两种动物 DNA 不同比例混合的混合检材。引物设计与合成:设计 4 对种属特异性引物和 1 对无种属特异性的 ND3 引物,并合成 COI 基因的标准引物。PCR 扩增:①以 10 种动物基因组 DNA 为模板,分别用自行设计的 4 对引物进行扩增,以检验引物种属特异性;②以 10 种动物不同浓度基因组 DNA 为模板,分别用对应种属特异性的引物进行扩增,以检验引物扩增效能;③以降解检材基因组 DNA 为模板,分别用自行设计引物和标准引物进行扩增,以评估引物应用价值。PCR 复合扩增:在确定自行设计引物特异性、扩增灵敏度的基础上,通过调整引物量和退火温度构建含有 5 对引物的复合扩增体系,并用于单一样本和混合样本基因组 DNA 的扩增。扩增产物检测:用聚丙烯凝胶电泳结合银染的方法检测各种动物模板 DNA 的扩增效果,以判定引物的扩增特异性和灵敏度,及降解检材和混合检材的扩增效果;用循环测序的方法获得各扩增产物的碱基序列,并通过 BLAST 软件与 DNA 数据库比对及遗传距离分析,判定检材的种属来源。

【实验材料】 常见家禽(鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸽子)和常见家畜(水牛、黄牛、山羊、绵羊、马、驴、犬)共 7 科 18 种动物及人类血液样本各 5 例。

【可行性】 (1)不同种属动物 COI 基因序列可从相应 DNA 数据库获得;(2)熟练掌握引物设计的操作方法和 PCR 技术;(3)具备本研究所需的各种仪器、设备和试剂。

【创新性】 为法医物证降解检材的种属鉴定提供一种有效的方法。

B-S2-2

胃肠道激素 ghrelin/nesfatin 对棕色脂肪细胞分化的影响

王岳鑫,陈佳琰,张新宇;指导教师:李 茵

北京大学医学部 2011 级临床医学

【立项依据】 Ghrelin 和 nesfatin 是两种主要由胃粘膜 X/A 样细胞分泌的激素,对于全身的能量代谢有重要的调控作用,其作用基本上是相互拮抗的。例如,给予 ghrelin 后,动物摄食、体重增加,白色脂肪组织中脂质沉积增加,胰岛素敏感性下降,而 nesfatin 的作用却是相反的。因此 ghrelin 和 nesfatin 的平衡对于代谢综合征的改善有重大意义。人体内的脂肪组织分为两种,不同于以储能为主要功能的白色脂肪组织,棕色脂肪组织与非颤栗性产热有关,其活性受多种因素的调节。棕色脂肪细胞特异性表达解偶联蛋白 1(UCP1),使得能量以热能的形式释放出去而不是转化为 ATP。近年来的研究表明,成年人的身体中依然存在棕色脂肪组织,并且其活性与肥胖成负相关,表明棕色脂肪组织可能对能量代谢有重要的调节作用。在能量代谢的调控过程中,ghrelin 和 nesfatin 可能对棕色脂肪组织的功能有着调控作用。

【设计思路】 研究主要采用体外实验的方法,培养分离的乳鼠原代前棕色脂肪细胞,诱导分化,在分化过程中的不同时间给予一定剂量的 ghrelin 或 nesfatin 的刺激,然后观察激素对于细胞分化的影响。

【实验内容】 分离出生两天内的乳鼠原代前棕色脂肪细胞,分化并给予激素刺激,一定时间后收细胞提取 RNA 和蛋白进行 RT-PCR、蛋白质印迹、Co-IP 检测,测定线粒体功能、拷贝数等实验,同时进行 HE、Oil red 染色等,从而在分子水平上和形态学上检验激素对棕色脂肪细胞分化的影响。

【材料】 C57 小鼠,ghrelin 和 nesfatin 多肽,多种抗体、引物、试剂等。

【可行性】 Ghrelin 和 nesfatin 已经被证实对多个与能量代谢相关的靶器官的功能有调控作用,并且与肥胖的形成和肥胖后一系列的代谢改变有关。而肥胖的过程中,棕色脂肪组织的活性明显下降。最近有研究表明 ghrelin 受体敲除后,棕色脂肪组织中 UCP1 的表达量上升;寒冷刺激下,被激活的 nesfatin⁺ 神经元与调控棕色脂肪组织活性的神经元存在共定位,说明两种激素可能与棕色脂肪组织的功能相关。

【创新性】 本研究探索胃肠道激素对棕色脂肪细胞功能的影响,把胃肠道和棕色脂肪组织有机的联系在了一起,为解决代谢综合征提供了一条新思路。

关键词: 棕色脂肪细胞;分化;ghrelin;nesfatin