

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2026.08.021

ZAP1 基因过表达转基因果蝇的构建与功能鉴定

栗紫茹, 肖桂然

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:微量金属元素锌稳态与帕金森病(Parkinson's disease, PD)的发生发展密切相关,酵母 ZAP1 转录因子已被鉴定可感知细胞锌状态,可通过增加其靶基因的表达以响应锌缺乏症,然而,ZAP1 与 PD 发生发展是否有关鲜有报道。为了更好地研究 ZAP1 的功能,文章利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增出 ZAP1 基因全长,并将其连接至 pUAST 上构建 pUAST-ZAP1;采用显微注射技术导入果蝇卵,获得 UAS-ZAP1 转基因果蝇,通过 PCR 验证了转基因果蝇构建成功;再利用遗传学和行为学方法研究转基因成功的果蝇在多巴胺能神经元中进行特异性表达的效果,发现过表达 ZAP1 能够挽救鱼藤酮诱导的果蝇攀爬、跳跃能力的降低。该研究结果为探究 ZAP1 基因在鱼藤酮诱导的 PD 模型中的功能奠定了基础。

关键词:ZAP1 基因; 锌; 果蝇; 帕金森病(PD); 鱼藤酮

中图分类号:Q71

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2026)08-1148-05

Construction and functional identification of ZAP1 gene overexpression transgenic *Drosophila*

LI Ziru, XIAO Guiran

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: The homeostasis of trace metal element zinc is closely related to the occurrence and development of Parkinson's disease(PD). The yeast ZAP1 transcription factor has been identified to perceive cellular zinc status and increase the expression of its target gene in response to zinc deficiency. However, there have been few reports on the relationship between ZAP1 and the occurrence and development of PD. In order to better study the function of ZAP1, this paper amplified the full length of the ZAP1 gene using polymerase chain reaction(PCR) and connected it to pUAST to construct pUAST-ZAP1. *Drosophila* eggs were introduced using microinjection technology to obtain UAS-ZAP1 transgenic *Drosophila*. The successful construction of the transgenic *Drosophila* was verified through PCR, and genetic and behavioral methods were used to specifically express the ZAP1 gene in dopaminergic neurons of the transgenic *Drosophila*. Overexpression of ZAP1 was found to rescue the reduced climbing and jumping ability induced by rotenone in *Drosophila*. These findings lay a foundation for further studying the function of ZAP1 gene in rotenone-induced PD.

Key words: ZAP1 gene; zinc; *Drosophila*; Parkinson's disease(PD); rotenone

0 引言

锌是所有生物生长所必需的微量元素,细胞或组织水平的锌过量或缺乏均会引发多种生理障

碍、发育缺陷或疾病^[1-2],因此,机体进化出一系列机制维持锌离子处于平衡的状态,被称为锌稳态。锌稳态主要依赖一系列锌转运蛋白调节细胞内、外锌离子转运以维持稳态^[3]。依据锌离子转运方

收稿日期:2024-04-10;修回日期:2024-05-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32170576)

作者简介:栗紫茹(1998—),女,安徽涡阳人,合肥工业大学硕士生;

肖桂然(1988—),女,山东邹城人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者,E-mail: xiaoguiran.101@163.com.

向,锌转运蛋白可分为 ZIP 和 ZnT2 个家族。锌稳态很大程度上依赖于在转录水平上对 ZIP 和 ZnT 的调节。例如,哺乳动物 *MTF1* (metal regulatory transcription factor 1) 基因编码的转录因子可诱导金属硫蛋白和其他参与金属体内平衡的基因的表达,以响应镉、锌、铜和银等重金属。酵母 *ZAP1* 转录激活因子直接控制许多基因的表达,以响应细胞内锌水平的变化^[4]。

研究发现,锌与帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 之间存在一定的联系,用过量锌喂养大鼠会引发多巴胺能神经元的变性和多巴胺 (DA) 水平的降低^[5]。也有临床研究表明:PD 患者黑质纹状体多巴胺能系统中存在锌蓄积^[6];大脑中的高锌含量导致黑质纹状体通路多巴胺能神经元的选择性和进行性死亡^[7];锌诱导的泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 损伤导致 α -突触核蛋白聚集,从而使多巴胺能神经变性^[8]。由此可见,PD 与锌之间存在密切联系。

