

牛 FADD 基因的克隆分析及其真核表达载体的构建

杨润军^{1,2}, 张路培², 许尚忠^{1,2}, 李俊雅², 高 雪²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100094)

【摘要】【目的】克隆牛 FADD 基因并构建真核表达载体,以探讨其在牛卵泡发育过程中的调控作用。【方法】采用 RT-PCR 技术,从牛卵巢组织总 RNA 中反转录 FADD cDNA,对编码区核苷酸序列分析后,将其全长 cDNA 删除终止密码子,采用定向克隆技术连接克隆到含有水母绿色荧光蛋白(AcGFP)报告基因的真核表达载体 pAcGFP-N1 中,用 *Bgl*Ⅱ、*Eco*RⅠ 双酶切、测序进行鉴定,并进行了牛 FADD mRNA 的组织表达谱分析。【结果】克隆的牛 FADD 基因编码区全长序列与 NCBI 公布的序列完全一致,核苷酸和氨基酸序列与猪的同源性最高,与鸡的同源性最低,仅为 42.5% 和 44%;通过 PCR 方法在 FADD 阅读框两端引入了 *Bgl*Ⅱ 和 *Eco*RⅠ 克隆位点,并于起始位点前加入 Kozak 序列,成功构建 pAcGFP-N1-bFADD 融合蛋白表达载体。组织表达谱分析表明,牛 FADD mRNA 高表达于肝脏、淋巴组织及睾丸、卵巢组织,在小肠、心、胰腺、肺、肾及肌肉中则弱表达或无表达。【结论】成功克隆了牛 FADD 基因,并构建 pAcGFP-N1-bFADD 融合蛋白表达载体,为 FADD 基因在牛卵母细胞发育调控中的基础研究提供了一种简便可靠的方法。

【关键词】 FADD 基因; pAcGFP-N1 载体; 融合蛋白; 重组质粒

【中图分类号】 S823.8⁺1; Q784

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)02-0015-06

Cloning and analysis of the cattle FADD gene and construcion of eukaryotic expression vector

YANG Run-jun^{1,2}, ZHANG Lu-pei², XU Shang-zhong^{1,2}, LI Jun-ya², GAO Xue²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: 【Objective】Cattle FADD gene was cloned and its eukaryotic expression vector was constructed to exploit the gene's regulation role in the procedure of follicular development in bovine ovary. 【Method】The FADD gene was amplified in cattle ovary tissue by RT-PCR, the nucleotide sequence in the coding region was analyzed and the termination codon in its cDNA was deleted. The amplified FADD gene was directionally cloned into eukaryotic expression vector pAcGFP-N1 including AcGFP, then identified by restrictive enzyme *Bgl*Ⅱ/*Eco*RⅠ and sequencing. 【Result】The sequence was consistent with that of NCBI, the homology with pig was the highest in nucleotide and amino acid sequence, while that with poultry was the lowest, only 42.5% and 44%. The pAcGFP-N1-bFADD fusion protein recombinant plasmid was successfulely constructed by introducing *Bgl*Ⅱ, *Eco*RⅠ cloning site at two ends of FADD open reading frame and inserting a Kozak sequence before start codon. 【Conclusion】Bovine FADD gene was cloned successfully and the pAcGFP-N1-bFADD recombinant plasmid was constructed, it should be helpful for further understanding the mechanism of regulation of FADD on bovine oocyte formation and development.

* [收稿日期] 2008-04-02

[基金项目] 国家“863”高技术研究与发展计划项目(2006AA107Z197); 国家“十五”科技攻关计划后继项目(2002BA514A-2-1, 2004BA514A04)

[作者简介] 杨润军(1979—), 男, 河北康保人, 在读博士, 主要从事生物技术与家畜育种研究。E-mail: yrj_1979@msn.com

[通信作者] 许尚忠(1950—), 男, 河北康保人, 研究员, 博士生导师, 主要从事生物技术与动物遗传育种研究。

E-mail: simmenta@vip.sina.com

Key words: FADD gene; pAcGFP-N1 vector; fusion protein; recombinant plasmid

Fas 相关死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain protein, FADD), 是 1995 年由 Arul 等^[1]用酵母双杂交系统克隆出的一种能与 Fas 相互作用诱导细胞凋亡的蛋白, 因其包含一个与 Fas 同源的死亡结构域(Death domain, DD)而得名。随后, 研究人员对 FADD 进行了大量研究, 发现 FADD 不仅在凋亡信号传导通路中起作用, 而且在 T 细胞的增殖、精、卵配子发生, 胚胎的发育及基因治疗上也有重要作用^[2-4]。

