

**【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  $\beta$ -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