

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 24520091152946

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**eEF1A1 在 Ges-1 细胞中的生物学功能及与
TFF1 关系探讨**

**The function of eEF1A1 in the Ges-1 cells and the contaction
with TFF1**

谢 斌 兴

指导教师姓名: 任建林 教授

专 业 名 称: 内科学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 5 月

eRF1A1 在 Ges-1 细胞中的生物学功能及与 FtsZ 的关系探讨

谢斌兴

指导教师

任建林
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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

目的: 进一步验证 eEF1A1 是 TFF1 的结合蛋白, 并初步研究 eEF1A1 在胃黏膜细胞中的生物学功能, 从而为更深入的研究早期胃癌的基因诊断及分子靶向治疗提供新的思路和理论依据。

方法: 我们构建 eEF1A1、TFF1 的重组真核表达载体, 利用免疫荧光染色及共聚焦技术探索两者在 HEK-293T 细胞内的空间定位, 并通过免疫共沉淀证明二者是否结合。此外我们构建了 eEF1A1 的 siRNA 质粒, 稳定转染 BGC-823、Ges-1 细胞, 并在 Ges-1 细胞中成功构建了 si-eEF1A1 细胞株。应用 CCK-8、brdu、划痕实验、Transwell 小室实验分析 siRNA-eEF1A1 稳转细胞株的增殖、迁移的变化, 由此考察 eEF1A1 在 Ges-1 细胞中的生物学功能。

结果: eEF1A1 与 TFF1 在 HEK-293T 细胞胞质中存在一定的共定位, 但通过免疫共沉淀证明 eEF1A1 不是 TFF1 的结合蛋白。eEF1A1 在正常高分化胃黏膜 Ges-1 细胞, 以及 MKN28、SGC-7901、BGC-823 等三株不同分化程度的胃癌细胞中均有表达; eEF1A1 在正常高分化胃黏膜 Ges-1 细胞、以及胃癌细胞株中的表达无明显差异; 此外, 在胃癌细胞株中, eEF1A1 不随细胞恶性程度而出现增减。在 Ges-1 细胞中, 当 eEF1A1 表达下调后, Ges-1 细胞的增殖减慢, 而迁移无明显改变; eEF1A1 可能是通过 E-cadherin 调控 beta-catenin, 从而影响 PI3K/Akt 信号通路, 促进细胞的增殖。

结论: 明确 eEF1A1 不是 TFF1 的结合蛋白, 在 Ges-1 细胞中, eEF1A1 与细胞增殖相关, 而对细胞迁移影响不大, eEF1A1 可能是通过 E-cadherin 调控 beta-catenin, 从而影响 PI3K/Akt 信号通路, 促进细胞的增殖。

关键词: eEF1A1; 三叶因子-1; 胃癌

Abstract

Objective: To further verify eEF1A1 is a binding protein of TFF1 and preliminary study the biological function of eEF1A1 in the gastric mucosal cells . So as to further research and genetic diagnosis of early gastric cancer and molecular targeted therapy to provide new ideas and theories.

Method : We constructed recombinant eukaryotic expression vector containing eEF1A1 and TFF1, using immunofluorescence staining and confocal techniques to explore the spatial orientation of both in HEK-293T cells , and coimmunoprecipitation to demonstrated whether both of them is combination . In addition , we constructed eEF1A1 siRNA plasmid and stably transfected into BGC-823 and Ges-1 cells , and successfully constructed the si-eEF1A1 cell line in Ges-1 cells . To determine the change of siRNA-eEF1A1 in cell growth and motility, various methods are applied , including CCK-8 , brdu , scratch test and Transwell . Thus the biological function of eEF1A1 was also detected in Ges-1 cell .

Results: eEF1A1 was not TFF1 binding protein by Co-immunoprecipitation , although there was a co-location of eEF1A1 and TFF1 in HEK-293T cytoplasm. There was expression of eEF1A1 in normal highly differentiated gastric mucosa Ges-1 cell and various differentiated gastric cancer cells, such as MKN28, SGC-7901 and BGC-823, and no statistical difference was found among them. Meanwhile , eEF1A1 was steady according to the degree of malignancy in gastric cancer . Following eEF1A1 reducing , Ges-1 cell growth was inhibited while no obvious change was show in migration . We then found that eEF1A1 may be through E-cadherin regulation of beta-catenin , thus affecting the PI3K/Akt signaling pathway to promote cell proliferation .

