

A-S2-8

H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄复合体的原核表达、折叠、纯化与鉴定

丁 双¹, 顾冬梅², 许文锦²; 指导教师: 沈传来

1. 东南大学 2010 级临床医学七年制

2. 东南大学 2010 级护理学

【目的】 目前 pMHC 复合体(即 MHC 分子与抗原肽的复合体)常被用来检测特异性 T 细胞的数量, 还是 T 细胞功能分析、抗原表位验证以及 T 细胞靶向治疗等诸多方面的有力工具。但是其制备技术复杂, 复性、折叠和纯化等步骤受多种因素限制, 产出效率较低。国内目前尚无生产厂家, 一定程度上限制了我国基础与临床免疫学的更快发展。本实验旨在制备小鼠 H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 复合体, 验证其正确构象和与特异性 T 细胞 TCR 有效结合的功能, 为在小鼠模型中进行移植排斥和肿瘤的生物治疗研究提供靶向工具。

【方法】 利用 IPTG 诱导编码小鼠 H-2K^b 蛋白重链的重组质粒和 OVA-β2m 融合蛋白的重组质粒在大肠杆菌 BL21 中表达; 通过超声粉碎、洗涤、化学纯化等方法收集两种重组蛋白, 经 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的纯度和分子大小; 再经稀释复性法在体外折叠并超滤浓缩; 利用尺寸排阻层析法在 FPLC 系统中纯化收集 H-2K^b/OVA 复合体, 经 BCA 法蛋白定量后分装保存; 通过包被细胞大小的 PLGA 微球, 用 H-2K^b 分子构象特异性单抗进行荧光染色, 经流式分析验证该复合体的空间构象; 利用 OVA 抗原特异性的 OT-1 细胞株和流式细胞术分析检测该自制分子与 TCR 的结合能力。

【结果】 两种重组质粒在大肠杆菌中表达后, 经 SDS-PAGE 分析分子量同预计大小相等; 复性、折叠、FPLC 系统纯化洗脱后得到 3 个峰, 其中第一个洗脱峰经 SDS-PAGE 鉴定证实含有重链蛋白和轻链蛋白, 为 H-2K^b/OVA 复合体峰; 流式荧光染色分析显示: 该复合体包被 PLGA 后能与构象特异性抗体呈有效结合, 提示构象正确; 用该分子制备的 PE-标记的 H-2K^b/OVA 四聚体染色 OT-1 转基因鼠的脾细胞, 经流式检测: OT-1 细胞占脾细胞群的 16.35%。

【结论】 利用大肠杆菌成功表达了小鼠 H-2K^b 分子的重组重链和轻链, 并经体外折叠和纯化成功制备了构象正确、能与特异性 TCR 结合的 H-2K^b/OVA 复合体。

关键词: MHC; 小鼠 H-2K^b/OVA 复合体; 折叠; 纯化; FACS 检测

A-S2-9

磁场下制备的 γ -Fe₂O₃ 膜对成骨细胞分化作用的效果研究

单世豪, 黄继青, 陈奕含, 李雪琼; 指导教师: 刘 璇

东南大学 2011 级生物工程

【目的】 骨质疏松症已成为世界公共卫生问题, 针对骨质疏松症的基础及临床研究是目前国际研究的热点。目前已有实验证明 PLA/ γ -Fe₂O₃ 复合膜对于细胞的分化具有促进作用, 但是由于复合膜是自然晾干的, 纳米磁性材料分布不均, 对细胞的生长不利, 为了将这种材料的性能优化, 根据在磁场下, 磁性纳米粒子分布更加均匀的特性, 通过实验验证在磁场下制备的磁性纳米材料对于细胞分化的促进作用更加明显。

【方法】 因为 PLA 在复合膜中起到支架和黏附作用, 所有本项目将首先在磁场条件下组装纳米材料膜(γ -Fe₂O₃ 膜), 研究其对成骨细胞的影响。利用 qPCR、ALP 等检测方法对不同组细胞的分化情况进行对比, 并分析各项检测结果得出结论。然后进一步在 γ -Fe₂O₃ 膜的基础上用 PLA 粘附, 并对其对于成骨细胞的生长分化的作用进行研究。

