

研究报告

Research Report

盘基网柄菌 *DJ-1* 基因真核表达载体的构建

陈苏维* 崔钰莹

安康学院现代农业与生物科技学院,安康,725000

* 通信作者, chsw04@163.com

摘要 *DJ-1* 突变或缺失导致帕金森病相关症状,但其具体功能和致病机理尚在研究和探讨阶段。盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum* 是研究神经退化性疾病的模式生物之一,为了研究 *DJ-1* 基因在帕金森病中的作用机制,本研究设计特异性引物对盘基网柄菌 *DJ-1* 基因或其部分片段(75~479 bp)进行 PCR 扩增,再通过两步克隆法先对目的基因和 pUC18 质粒进行酶切、连接、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 转化、菌株蓝白斑筛选和目的片段测序,构建了盘基网柄菌 *DJ-1* 基因的原核表达载体 pPROF681 和 pPROF682。经酶切鉴定和序列测定确认后,再利用引物中的第二限制性内切酶(*Sac*, *Bam*H, *Eco*R 和 *Xho*)进行酶切,将目的基因插入盘基网柄菌质粒 pDNeo2 和 pPROF267,构建了 *DJ-1* 基因的重组真核表达载体 pPROF688 和 pPROF690,为后期培育含重组载体的盘基网柄菌转化株、进行菌株筛选和鉴定、分析 *DJ-1* 的表达量与盘基网柄菌表现型之间的相关性,并进一步建立帕金森病相关基因 *DJ-1* 的盘基网柄菌模型奠定基础。

关键词 帕金森病; *DJ-1*; 盘基网柄菌; 原核表达载体; 真核表达载体

Construction of Eukaryotic Expression Vector of *DJ-1* Gene in *Dictyostelium discoideum*

Chen Suwei* Cui Yuying

School of Modern Agriculture and Biotechnology, Ankang University, Ankang, 725000

* Corresponding author, chsw04@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.040.002610

Abstract The mutations or loss of *DJ-1* gene cause Parkinson's disease (PD), but the role of *DJ-1* and its relative mechanisms for PD are still under study and investigation. *Dictyostelium discoideum* is one of the recognized models for study of neurodegenerative disease. To study the role of *DJ-1* in PD and its mechanisms, the specific primers were designed to amplify the full-length *Dictyostelium discoideum DJ-1* and its fragment from 75~479 bp using two-step cloning strategy. The DNA of interest and pUC18 vector were digested and ligated with T4 ligase. The product of ligation was transformed into *Escherichia coli* DH5 α and followed by screening of strains of interest using Blue/white selection and gene sequencing. The *D. discoideum* prokaryotic expression construct pPROF681 and pPROF682 were built and verified by endonuclease digestion and gene sequencing. The genes of interest were then cut by *Sac*, *Bam*H, *Eco*R and *Xho* designed in primers from pPROF681 and pPROF682 and inserted into *D. discoideum* vectors pDNeo2 and pPROF267 to create *D. discoideum* eukaryotic expression vectors pPROF688 and pPROF690. This work provides a very important basis for further achievement of *D. discoideum* strains containing pPROF688 and pPROF690, selection and verification of interested transformants, analysis of the relativities between

基金项目:本研究由澳大利亚 Australian Research Council (DP140104276)、陕西省教育厅(18JK0017)和教育部(201911397005)共同资助

引用格式:Chen S.W., and Cui Y.Y., 2021, Construction of eukaryotic expression vector of *DJ-1* gene in *Dictyostelium discoideum*, *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 40(7-8 combined issue): 2610-2616. (陈苏维, 崔钰莹, 2021, 盘基网柄菌 *DJ-1* 基因真核表达载体的构建, 基因组学与应用生物学, 40(第 7-8 期合刊): 2610-2616.)

expression level of *DJ-1* and the phenotypes of *D. discoideum* and built of *D. discoideum* model of *DJ-1* for PD.

Keywords Parkinson's disease; *DJ-1*; *Dictyostelium discoideum*; Prokaryotic expression vector; Eukaryotic expression vector

帕金森病是发生率极高的中枢神经系统退化性病之一,80岁以上人群患帕金森病的几率高达1.903%,且男性患者的比例高于女性(Pringsheim et al., 2014; Smith and Dahodwala, 2014)。尽管临床上采用一些方案治疗,但截至目前帕金森病仍无法被彻底治愈。根据发生时段帕金森病可分为早发性和晚发性帕金森病,5%~10%的病人属于早发性帕金森病,且其发生最低年龄小于21岁(Ferguson et al., 2016)。研究证明线粒体功能紊乱和异常蛋白质累积可能是造成帕金森病的主要机制(Keeney et al., 2006; 李莉莉等, 2017),而0.5 mg/kg 雌激素处理可能通过降低黑质纹状体神经元DRP1蛋白的表达从而减少线粒体异常分裂对帕金森病起保护作用(周洁和罗海彦, 2018)。 α -synuclein 基因的发现打破了传统认为帕金森病是自发或者环境因素改变导致的神经系统紊乱的观念,而是与基因突变、缺失或者累积相关且发生具有一定的孟德尔遗传规律。

