

分类号\_\_\_\_\_

密级\_\_\_\_\_

U D C\_\_\_\_\_

编号\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

Cx32 通过 p53 和 Akt 信号通路调控肝癌细胞的转移和增殖

赵必星

工作完成日期 2014 年 8 月

报告提交日期 2014 年 12 月

厦门大学

2014 年 12 月

Cx32 通过 p53 和 Akt 信号通路调控肝癌细胞的转移和增殖

Connexin32 regulates hepatoma cell metastasis and proliferation via the p53 and Akt pathways

博 士 后 姓 名 赵必星

流动站（一级学科）名称 生物学

专 业（二级学科）名称 细胞生物学

研究工作起始时间 2011 年 11 月

研究工作期满时间 2014 年 8 月

厦 门 大 学

2014 年 8 月

## 厦门大学博士后研究工作报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（ ）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

## 摘要

肝细胞癌( Hepatocellular carcinoma, HCC ) 是全球最常见、高发的恶性肿瘤之一。高复发转移性已成为影响 HCC 预后的最重要因素。以往的研究发现, 细胞间隙连接蛋白 Cx32 在肝癌中的表达降低。本课题研究中, 我们通过体外细胞实验和人肝癌组织水平验证, 探讨 Cx32 对肝癌转移和增殖的影响及其分子机制。对人肝癌组织中 Cx32 表达水平的分析发现, Cx32 在肝癌中表达的下将与肿瘤血管侵犯、肿瘤大小以及不良的术后生存期密切相关。在肝癌细胞中敲低或者过表达 Cx32 都显示, Cx32 不仅能够抑制肝癌细胞的侵袭和迁移, 同时也抑制了细胞的增殖。对分子机制的研究发现, Cx32 能够直接增强 p53 的乙酰化水平和转录激活活性, 从而上调了 p53 下游肿瘤转移抑制因子 Kai1/CD82 的表达。另外, Cx32 负调控 Akt 的磷酸化和细胞周期调控蛋白 Cyclin D1 的表达, 从而发挥抑制肝癌细胞增殖的功能。我们的结果揭示了 Cx32 在肝癌中表达下降及其调控肝癌增殖和转移的功能, 提示 Cx32 可能作为一个潜在的肝癌治疗靶点。

关键词: Connexin32, 肝细胞癌, 侵袭, 迁移, 增殖

## 英文摘要

### Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) grows rapidly and is frequently associated with vascular invasion, metastasis, recurrence and poor prognosis. The expression of connexin32 (Cx32) is frequently downregulated in HCC tissues. In this study, the role of Cx32 in HCC metastasis and proliferation was investigated *in vitro*, as well as human HCC specimens. The reduction of Cx32 in HCC tissues was significantly associated with increased vascular invasion, increased tumor size and poor survival. Both knockdown and overexpression studies in the *in vitro* assays revealed that Cx32 not only suppressed the invasion and migration of HCC cells but also repressed HCC cell proliferation. Subsequent investigations revealed that Cx32 directly enhanced the acetylation and transcriptional activity of p53, thus upregulating the expression of the tumor metastasis suppressor protein KAI1/CD82, which is a p53 target gene. Additionally, Cx32 negatively regulated the phosphorylation of Akt and the expression of the cell cycle regulation protein cyclin D1, thereby inhibiting the proliferation of HCC cells. Our results imply that Cx32 downregulation contributes to the proliferation and metastasis of HCC, and the restoration of Cx32 expression may be a promising strategy for HCC therapy.

Keywords: connexin32, hepatocellular carcinoma, cell invasion, migration, proliferation

