



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111057136 A

(43)申请公布日 2020.04.24

(21)申请号 201911393670.3

(22)申请日 2019.12.30

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 刘平生 马学婧 支泽仑 周畅

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 闫书宁

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

A61K 47/24(2006.01)

A61K 47/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图23页

(54)发明名称

一种脂肪体及其在评价待测蛋白与脂滴相互作用中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种脂肪体及其在评价待测蛋白与脂滴相互作用中的应用。通过涡旋混合甘油三酯和磷脂,使用两步法纯化,制备出由甘油三酯核心和单层磷脂膜构成的脂肪体;磷脂为“DOPC和PI”、“DOPC和PA”、“DOPC和PS”、“DOPC、PI和DOPE”、“DOPC、PA和DOPE”或“DOPC、PS和DOPE”。同时发现脂肪体具体如下用途:检测待测蛋白在脂滴上的结构、形态和/或密度,评价待测蛋白和脂滴相互作用,检测待测蛋白和脂滴的亲合力,检测ATGL酶活性,分析待测蛋白中氨基酸残基的位置和/或种类对待测蛋白在脂滴的定位的影响,分析磷脂组分对待测蛋白在脂滴的定位的影响。本发明具有重要的应用价值。

1. 一种制备脂肪体的方法,包括步骤:a1)将磷脂和甘油三酯在缓冲液中进行涡旋以实现两者的反应,然后进行离心,收集上层液相,从上层液相中分离得到脂肪体;磷脂和甘油三酯的质量比为d1)至d6)中的任一种:d1) 0.25~3:5;d2) 3:5;d3) 2:5;d4) 1:5;d5) 1:10;d6) 1:20;

所述磷脂为B1)、B2)、B3)、B4)、B5)、B6)或B7):B1) DOPC和PI;B2) DOPC和PA;B3) DOPC和PS;B4) DOPC、PI和DOPE;B5) DOPC、PA和DOPE;B6) DOPC、PS和DOPE;B7) DOPC和胆固醇。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:

所述B1)中,DOPC和PI的质量比为(4-249):1;

所述B2)中,DOPC和PA的质量比为(20-99):1;

所述B3)中,DOPC和PS的质量比为(30-99):1;

所述B4)中,DOPC、PI和DOPE的质量比为100:(0.1~90):(0.1~200);

所述B5)中,DOPC、PA和DOPE的质量比为100:(0.1~35):(0.1~200);

所述B6)中,DOPC、PS和DOPE的质量比为100:(0.1~35):(0.1~200);

所述B7)中,DOPC和胆固醇的质量比为(0.1~100):1。

3. 权利要求1或2所述方法制备的脂肪体。

4. j1)、j2)或j3):

j1) 权利要求3所述脂肪体在制备人工脂滴和/或人工脂蛋白和/或药物载体中的应用;

j2) 人工脂滴在制备药物载体或制备药物中的应用;所述人工脂滴是通过在权利要求3所述脂肪体上招募一种或几种固有蛋白和/或功能蛋白获得的;

j3) 人工脂蛋白在制备药物载体或制备药物中的应用;所述人工脂蛋白是通过在权利要求3所述脂肪体上招募一种或几种载脂蛋白获得的。

5. 脂肪体在检测待测蛋白在脂滴上的结构、形态和密度中至少一种的应用。

6. 脂肪体的应用,为c1)至c3)中的任一种:

c1) 评价待测蛋白和脂滴相互作用;

c2) 检测待测蛋白和脂滴的亲合力;

c3) 检测ATGL酶活性。

7. 脂肪体在分析待测蛋白中氨基酸残基的位置和/或种类对待测蛋白在脂滴的定位中的应用。

8. 脂肪体在分析磷脂组分对待测蛋白在脂滴的定位中的应用。

9. 一种检测待测蛋白和脂滴的亲合力的方法,包括如下步骤:

d1) 将不同浓度的待测蛋白和脂肪体混合,孵育,然后检测脂肪体上的蛋白质;

d2) 完成步骤d1)后,以蛋白浓度为横坐标,脂肪体结合蛋白浓度为纵坐标,绘制标准曲线;

d3) 完成步骤d2)后,Scatchard分析计算待测蛋白和脂肪体的亲合力,该亲合力即为待测蛋白和脂滴的亲合力。

10. 如权利要求4至8任一所述的应用或权利要求9所述的方法,其特征在于:所述脂肪体为权利要求3所述脂肪体。

## 一种脂肪体及其在评价待测蛋白与脂滴相互作用中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种脂肪体及其在评价待测蛋白与脂滴相互作用中的应用。

### 背景技术

[0002] 脂滴是单层磷脂膜包裹中性脂核心、表面被覆蛋白的多功能细胞器,它参与脂质的合成、储存、代谢和转运,蛋白的储存和降解,脂质信号分子和激素的修饰和合成,并与其它细胞器发生动态相互作用。脂滴的蛋白和脂质组分的改变均可能导致脂滴功能的异常,进而引起人类代谢疾病的发生。因此,脂滴生物学的研究重要性日益凸显。

[0003] 借助蛋白质组学和脂质组学的技术手段,不同物种的脂滴的蛋白质和脂质组成日益清晰。但是,由于体内研究系统复杂,脂滴与其它细胞器有相互作用,蛋白的敲除或过表达可能引起其他蛋白的补偿作用,并且无法精确改变脂滴的脂质组分,因此,为了全面地理解脂滴的形成、功能和调控机制,构建了人工脂滴。

[0004] 脂肪细胞分化相关蛋白(ADRP)是主要的脂滴常驻蛋白之一。然而,调控ADRP脂滴定位的机制还不明确。脂滴中,甘油三酯是中性脂核心的主要组成部分。甘油三酯通过脂肪水解酶ATGL分解为脂肪酸,脂肪酸被用作细胞能量和物质合成原料。ATGL活性降低会引起各个组织脂肪过度积累而导致代谢疾病的发生。磷酸化是调控脂类水解酶活性的机制之一。人们已经发现了ATGL的八个磷酸化位点,其中Ser406 S396调控其活性,Thr372调控其定位。但是,其它磷酸化位点在脂滴定位和活性调控中发挥怎样的作用,哪些蛋白和脂质参与了ATGL的调控仍不清楚。因此,ATGL的活性和细胞定位的调控机制有待进一步研究。由于体内研究系统复杂,蛋白的敲除或过表达可能引起其它蛋白的补偿作用,无法研究磷酸化这一单一因素对ATGL活性的影响。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是制备一种新的脂肪体,并研究脂肪体的应用。

[0006] 本发明首先保护一种制备脂肪体的方法,可包括步骤:a1)将磷脂和甘油三酯在缓冲液中进行涡旋以实现两者的反应,然后进行离心,收集上层液相,从上层液相中分离得到脂肪体;磷脂和甘油三酯的质量比可为d1)至d6)中的任一种:d1) 0.25~3:5;d2) 3:5;d3) 2:5;d4) 1:5;d5) 1:10;d6) 1:20;

[0007] 所述磷脂为B1)、B2)、B3)、B4)、B5)、B6)或B7):B1) DOPC和PI;B2) DOPC和PA;B3) DOPC和PS;B4) DOPC、PI和DOPE;B5) DOPC、PA和DOPE;B6) DOPC、PS和DOPE;B7) DOPC和胆固醇。

[0008] 所述“从上层液相中分离得到脂肪体”可包括如下步骤:

[0009] a2)将所述上层液相进行两次以上的纯化;每次纯化的方法可为:将上层液相与所述缓冲液混匀,然后使其分层,收集上层液相;

[0010] a3)将步骤a2)得到的上层液相与所述缓冲液混合,然后使其分层,收集下层液相,其中含有脂肪体。

- [0011] 所述缓冲液可为缓冲液B。
- [0012] 所述缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度可为:15mM~25mM HEPES,80mM~120mM KCl,1.5~2.5mM的MgCl<sub>2</sub>;溶剂可为去离子水;pH可为7.2~7.6。
- [0013] 所述缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度具体可为:20mM HEPES,100mM KCl,2mM的MgCl<sub>2</sub>;溶剂具体可为去离子水;pH具体可为7.4。
- [0014] 所述步骤a1)中,所述涡旋的参数可为:总时长为3~5min;
- [0015] 所述步骤a1)中,所述离心的参数可为:18000~22000g、3~7min。
- [0016] 所述步骤a1)中,所述涡旋的参数具体可为:总时长4min。
- [0017] 所述步骤a1)中,所述离心的参数具体可为:20000g、5min。
- [0018] 所述步骤a2)中,所述“上层液相进行两次以上的纯化”中的次数以上层液相与所述缓冲液混匀,分层后无沉淀为准。
- [0019] 所述步骤a2)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数可为:18000~22000g、3~7min。
- [0020] 所述步骤a2)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数具体可为:20000g、5min。
- [0021] 所述步骤a3)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数可为:800~1200g、3~7min。
- [0022] 所述步骤a3)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数具体可为:1000g、5min。
- [0023] 所述B1)中,DOPC和PI的质量比可为(4-249):1(如:(4-50):1、(50-100):1、(100-150):1、(150-200):1、(200-249):1、4:1、50:1、100:1、150:1、200:1或249:1)。
- [0024] 所述B2)中,DOPC和PA的质量比可为(20-99):1(如(20-40):1、(40-60):1、(60-80):1、(80-99):1、20:1、40:1、60:1、80:1或99:1)。
- [0025] 所述B3)中,DOPC和PS的质量比可为(30-99):1(如(30-40):1、(40-60):1、(60-80):1、(80-99):1、30:1、40:1、60:1、80:1或99:1)。
- [0026] 所述B4)中,DOPC、PI和DOPE的质量比可为100:(0.1~90):(0.1~200)(如100:(0.1~90):(0.1~50)、100:(0.1~90):(50~100)、100:(0.1~90):(100~150)、100:(0.1~90):(150~200)、100:(0.1~30):(0.1~200)、100:(30~60):(0.1~200)、100:(60~90):(0.1~200)、100:0.1:0.1、100:90:200、100:30:50、100:60:100或100:25:44(即实施例中的59:15:26))。
- [0027] 所述B5)中,DOPC、PA和DOPE的质量比可为100:(0.1~35):(0.1~200)(如100:(0.1~35):(0.1~50)、100:(0.1~35):(50~100)、100:(0.1~35):(100~150)、100:(0.1~35):(150~200)、100:(0.1~15):(0.1~200)、100:(15~25):(0.1~200)、100:(25~35):(0.1~200)、100:0.1:0.1、100:35:200、100:15:50或100:25:100)。
- [0028] 所述B6)中,DOPC、PS和DOPE的质量比可为100:(0.1~35):(0.1~200)(如100:(0.1~35):(0.1~50)、100:(0.1~35):(50~100)、100:(0.1~35):(100~150)、100:(0.1~35):(150~200)、100:(0.1~15):(0.1~200)、100:(15~25):(0.1~200)、100:(25~35):(0.1~200)、100:0.1:0.1、100:35:200、100:15:50或100:25:100)。
- [0029] 所述B7)中,DOPC和胆固醇的质量比可为(0.1~100):1(如(0.1~30):1、(30~

60):1、(60~100):1、0.1:1、100:1、30:1或60:1)。

[0030] 所述甘油三酯(triacylglycerol, TAG)的制备方法可如下:(1)取死亡的SD大鼠1只,取皮下脂肪与大网膜脂肪,剪碎;(2)将步骤(1)得到的碎组织置于离心管中,加入萃脂液甲(氯仿:去离子水=1:1,v/v),剧烈涡旋1分钟,然后8000g离心10分钟;(3)取步骤(2)得到的下层有机相,置于新的离心管中,如果发现其浑浊的话按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取直至其澄清;(4)取步骤(3)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干(若吹干过程中发现其变浑浊的话则按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取);(5)取步骤(4)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干(连续3次称重质量不变),产物即为甘油三酯。

[0031] 上述任一所述方法制备的脂肪体也属于本发明的保护范围。

[0032] 本发明还保护j1)、j2)或j3)。

[0033] j1)上述任一所述脂肪体在制备人工脂滴和/或人工脂蛋白和/或药物载体中的应用。

[0034] j2)人工脂滴在制备药物载体或制备药物中的应用;所述人工脂滴是通过在上述任一所述脂肪体上招募一种或几种固有蛋白和/或功能蛋白获得的。

[0035] j3)人工脂蛋白在制备药物载体或制备药物中的应用;所述人工脂蛋白是通过在上述任一所述脂肪体上招募一种或几种载脂蛋白获得的。

[0036] 上述应用中,所述固有蛋白一般可为天然脂滴上的组分,如MLDS蛋白、MDT-28蛋白或Perilipin-2蛋白。所述功能蛋白可为天然脂滴上的组分,也可为具有药物作用的蛋白或可以结合药物的蛋白。所述功能蛋白可为ATGL。所述载脂蛋白为Apo A-I。

[0037] 本发明还保护脂肪体在检测待测蛋白在脂滴上的结构、形态和密度中至少一种的应用。

[0038] 本发明还保护脂肪体的应用,可为c1)至c3)中的任一种:

[0039] c1)评价待测蛋白和脂滴相互作用;

[0040] c2)检测待测蛋白和脂滴的亲合力;

[0041] c3)检测ATGL酶活性。

[0042] 本发明还保护脂肪体在分析待测蛋白中氨基酸残基的位置和/或种类对待测蛋白在脂滴的定位中的应用。

[0043] 本发明还保护脂肪体在分析磷脂组分对待测蛋白在脂滴的定位中的应用。

[0044] 本发明还保护一种检测待测蛋白和脂滴的亲合力的方法,包括如下步骤:

[0045] d1)将不同浓度的待测蛋白和脂肪体混合,孵育,然后检测脂肪体上的蛋白质;

[0046] d2)完成步骤d1)后,以蛋白浓度为横坐标,脂肪体结合的蛋白浓度为纵坐标,绘制标准曲线;

[0047] d3)完成步骤d2)后,Scatchard分析计算待测蛋白和脂肪体的亲合力,该亲合力即为待测蛋白和脂滴的亲合力。

[0048] 上述任一所述脂肪体可由甘油三酯和单层磷脂膜组成。

[0049] 上述任一所述脂肪体可为采用上述任一所述方法制备的脂肪体,也可为其它方法制备的脂肪体,例如利用运用涡旋和两步法离心制备的脂肪体(已在中国发明专利文献CN 105483076 B中公开)。

[0050] 上述任一所述待测蛋白可为ADRP蛋白。

[0051] 本发明的发明人通过涡旋混合甘油三酯和磷脂,使用两步法纯化,制备出由甘油三酯核心和单层磷脂膜构成的脂肪体;磷脂为B1)、B2)、B3)、B4)、B5)、B6)或B7):B1) DOPC和PI;B2) DOPC和PA;B3) DOPC和PS;B4) DOPC、PI和DOPE;B5) DOPC、PA和DOPE;B6) DOPC、PS和DOPE;B7) DOPC和胆固醇。同时本发明的发明人发现脂肪体具体如下用途:1、检测待测蛋白在脂滴上的结构、形态和/或密度;2、评价待测蛋白和脂滴相互作用;3、检测待测蛋白和脂滴的亲和力;4、检测ATGL酶活性;5、分析待测蛋白中氨基酸残基的位置和/或种类对待测蛋白在脂滴的定位的影响;6、分析磷脂组分对待测蛋白在脂滴的定位的影响。本发明具有重要的应用价值。

### 附图说明

- [0052] 图1为使用涡旋及两步法离心制备纯化脂肪体乙。  
[0053] 图2为内源ADRP在脂滴中的形态和包被ADRP蛋白的脂肪体的形态及内源ADRP蛋白在小鼠骨骼肌细胞脂滴上的密度的检测。  
[0054] 图3为SMT3-ADRP-GFP蛋白在脂肪体上的密度的检测。  
[0055] 图4为含磷脂酰肌醇的脂肪体乙表面ADRP的密度降低。  
[0056] 图5为TIP47在含磷脂酰肌醇的脂肪体表面的定位没有减少。  
[0057] 图6为ADRP定位序列中负电氨基酸的突变可恢复磷脂酰肌醇对ADRP的定位。  
[0058] 图7为ATGL及其激活蛋白CGI-58均可定位于脂肪体。  
[0059] 图8为影响甘油三酯水解酶活性的因素。  
[0060] 图9为ATGL野生型与突变体的酶活性测定。  
[0061] 图10为ATGL野生型与突变体在人工脂滴系统中的酶活性测定。  
[0062] 图11为小鼠骨骼肌细胞中ATGL的敲除。

