

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810037698.9

[51] Int. Cl.  
G12N 15/12 (2006.01)  
G12Q 1/68 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 21/64 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 8 日

[11] 公开号 CN 101280306A

[22] 申请日 2008.5.20

[21] 申请号 200810037698.9

[71] 申请人 上海大学

地址 200444 上海市宝山区上大路 99 号

[72] 发明人 文铁桥 吴翌臻 钱仁红

[74] 专利代理机构 上海上大专利事务所  
代理人 何文欣

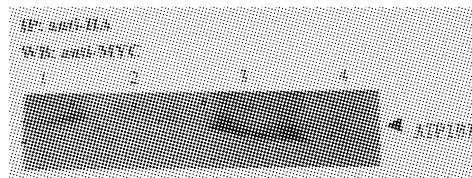
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

## [54] 发明名称

与神经干细胞分化相关基因 DCF1 的新用途

## [57] 摘要

本发明涉及一种神经干细胞分化相关基因 DCF1 的新用途。本发明利用酵母双杂交技术筛选到了与 DCF1 相互作用的蛋白 ATP1B1，并用细胞荧光共定位，免疫共沉淀证实其相互作用。据文献报道，ATP1B1 与 BACE1 存在相互作用，而 BACE1 是 AD (阿兹海默病) 发生发展的关键基因。用 RNAi 的手段将 DCF1 沉默后，ATP1B1 与 BACE1 的表达也发生了显著变化，以上这些结果证明 DCF1 通过某种信号通路能调控 BACE1 的表达，DCF1 与 AD 的发生发展存在着某种联系，其有可能成为 AD 治疗的新的药物作用靶点，发现 DCF1 与 ATP1B1 的相互作用，对了解 AD 发生发展过程中的信号传导机制具有重要的意义。



1. 神经干细胞分化相关基因 DCF1 在调节  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATP 酶  $\beta 1$  亚基蛋白表达中的应用。
2. 神经干细胞分化相关基因 DCF1 在调节与阿兹海默病有关的基因 BACE1 的表达中的应用。

## 与神经干细胞分化相关基因 DCF1 的新用途

### 技术领域

本发明涉及一种与神经干细胞分化相关基因 DCF1 的新用途。

### 发明背景

神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 可自我复制并具有多向分化潜能, 在中枢神经系统损伤及退行性疾病的治疗中具有重要的应用价值。将神经干细胞移植到受损部位, 可分化成机体的特定神经细胞, 完成特定的神经功能。然而神经干细胞移植存在诸多技术上的难题, 其中移植后神经干细胞分化并参与神经网络重建的能力成为人们关注的焦点。阐明神经干细胞的分化机制对于解决以上问题有重要理论意义和实用价值。

在神经干细胞中, 树突细胞因子 (dendritic cell factor 1, DCF1) 基因的功能未见报道。研究发现 DCF1 基因在未分化的神经干细胞中高表达而在终末分化的神经细胞中表达量很低 (Tieqiao Wen, Ping Gu and Fuxue Chen (2002) Discovery of two novel functional genes from differentiation of neural stem cells in the striatum of the fetal rat. *Neuroscience Letters* 329:101 - 105), 由此推测此基因可能与神经干细胞的分化有关; 随后克隆并在小鼠神经干细胞中过量表达此基因, 发现与对照组相比, 过量表达 DCF1 基因的细胞轴突生长被抑制, DCF1 基因可维持神经干细胞的状态。而抑制 DCF1 的表达, 则神经干细胞能发生分化。为了进一步研究 DCF1 基因在神经系统中的功能及其作用的分子机制, 本发明利用酵母双杂交技术筛选与 DCF1 相互作用的蛋白, 并用细胞荧光共定位, 免疫共沉淀证实其相互作用。并用 RNAi 的手段探讨 DCF1 沉默后, AD (阿兹海默病) 相关基因的表达变化。

### 发明内容

本发明的目的之一在于提供一种神经干细胞分化相关基因 DCF1 在调节  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATP 酶  $\beta 1$  亚基蛋白表达中的应用。

