR2 的功能,进一步解析其对人类疾病和畜禽经济性状的作用。

## 4 结 论

本研究成功克隆了猪 ADAR2 基因的全长 cDNA 序列,其长度为 6 305 bp,包含 548 bp 的 5' UTR,2 115 bp 的 CDS,3 616 bp 的 3' UTR 和一个 poly(A)尾巴,共编码 704 个氨基酸。ADAR2 在猪体内广泛表达,且在肺中高表达。本研究结果对进一步探索 ADAR2 的功能具有重要的理论意义和学术价值。

## 参考文献(References):

[1] 张跃博,颜 华,王立刚,等.哺乳动物 RNA 编辑及其检测方法[J].畜牧兽医学报,2018,49(11):2299-2309.  
ZHANG Y B, YAN H, WANG L G, et al. RNA editing and its detection methods in mammalian[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(11): 2299-2309. (in Chinese)

[2] ZHANG Y B, ZHANG L C, YUE J W, et al. Genome-wide identification of RNA editing in seven porcine tissues by matched DNA and RNA high-throughput sequencing[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2019, 10:24.  
[3] CHEN J Y, PENG Z Y, ZHANG R L, et al. RNA editome in rhesus macaque shaped by purifying selection[J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(4):e1004274.  
[4] OUYANG Z Y, REN C, LIU F, et al. The landscape of the A-to-I RNA editome from 462 human genomes [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12069.  
[5] ZHOU R, YAO W Y, XIE C D, et al. Developmental stage-specific A-to-I editing pattern in the postnatal pineal gland of pigs (*Sus scrofa*) [J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2020, 11(1):90.  
[6] WANG L G, LI J N, HOU X H, et al. Genome-wide identification of RNA editing sites affecting intramuscular fat in pigs[J]. *Animals*, 2020, 10(9):1616.  
[7] EISENBERG E, LEVANON E Y. A-to-I RNA editing—immune protector and transcriptome diversifier[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(8): 473-490.  
[8] GATSIOU A, VLACHOGIANNIS N, LUNELLA F F, et al. Adenosine-to-inosine RNA editing in health and disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(9): 846-863.  
[9] FRITZELL K, XU L D, LAGERGREN J, et al. ADARs and editing: The role of A-to-I RNA modification in cancer progression[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 79:123-130.  
[10] SONG Y Y, AN O, REN X, et al. RNA editing mediates the functional switch of COPA in a novel mechanism of hepatocarcinogenesis[J/OL]. *J Hepatol*, 2020, doi:10.1016/j.jhep.2020.07.021.  
[11] KLAUE Y, KÄLLMAN A M, BONIN M, et al. Biochemical analysis and scanning force microscopy reveal productive and nonproductive ADAR2 binding to RNA substrates[J]. *RNA*, 2003, 9(7):839-846.  
[12] HIGUCHI M, SINGLE F N, KÖHLER M, et al. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency[J]. *Cell*, 1993, 75(7):1361-1370.  
[13] HIGUCHI M, MAAS S, SINGLE F N, et al. Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2 [J]. *Nature*, 2000, 406(6791):78-81.  
[14] HORSCH M, SEEBURG P H, ADLER T, et al. Requirement of the RNA-editing enzyme ADAR2 for normal physiology in mice[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286