Conclusion: Define that eEF1A1 was not TFF1 binding protein . eEF1A1 was correlated with cell growth , while it had little influence on cell migration . eEF1A1 may be through E-cadherin regulation of beta-catenin , thus affecting the PI3K/Akt signaling pathway to promote cell proliferation .

Keywords: eEF1A1; TFF1; gastric cancer

目 录

摘 要.....	I
Abstract	II
前 言.....	1
1.1 胃癌的分子机制研究	1
1.2 TFF1 的生物学功能	1
1.3 eEF1A1 的生物学功能.....	4
第一部分 TFF1 与候选结合蛋白 eEF1A1.....	6
1.1 实验材料与主要试剂配方	6
1.2 实验方法	8
1.3 实验结果	19
第二部分 eEF1A1 在 GES-1 细胞中的生物学功能.....	22
2.1 实验材料与主要试剂配方	22
2.2 实验方法	25
2.3 实验结果	37
结 论.....	46
参 考 文 献	47
英文缩略词表	51
综 述.....	55
参 考 文 献	62
致 谢.....	68

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Introduction	1
1.1 Gastric cancer	1
1.2 TFF1.....	1
1.3 eEF1A1	4
Part 1 TFF1 and its candidate binding protein eEF1A1	6
1.1 Materials and Reagents.....	6
1.2 Methods	8
1.3 Results.....	19
Part 2 The function of eEF1A1 in the Ges-1 cells	22
2.1 Materials and Reagents.....	22
2.2 Methods	25
2.3 Results.....	37
Conclusion	46
Reference	47
Abbreviation	51
Review	55
Reference	62
Acknowledgement	68

前言

1.1 胃癌的分子机制研究

胃癌约占胃恶性肿瘤的95%以上，其在每年新诊断的癌症病例数中位居第四位，癌症病死率中排第二位。全世界胃癌的发病率呈现多样性，日本、韩国和中国等发展中国家发病率最高，在北美、大洋洲及南亚的发病率最低。高盐摄入、幽门螺杆菌感染、胃癌家族史、吸烟、大量饮酒等是目前比较明确的胃癌危险因素。随着分子生物学的发展，研究证实肿瘤的产生发生发展是多因素造成的，包括肿瘤相关基因的异常表达，引起细胞生物学特性的变化，诸如促进细胞增殖，同质粘附力减小，异质粘附力增加，侵袭力增强，肿瘤的促血管生成作用等。寻找胃癌发生、发展的相关基因，了解胃癌的分子遗传学机制从而为胃癌的诊断、治疗提供理论基础为目前的研究热点。

随着肿瘤分子生物学研究的深入，既往研究已发现多种异常基因表达(表达上调或下调或突变)和胃癌的发生发展相关。在某些上皮细胞肿瘤中，例如胃癌，已经发现依赖于gp130的细胞因子信号通路，发现发生了异常，在MAPK细胞信号通路中，阻断SHP2的活性可引起STAT3的过度活化，从而导致细胞增殖、血管生长及炎症状态的增加，同时抑制免疫细胞和上皮细胞的凋亡，并且通过MAPK信号通路的活化引起胃特异性肿瘤抑制基因TFF1的活性被抑制，从而导致肿瘤的发生¹。文献报道，在胃癌细胞中可发现细胞周期紊乱的现象，活化的p53可以抑制细胞周期进程以获得足够的时间来修补DNA损伤，同时，如果DNA损伤超过了可修复程度，p53还可以诱导程序性细胞死亡以阻止DNA损伤积累所引起的基因突变²。

1.2 TFF1的生物学功能

1.2.1 TFF1的结构

三叶因子（Trefoil factor）家族是一种分泌性蛋白，主要由胃肠道粘液细胞分泌。在哺乳动物体内，他们具有保护和修复黏膜、肿瘤抑制、信号传导、调节细胞凋亡等功能。目前在哺乳动物体内发现了三种 TFF,即乳癌相关肽(pS2 或

