

B-S3-4

探究 3C 蛋白酶切割 p51 在 B 组柯萨奇病毒致病毒性心肌炎中的作用

宋 庆¹,王雪卿²,郎秀娟²;指导教师:钟照华

1. 哈尔滨医科大学 2010 级基础医学七年制
2. 哈尔滨医科大学 2011 级基础医学七年制

【立题依据】 B 组柯萨奇病毒(CVB)是病毒性心肌炎的主要病原体,可引发扩张型心肌病,尚无治疗药物。CVB 的 3C 蛋白酶切割前体蛋白形成结构蛋白,完成病毒复制,也通过切割宿主蛋白发挥致病作用。我们发现宿主细胞中一个长约 51kDa 的蛋白质(其功能尚不清楚,暂称为 p51)有 3C 蛋白酶的特异性酶切位点,推测 p51 是 CVB 的作用靶点之一,3C 蛋白酶切割 p51 可能是 CVB 致病的新机制。

【设计思路】 通过蛋白质过表达和沉默等分子生物学技术,在细胞和动物实验中证实 CVB 3C 蛋白酶可以切割 p51,并通过通过切割 p51 发挥致病作用。

【实验内容】 本实验设计通过以下 4 方面研究 CVB 通过其 3C 蛋白酶切割 p51 致病的作用机制:(1)构建真核表达载体质粒 pEGFP-p51;(2)细胞实验确定 3C 蛋白酶通过特异性位点切割 p51;(3)细胞实验确定 CVB 通过 3C 蛋白酶切割 p51 发挥致病作用;(4)动物实验确定 3C 蛋白酶可以切割 p51 并在 CVB 致病毒性心肌炎中发挥作用。

【材料】 HeLa 细胞;Balb/c 小鼠;CVB3,嗜心肌 CVB3 H3 株;质粒:pEGFP-C1,pEGFP-2A,pEGFP-3C;干扰 RNA:通过商业渠道购买。

【可行性】 本实验设计有充分依据表明 p51 有 CVB 3C 蛋白酶的酶切位点,CVB 可能通过 3C 蛋白酶切割 p51 发挥致病作用,从而导致病毒性心肌炎和扩张型心肌病。

【创新性】 通过本实验,我们可能揭示 CVB 致病的新机制,能够更加全面地了解 CVB 致病毒性心肌炎的分子机制,为研发抗 CVB 药物提供新靶点,为临床治疗提供新方向,有广泛的应用前景。

关键词:柯萨奇病毒;51kDa 蛋白;3C 蛋白酶;致病机制

B-S3-5

抗碳青霉烯类产酸克雷伯菌的耐药机理

石 平,丁 喆,庄小玲,姜 贺,邵 星;指导教师:金志雄

湖北医药学院,2011 级,麻醉学

【立论依据】 肠杆菌科细菌是寄居肠道的一大类正常菌群,已成为病人医院获得性感染的主要来源。产酸克雷伯菌是肠杆菌科克雷伯氏菌属的一个种,2011 年度卫生部全国细菌耐药监测网肠杆菌科细菌耐药监测结果显示,产酸克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素的耐药率在 5% 以上。有研究在产酸克雷伯菌耐药基因的检测中发现了碳青霉烯酶基因 blaKPC。

【设计思路】 本课题对临床抗碳青霉烯类产酸克雷伯菌染色体或质粒介导的耐药基因进行研究,初步明确菌株的耐药机理及发生院内感染的可能,为临床监测该细菌的耐药变化和预防或控制院内感染提供依据。

【实验内容】 (1)筛选耐碳青霉烯类产酸克雷伯菌菌株;(2)菌株的形态结构、生理生化和分子(16S rDNA)鉴定;(3)菌株染色体、质粒耐药基因提取克隆;(4)同或异属、种敏感和耐药菌株进行遗传物质的人为干预,推测耐药菌株发生院内感染的潜能。