DJ-1 基因突变或缺失导致的帕金森病占先天性帕金森病人的1%~2%,研究发现14个以上的*DJ-1*位点突变或片段缺失与帕金森病相关。人类*DJ-1*基因由23 629个碱基对组成,含有8个外显子,前两个外显子不编码且交替性在mRNA中剪辑,其主要的转录产物约1 000 bp,其中开放阅读框长570 bp,编码长189个氨基酸的蛋白质(Bonifati et al., 2003)。关于*DJ-1*基因突变或缺失导致帕金森病症状的机理有很多提议,包括作为转录因子、抗氧化剂和蛋白降解酶等,但其作用条件、具体功能以及与帕金森病其他相关基因之间的互作目前仍有很多争议(Zhou et al., 2006; Chen et al., 2010; Gan et al., 2010)。

高等模式生物基因型-表现型相关性较为复杂,同一基因型变化可导致不同表现型,而同一表现型可能由不同基因型变化引起。简单真核模式生物盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)简化了基因型-表现型之间的复杂性,可以提供可数、可读和可靠的基因型-表现型相关性(Williams et al., 2006; Annesley et al., 2014)。同源基因对比及克隆和序列分析发现,盘基网柄菌*DJ-1*基因全长618 bp,无内含子,编码长205个氨基酸的蛋白质(Chen et al., 2017)。本研究将利用两步克隆法(twostep cloning strategy)构建盘基网柄菌*DJ-1*基因的原核和真核表达载体,为后

期研究*DJ-1*基因在帕金森疾病中的作用和致病机制以及建立帕金森病的盘基网柄菌模型提供基础。

1 结果与分析

1.1 *DJ-1* 基因及其片段的 PCR 扩增结果

通过改变盘基网柄菌细胞内*DJ-1*蛋白的表达水平,可以研究*DJ-1*基因型与盘基网柄菌表现型之间的相关性。*DJ-1*表达水平的增加可以通过外源性表达含*DJ-1*基因全长的重组表达载体,而降低*DJ-1*的表达水平则通过反意义链抑制内源性*DJ-1*的表达完成。为了达到此目的,首先以盘基网柄菌总基因组DNA作为模板,利用设计的特异性引物对全长*DJ-1*基因(618 bp)和*DJ-1*片段,即DA(从起始密码子开始,长404 bp)进行PCR扩增(图1)。

1.2 盘基网柄菌 *DJ-1* 原核表达载体的构建及鉴定

盘基网柄菌的表达质粒pDNeo2(6 167 bp)和pP-ROF267(7 278 bp)所含碱基对多,环状DNA长,且腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)所占比例大。盘基网柄菌*DJ-1*基因也富含A和T碱基对,因此在PCR扩增过程中容易出现因A和T碱基缺失或增加造成的突变。为了解决这一困难,本研究利用两步克隆法先将*DJ-1*及DA克隆至大肠杆菌原核表达质粒pUC18(2 686 bp),然后再通过限制性酶切将其克隆至盘基

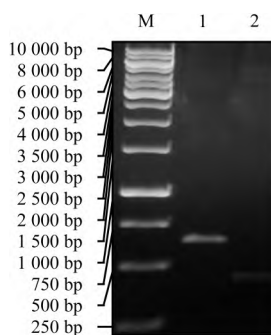


图1 *DJ-1* 基因及其 DA 片段的 PCR 扩增

注: M: 1 kb DNA Marker; 1: *DJ-1* 基因, 共长 618 bp; 2: DA: *DJ-1* antisense, 指用于 *DJ-1* 反义抑制的片段, 取自 *DJ-1* 75~479 bp, 共长 404 bp

Figure 1 Amplification of *DJ-1* and fragment DA by PCR

Notes: M: 1 kb DNA Marker; 1: Full-length *DJ-1*, 618 bp; 2: DA, *DJ-1* antisense, referring to the fragment of *DJ-1* from 75~479 bp for antisense inhibition of *DJ-1*, 404 bp

