

S-3 病原生物与微生物学, 感染与免疫

B-S3-1

pTn5GFP 转座质粒用于耐药鲍曼不动杆菌生物被膜相关基因的研究

陈君逸¹, 周 明¹, 卢 鹏²; 指导教师: 邹清华

1. 北京大学医学部 2010 级临床医学

2. 北京大学医学部 2011 级临床医学

【立论依据】 鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB)是一种革兰氏阴性球杆菌,是引起院内感染的主要菌种之一,多重耐药和泛耐药 AB 菌株感染更是给临床治疗带来极大的困难。生物被膜形成能力与 AB 耐药以及致病性密切相关。寻找 AB 生物被膜形成的关键基因对于 AB 相关疾病的预防和控制具有重要意义。转座子是一段特殊的 DNA 片段,在转座酶的作用下,可随机插入细菌基因组,使插入基因失活,改变相关表型。应用转座子随机突变策略可以找出特定表型对应的基因,但是以传统的抗生素抗性基因作为报告基因显然不能满足对多重耐药菌株的研究。

【设计思路】 绿色荧光蛋白(GFP)因为不需要单独加入底物并且易于观察而被广泛用来标记生物分子或细胞。已有研究表明,GFP 基因插入细菌的染色体上后,可以有效地对细菌进行标记。基于转座质粒以及 GFP 的特点,本研究拟构建具有 Tn5 转座子和 GFP 基因的 pTn5GFP 转座质粒,利用 GFP 作为报告基因,构建临床分离的多重耐药 AB 突变文库,进而筛选出 AB 生物被膜形成的关键基因,并对其功能进行研究。

【实验内容】 以 pGFPmut3.1 质粒为模板,扩增 GFP 基因,将其连接入含有 Tn5 转座子的 pRL27 质粒,构建 pTn5GFP 转座质粒。利用该质粒对多重耐药 AB 菌株进行转座子突变,构造突变文库。对突变株的生物被膜情况进行分析,确定转座子插入位点,找出生物被膜形成的关键基因,并对其功能进行研究。

【材料】 临床多重耐药 AB 两株,R005 和 R036,自北京大学人民医院获得。常用工具菌 *E. coli* CC118 $\lambda\pi$ 和 *E. coli* DH5 α 。pRL27 和 pGFPmut3.1 质粒由原实验室毕业研究生提供。

【可行性】 已成功构建了 pTn5GFP 转座质粒,该质粒在容纳菌株 *E. coli* CC118 $\lambda\pi$ 具有绿色荧光表型,并已通过预实验初步确定了两株多重耐药 AB 生物被膜形成能力和最适实验条件。

【创新性】 本研究将 GFP 报告基因的便捷性以及转座质粒的转座性结合起来,有效解决了因耐药性而无法对泛耐药菌株构建突变文库的问题,结果直观,易于筛选,可行性高。

关键词: 转座子; GFP; 多重耐药菌; 鲍曼不动杆菌; 生物被膜

B-S3-2

结核分枝杆菌 38KD 蛋白对小鼠树突状细胞的功能影响

袁建波¹, 秦 欢², 宋 丹³, 秦焕永¹; 指导教师: 秦娜琳

1. 遵义医学院 2011 级医学检验

2. 遵义医学院 2011 级免疫

3. 遵义医学院 2012 级临床

【立论依据】 结核分枝杆菌(MTB)是结核病的病原菌,属胞内寄生菌。MTB 感染机体后由抗原提呈细胞(APC)将抗原分子提呈给初始 T 细胞,诱导体内产生以细胞免疫为主的适应性免疫应答。树突状细胞(DC)作为提呈能力最强的 APC 在机体抗结核免疫中起着重要作用。有研究表明 MTB 可通过影响 DC 的功能来调节淋巴细胞的应答。如 Palma 等发现 MTB 的 PstS1 蛋白可刺激 DC 诱导记忆性 T 细胞增殖并分泌更多的 IFN- γ 和 IL-

22;Byun 等则发现 Rv0315(一种新的 MTB 抗原)可促进 DC 的成熟进而诱导 Th1 型免疫应答。而 38KD 蛋白作为 MTB 的一种具有强免疫原性的免疫原,其对树突状细胞的影响尚不清楚。本课题通过体外诱导表达 MTB-38KD 蛋白,刺激小鼠 DC,研究其相关分子的变化情况,以明确 38KD 蛋白对 DC 的功能影响。