### 具体实施方式

- [0063] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。  
[0064] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。  
[0065] 下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。  
[0066] 以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。  
[0067] 本发明中脂肪体(adiposome)定义为一类以天然或人工合成的中性脂质为核心,天然或人工合成的极性脂质单层膜包裹的,人工合成的结构。脂肪体的脂质组成及形态结构与脂滴近似,因此可以作为制备人工脂滴的主要原材料。  
[0068] 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)为Avanti公司的产品,产品状态为DOPC溶液,即DOPC溶解于氯仿中。  
[0069] 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)为Avanti公司的产品,产品状态为DOPE溶液,即DOPE溶解于氯仿中。  
[0070] 1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)为Avanti公司的产品,产品状态为DSPC溶液,即DSPC溶解于氯仿中。  
[0071] 胆固醇油酸酯(cholesteryl oleate,CO)为Alfa Aesar公司的产品。LipidTOX

red为Invitrogen公司的产品,产品目录号为H34476。

[0072] 动态光散射仪(DLS,Delsa Nano C颗粒分析仪)为Beckman公司产品。

[0073] “涡旋”均使用Vortex-Genie 1涡旋仪(Scientific Industries,Inc.公司,美国)进行。“胶体蓝染色”均使用胶体蓝染色试剂盒(Invitrogen公司的产品,产品目录号为LC6025)进行。

[0074] 甘油三酯(triacylglycerol,TAG)的制备方法如下:(1)取死亡的SD大鼠1只,取皮下脂肪与大网膜脂肪,剪碎;(2)将步骤(1)得到的碎组织置于离心管中,加入萃脂液甲(氯仿:去离子水=1:1,v/v),剧烈涡旋1分钟,然后8000g离心10分钟;(3)取步骤(2)得到的下层有机相,置于新的离心管中,如果发现其浑浊的话按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取直至其澄清;(4)取步骤(3)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干,(若吹干过程中发现其变浑浊的话则按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取);(5)取步骤(4)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干(连续3次称重质量不变),产物即为甘油三酯。

[0075] 缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度为:20mM HEPES,100mM KCl,2mM MgCl<sub>2</sub>;溶剂为去离子水;pH值为7.4。

[0076] 实施例1、脂肪体的制备

[0077] 一、脂肪体甲的制备

[0078] 利用运用涡旋和两步法离心制备脂肪体甲(已在中国发明专利文献CN 105483076 B中公开),具体步骤如下:

[0079] 1、取磷脂1加入到微量离心管中,用高纯氮气吹干溶剂。

[0080] 2、完成步骤1后,向微量离心管中加入100μL缓冲液B和中性脂质,涡旋4min(涡旋10s,停止10s),得到乳白色的脂质混合物1,将脂质混合物1以20000g离心5min。离心后,微量离心管中底部为沉淀组分1,液相体系呈现两层分层(上层为白色带1,白色带1以下的部分为溶液1)。

[0081] 磷脂1和中性脂质的质量比为(0.25~3):5。

[0082] 磷脂1为b1)、b2)或b3):b1) DOPC;b2) DOPC和DOPE;b3) DOPC和DSPC。

[0083] b2)中,DOPC和DOPE的质量比为1:0.01~2。

[0084] b3)中,DOPC和DSPC的质量比可为1:0.01~2。

[0085] 中性脂质为c1)或c2):c1)甘油三酯(triacylglycerol,TAG);c2)胆固醇油酸酯(cholesteryl oleate,CO)和TAG。

[0086] c2)中,CO和TAG的质量比为(1~5):1。

[0087] 3、完成步骤2后,通过抽取的方式弃除溶液1与沉淀组分1,保留白色带1,加入100μL缓冲液B,涡旋,得到乳白色的脂质混合物2,将脂质混合物2以20000g离心5min。离心后,如果微量离心管中底部有沉淀,即为沉淀组分2,液相体系呈现两层分层(上层为白色带2,白色带2以下的部分为溶液2)。

[0088] 4、完成步骤3后,通过抽取的方式弃除溶液2与沉淀组分2,保留白色带2,加入100μL缓冲液B,涡旋,得到乳白色的脂质混合物3,将脂质混合物3以20000g离心5min。离心后,液相体系呈现两层分层(上层为白色带3,白色带3以下的部分为溶液3)。

[0089] 步骤4即步骤3的重复,实际应用中的步骤3的重复次数以白色带下层无沉淀为准。

[0090] 5、完成步骤4后,取白色带3,加入100μL缓冲液B,涡旋混匀,1000g离心5min,离心

后,液相体系呈现两层分层(上层为白色带4,白色带4以下的部分为溶液4)。收集溶液4,即为脂肪体甲。

[0091] 二、脂肪体乙的制备

[0092] 磷脂酰肌醇(PI)、PA和PS均为Avanti公司的产品。

[0093] 1、脂肪体乙的制备

[0094] 按照步骤一的方法,将磷脂1替换为磷脂2,中性脂质为甘油三酯,其它步骤均不变,得到脂肪体乙。

[0095] 磷脂2为B1)、B2)、B3)、B4)、B5)、B6)或B7):B1)DOPC和PI;B2)DOPC和PA;B3)DOPC和PS;B4)DOPC、PI和DOPE;B5)DOPC、PA和DOPE;B6)DOPC、PS和DOPE;B7)DOPC和胆固醇。

[0096] B1)中,DOPC和PI的质量比为99.6:0.4、97.2:2.8、95.2:4.8、92.4:7.6、90.4:9.6或86.0:14.0。

[0097] B2)中,DOPC和PA的质量比为99:1或97:3。

[0098] B3)中,DOPC和PS的质量比为99:1或97:3。

[0099] B4)中,DOPC、PI和DOPE的质量比为85:15:0、74:0:26或59:15:26。

[0100] 2、用光密度(OD)测量脂肪体乙的产量,用DLS测量脂肪体乙的大小并统计比例。

[0101] 部分结果见图1(A为DOPC和PI,B为DOPC和PA,C为DOPC和PS)。结果表明,掺入PI比例为4.8-7.6%时产率提高,比例增长至14%时产率下降,脂肪体乙平均直径无明显变化,大脂肪体数目增加,中等大小脂肪体减少,小脂肪体增加但并无显著性差异;掺入PA不影响产率,也不影响直径大小。掺入PS可提高产率,在PS比例达到3%时,脂肪体平均直径增大,说明提高PS含量导致更大的脂肪体。用中性脂染料染色后,所有脂肪体都为球形结构,这表明它们都含有中性脂核心。由此可见,磷脂可以极大的影响脂肪体的产量和大小。

[0102] 综合上述结果,制备脂肪体乙时,磷脂和甘油三酯的质量比为(0.25~3):5。

[0103] 磷脂为B1)、B2)、B3)、B4)、B5)或B6):B1)DOPC和PI;B2)DOPC和PA;B3)DOPC和PS;B4)DOPC、PI和DOPE;B5)DOPC、PA和DOPE;B6)DOPC、PS和DOPE。

[0104] B1)中,DOPC和PI的质量比可为(4-249):1。

[0105] B2)中,DOPC和PA的质量比可为(20-99):1。

[0106] B3)中,DOPC和PS的质量比可为(30-99):1。

[0107] B4)中,DOPC、PI和DOPE的质量比可为100:(0.1~90):(0.1~200)。

[0108] B5)中,DOPC、PA和DOPE的质量比可为100:(0.1~35):(0.1~200)。

[0109] B6)中,DOPC、PS和DOPE的质量比可为100:(0.1~35):(0.1~200)。

[0110] B7)中,DOPC和胆固醇的质量比可为(0.1~100):1。

[0111] 实施例2、脂肪体在评价蛋白在脂滴上的结构、形态和密度中的应用

[0112] 一、比较内源ADRP在脂滴中的形态和包被ADRP蛋白的脂肪体的形态

[0113] 1、为观察内源ADRP在细胞中的分布状况,本发明的发明人构建了在ADRP的C端敲入了EGFP基因的C2C12细胞系(即GFP-KI-ADRP细胞),将GFP-KI-ADRP细胞种在Confocal小皿中,用100 $\mu$ M OA处理细胞12h,用激光共聚焦显微镜Olympus FV1000拍摄图像。

[0114] GFP-KI-ADRP细胞的构建步骤如下:以小鼠ADRP的mRNA作为模板设计gRNA,将ADRP两端的gRNA序列构建至pX260a载体中,得到pX260a重组质粒。将ADRP基因的核苷酸序列构建至pQCXIP载体,并在C端插入GFP序列,得到pQCXIP重组质粒。将pX260a重组质粒和重组质

粒pQCXIP同时导入C2C12细胞,转染48h后,用含1 $\mu$ g/ml的嘌呤霉素的培养基培养细胞,筛选1周后,将存活的细胞进行96孔板单克隆筛选,直到获取单克隆细胞。用蛋白免疫印迹验证得到的单克隆细胞是否为阳性细胞株。单克隆细胞为阳性细胞株的即为GFP-KI-ADRP细胞。

[0115] 结果见图2中A的A(GFP为包被脂滴的荧光图)。结果表明,内源ADRP全部定位在脂滴上并形成均匀的圈状包裹脂滴。

[0116] 2、将5 $\mu$ g SMT3-ADRP-GFP蛋白与30 $\mu$ L脂肪体甲(磷脂为DOPC,中性脂质为甘油三酯,DOPC和甘油三酯的质量比为2:5)混合,37 $^{\circ}$ C孵育5min,然后清洗3遍,每次清洗的步骤如下:20000g离心5min,吸去下层溶液,用30 $\mu$ L缓冲液B重悬。之后,用LipidTOX Red染色,用超高分辨显微镜SIM拍摄图像。

[0117] SMT3-ADRP-GFP蛋白:向pET-28a载体的多克隆位点插入ADRP基因的核苷酸序列,并在N端和C端分别插入SMT-3序列和GFP序列,得到重组质粒。将该重组质粒导入大肠杆菌BL21感受态,得到的重组大肠杆菌接种于蛋白表达培养基(含抗生素),37 $^{\circ}$ C、220rpm振荡培养至对数期,之后加入IPTG至终浓度为0.4mM,16 $^{\circ}$ C、220rpm诱导培养24h。所获菌体经清洗、破碎和离心,获得蛋白粗提液;再经镍柱纯化和琼脂糖葡聚糖凝胶分子排阻色谱纯化获得高纯度的SMT-ADRP-GFP蛋白。

[0118] 结果见图2中A的B(GFP为SMT-ADRP-GFP蛋白包被脂肪体的荧光图,LipidTOX Red为明场脂肪体图)。结果表明,SMT3-ADRP-GFP蛋白在脂肪体甲表面形成圈状。

[0119] 按照上述步骤,将脂肪体甲替换为脂肪体乙,其它步骤均不变。结果表明,SMT3-ADRP-GFP蛋白也在脂肪体乙表面形成圈状。

[0120] 由此可见,实施例1制备的脂肪体甲和脂肪体乙可以评价蛋白(如ADRP蛋白)在脂滴上的结构和形态。

[0121] 二、比较内源ADRP蛋白在小鼠骨骼肌细胞脂滴上的密度和ADRP蛋白在脂肪体上的密度

[0122] 1、内源ADRP蛋白在小鼠骨骼肌细胞脂滴上的密度的检测

[0123] (1)分别将0 $\mu$ g BSA蛋白、1 $\mu$ g BSA蛋白、2 $\mu$ g BSA蛋白、4 $\mu$ g BSA蛋白、8 $\mu$ g BSA蛋白、16 $\mu$ g BSA蛋白、32 $\mu$ g BSA蛋白、0.5 $\mu$ L SMT3-ADRP-GFP蛋白和1 $\mu$ L SMT3-ADRP-GFP蛋白上样。通过ImageJ扫描定量SMT3-ADRP-GFP蛋白浓度。

[0124] 上样结果见图2中B。

[0125] (2)分别将3.39 $\mu$ g SMT3-ADRP-GFP蛋白、6.78 $\mu$ g SMT3-ADRP-GFP蛋白、13.56 $\mu$ g SMT3-ADRP-GFP蛋白、27.12 $\mu$ g SMT3-ADRP-GFP蛋白、54.24 $\mu$ g SMT3-ADRP-GFP蛋白、108.48 $\mu$ g SMT3-ADRP-GFP蛋白、216.96 $\mu$ g SMT3-ADRP-GFP蛋白、5 $\mu$ L脂滴蛋白和10 $\mu$ L脂滴蛋白上样。通过ImageJ扫描定量内源ADRP蛋白浓度。

[0126] 脂滴蛋白:从小鼠骨骼肌细胞中分离亚细胞组分,分离并纯化脂滴,再用氯仿丙酮萃取脂质,即获得脂滴蛋白。

[0127] 上样结果见图2中C。

[0128] (3)通过动态光散射检测GFP-KI-ADRP细胞的脂滴平均直径,进而获得单个脂滴的表面积。

[0129] 检测结果见图2中D。结果表明,脂滴的平均直径为540.2nm。

[0130] (4)通过静态光散射检测脂滴浓度,进而可计算出所有脂滴的总表面积。

[0131] 检测结果见图2中E。结果表明,每mL脂滴的个数为 $2.26 \times 10^8$ 个。

[0132] (5) 将内源ADRP蛋白的总量与脂滴的总表面积相除,得出内源ADRP蛋白在脂滴上的密度大约为 $9.33 \times 10^7/\mu\text{m}^2$ 。

[0133] 2、SMT3-ADRP-GFP蛋白在脂肪体上的密度的检测

[0134] (1) 通过动态光散射检测脂肪体甲(磷脂为DOPC,中性脂质为甘油三酯,DOPC和甘油三酯的质量比为2:5)的平均直径。

[0135] 检测结果见图3中A。结果表明,脂肪体甲的平均直径为161.1nm。

[0136] (2) 通过静态光散射检测脂肪体甲脂滴的浓度。

[0137] 检测结果见图3中B。结果表明,脂肪体甲脂滴的浓度为 $8.53 \times 10^9/\text{mL}$ 。

[0138] (3) 将不同浓度的SMT3-ADRP-GFP蛋白与脂肪体甲混合,4℃孵育12h,然后通过EnSpire Multimode Plate Reader检测脂肪体甲上的蛋白质。

[0139] 检测结果见图3中C。结果表明,在脂肪体甲上募集的ADRP可以是饱和的,SMT3-ADRP-GFP蛋白的饱和浓度为 $0.59\mu\text{M}$ 。

[0140] 以蛋白浓度为横坐标,脂肪体结合蛋白浓度为纵坐标,绘制标准曲线;之后根据标准曲线,通过Scatchard分析计算SMT3-ADRP-GFP蛋白和脂肪体甲的亲和力(Kd)和脂肪体甲上ADRP结合位点数(Bmax)。

[0141] 检测结果见图3中C。结果表明,标准曲线为: $y = 0.8259x + 1.067, r^2 = 0.9434$ 。SMT3-ADRP-GFP蛋白和脂肪体甲的亲和力(Kd)为 $1.21\mu\text{M}$ ,脂肪体甲上ADRP结合位点数(Bmax)为 $1.29\mu\text{M}$ 。

[0142] (4) 按照图3中D(其中D为整个脂肪体甲的直径, $P_{\text{Bound}}$ 为结合脂肪体甲的蛋白质的饱和量和,NA为Avogadro常数,N为脂肪体甲的绝对数量)所示的公式计算单位面积上蛋白的数量。

[0143] 结果表明,SMT3-ADRP-GFP蛋白在脂肪体甲上的密度大约为 $1.02 \times 10^6/\mu\text{m}^2$ 。

[0144] 按照上述步骤,将脂肪体甲替换为脂肪体乙,其它步骤均不变。结果表明,SMT3-ADRP-GFP蛋白在脂肪体乙上的密度和SMT3-ADRP-GFP蛋白在脂肪体甲上的密度无显著差异。

[0145] SMT3-ADRP-GFP蛋白在脂肪体上的密度与内源ADRP蛋白在小鼠骨骼肌细胞脂滴上的密度相近。由此可见,人工脂滴可以很好的模拟真实的脂滴用于体外研究。

[0146] 实施例3、磷脂酰肌醇对ADRP定位于脂肪体的影响

[0147] 一、在含磷脂酰肌醇的脂肪体乙表面ADRP的密度降低

[0148] 由于体内脂滴表面磷脂的定向改变非常困难,而人工脂滴可以很好地模拟真实的脂滴,且可以精确改变磷脂组成,因此本发明的发明人通过构建了不同磷脂组成的脂肪体乙,以研究磷脂对ADRP定位的调控;中性脂质均为甘油三酯,磷脂和中性脂质的质量比为2:5。脂滴表面的磷脂主要由磷脂酰胆碱(如DOPC)、磷脂酰乙醇胺(如DOPE)和磷脂酰肌醇(PI)构成,重点研究磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇对ADRP定位的调控。