【材料】 菌株来源:临床标本(痰液、血液、脑脊液等)分离得到 13 株耐药菌株;抗菌药物:亚胺培南、厄他培

南、美罗培南纸片;培养基:营养琼脂培养基;仪器:VITEK-32 全自动微生物鉴定/药物分析系统,低速高速离心机,PCR 仪,电泳仪,凝胶成像系统,—20℃低温冰箱;试剂:D3H₂O,PCR 引物,等电聚焦电泳用聚丙烯酰胺凝胶,TaqMix(含 KCl、Tris-HCl、MgCl₂、dNTP 混合物、Pfu DNA 聚合酶、溴酚蓝、其它增强剂与稳定剂),GelRed 核酸电泳染料,PCR DNA Loading Buffer(1 000 bp)。

【可行性】 (1)研究路线在理论和实践上都是可行的,相关的技术都比较成熟;(2)湖北医药学院具备所有相关实验条件;(3)本课题指导教师有 20 余年的微生物代谢产物及基因组研究经历,且已完成十堰地区三家三甲医院近十年来临床耐药菌株的流行病学调查和耐药性分析;(4)现已获得耐药菌株 *K. oxytoca*,正在进行其染色体 DNA 携带耐药基因的筛查。

【创新性】 国内外对产酸克雷伯菌耐碳青霉烯类机理的研究刚刚起步,本课题拟提取耐药株质粒 DNA,分析耐药基因,预测产酸克雷伯菌院内感染的可能。目前,国内相关报道很少,本课题为较早开展的研究。

关键词:产酸克雷伯菌;碳青霉烯类;耐药性;KPC-2

B-S3-6

NF- κ B 在感染合胞病毒的人支气管上皮细胞凋亡中作用的探讨

吴东升¹,丁 煌¹,张诗瑶²,张 彧¹,张晨阳¹;指导教师:李 玲,刘慧萍

1. 湖南中医药大学 2012 级中西医结合

2. 湖南中医药大学 2013 级中医临床

【立论依据】 呼吸道合胞病毒(RSV)易致呼吸道上皮细胞受损凋亡,NF- κ B 与细胞凋亡密切相关。建立感染 RSV 的支气管上皮细胞(NHBE)模型,检测 NHBE 的增值、凋亡情况及 NF- κ B 的转位,阐明 NF- κ B 在感染合胞病毒的人支气管上皮细胞凋亡中的作用,为临床治疗呼吸道疾病提供新的方法和思路。

【设计思路】 建立感染 RSV 的 NHBE 模型,检测细胞增值、凋亡情况以及 NF- κ B 是否转位,定性定量地探讨呼吸道合胞病毒(RSV)是否通过诱导 NF- κ B 激活介导人支气管上皮细胞(NHBE)凋亡。

【实验内容】 培养人支气管上皮细胞(NHBE),建立并鉴定 RSV 感染 NHBE 的体外细胞模型(用定量 RT-PCR 法鉴定细胞模型是否成功;设正常组、水相处理组、RSV 感染组,MTT 比色法检测 RSV 对 NHBE 增殖的抑制作用,感染组以不同滴度分为 1 000、500、100、50、10 TCID₅₀ 5 个组,感染 12、48、72、96、120 h);用 Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂盒检测 RSV 诱导体外培养的 NHBE 的凋亡;以免疫荧光法和蛋白质印迹法检测经 RSV 处理的人支气管上皮细胞 NF- κ B 的激活和对细胞凋亡的影响。

【材料】 人支气管上皮细胞(NHBE)细胞;RSV A 亚型原型株 Long 株;细胞胞浆核蛋白提取试剂盒;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒;兔抗 NF- κ B 抗体;电泳仪。

【可行性】 (1)呼吸道合胞病毒(RSV)易致呼吸道上皮细胞受损凋亡,NF- κ B 与细胞凋亡密切相关,感染 RSV 的人支气管上皮细胞模型容易建立成功。(2)本组成员长期跟随老师进行呼吸合胞病毒、流感病毒的研究,具有一定的科研基础和实验能力。(3)所需试剂、仪器、材料,医学基础实验中心基本都有配备,学校同时具备 SPF 级实验中心。

【创新性】 (1)首次从 NF- κ B 角度探讨感染 RSV 的 NHBE 模型,为临床治疗呼吸道疾病提供新的方法思路。(2)分别使用免疫荧光法和蛋白质印迹法定性与定量检测 RSV 是否通过诱导 NF- κ B 激活介导 NHBE 凋亡。

关键词:呼吸道合胞病毒(RSV);人支气管上皮细胞(NHBE);核因子 NF- κ B