# 目 录

前 言.....	4
材料与amp;方法.....	5
2.1 实验材料.....	5
2.1.1 人肝癌组织标本.....	5
2.1.2 细胞株.....	5
2.1.3 实验动物.....	5
2.1.4 质粒载体.....	5
2.1.5 试剂与耗材.....	6
2.1.6 仪器设备.....	7
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 质粒构建.....	8
2.2.2 细胞培养.....	9
2.2.3 细胞转染.....	9
2.2.4 稳定转染细胞筛选.....	10
2.2.5 蛋白提取与 Western blot.....	10
2.2.6 免疫共沉淀.....	12
2.2.7 荧光素酶活性测定实验.....	12
2.2.8 RNA 提取和 real-time PCR.....	13
2.2.9 Transwell 细胞迁移和侵袭实验.....	15
2.2.10 细胞划痕实验.....	15
2.2.11 裸鼠移植瘤模型.....	16
2.2.12 免疫组化.....	16
2.2.13 EdU 细胞增殖检测实验.....	18
2.2.14 统计学分析.....	19
实验结果.....	20
3.1 Cx32 表达的下调与肝癌恶性表型相关.....	20
3.2 Cx32 抑制肝癌细胞的侵袭和迁移.....	24
3.3 Cx32 通过 p53 信号通路抑制肝癌细胞转移.....	28
3.4 Cx32 通过 Akt 信号通路抑制肝癌细胞增殖.....	32
3.5 裸鼠移植瘤中 Cx32 抑制肝癌生长和转移.....	34
讨 论.....	37
参考文献.....	39
致 谢.....	43
博士生期间发表的学术论文、专著.....	44
博士后期间发表的学术论文、专著.....	45
个人简历.....	46
联系地址.....	47

## 前 言

肝癌作为全球最常见的5大恶性肿瘤之一，其死亡率排在癌症的第三位(1)。目前对肝癌的治疗仍是以手术治疗为主的综合治疗模式，但是由于肝癌患者术后容易复发和转移，导致肝癌术后5年生存率仅40%左右。到目前为止，肝癌发生与发展的分子机制仍然没有阐述清楚。

细胞间隙连接通道位于相邻细胞的接触点，由 Connexin 蛋白组成，其主要功能为介导细胞与细胞之间的代谢物、营养物质和第二信使等小分子物质的传输(2, 3)。Connexin 及其介导的细胞间通讯在维持器官、组织的内稳态和细胞分化等反面扮演重要的角色(2, 4)。Connexin 命名是根据其不同亚型的分子量，这些不同亚型的 Connexin 蛋白在不同的组织中表达并具有不同的功能(5)。在肝实质细胞中 Cx32 和 Cx26 是主要的两类连接蛋白(2)。先前的众多研究证据显示,Connexin 基因在肿瘤中是作为一个抑癌基因发挥功能的(6)。然而,现在有一些新数据显示，他们也可能在肿瘤进展中发挥作用。一些报道认为 Connexin 可能促进肿瘤的侵袭和转移(7-9)。因此，Connexin 和肿瘤细胞侵袭的关系一直存有争议,需要进一步的实验验证。

肿瘤细胞的一个显著特征就是对细胞周期行进的调节失控，导致细胞持续的恶性增殖。早期的研究发现，在癌细胞中提高 connexin 的表达，可导致细胞出现增殖抑制的表型变化(10)。最近的研究表明，connexin 在多种不同的肿瘤中都发挥抑制增殖的功能，包括肝细胞癌(11)、胃癌(12)、胰岛瘤(13)、骨肿瘤(14)、和肺癌(15)。因此，对间隙连接蛋白的研究为肿瘤细胞周期的调控机制提供一个新的可能机制，也为从调控细胞中周期行进的角度治疗肿瘤提供了一个新的可能靶点。

在本研究中，我们揭示了 Cx32 在肿瘤细胞增殖和转移过程中的重要性。首先，在人肝癌组织中 Cx32 的下调同肿瘤大小、侵袭能力以及不良术后生存相关。随后的体外实验证实，Cx32 蛋白在肝癌细胞中发挥显著抑制增殖和转移的功能。我们进一步研究 Cx32 调控肝癌细胞增殖和转移的分子机制发现，Cx32 抑制增殖和转移分别通过 PI3K/Akt 和 p53 信号通路的介导。

# 材料与方法

## 2.1 实验材料

### 2.1.1 人肝癌组织标本

原发性肝癌及癌旁组织标本来源于 2007~2012 年中山医院肝胆外科手术切除标本。研究通过厦门大学医学伦理委员会批准，并经过患者的知情同意。

### 2.1.2 细胞株

肝癌细胞系 (HepG2, QGY-7701, SMMC-7721, Hep3B) 和人胚肾细胞 HEK293T 购自上海细胞生物研究所细胞库。MHCC97-H 细胞系由上海肿瘤研究所获得的。细胞培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中，含 100 U / ml 青霉素和 100U/ml 链霉素。