牛 FADD 基因位于 29 号染色体上, 包含 2 个外显子, 编码 DED 和 DD 蛋白结构域。FADD mRNA 和蛋白广泛表达于淋巴样和非淋巴样组织(如肝、睾丸、胰腺、卵巢等), 特别是在卵巢、睾丸、淋巴组织中高表达^[5]。

FADD 不仅传导凋亡信号, 而且传导细胞生长信号, 通过促进有丝分裂诱导细胞增殖^[6]。在卵母细胞发育的不同阶段, FADD 既通过 Fas/FasL 途径参与卵泡闭锁, 又通过细胞周期中与不同的胞浆蛋白相互作用诱导卵巢颗粒细胞增殖, 进而促进卵母细胞发育, 来维持卵泡发育的平衡状态; 表明 FADD 在卵母细胞发生的调控过程中具有重要作用。

为了研究 FADD 的生物学功能, 进一步揭示 FADD 在牛卵母细胞发育中的调控作用。本研究对牛 FADD 基因进行了克隆和同源性分析, 并将其定向插入真核表达载体 pAcGFP-N1 中, 构建 FADD 基因真核表达载体。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 试验用卵巢、小肠、心、胰腺、淋巴、胸腺、睾丸、肾、脾、肝、肺、肌肉等组织, 均来自于内蒙古通辽市科尔沁牛场的西门塔尔牛, 公、母牛各 8 头。

1.1.2 菌种、克隆载体、表达载体质粒 cDNA 合成反转录试剂盒、DH5 α 感受态大肠杆菌和 pMD19-T Simple vector 质粒, 均购自 TaKaRa 公司; pAcGFP-N1 质粒, 购自 Clontech 公司; Trizol 试剂盒, 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 酶及主要试剂 限制性内切酶 *Bgl* II、*Eco*R I 和 T4 DNA 连接酶, 均购自 TaKaRa 公司; *Taq* DNA 聚合酶, 购自北京普博欣公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、DNA

Marker, 均购自天根生化科技公司。

1.2 牛卵巢总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

无菌摘取健康母牛的卵巢, 迅速置于液氮中带回实验室, 用 Trizol 法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定其 OD_{260} 和 OD_{280} 值, 将 $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$ 的 RNA 置于 -70°C 备用。按照 TaKaRa 公司 cDNA 合成反转录试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA。

1.3 牛 FADD 基因的 PCR 扩增

1.3.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 检索到的牛 FADD 基因全长 cDNA 序列(GenBank 登录号: NM_001007816), 设计 1 对特异性引物: 上游引物为 5'-CATGGACCCGTTCTTGGTGC-3'; 下游引物为 5'-CACAGCCACCTCCCTGAGTCTTC-3'。引物均由北京赛百盛生物工程公司合成。

1.3.2 PCR 扩增 PCR 扩增采用 20 μL 体系: $10\times$ buffer (含 20 $\mu\text{mol/L}$ Mg^{2+}) 2.0 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs 0.4 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 0.6 μL , 模板 DNA 1 μL , 2 U/ μL *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μL , 超纯水 15.1 μL 。反应程序: 94°C 90 s; 94°C 30 s, 65°C 30 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。取 3 μL PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收 PCR 产物。

1.4 牛 FADD 基因的 TA 克隆与序列分析

将纯化的牛 FADD 基因与 pMD19-T 载体进行连接, 反应条件为: 16°C 、6 h。然后转化 DH5 α 感受态细菌, 于 37°C 培养过夜, 次日挑取白斑菌落进行菌液 PCR(反应体系及程序同 1.3.2), 并将正确的阳性克隆送北京诺赛基因组研究中心测序。