TFF1)、解痉多肽(SP 或 TFF2) 和肠三叶因子(ITF 或 TFF3)。1982 年 Masiakowski 等在雌激素诱导的人乳腺癌细胞系 MCF27 中获得 TFF1。TFF1 定位于人 21q 染色体,基因含有 3 个外显子、2 个内含子和 2 个转录启动子。每个成熟 TFF1 分子由 60 个氨基酸残基组成,分子量为 6.7kD,含有 7 个半胱氨酸残基。由 38~39 个氨基酸通过 6 个半胱氨酸残基经由 3 个二硫键相互连接,使整个肽链扭曲、折叠形成一个“三叶草结构域”。这种结构的稳定性使其具有明显的抗蛋白酶、抗酸、抗热的分解特性,其生物学活性也与其特殊的形态结构有关。Newton 等³⁾发现,TFF1 在正常胃粘膜中有 3 种存在形式:单聚体、二聚体及一种相对分子量 25kD 的 TFF1 复合体。其中,复合体浓度最高,二聚体仅少量存在。Westley 等⁴⁾将该 25kD 的 TFF1 复合体命名为 TFIZ1,通过研究证实它能够增强 TFF1 的生物学活性并且能够延长其半衰期。

1.2.2 TFF1在胃部的表达

生理条件下,TFF1 主要在胃特异性表达。在正常组织中,TFF1 主要在胃体及胃窦粘膜上皮表面细胞表达,其次在空回肠、结肠、唾液腺、胰腺及其他粘液上皮(如呼吸道、乳腺)中也有低水平表达。但在病理条件下,这种表达特异性消失,当胃肠道粘膜损伤时,它都可在胃肠道所有粘膜损伤部位表达,且其基因被迅速上调,参与胃肠道粘膜上皮的重建和修复过程。还有相关报道显示 TFF1 在乳腺癌、胆管癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌等实体瘤中高表达。在 7 中胃癌细胞系中,TFF1 在 OKAJIMA、TMK1、MKN45 和 KATO-III 中均表达,TFF2 仅在 KATO-III 中表达,TFF3 则在 KATO-III、MKN45 中表达。据 Ren JL⁵⁾报道,TFF1 表达于正常胃黏膜,但在胃癌组织中 TFF1 的表达只有 50%左右。还有研究显示,从胃黏膜肠化→不典型增生→胃癌这一过程中,TFF1 的表达逐渐下降,并且 40%-60%胃癌出现 TFF1 表达缺失⁶⁻⁷⁾。Park 等⁸⁾通过对基因图谱分析发现,在原发性胃癌时,人染色体 21q22 出现等位基因的缺失,而 TFF1 的基因正处于这个位置,因此提出 TFF1 在胃癌早期起作用,进而可能影响相关癌基因与抑癌基因的改变,促进胃癌的发生。此外,Wu 等⁸⁻⁹⁾发现 TFF1 表达缺失主要发生在肠型胃癌的癌前病变期的胃黏膜,即不完全性肠上皮化生的黏膜,而完全性肠上皮化生的黏膜无 TFF1 表达缺失,故认为 TFF1 表达缺失是肠型胃癌发生的早期事件。

1.2.3 TFF1的生理功能

在胃肠道中，TFF1是通过与粘蛋白结合发挥对黏膜保护防御作用。在胃肠道中，特定的黏膜分泌特定的TFFs与粘蛋白。粘蛋白是一种分子较大且较重的糖基蛋白，常可分为2类，一类是分泌型，一类是粘蛋白结合型。其中分泌型MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6是胃肠道主要凝胶形成的粘蛋白，也是粘液层流变学特点的主要成因¹⁰。不同的三叶因子与不同的粘蛋白作用，生理状态下，胃肠道中TFF1与MUC5AC在小凹细胞和黏液表面共同包装分泌到胃黏膜表面并且相互结合，不仅可增加黏液胶原的粘滞度，还增强上皮防御酸和食物诱发损伤的能力¹¹。但在病理状态下，上述表达发生了改变。在Barrett's食管¹²、炎症性肠病中，三叶肽与黏蛋白的这种协调作用下降。

