



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102901825 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201110217089. 3

(22) 申请日 2011. 07. 29

(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 赫荣乔 韩婵帅 强敏 许亚杰

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/52(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

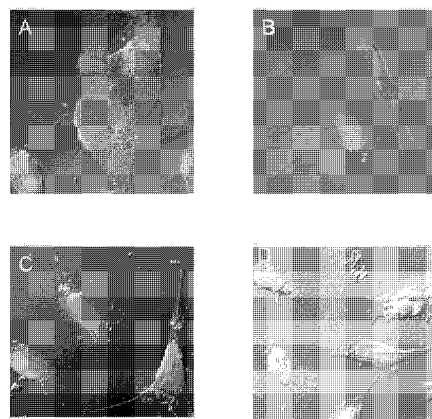
权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 9 页

(54) 发明名称

丙二醛修饰蛋白质作为错误折叠蛋白质荧光探剂的应用

(57) 摘要

本发明涉及丙二醛修饰蛋白质作为错误折叠蛋白质(肽)荧光探剂的应用。本发明提供丙二醛用于荧光检测错误折叠蛋白质(肽)的用途和荧光检测蛋白质的方法,在本发明的方法中,使蛋白质与丙二醛反应,生成丙二醛蛋白荧光衍生物,产生特征荧光;在激发波长 380-420nm;发射波长 420-600nm 处进行荧光检测。本发明的方法可以在活细胞内外研究蛋白质折叠、错误折叠以及蛋白质代谢动力学过程;被标记蛋白质在细胞内外的分布;被标记蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸、蛋白质与细胞器之间的相互作用及其导致细胞功能障碍的分子机制,同时也可以为细胞内蛋白质的错误折叠动力学研究提供可视的技术手段。



1. 丙二醛用于荧光检测错误折叠蛋白质（肽）的用途。
2. 根据权利要求 1 所述的丙二醛用于荧光检测错误折叠蛋白质（肽）的用途，其中包括丙二醛作为蛋白质构象变化的荧光探针，蛋白质错误折叠的荧光探针，被修饰蛋白质在细胞外、细胞膜和细胞内的荧光标记，蛋白质在活细胞内分布与代谢动力学的荧光探针的用途。
3. 一种荧光检测错误折叠蛋白质（肽）的方法，其中，使所述蛋白质与丙二醛接触。
4. 根据权利要求 2 所述的方法，其中，在激发波长 380-420nm，优选为 400nm；发射波长 420-600nm，优选为 460nm 处进行荧光检测。
5. 根据权利要求 3 或 4 的方法，其中在活细胞内外检测蛋白质折叠、错误折叠以及蛋白质代谢动力学过程。
6. 根据权利要求 3-5 中任意一项所述的方法，其中检测被标记蛋白质在细胞内外的分布。
7. 根据权利要求 3-6 中任意一项所述的方法，其中检测被标记蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸、蛋白质与细胞器之间的相互作用。
8. 根据权利要求 3-7 中任意一项所述的方法，其中检测细胞内蛋白质的错误折叠动力学。
9. 根据权利要求 3-8 中任意一项所述的方法，其中所述方法与绿色和 / 或红色荧光检测方法联合应用。
10. 根据权利要求 3-9 中任意一项所述的方法，其中所述丙二醛的浓度为 12mM，优选地，与所述蛋白质接触 60-96 小时后进行检测。

丙二醛修饰蛋白质作为错误折叠蛋白质荧光探剂的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质或肽的检测领域。具体而言,本发明涉及使用丙二醛对错误折叠蛋白质或肽进行荧光检测。

背景技术

[0002] 蛋白质是生命功能分子,参与生命活动的方方面面。不同功能的蛋白质具有不同的结构,具有完整一级结构的多肽或蛋白质,只有当其折叠形成正确的三维空间结构才可能具有正常的生物学功能。在某些物理、化学、生物等因素的作用下,蛋白质发生空间构象改变,引起蛋白质分子错误折叠并形成淀粉样沉积。一旦蛋白质形成了错误的空间结构,将丧失其生物学功能,还会引起细胞代谢障碍,甚至疾病的发生。迄今已发现 20 多种蛋白质的错误折叠与疾病相关。神经退行性疾病与蛋白质的错误折叠和沉积有关 (Taylor 等,2002),如阿尔茨海默病 (AD),帕金森病 (PD),亨廷顿舞蹈病,朊蛋白病,家族性肌萎缩侧索硬化症 (ALS) 等。蛋白质的错误折叠可以发生在细胞内或分布在细胞表面,如 Tau、 α -synuclein 等分布在神经细胞内 (以包涵体形式存在的蛋白质错误折叠聚积物) (Kopito,2000),而 amyloid β ($A\beta$) 分布在神经元和胶质细胞表面 (细胞外的淀粉样蛋白质聚积物) (Takahashi 等,2002)。这是许多哺乳类动物中枢神经系统机能退行性改变的共同病理特征。因此,探索和阐明神经系统某些特定蛋白质的错误折叠,特别在细胞内的错误折叠以及错误折叠产物导致神经细胞死亡的机制,对神经退行性疾病的药物设计以及防治具有重大的科学意义。