本发明的目的之二在于提供一种神经干细胞分化相关基因 DCF1 在调节与阿兹海默病有关的基因 BACE1 的表达中的应用。

本发明用 PCR 从小鼠脑 cDNA 中克隆到 DCF1 完整阅读框的 cDNA, 并将其重组入酵母双杂交系统的克隆载体 pGBKT7, 构建成 pGBKT7-DCF1, 构建的诱饵质粒 pGBKT7-DCF1 对宿主菌 AH109 没有毒性作用, 也没有自激活报告基因表达的能力。

将诱饵质粒 pGBKT7-DCF1 与小鼠脑 cDNA 文库质粒共转化酵母 AH109, 在营养缺陷型培养基上筛选阳性克隆, 并送测序。测序得到的有意义的结果再次与诱饵质粒回交, 排除假阳性, 得到 ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide (缩写为 ATP1B1) 为阳性。将 DCF1 和 ATP1B1 分别构建到荧光共定位载体, 转染 C17.2 细胞后用激光共聚焦显微镜观察。将 DCF1 和 ATP1B1 分别构建到免疫共沉淀载体, 进行免疫共沉淀。细胞荧光共定位和免疫共沉淀均证明了 DCF1 和 ATP1B1 的相互作用。据文献报道, ATP1B1 与 BACE1 存在相互作用, 而 BACE1 是 AD (阿兹海默病) 的关键基因, 因此 DCF1 可能也与 AD 有着某种关系。用 RNAi 技术沉默 DCF1, 发现 ATP1B1 的表达大幅下调, ATP1B1 相关基因 BACE1 的表达也大幅下调。以上这些结果证明 DCF1 通过某种信号通路能调控 BACE1 的表达, DCF1 与 AD 的发生发展存在着某种联系, 其有可能成为 AD 治疗的新的药物作用靶点, 发现 DCF1 与 ATP1B1 的相互作用对了解 AD 发生发展过程中的信号传导机制具有重要的意义。

#### 附图说明

图 1 为 pGBKT7 表达载体 EcoRI 和 SalI 双酶切电泳图(1-未插入片段的 pGBKT7 表达载体; 2-插入片段的 pGBKT7 表达载体; 3-DCF1 片段), 说明 DCF1 基因已插入 pGBKT7 载体中

图 2 为  $\beta$ -半乳糖苷酶活性滤膜影印分析, 其中第 1-3 列为 Yeast pGBKT7-DCF1, 第 4 列为阴性对照, 第 5 列为阳性对照, 说明 AH109(pGBKT7-DCF1) 没有  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。

图 3 为检测  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的表达

图 4 为 pDSRED2 载体 EcoRI 和 BamHI 双酶切电泳图 (1:marker 2: pDSRED2-ATP1B1 重组质粒 3: pDSRED2-C1 空质粒) 说明 ATP1B1 已插入 pDSRED2 载体中

图 5 为荧光共定位图 (左上:绿色激发光下 右上:红色激发光下 左下:明视野 右下:左上图与右上图 MERGE) 说明 DCF1 和 ATP1B1 能在细胞质中呈现完全的共定位

图 6 为 pCMV-HA 和 pCMV-MYC 载体 EcoRI 和 BglIII 双酶切电泳图 (1: pCMV-HA-DCF1 重组质粒 2: pCMV-HA 空质粒 3:pCMV-MYC-ATP1B1 重组质粒 4: pCMV-MYC 空质粒 5:marker) 说明 DCF1 和 ATP1B1 已插入 pCMV-HA 和 pCMV-MYC 载体中