黑腹果蝇是最重要的模式生物之一,对生物学的不同领域作出了重要贡献^[9],据报道,75% 的人类疾病基因在果蝇中具有同源基因^[10]。此外,果蝇具有体积小、生命周期短 (约 12 d)、后代数量多、易于培养、突变株多、技术先进等特点,使其成为遗传研究中的理想模式生物^[11]。果蝇中锌代谢研究起步晚,很多代谢机制尚不明确,如锌转运蛋白 ZIP 和 ZnT 的调控机制还有待深入研究。

鱼藤酮是一种广泛使用的农药,是一种特殊的线粒体复合物 I 抑制剂。与其他神经毒素 (如 6-羟基多巴胺、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 和百草枯) 不同,鱼藤酮毒素具有高度亲脂性,容易穿过血脑屏障,不需要任何转运体进入多巴胺能神经元^[12]。鱼藤酮诱导的帕金森神经毒素模型是近期在其他神经毒性药物研究中备受关注的一种模型^[13]。有研究表明,鱼藤酮诱导的 PD 模型比其他实验性 PD 模型具有更多优势,由于它可以通过多巴胺能神经元的选择性变性有效模拟疾病的行为和神经病理学特征^[14];利用鱼藤酮诱导的果蝇 PD 模型被广泛应用于病理药理学研究^[15]。

本研究通过基因工程技术构建 pUAST-*ZAP1* 质粒,采用显微注射技术获得 *ZAP1* 过表达转基因果蝇,并利用鱼藤酮暴露构建 PD 果蝇模型,检测 *ZAP1* 过表达对 PD 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料及仪器

1.1.1 主要材料

攀爬管由 2 个干净的果蝇管构成,两管口倒扣后用胶带缠绕,用刀片把小管一端底部开口便于放置果蝇,管口直径为 1.5 cm,管总长为 16 cm。大肠杆菌感受态菌株 DH5 α 购于北京全式金生物技术有限公司;pUAST 质粒由清华大学生命科学学院周兵实验室馈赠;TH-Gal4 果蝇来源于布鲁明顿果蝇库存中心 (Bloomington *Drosophila* Stock Center, BDSC);野生型果蝇 ω 1118 来源于维也纳果蝇资源中心 (Vienna *Drosophila* Resource Center, VDRC)。

1.1.2 主要试剂

鱼藤酮购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;*EcoR* I、*Sal* I、*Not* I 限制性快速内切酶、T4 DNA 连接酶均购于北京全式金生物技术有限公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖 (IPTG)、氨苄青霉素均购于北京普利莱公司;溴化乙锭、琼脂糖均购于国药集团化学试剂有限公司;引物由通用生物技术有限公司提供。

1.1.3 主要仪器

所用主要仪器有:EPS300 电泳仪 (上海天能科技有限公司);化学发光成像仪 (Protein Simple);5418 离心机 (Eppendorf);SZ660 体视显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因的获得

利用 Primer Premier 5.0 软件设计所需引物序列具体如下:

F: 5'-GCATCAGCAAGTGCATACGG-3';

R: 5'-CTGCGCTTCTCGCAAACAAT-3'。

以 cDNA 为模板,用高保真扩增酶进行聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增。

1.2.2 pUAST-*ZAP1* 表达载体的构建

将回收后的 *ZAP1* 目的基因用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 于 37 °C 进行双酶切,pUAST 质粒用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,再用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 过夜连接;将连接过夜的产物转入到大肠杆菌感受态细胞中,用含有氨苄青霉素 LB 固体培养基筛选阳性克隆;挑取的单克隆菌落进行 PCR 鉴定,并用 IPTG 诱导剂在 37 °C 下诱导 4 h,对表达菌表达的蛋白进行定性分析。

1.2.3 果蝇培养

果蝇标准玉米粉培养基的配方为:玉米粉 100 g、大豆粉 10 g、白糖 14.5 g、红糖 40 g、酵母 25 g、琼脂 8 g,添加超纯水至 1 L。将该培养基加热煮沸,待冷却至适当温度后加入 2% 的防腐剂搅拌均匀,即可倒入果蝇管。果蝇饲养的温度为 25℃,湿度 65%。

