



精神分裂症易感基因DISC1重组质粒pmirGLO-DISC1 3' UTR的构建和分析

宋红涛, 焦东亮, 王立金, 沐林林, 王文娟, 宋佩佩, 翟长平, 何震

引用本文:

宋红涛, 焦东亮, 王立金, 等. 精神分裂症易感基因DISC1重组质粒pmirGLO-DISC1 3'UTR的构建和分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(1): 26-29.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.01.006>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

精神分裂症病人外周血差异表达miRNA-181b的生物信息学分析

Bioinformatics analysis of the differential expression of miRNA-181 b in peripheral blood of schizophrenic patients

蚌埠医学院学报. 2019, 44(2): 173-177 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.02.010>

伴迟发性运动障碍的慢性精神分裂症病人认知功能状况分析

Analysis of the cognitive function in chronic schizophrenic patients complicated with tardive dyskinesia

蚌埠医学院学报. 2020, 45(2): 255-258 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.02.033>

奥氮平对伴或不伴代谢综合征的精神分裂症病人认知功能的差异性影响分析

Effect of olanzapine on the cognitive function of schizophrenic patients complicated with or without metabolic syndrome

蚌埠医学院学报. 2019, 44(8): 1027-1029 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.08.013>

手工制作对慢性精神分裂症病人自我效能感及自尊水平的影响

蚌埠医学院学报. 2020, 45(4): 554-556 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.04.035>

精神分裂症病人维生素D缺乏与血脂异常的相关性研究

Association between vitamin D deficiency and dyslipidemia in patients with schizophrenia

蚌埠医学院学报. 2018, 43(1): 20-22,26 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.01.006>

精神分裂症易感基因 DISC1 重组质粒 pmirGLO-DISC1 3'UTR 的构建和分析

宋红涛¹, 焦东亮¹, 王立金¹, 沐林林¹, 王文娟¹, 宋佩佩¹, 翟长平², 何震³

[摘要] 目的: 构建精神分裂症断裂基因 1 (DISC1) 重组质粒 pmirGLO-DISC1 3'UTR, 分析和鉴定该重组质粒。方法: 通过生物信息学分析精神分裂症病人差异表达 miRNA-181b-5p 与精神分裂症易感基因 DISC1 的结合位点, 选取包含结合位点在内的上下游 200 bp 长度序列 DISC1 3'UTR (1.26 kb-WT) 人工合成目的基因, 将合成的目的基因导入 H343 pmirGLO 空载体构建 pmirGLO-DISC1 3'UTR, 对构建的重组质粒进行分析和鉴定。结果: 测序结果显示, DISC1 3'UTR (1.26 kb-WT) 基因成功插于 H343 pmirGLO 质粒, pmirGLO-DISC1 3'UTR 序列正确, 与目标序列比较覆盖度为 84%, 相似度为 100%。结论: 成功构建了精神分裂症易感基因 DISC1 重组质粒 pmirGLO-DISC1 3'UTR, 为 miRNA-181b-5p 调控精神分裂症易感基因 DISC1 奠定了基础, 可用于后续研究。

[关键词] 精神分裂症; 精神分裂症断裂基因 1; 微小 RNA181b-5p; 重组质粒

[中图分类号] R 749.3

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.01.006

Construction and analysis of recombinant plasmid pmirGLO-DISC1 3'UTR of schizophrenia susceptibility gene DISC1

SONG Hong-tao¹, JIAO Dong-liang¹, WANG Li-jin¹, MU Lin-lin¹, WANG Wen-juan¹, SONG Pei-pei¹, ZHAI Chang-ping², HE Zhen³

(1. School of Mental Health, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030; 2. Department

of Science and Education, 3. Department of Psychiatry, Anhui Province Veterans Hospital, Bengbu Anhui 233400, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the recombinant plasmid of the disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) pmirGLO-DISC1 3'UTR, then analyze and identify the recombinant plasmid. **Methods:** The binding sites of differentially expressed miRNA-181b-5p in schizophrenia and schizophrenia susceptibility gene DISC1 were analyzed by bioinformatics. The upstream and downstream 200 bp length sequence of DISC1 3'UTR (1.26 kb-WT) including the binding sites was selected and synthesized. The synthesized target gene was inserted into H343pmirGLO plasmid to construct pmirGLO-DISC1 3'UTR, which was analyzed and identified. **Results:** The sequencing results showed that the DISC1 3'UTR (1.26 kb-WT) gene was successfully inserted into the H343pmirGLO plasmid. The pmirGLO-DISC1 3'UTR sequence was correct. Compared with the target sequence, the query cover of pmirGLO-DISC1 3'UTR sequence was 84% and the identity was 100%. **Conclusions:** The recombinant plasmid pmirGLO-DISC1 3'UTR is successfully constructed, which lays a foundation for the regulation of schizophrenia susceptibility gene DISC1 by miRNA-181b-5p and can be used in follow-up study.