### 2.1.3 实验动物

BALB/c nu/nu 裸小鼠，6-8 周龄，体重 18-25g，购置于上海海斯莱克实验动物有限责任公司，饲养于厦门大学医学院实验动物中心。

### 2.1.4 质粒载体

sh-Cx32 表达质粒由本实验室构建、保存；

$\beta$ -gal、pGL3-p53RE、Myc-p53 表达质粒来源于厦门大学生命科学学院吴乔教授实验室；

pcPUR+U6icassette 载体质粒由厦门大学附属中山医院消化内科实验室惠赠；

p53 (K373R/K382R) 点突变质粒由北京大学医学部朱卫国教授惠赠；

pIRES2-EGFP-Cx32 表达质粒由 Jennifer Orthmann-Murphy (University of Pennsylvania Medical Center) 教授惠赠。

Cx32 siRNA 和 p53 siRNA 由广州锐博公司合成。



## 2.1.5 试剂与耗材

胶回收试剂盒	北京天根生化科技有限公司
质粒提取试剂盒	北京天根生化科技有限公司
柱式胶回收试剂盒	北京天根生化科技有限公司
限制性内切酶	加拿大Fermentas公司
T4DNA连接酶	加拿大Fermentas公司
DL 5000Marker	北京康为世纪生物科技有限公司
琼脂糖(Agarose)	美国Promega 公司
Marker I DNA Ladder	索莱宝科技有限公司
DL 5000Marker	北京康为世纪生物科技有限公司
Mouse anti Cx32 antibody	Thermo
Rabbit anti Cx32 antibody	武汉博士德生物
Mouse anti GFP	Santa Cruz
HDAC1 antibody	Proteintech
MMP2 antibody	Epitomics
PCNA antibody	Abcam
beta-actin antibody	Sigma
acetylated-p53 antibody	Upstate Biotechnology
p53, Akt, phosphorylated-Akt antibody	Cell Signaling Technology
cyclin D1, p21 <sup>Cip1/Waf1</sup> antibody	Cell Signaling Technology
羊抗兔 IgG 抗体 (GAR007)	中国联科生物技术有限公司
羊抗小鼠 IgG 抗体 (GAR009)	中国联科生物技术有限公司
ECL 化学发光显色液	北京普利莱基因技术有限公司
超 0.45um 孔径 PVDF 膜	美国 Amersham 公司
RIPA 蛋白质裂解液	江苏碧云天生物技术研究所以
4×蛋白上样缓冲液、30%丙烯酰胺	索莱宝科技有限公司
蛋白预染 marker	美国 Thermo scientific 公司
四甲基乙二胺 (TEMED)	美国 Sigma 公司
免疫组化试剂盒	福州迈新生物技术开发有限公司

胎牛血清	美国 GIBCO 公司
胰蛋白酶	美国 Hyclone 公司
RPMI-1640 培养基	美国 Hyclone 公司
DMEM 培养基	美国 Hyclone 公司
100*双抗	美国 Hyclone 公司
DMSO	美国 Sigma 公司
嘌呤霉素	美国 sigma 公司
TurboFect™ Protein Transfection Reagent	MBI Fermentas
HiPerFect siRNA transfection reagent	Qiagen
CHX	美国sigma公司
Ly294002	美国sigma公司
实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒	Fermentas 公司
PCR 引物合成	上海生工生物公司
Transwell 小室	美国 BD 公司
EDU 试剂盒	联科生物技术有限公司
其余生化试剂	Sigma, BBI 或国产分析纯

### 2.1.6 仪器设备

生物安全柜	美国 Thermo 公司
C02 细胞培养箱	美国 Thermo 公司
细胞计数仪	韩国 ADAM 公司
超纯水仪	Millipore-Q 公司
Western blotting 设备	BIO—RAD 公司
XW-80A 旋涡混合器	上海医科大学仪器厂
电热恒温水浴锅	上海医疗器械七厂
电子分析天平	德国 Sartorius 公司
超声破碎仪	美国 Sonic 公司
微量振荡器	上海象华化工有限公司
低温离心机	德国Thermo Fisher 公司

电热恒温水槽	上海精宏实验设备有限公司
BR680 型酶标仪	美国BIO-RAD 公司
电热恒温鼓风干燥箱	上海精宏实验设备有限公司
液氮罐	美国Thermolyne 公司
匀浆机	德国 IKA 公司
程序性冻存盒	美国 Nalgene 公司
L420 台式低速离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司
低温高速离心机 5804R	德国 Eppendorf 公司
4℃冰箱、-20℃冷柜	青岛海尔公司
-80℃冰箱	美国 Thermo Scientific 公司
Excelsior 型生物组织自动脱水机	赛默飞世尔科技仪器公司
Histocentre 3 型组织包埋机	赛默飞世尔科技仪器公司
HM315 型轮转切片机	赛默飞世尔科技仪器公司
显微镜	德国 Leica 公司
荧光定量 PCR 扩增仪	ABI 公司 5700 型
核酸测定仪	美国 Thermo Scientific 公司
全自动凝胶成像分析系统	上海天能科技有限公司
紫外分光光度计	美国 BeCkman 公司
高速台式冷冻离心机	美国 BeCkman 公司