1.2.4 鱼藤酮食物配制

1) 每个果蝇培养小管中加入果蝇一次性速溶培养基 0.3 g,按照每个小管加入 1 mL 混合溶液的用量量取所需量的去离子水,再加入 1% 酵母,使之溶解混匀。

2) 吸取 1 mL 配制好的均匀混合溶液加入到上述一次性速溶培养基小管中,即为对照组果蝇培养基。

3) 按需量取去离子水和 1% 酵母,根据所需称取鱼藤酮并用适量 DMSO 溶解,加入混合液中后混匀,吸取 1 mL 含有鱼藤酮混合溶液加入到一次性速溶培养基小管中,即为含有鱼藤酮的果蝇培养基。

4) 将果蝇快速分装至配制好的对照组果蝇培养基和含有鱼藤酮的果蝇培养基中,此过程需避光进行,最后置于暗室培养。

1.2.5 PD 果蝇模型构建

因为鱼藤酮不稳定,遇光易分解,所以鱼藤酮培养基应现配现用。为了药效的持久性需每隔 1 d 更换培养基,并将果蝇转移至新配制的培养基管中,饲养约 7 d 即可构建成 PD 果蝇模型。

1.2.6 攀爬能力测试

将 20 只雌性果蝇放入攀爬管适应环境 15 min 后进行实验,敲击攀爬管,使果蝇全部掉落到管子底部,立刻开始计时,记录 8 s 内爬过 7 cm 的时间。

1.2.7 弹跳能力检测

用二氧化碳迷晕各基因型的果蝇,每个培养小管中分装 20 只果蝇,果蝇恢复清醒后静置 15 min 使其适应新环境;选取一个有利于进行实验计数的背景环境,做好实验前的准备工作;轻弹小管观察果蝇的起始跳跃表现行为,接着匀速、缓慢地转动小管,记录小管中果蝇在 1 min 之内的跳动次数,以跳动次数为指标表征果蝇运动能力的强弱。

1.3 数据分析

本文使用 Graph prism 8 软件对实验结果进行 t 检验分析,数据以平均值±标准差表示,其

中:NS 表示无显著性差异;* 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$; *** 表示 $P<0.001$; **** 表示 $P<0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 ZAP1 基因扩增结果

以果蝇 cDNA 为模板扩增出 ZAP1 基因片段,扩增结果如图 1 所示,可以看出,样品扩增出一条特异性条带,大小为 1 623 bp,与目的 ZAP1 基因片段相符,可以用于后续实验。

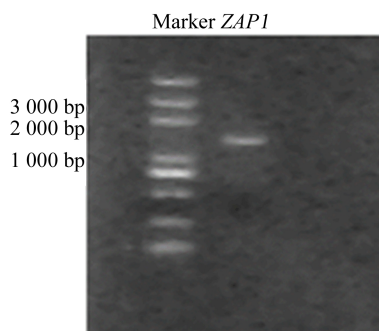


图 1 ZAP1 基因片段的克隆

2.2 ZAP1 与 pUAST 质粒的双酶切结果

用 *EcoR* I 和 *Sal* I 内切酶对回收纯化的 ZAP1 基因片段和空载 pUAST 质粒进行双酶切,结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,酶切后目的基因条带清晰完整,大小与酶切前基因片段大小相符,且未出现拖带、弥散等现象。回收酶切产物与质粒,再利用 T4-DNA 连接酶将酶切后的基因片段与 pUAST 质粒在 16℃ 过夜连接,获得连接产物。

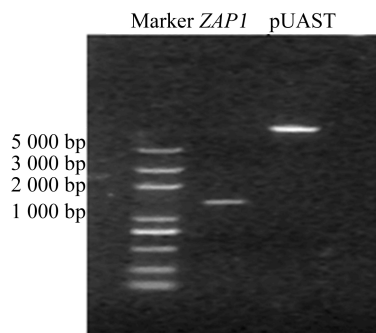


图 2 基因和质粒双酶切

2.3 ZAP1 表达载体的转化及鉴定

将连接产物转入大肠杆菌感受态 DH5 α 细胞中,均匀涂布于氨苄青霉素单抗性 LB 固体培养基上,筛选阳性单克隆,结果如图 3 所示。从图 3 可以看出,培养基中菌落呈圆形、凸起状且半透