- (21);18614-18622.
- [15] TAN M H, LI Q, SHANMUGAM R, et al. Dynamic landscape and regulation of RNA editing in mammals [J]. *Nature*, 2017, 550(7675):249-254.
- [16] SINGH M, KESTERSON R A, JACOBS M M, et al. Hyperphagia-mediated obesity in transgenic mice mis-expressing the RNA-editing enzyme ADAR2 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(31):22448-22459.
- [17] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8):1194-1202.
- [18] PICARDI E, D'ERCHIA A M, GIUDICE C L, et al. REDiportal: a comprehensive database of A-to-I RNA editing events in humans [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1):D750-D757.
- [19] OAKES E, ANDERSON A, COHEN-GADOL A, et al. Adenosine deaminase that acts on RNA 3' (ADAR3) binding to glutamate receptor subunit B pre-mRNA inhibits RNA editing in glioblastoma [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(10):4326-4335.
- [20] SLAVOV D, GARDINER K. Phylogenetic comparison of the pre-mRNA adenosine deaminase ADAR2 genes and transcripts: conservation and diversity in editing site sequence and alternative splicing patterns [J]. *Gene*, 2002, 299(1-2):83-94.
- [21] BURSET M, SELEDTSOV I A, SOLOVYEV V V. Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(21):4364-4375.
- [22] BLOW M, FUTREAL P A, WOOSTER R, et al. A survey of RNA editing in human brain [J]. *Genome Res*, 2004, 14(12):2379-2387.
- [23] SANSAM C L, WELLS K S, EMESON R B. Modulation of RNA editing by functional nucleolar sequestration of ADAR2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(24):14018-14023.
- [24] BEHM M, WAHLSTEDT H, WIDMARK A, et al. Accumulation of nuclear ADAR2 regulates adenosine-to-inosine RNA editing during neuronal development [J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(4):745-753.
- [25] BLOM N, SICHERITZ-PONTÉN T, GUPTA R, et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence [J]. *Proteomics*, 2004, 4(6):1633-1649.
- [26] MELCHER T, MAAS S, HERB A, et al. A mammalian RNA editing enzyme [J]. *Nature*, 1996, 379(6564):460-464.
- [27] 张耀丹, 汪伟, 李继红, 等. 鸡源 ADAR2 基因克隆及其抗新城疫病毒作用研究 [J]. *中国动物传染病学报*, 2017, 25(2):35-42.
- ZHANG Y D, WANG W, LI J H, et al. Identification of chicken adenosine acting on RNA (ADAR2) and its anti-viral effect on newcastle disease virus [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2017, 25(2):35-42. (in Chinese)
- [28] YU Z, CHEN T Y, CAO X T. RNA editing by ADAR1 marks dsRNA as "self" [J]. *Cell Res*, 2015, 25(12):1283-1284.
- [29] YANAI M, KOJIMA S, SAKAI M, et al. ADAR2 is involved in self and nonself recognition of borna disease virus genomic RNA in the nucleus [J]. *J Virol*, 2020, 94(6):e01513-19.
- [30] NAKAHAMA T, KATO Y, KIM J I, et al. ADAR1-mediated RNA editing is required for thymic self-tolerance and inhibition of autoimmunity [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(12):e46303.
- [31] 张跃博, 欧阳峰正, 王立刚, 等. 猪 ADAR1 基因 cDNA 全长克隆、序列信息及组织表达分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(06):1135-1144.
- ZHANG Y B, OUYANG F Z, WANG L G, et al. The full-length cloning, sequence information and expression analysis of porcine ADAR1 gene [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2019, 50(6):1135-1144. (in Chinese)
- [32] GALLO A, LOCATELLI F. ADARs: allies or enemies? The importance of A-to-I RNA editing in human disease: from cancer to HIV-1 [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2012, 87(1):95-110.
- [33] GALIPON J, ISHII R, SUZUKI Y, et al. Differential binding of three major human ADAR isoforms to coding and long non-coding transcripts [J]. *Genes*, 2017, 8(2):68.
- [34] LEVANON E Y, EISENBERG E, YELIN R, et al. Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(8):1001-1005.
- [35] SOMMER B, KÖHLER M, SPRENGEL R, et al. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels [J]. *Cell*, 1991, 67(1):11-19.
- [36] RUETER S M, DAWSON T R, EMESON R B. Regulation of alternative splicing by RNA editing [J]. *Nature*, 1999, 399(6731):75-80.

- [37] TERAJIMA H, YOSHITANE H, OZAKI H, et al. ADAR1 catalyzes circadian A-to-I editing and regulates RNA rhythm[J]. *Nat Genet*, 2017, 49(1): 146-151.
- [38] TERAJIMA H, YOSHITANE H, YOSHIKAWA T, et al. A-to-I RNA editing enzyme ADAR2 regulates light-induced circadian phase-shift[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):14848.
- [39] 田宇, 潘玉琢, 杜超, 等. 胶质瘤中 RNA 编辑酶 ADAR2, ADAR3 mRNA 表达及意义[J]. *中国实验诊断学*, 2006, 10(1): 23-26.  
TIAN Y, PAN Y Z, DU C, et al. The expression of RNA editing deaminase ADAR2, ADAR3 mRNA on human glioma cell lines [J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2006, 10 (1): 23-26. (in Chinese)
- [40] MAAS S, PATT S, SCHREY M, et al. Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(25): 14687-14692.
- [41] CENCI C, BARZOTTI R, GALEANO F, et al. Down-regulation of RNA editing in pediatric astrocytomas: ADAR2 editing activity inhibits cell migration and proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (11): 7251-7260.

(编辑 郭云雁)