[Key words] schizophrenia; disrupted in schizophrenia 1; miRNA-181b-5p; recombinant plasmid

精神分裂症断裂基因 1 (DISC1) 是目前较明确的精神分裂症易感基因之一, 其首次在一个具有染色体平衡易位的苏格兰精神疾病高发家系中被发现, 后续研究^[1]显示, DISC1 与精神分裂症存在明显相关关系。精神分裂症的遗传模式复杂, 难以用单纯的遗传因素来解释, 目前认为可能是遗传因素和环境因素两者相互作用共同导致了精神分裂症的发生, 表观遗传学解释了在不改变基因型的情况下环

境因素是如何致病的。微小 RNA (miRNA) 作为表观遗传学的一员, 可以靶向结合目标 mRNA 负性调控众多基因。精神分裂症关联的 miRNA 中, miRNA-181b 表达和调控的异常与精神分裂症的发生和发展的密切关联已有报道^[2-4]。miRNA-181b 可能通过抑制 DISC1 基因及其蛋白的表达, 影响突触和神经元的发育, 在精神分裂症的发病过程中起重要作用。本研究拟通过生物信息学分析精神分裂症病人差异表达 miRNA-181b-5p 与精神分裂症易感基因 DISC1 的结合位点, 选取包含结合位点在内的上下游 200 bp 长度序列 DISC1 3'UTR (1.26 kb-WT) 人工合成目的基因, 将合成的目的基因导入 H343 pmirGLO 空载体构建 pmirGLO-DISC1 3'UTR, 对构建的重组质粒进行分析和鉴定, 以期为 miRNA-181b-5p 调控精神分裂症易感基因 DISC1 的机制研

[收稿日期] 2020-08-14 [修回日期] 2021-11-29

[基金项目] 蚌埠医学院自然科学基金重点项目 (BYKY1814ZD)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 精神卫生学院, 安徽 蚌埠 233030; 安徽省荣军医院 2. 科教科, 3. 精神科, 安徽 蚌埠 233400

[作者简介] 宋红涛 (1985-), 男, 硕士, 讲师。

[通信作者] 何震, 副主任医师。E-mail: lianxiangheyu@163.com

究提供基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与材料 超微量分光光度计(北京凯奥科技发展有限公司, K5600 型), PCR 仪(Applied Biosystems, 2720 thermal cycler), 凝胶成像分析仪(培清科技, JS-680D 型), DNA 电泳槽(上海天能科技有限公司, HE-120 型)。

H343 pmirGLO 质粒和 DH5 α 感受态细胞及和元无缝克隆试剂盒来自和元生物技术(上海)股份

有限公司, AxyPrep 质粒 DNA 小量抽提试剂盒来自爱思进生物技术(杭州)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因合成 通过生物信息学分析精神分裂症病人差异表达 miRNA-181b-5p 与精神分裂症易感基因 DISC1 的结合位点, TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 预测到 2 个结合位点(见图 1), 选取包含结合位点在内的上下游 200 bp 长度序列 DISC1 3'UTR(1.26 kb-WT)人工合成目的基因。

Position 2174-2180 of DISC1 3' UTR	5' ...CAAAGCACAUAUGUGAAUGUG... 3' UGGGUGGCUGUCGUU-ACUUACAA	7mer-m8
hsa-miR-181b-5p		
Position 2174-2180 of DISC1 3' UTR	5' ...CAAAGCACAUAUGUGAAUGUG... 3' UGGGUGGCUGUCGUU-ACUUACAA	7mer-m8
hsa-miR-181d-5p		
Position 3027-3033 of DISC1 3' UTR	5' ...UGGGAUGUUUAUGAGAAUGUAA... 3' GUCCAUCAGACUUACAG	7mer-A1
hsa-miR-4262		
Position 3027-3033 of DISC1 3' UTR	5' ...UGGGAUGUUUAUGAGAAUGUAA... 3' UGAGUGGCUGUCGCACUUACAA	7mer-A1
hsa-miR-181a-5p		
Position 3027-3033 of DISC1 3' UTR	5' ...UGGGAUGUUUAUGAGAAUGUAA... 3' UGGGUGGCUGUCGUUACUUACAA	7mer-A1
hsa-miR-181b-5p		