网柄菌表达质粒 pDNeo2 和 pPROF267。

为了构建盘基网柄菌 *DJ-1* 的反义抑制原核表达载体,先将 DA 和 pUC18 质粒均用 *EcoR* 进行限制性酶切(digestion)、然后进行凝胶电泳、DNA 纯化(purification)、pUC18 质粒去磷酸化(dephosphorylation),再将 DA 和 pUC18 进行连接(ligation)以构建盘基网柄菌 *DJ-1* 反义抑制原核表达载体 pPROF-681。将连接产物通过电穿孔法转入大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 进行转化株培养和蓝白斑筛选,将含 pPROF681 的菌株进行再次培养,并利用碱裂解法提取原核表达载体 pPROF681,最后对其进行双酶切确认 DA 的插入方向是否正确(图 2)。

将 *DJ-1* 全长基因酶切插入 pUC18 质粒,即可构建 *DJ-1* 过表达的原核表达载体 pPROF682,其构

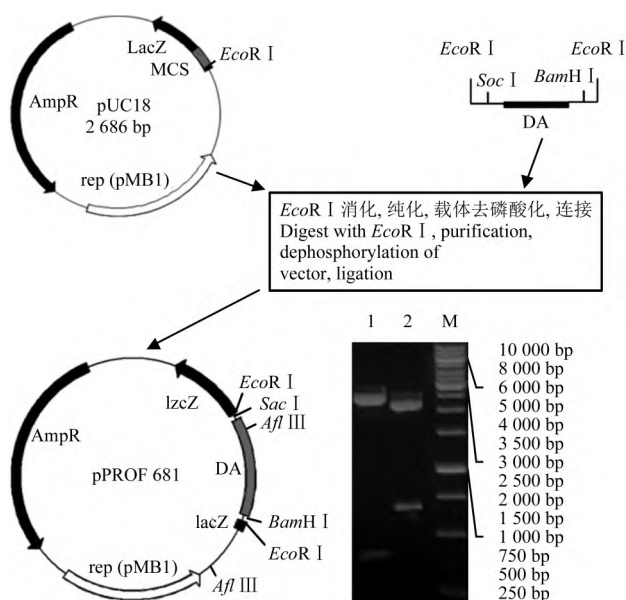


图 2 pPROF681 的构建流程和限制性酶切鉴定

注:电泳图中的 DNA 条带为 pPROF681 酶切后的条带,具体为:1: pPROF681 利用 *EcoR* 进行酶切后的 DNA 条带,其大小分别为 404 bp 和 2686 bp; 2: pPROF681 利用 *Afl* 进行酶切后的 DNA 条带,其大小分别为 705 bp 和 2386 bp; M: 1 kb DNA Marker; 1 和 2 最上面较细的 DNA 条带因 pPROF681 酶切不完全造成

Figure 2 Generation and restriction endonuclease digestion of pPROF681

Notes: The DNA bands in the electrophoretogram are the ones after digestion of pPROF681. 1: The DNA bands after digestion of pPROF681 by *EcoR*, the sizes of DNA bands are 404 bp and 2686 bp respectively; 2: The DNA bands after digestion of pPROF681 by *Afl*, the sizes of DNA bands are 705 bp and 2386 bp, respectively; M: 1 kb DNA Marker; The top bands in lanes 1 and 2 are due to the partial digestion of pPROF681

建流程及酶切结果(图 3)。

1.3 盘基网柄菌 *DJ-1* 及其片段序列比对分析

经双酶切和琼脂糖凝胶电泳确认原核表达载体 pPROF681 和 pPROF682 中 DA 和 *DJ-1* 的片段大小以及插入方向正确后,对该重组载体进行大规模提取和纯化,并利用表 2 设计的特异性引物进行序列测定。再将测定结果利用 Bioedit 软件与盘基网柄菌 *DJ-1* 基因进行 BLAST 对比分析,结果显示 pPROF681 和 pPROF682 重组表达载体中所含的 *DJ-1* 片段和 *DJ-1* 全长基因序列和开放阅读框正确。但是 pPROF682 中用于进行第二步克隆的 *Cla* 限制性内切酶的识别位点发生了 A 碱基缺失,即由 ATC-GAT 变成了 TCGAT,通过 BLAST 对比分析发现:用于第二步克隆的 pPROF682 重组载体和 pPROF267 质粒均含有 *EcoR* 克隆位点,因此判定该重组载体