利用 DNASTAR、BLAST 等生物软件, 将测序的 FADD 基因序列与其他物种进行同源性比较, 构建分子系统进化树, 分析牛 FADD 基因与其他物种间的遗传保守性。

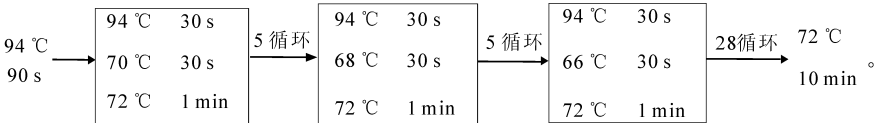
1.5 牛 FADD mRNA 的组织表达谱分析

用 Trizol 法提取牛小肠、心、胰腺、淋巴、胸腺、睾丸、卵巢、肾、脾、肝、肺、肌肉等组织的总 RNA。RT-PCR 方法分析 FADD 在牛各组织器官中的表达情况, 引物及反应条件同 1.3。

1.6 牛 FADD 基因真核表达载体的构建

根据牛 FADD 基因的酶切图谱和 pAcGFP-N1 的多克隆酶切位点, 选用 *Bgl* II 和 *Eco*R I 作为克隆位点。从 FADD 基因的完整阅读框序列的两端设

计引物:上游引物在 ATG 前加入 *Bgl* II 酶切位点和 4 个保护性碱基,同时加入 Kozak 序列以提高插入基因在真核细胞中转录起始和表达的效率,序列为 S: 5'-ACTAAGATCT GCCACCATGGACCCGT-TCCTGGT-3'(下划线为 *Bgl* II 酶切位点,波浪线为 Kozak 序列);反向引物设计时删除终止密码子 TGA,并在其后加入 1 个 C 碱基和 *Eco*R I 酶切位点,使 FADD 阅读框与下游的 AcGFP 基因序列保持一致,与融合蛋白基因同时进行表达,序列为 AS: 5'-ACTA GAATTCCGGAGGCTCCCGGGGCAGC



PCR 产物经凝胶回收试剂盒胶纯化回收后,克隆到 pMD19-T Simple vector,转化 DH5 α 宿主菌,提取 pMD19 T(S)-FADD 质粒,用 *Bgl* II 和 *Eco*R I 双酶切鉴定,8 g/L 琼脂糖凝胶纯化回收酶切片段。同样,将 pAcGFP-N1 质粒用 *Bgl* II 和 *Eco*R I 双酶切,纯化回收酶切片段。将 FADD 和 pAcGFP-N1 酶切片段用 T4 DNA 连接酶连接,构建重组质粒 pAcGFP-N1-bFADD,转化 DH5 α 宿主菌后,接种于含有 30 ng/mL 卡那霉素的固体 LB 培养基平板,于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,蓝白斑筛选阳性克隆。

1.7 重组质粒 pAcGFP-N1-bFADD 的鉴定

挑取阳性克隆,摇菌,进行菌液 PCR 扩增。同时用质粒小量抽提试剂盒提取质粒进行 *Bgl* II、*Eco*R I 双酶切,并将酶切鉴定后的质粒送北京诺赛

G-3'(下划线为 *Eco*R I 酶切位点,圆点标注为添加的 C 碱基)。

以 1.4 中 TA 克隆的 pMD19 T-FADD 质粒为模板,采用降落 PCR 方法扩增 FADD 基因编码区序列,20 μ L 反应体系:10 $\times$ buffer (含 20 μ mol/L Mg^{2+}) 2.0 μ L,10 μ mol/L dNTPs 0.4 μ L,10 μ mol/L 上、下游引物各 0.6 μ L,质粒 DNA 1 μ L,2 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μ L,超纯水 15.1 μ L。反应程序如下:

基因组研究中心进行测序。将经鉴定正确的 pAcGFP-N1-bFADD 质粒在 DH5 α 中扩增,以无内毒素超纯质粒抽提试剂盒制备不含内毒素的 pAcGFP-N1-bFADD 表达载体,于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2 结果与分析