图1 hsa-miRNA-181b-5p与靶基因DISC1 3'UTR结合位点预测

1.2.2 制备线性化表达载体 在限制性内切酶的作用下酶切表达载体, 酶切反应体系如下: 2 μ g 质粒, 10 \times 反应 Buffer 5 μ L 和 1 μ L 限制性内切酶, 用纯水稀释至 50 μ L, 然后在 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 2 h 以上。利用琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物的酶切效果, 并从琼脂糖凝胶电泳后的胶中切割出目的载体条带, 采用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 3.0 对切割的条带进行回收。

1.2.3 目的基因构建入线性化表达载体 将目的基因片段和线性化载体按照 2:1 比例添加到离心管中, 在无缝克隆试剂盒作用下进行重组反应 30 min, 将反应后的产物转移到冰上冷却 5 min。反应产物可以直接用于转化, 也可冷藏于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.4 转化和 PCR 鉴定 (1) 取具有抗生素抗性的质粒 2 μ L 放入 100 μ L DH5 α 感受态细胞中, 将上述混合液放在冰上冷却 30 min; (2) 将混合液在 42 $^{\circ}$ C 环境下热激 90 s 后, 立即放置在冰上, 冷却 2 min; (3) 加入 1 mL LB 液体培养基至管中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 30min, 活化细菌; (4) 取 50 mL 菌液涂平板(如果转化效率低, 可多取菌液或离心弃上清取下层涂板; 涂菌棒在酒精灯上烘烤之后应搁置稍凉后再涂板, 以防杀死细胞), 涂板时, 感受态涂两个, 有抗性, 无抗性, 转化后菌液涂一个有抗性(涂板后

的平板先正放一会, 干燥菌液后将其倒置在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养); (5) 选取平板上培养出的转化子, 将其重悬于 10 μ L LB 培养液中, 从中选取 1 μ L 模板进行菌落 PCR 鉴定。

1.2.5 阳性克隆鉴定和质粒小提 菌落鉴定得到的阳性克隆, 送样本到和元生物技术(上海)股份有限公司进行测序验证, 比对测序结果并分析, 测序通过的阳性克隆, 采用 AxyPrep 质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒。

2 结果

2.1 pmirGLO-DISC1 3'UTR 质粒图谱 以“Luc2-C-F GTG GTG TTG TGT TCG TGG AC”为正向测序引物, “SV40pA-F GCA ATA GCA TCA CAA ATT TC”为反向测序引物, *Nhe* I 和 *Sal* I 分别为上下游克隆酶切位点, H343 pmirGLO 为空载体, 将合成的目的基因 DISC1 3'UTR(1.26 kb-WT)置于空载体中, 构建 pmirGLO-DISC1 3'UTR 质粒(见图 2)。

2.2 测序结果在 NCBI/BLAST 数据库中的比较和分析 将 pmirGLO-DISC1 3'UTR 质粒的克隆序列与 NCBI/BLAST 数据库中的 DISC1 3'UTR(1.26 kb-WT)序列分别推导出来的开放阅读框进行比对(dnman1; 送测序的 pmirGLO-DISC1 3'UTR 质粒克

用于后续研究。

[参 考 文 献]

- [1] SOEKER MS, TRUTER T, VAN WILGEN N, *et al.* The experiences and perceptions of individuals diagnosed with schizophrenia regarding the challenges they experience to employment and coping strategies used in the open labor market in Cape Town, South Africa [J]. *Work*, 2019, 62(2):221.
- [2] QU M, TANG F, YUE W, *et al.* Positive association of the Disrupted-in-Schizophrenia-1 gene (DISC1) with schizophrenia in the Chinese Han population [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007, 144B(3):266.
- [3] HWU HG, LIU CM, FANN CS, *et al.* Linkage of schizophrenia with chromosome 1q loci in Taiwanese families [J]. *Mol Psychiatry*, 2003, 8(4):445.
- [4] BEVERIDGE NJ, CAIRNS MJ. MicroRNA dysregulation in schizophrenia [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(2):263.
- [5] SCHUMACHER J, LAJE G, ABOU JAMRA R, *et al.* The DISC locus and schizophrenia: evidence from an association study in a central European sample and from a meta-analysis across different European populations [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(14):2719.
- [6] TOMPPA L, HENNAH W, MIETTUNEN J, *et al.* Association of variants in DISC1 with psychosis-related traits in a large population cohort [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2009, 66(2):134.
- [7] 简崇东. 小鼠胚胎内 DISC1 基因功能干扰对成年后行为、脑代谢和中间神经元发育的影响 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2018.
- [8] 王兆涛, 徐如祥, 马全红, 等. 过表达精神分裂断裂基因 1 对

APP/PS1 转基因阿尔茨海默病小鼠突触可塑性及学习记忆能力的改善 [J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(9):1117.