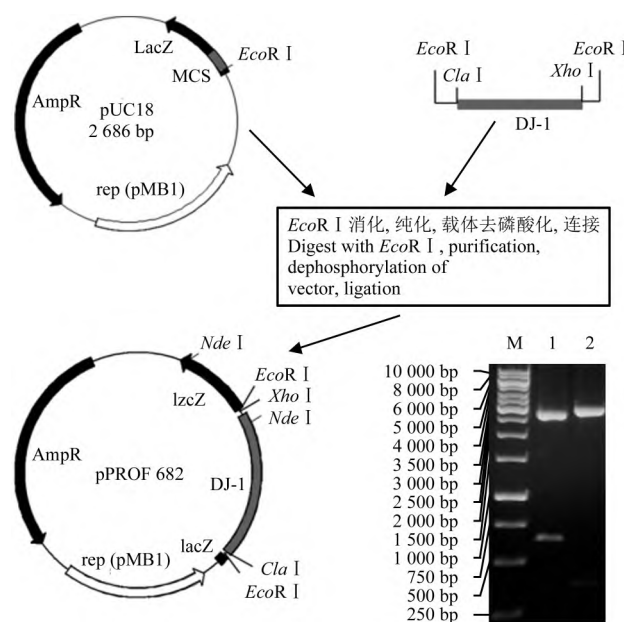


图 3 pPROF682 的构建流程及限制性酶切鉴定

注:电泳图中的 DNA 条带为 pPROF682 酶切后的条带,具体为:M: 1 kb DNA Marker; 1: pPROF682 利用 *EcoR* 进行酶切后的 DNA 条带,其大小分别为 618 bp 和 2686 bp; 2: pPROF682 利用 *Nde* 进行酶切后的 DNA 条带,其大小分别为 344 bp 和 2960 bp

Figure 3 Generation and restriction endonuclease digestion of pPROF682

Notes: The DNA bands in the electrophoretogram are the ones after digestion of pPROF682; M: 1 kb DNA Marker; 1: The DNA bands after digestion of pPROF682 by *EcoR*, the sizes of DNA bands are 618 bp and 2686 bp respectively; 2: The DNA bands after digestion of pPROF682 by *Nde*, the sizes of DNA bands are 344 bp and 2960 bp respectively

pPROF682 可以用于进行下一步限制性酶切和与盘基网柄菌质粒的连接。

1.4 盘基网柄菌 *DJ-1* 真核表达载体的构建和鉴定

测序确认 pPROF681 原核表达载体中的 DA 基因序列和开放阅读框正确后, 将其利用引物中设计的限制性内切酶 *Sac* 和 *Bam*H 进行酶切, 并同时利用这两个限制性内切酶对盘基网柄菌表达质粒 pDNeo2 进行酶切, 再进行琼脂糖凝胶电泳和 DNA 纯化, 最后将切下的 DA 片段以反方向插入 pDNeo2 的 *Sac* 和 *Bam*H 酶切位点以构建盘基网柄菌真核表达载体 pPROF688。将连接产物进行 *E. coli* DH5 α 转化、培养和蓝白斑筛选, 提取 pPROF688 并通过酶切确认插入的片段和方向是否正确(图 4)。

由于限制性内切酶 *Cla* 位点的突变, 引物中原计划的 *Cla* 位点无法使用, 本研究利用 *Eco*R 和 *Xho* 将 *DJ-1* 全长基因从原核表达载体 pPROF682

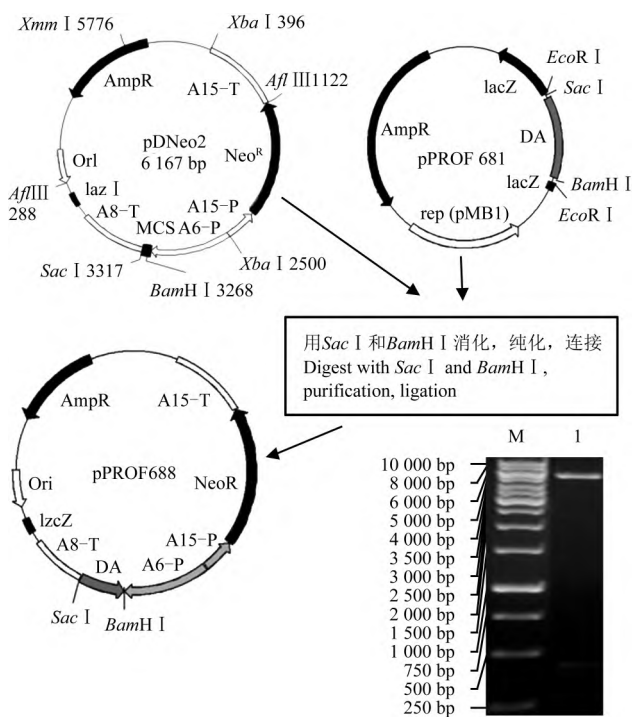


图 4 pPROF688 的构建流程和限制性酶切鉴定
 注: 电泳图中的 DNA 条带为 pPROF688 酶切后的条带; M: 1 kb DNA Marker; 1: pPROF688 利用 *Sac* 和 *Bam*H 进行酶切后的 DNA 条带, 其大小分别为 404 bp 和 6167 bp
 Figure 4 Generation and restriction endonuclease digestion of pPROF688
 Notes: The DNA bands in the electrophoretogram are the ones after digestion of pPROF688; M: 1 kb DNA Marker; 1: The DNA bands after digestion of pPROF688 by *Sac* and *Bam*H, the sizes of DNA bands are 404 bp and 6167 bp respectively