图 7 免疫共沉淀图 (1.HA-DCF1 和 MYC-ATP1B1 蛋白免疫共沉淀样品 2. 空白

3. C17.2 细胞表达 MYC-ATP1B1 蛋白的细胞裂解上清液, 作为阳性对照 4. HA 和 MYC-ATP1B1 蛋白免疫共沉淀样品, 作为阴性对照) 说明 DCF1 和 ATP1B1 能发生免疫共沉淀

### 具体实施方式

#### 实施例一: 诱饵质粒 pGBKT7-DCF1 的构建与鉴定

利用 Premier 5.0 软件设计 DCF1 的上游和下游引物, 在其上游和下游引物中分别引入 EcoRI 和 SalI 的酶切位点。此对引物由上海生工合成。以小鼠脑 cDNA 为模板, 用合成的上游和下游引物扩增 DCF1 全长 cDNA, EcoR I 和 SalI 双酶切、连接到同样经 EcoR I 和 SalI 双酶切的 pGBKT7 载体中。酶切, PCR 鉴定, 测序正确, 见图 1。AH 109(pGBKT7-DCF1) 在 SD/-Trp/-His 不能生长, 在  $\beta$ -半乳糖苷酶活性滤膜影印分析中, 8 小时内菌落保持白色, 没有变蓝, 见图 2。提示 pGBKT7-DCF1 质粒没有自身激活报告基因的表达。可用于后续的实验。

#### 实施例二: 小鼠脑 cDNA 文库的筛选

纯化后的小鼠脑 cDNA 文库质粒和 pGBKT7-DCF1 诱饵质粒共转化酵母细胞 AH109, 从 100 块 SD/-Trp/-Leu (100mm) 上共获得  $5.2 \times 10^7$  个转化子。从平板收集酵母菌并滴定, 其滴度为  $0.59 \times 10^8$ 。取  $1.57 \times 10^8$  个酵母菌涂布于 SD/-Trp-Leu-His 平板, 共长出 1820 个克隆; 将这些克隆使用牙签挑至 SD/-Trp-Leu-His-Ade 平板, 得到 105 个单克隆。用 fliter-assay 检测了这 105 个单克隆  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的表达(蓝白筛选), 结果如图 3 所示, 共有 20 个克隆呈蓝色(即表达  $\beta$ -半乳糖苷酶基因), 为阳性克隆。从上述得到的 20 个阳性克隆中提取含有 pACT2 载体的质粒, 将其分别电转化入大肠杆菌 DH5  $\alpha$  内进行扩增, 提取质粒。将上述得到的非重复片断所对应的克隆送交上海生工进行测序。同源性分析: 在 NCBI 进行 blast 的结果显示有若干序列分别与 ATP synthase F0 subunit 6, DTX3, Creatine Kinase, ATP1B1 等有高度同源性(99%) 将含有以上这些片段的 pACT2 载体与诱饵载体再次共转化酵母 AH109, 进行回交, 结果显示 ATP1B1 仍能与 DCF1 相互作用

#### 实施例三: 荧光共定位验证 DCF1 与 ATP1B1 的相互作用

利用 Premier 5.0 软件设计 ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide 的上游和下游引物, 在其上游和下游引物中分别引入 EcoRI 和 BamHI 的酶切位点。此对引物由上海生工合成。以小鼠脑 cDNA 为模板, 用合成的上游和下游引物扩增 ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide 全长 cDNA, EcoR I 和 BamHI 双酶切,

连接到同样经 EcoR I 和 BamHI 双酶切的 pDSRED2-C1 载体中, 酶切、PCR 鉴定正确, 见图 4。pDSRED2-ATP1B1 与 pEGFP-DCF1(其构建方法, 参见 Lei Wang, Jiao Wang, Yiliu Wu, Jie Wu, Shuya Pang, Rong Pan, Tieqiao Wen(2008) A Novel Function of dcf1 During the Differentiation of Neural Stem Cells In vitro. *Cell Mol Neurobiol*)。共转染 c17.2 神经干细胞系, 24 小时后在激光共聚焦显微镜下观察, 见图 5。pDSRED2-ATP1B1 与 pEGFP-DCF1 共转染细胞后, 两者能共定位于细胞质, 进一步证明了它们的相互作用