[0149] 1、通过不断增加磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇在脂肪体乙中的比例,并与等量的SMT3-ADRP-GFP蛋白孵育,进行免疫印迹分析。

[0150] 结果表明(图4中A),ADRP在脂肪体乙上的定位随磷脂酰肌醇的增加而减少,随磷脂酰乙醇胺的增加而增加。

[0151] 2、通过荧光检测得出脂肪体乙的ADRP饱和曲线。

[0152] 结果见图4中B和C(B中总磷脂由92.4%DOPC和7.6%PI组成;C中总磷脂由81%DOPC和19%DOPE组成)。结果表明,加入磷脂酰乙醇胺的脂肪体乙的ADRP饱和浓度比加入磷脂酰肌醇的高。

[0153] 3、分别用动态光和静态光散射测得加入磷脂酰肌醇的脂肪体乙的平均直径和个数。

[0154] 4、通过Scatchard分析计算ADRP-GFP和加入磷脂酰肌醇或磷脂酰乙醇胺的脂肪体乙的亲和力。

[0155] 检测结果见图4中D、E、F和G。结果表明,ADRP-GFP和加入磷脂酰肌醇的脂肪体乙的亲和力为1.10 $\mu$ M,脂肪体乙上ADRP结合位点数( $B_{max}$ )为0.62 $\mu$ M;ADRP-GFP和加入磷脂酰乙醇胺的脂肪体乙的亲和力为4.48 $\mu$ M,脂肪体乙上ADRP结合位点数( $B_{max}$ )为1.61 $\mu$ M。进一步根据步骤三的方法,得到ADRP在脂肪体乙表面的密度为4.78e+5/ $\mu$ m<sup>2</sup>。

[0156] 5、按照实施例1中脂肪体乙制备方法加入指定百分比的磷脂构建不同磷脂组成的脂肪体乙,然后将1 $\mu$ g SMT3-ADRP-GFP蛋白与30 $\mu$ L脂肪体乙( $OD_{600}$ 为20)混合,37 $^{\circ}$ C孵育5min,LipidTOX Red染色后使用共聚焦成像Confocal FV1000显微镜成像。

[0157] 检测结果见图4中H(标尺为2 $\mu$ m)。结果表明,绿色荧光的强度是随磷脂酰肌醇的增加而减少,证明了磷脂酰肌醇会减少ADRP在脂肪体乙上定位。

[0158] 二、TIP47在含磷脂酰肌醇的脂肪体表面的定位没有减少

[0159] TIP47是与ADRP非常相似的蛋白,同属PLIN蛋白家族。检测磷脂酰肌醇是否对TIP47的定位有同样的阻碍作用。本发明的发明人表达并纯化了TIP47-APPLE融合蛋白,并与30 $\mu$ L脂肪体( $OD_{600}$ 为20)混合,37 $^{\circ}$ C孵育5min,检测TIP47-APPLE融合蛋白在掺入磷脂酰肌醇的脂肪体上是否会定位减少。

[0160] TIP47-APPLE融合蛋白:向pET-28a载体的多克隆位点插入TIP47基因的核苷酸序列,并在C端插入APPLE序列,得到重组质粒。将该重组质粒导入大肠杆菌BL21感受态,得到的重组大肠杆菌接种于蛋白表达培养基(含抗生素),37 $^{\circ}$ C、220rpm振荡培养至对数期,之后加入IPTG至终浓度为0.4mM,16 $^{\circ}$ C、220rpm诱导培养24h。所获菌体经清洗、破碎和离心,获得蛋白粗提液;再经镍柱纯化和琼脂糖葡聚糖凝胶分子排阻色谱纯化获得高纯度的TIP47-APPLE融合蛋白。

[0161] (1)将TIP47-APPLE融合蛋白分别与只含有DOPC的脂肪体和掺入7.6%PI的脂肪体孵育,用银染方法检测。

[0162] 检测结果见图5中A。结果表明,SMT3-ADRP-GFP蛋白的浓度为0.05 $\mu$ g/ $\mu$ L,GFP浓度为0.09 $\mu$ g/ $\mu$ L,TIP47-APPLE融合蛋白浓度为0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L。

[0163] (2)将具有一系列浓度的TIP47-APPLE融合蛋白与脂肪体在4 $^{\circ}$ C孵育24h,并通过EnSpire Multimode Plate Reader检测脂肪体上的蛋白质。通过荧光检测分别得出两种脂肪体的TIP47饱和曲线。

[0164] 结果见图5中B和C。结果表明,在脂肪体上募集TIP47是可以饱和的。

[0165] (3)通过Scatchard分析计算TIP47-APPLE融合蛋白和脂肪体的亲和力。

[0166] 结果表明,TIP47-APPLE融合蛋白和不加入PI的脂肪体的亲和力为5.40 $\mu$ M,脂肪体上TIP47结合位点数( $B_{max}$ )为2.56 $\mu$ M;TIP47-APPLE融合蛋白和加入PI的脂肪体的亲和力为

7.14 $\mu\text{M}$ ,脂肪体上TIP47结合位点数( $B_{\text{max}}$ )为2.97 $\mu\text{M}$ 。不加入PI的脂肪体的TIP47饱和浓度与加入PI的相比没有显著变化。

[0167] 结果表明,与ADRP不同,在脂肪体中添加了磷脂酰肌醇后,TIP47在脂肪体上的定位没有减少,反而略微增加。这说明TIP47与ADRP存在不同,磷脂酰肌醇对ADRP的阻碍作用是相对特异的。

[0168] 实施例4、ADRP定位序列中负电氨基酸的突变可恢复磷脂酰肌醇对ADRP的定位的影响

[0169] 组成该脂肪体的磷脂为(a) DOPC或(b) DOPC和PI,中性脂质为甘油三酯,磷脂和中性脂质的质量比为2:5。

[0170] 1、ADRP和TIP47结构分析

[0171] 为研究磷脂酰肌醇对ADRP和TIP47脂肪体定位不同的调控,首先对两个蛋白的结构进行了分析和比较。鼠源TIP47的C端结构已经被解析,以此为模板,对人源ADRP和TIP47进行了结构预测,再将两个蛋白的结构导入软件进行配对比较,并在图中将有区别的部分进行了颜色标记。接着,将两个蛋白的氨基酸序列进行比对,并将结构不同的区域在序列上进行了标注。磷脂酰肌醇对ADRP的阻碍作用很可能发生在ADRP的脂滴定位序列中,而脂滴蛋白的脂滴定位序列很大可能性为双性 $\alpha$ 螺旋,因此预测了ADRP的双性 $\alpha$ 螺旋,并将这些 $\alpha$ 螺旋的位置与ADRP和TIP47区别区域进行了比对,发现B双性 $\alpha$ 螺旋恰好处于ADRP和TIP47区别区域中,且E73负电氨基酸位于该 $\alpha$ 螺旋中。虽然TIP47在相近位置也有一个负电氨基酸,但该位点所在位置并不是双性 $\alpha$ 螺旋,且与73位氨基酸相比更远离疏水氨基酸。因此该位点有可能是导致磷脂酰肌醇对ADRP和TIP47脂肪体定位不同的调控的原因。

[0172] 2、ADRP定位序列中负电氨基酸的突变可恢复磷脂酰肌醇对ADRP的定位

[0173] (1) 为研究ADRP双性 $\alpha$ 螺旋哪些负电氨基酸导致PI阻碍ADRP定位于脂肪体,将这些负电氨基酸分别突变为正电氨基酸和中性氨基酸,并在Transetta菌株中进行了表达。通过超声破碎、高速离心,取上清(ADRP突变体蛋白)分别与DOPC脂肪体和掺入PI(PI掺入比例为7.6%)脂肪体混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5min,然后用缓冲液B洗2遍,15000rpm离心5min。制样后用免疫印迹分析。

[0174] 免疫印迹结果见图6中A。用ImageJ扫描三次结果后的量化分析结果见图6中B。

[0175] (2) 将ADRP突变体蛋白与两种脂肪体孵育,用银染方法检测。

[0176] 结果见图6中C。结果表明,SMT3-ADRP-GFP蛋白的浓度为0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,GFP浓度为0.09 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,E73K浓度为0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,E73Q浓度为0.23 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

[0177] 结果表明,仅在E73突变为正电氨基酸时可显著减少PI对ADRP定位于脂肪体的阻碍。

[0178] 实施例5、脂肪体在检测ATGL酶活性中应用

[0179] 一、ATGL及其激活蛋白CGI-58均可定位于脂肪体

[0180] 1、本发明的发明人表达并纯化了SMT3-ATGL蛋白和SMT3-CGI-58蛋白。

[0181] SMT3-ATGL蛋白:向pET-28a-SMT3vector的多克隆位点插入ATGL基因的核苷酸序列,得到重组质粒。将该重组质粒导入大肠杆菌BL21感受态,得到的重组大肠杆菌接种于蛋白表达培养基(含抗生素),37 $^{\circ}\text{C}$ 、220rpm振荡培养至对数期,之后加入IPTG至终浓度为0.4mM,16 $^{\circ}\text{C}$ 、220rpm诱导培养24h。所获菌体经清洗、破碎和离心,获得蛋白粗提液;再经镍

柱纯化和琼脂糖葡聚糖凝胶分子排阻色谱纯化获得高纯度的SMT3-ATGL蛋白。

[0182] SMT3-CGI-58蛋白:向pET-28a-SMT3vector的多克隆位点插入CGI-58基因的核苷酸序列,得到重组质粒。将该重组质粒导入大肠杆菌BL21感受态,得到的重组大肠杆菌接种于蛋白表达培养基(含抗生素),37℃、220rpm振荡培养至对数期,之后加入IPTG至终浓度为0.4mM,16℃、220rpm诱导培养24h。所获菌体经清洗、破碎和离心,获得蛋白粗提液;再经镍柱纯化和琼脂糖葡聚糖凝胶分子排阻色谱纯化获得高纯度的SMT3-CGI-58蛋白。

[0183] 2、将12μg SMT3-ATGL蛋白和18μg SMT3-CGI-58蛋白分别与100μL脂肪体(磷脂为DOPC,中性脂质为甘油三酯,DOPC和甘油三酯的质量比为2:5)混合,室温孵育1h,然后用100μL缓冲液B洗涤3次,制样用免疫印迹分析。

[0184] 分析结果见图7。检测表明,ATGL和CGI-58均可定位于脂肪体,且定位比例均大于50%。这说明应用脂肪体研究ATGL的甘油三酯酶活性是可行的。同时,CGI-58在脂肪体表面也是可饱和的,其饱和浓度约为0.451μg/μL,说明CGI-58与脂肪体的结合是生理性的。

[0185] 二、影响甘油三酯水解酶活性的因素

[0186] 棕色脂肪细胞质含有大量ATGL且活性很高,因此使用棕色脂肪细胞质研究影响ATGL酶活性的因素。采用文献报道的超声法制备反应底物,通过在反应体系中加入高浓度咪唑、去除PI、将制备底物的Solution A换为Buffer B,发现都会使ATGL酶活性降低(图8中左上)。检测并比较了棕色脂肪细胞质和纯化的SMT3-ATGL蛋白的酶活性,发现纯化的SMT3-ATGL蛋白活性很低(图8中右上),因此继续用棕色脂肪细胞质探索最适反应条件。当不断增加PI在反应底物中的比例时,棕色脂肪细胞质ATGL酶活性是显著增高的,这说明PI对于ATGL酶活性的激活有重要作用;与等量的棕色脂肪组织细胞质反应,当PI的比例增加到25%时,ATGL酶活性最高(图8中左下)。但是在制备脂肪体时掺入18.8%PI会使得率显著降低(图8中右下)。

[0187] 三、ATGL野生型与突变体的酶活性测定

[0188] 1、由于纯化的SMT3-ATGL蛋白酶活性很低,因此采用表达SMT3-ATGL的细菌裂解液检测酶活性。通过对ATGL进行定点突变,构建了目前报道的磷酸化位点突变体,突变成A为模拟非磷酸化状态,突变成D为模拟磷酸化状态。

[0189] 检测结果见图9中A。结果表明,与野生型ATGL相比,S47A和S47D均会酶活性下降,S87A会酶活性下降,S430A和S430D均会酶活性下降。

[0190] 2、在C2C12细胞中过表达ATGL及突变体,用免疫荧光的方法检测ATGL及突变体在C2C12细胞中的酶活性,用抗Flag的抗体与蛋白特异性结合,脂滴用LipidTOX Red染色。

[0191] 检测结果见图9中B(绿色为ATGL,红色为脂滴,标尺为5μm)。结果表明,S47A和S47D在有0A条件下均会酶活性下降,其中S47D下降更明显。S87A和S87D均会酶活性下降,其中S87A在有0A条件下下降程度无明显差别,S87D在无0A条件下下降明显,在有0A条件下下降不明显。S430A和S430D还未进行检测。这说明S47是重要的酶活性位点,且该位点的磷酸化与否可能并不是决定其酶活性的唯一因素。S87的磷酸化可能会导致酶活性的下降,另外在0A处理后,CGI-58会更多的定位于脂滴,CGI-58可能与S87D结合,而不与S87A结合。

[0192] 四、ATGL野生型与突变体在人工脂滴系统中的酶活性测定

[0193] 为精确研究ATGL在脂肪体上的酶活性,进行了人工脂滴系统中的酶活性测定。

[0194] 1、由于ATGL在PI含量增加时酶活性增高,因此需制备掺入PI的脂肪体。由于高比

例PI的掺入会降低脂肪体得率,因此,在掺入PI的同时掺入了DOPE以提高脂肪体得率。

[0195] 根据光密度测定结果发现(见图10中左上),在DOPC:PI:DOPE=59:15:26时,脂肪体得率最高。因此,采用该比例制备的脂肪体作为反应底物。

[0196] 2、将棕色脂肪细胞质与不同比例的脂肪体乙进行孵育,然后免疫印迹检测ATGL是否定位与脂肪体。

[0197] 检测结果见图10中右上。结果表明,在DOPC:PI:DOPE=59:15:26时,ATGL在脂肪体上的定位情况与只掺有DOPC的脂肪体并无显著差别,说明应用该脂肪体进行酶反应试验是可行的。

[0198] 3、应用脂肪体在有无BSA条件下检测棕色脂肪细胞质中的ATGL的酶活性。

[0199] 检测结果见图10中左下。结果表明,加入BSA会降低酶活性。这可能是因为BSA会影响ATGL在脂肪体上的定位。

[0200] 4、应用脂肪体在无BSA条件下检测ATGL及其突变体的酶活性。

[0201] 检测结果见图10中右下。结果表明,突变体S47A、S47D、S87A和S430D的酶活性显著降低。

[0202] 五、小鼠骨骼肌细胞中ATGL的敲除

[0203] 1、为进一步在细胞中检测ATGL及其突变体的酶活性,本发明的发明人构建了ATGL敲除细胞系。

[0204] 2、骨骼肌是重要的代谢器官,ATGL在骨骼肌的脂肪代谢中起着重要的作用,因此选择C2C12细胞作为实验细胞。应用Crispr-cas9技术,设计了2个靶序列,靶序列1为ATGL(mouse) KO Target-1 F:CACCGCGGGTCTACCACATTGGCG和ATGL(mouse) KO Target-1 R:AAACCGCCAATGTGGTAGACCCCGC;靶序列2为ATGL(mouse) KO Target-2 F:CACCGATTGCCATGAGCGCGCCAA和ATGL(mouse) KO Target-2 R:AAACTTGGCGGCTCATGGCAATC。其中靶序列2有敲除效率,靶序列1没有敲除效率。