- [9] 任君, 赵天, 韩玉英, 等. DISC1 基因及其编码蛋白的结构、功能与精神分裂症的相关研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2014, 45(6):442.
- [10] DEMPSTER EL, PIDSLEY R, SCHALKWYK LC, *et al.* Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(24):4786.
- [11] CAO T, ZHEN XC. Dysregulation of miRNA and its potential therapeutic application in schizophrenia [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(7):586.
- [12] BEVERIDGE NJ, TOONEY PA, CARROLL AP, *et al.* Dysregulation of miRNA 181b in the temporal cortex in schizophrenia [J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(8):1156.
- [13] BRAUNEWELL KH, DWARY AD, RICHTER F, *et al.* Association of VSNL1 with schizophrenia, frontal cortical function, and biological significance for its gene product as a modulator of cAMP levels and neuronal morphology [J]. *Transl Psychiatry*, 2011, 1(7):e22.
- [14] TUCHOLSKI J, SIMMONS MS, PINNER AL, *et al.* Abnormal N-linked glycosylation of cortical AMPA receptor subunits in schizophrenia [J]. *Schizophr Res*, 2013, 146(1/3):177.
- [15] LIU S, ZHANG F, WANG X, *et al.* Diagnostic value of blood-derived microRNAs for schizophrenia: results of a meta-analysis and validation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):15328.

(本文编辑 卢玉清)

(上接第 25 页)

[参 考 文 献]

- [1] GALDERISI M. Diastolic dysfunction and diabetic cardiomyopathy: evaluation by Dopple echocardiography [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48(8):1548.
- [2] 黄巧丽, 周华, 李涛. Wnt 信号通路与心脏发育和心肌诱导分化 [J]. *浙江师范大学学报 (自然科学版)*, 2016, 39(3):331.
- [3] EHLUND A, MEJHERT N, LORENTE-CEBRIÁN S, *et al.* Characterization of the wnt inhibitors secreted frizzled-related proteins (SFRPs) in human adipose tissue [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(3):E503.
- [4] TAO H, YANG JJ, SHI KH, *et al.* Wnt signaling pathway in cardiac fibrosis: new insights and directions [J]. *Metabolism*, 2016, 65(2):30.
- [5] 高波. 丹参的药理分析及临床应用研究 [J]. *中国卫生标准管理*, 2016, 7(9):119.
- [6] 陈梅. 丹参分散片的质量研究 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2015, 40(8):1096.
- [7] SREEJIT P, KUMAR S, VERMA RS. An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 2008, 44(3/4):45.
- [8] LEASK A, PARAPURAM SK, SHI WX, *et al.* Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical biomarker of fibroprolifer active disease [J]. *J Cell Commun Signal*, 2009, 3(2):89.
- [9] 高兵. 丹参的药理作用及临床应用分析 [J]. *中国现代药物应用*, 2018, 12(1):196.
- [10] 孙宇远, 朱雪林, 陈君. 丹参化学成分抗纤维化药理作用及机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(22):201.

- [11] 王涵, 杨娜, 谭静, 等. 丹参化学成分、药理作用及临床应用的研究进展 [J]. *特产研究*, 2018, 40(1):48.
- [12] 蒲翔, 姚元贵, 谢宇, 等. 丹参破壁饮片、传统饮片中水溶性成分对心肌细胞保护作用对比研究 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(6):1354.
- [13] 张飞飞, 党懿, 郝清卿, 等. 心脏收缩力调节对转化生长因子 $\beta 1$ /结缔组织生长因子信号通路的影响 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2018, 20(5):525.
- [14] 高嘉梦, 胡兵, 申镠. 心肌成纤维细胞转分化与糖尿病心肌病的研究进展 [J]. *中华心血管病杂志*, 2020, 48(10):885.
- [15] GOLDSMITH EC, BRADSHAW AD, SPINALE FG. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 2. contributory pathways leading to myocardial fibrosis: moving beyond collagen expression [J]. *Am J Physiol*, 2013, 304(5):C393.
- [16] MAC DONALD BT, TAMAI K, HE X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1):9.
- [17] PENKE LR, PETERS GM. Molecular determinants of mesenchymal cell activation in fibroproliferative diseases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(21):4179.
- [18] SHARMA AK, THANIKACHALAM PV, BHATIA S. The signaling interplay of GSK-3 β in myocardial disorders [J]. *Drug discov today*, 2020, 25(4):633.
- [19] 张建奇, 张明, 吴熙, 等. Elabela-APJ 轴在心血管系统疾病中的作用 [J]. *国际心血管病杂志*, 2020, 47(5):281.
- [20] VALLÉE A, LECARPENTIER Y. TGF- β in fibrosis by acting as a conductor for contractile properties of myofibroblasts [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9(1):98.

(本文编辑 赵素容)