明,表面光滑,边缘整齐,而且未见杂菌。因此,可以判断培养板上生长的是大肠杆菌。

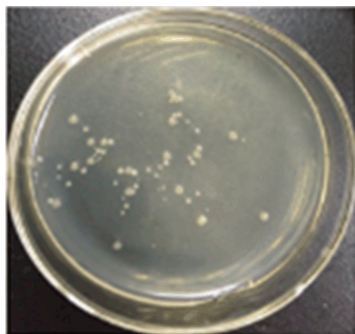


图 3 转化后的克隆载体大肠杆菌

挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定,并通过琼脂糖凝胶电泳检测产物,结果如图 4 所示,可以看出,只有 4 个单菌落条带显示阳性,可能是制胶方面的因素导致有些条带的结果未达到预期。

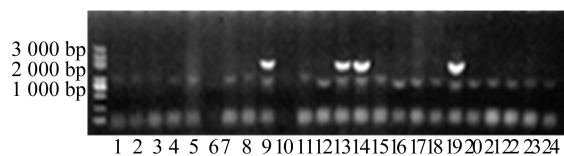


图 4 菌落 PCR 的电泳图

2.4 转基因果蝇的构建

将构建的载体 pUAST-*ZAP1* 通过显微注射技术导入野生型果蝇 w^{1118} (眼睛白色) 中,得到不同插入位点的 *ZAP1* 转基因果蝇,由于 pUAST 载体具有白眼基因,成功获得的转基因 UAS-*ZAP1* 果蝇眼睛呈红色,如图 5 所示。

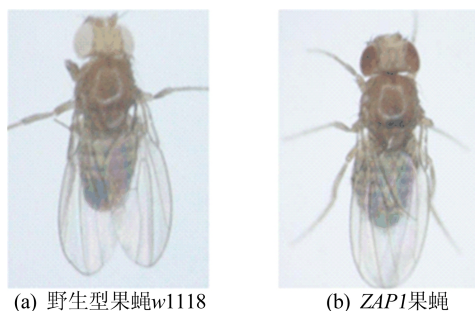


图 5 转基因果蝇的构建

2.5 果蝇攀爬能力测试结果

利用 UAS/GAL4 系统在中多巴胺能神经元中过表达 *ZAP1*, 即利用 TH-GAL4 处女蝇与 UAS-*ZAP1* 杂交, 取子一代雌性果蝇, 再用鱼藤酮暴露诱导建立的散发性 PD 果蝇模型进行攀爬能力检测, 结果如图 6 所示。

图 6 中: 1 表示 NF w^{1118} ; 2 表示 RF w^{1118} ; 3 表示 NF *ZAP1*; 4 表示 RF *ZAP1*。下同。其中: NF 表示 normal food, 即正常培养基; RF 表示 rotenone food, 即鱼藤酮培养基。

由图 6 可知: 与 NF w^{1118} 果蝇相比, RF w^{1118} 果蝇攀爬能力降低, 说明 PD 模型构建成功; 与 RF w^{1118} 果蝇相比, RF *ZAP1* 果蝇攀爬能力升高。结果表明, *ZAP1* 在中多巴胺能神经元中的过表达可挽救鱼藤酮诱导的 PD 果蝇攀爬能力的降低。

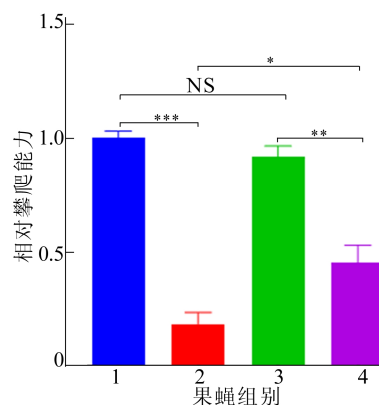


图 6 雌性果蝇的攀爬能力

2.6 果蝇弹跳能力测试结果

利用 UAS/GAL4 系统将多巴胺能神经元过表达 *ZAP1*, 即利用 TH-GAL4 处女蝇与 UAS-*ZAP1* 杂交取子一代雌性果蝇, 再用鱼藤酮暴露诱导建立的散发性 PD 果蝇模型进行弹跳能力检测, 结果如图 7 所示。