[0003] 无论在细胞外还是在细胞内沉积的错误折叠蛋白质聚积物都可能引起细胞代谢障碍,甚至细胞死亡。针对诱导蛋白质错误折叠的有关危险因素和相关疾病发病诱因已经有了大量的研究,如氧化应激、自由基、重金属、脂代谢紊乱、自吞噬系统功能失调以及蛋白质的异常化学修饰等等。因为蛋白质错误折叠的重要生理、病理意义,人们越来越重视对蛋白质错误折叠的研究,并取得了许多重要的进展。在对蛋白质错误折叠发生机制的研究中,生物物理学技术以及计算生物学的应用使得科研人员能够系统地分析外界条件改变对蛋白质折叠作用的影响。同时,通过对蛋白质错误折叠动物模型 (如过表达 $A\beta$ 蛋白的 AD 果蝇模型) 的研究 (Iijima 等,2008),科研人员能够从个体水平观察到蛋白质错误折叠后一系列的生理病理效应。但是,由于缺少对于错误折叠蛋白的有效标记物,仍有许多问题无法得到解决,如细胞如何对错误折叠的蛋白质进行应答,错误折叠蛋白质如何引起细胞凋亡的机制,组织中错误折叠的蛋白如何引发一系列病理效应等等。要解决蛋白质错误折叠领域这些至关重要的问题,需要一种能够标记错误折叠蛋白的技术手段,即制备一种有效的荧光探剂,能够特异标记蛋白质的错误折叠,通过荧光显微镜直接观察错误折叠蛋白质与细胞的相互作用以及在活细胞内的动态过程,从而对错误折叠蛋白在细胞和组织水平进行观察和研究。

[0004] 目前,在研究细胞内蛋白质折叠与动态运输所采用的标记物可以分为几类:(1) 采用荧光蛋白直接融合标记蛋白质 (Chudakov 等,2010),观察被标记的蛋白质在细胞的定

位(2008年获得诺贝尔化学奖)。然而,这种标记方法在原有蛋白上融合了一个分子量相对较大的蛋白,在研究蛋白质错误折叠时难以排除融合蛋白对原有蛋白结构的影响。(2) 采用得较多的是免疫荧光标记,通过单克隆抗体对细胞内的蛋白质进行标记,进行蛋白质在胞质或胞核内定位(Dinamarca等,2008)。免疫荧光标记所面临的问题是在抗体结合了目的蛋白质前,必须对细胞进行固定,因此这种方法无法用于蛋白质在活细胞内的动态观察。(3) 目前最常见用于错误折叠蛋白质荧光标记物是一类小分子有机染料1,8-ANS(1-Anil inonaphthalene-8-Sulfonic Acid,与蛋白质分子间的疏水核结合,Pastukhov等,2003)、ThT(Thioflavin T,与淀粉样蛋白结合,Hudson等,2009)、ThS(Thioflavin S,与细胞内淀粉样蛋白结合,Guntern等,1992)、Rhodamine B(直接标记蛋白质,Kubin等,1982)等等。但是,这些荧光标记物不属于天然生命体内存在的具有诱导蛋白质聚积作用的化合物,用于活细胞的观察也较为困难。