【结果】 ALP 染色结果: 在磁场下制备的纳米磁性材料上接种的细胞染色明显比自然晾干的磁性纳米材料

上接种的细胞颜色深且分散;qPCR 检测结果;Oc、BMP2、ALP 三种成骨细胞标志性基因的 qPCR 结果显示,在磁场下制备的纳米磁性材料上接种的细胞几种标志性基因含量明显比自然晾干的磁性纳米材料上接种的细胞含量多,且随着磁场强度的增强,基因含量随之增多。

【结论】 自然干的纳米材料+玻片上接种的细胞分化情况明显不如在磁场下组装的纳米基底,而且在不同场强下组装的纳米基底中随着场强增大,细胞分化生长均越来越好。磁场下组装的纳米材料对于细胞分化的促进作用要优于自然晾干的复合膜,且随着场强的增大,促进作用愈加明显。

关键词:成骨细胞;PLA/ γ -Fe₂O₃ 复合膜;细胞分化;磁性纳米材料;磁场

A-S2-10

NADPH 氧化酶来源的活性氧在 2 型糖尿病发生发展中的作用

刘晓敏¹,焦宇琼¹,康 祺²;指导教师:施冬云

1. 复旦大学医学院 2010 级临床医学
2. 复旦大学医学院 2010 级基础医学

【目的】 探讨 NADPH 氧化酶来源的活性氧在糖尿病发生发展中起到的作用。

【方法】 我们建立了长时程高脂饮食结合小剂量链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)诱导的大鼠模型来模拟人类 2 型糖尿病。在此模型基础上,运用常规的形态学和生物化学测定有关蛋白质的含量;运用免疫放射法测定胰岛素的含量。通过对糖代谢通路关键酶、血糖、胰岛素的测定来判定大鼠糖尿病的发生、发展。通过对大鼠体内 ROS、MDA、TOAS 的测定来判定大鼠体内氧化应激的状态。通过测定葡萄糖-6-磷酸脱氢酶及糖原磷酸化酶的活性来反映大鼠糖代谢通路的变化。

【结果】 apocynin 可以明显降低糖尿病大鼠的血糖升高水平,于此同时,在 apocynin 的干预下,糖尿病大鼠体内的氧化应激的水平比其它各组明显降低,其还可降低糖尿病大鼠肝脏糖原分解关键酶的活性、使其更接近于正常水平。

【结论】 NADPH 氧化酶来源的活性氧可能通过糖原分解通路,对 2 型糖尿病的发生发展发挥作用。

关键词:糖尿病;NADPH 氧化酶;apocynin;氧化还原微环境;血糖

A-S2-11

TSC1 基因对调节性 T 细胞发育分化的免疫调控作用

韩 霏;指导教师:刘光伟

复旦大学基础医学院 2010 级临床医学八年制

【目的】 本研究利用 TSC1 的 T 细胞特异缺失小鼠探讨 TSC1 对 T 细胞尤其是调节性 T 细胞(Treg)发育的免疫调控效应。

【方法】 主要应用 T 细胞特异性 TSC1 基因敲除小鼠(Lck-cre; TSC1lox⁺/lox⁻)及细胞分子免疫学技术,阐明 TSC1 基因对 CD4⁺ Treg 发育分化及其免疫功能的重要调控作用和规律。

【结果】 (1)TSC1 基因缺失小鼠,其胸腺 CD4⁺CD8⁻ T (CD4SP),CD8⁺CD4⁻ T(CD8SP),CD4⁻CD8⁻ T(DN)和 CD4⁺CD8⁺ T(DP)细胞百分率无显著差异;(2)TSC1 基因缺失小鼠 CD4⁺Foxp3⁺ Tregs 百分率和细胞绝对数均明显增加;(3)小鼠外周免疫器官(脾脏)的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T 细胞百分率和绝对数均无显著差异;(4)小鼠胸腺中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ T 细胞百分率和绝对数有下降的趋势;(5)小鼠胸腺中 Treg 其他亚型如 CTLA-4 以及 GITR 型均有所增加。