

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520141153443

UDC _____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

心肌細胞中 Stk38 與 Rbm24 相互作用的探討

Characteristics of the Interaction between Stk38 and Rbm24

in Cardiomyocytes

郭立岩

指導教師姓名: 徐秀琴 教授

專業名稱: 生理學

論文提交日期: 2016 年 4 月

論文答辯時間: 2017 年 5 月

學位授予日期: 2017 年 6 月

答辯委員會主席: _____

評 閱 人: _____

2017 年 月

心肌细胞中 SIK38 与 Rm24 相互作用的探讨

郭立岩

指导教师

徐秀琴
教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的

研究 Rbm24 在心肌细胞中作用的分子机制,寻找与 Rbm24 相互结合的蛋白,探索两者的相互作用关系及作用机制,为 Rbm24 在心肌细胞中参与肌节组装及肌节稳定提供新的数据及理论依据。

方法

通过 pull-down 和蛋白质谱技术寻找与 Rbm24 相互结合的蛋白,然后检测此蛋白的表达情况。构建此蛋白的表达载体,通过与 Rbm24 共转染入 293FT 细胞后,使用免疫共沉淀技术检测两者的相互作用,然后又分别在 H9C2 细胞和 HL-1 细胞中检测内源表达时两者是否有相互作用,以及使用 RNase A 处理检测两者的结合是否依赖于 RNA。随后我们使用免疫荧光实验检测两者在 H9C2 细胞内的表达分布情况,观察两者在细胞中是否存在共定位。随后我们构建敲低相互作用蛋白的细胞系,通过实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 免疫印迹实验检测敲低此蛋白后, Rbm24 及受 Rbm24 调控的心肌特异性基因的表达情况。

结果

在 H9C2 过表达 Rbm24 的细胞 H9C2-Flag-Rbm24 中,使用 pull-down 和蛋白质谱技术寻找到与 Rbm24 相互作用的蛋白 Stk38(Serine/Threonine Kinase 38),通过免疫共沉淀实验,我们确定 Stk38 与 Rbm24 具有相互作用,进一步在 H9C2 细胞和 HL-1 细胞中的免疫共沉淀实验发现, Stk38 只能结合 Rbm24 完整蛋白且两者的结合不依赖于 RNA。之后我们构建了敲低 Stk38 的心肌细胞系 HL-1-shStk38,使用实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹技术检测,我们发现 Stk38 对 Rbm24 mRNA 的表达影响很小,但 Stk38 敲低的细胞系中 Rbm24 蛋白的表达下降,同时,受 Rbm24 调控的几种心肌肌节组成蛋白基因的 mRNA 和蛋白水平表现出与 Rbm24 相同的趋势。

结论

Stk38 能与 Rbm24 相互结合,两者的结合不依赖于 RNA,且 Stk38 只能结合

Rbm24 完整蛋白。 Stk38 调控 Rbm24 蛋白的表达，但不影响其 mRNA 水平的表达，受 Rbm24 调控的心肌肌节蛋白基因的表达情况与 Rbm24 趋势相同。

关键词：Rbm24 Stk38 蛋白相互作用 心肌肌节

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Aims

The molecular mechanism of Rbm24 in cardiomyocytes is not fully understood. Our studies are to find the proteins that could bind to Rbm24 and explore their interaction and mechanism, hoping to find the new data and theoretical basis for the sarcomere assembly and sarcomere stability. Rbm24 may participated in cardiomyocytes.

Methods

The proteins that bind to Rbm24 were searched by pull down assay and mass spectrometry analysis, and confirmed the information of this protein. The expression vector of this protein was constructed and then the interaction between it and Rbm24 was confirmed by co-immunoprecipitation after we co-transfect them into 293FT cell lines. We also detected that whether they can interact with each other in the endogenous expression by using H9C2 and HL-1 cell lines which both of them could express in. Then we confirmed that whether their interaction is dependent on RNA by degradate RNA using RnaseA treatment. Finally, immunofluorescence assay was used to detect the expression of this protein in H9C2 cells and to observe whether it can coexpression with Rbm24 in H9C2 cells. The cell lines, which the protein interacting with Rbm24 was knowdown by lentivirus infection, was constructed subsequently, and RT-qPCR and Western Blot analysis were used to detect the expression of Rbm24 and Rbm24-regulated myocardium-specific genes.