[0005] 越来越多的研究证实自由基介导的氧化损伤与老龄化相关疾病的发病机理相关。自由基介导的脂类、蛋白质、核酸的氧化已成为了公认的老龄化的生物学标记(Emerit等,2004)。丙二醛(MDA)是一种重要的脂类过氧化产物,经常作为脂类过氧化水平的衡量指标,不仅如此,氨基酸、糖类化合物、脱氧核糖核酸的过氧化反应也会产生丙二醛。丙二醛具有较强的亲电子性,能够与蛋白质、核酸、氨磷脂等生命活动重要分子上的亲核基团发生反应,因此在病理学以及生理学上有着重要的作用。近来,有研究发现机体内丙二醛的含量与多种神经退行性疾病的临床症状有关(Negre-Salvayre等,2008)。有证据表明,当神经系统发生氧化应激时,丙二醛的产生增加,在AD患者的皮层和海马区,PD患者的黑质和脑脊液中,以及ALS患者的脑脊液和外周循环系统的血浆中,丙二醛的含量升高(Dib等,2002)。丙二醛具有活泼的化学性质,能够迅速与蛋白质的赖氨酸侧链氨基(Uchida,2000)、精氨酸侧链胍基(Foettinger等,2006)反应,修饰蛋白质,导致蛋白质发生错误折叠并形成聚集。丙二醛可与赖氨酸反应生成具有荧光性质的产物二氢吡啶-赖氨酸和pridium dihydropyridine,与精氨酸反应生成2-pyrimidinylarginine(Uchida,2000)。

[0006] 因此,需要寻找一种新的荧光标记物来标记错误蛋白质。这种新的荧光标记物需具有这些特性:自然存在于人体内;能够在一定剂量下与蛋白质进行化学反应并诱导其错误折叠分子聚集,并且该荧光标记物与蛋白质错误折叠所导致的疾病相关。

发明内容

[0007] 本发明首次发现,丙二醛与蛋白质反应生成的丙二醛-蛋白荧光衍生物(malondialdehyde protein/peptide fluorescent derivatives),具有较强的荧光产率,在特定波长激发光激发下,发射出可见的青色荧光,并能够在光学显微镜直接观察到错误折叠的蛋白颗粒,而这些在可见光波长范围内的荧光点,可以在细胞环境、细胞膜以及细胞内观察到。因此,该荧光可以用于观察被修饰蛋白质分子位于活细胞膜上,进入细胞的过程以及在细胞内的分布情况。该荧光与传统的绿色荧光和红色荧光在波长范围上有较大差别,能够在显微镜视野下相互区别。因此,该荧光探剂具有较宽的应用范围,可用于被修饰蛋白质的体内外标记,特别是错误折叠蛋白质的标记。

[0008] 本发明发现,丙二醛在溶液中与蛋白质进行反应,生成丙二醛蛋白荧光衍生物,产生特征荧光(激发波长范围:380-420nm;发射波长范围:420-600nm),该荧光能够作为蛋白

质的荧光标记以及错误折叠蛋白质的荧光标记探针；用于蛋白质构象变化的荧光探针，蛋白质错误折叠的荧光探针，被修饰蛋白质在细胞外、细胞膜和细胞内的荧光标记，以及蛋白质在活细胞内分布与代谢动力学的荧光探针，使得在细胞膜内外的蛋白质以及错误折叠蛋白质在显微镜下能够得以显示和观察。本发明适用于蛋白质分子、细胞、组织水平上的应用。

[0009] 因此，本发明一方面提供丙二醛用于荧光检测错误折叠蛋白质的用途。在本发明中，蛋白质广义地使用，包括含有两个氨基酸残基以上的多肽、蛋白质等。

[0010] 在本发明的用途中，丙二醛可以作为错误折叠蛋白质的荧光标记探针，蛋白质构象变化的荧光探针，蛋白质错误折叠的荧光探针，被修饰蛋白质在细胞外、细胞膜和细胞内的荧光标记，错误折叠蛋白质在活细胞内分布与代谢动力学的荧光探针等使用。

[0011] 本发明另一方面提供一种荧光检测错误折叠蛋白质的方法，其中，使所述蛋白质与丙二醛接触。

[0012] 在本发明的一个实施方案中，蛋白质与丙二醛在溶液中接触进行反应后，在激发波长 380–420nm；发射波长 420–600nm 处进行荧光检测。

[0013] 在一个优选实施方案中，检测在 400nm 激发光激发下的荧光强度。

[0014] 在一个优选实施方案中，检测在 460nm 处产生的发射光的荧光强度。

[0015] 在一个优选实施方案中，检测丙二醛与蛋白质生成的丙二醛蛋白荧光衍生物在波长为 400nm 激发光激发下在 460nm 处产生的发射光的荧光强度。

[0016] 在本发明的一个实施方案中，在活细胞内外检测蛋白质折叠、错误折叠以及蛋白质代谢动力学过程。

[0017] 在本发明的一个实施方案中，检测被标记蛋白质在细胞内外的分布。

[0018] 在本发明的一个实施方案中，检测被标记蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸、蛋白质与细胞器之间的相互作用。