酶切下来, 插入盘基网柄菌质粒 pPROF267 的 *Eco*R I 和 *Xho* 位点, 从而构建盘基网柄菌 *DJ-1* 的真核表达载体 pPROF690 (图 5)。

2 讨论

DJ-1 基因位于染色体 1p36, 最早发现它是一种原癌基因, 与肿瘤发生相关。2001 年, 研究发现 *DJ-1* 基因 1-5 外显子缺失及 G310A、G293A、A1208G 和 G192C 等突变导致帕金森病相关症状, 作为第七个被发现与帕金森病相关的基因, 因此 *DJ-1* 也被称作 PARK7 (van Duijn et al., 2001)。

蛋白质功能结构域对比分析研究发现 *DJ-1* 属

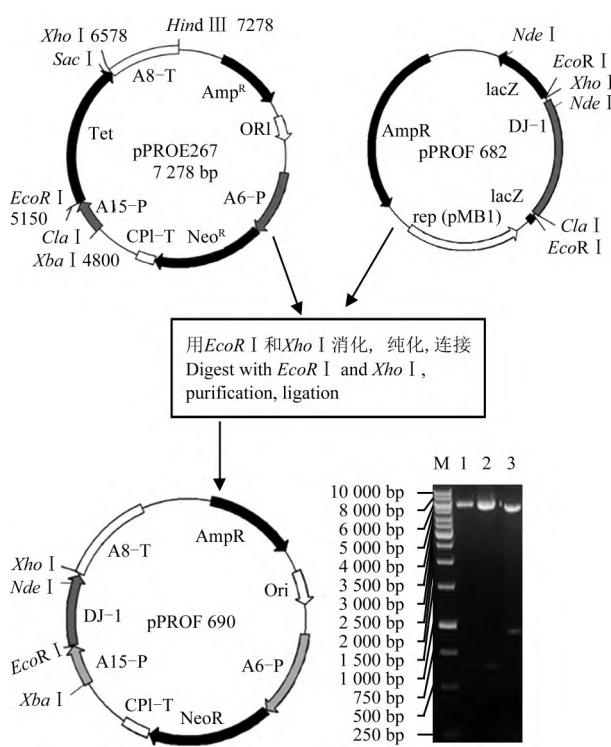


图 5 pPROF690 的构建流程及限制性酶切鉴定
 注: 电泳图中的 DNA 条带为重组载体 pPROF690 酶切后的条带; 具体为: M: 1 kb DNA Marker; 1,2: pPROF690 利用 *Eco*R 和 *Xho* 进行酶切后的 DNA 条带, 其大小分别为 618 bp 和 5850 bp; 3: pPROF690 利用 *Nde* 和 *Xba* 进行酶切后的 DNA 条带, 其大小分别为 890 bp 和 5578 bp
 Figure 5 Generation and restriction endonuclease digestion of pPROF690
 Notes: The DNA bands in the electrophoretogram are the ones after digestion of pPROF690; M: 1 kb DNA Marker; 1,2: The DNA bands after digestion of pPROF690 by *Eco*R and *Xho*, the sizes of DNA bands are 618 bp and 5850 bp respectively; 3: The DNA bands after digestion of pPROF690 by *Nde* and *Xba*, the sizes of DNA bands are 890 bp and 5578 bp respectively

于 Thi/PfpI 蛋白质家族,广泛分布于身体各组织及大脑区域,且与常染色体隐性早发型帕金森病相关(Annesi et al., 2005)。Canet-Avilés (2004)则通过转染 M17 细胞发现:正常情况下 *DJ-1* 的亚细胞位置与线粒体无关,受到农药百草枯刺激后 *DJ-1* 蛋白向线粒体发生转移,从而揭示其功能可能与 *DJ-1* 的亚细胞定位有关。也有不同研究指出 *DJ-1* 基因可能与帕金森病其他相关基因互作从而执行对细胞的保护功能(Thomas et al., 2011; Fu et al., 2017)。

本研究成功构建了盘基网柄菌 *DJ-1* 基因的真核表达载体 pPROF688 和 pPROF690,为后续利用盘基网柄菌模式生物研究 *DJ-1* 基因在帕金森病中的作用机制提供了基础。虽然不同研究发现 *DJ-1* 基因缺失或者突变导致帕金森病相关症状,从而认为 *DJ-1* 基因是一种 loss-of-function 的基因,对于神经细胞执行其正常生理功能起保护作用,但其具体作用机制及与帕金森病其他相关基因之间的互相作用还有待于进一步深入探讨。因此,盘基网柄菌 *DJ-1* 基因真核表达载体的构建对于研究其生理功能和构建帕金森病的盘基网柄菌模型具有重要的价值和意义。