#### 实施例四: 免疫共沉淀验证 DCF1 与 ATP1B1 的相互作用

利用 Premier 5.0 软件分别设计 DCF1 和 ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide 的上游和下游引物, 在其上游和下游引物中分别引入 EcoRI 和 BglIII 的酶切位点。以小鼠脑 cDNA 为模板, 用合成的上游和下游引物分别扩增 DCF1 和 ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide 全长 cDNA, 用 EcoRI 和 BglIII 酶切后纯化回收, 加入经相同双酶切的 pCMV-HA 和 pCMV-MYC, 16℃连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。长出菌落后, 按照北京博大泰克公司的小量质粒抽提试剂盒操作说明提取质粒, EcoR I 和 BglIII 双酶切、PCR 鉴定正确, 见图 6。pCMV-HA-DCF1 和 pCMV-MYC-ATP1B1 共转染 c17.2 神经干细胞系, 72 小时后抽提细胞蛋白。在细胞裂解上清液中加入 anti-HA 抗体和 proteinA 进行免疫共沉淀, 将样品经 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 再用 anti-MYC 抗体进行 western blotting. 结果图 7 所示, 当被 anti-HA 抗体沉淀 DCF1 时, ATP1B1 同时被一起沉淀, 而阴性对照组中 pCMV-HA 空载体则不能使 ATP1B1 共沉淀, 这进一步表明 DCF1 和 ATP1B1 的相互作用。

#### 实施例五: RNAi 沉默 DCF1 研究 AD 相关基因的变化

有文献表明 ATP1B1 能与 AD 相关基因 BACE1 相互作用, BACE1 在神经系统中的表达能导致 AD 的发生, 猜测 DCF1 与 BACE1 存在着某种联系, 故用 RNAi 的手段研究 DCF1 沉默后 BACE1, ATP1B1 表达的变化。psiRNA-1, psiRNA-3 (打乱序列), psiRNA(空载体) (以上均为本实验室前期构建, 见参考文献[2]) 用去内毒素试剂盒纯化后, 分别转染 c17.2 细胞, 转染 72 小时后, 分别抽提以上 3 种细胞的 RNA, 反转录, realtimePCR 检测, 并分别检测 beta actin, dcf1, ATP1B1, BACE1 这 4 种基因的表达, 以 beta actin 作为基准计算, psiRNA-1 组, psiRNA-3 组相对于 psiRNA 组的基因表达量, 如表 1 所示, 以上数据可以初步判断, DCF1 的下调对于 ATP1B1 和 BACE1 的表达具有显著影响, DCF1 可能通过某种信号通路调控 BACE1 的表达, 它与 AD 的发生发展存在着某种

联系。

表1 以 beta actin 作为基准计算, psiRNA-1 组, psiRNA-3 组相对于 psiRNA 组的基因表达量图

	<b>psiRNA-1 组</b>	<b>psiRNA-3 组</b>
DCF1	下调 32 倍	上调 4 倍
ATP1B1	下调 512 倍	基本不变
BACE	下调 2000 倍	下调 8 倍

表1 是以 beta actin 作为基准计算, psiRNA-1 组, psiRNA-3 组相对于 psiRNA 组的基因表达量图, 以上数据可以初步判断, DCF1 的下调对于 ATP1B1 和 BACE1 的表达具有显著影响。