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 质粒构建

以 pcPUR+ U6icassette 为载体构建含有 Cx32 RNA 干扰序列的真核表达质粒，按照 RNAi 寡核苷酸的设计原则和 Cx32 的 cDNA 序列，设计合成针对 Cx32 表达的三组 DNA 模板引物（表 1），将正反向引物混合退火，并插入到 pcPUR+ U6icassette 载体的 BspMI 酶切位点，由此产生 pcPUR+ U6-siCx32。连接产物经过转化，提取质粒并测序验证，测序正确的质粒用于后续转染实验。

Table 1 siRNA targeting Cx32 gene	
Site 1	<p>Sense-oligo: 5' CACCCCGGCATTCTACTGCCATTACGTGTGCTGTCCGTAATG GCAGTAGAATGCCGG TTTT 3'</p> <p>Antisense-oligo: 5' GCATAAAAACCGGCATTCTACTGCCATTACGGACAGCACACG TAATGGCAGTAGAATGCCGG 3'</p>
Site 2	<p>Sense-oligo: 5' CACCGCTGCAACAGCGTTTGCTAACGTGTGCTGTCCGTTAGC AAACGCTGTTGCAGCTTTTT 3'</p> <p>Antisense-oligo: 5' GCATAAAAAGCTGCAACAGCGTTTGCTAACGGACAGCACAC GTTAGCAAACGCTGTTGCAGC 3'</p>
Site 3	<p>Sense-oligo: 5' CACCGGCTCACCAGCAACACATAACGTGTGCTGTCCGTTATG TGTTGCTGGTGAGCC TTTT 3'</p> <p>Antisense-oligo: 5' GCATAAAAAGGCTCACCAGCAACACATAACGGACAGCACAC GTTATGTGTTGCTGGTGAGCC 3'</p>

## 2.2.2 细胞培养

细胞培养在 10% 小牛血清 (FBS), 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养液中, 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。传代时倾去培养液, 以 PBS 洗 1 到 2 次, 加适量胰酶/EDTA 消化液, 静置 1~2 分钟, 显微镜下观察到细胞变圆, 倒去消化液, 加培养液用移液枪吹成单细胞悬液, 分瓶培养。

## 2.2.3 细胞转染

### 2.2.3.1 磷酸钙沉淀法

细胞接种于直径 6 cm 的培养盘 24 h 后转染。转染前细胞先换液。取 1.5 mL 离心管, 依次加入水 180  $\mu$ L, 相应质粒若干, 2.5 M CaCl<sub>2</sub> 20  $\mu$ L, HBS 200  $\mu$ L, 轻柔混匀后室温静置 15-30 min。随后缓慢均匀加到培养液中, 轻轻晃动培养盘, 使其均匀分布。24~48 h 后收集细胞用于后续实验。

溶液配方:

HBS: 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 mM Glucose, 50 mM HEPES, pH 7.05

### 2.2.3.2 TurboFect 转染试剂转染

细胞接板 24 h 后转染。以 6 孔板为例，转染前细胞先换液，取 1.5 ml 离心管，加入 200  $\mu$ L 无血清无双抗 DMEM 培养液，加入质粒 2  $\mu$ g，转染试剂 4  $\mu$ L，混匀，室温静置 15—30 min。缓慢均匀加到培养液后，轻轻晃动圆盘，使其均匀分布。24~48 h 后收集细胞用于后续实验。

### 2.2.4 稳定转染细胞筛选

为构建 Cx32 稳定敲低的肝癌细胞系，用 TurboFect 转染试剂将 pcPUR+ U6-siCx32 或对照载体转染到 HepG2 细胞细胞中，加入 2 微克/毫升嘌呤霉素筛选 3 周，挑取单克隆继续培养，成为稳转细胞系。稳定转染 pcPUR+ U6-siCx32 或 pcPUR+ U6（对照载体）的细胞株分别命名为“shCx32”或“shCtrl”。