3 材料与方 法

3.1 实验菌株和质粒载体

本实验所用菌株为大肠杆菌 DH5 α 和盘基网柄菌 AX2,其相关信息见表 1。质粒载体为 pUC18、pDNeo2 和 pPROF267。

3.2 引物的设计与合成

参照盘基网柄菌 *DJ-1* 基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计上、下游引物分别用以扩增 *DJ-1* 基因的片段(DA, *DJ-1* antisense inhibition fragment)和全长基因(*DJ-1*) (表 2)。引物由澳大利亚 Geneworks 公司合成。

3.3 PCR 扩增 *DJ-1* 及其片段

以盘基网柄菌总基因组 DNA 为模板,利用 3.2

表 1 实验菌株名称及基因型

Table 1 The names and genotypes of strains used

菌株名称	基因型
Strain name	Genotypes
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F</i> , ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁻) <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>
<i>D. discoideum</i> AX2	<i>axeA1</i> , <i>axeB1</i> , <i>axeC1</i>

表 2 扩增盘基网柄菌 *DJ-1* 基因及其片段的上下游引物序列

Table 2 Primer sequences for amplification of *DJ-1* and its fragment

引物名称	引物序列
Primer name	Primer sequence
DOEF	GCGAATTCATCGATATGACCAAAAAAATA TTATTATTATTATGTAAAGG
DOER	GCGAATTCCTCGAGTTAAAAACCCATTAA AGTTTTTACTTTTTTAGC
DAF	GCGAATTCGAGCTCGGGTTGGGCTAGAGA GG
DAR	GCGAATTCGGATCCGCGATAACGTTTGCA CCG

注: DOEF: *DJ-1* overexpression forward, 指扩增 *DJ-1* 全长的上游引物; DOER: *DJ-1* overexpression reverser, 指扩增 *DJ-1* 全长的下游引物; DAF: *DJ-1* antisense inhibition forward, 指扩增 *DJ-1* 片段进行反意义链抑制的上游引物; DAR: *DJ-1* antisense inhibition reverse, 指扩增 *DJ-1* 片段的下游引物; 引物序列方向为 5'-3', 5' 端 GC 添加为了提高限制性内切酶酶切效率; 引物序列中加粗部分为限制性内切酶的识别序列, 分别为: *EcoR* (GAATTC), *Cla* (ATCGAT), *Xho* (CTCGAG), *Sac* (GAGCTC)和 *BamH* (GGATCC)

Notes: DOEF: *DJ-1* overexpression forward, refers to the forward primer for amplification of the full-length *DJ-1*; DOER: *DJ-1* overexpression reverse, refers to the reverse primer for amplification of the full-length *DJ-1*; DAF: *DJ-1* antisense inhibition forward, refers to the forward primer for amplification of the *DJ-1* fragment from 75~479 bp for antisense inhibition of *DJ-1*; DAR: *DJ-1* antisense inhibition reverse, refers to the reverse primer for amplification of the *DJ-1* fragment; The orientation of primers is 5'-3' and the addition of GC at 5' is to increase the efficacy of endonuclease digestion; The bold sequences in the primers are the recognition sequences of various endonuclease; They are *EcoR* (GAATTC), *Cla* (ATCGAT), *Xho* (CTCGAG), *Sac* (GAGCTC) and *BamH* (GGATCC), respectively

设计的引物对盘基网柄菌 *DJ-1* 基因及其片段进行扩增。100 μ L PCR 反应体系包括:盘基网柄菌总基因组 DNA 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1 μ L, dNTP 混合物(10 mmol/L) 2 μ L, MgCl₂ (50 mmol/L) 5 μ L, PCR 缓冲液(10 \times) 10 μ L, ddH₂O 78 μ L。PCR 扩增的反应条件和参数 (1) 95 $^{\circ}$ C 模板变性 5 min (2) 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个扩增循环;(3) 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物条带(姚艳丽等, 2015)。