2.1 牛 FADD 基因的 RT-PCR 扩增

从牛卵巢中提取 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.96。电泳检测结果表明,5S RNA 较小,跑到了凝胶的边界,条带较弱但可见,18S 和 28S RNA 条带明亮,且 28S 条带的亮度约为 18S 条带亮度的 2 倍(图 1)。说明提取的牛 RNA 未发生降解,纯度好。

以 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,得到 1 条约 730 bp 的 DNA 片段,与预计长度相符(图 2)。

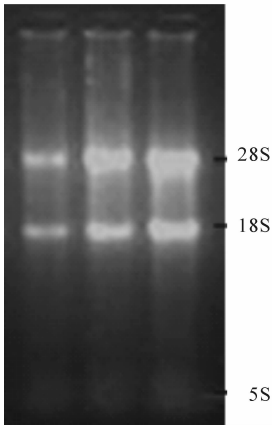


图 1 牛卵巢总 RNA 电泳检测结果

Fig. 1 Gel electrophoresis analysis of total RNA from cattle ovary

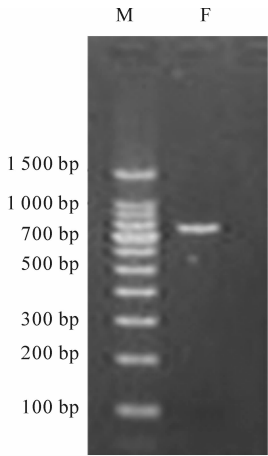


图 2 牛 FADD 基因 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

M, DNA Marker DL 1500; F, 牛 FADD cDNA
Fig. 2 Analysis of RT-PCR product of cattle FADD gene by agarose gel electrophoresis
M, DNA Marker DL 1500; F, cDNA of cattle FADD

2.2 牛 FADD 基因的 TA 克隆与序列分析

将纯化、回收后的扩增产物克隆到 pMD19-T 载体,筛选的阳性克隆菌液 PCR 扩增后,电泳检测得到 730 bp 的目的条带(图 3),表明牛 FADD 基因克隆成功。测序结果显示,牛 FADD 基因 ORF 共 630 bp,编码 209 个氨基酸,与 NCBI 上公布的序列进行比对,同源性为 100%,推导氨基酸序列与 NCBI 上公布序列的同源性为 100%,

牛 FADD 的核苷酸和氨基酸序列与猪的同源性最高,与猕猴、人的同源性次之,与鸡的同源性最低,仅为 42.5%和 44%,与啮齿类动物(大鼠,小鼠)的同源性则介于哺乳动物和禽类之间(表 1)。

从遗传进化树分析可见,牛 FADD 编码的氨基酸序列与猪、猕猴、人的亲缘关系最近,其次为鼠类,

与鸡的亲缘关系最远(图 4)。

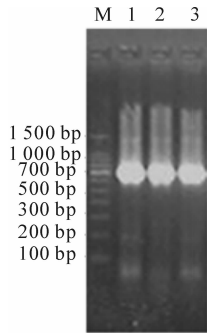


图 3 牛 FADD 基因阳性克隆的菌液 PCR 检测
M, DNA Marker DL 1500;1~3, 牛 FADD 菌液 PCR 产物
Fig. 3 Result of recombinant pMD19-T vector plasmid of cattle FADD by PCR
M, DNA Marker DL 1500;1-3, cDNA of cattle FADD

表 1 牛 FADD 基因 ORF 及编码氨基酸序列与其他物种的同源性比较

Table 1 Homologic comparison of FADD mRNA and amino acid sequence from cattle with other species								%
物种 Species	指标 Index	人 Homo sapien	猕猴 Macaque	猪 Pig	鸡 Chook	小鼠 Mouse	大鼠 Rat	
牛 Cattle	mRNA	79	80	85	42.5	76	74.5	
	氨基酸 Amino acid	65	65	74	44	60	63	