Results

The protein Stk38(Serine/Threonine Kinase 38),which can interact with Rbm24, was found using pull-down assay and mass spectrometry analysis in H9C2-Flag-Rbm24 cell lines. We determined that Stk38 can interact with Rbm24 through co-immunoprecipitation. Futher immunoprecipitating experiments in H9C2

cells and HL-1 cells showed that Stk38 binds only to full-length Rbm24 protein and their combination is direct, which do not depend on RNA. After that we constructed a knockdown Stk38 cardiomyocyte line HL-1-shStk38. Using RT-qPCR and Western Blot analysis, we found that Stk38 almost did not affect the expression of Rbm24' mRNA but decreased the protein expression of Rbm24 after knockdown Stk38. Interestingly, the mRNA and protein levels of several myocardium sarcomere genes regulated by Rbm24 showed the same trend as Rbm24.

Conclusions

Stk38 can bind to Rbm24, which only need its full-length forms, directly. And Stk38 regulates the protein expression of Rbm24 but scarcely influences the mRNA expression of Rbm24. The expression both in mRNA and protein levels of Rbm24-regulated myocardium carcomere genes are the same as Rbm24.

Keywords: Rbm24; Stk38; Protein interaction; Myocardium carcomere

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
第一章 前 言	1
1.1 心肌发育的调控	3
1.1.1 心肌发育的转录因子.....	4
1.2 RNA 结合蛋白 (RNA BINDING PROTEIN)	5
1.2.1 RNA 结合蛋白的结构	5
1.2.2 RNA 结合蛋白的功能	7
1.2.3 RNA 结合蛋白在心肌细胞发育过程中的作用	8
1.3 RBM24 基因	11
1.3.1 Rbm24 基因的结构.....	11
1.3.2 Rbm24 基因的功能及研究进展.....	13
1.3.2.1 Rbm24 在肌节组装中发挥重要作用。.....	13
1.3.2.2 Rbm24 可作为剪接因子发挥功能.....	14
1.3.2.3 Rbm24 调控 mRNA 的稳定性.....	14
1.3.2.4 Rbm24 蛋白复合体的生理作用研究.....	15
1.4 STK38 基因.....	16
1.4.1 Stk38 简介	16
1.4.2 哺乳动物中 Stk38 的调节	17
1.4.3 哺乳动物中 Stk38 生物学功能及研究进展	17
第二章 材料与方 法	20
2.1 实验材料	20
2.1.1 哺乳动物细胞株.....	20
2.1.2 抗体.....	20
2.1.3 感受态与载体质粒.....	21
2.1.4 PCR 引物	21

2.2	主要仪器与耗材	21
2.3	主要试剂	23
2.4	常用试剂配制	25
2.5	实验内容与方法	27
2.5.1	基因真核表达质粒的构建.....	27
2.5.1.1	基因组总 RNA 提取.....	27
2.5.1.2	RNA 反转录合成 cDNA 模板.....	28
2.5.1.3	由 cDNA 为模板 PCR 扩增目的基因.....	28
2.5.1.4	PCR 产物琼脂糖凝胶电泳.....	29
2.5.1.5	琼脂糖凝胶回收目的 DNA 片段.....	30
2.5.1.6	酶切载体片段和 DNA 纯化产物.....	31
2.5.1.7	酶切反应液或 PCR 反应液回收 DNA.....	32
2.5.1.8	酶切载体去磷酸化处理.....	32
2.5.1.9	连接目的片段与线性载体.....	32
2.5.1.10	DNA 的化学转化.....	33
2.5.1.11	质粒 DNA 小量提取.....	34
2.5.2	细胞相关实验和方法.....	35
2.5.2.1	细胞复苏.....	35
2.5.2.2	细胞传代.....	36
2.5.2.3	细胞冻存.....	37
2.5.2.4	细胞计数.....	38
2.5.2.5	细胞转染.....	38
2.5.2.5.1	PEI 转染法.....	38
2.5.2.5.2	电转染法.....	39
2.5.3	蛋白免疫印迹(Western Blot)分析.....	40
2.5.3.1	细胞内总蛋白提取.....	40
2.5.3.2	BCA 法检测蛋白浓度.....	41
2.5.3.3	免疫印迹试验.....	41
2.5.4	蛋白银染.....	42
2.5.5	免疫共沉淀 (Co-Immunoprecipitation)	43
2.5.6	细胞免疫荧光染色.....	44
2.5.7	实时荧光定量 PCR.....	45
2.5.8	慢病毒相关操作.....	46