3.4 目的基因与 pUC18 质粒的限制性酶切和连接

利用引物设计中加入的 *EcoR* 限制性内切酶

对 PCR 扩增的 *DJ-1* 和 DA 片段及 pUC18 质粒进行酶切。反应体系 10 μ L: 目的基因 DNA (0.2~1.0 μ g/ μ L) 2 μ L, 限制性内切酶 *EcoR* (1~10 U) 1 μ L, 缓冲液 (10 \times) 1 μ L, ddH₂O 6 μ L。将该反应体系 37 $^{\circ}$ C 温育 1.5 h 后, 加入硼酸钠电泳显示剂(SBE)或 65 $^{\circ}$ C 加热 20 min 进行热失活。酶切结果进行琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用 PureLink™ Quick Gel Extraction Kit 对目的 DNA 和质粒 pUC18 进行抽提和纯化。为了避免 pUC18 质粒自身重新环化, 将 15 U 热敏碱性磷酸酶 (TSAP)、1 μ g pUC18 质粒和 1 μ L 缓冲液 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min 以去除质粒 5' 端的磷酸, 然后 75 $^{\circ}$ C 温育 15 min 使酶失活后再通过微量透析去除多余的电解液。目的基因 DNA 和 pUC18 质粒最后以下面的反应体系 16 $^{\circ}$ C 过夜进行连接反应: 目的 DNA (DA 或 *DJ-1*) 22 μ L, pUC18 质粒 3 μ L, T4 连接酶 2 μ L, T4 连接缓冲液(10 \times) 3 μ L。连接后形成的产物为 pUC18-DA 和 pUC18-*DJ-1*。

3.5 大肠杆菌转化株的获取及筛选

将 100 μ L 电感受态 *E. coli* DH5 α 细胞与 15 μ L pUC18-DA 或 pUC18-*DJ-1* 连接产物混合, 再将此混合物加入提前预冷的电脉冲小槽(Gene pulser), 以 25 μ F 电容, 2.5 kV 电势和 200 电阻进行电脉冲, 然后立即将 1 mL 冷 SOC 培养液加入混合液, 将此混合液转入 10 mL 试管 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h。将培养的细胞进行不同浓度稀释, 然后按照浓度梯度培养法接种到含 100 μ g/mL 阿莫西林的 LB 培养基上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 利用蓝-白斑法对转化株进行筛选(张青云等, 2016)。

3.6 盘基网柄菌 *DJ-1* 真核表达载体的提取、纯化及序列测定

将大肠杆菌筛选的转化株进行重组原核表达载体的抽提, 经限制性内切酶酶切和琼脂糖凝胶电泳检测确认后, 利用 PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kit 和 PureLink™ HiPure Precipitator Module 的使用说明进行大规模质粒表达载体的提取和纯化, 纯化的重组质粒载体用 400 μ L TE 缓冲液进行洗脱, 并由澳大利亚 AAGRF 公司进行测序, 测序结果利用 Bioedit 软件和参考序列进行 BLAST 比对分析。

3.7 原核表达载体和盘基网柄菌质粒载体的限制性酶切与连接

将参考序列确认无误的 pUC18-DA 和 pUC18-

DJ-1 与盘基网柄菌的质粒 pDNeo2 和 pPROF267 利用引物设计中第二个限制性内切酶 *Sac* 和 *Bam*H 或者 *Cla* 和 *Xho* 进行酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测、抽提和纯化, 利用“3.4”小节的连接反应体系进行连接, 并对连接的方向进行酶切和琼脂糖凝胶电泳检测, 形成新的重组真核表达载体 pDNeo2-DA 和 pPROF267-*DJ-1*。

作者贡献

陈苏维是项目的构思者及负责人, 是本研究的实验设计者和实验研究的执行人, 完成数据分析、论文写作与修改; 崔钰莹参与实验设计和试验结果分析。二位作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由澳大利亚 Australian Research Council (DP140104276)、陕西省教育厅(18JK0017)和教育部(201911397005)共同资助。

参考文献

- Annesi G., Savettieri G., Pugliese P., D'Amelio M., Tarantino P., Ragonese P., La Bella V., Piccoli T., Civitelli D., Annesi F., Fierro B., Piccoli F., Arabia G., Caracciolo M., Cirò Candiano I.C., and Quattrone A., 2005, DJ-1 mutations and parkinsonism-dementia-amyotrophic lateral sclerosis complex, *Ann. Neurol.*, 58(5): 803-807.
- Annesley S.J., Chen S., Francione L.M., Sanislav O., Chavan A. J., Farah C., De Piazza S.W., Storey C.L., Ilievska J., Fernando S.G., Smith P.K., Lay S.T., and Fisher P.R., 2014, *Dictyostelium*, a microbial model for brain disease, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1840(4): 1413-1432.
- Bonifati V., Rizzu P., van Baren M.J., Schaap O., Breedveld G.J., Krieger E., Dekker M.C., Squitieri F., Ibanez P., Joosse M., van Dongen J.W., Vanacore N., van Swieten J.C., Brice A., Meco G., van Duijn C.M., Oostra B.A., and Heutink P., 2003, Mutations in the *DJ-1* gene associated with autosomal recessive early-onset Parkinsonism, *Science*, 299(5604): 256-259.
- Canet-Avilés R.M., Wilson M.A., Miller D.W., Ahmad R., McLendon C., Bandyopadhyay S., Baptista M.J., Ringe D., Petsko G.A., and Cookson M.R., 2004, The parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(24): 9103-9108.
- Chen J., Li L., and Chin L.S., 2010, Parkinson disease protein