[0019] 在本发明的一个实施方案中，检测细胞内蛋白质的错误折叠动力学。

[0020] 在本发明的一个实施方案中，本发明的方法可以与绿色和 / 或红色荧光检测方法联合应用。

[0021] 在本发明的一个实施方案中，所用的丙二醛的浓度为 12mM，优选地，与所述蛋白质接触 60–96 小时后进行检测。

[0022] 本发明的方法可以在活细胞内外研究蛋白质折叠、错误折叠以及蛋白质代谢动力学过程；被标记蛋白质在细胞内外的分布；被标记蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸、蛋白质与细胞器之间的相互作用及其导致细胞功能障碍的分子机制，同时也可以为细胞内蛋白质的错误折叠动力学研究提供可视的技术手段。

附图说明

[0023] 图 1：丙二醛修饰后牛血清白蛋白 SDS-PAGE 电泳结果：A 为不同浓度丙二醛修饰牛血清白蛋白电泳结果，B 为 12mM 丙二醛修饰牛血清白蛋白不同时间电泳结果。

[0024] 图 2：牛血清白蛋白经过不同时间的丙二醛修饰生成的衍生物核黄素 T 染色后荧光检测结果。

[0025] 图 3：透射电子显微镜观察牛血清白蛋白经丙二醛修饰后生成的衍生物聚集形

态 :A 为牛血清白蛋白对照, B 为牛血清白蛋白与丙二醛反应后衍生物。

[0026] 图 4 : 荧光分光光度计 3D 扫描检测牛血清白蛋白经丙二醛修饰后产生的新荧光峰 :A 为牛血清白蛋白对照, B 为丙二醛修饰后的牛血清白蛋白。

[0027] 图 5 : 丙二醛与牛血清白蛋白反应衍生物的荧光峰激发波长与发射波长的确定。

[0028] 图 6 : 丙二醛与牛血清白蛋白反应衍生物荧光强度测定 :A 为不同浓度丙二醛与牛血清白蛋白反应后衍生物的荧光强度测定, B 为丙二醛与牛血清白蛋白反应不同时间后生成衍生物的荧光强度测定。

[0029] 图 7 : 激光共聚焦显微镜观察丙二醛与牛血清白蛋白反应荧光衍生物进入 BV-2 细胞。

[0030] 图 8 : 15% SDS-PAGE 检测提取突触核蛋白的纯度。

[0031] 图 9 : 丙二醛修饰后突触核蛋白的蛋白质免疫印迹试验结果, A 为 0-12h 被修饰突触核蛋白, B 为 16-168h 被修饰突触核蛋白。

[0032] 图 10 : 荧光分光光度计检测丙二醛修饰突触核蛋白的荧光强度随时间变化。A 为丙二醛修饰突触核蛋白, B 为突触核蛋白, C 为磷酸盐缓冲液, D 为丙二醛, E 为前述 4 组在发射波长 600nm 处的荧光值随时间变化的统计结果。

[0033] 图 11 : 激光共聚焦显微镜观察带有自发荧光标记的丙二醛修饰突触核蛋白在活细胞中的存在。丙二醛修饰的突触核蛋白处理 BV-2 或 SH-SY5Y 细胞 24h 后, 在激光共聚焦显微镜下进行活细胞成像观察。A 为丙二醛修饰的突触核蛋白作用于 BV-2 细胞 ;B 为对照突触核蛋白作用于 BV-2 细胞 ;C 为丙二醛修饰的突触核蛋白作用于 SH-SY5Y 细胞 ;D 为对照突触核蛋白作用于 SH-SY5Y 细胞。

[0034] 图 12 : 丙二醛修饰的突触核蛋白进入细胞后免疫荧光定位实验。丙二醛修饰的突触核蛋白处理 BV-2 或 SH-SY5Y 细胞 24h 后, 经免疫细胞化学方法处理观察。A 为丙二醛修饰的突触核蛋白作用于 BV-2 细胞 ;B 为对照突触核蛋白作用于 BV-2 细胞 ;C 为丙二醛修饰的突触核蛋白作用于 SH-SY5Y 细胞 ;D 为对照突触核蛋白作用于 SH-SY5Y 细胞。蓝色荧光为丙二醛修饰的突触核蛋白, 绿色荧光为 FITC 标记的突触核蛋白, 红色为细胞核染料碘化丙啶。