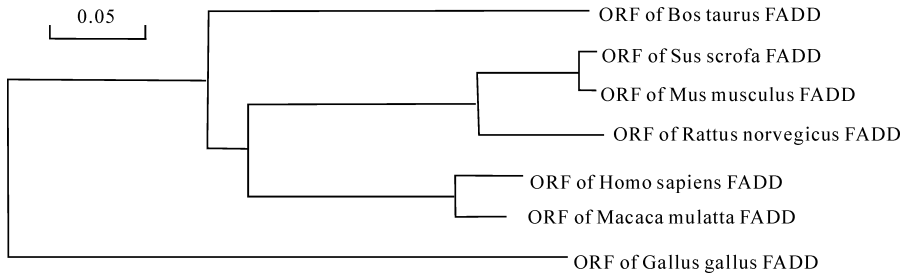


图 4 牛 FADD 基因遗传进化树分析
Fig. 4 Analysis of the phylogenetic tree of cattle FADD gene

2.3 牛 FADD mRNA 在组织中的表达

组织表达谱分析结果表明,牛 FADD mRNA 高表达于肝脏、淋巴组织、睾丸、卵巢组织、胸腺及脾脏,而在小肠、心、胰腺、肺、肾及肌肉中弱表达或无表达(图 5)。

2.4 牛 FADD 基因真核表达载体的构建

利用带有 Kozak 序列及删除终止密码子的 1 对引物,以 pMD19 T-FADD 质粒为模板,经降落 PCR 扩增出带有 Bgl II、EcoR I 酶切位点的牛 FADD 基因编码区全长序列,约 654 bp(图 6)。为了提高目的片段的酶切和连接效率,将纯化、回收后的目的基因克隆到 pMD19-T Simple vector,转化 DH5α 感受态大肠杆菌,抽提质粒,用 Bgl II 和 EcoR I 双酶切目的片段,与预期片段相同,并且两端带有内切酶黏

性末端(图 7)。

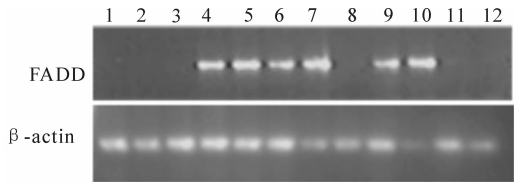


图 5 牛 FADD 基因在 12 个组织器官中的 RT-PCR 分析
1. 小肠;2. 心;3. 胰腺;4. 淋巴;5. 胸腺;6. 睾丸;
7. 卵巢;8. 肾;9. 脾;10. 肝;11. 肺;12. 肌肉
Fig. 5 Detection of cattle fas mRNA from various bovin tissues by RT-PCR
1. Small intestine;2. Heart;3. Pancreatic;4. Lymph;5. Thymus;
6. Testicle;7. Ovary;8. Kidney;9. Spleen;
10. Liver;11. Lung;12. Muscle

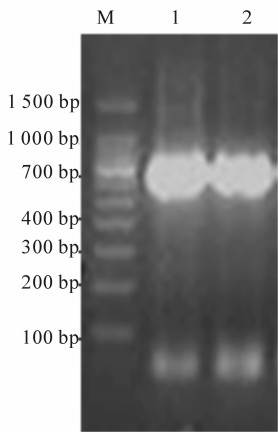


图 6 牛 FADD 基因编码区的降落 PCR 扩增结果

M. DNA Marker DL 1500;1,2. 牛 FADD PCR 产物
Fig. 6 Amplification of coding sequence of cattle FADD gene by TD PCR

M. DNA Marker DL 1500;1,2. Cattle FADD

重组质粒 pAcGFP-N1-bFADD 的 *Bgl* II/*Eco*R I 双酶切结果显示,均可切下 654 bp 的目的基因片段(图 8),与预期结果一致,表明真核表达载体 pAcGFP-N1-bFADD 构建成功。

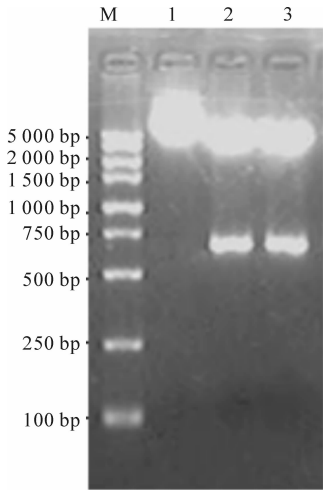


图 8 重组质粒 pAcGFP-N1-bFADD 的酶切鉴定结果

M. DNA Marker DL 5000;1. pAcGFP-N1-bFADD 质粒;
2,3. pAcGFP-N1-bFADD 质粒双酶切

Fig. 8 Identification of recombinant plasmid pAcGFP-N1-bFADD by restriction enzyme digestion