[0205] 3、将细胞单克隆K0-2-15和细胞单克隆K0-2-16脂滴纯化后,用银染检测脂滴纯度。

[0206] 检测结果见图11中A。

[0207] 4、用ATGL抗体分别检测细胞单克隆K0-2-15和细胞单克隆K0-2-16中是否有ATGL表达。

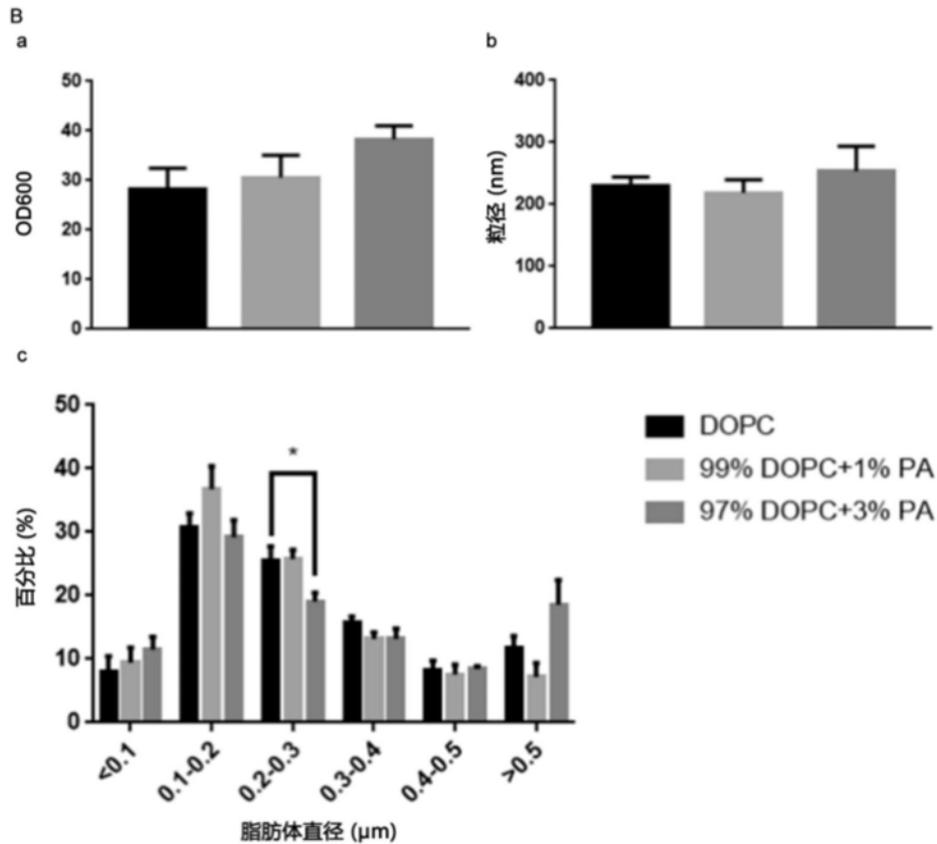
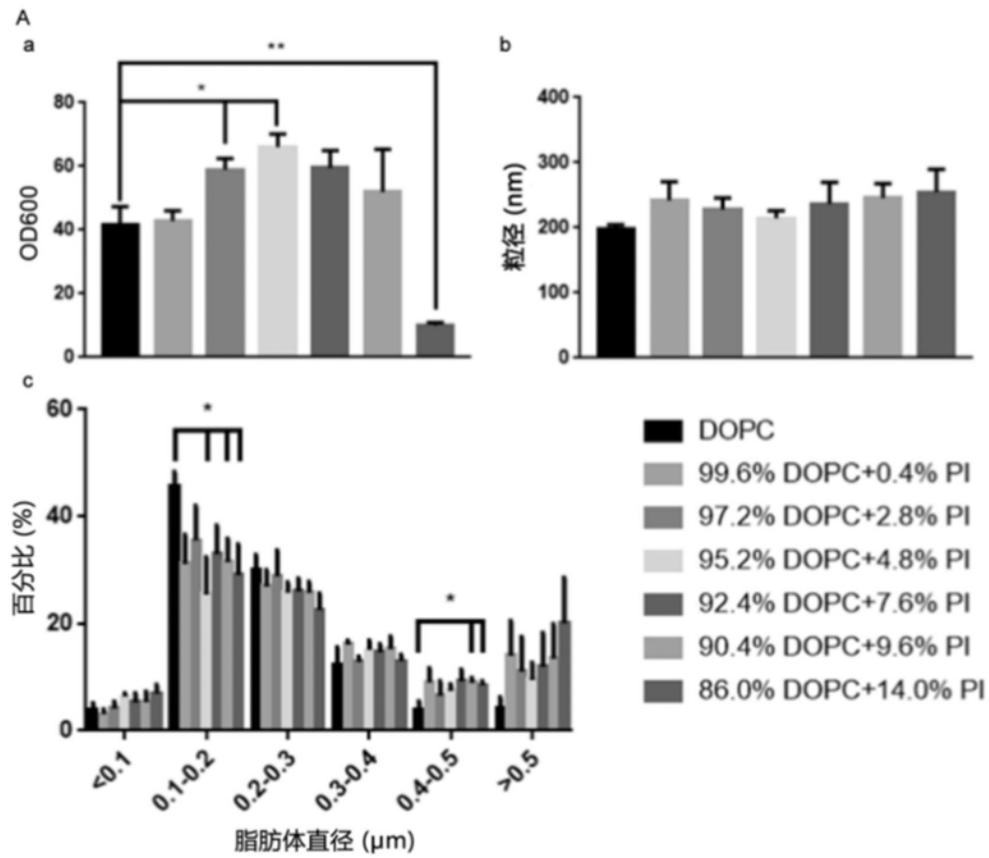
[0208] 检测结果见图11中B。结果表明,ATGL在细胞单克隆K0-2-16被敲除。

[0209] 5、分别将细胞单克隆K0-2-15和细胞单克隆K0-2-16进行测序。

[0210] 测序结果见图11中C。结果表明,细胞单克隆K0-2-15为转染靶序列2但没有发生移码突变的克隆,细胞单克隆K0-2-16在靶序列中发生了单个碱基的缺失,导致移码突变。

[0211] 6、分别将细胞单克隆K0-2-15和细胞单克隆K0-2-16种在Confocal小皿中,用LipidTOX Green染脂滴,用激光共聚焦显微镜观察。

[0212] 结果见图11中D。结果表明,ATGL敲除后脂滴变大。



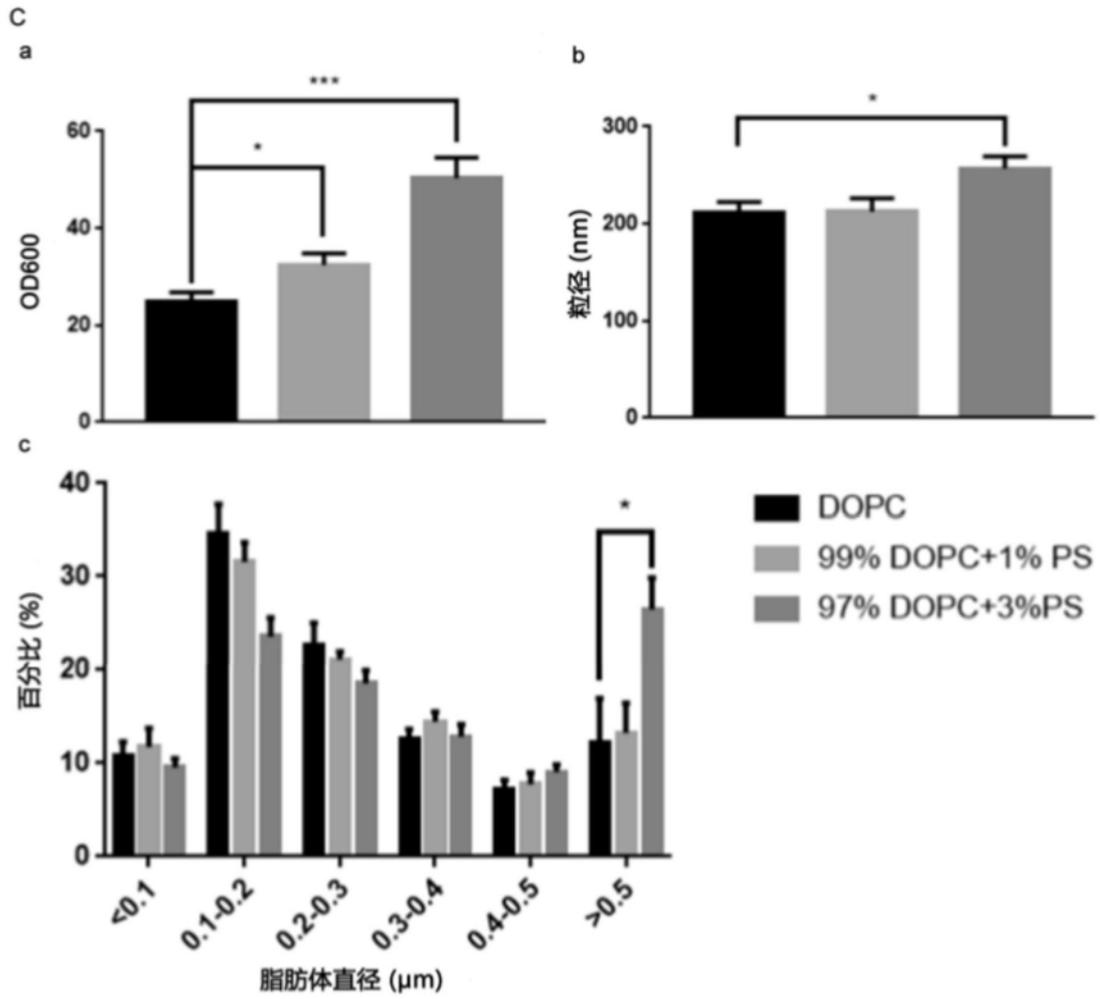
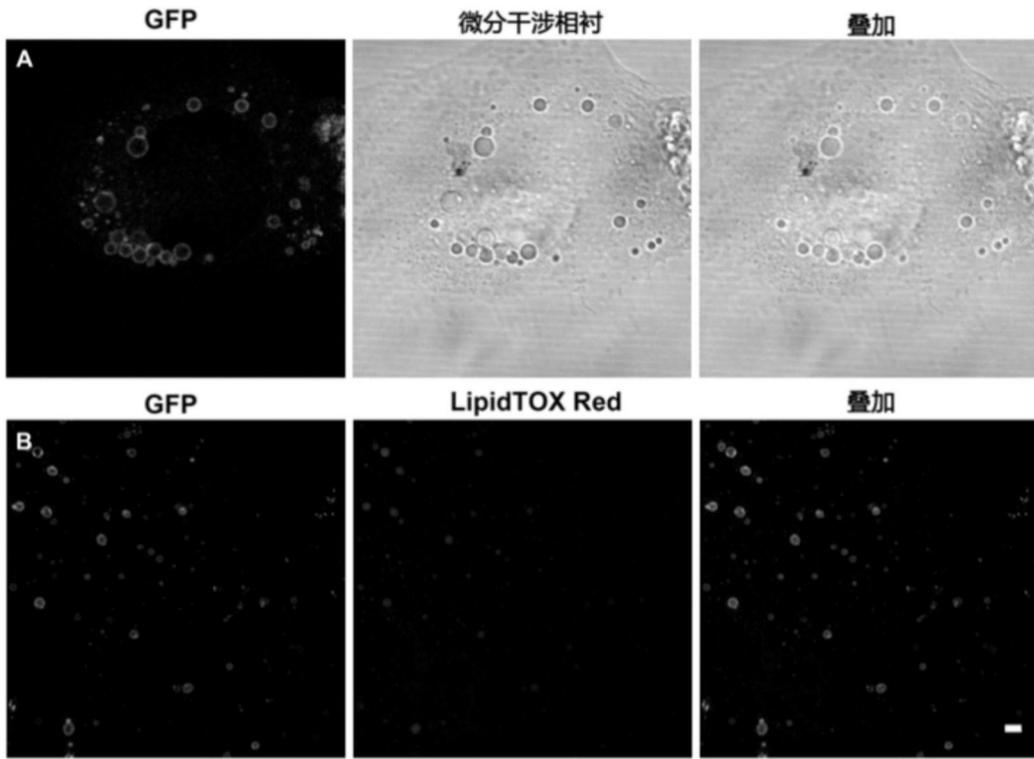
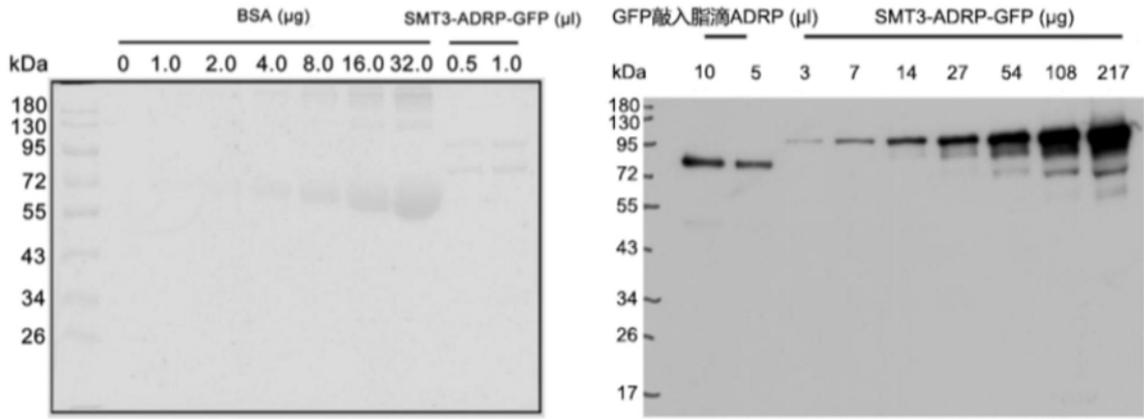