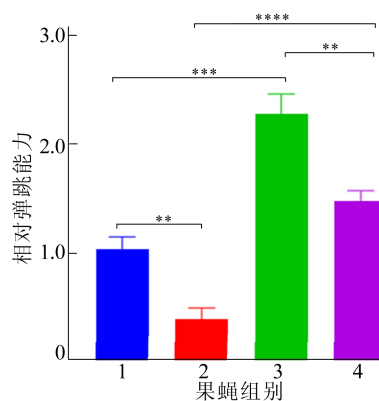


图 7 雌性果蝇的弹跳能力

从图 7 可以看出: 与 NF w^{1118} 果蝇相比, RF w^{1118} 果蝇弹跳能力降低, 说明 PD 果蝇模型构建成功; 与 RF w^{1118} 果蝇相比, RF *ZAP1* 果蝇弹跳能力升高。因此, *ZAP1* 可挽救鱼藤酮诱

导的 PD 果蝇弹跳能力的降低。

3 结 论

本文利用 PCR 技术扩增 *ZAP1* 基因,经双酶切后将其连接在 pUAST 质粒上,导入大肠杆菌感受态细胞中,经测序可知载体构建成功。将该载体通过显微注射技术构建转基因果蝇,利用遗传技术成功获取子代转基因的果蝇,再利用 UAS/GAL4 系统将多巴胺能神经元表达 *ZAP1*,用鱼藤酮暴露诱导建立散发性 PD 果蝇模型,并进行攀爬和弹跳能力测试。分析结果表明,*ZAP1* 对于鱼藤酮诱导的散发性 PD 果蝇具有挽救效果。根据研究报道,PD 的发病既与遗传因素有关,也与环境因素有关^[16],但 PD 发病机制尚不完全清楚,目前尚无有效的治疗方法。因此,本文结果为研究 *ZAP1* 基因对 PD 的治疗奠定了基础。

【参 考 文 献】

- [1] Vallae B L, Falchuk K H. The biochemical basis of zinc physiology[J]. *Physiological Reviews*, 1993, 73(1): 79-118.
- [2] Hambidge M. Human zinc deficiency[J]. *Journal of Nutrition*, 2000, 130(5): 1344S-1349S.
- [3] Wang X X, Wu Y T, Zhou B. Dietary zinc absorption is mediated by ZnT1 in *Drosophila melanogaster* [J]. *The FASEB Journal*, 2009, 23(8): 2650-2661.
- [4] Eide D J. Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(28): 18565-18569.
- [5] Kumar V, Singh B K, Chauhan A K, et al. Minocycline rescues from Zinc-induced nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration: biochemical and molecular interventions [J]. *Molecular Neurobiology*, 2016, 53(5): 2761-2777.
- [6] Dexter D T, Wells F R, Lee A J, et al. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2010, 52(6): 1830-1836.
- [7] Kumar A, Ahmad I, Shukla S, et al. Effect of zinc and paraquat co-exposure on neurodegeneration: modulation of oxidative stress and expression of metallothioneins, toxicant responsive and transporter genes in rats [J]. *Free Radic Res*, 2010, 25(8): 950-965.
- [8] Kumar V, Singh D, Singh B K, et al. Alpha-synuclein aggregation, ubiquitin proteasome system impairment, and L-Dopa response in zinc-induced Parkinsonism: resemblance to sporadic Parkinson's disease [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2018, 444(1/2): 149-160.
- [9] Ugur B, Chen K C, Bellen H J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases [J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2016, 9(3): 235-244.
- [10] Bier E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6: 9-23.
- [11] Xiao G, Zhou B. What can flies tell us about zinc homeostasis? [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 611: 134-141.
- [12] Gutman M, Singer T P, Casida B J E. Reaction sites of rotenone, Piericidin A, and amytal in relation to the nonheme iron components of NADH dehydrogenase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1970, 65(3): 763-770.
- [13] Subaraia M, Vanisree A K. Rotenone causing dysfunctional mitochondria and lysosomes in cerebral ganglions of *Lumbricus terrestris* degenerate giant fibers and neuromuscular junctions [J]. *Chemosphere*, 2016, 152: 468-480.
- [14] Johnson M E, Bobrovskaya L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions [J]. *Neurotoxicology*, 2015, 46: 101-116.
- [15] Coulom H, Birman S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster* [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2004, 24 (48): 10993-10998.
- [16] Xue J, Wang H L, Xiao G. Transferrin1 modulates rotenone-induced Parkinson's disease through affecting iron homeostasis in *Drosophila melanogaster* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 531(3): 305-311.

(责任编辑 闫杏丽)