

化和骨质疏松的发生、发展过程中起重要作用,为黄韧带骨化和骨质疏松等老年骨骼系统疾病的治疗提供新的思路。

关键词:骨质疏松;黄韧带骨化;血清 miRNA

A-S2-37

构建一种新型穿膜活性 hMsra 的酵母表达体系

陈佳佳,王跃申,孙守国,何绍俊;指导教师:喻红

武汉大学 2010 级临床医学五年制

【目的】 当机体代谢生成的活性氧簇超过了抗氧化系统的清除能力,可引起氧化应激而与心血管疾病、炎症、肿瘤等发生密切相关。甲硫氨酸亚砷还原酶 A (methionine sulfoxide reductase A, MsrA)能够特异还原被氧化的甲硫氨酸,是细胞内一道重要的蛋白抗氧化防御屏障。导师课题组曾构建大肠杆菌表达系统并获得人源性 MsrA (hMsrA),证实其在体外的抗氧化作用。本课题试图利用酵母表达体系表达一种具有细胞穿膜活性的分泌型 Pep-1-hMsrA,为进一步研究 MsrA 对细胞的抗氧化保护机制奠定基础。

【方法】 利用基因克隆技术,合成含有细胞穿膜肽的 pUC19/pep-1 载体,双酶切将 Pep-1 序列连接到 pET28a/hMsrA 质粒上,构建 pUC19/pep-1-hMsrA,再双酶切亚克隆到酵母表达载体获得 pPICZ9k/pep-1-hMsrA 重组质粒。经线性化的质粒电转导入毕赤酵母 GS115,通过 G418 抗性筛选、PCR 鉴定拷贝数,构建新的 hMsrA 酵母表达体系。经甲醇(0.5%V/V)诱导表达,SDS-PAGE 鉴定发酵液中 Pep-1-hMsrA 融合蛋白的产量,利用 Ni-NTA Agarose 亲和层析分离纯化目的蛋白,蛋白质印迹法鉴定融合蛋白的细胞穿膜效率,利用特异荧光底物鉴定融合蛋白的催化活性。

【结果】 成功构建 pPIC9k/Pep-1-hMsrA 重组质粒,并筛选出 17 株表达 Pep-1-hMsrA 的 GS115 工程株。诱导表达并纯化的目的蛋白产量约为 30~40 mg/L,SDS-PAGE 显示 MW 为约 50 kD 的单一一条带,糖染色表明目的蛋白糖基化。蛋白质印迹法鉴定纯化蛋白有免疫原性,并具有特异还原活性。

【结论】 建立了 Pep-1-hMsrA 重组蛋白的酵母表达体系,纯化的 Pep-1-hMsrA 存在高度糖基化可能影响其催化活性,有待进一步研究此 MsrA 融入蛋白的结构与功能。

关键词:甲硫氨酸亚砷还原酶 A;细胞穿膜肽;毕赤酵母表达体系;纯化

A-S2-38

一个中国 X 性连锁少汗型外胚层发育不良家系的遗传变异分析

黄芙蓉¹,陶昱²,李海瑞¹,王碧媛¹,蒋子剑¹;指导教师:马捷

1. 西安交通大学医学部 2010 级临床医学

2. 西安交通大学医学部 2009 级口腔医学

【目的】 前期,课题组在临床工作中发现了一个 X 性连锁少汗型外胚层发育不良(XLHED)疑似患者家系。该家系共四代 24 例,男性 15 例,女性 9 例,患者 4 例。鉴此,课题组拟通过分子水平的研究,分析鉴定该家系的致病基因和遗传突变,探讨可能的分子致病机制,为疾病的预防与治疗奠定一定的基础。

【方法】 课题组对该家系资料进行了收集和整理,绘制出了遗传图谱。本课题对疾病家系中所有患病及未患病个体进行了详细的临床检查,并获得患者口腔的临床和 X 线照片。遗传分析中课题组运用直接测序的方法对

候选致病基因进行序列分析,并与 300 例正常对照人群的基因序列进行序列比对。

【结果】 在该家系中,4 例患者均为男性,另有 5 例女性确认为是携带者。测序结果显示,所有患者和携带者中 EDA 基因的第 220 个密码子发生点突变(C→T),造成密码子 CCA 转变为 CTA,对应的氨基酸残基由脯氨酸转变为亮氨酸。同时,在该家系的其他健康成员以及随机选取的 300 例正常对照人群中均未检测到该突变。