图1

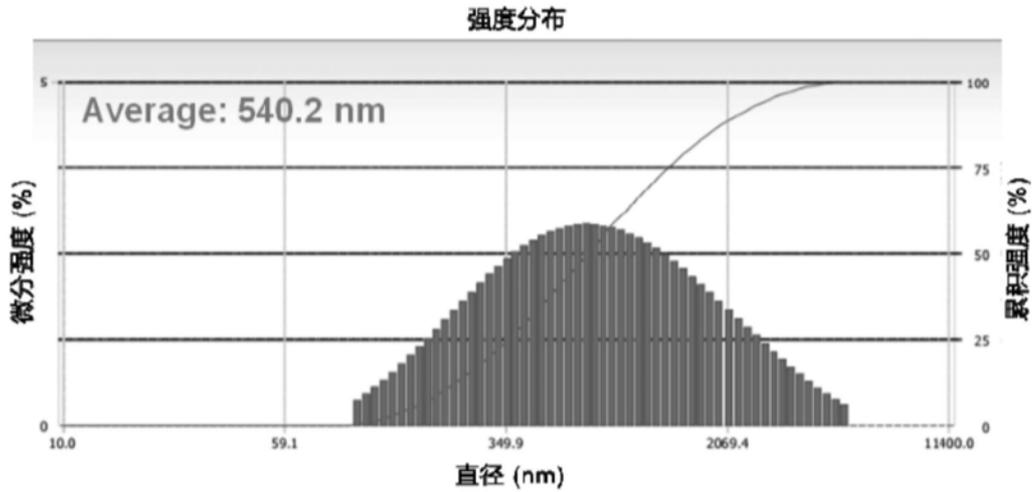


A

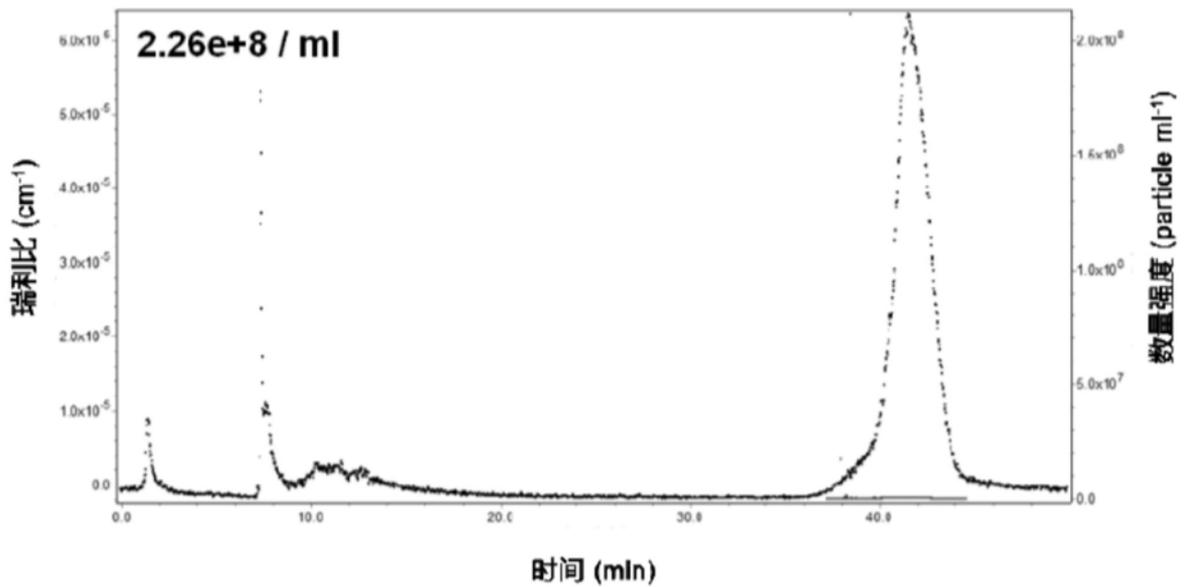


B

C

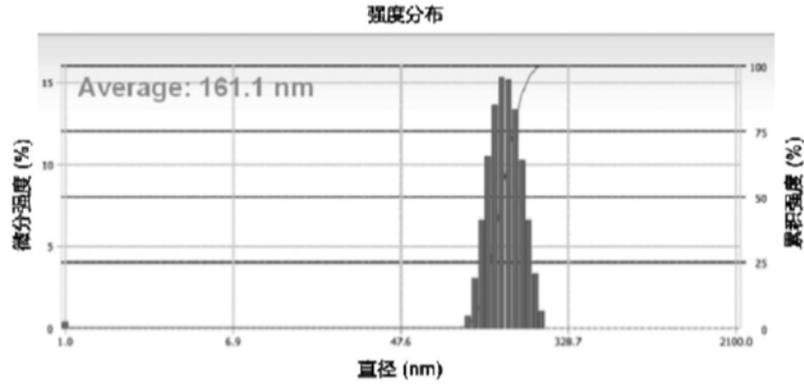


D

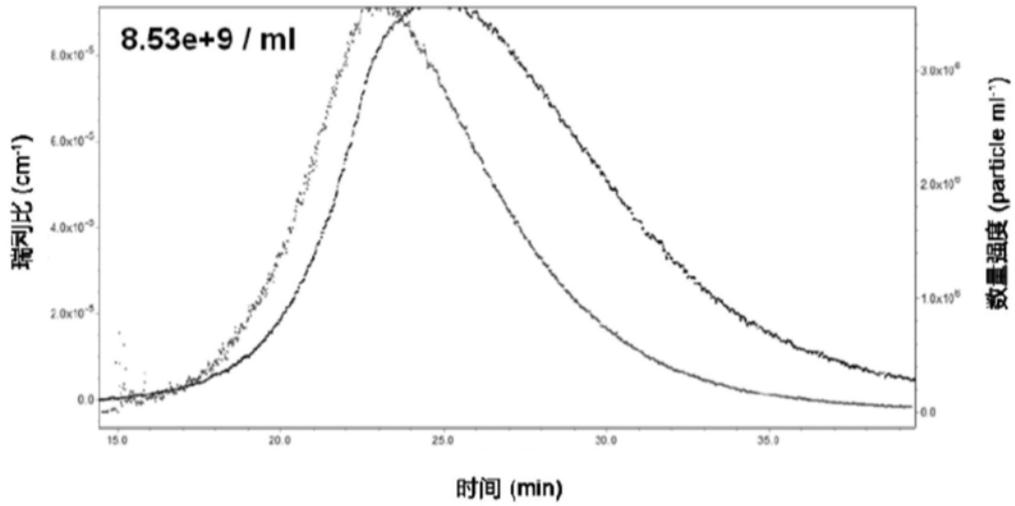


E

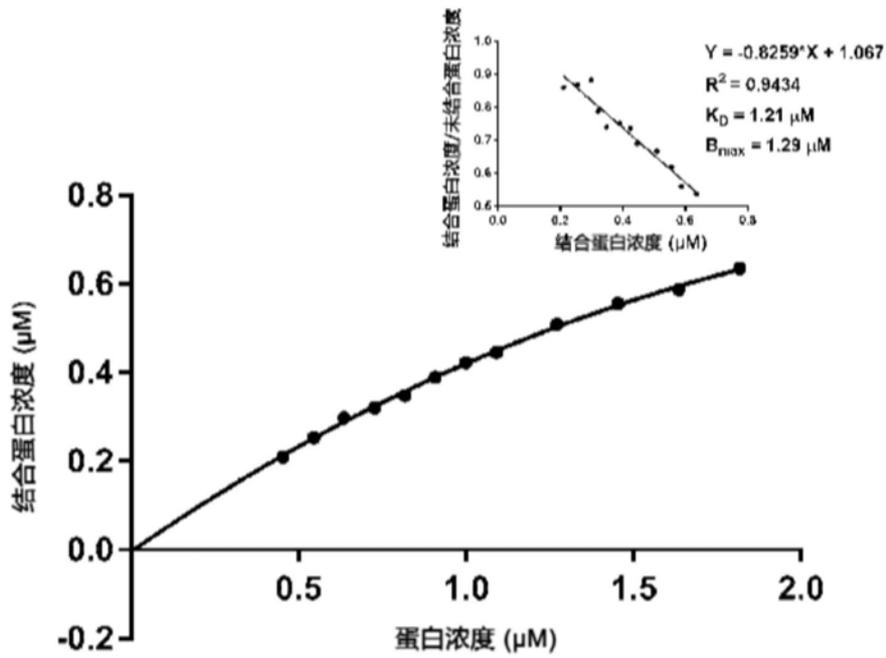
图2



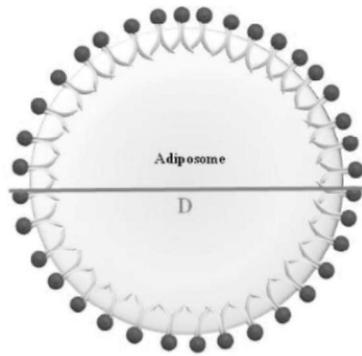
A



B



C



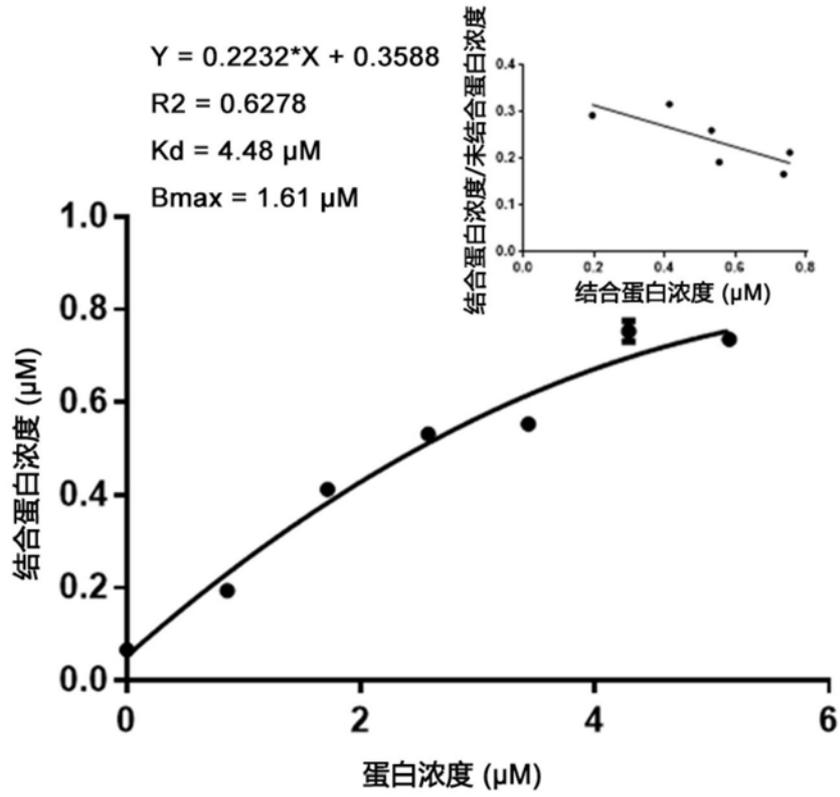
$$P_{Density} = \frac{P_{Bound} * NA}{\pi * D^2 * N}$$

D

图3

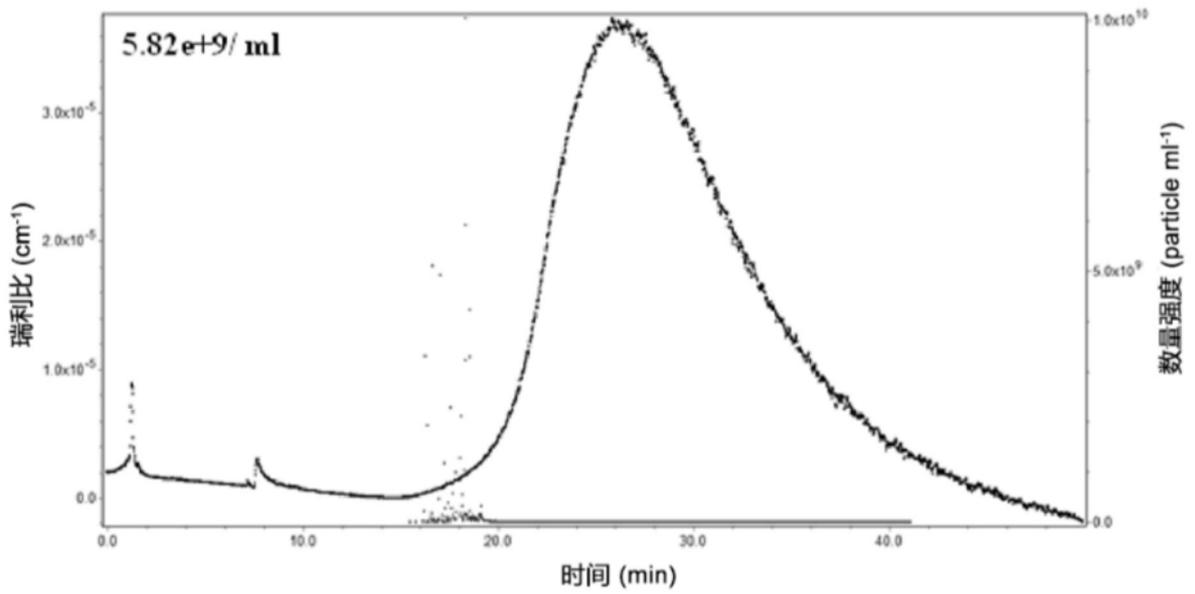


81% DOPC + 19% DOPE

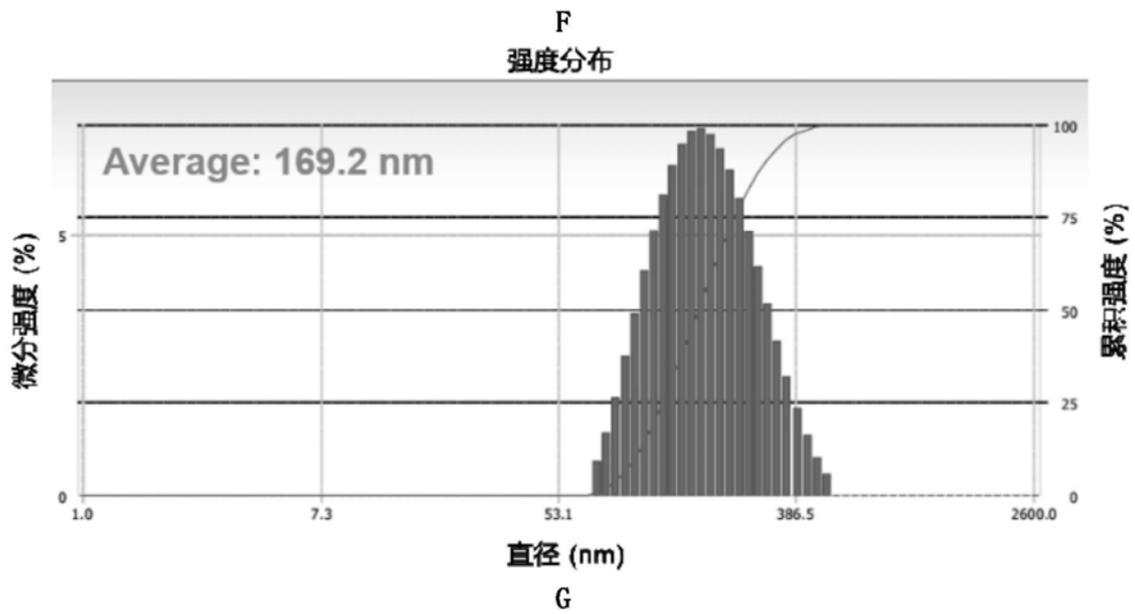
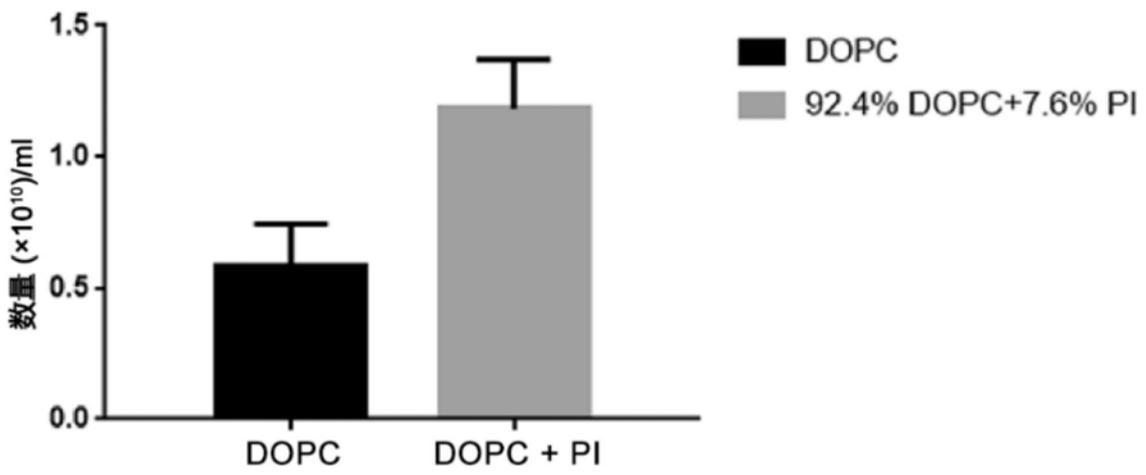
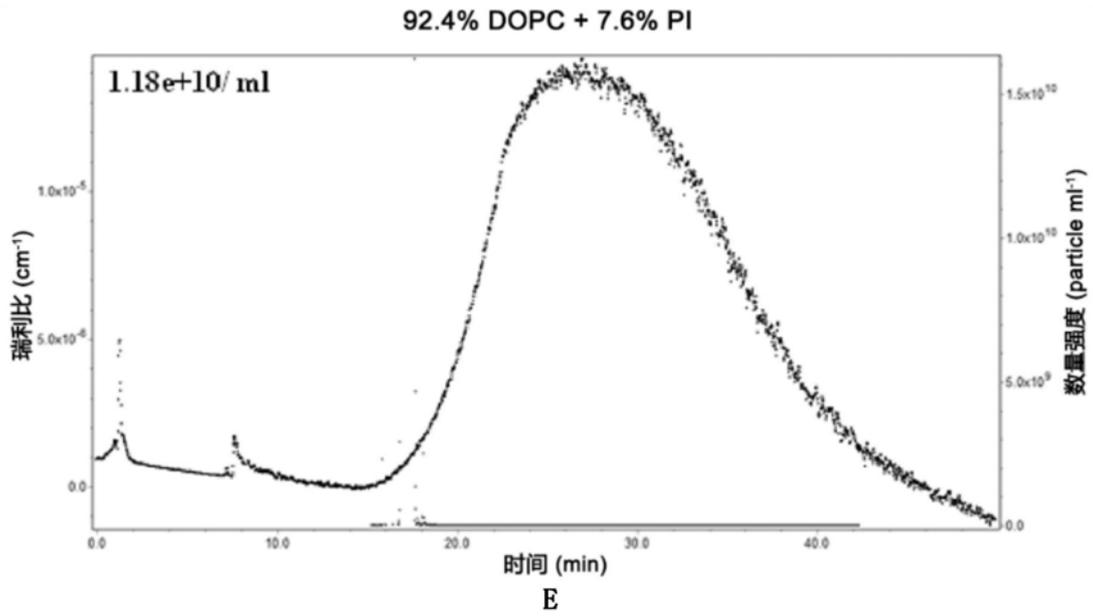