图 1

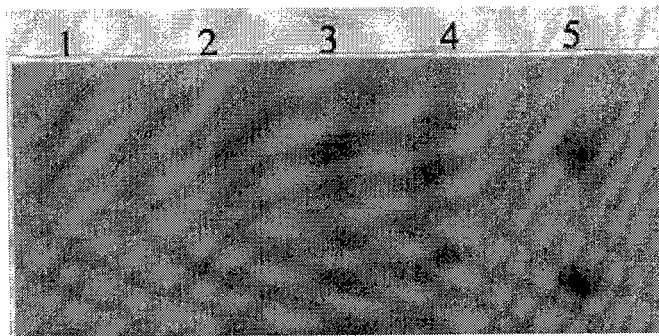


图 2

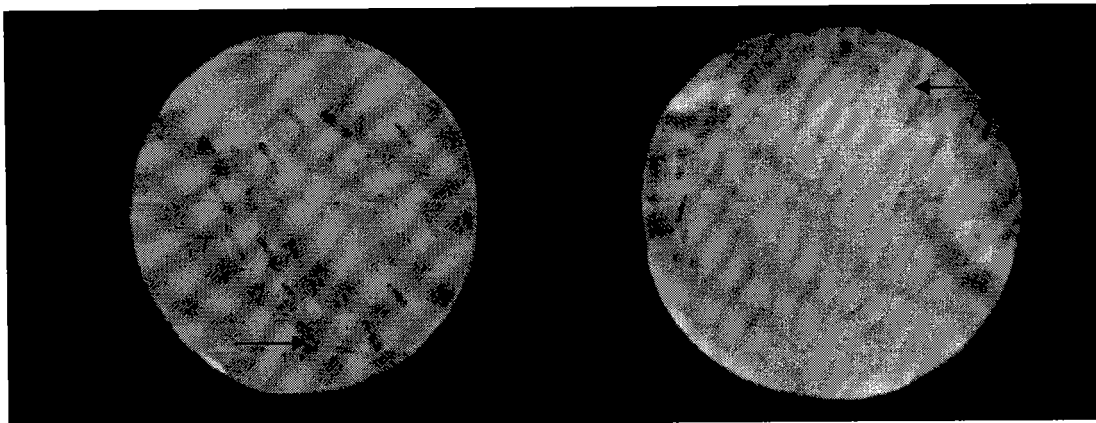


图 3

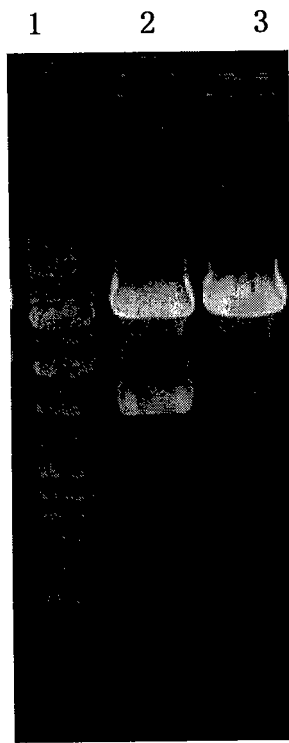


图 4

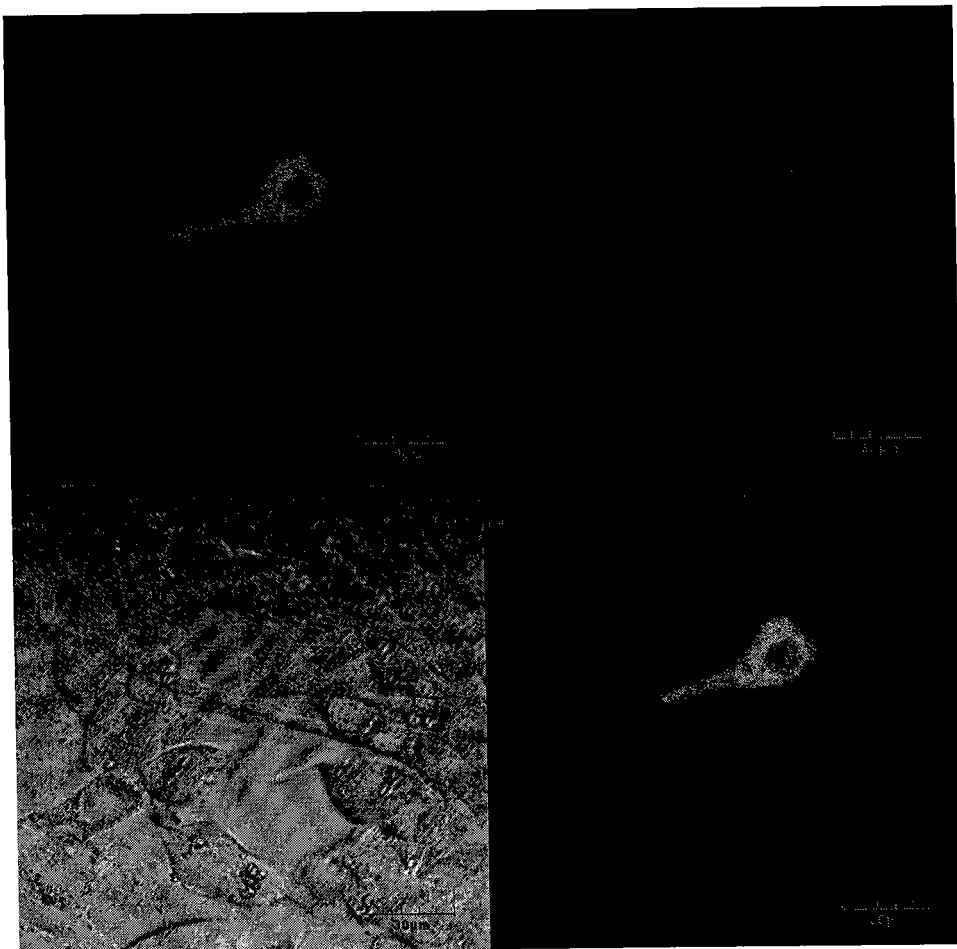


图 5

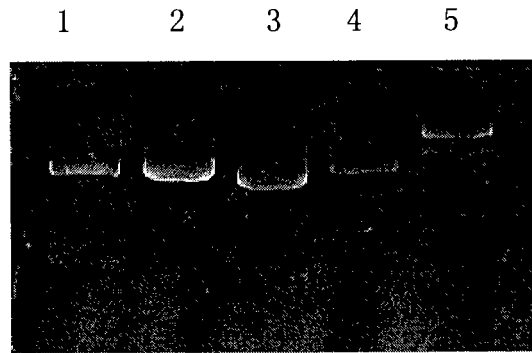


图 6

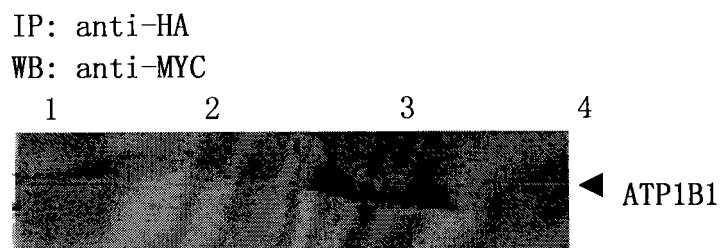


图 7

专利名称(译)	与神经干细胞分化相关基因DCF1的新用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN101280306A</a>	公开(公告)日	2008-10-08
申请号	CN200810037698.9	申请日	2008-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海大学		
申请(专利权)人(译)	上海大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海大学		
[标]发明人	文铁桥 吴翌鎏 钱仁红		
发明人	文铁桥 吴翌鎏 钱仁红		
IPC分类号	C12N15/12 C12Q1/68 G01N33/53 G01N21/64		
代理人(译)	何文欣		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种神经干细胞分化相关基因DCF1的新用途。本发明利用酵母双杂交技术筛选到了与DCF1相互作用的蛋白ATP1B1，并用细胞荧光共定位，免疫共沉淀证实其相互作用。据文献报道，ATP1B1与BACE1存在相互作用，而BACE1是AD(阿兹海默病)发生发展的关键基因。用RNAi的手段将DCF1沉默后，ATP1B1与BACE1的表达也发生了显著变化，以上这些结果证明DCF1通过某种信号通路能调控BACE1的表达，DCF1与AD的发生发展存在着某种联系，其有可能成为AD治疗的新的药物作用靶点，发现DCF1与ATP1B1的相互作用，对了解AD发生发展过程中的信号传导机制具有重要的意义。