2.5.7.1 慢病毒包装.....	46
2.5.7.2 病毒滴度检测.....	47
2.5.7.3 细胞感染与细胞系筛选.....	48
2.5.9 统计学分析.....	48
第三章 结果与分析	49
3.1 蛋白质谱分析与 RBM24 结合的蛋白	49
3.1.1 蛋白质银染寻找与 Rbm24 相互作用的蛋白.....	49
3.2 STK38 表达载体的构建.....	50
3.2.1 Stk38 基因的扩增	50
3.2.2 Stk38 表达载体克隆鉴定	51
3.2.3 Stk38 表达载体蛋白真核系统表达鉴定	52
3.3 STK38 与 RBM24 相互作用.....	53
3.3.1 外源性 Stk38 与外源性 Rbm24 相互作用	53
3.3.2 内源性 Stk38 与外源性 Rbm24 相互作用	53
3.3.3 内源性 Stk38 与内源性 Rbm24 相互作用	54
3.4 RBM24 与 STK38 的直接相互作用.....	55
3.5 细胞中 RBM24 与 STK38 的定位.....	56
3.6 STK38 与 RBM24 结构域相互作用检测.....	57
3.6.1 Stk38 与 Rbm24 不同功能域相互作用的检验	58
3.6.2 Rbm24 片段拆分构想.....	59
3.6.3 Rbm24 拆分片段的构建.....	59
3.6.4 Rbm24 拆分片段的表达验证.....	60
3.6.5 Stk38 与 Rbm24 拆分片段相互作用检测	61
3.7 HL-1-shSTK38 敲低细胞系的构建.....	61
3.7.1 筛选有效的 shStk38 慢病毒表达载体.....	62
3.7.2 shStk38 慢病毒包装及病毒滴度检验.....	62
3.7.3 HL-1 shStk38 稳定细胞株构建.....	64
3.8 STK38 影响 RBM24 及肌节相关基因表达的检测.....	65
第四章 讨 论	67
第五章 结 论	70

附录 图表索引	71
附录 引物列表	72
参考文献	73
致谢.....	84

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

ABSTRACT OF CHINESE	I
ABSTRACT OF ENGLISH	III
CHAPTER 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 REGULATION OF MYOCARDIAL DEVELOPMENT.....	3
1.1.1 Cardiac developmental transcription factor	4
1.2 RNA BINDING PROTEINS(RBPs).....	5
1.2.1 Structure of RBPs	5
1.2.2 Function of RBPs.....	7
1.2.3 Relationship between RBPs and Cardiac development	8
1.3 RNA BINDING MOTIF PROTEIN 24(RBM24)	11
1.3.1 Structure of RBM24.....	12
1.3.2 Function of RBM24	13
1.3.2.1 Rbm24 plays an important role in sarcomere assembly	13
1.3.2.2 Rbm24 acts as a splicing factor	14
1.3.2.3 Rbm24 regulates the stability of mRNA.	15
1.3.2.4 Physiological Effects of Rbm24 Protein Complexes	15
1.4 SERINE/THREONINE KINASE38 (STK38)	16
1.4.1 Introduction of STK38.....	16
1.4.2 Regulation of Mammalian STK38.....	17
1.4.3 Biological Functions and research progress of Mammalian STK38	17
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS.....	20
2.1 MATERIALS.....	20
2.1.1 Cell lines	20
2.1.2 Antibodies	20
2.1.3 Competent cells and Vectors	21
2.1.4 PCR Primers.....	21