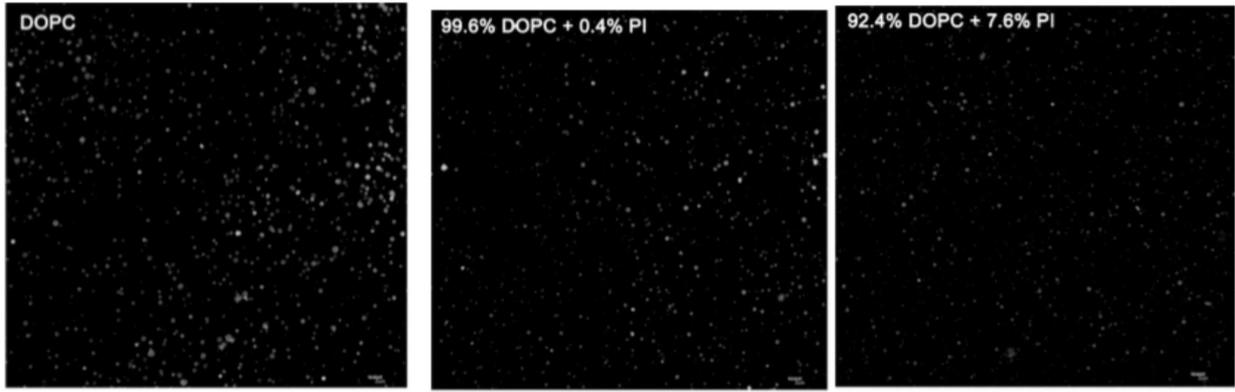
C

DOPC



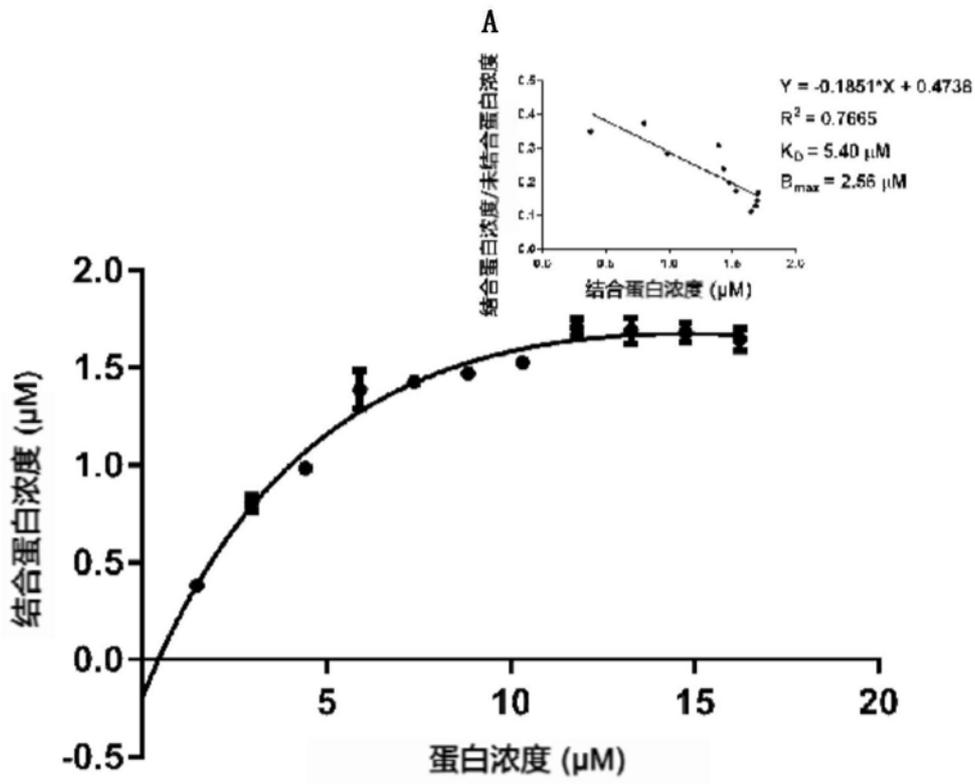
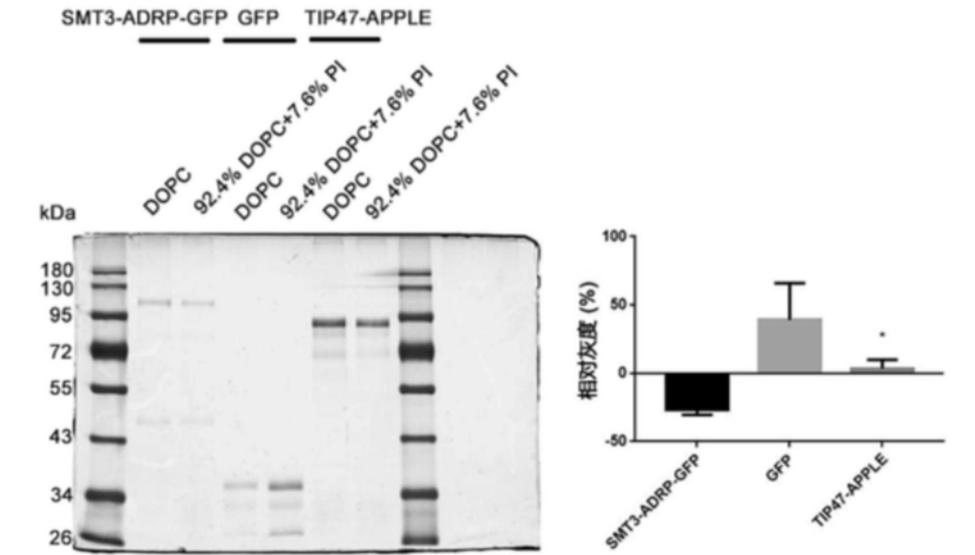
D