### 2.2.5 蛋白提取与 Western blot

(1) 细胞的收集（以直径 6 cm 培养盘为例）

加入 PBS，将细胞刮入离心管中，4 $^{\circ}$ C，1200-1500 rpm 离心 10 min，弃上清，细胞保存于 -80 $^{\circ}$ C 或现用。

(2) 细胞裂解

每管中加含 1 mmol/L 的 PMSF, Cocktail (临用前加，每 100  $\mu$ L 裂解液加 1  $\mu$ L) 的 lysis buffer 细胞裂解液 400  $\mu$ L，冰上超声破碎，4 $^{\circ}$ C，13000 rpm 离心 30 min 收集上清液，测蛋白浓度。

(3) 蛋白浓度的测定

- a. 96 孔板中每孔加 200  $\mu$ L Bradford 蛋白测定液，每组设 3 孔；
- b. 空白：每孔加 2  $\mu$ L Lysis buffer 裂解液混匀；
- c. 标准：每孔加 2  $\mu$ L 浓度为 1 mg/mL 的 BSA (溶于 Lysis Buffer)；
- d. 样品：每孔加 2  $\mu$ L 混匀；

e. 于酶标仪测 OD 595, 计算样品浓度。

#### (4) 蛋白电泳

取 20-40  $\mu\text{g}$  蛋白样品, 加等体积  $2 \times \text{SDS}$  样品缓冲液,  $100^\circ\text{C}$  煮沸 6 min, 于不连续 SDS-PAGE 胶中电泳, 电压 100V, 待样品进入分离胶后电压调为 150V。

#### (5) 电转移

电转液于  $4^\circ\text{C}$  预冷, 切好胶后将同样大小的甲醇预处理的 PVDF 膜以及滤纸浸于电转液中; PVDF 膜贴于胶后, 两面覆盖滤纸, 赶尽气泡, 按膜朝正极的顺序装于电转槽中, 于  $-20^\circ\text{C}$  电转 (100 V, 60 min)。

#### (6) 抗原抗体反应

a. 封闭: 封闭液室温封闭 1 h;

b. 一抗反应: 封闭后膜与相应一抗室温孵育 1-2 h;

c. 二抗反应: TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 加入相应的二抗, 室温孵育 1-2 h。

#### (7) ECL 检测

TBST 洗 3 次, 每次 10 min。ECL 的 A 液和 B 液以 1:1(V/V)混和, 于暗室中滴加于膜表面, 孵育 1 min 后曝光。

溶液配方:

PMSF: 100 mM PMSF 溶于异丙醇

Lysis Buffer: 50 mM HEPES(pH 7.4), 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X-100, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25 mM NaF

10 $\times$ 下层胶缓冲液 (1L): 422.5 g Tris, 10 g SDS, 用 HCl 调 pH 值至 8.8

4 $\times$ 上层胶缓冲液 (1L): 60.6 g Tris, 4g SDS, 用 HCl 调 pH 值至 6.8

10%下层胶 (10 mL): 3.33mL 30% 丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺(29:1), 1 mL 10 $\times$ 下层胶缓冲液, 5.6 mL 水, 100  $\mu\text{L}$  10% 过硫酸铵, 10  $\mu\text{L}$  TEMED

4%上层胶(5 mL): 0.67 mL 30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺(29:1), 1.25 mL 4 $\times$ 上层胶缓冲液, 3.05 mL 水, 50  $\mu\text{L}$  10% 过硫酸铵, 5  $\mu\text{L}$  TEMED

2 $\times$ SDS 样品缓冲液 (10 mL): 2 mL 甘油, 4 mL 10% SDS, 2 mL 4 $\times$ 上层胶缓冲液, 1 mL  $\beta$ -巯基乙醇, 0.002 g 溴酚兰

10 $\times$ 电泳缓冲液 (1L): 30 g Tris, 144 g Glycine, 10 g SDS

10 $\times$ 电转缓冲液 (1 L): 24.25g Tris, 112.5 g Glycine, 临用前加甲醇至终浓

度为 10%

10×TBS (1 L): 24.2 g Tris, 80 g NaCl, 用 HCl 调 pH 值至 7.6

TBST 洗脱液 (1 L): 100 mL 10×TBS, 1 mL Tween-20

封闭液: 5%脱脂奶粉溶于 TBST

一抗稀释缓冲液: 5% BSA, 0.03% NaN<sub>3</sub> 溶于 TBST

ECL: A 液: 将 22.5 g Luminol 溶解在 0.5 mL DMSO 中, 加入 220 μL 90 mM Pcoumaric acid(将 18.5 mg P-coumaric acid 溶解在 1.25 mL DMSO 中), 加入 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) 至 50 mL; B 液: 将 30.6 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加入到 50 mL 0.1 M Tris-HCl (pH8.5); 使用时, ECL A 液和 ECL B 液按等体积混匀。

