

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:殷婷婷

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。

【结果】 体外培养的细胞表达 BMSCs 细胞表面标志;复叶耳蕨总黄酮对 BMSCs 增殖具有一定的抑制作用;促进 BMSCs 分化为成骨细胞;增强 ALP 活性和钙结节形成;上调 WNT 通路转导体 β -catenin、cyclinD1 和 BMP 通路转导体 BMP2、BMP4、两条通路交互靶点 Runx2 以及骨桥蛋白、骨钙蛋白和 I 型胶原基因表达。

【结论】 复叶耳蕨总黄酮能够上调 BMP 和 WNT 通路,促进网络靶点 Runx2 表达,从而促进大鼠 BMSCs 定向分化为成骨细胞。

关键词: 复叶耳蕨总黄酮;骨髓间充质干细胞;WNT 信号通路;BMP 信号通路;Runx2;成骨分化

A-S2-22

从人卵巢 cDNA 文库中筛选与蛋白激酶 Wee1B 相互作用蛋白及在小鼠 1-细胞期受精卵中的功能验证

孙 静,张晓玉,马浚仁;指导教师:刘 超,肖建英

辽宁医学院 2011 级临床医学英文班

【目的】 筛选与蛋白激酶 Wee1B 相互作用的候选分子,证实该蛋白与 Wee1B 的相互作用及作用机制,并进一步探讨其对小鼠受精卵早期发育的影响,本研究对揭示小鼠受精卵早期发育的分子机制和生殖机理具有十分重要的意义,为优化人类辅助生殖提供理论和实验依据。

【方法】 构建 pGBKT7-Wee1B 诱饵质粒并转入酵母感受态细胞中检测其对酵母的毒性、自激活能力以及表达情况,再将含有 pGBKT7-Wee1B 的酵母感受态细胞与人卵巢 cDNA 文库相融合,利用酵母双杂交系统筛选出阳性克隆,提取阳性克隆的酵母质粒转化大肠杆菌后进行测序鉴定。经酵母重新转化验证后,在哺乳动物细胞中使用免疫共沉淀和免疫荧光共定位的方法确定候选分子与 Wee1B 蛋白激酶的相互作用。过表达或降低筛选分子,并显微注射入小鼠 1-细胞期受精卵中观察 Wee1B 的蛋白激酶活性和定位的变化及候选分子是否通过 Wee1B 调控小鼠受精卵的早期发育。

【结果】 以小鼠 Wee1B 编码基因的 pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Wee1B-WT 野生型质粒为模板,设计特异性引物构建出 pGBKT7-Wee1B 诱饵质粒;诱饵质粒 pGBKT7-Wee1B 对酵母感受态细胞无毒性,无自激活能力,通过蛋白质印迹法验证其在酵母感受态细胞中表达;酵母双杂交系统从人卵巢 cDNA 文库中筛选出了 9 个与 Wee1B 蛋白激酶存在相互作用的蛋白;免疫共沉淀证实蛋白激酶 Wee1B 与 KHDRBS3 蛋白在 HEK293 细胞中存在相互作用;免疫荧光共定位确定蛋白激酶 Wee1B 与 KHDRBS3 蛋白在小鼠受精卵中共定位;干预 KHDRBS3 影响 Wee1B 的蛋白激酶活性和定位,并影响小鼠受精卵的早期发育。

【结论】 成功构建 pGBKT7-Wee1B 质粒,并以此为诱饵,利用酵母双杂交系统从人卵巢 cDNA 文库筛选出 KHDRBS3 蛋白;免疫共沉淀证实 KHDRBS3 与 Wee1B 存在相互作用,且二者在小鼠 1-细胞期受精卵中共定位。以上提示 KHDRBS3 蛋白可能通过调控 Wee1B 的蛋白激酶活性和定位进而参与小鼠受精卵的早期发育。

关键词: Wee1B;KHDRBS3 蛋白;酵母双杂交;免疫共沉淀;免疫荧光;小鼠受精卵