3种三叶肽涉及黏膜重建的不同过程，特别是调节细胞—细胞连接，细胞移行。有关研究表明，TFFs能促进细胞分散，而这一作用是通过减少细胞—细胞、细胞—基质相互作用¹³。2001年，Emami S报道¹⁴三叶肽可以通过Src原癌基因和RhoA蛋白诱发转化细胞分散，导致他们迁入胶原蛋白凝胶剂内，而Ras和Src路径的活化可减少黏连接¹⁵⁻¹⁶。在HCT-8结肠细胞株中，稳定的转染TFF1，表现出通过RhoA相关途径诱导侵袭的表现型。RhoA是GTP酶，调节生长因子诱导细胞骨架重组，这在细胞运动中起关键性作用¹⁷。

Lefebvre 等¹⁸构建了 TFF1 基因敲除小鼠模型，发现小鼠 TFF1 基因失活以后表面上看是正常的，但随着年龄的增长，小鼠的胃窦部及幽门口粘膜厚度增加，出现严重增生、高度发育不良甚至胃窦部腺瘤形成，30%的小鼠发生上皮或粘膜多病灶癌。体外实验发现，人重组 TFF1 可抑制胃腺癌细胞系 AGS 的生长，并且这种抑制作用与随 TFF1 的剂量增大而增强¹⁹。据目前相关研究提示，三叶因子发挥其生理功能可能通过与其结合的相应受体或特定蛋白质。Frandsen²⁰将¹²⁵I - pTFF2 与大鼠小肠黏膜细胞一起孵育，发现¹²⁵I - pTFF2 可与细胞膜快速结合，且这种结合表现出了配体-受体结合的可逆性、可饱和性及特异性等特点，提示小肠黏膜中可能存在 TFF2 的受体。Playford RJ²¹对吡啶美辛诱导的大鼠胃溃疡模型皮下注射小剂量 hTFF2，发现 TFF2 可发挥明显的黏膜保护作用。Poulsen SS²²将¹²⁵I 标记的 TFF2 静脉注射到大鼠体内，6 分钟后约有 14%在胃肠道显影，胃体及幽门部对放射性 TFF2 的摄取可被非放射性标记的 TFF2 所代替，且这种过程呈剂量依赖性，这些研究亦证实了受体存在的可能。因此，寻找 TFF1 在胃

癌细胞中的相互作用蛋白或受体成为近些年研究的热点。本实验室前期采用免疫组化方法观察 TFF1 在正常胃黏膜与胃癌黏膜中的表达情况，分析 TFF1 与胃癌的相关性，采用酵母双杂交技术筛选胃癌细胞 cDNA 文库中 TFF1 相互作用蛋白基因。eEF1A1 是酵母双杂交技术筛选出的 TFF1 结合蛋白中的一个候选蛋白，本实验首次验证 eEF1A1 是否是 TFF1 的结合蛋白，为进一步探讨胃癌发生发展机制奠定基础。

1.3 eEF1A1的生物学功能

真核生物延长因子包含两类，分别为 eEF1 和 eEF2²³，eEF1 主要介导氨酰-tRNA 与核糖体结合，目前发现其有 EF-1 α 、EF-1 β 1、EF-1 β 、EF-1 γ 4 个亚基，后来 IUBMB 委员会将它们分别重新命名为 eEF1A、eEF1B α 、eEF1B β 、eEF1B γ ²⁴。eEF1A 相当于原核生物中的 EF-Tu，在细胞中表达丰富，含量仅次于肌动蛋白。

真核翻译延伸因子 1A (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha) 是参与蛋白翻译延伸的重要蛋白质，有 3 个结构域，结构域 I 与 GTP 结合，结构域 II 和 III 结合 tRNA。在不同的物种中它的基因及表达调控有高度保守性，eEF1A 在人类有两个亚型：eEF1A1 与 eEF1A2，eEF1A1 与 eEF1A2 的基因分别位于染色体的 6q14.1 和 20q13.3。eEF1A1 与 eEF1A2 的基因编码 78% 是相同的，而蛋白表达 92% 是相同的²⁵⁻²⁶。eEF1A1 在正常组织广泛表达，近乎无处不在的形式表达在所有组织的各个发展阶段，除了成人的肌肉和心脏中。而 eEF1A2 在正常组织中仅在心脏、脑、肌肉有表达²⁷。2006 年宋光辉等发现，在野生型小鼠的神经元中，eEF1A1 与 eEF1A2 的表达随发育而呈相反变化。在胚胎期、幼龄期的野生型小鼠的神经元胞质中，eEF1A1 表达水平随着发育由高水平下降，到出生后 26 天其表达停止。而 eEF1A2 却相反，其蛋白水平在小鼠出生后 7 天开始表达逐渐上升，到了出生后 20 天，其表达水平达到最高并一直保持稳定。尽管人源性 eEF1A1 与 eEF1A2 蛋白表达 92% 是同源性的，但二者在功能上有许多的不同。例如，在蛋白翻译过程中，二者与 GTP、GDP 结合的亲和力不同²⁸。eEF1A1 与 GTP 结合的能力比与 GDP 结合的能力强，而 eEF1A2 却恰恰相反，是与 GDP 结合的能力更强。