【结论】 XLHED 是一种 X 连锁的遗传疾病,目前研究发现 XLHED 的发生发展与 3 个基因有关,分别是位于 Xq12-q13.1 的 EDA、位于 2q11-q43 的 EDAR 和位于 1q42.2-q43 的 EDARADD。本 XLHED 家系是由 EDA 基因突变引起的。已知 EDA 蛋白具有 4 个功能区,包括:跨膜区、弗林蛋白酶切割位点、(Gly-X-Y)₁₉ 胶原样结构域、TNF 同源结构域。其中(Gly-X-Y)₁₉ 胶原样结构域及 TNF 同源结构域位于细胞外,构成细胞外 C 末端结构域。本课题组所鉴定的突变 c.659C>T 是一个新的,且从未被报道过的错义突变。在 19 个(Gly-X-Y)胶原样结构域中,本次鉴定的突变发生在第 13 个(Gly-X-Y)的 Y 位,造成脯氨酸残基被亮氨酸残基替代。由于脯氨酸和亮氨酸侧链基团的差异,很可能造成肽链上该位点之后氨基酸残基的空间走向改变,影响 EDA 蛋白的空间构象,进而造成 EDA-EDAR 结合障碍,使之无法有效激活 NF-κB 的信号传导途径。进一步阻断或削弱了外胚层发育所必须的基因表达。本课题的完成将进一步丰富 EDA 基因突变谱,并为 XLHED 致病机制的研究提供新思路和新线索。

关键词: XLHED; EDA; 突变; X-连锁

A-S2-39

MiR-497 通过抑制胰岛素受体的表达导致 E3 大鼠 HFD-MetS 模型肝胰岛素抵抗

王美晨¹, 李嘉熙¹, 刘 鹏², 张 鹏³; 指导教师: 李冬民

1. 西安交通大学医学部 2010 级临床医学七年制
2. 西安交通大学医学部 2010 级口腔医学七年制
3. 西安交通大学医学部 2010 级口腔医学五年制

【目的】 本实验旨在探究 microRNA 参与调控 E3 大鼠高脂饮食诱导的代谢综合征(HFD-MetS)模型肝胰岛素受体(InsR)表达下降的分子机制。

【方法】 首先根据 microRNA 数据库预测并选择可能调控 InsR 表达的候选 microRNAs, 用实时定量 PCR 法检测 E3 大鼠 HFD-MetS 模型肝中这些候选 microRNAs 的表达水平, 选择与 InsR mRNA 表达呈负相关的关键 microRNA。然后用该关键 microRNA 的模拟物和抑制剂瞬时转染大鼠肝癌细胞系 CBRH-7919 细胞 24 h。无血清培养基培养 4 h 后, 用 100 nmol/L 的胰岛素分别处理上述细胞 0、5、15 min, 用实时定量 PCR 和蛋白质印迹检测 InsR、AKT 及磷酸化 AKT 的表达。最后, 分别构建包含 miR-497 结合位点和突变结合位点的、野生型和突变型的胰岛素受体 mRNA 3'UTR 区双荧光素酶报告基因载体(简称为野生型载体和突变型载体), 用 miR-497 模拟物和抑制剂分别与空载体、野生型载体、突变型载体转染 293T 细胞、观察萤火虫/海肾虫荧光强度比值的相对改变。

【结果】 实时定量 PCR 及相关分析结果显示 miR-497 在 E3 大鼠 HFD-MetS 模型肝中表达显著上调, 并与 InsR 表达水平呈负相关。用 miR-497 模拟物瞬时转染 CBRH-7919 细胞 24 h, InsR 的 mRNA 和蛋白质表达水平与对照组相比显著下降, 胰岛素处理 5、15 min 后在 ser473 和 Thr308 位点磷酸化的 AKT 与对照组相比也明显下降; 而 miR-497 抑制剂瞬时转染后, InsR 的 mRNA 和蛋白质及胰岛素处理后 ser473 和 Thr308 位点磷酸化的 AKT 与对照组相比明显上调, 这些结果说明 miR-497 负性调节了胰岛素受体表达。最后用 miR-497 模拟物分别与空载体、野生型载体及突变型载体转染 293T 细胞后, 与空载体组相比, 野生型载体组相对的萤火虫/海肾虫荧光强度比值明显下降, 突变型载体组无变化, 而用 miR-497 抑制剂分别与上述三种载体转染 293T 细胞后, 野生型载体组结果恰相反、突变型载体组亦无变化; 这些结果进一步提示 miR-497 可直接与大鼠 InsR mRNA 的 3-UTR