

A-S2-18

金乌贼墨多糖的制备及对多氯联苯引起的生殖细胞损伤的缓解作用

葛兴朝, 刘蕊; 指导教师: 武艳群

济宁医学院 2012 级生物技术

【目的】 多氯联苯(PCB)在工业上曾作为电介质、润滑剂、增塑剂被广泛应用,是种难分解的氯代芳烃族内分泌干扰物,由于过去大量使用且难分解并通过生物链累积,因此 PCB 在环境中仍然普遍存在,对动物和人体的生殖系统、免疫系统等造成巨大伤害。诱导氧化损伤是 PCB 生殖毒性机制中一个最重要的途径,那么具有抗氧化活性的物质就有可能预防 PCB 的毒性。乌贼墨是由软体动物乌贼墨囊中的分泌腺合成的,含有多种海洋活性物质。而乌贼墨多糖是从乌贼墨中分离提取得到的一种新型海洋活性物质,最近的研究结果表明,其具有较高的体外抗氧化活性。由于 PCB 能引起自由基的产生和氧化损伤,而乌贼墨多糖具有清除自由基的作用,加之目前关于乌贼墨多糖与 PCB 相互作用的机理还未有报道。为此,本研究以小鼠生殖细胞作为模型,探讨并阐明金乌贼墨多糖缓解 PCB 引起的生殖毒性作用,为动物食源性乌贼墨多糖用于防治氧化性 PCB 生殖毒性提供理论指导。

【方法】 采用木瓜蛋白酶水解和 Sevag 结合的方法提取和纯化金乌贼墨多糖,并采用高效液相色谱对其进行分析鉴定。建立小鼠生殖细胞-体细胞无血清共培养模型,确定 PCB 对生殖细胞的毒性作用依赖的剂量和作用时间。不同剂量水平的金乌贼墨多糖与 PCB 联合作用,分析金乌贼墨多糖对多氯联苯引起的生殖细胞损伤的缓解作用。

【结果】 高效液相色谱及光谱分析结果显示,经木瓜蛋白酶水解和 Sevag 结合的方法所制备的金乌贼墨多糖成分均一,分子量约为 37 ku。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PCB 会导致小鼠生殖细胞核染色质固缩,细胞出现脱落和崩解,产生严重的细胞毒性。添加金乌贼墨多糖则可缓解 PCB 的细胞毒性,细胞活性得到恢复。

【结论】 实验表明,具有抗氧化活性的金乌贼墨多糖能够缓解 PCB 的氧化损伤,防止 PCB 的生殖毒性。

关键词: 金乌贼墨多糖;多氯联苯;生殖细胞;小鼠

A-S2-19

来源于一株嗜热菌的 L-阿拉伯糖异构酶的分离纯化及其蛋白质印迹分析

张冉,董超男;指导教师:常允康

济宁医学院 2012 级生物技术

【目的】 L-阿拉伯糖异构酶(L-AI)是生物转化生产功能性糖 L-阿拉伯糖的关键酶。尽管对 L-AI 的研究已达数十年,但直到 2006 年,首个来源于大肠杆菌(*E. coli*)的 L-AI(ECAI)的晶体结构才被解析出来,但其最高分辨率仅为 2.6,且只解析出了单酶的空间结构。到目前为止,虽然对 L-AI 的研究不断深入,但是未见有其晶体结构的相关报道。我们在研究过程中发现 L-AI 家族蛋白难以结晶,因此本文拟通过研究来源于一株嗜热菌的 L-AI,研究导致其不能结晶的可能原因。

【方法】 通过分子克隆手段,实现嗜热菌 L-AI 编码基因在 *E. coli* 中的异源表达;通过镍柱亲和层析纯化得到 L-AI 纯酶;通过 SDS-PAGE 及蛋白质印迹检测,分析 L-AI 在溶液中的状态。

【结果】 SDS-PAGE 结果显示,L-AI 经过镍柱纯化后基本可达到电泳纯,即只有一条蛋白条带;蛋白质印迹结果显示,在目的蛋白条带上下方存在多条蛋白条带,上方条带可能是 L-AI 发生聚集所致,下方条带可能是 L-AI

被降解所致。

【结论】 实验表明,L-AI 在溶液中不是以均一形态存在的,可能存在多种形态,而且 L-AI 易被降解。因此,影响 L-AI 结晶的可能原因包括蛋白聚集所导致的构象不均一以及目的蛋白被降解。

关键词: L-阿拉伯糖异构酶;蛋白质印迹;降解;聚集

A-S2-20

PKA 信号通路通过 CREB 正性调控 USP22 基因的转录激活

张昭雪,徐秋琴,陈 颀;指导教师:熊建军,周小鸥

九江学院基础医学院 2012 级医学检验

【目的】 通过对原癌基因 USP22 的 5'端启动子活性分析,获得 PKA 信号通路调控 USP22 转录激活的直接证据并探索其中机制。

【方法】 克隆 USP22 基因 5'端核心启动子,定向插入荧光素酶报告载体 pGL3-Basic;重组质粒经脂质体转染人宫颈癌 HeLa 细胞 12 h 后,分别采用 PKA 信号的激动剂 Forskolin 和抑制剂 H-89 刺激;双荧光素酶实验分析 USP22 启动子片段的相对活性;在此基础上,利用 real-time PCR 检测 Forskolin 和 H-89 对内源性 USP22 表达影响,以获得 PKA 信号通路调控 USP22 转录激活的直接证据;采用 DNA 定点突变技术,剔除该启动子区一个典型的 CREB/ATF 结合位点,经 Forskolin 和 H-89 处理,双荧光素酶检测以证实 PKA 信号通路通过 CREB/ATF 反应元件调控 USP22 的转录;最后,联合染色质免疫共沉淀(ChIP)与 real-time PCR 实验观察 H-89 对转录因子 CREB 与 USP22 启动子结合能力的影响。

【结果】 USP22 基因的启动子活性及内源性 mRNA 表达受到 PKA 通路抑制剂 H-89 的显著抑制,但并未因为 PKA 的激活而出现明显上调;破坏 CREB/ATF 结合位点可消除 USP22 启动子对 H-89 的反应性;H-89 抑制 CREB 与 USP22 启动子中 CREB/ATF 反应元件的结合导致 USP22 转录活性的下降。

【结论】 CREB/ATF 结合位点控制着 USP22 基因的常规表达;USP22 的转录受到 PKA 信号通路的正性调控;PKA 信号通路通过转录因子 CREB 实现上述功能。

关键词: USP22 基因;PKA 信号通路;CREB;转录调控

A-S2-21

基于信号通路网络交互研究复叶耳蕨总黄酮诱导 BMSCs 成骨分化的分子机制

罗 超,黄淑萍,邱淑玲;指导教师:殷嫦嫦

九江学院 2011 级临床医学

【目的】 探究复叶耳蕨总黄酮对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)增殖、定向成骨分化的影响以及相关信号通路。

【方法】 采用差速贴壁法体外分离、纯化和培养大鼠骨髓间充质干细胞,取 P3 代细胞,采用 MTT 法检测细胞生长曲线、流式细胞术测定细胞表面标志。实验采用不同浓度的复叶耳蕨总黄酮培养基对大鼠 BMSCs 定向诱导分化,观察 BMSCs 诱导分化过程中诱导细胞的形态;测定诱导细胞碱性磷酸酶(ALP)活性和组织化学染色观察钙化结节形成能力;采用 RT-PCR 和 ELISA 法检测 BMSCs 诱导分化过程中的 WNT 和 BMP 通路转导体及其交汇靶点 Runx2 相关基因表达。