M. DNA Marker DL 5000;1. pAcGFP-N1-bFADD recombinant plasmid;2,3. pAcGFP-N1-bFADD digestion by restrictive enzyme *Bgl* II/*Eco*R I

重组质粒 pAcGFP-N1-bFADD 测序结果显示,牛 FADD 基因编码序列全部正确插入 pAcGFP-N1 载体,并且删除终止密码子 TGA,添加 1 个 C 碱基

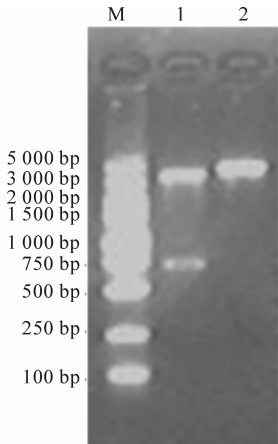


图 7 pMD19T (S)-FADD 质粒的 *Bgl* II/*Eco*R I

双酶切鉴定结果

M. DNA Marker DL 5000;1. pMD19T (S)-FADD 双酶切;

2. pMD19T (S)-FADD 质粒

Fig. 7 Construction and identification of pMD19T (S)-FADD

M. DNA Marker DL 5000;1. pMD19T (S)-FADD plasmid digestion by restrictive enzyme *Bgl* II/*Eco*R I ;2. pMD19T (S)-FADD plasmid

使其核苷酸序列与 pAcGFP 基因保持相同的读码框,确保了目的基因与报告基因构成的融合蛋白基因能够同时表达。

3 讨 论

凋亡作为一种维持机体自身内环境稳定所必需的生理性细胞主动死亡的过程,在控制细胞增殖、分化、发育和应答等过程中发挥着重要作用^[7-9]。

FADD 是 Fas/FasL 系统的一个信号连接蛋白,是死亡受体与胞浆成分之间联系的纽带,由外显子 2 编码的死亡结构域(Death domain, DD)可以与膜表面受体 Fas 结合,并通过外显子 1 编码的死亡效应域(Death effector domain, DED)与胞浆中细胞凋亡的终末酶连接,形成死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC),DISC 包括 Fas、FADD 和 casapase-8 前体。Caspase-8 前体经过加工,以活性形式从 DISC 中释放出来,进而使其他 caspase(caspase-3、caspase-6 和 caspase-7 等)前体裂解为活性亚单位,激活 caspase 级联反应,介导细胞凋亡^[10-11]。

牛 FADD 基因位于 29 号染色体,全长 2 404 bp,由 2 个外显子和 1 个内含子组成,2 个外显子拼接组成 FADD 编码区,长度为 630 bp,编码 209 个氨基酸多肽,分子量约为 26 ku。

本研究在成功克隆牛 FADD 基因的基础上,将其 mRNA 和氨基酸与其他物种进行了同源性比较。

结果显示,牛 FADD 的核苷酸和氨基酸序列与猪的同源性最高;通过构建遗传进化树亦表明,牛先和亲缘关系近的猪聚在一起,然后才依次和亲缘关系较远的人、猕猴、鼠、鸡形成聚类。说明 FADD 基因在亲缘关系近的物种间具有较高的保守性。

通过表达谱分析,牛的 FADD mRNA 高表达于淋巴组织、睾丸、卵巢组织、肝脏、胸腺及脾脏,在其他组织器官中的表达量则很少。这表明,表达于淋巴细胞的 FADD 通过 Fas/FasL 系统,在维持牛机体免疫内环境的自稳方面具有重要作用;表达于睾丸生殖细胞和卵巢卵母细胞的 Fas 与睾丸支持细胞、卵泡颗粒细胞表达的 FasL 相互作用,通过调节 FADD 表达水平的高低、作用的强弱来调控精子的发生和卵母细胞发育,使精、卵发生维持在一个生理的平衡状态。如果生殖系统的 FADD 基因发生突变或表达异常,则会使生殖内环境紊乱,导致精卵发生异常,造成公牛少精或无精、母牛排卵率及受胎率降低^[12-13]。