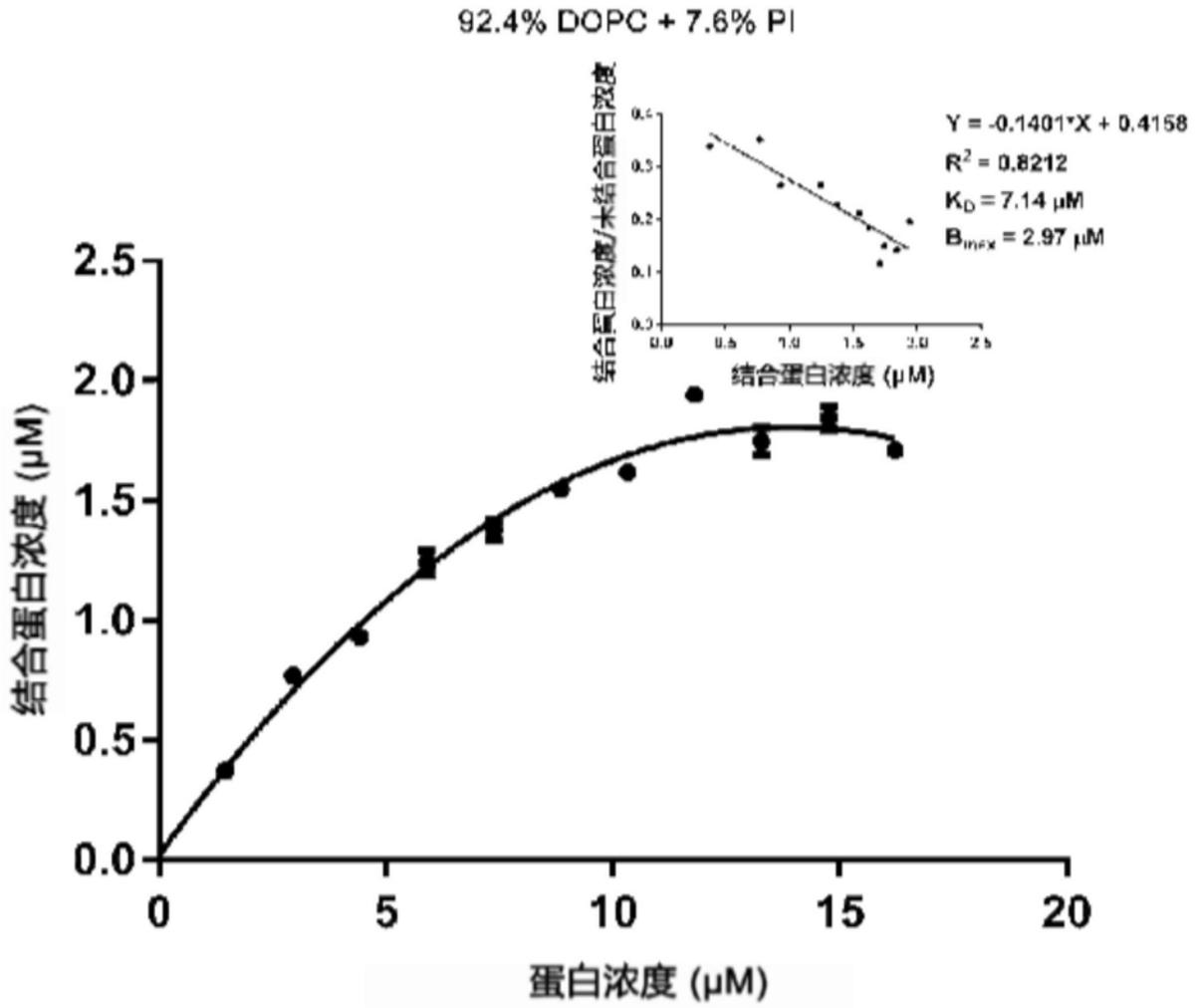


H

图4

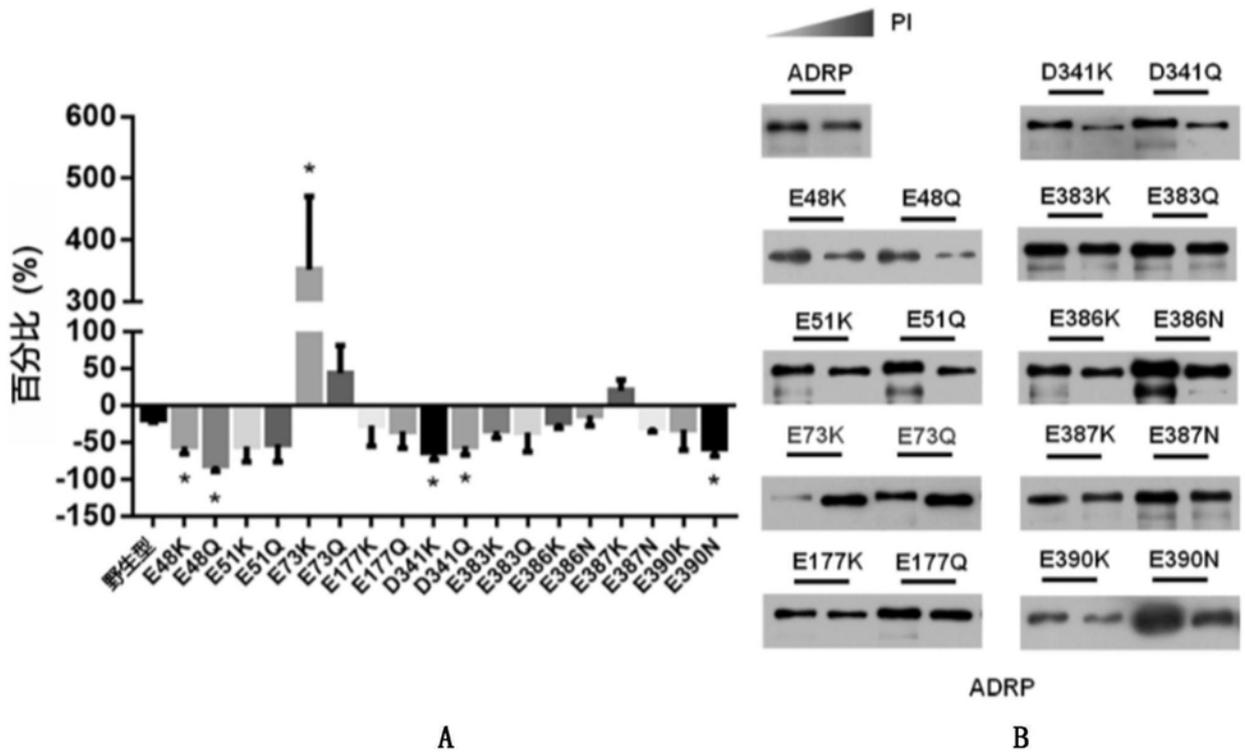


B



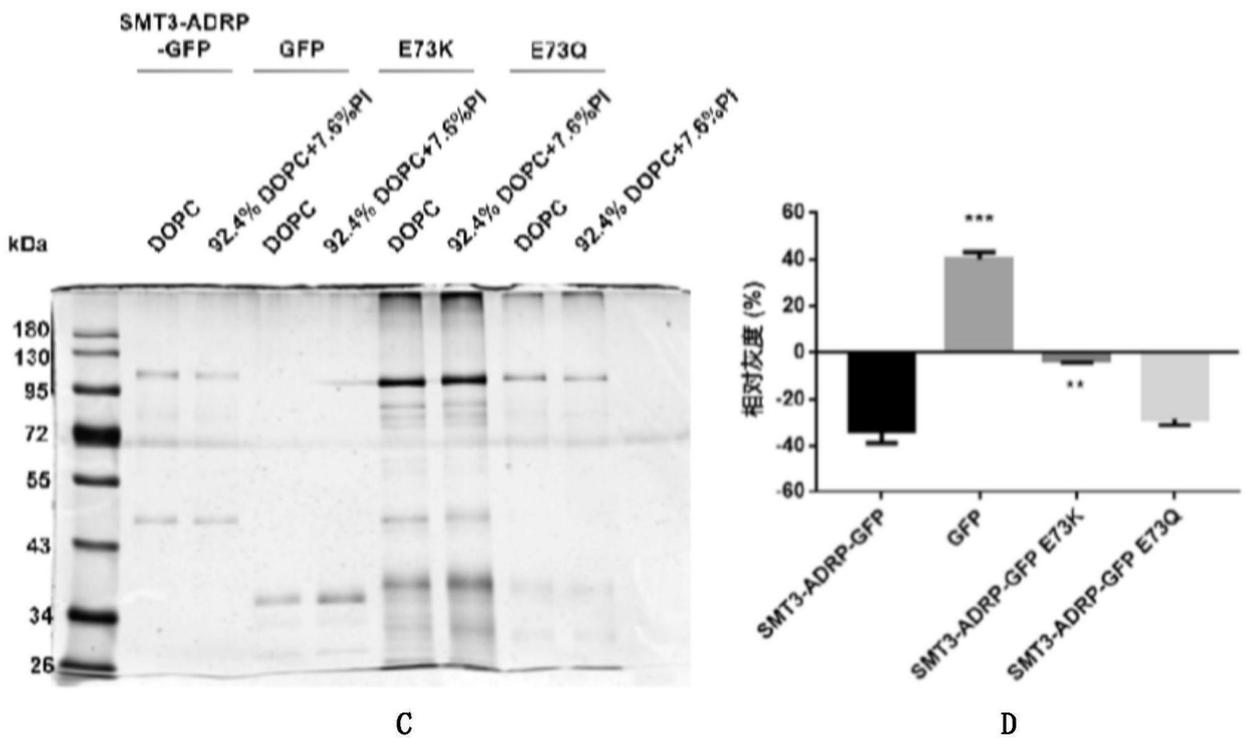
C

图5



A

B



C

D

图6

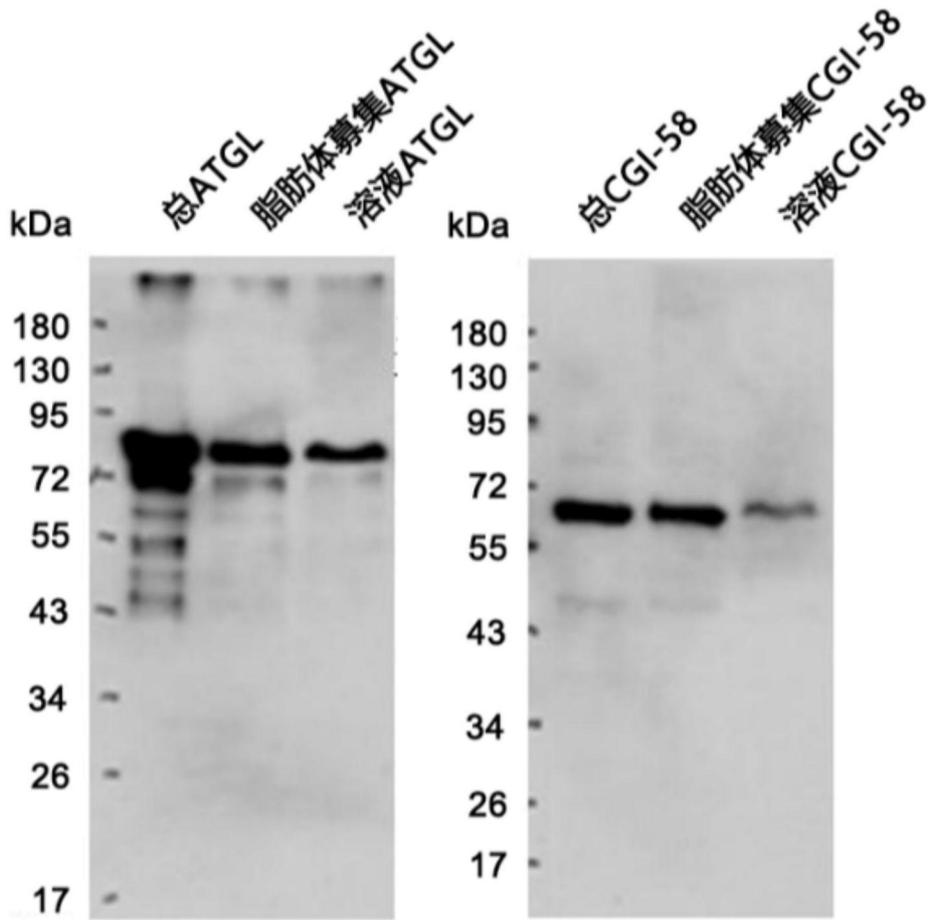


图7

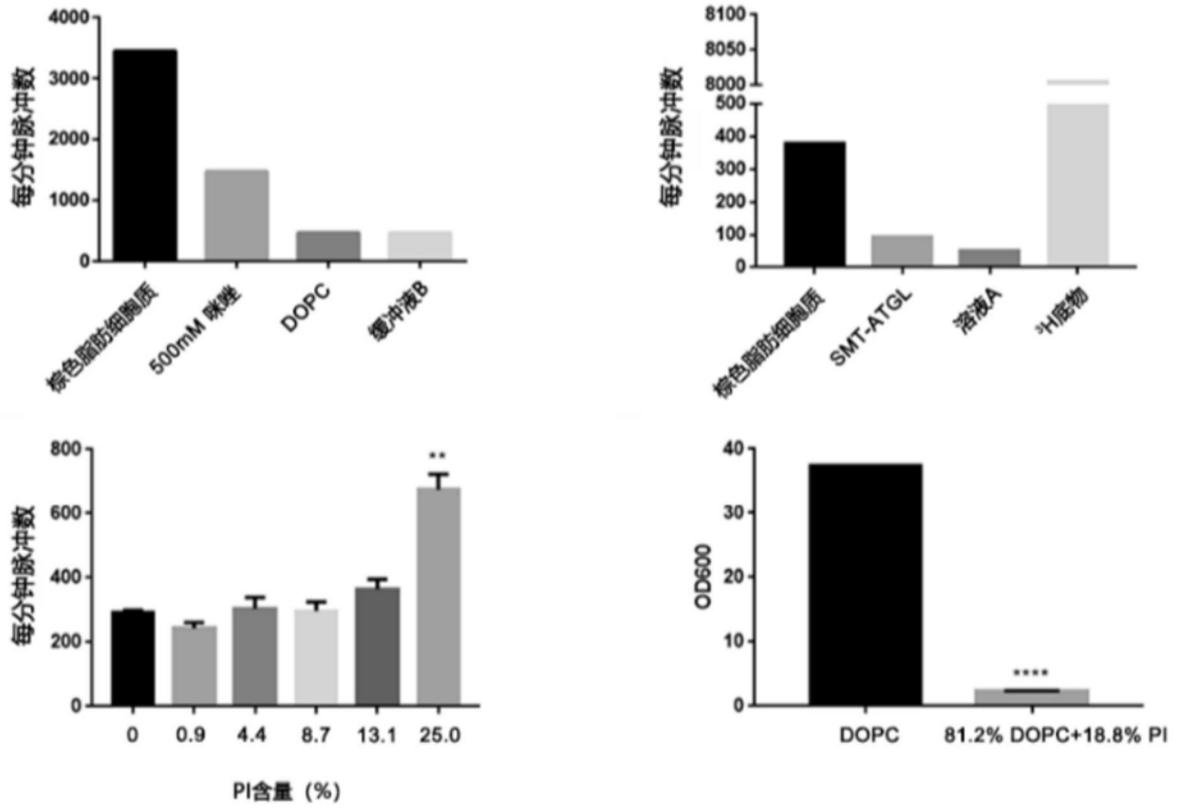
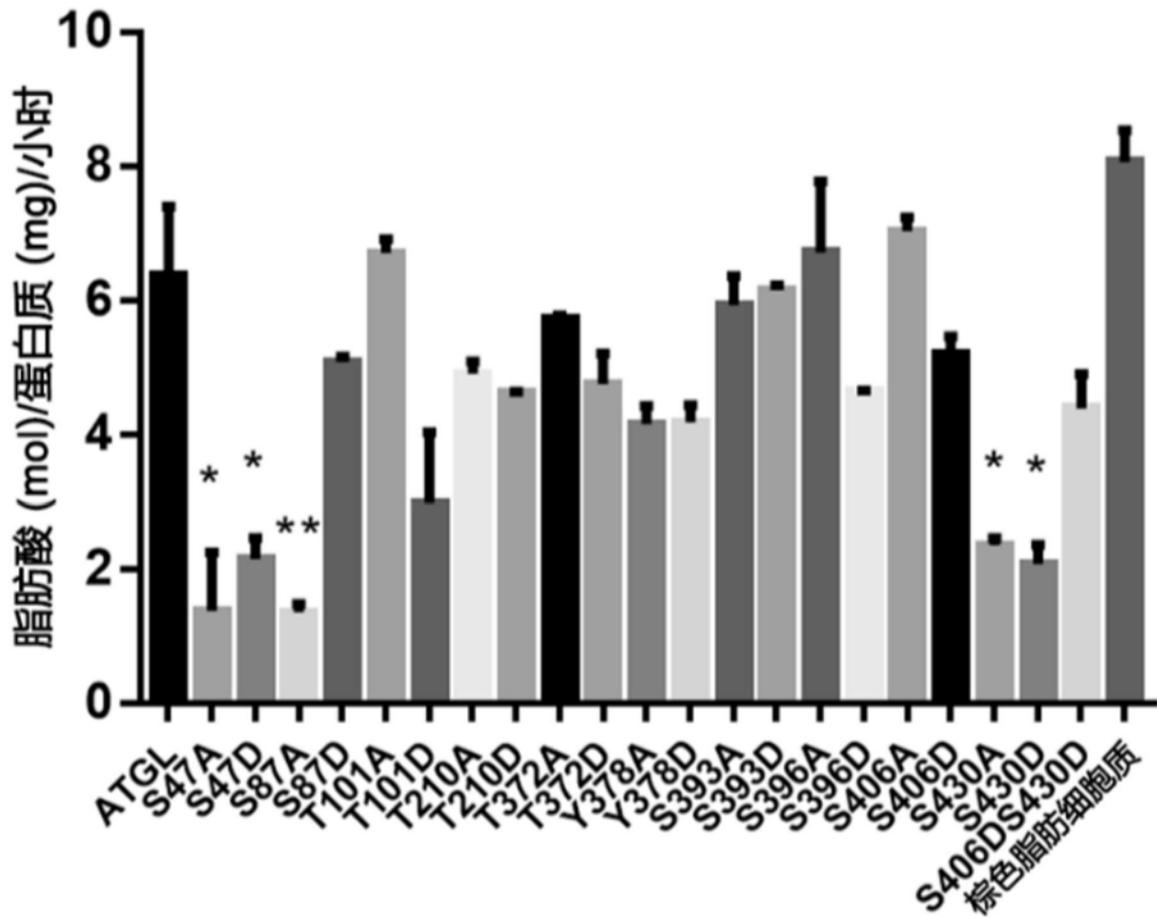
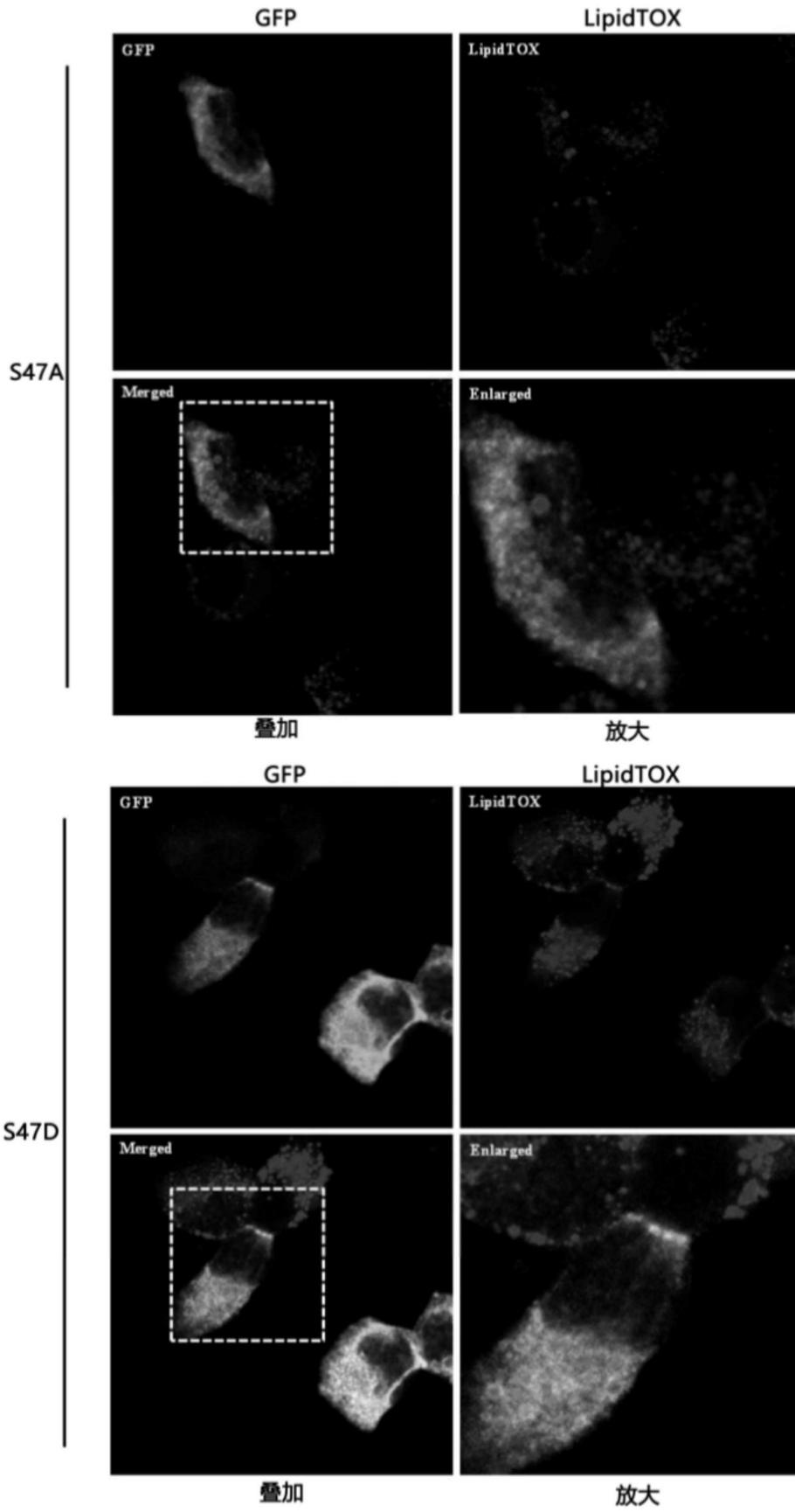
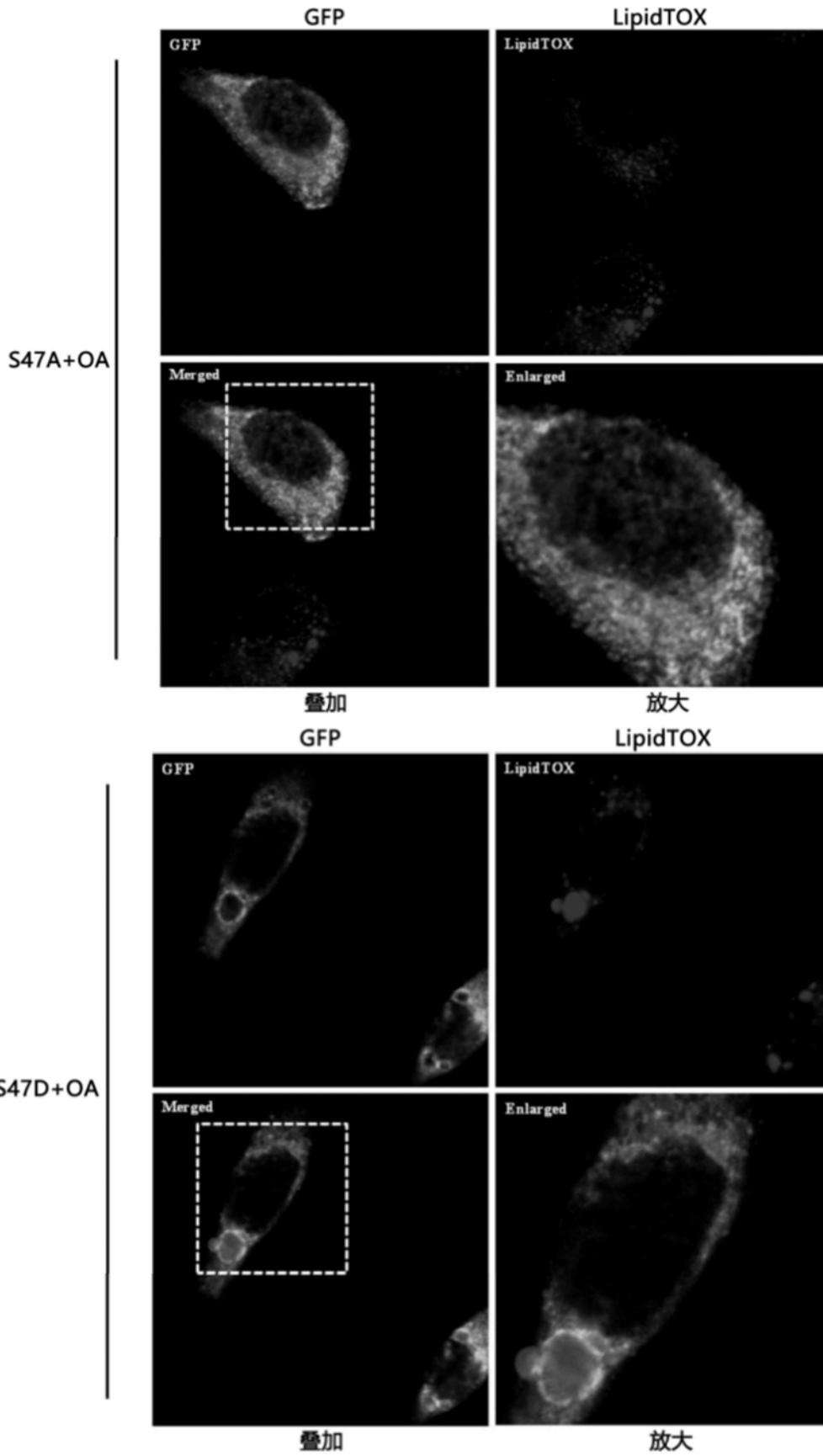