- DJ-1 converts from a zymogen to a protease by carboxyl-terminal cleavage, *Hum. Mol. Genet.*, 19(12): 2395-2408.
- Chen S.W., Annesley S.J., Jasim R.A.F., Musco V.J., Sanislav O., and Fisher P.R., 2017, The parkinson's disease-associated protein DJ-1 plays a positive nonmitochondrial role in endocytosis in *Dictyostelium* cells, *Dis. Model. Mech.*, 10(10): 1261-1271.
- Ferguson L.W., Rajput A.H., and Rajput A., 2016, Early-onset vs. late-onset parkinson's disease: a clinical-pathological study, *Can. J. Neurol. Sci.*, 43(1): 113-119.
- Fu K., Wang Y.F., Guo D.K., Wang G.H., and Ren H.G., 2017, Familial parkinson's disease-associated I166P mutant DJ-1 is cleaved by mitochondrial serine protease omi/htrA2, *Neurosci. Bull.*, 33(6): 685-694.
- Gan L., Johnson D.A., and Johnson J.A., 2010, Keap1-nrf2 activation in the presence and absence of DJ-1, *Eur. J. Neurosci.*, 31(6): 967-977.
- Keeney P.M., Xie J., Capaldi R.A., and Bennett J.P., 2006, Parkinson's disease brain mitochondrial complex has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled, *J. Neurosci.*, 26(19): 5256-5264.
- Li L.L., Li H.H., Jia Y.N., and Bao B., 2017, Research progress of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of Parkinson's disease, *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 36(2): 523-530. (李莉莉, 利慧华, 贾亚楠, 鲍波, 2017, 内质网应激在帕金森病发病机制中的研究进展, *基因组学与应用生物学*, 36(2): 523-530.)
- Pringsheim T., Jette N., Frolkis A., and Steeves T.D., 2014, The prevalence of parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis, *Mov. Disord.*, 29(13): 1583-1590.
- Smith K.M., and Dahodwala N., 2014, Sex differences in parkinson's disease and other movement disorders, *Exp. Neurol.*, 259(3): 44-56.
- Thomas K.J., McCoy M.K., Blackinton J., Beilina A., van der Brug M., Sandebring A., Miller D., Maric D., Cedazo-Minguez A., and Cookson M.R., 2011, DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy, *Hum. Mol. Genet.*, 20(1): 40-50.
- van Duijn C.M., Dekker M.C., Bonifati V., Galjaard R.J., Houwing-Duistermaat J.J., Snijders P.J., Testers L., Breedveld G. J., Horstink M., Sandkuijl L.A., van Swieten J.C., Oostra B. A., and Heutink P., 2001, Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36, *Am. J. Hum. Genet.*, 69(3): 629-634.
- Williams R.S., Boeckeler K., Graf R., Müller-Taubenberger A., Li Z., Isberg R.R., Wessels D., Soll D.R., Alexander H., and Alexander S., 2006, Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*, *Trends Mol. Med.*, 12(9): 415-424.
- Yao Y.L., Xing S.L., Hu X.W., Xu L., and Liu Y., 2015, Isolation and characterization of Cu/Zn superoxide dismutase gene in *Saccharum arundinaceum* Retz, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 13(10): 2362-2368. (姚艳丽, 邢淑莲, 胡小文, 徐磊, 刘洋, 2015, 斑茅铜锌超氧化物歧化酶基因 (*SaSOD-1*) 的克隆与序列分析, *分子植物育种*, 13(10): 2362-2368.)
- Zhang Q.Y., Sun Q.X., Tang Y.Y., Wang X.Z., Wu Q., Wang Y. Y., Cao G.Y., Qi X., and Wang C.T., 2016, Cloning and expression vector construction of *AhCDPK32* gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 14(5): 1171-1178. (张青云, 孙全喜, 唐月异, 王秀贞, 吴琪, 王云云, 曹广英, 祁雪, 王传堂, 2016, 花生 *AhCDPK32* 基因克隆及表达载体的构建, *分子植物育种*, 14(5): 1171-1178.)
- Zhou J., and Luo H.Y., 2018, Estrogen intervention effects the nigrostriatal DRP1 expression in subacute MPTP PD mice model, *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 37(4): 1705-1712. (周洁, 罗海彦, 2018, 雌激素干扰急性 MPTP 小鼠模型黑质纹状体 DRP1 表达, *基因组学与应用生物学*, 37(4): 1705-1712.)
- Zhou W., Zhu M., Wilson M.A., Petsko G.A., and Fink A.L., 2006, The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein, *J. Mol. Biol.*, 356(4): 1036-1048.

(责任编辑 罗厚枚)