### 2.2.6 免疫共沉淀

(1) 收集细胞;

(2) 加入 500μL 含蛋白酶抑制剂的 Lysis Buffer, 冰上超声破碎, 4℃, 13000 rpm 离心 30 min 收集上清液;

(3) 取 5%的上清液做为总蛋白(Input), 余下的上清液加入 5 μL protein A 琼脂糖珠和 1 μg 相应的一抗, 4℃孵育 3 h;

(4) 800 μL Lysis buffer 洗珠子 3 次, 4℃, 3000 rpm 离心 3 min;

(5) 吸干上清液, 加入 30 μL 2×SDS 样品缓冲液, 沸水加热 6 min。Western blot 检测。

### 2.2.7 荧光素酶活性测定实验

(1) 以  $5 \times 10^4$  细胞/孔的细胞接种于 24 孔板中, 24 h 后转染实验所需的质粒, 包括荧光素酶报告基因表达质粒和 β-半乳糖苷酶表达质粒。

(2) 弃去培养液后, PBS 洗 1 次, 每孔加入 200 μL 裂解液, 4℃放置 15 min, 13000 rpm 离心 5 min, 取上清。

(3) β-半乳糖苷酶活性测定:

配制 β-半乳糖苷酶测定液: 880 μL ONPG + 40 μL 100×镁离子溶液 + 2280 μL 0.1M 磷酸盐缓冲液。每个样品加 β-半乳糖苷酶测定液 120 uL 和细胞裂解液 80 μL。以上混和液于 37℃孵育至黄色出现为止, 加入 60 μL 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止

反应，于酶标仪 410 nm 测吸收值，以此作为  $\beta$ -半乳糖苷酶的相对活性，用于内对照，以标定转染效率。

#### (4) 荧光素酶活性测定：

将 80 $\mu$ L 细胞裂解液与 20  $\mu$ L 的荧光素酶检测试剂(Luciferin solution 一管 + ATP 一管)混匀，立即用化学发光仪检测发出的荧光信号。该荧光值与相应的  $\beta$ -半乳糖苷酶的 OD 值之比为标定后的荧光素酶相对活性。

#### 溶液配方：

细胞裂解液(25 mL)：1.25 mL 1 M Tris-HCl(pH7.4)，25  $\mu$ L Triton-X-100，25 $\mu$ L 1 M DTT。

0.1M 磷酸钠缓冲液 (1L)：22.6 mL 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，77.4 mL 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，pH7.4

100 $\times$ 镁离子溶液：0.1 M MgCl<sub>2</sub>，5 M  $\beta$ -巯基乙醇

ONPG(O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)：4 mg 溶于 1 mL 0.1M 磷酸盐缓冲液

Luciferin solution：10 mg luciferin 溶于 36 mL 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.8)，分装成 432 mL 每管。储存于-80 $^{\circ}$ C。用前应先于室温放 30 min。注意避光。

ATP：25 mL 1 M Tris+5 mL 1M MgCl<sub>2</sub>+0.48 g ATP 分装成 120 mL 每管。储存于-80 $^{\circ}$ C。

## 2.2.8 RNA 提取和 real-time PCR

### 2.2.8.1 组织总 RNA 的提取

- (1) 从-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取冻存肝脏或骨骼肌组织块约 50-100mg 于研钵内，加入液氮，在研钵中研磨成粉末。
- (2) 加入 1ml Trizol 抽吸匀浆。
- (3) 上清液移入 1.5ml 新 Eppendorf 管。
- (4) 冰上孵育 5min。
- (5) 4 $^{\circ}$ C，12000g $\times$ 5min 条件下离心，取上清液移入 1.5ml 新的 Eppendorf 管。
- (6) 加入 0.2ml 氯仿，剧烈振荡 15sec，冰上孵育 5min。
- (7) 4 $^{\circ}$ C，12000g $\times$ 5min 条件下离心，取上层无色水相移至新的 1.5ml Eppendorf



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.