2.2	EXPERIMENTAL EQUIPMENTS AND SUPPLIES	21
2.3	EXPERIMENTAL REAGENTS	23
2.4	REAGENTS AND SOLUTIONS	25
2.5	METHODS	27
2.5.1	Construction of Eukaryotic Expression Plasmids.....	27
2.5.1.1	Genomic total RNA extraction	27
2.5.1.2	Reverse Transcription RNA	28
2.5.1.3	Amplification of the Target Gene	28
2.5.1.4	Agorose Gel Electrophoresis	29
2.5.1.5	Gel Purification.	30
2.5.1.6	Restriction Endonuclease digestion	31
2.5.1.7	Recycling DNA.	32
2.5.1.8	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase(CIAP) Reaction	32
2.5.1.9	T4 DNA ligase reaction	32
2.5.1.10	DNA Chemical conversion.....	33
2.5.1.11	Mini Extraction of plasmid DNA	34
2.5.2	Cell - related experiments and methods.....	35
2.5.2.1	Cell Recovery	35
2.5.2.2	Cell Passage	36
2.5.2.3	Cell Cryopreservation	37
2.5.2.4	Cell Counting	38
2.5.2.5	Cell Transfection.	38
2.5.2.5.1	PEI Transfection	38
2.5.2.5.2	Electric Transfection	39
2.5.3	Western Blot Analysis	40
2.5.3.1	Total Protein Extraction	40
2.5.3.2	BCA Assay	41
2.5.3.3	Western Blot	41
2.5.4	Protein silver staining	42
2.5.5	Co-Immunoprecipitation.....	43
2.5.6	Immunofluorescence staining	44
2.5.7	RT-qPCR	45
2.5.8	Lentivirus-related Experiments.....	46

2.5.7.1	Lentivirus packaging.....	46
2.5.7.2	Titer detection.....	47
2.5.7.3	Cell infection and Cell line selection.....	48
2.5.9	Statistical Analysis.....	48
CHAPTER 3 RESULTS AND ANALYSIS.....		49
3.1	MASS SPECTROMETRY TO FIND PROTEINS BOUND TO RBM24.....	49
3.1.1	Silver Staining to explore proteins affected by RBM24.....	49
3.2	CONSTRUCTION OF STK38 EXPRESSION VECTOR.....	50
3.2.1	STK38 Amplification.....	50
3.2.2	Cloning Identification of STK38 Expression Vector.....	51
3.2.3	Eukaryotic Expression Identification of STK38 protein.....	52
3.3	STK38 TINTERACTS WITH RBM24.....	52
3.3.1	Exogenous interaction Detection.....	53
3.3.2	Exogenous STK38 interacts with Endogenous RBM24.....	53
3.3.3	Endogenous interaction Detection.....	54
3.4	INTERACTION BETWEEN STK38 AND RBM24 IS DITECT.....	55
3.5	CO-LOCALIZATION OF RBM24 AND STK38 IN CELLS.....	56
3.6	DETECTION OF STK38 INTERACTS WITH RBM24 DOMAIN.....	57
3.6.1	Detection of interaction between Stk38 and Rbm24's different functional domains.....	58
3.6.2	Ideas of RBM24 truncated fragment.....	59
3.6.3	Construction of RBM24-truncated fragment expression vector.....	59
3.6.4	Expression Verification of RBM24-truncated proteins.....	60
3.6.5	Detection of interaction between Stk38 and Rbm24 fragments.....	61
3.7	CONSTRUCTION OF HL-1-SHSTK38 CELL LINES.....	61
3.7.1	Screening effective shSTK38 lentivirus expression vector.....	62
3.7.2	shSTK38 lentivirus production and titration.....	62
3.7.3	Construction of HL-1-shSTK38 stable cell line.....	64
3.8	THE EFFECT OF STK38 ON THE EXPRESSION OF RBM24 AND SARCOMERE RELATED GENES.....	65
CHAPTER 4 DISCUSSION.....		67

CHAPTER 5 CONCLUSION.....	70
APPENDIX CHART INDEX.....	71
APPENDIX LISTS OF PRIMERS	72
REFERENCE.....	73
ACKNOWLEDGEMENT.....	84

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts 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 for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库