目前相关研究显示，eEF1A 不仅仅是蛋白合成中的一个重要的翻译延伸因

子, 还参与胚胎形成、老化、增殖、凋亡、细胞骨架重组以及蛋白降解等²⁹⁻³⁰⁻³¹。大家认为 eEF1A 参与胚胎形成、老化、增值、凋亡、细胞骨架重组以及蛋白降解是因为其影响蛋白的合成, 但目前关于 eEF1A 自身具有这些生物功能还是因为参与蛋白合成而影响这些功能仍处于争议阶段。报道显示 eEF1A 参与肿瘤的形成, 发现 eEF1A1 在肝细胞癌³²⁻³³、前列腺癌³⁴中表达增加, eEF1A 增加乳腺癌的转移侵袭能力³⁵, 30%的卵巢肿瘤³⁶和 83%的胰腺肿瘤³⁶⁻³⁷中 eEF1A2 异常过表达。Luisa Pecorari 等³⁷⁻³⁸发现, 在乳腺癌细胞中, eEF1A 是 p-Akt 的结合蛋白, eEF1A 通过调控 p-Akt 的表达水平而影响细胞的增值、存活、侵袭能力。

1 磷酸鞘氨醇 (S1P) 在哺乳动物中参与许多重要功能, 它能调控细胞的存活和生长。鞘氨醇激酶 (sphingosine kinases) 在哺乳动物中有两个亚型, 分别为 sk1、sk2, 它们能使鞘氨醇发生磷酸化形成 1 磷酸鞘氨醇 (S1P)。Tamara M³⁹等发现 eEF1A1 和 eEF1A2 是 SKs 的结合蛋白, eEF1A1 和 eEF1A2 能催化 SKs 的激活, 从而影响 1 磷酸鞘氨醇 (S1P) 的表达水平而调控细胞的存活和生长。

氧化应激和营养缺乏可使细胞中的 p53 和 eEF1A 的表达发生改变, 并且 eEF1A 的表达受 p53 转录因子正调节³⁰。在老鼠的 3T3 成纤维细胞中过表达 eEF1A 时, 可发现细胞对血清饥饿诱导凋亡的敏感性增加; 但当使 eEF1A 在老鼠的 3T3 成纤维细胞中的表达下调时, 可发现细胞能抵抗血清饥饿而产生的凋亡⁴⁰。在心肌细胞株中, 用过氧化氢诱导细胞凋亡, 发现 eEF1A 的表达量快速增加, 这提示 eEF1A 在氧化应激诱导的凋亡中发挥着正调节作用⁴¹。Ruset 等报道小鼠细胞中 eEF1A2 高表达可抑制与 caspase 相关的细胞凋亡⁴²。在骨骼肌细胞成熟分化过程中, eEF1A-2 / S1 呈持续表达, 但在剥夺血清诱导细胞凋亡过程中, eEF1A-2 / S1 被 eEF1A-1 / EF-1 alpha 取代, caspase-3 被激活, 细胞出现凋亡, 可当使用腺病毒转染 eEF1A-2 / S1 后, 发现其能促进肌管的合成, 并延缓细胞的凋亡⁴³。