【设计思路】 构建 38KD 载体,诱导蛋白表达纯化后体外刺激小鼠 DC,在不同时间点检测 DC 相关分子表达情况。

【实验内容】 38KD 蛋白基因从 MTB 提取扩增验证后,将其构建到 pET28a 质粒上转入大肠杆菌 BL21(DE3),IPTG 诱导蛋白表达并纯化,以不同浓度 38KD 蛋白刺激小鼠骨髓源 DC,在不同时间点用流式细胞术检测表面 CD11c、B7、MHC-II 等分子表达、ELISA 检测培养上清 IL-4、IL-10、IL-12、IFN- γ 分泌情况。

【材料】 昆明小鼠、MTB 菌株、质粒 pET28a、BL21(DE3)、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、SDS-PAGE 配胶所需试剂、相关细胞因子 ELISA 检测试剂盒、荧光标记抗体(抗 CD11c、B7、MHC-II)等。

【可行性】 已有研究表明 MTB 的抗原成分与 DC 有关,38KD 蛋白作为 MTB 的主要免疫原,极有可能对 DC 的功能有一定的影响;项目组已构建 38KD 蛋白原核表达载体,并参与发表相关科研文章,具有一定的结核研究基础,并可提供相关理论和技术支持。

【创新性】 本课题首次观察 MTB-38KD 蛋白对小鼠 DC 的影响,为后续抗 MTB 感染机制的研究提供理论基础。

关键词: 结核分枝杆菌;38KD 蛋白;原核表达;树突状细胞

B-S3-3

栀子柏皮汤与阿苯达唑对肝吸虫感染大鼠肝胆管的保护作用

林 添,邓 威,陈 鹏;指导教师:李 娟

赣南医学院 2012 级临床医学

【立论依据】 肝吸虫可引起宿主肝胆管炎症,严重感染导致门脉区肝纤维组织增生和肝细胞萎缩变性。阿苯达唑广泛应用于肝吸虫病治疗,但存在与成虫寄生部位隔离、副作用大、患者依从性不佳等不足。栀子柏皮汤具有消炎、抗菌、解热、护肝、利胆等作用。

【设计思路】 本研究拟用栀子柏皮汤和阿苯达唑按析因设计治疗肝吸虫感染模型大鼠,通过观察各组大鼠的胆汁分泌量、肝功能血清学指标及肝胆管组织病理学改变,初步探讨栀子柏皮汤和阿苯达唑对肝胆管的影响及其相互作用,为其临床应用提供实验依据。

【实验内容】 (1)建立肝吸虫感染大鼠模型;(2)动物分组及处理:动物按 2 \times 2 析因设计分组,各治疗组接受相应药物治疗,模型组取等量生理盐水灌胃,平行操作;(3)胆汁引流术测胆汁流量;(4)腹主动脉取血,检测血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、透明质酸酶 (HA)、层粘连蛋白 (LN) 和 III 型前胶原 (PC III) 水平;(5)大鼠肝胆管组织病理学检查。

【材料】 (1)含肝吸虫囊蚴的麦穗鱼;(2)180~220 g SD 大鼠 50 只;(3)栀子、黄柏、甘草;(4)透明质酸酶 (HA)、层粘连蛋白 (LN) 和 III 型前胶原 (PC III) 试剂盒。

【可行性】 (1)栀子柏皮汤具有护肝利胆、消炎抗菌的作用,阿苯达唑可杀灭肝吸虫成虫,本研究从消灭病原体和保护宿主两方面联合用药以增强疗效,在理论上具备可行性;(2)本课题预实验中已成功建立肝吸虫囊蚴感染大鼠模型;(3)课题组成员已掌握动物实验技术;(4)实验室具备相应的实验设备和器材。

【创新性】 本实验首次采用析因设计的方法来研究栀子柏皮汤与阿苯达唑对肝吸虫感染大鼠肝胆管的影响,既探讨栀子柏皮汤对肝吸虫感染大鼠的保肝利胆作用,又探讨阿苯达唑对肝吸虫的直接杀灭效果,并分析栀子柏皮汤与阿苯达唑之间的交互作用。实验结果可为栀子柏皮汤临床应用于肝吸虫病的治疗提供科学依据。

关键词: 栀子柏皮汤;阿苯达唑;肝吸虫感染;肝胆管