在构建 AcGFP 融合蛋白真核表达载体时,本研究充分利用定向克隆的优势,在分析牛 FADD 全长序列和 AcGFP 载体图谱的基础上,在 PCR 上、下游引物中分别引入 *Bgl* II (AGATCT) 和 *Eco*R I (GAATTC) 酶切位点。这 2 种内切酶酶切产生不同的 3'黏性末端,使目的基因和载体实现定向连接克隆,该方法具有如下优点:(1)由于载体的 2 个黏性末端不互补,因而载体片段不能环化,假阳性重组克隆少;(2)外源牛 FADD 基因只以一个方向插入至重组质粒中,减少了正、反向连接的筛选问题;(3)目的基因和载体连接处的限制性酶切位点得以保留,便于进一步鉴定。

Marilgn^[14]曾系统地分析了真核表达基因 mRNA 5'端序列与翻译效率的关系,发现 5'G/N-C/N-C/N-ANNATGG 3'序列能够提高基因转录和翻译效率,特别是一 3 位的 A 和 +4 位的 G 对翻译效率非常重要。因此在引物设计时,本试验在上游引物的 *Bgl* II 酶切位点后添加了 Kozak 序列 GCCAC-CATGG,以保证牛 FADD 在重组质粒中高效表达。另外,在连接时按 FADD 与载体 pAcGFP-N1 摩尔数比 8:1,于 16℃ 进行连接,不但提高了连接效率,而且进一步减少了载体自身环化的机率。

AcGFP 是从水母 *Aequorea coerulescens* 中分离出来的荧光蛋白,作为 EGFP 的替代品,具有如下优点:优化了密码子的开放阅读框,与 EGFP 相比不仅提高了 AcGFP mRNA 的转化效率,而且提

高了它在高等哺乳动物细胞中的表达水平^[15];同时这种载体成熟的很迅速,转染后 8~12 h 就可以进行检测(最大激发波长 475 nm,发射波长 505 nm);AcGFP 蛋白很稳定,可以对它在长时间范围内进行荧光检测^[16]。

本试验成功构建了牛 FADD 基因的真核表达载体,将 FADD 插入 AcGFP 的 N 末端,在 CMV 启动子的作用下与 AcGFP 共同表达形成融合蛋白,不仅可以提高转染效率,减小细胞损伤,便于原代细胞水平上的快速筛选;而且有利于模拟体内卵母细胞发育的基因层次性表达调控环境,对 FADD 基因的表达进行定性和定量分析,为 FADD 基因在牛卵母细胞发育调控中的基础研究提供了一种简便可靠的方法,对于进一步深入研究具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Arul M C, Karen O R, Muneesh T, et al. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis [J]. *Cell*, 1995, 81(4): 505-512.
- [2] Werner M, Wu C, Walsh C. Emerging roles for the death adaptor FADD in death receptor avidity and cell cycle regulation [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(20): 2332-2328.
- [3] Ferguson B, Esposito D, Jovanovic J, et al. Biophysical and cell-based evidence for differential interactions between the death domains of CD95/Fas and FADD [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2007, 14(9): 1717-1719.
- [4] Tomoki T, Manabu N. Modifications enhance the apoptosis-inducing activity of FADD [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(6): 1793-1803.
- [5] Carrington P, Sandu C, We Y, et al. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8 [J]. *Mol Cell*, 2006, 22(5): 599-610.
- [6] Imtiyaz H Z, Zhang Y, Zhang J, et al. Structural requirements for signal-induced target binding of FADD determined by functional reconstitution of FADD deficiency [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(36): 31360-31367.
- [7] Hengartner M. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 770-776.
- [8] Lin M, Chang K, Shankar D. The role of p53/CDC in cell cycle control and mammalian cell proliferation, differentiation, and apoptosis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2003, 74(2): 123-128.
- [9] Tsukane M, Yoshizaki C, Yamauchi T, et al. Development and specific induction of apoptosis of cultured cell models overexpressing human tau during neural differentiation: Implication in Alzheimer's disease [J]. *Anal Biochem*, 2007, 360(1): 114-122.