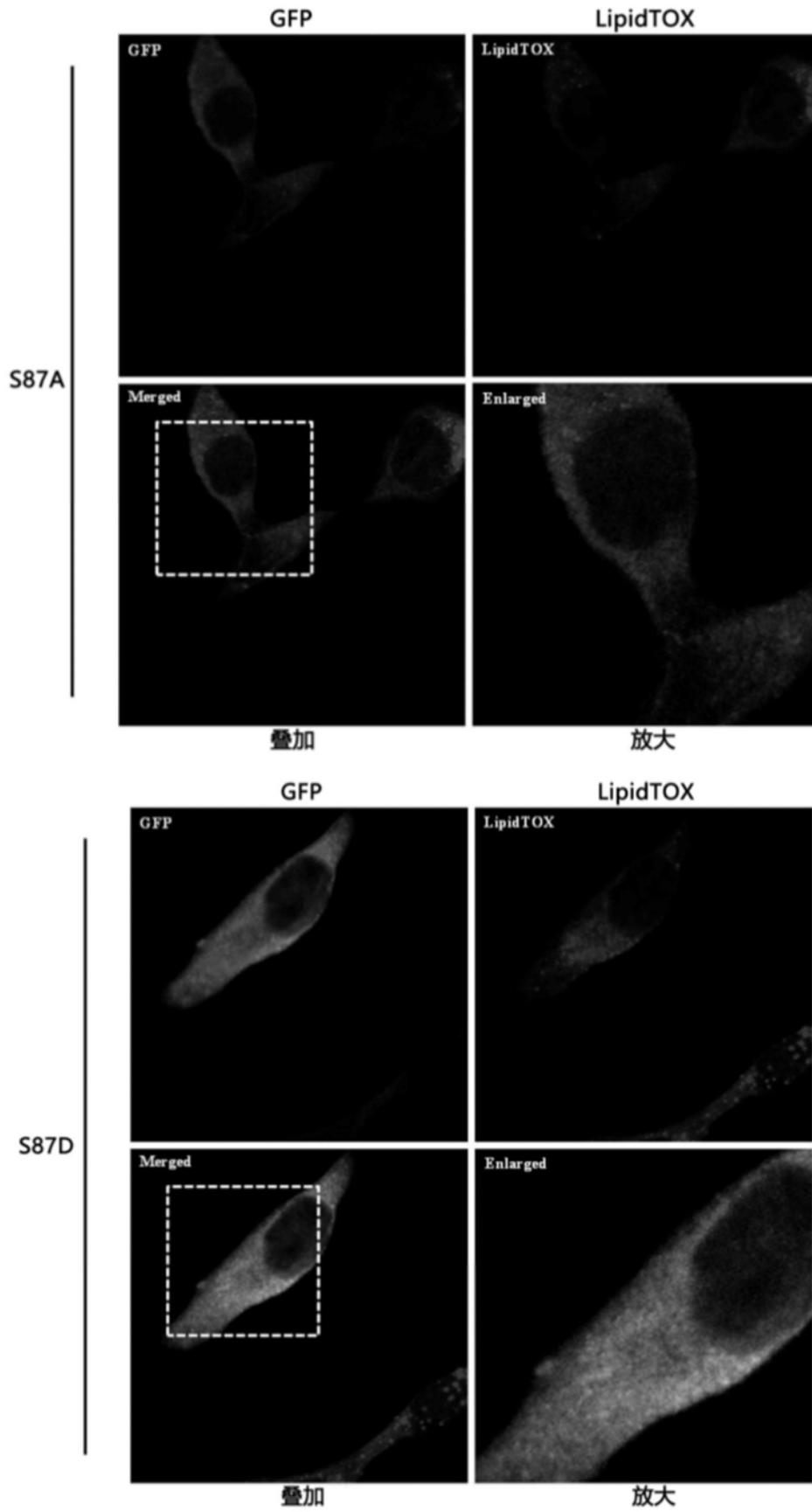
图8

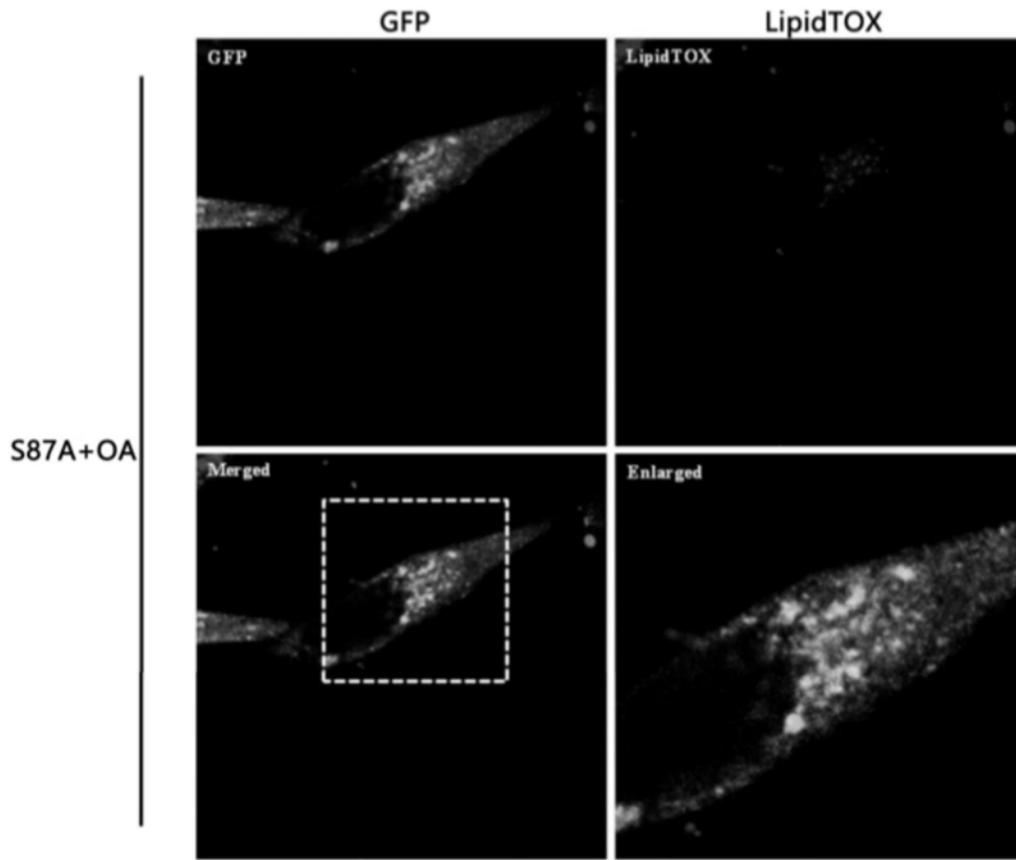


A



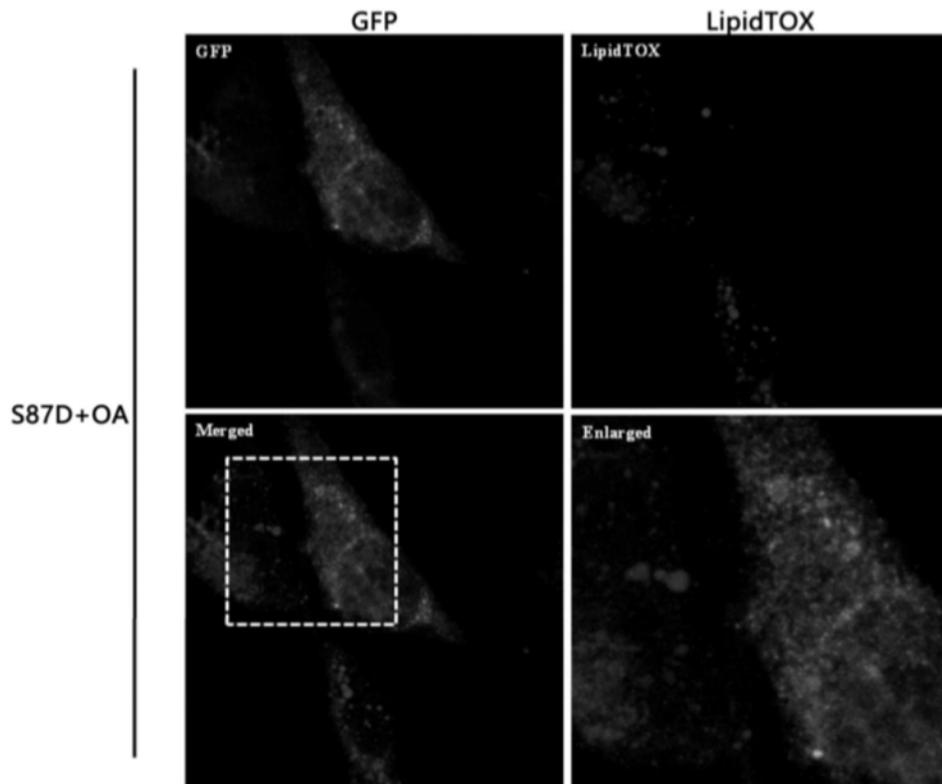






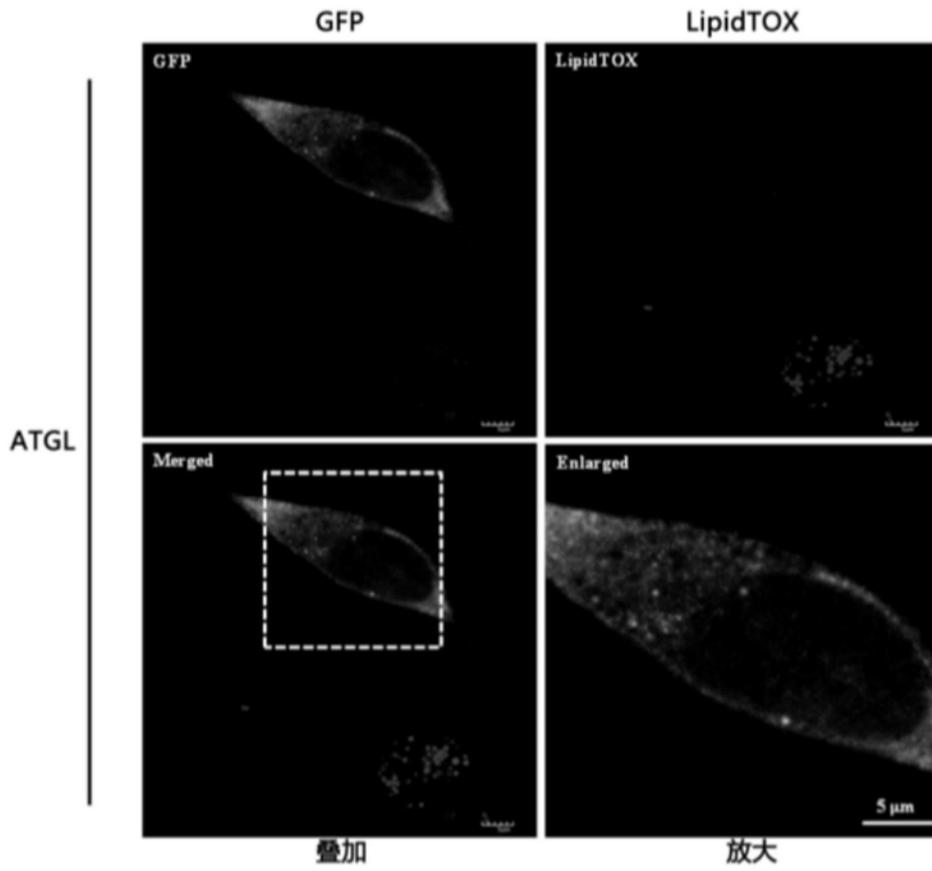
叠加

放大



叠加

放大



B

图9

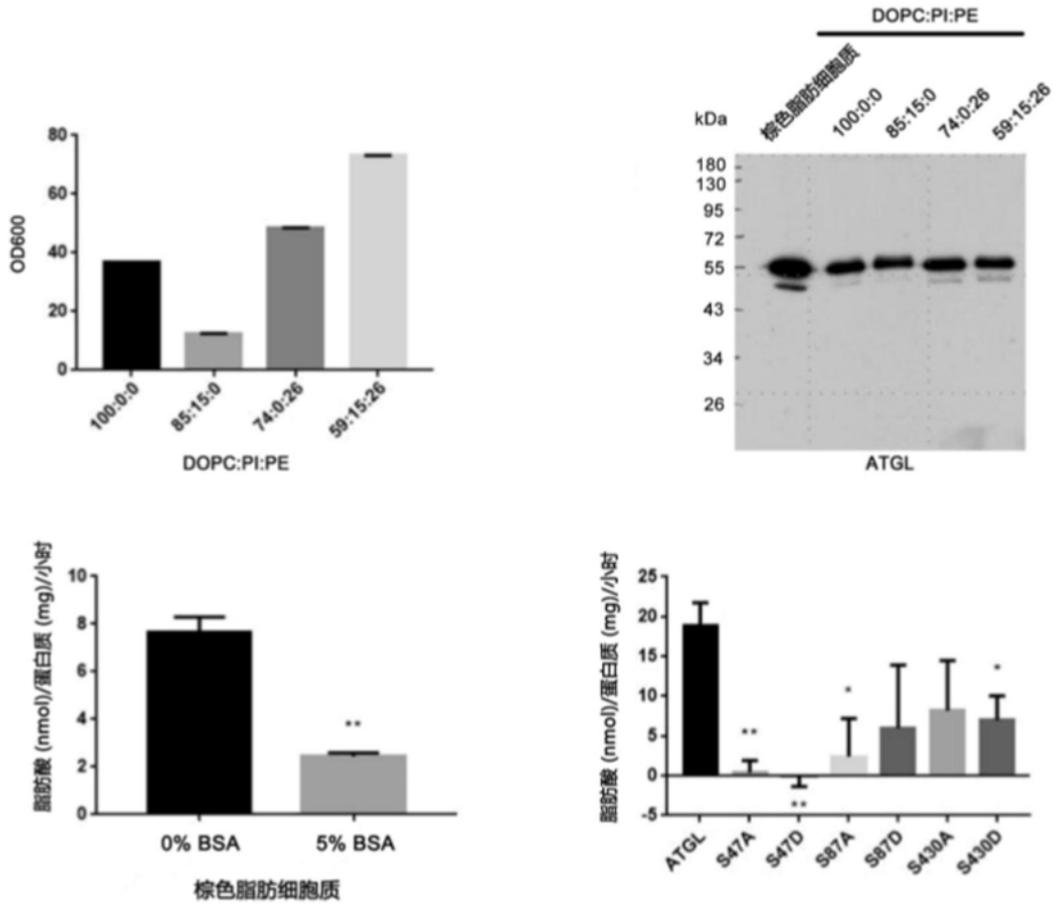
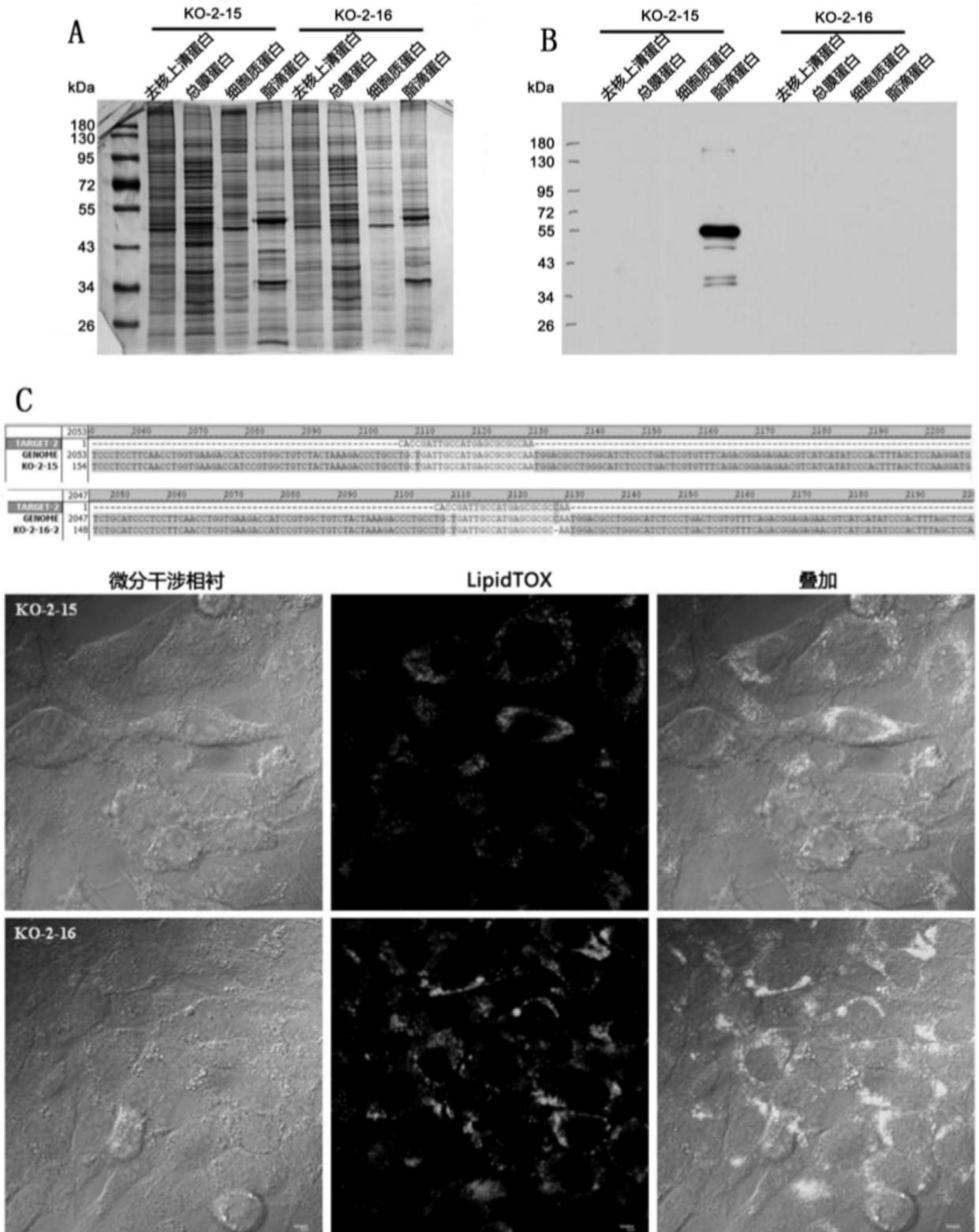


图10



D

图11