第一部分 TFF1 与候选结合蛋白 eEF1A1

TFF1 是近年来研究较为热点的一类小分子多肽，近年来大量的研究表明三叶肽在胃肠道的保护和修复中发挥着重要作用。在 TFF1 基因敲除小鼠模型中，所有小鼠胃上皮细胞均出现严重增生、高度发育不良以及胃窦部腺瘤形成，有部分发展成为胃浸润型癌。体外实验发现，将人重组 TFF1 作用于胃腺癌细胞系 AGS，其可抑制 AGS 的生长，且抑制作用与 TFF1 的剂量大小有关。这提示 TFF1 是一种肿瘤抑制因子，在抑制胃癌的发生发展中发挥了重要的作用，但其作用机制目前尚不明确，且国内外仍未发现 TFF1 的结合蛋白或作用受体。本实验室前期在利用酵母双杂交技术筛选 TFF1 结合蛋白的过程中验证得到了 eEF1A1 作为备选蛋白，在后续的实验中将分别利用免疫共沉淀及激光共聚焦等实验技术对其结合的可能性进行验证，并对两者之间具体的作用方式与途径进行深入的探讨。

1.1 实验材料与主要试剂配方

1.1.1 实验材料

人胚肾细胞 HEK-293T，MYC 标签抗体购自美国 Cell Signaling Technology(CST)公司，HA 标签抗体购自美国 Sigma 公司，TFF1 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司，eEF1A1 多克隆抗体购自 abcam 公司，Goat Anti-Mouse IgG 购自美国 Jacksonimmuno 公司，Goat Anti-Rabbit IgG 购自美国 Jacksonimmuno 公司，质粒提取试剂盒购自北京博大泰克公司，抗荧光淬灭剂购自江苏碧云天生物研究所，封片剂购自江苏碧云天生物研究所。

1.1.2 主要试剂配方

(1) 琼脂糖溶液 (1.0%)：1×TAE 缓冲液 100 mL 溶解 1.0 g 琼脂糖，微波炉煮至沸腾使琼脂糖全部溶解，冷却至 55℃ 左右，再加入 5 μ L 核酸染料，轻轻摇匀，铺胶。

(2) LB 液体培养基：每 1 L 加分析纯 NaCl 10 g，蛋白胨 10 g，酵母粉 5 g，

用 ddH₂O 配制，再用 10 mol/L NaOH 调 pH 至 7.4，0.11 Mpa 高压蒸汽灭菌 20 分钟，冷却后使用。

(3) LB 固体培养基：每 100 mL LB 培养基中加入 1.5 g 琼脂，湿热灭菌成凝胶状备用。

(4) 氨苄青霉素储备液：0.5 g 氨苄青霉素钠盐粉末加入 10 mL 无菌水或 LB 溶解混匀为 50 mg/mL 的氨苄储存液，0.22 μm 滤膜过滤除菌，分装后 -20℃ 储存备用。使用时按 1 mL 培养基加 1 μL 的用量。

(5) 50×TAE 缓冲液：在体积为 800 mL 的蒸馏水中溶解 242 g Tris 碱，加入 57.1 mL 无水乙酸和 200 mL 0.5 M EDTA (PH8.0) 溶液，加入蒸馏水定容至 1000 mL。

(6) PBS 缓冲液：用天平称取 NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g 加入 800 mL 去离子水中溶解，调节 pH 值至 7.4，定至 1 L，高压 20 分钟灭菌。

(7) 0.25% 胰酶消化液：称量 0.25 g 胰酶，溶于 100 mL PBS 中，4℃ 过夜，0.22 μm 滤膜过滤分装，-20℃ 保存。

(8) 基础培养基：购买的每包 DMEM 干粉可配置 1 L 培养基，拆封后将全部粉末溶解入 600 mL 超纯水中，根据产品说明书所示加入适量 NaHCO₃ 粉末，搅拌混匀，调整 pH 值到 7.2，加超纯水到 1 L，用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌，4℃ 储存备用。

(9) 完全培养基：向基础培养基里加入 1% 的青霉素和链霉素储存液，10% FBS，4℃ 储存备用。

(10) 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液：将 40g 多聚甲醛，溶解于 600 mL 0.1mol/L 磷酸缓冲液，加热至 60℃，磁力搅拌器持续搅拌使粉末完全溶解，滴加少许 NaOH 溶液使溶液充分溶解至溶液清亮，用 0.1mol/L 的磷酸缓冲液定容至 1L，充分混匀备用。

(11) PBST：8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄ 和 0.24g KH₂PO₄ 2mL Triton100 溶解于 800mL 蒸馏水中摇匀，用浓 HCl 调节溶液 pH 值调整 PH 至 7.20。

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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库