[0035] 图 13 : 丙二醛修饰的突触核蛋白进入细胞后细胞器定位实验。丙二醛修饰的突触核蛋白作用于 BV-2 细胞 24h 后, 用活细胞内溶酶体的荧光探针标记后在激光共聚焦显微镜下观察。B 为红色荧光通道成像, 显示溶酶体探针的荧光 ;C 为青色荧光通道成像, 显示丙二醛修饰的突触核蛋白的荧光 ;D 为 BV-2 细胞的明场成像 ;A 为 B、C 和 D 通道成像的合并图。

[0036] 表 1 : 丙二醛修饰牛血清白蛋白的荧光量子产率。

[0037] 表 2 : 丙二醛的荧光量子产率。

具体实施方式

[0038] 实施例 :

[0039] 实施例 1 : 丙二醛的制备

[0040] 实验方法与结果 (请提供主要实验材料的来源)

[0041] 1. 利用酸水解 1,1,3,3- 四甲氧基丙烷 (TMP) 法配置 200mM 的 MDA 母液。主要过程 : 0.135ml 的 TMP (购自美国 Sigma 公司) 与 1.0M 的 HCl 0.6ml 混合后, 40℃ 水浴中震荡

水解 2.5 分钟。TMP 完全水解后用 6.0M 的 NaOH 调节 pH 值至 7.2-7.4, 最后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 定容到 4ml。

[0042] 2. 通过测定 267nm 的紫外吸收值, 证明所制备的丙二醛浓度为 200mM。

[0043] 实施例 2: 丙二醛修饰牛血清白蛋白及 SDS-PAGE 实验

[0044] 实验方法与结果

[0045] 1. 将终浓度为 3mg/ml 的牛血清白蛋白 (购自美国 Ameresco 公司) 在 50mM PBS (pH 7.4, 37°C) 中与不同浓度的丙二醛保温, 或与 12mM 的丙二醛保温不同时间, 取样观察反应后牛血清白蛋白的结构与生物学和动力学性质。

[0046] 2. 取与不同浓度丙二醛保温 24h 后的牛血清白蛋白样品和与 12mM 的丙二醛保温不同时间后的牛血清白蛋白样品, 加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 5min, 离心后, 进行 10% SDS-PAGE, 最后以考马斯亮蓝染色。

[0047] 3. SDS-PAGE 电泳结果见图 1。结果显示丙二醛修饰后的牛血清白蛋白能够生成较大分子量条带。随着丙二醛浓度的升高 (如图 1A) 或者修饰时间的延长 (如图 1B), 新生成的大分子蛋白逐渐增多。

[0048] 实施例 3: 硫磺素 T 染色法检测修饰后牛血清白蛋白产生的淀粉样聚集

[0049] 实验方法与结果

[0050] 1. 将硫磺素 T (购自美国 sigma 公司) 粉末溶解在 pH 7.0 的 PBS 中, 0.22 μm 孔径滤膜过滤后, 配制成 1mM 硫磺素 T 母液。取与 12mM 丙二醛保温不同时间的牛血清白蛋白样品, 加入硫磺素 T 母液染色 (硫磺素 T 终浓度为 5 μM)。用荧光分光光度计 F-4500 (Hitachi, Japan) 在波长为 440nm 的光进行激发, 检测其在波长 484nm 处的发射光强度。

[0051] 2. 检测结果见图 2。结果显示, 经过丙二醛修饰后的牛血清白蛋白能够被核黄素 T 结合并产生特异荧光, 同时发现随着反应时间的延长, 荧光强度逐渐增强, 并在 48h 后达到平台期。说明丙二醛的修饰能够导致牛血清白蛋白 β 折叠增加, 并形成淀粉样聚集。

[0052] 实施例 4: 透射电子显微镜观察丙二醛修饰后牛血清白蛋白聚集形态

[0053] 实验方法与结果

[0054] 1. 取 12mM 丙二醛修饰五天后的牛血清白蛋白样品 5 μl, 用二次蒸馏水 5 倍稀释后, 点样 10 μl 于镀膜的铜网上, 10min 后用滤纸吸干, 再滴加 10 μl 双氧铀 (20g/L) 溶液染色, 3min 后吸干, 在透射电子显微镜下观察并拍照。

[0055] 2. 拍照结果见图 3。通过透射电子显微镜可以看到, 牛血清白蛋白经过丙二醛修饰五天后, 形成无规则状聚集体。

[0056] 实施例 5: 丙二醛修饰后牛血清白蛋白的新荧光生成

[0057] 实验方法与结果

[0058] 1. 荧光分光光度计 3D 扫描法检测新的荧光峰的产生

[0059] (1) 取 12mM 丙二醛修饰四天后的牛血清白蛋白样品, 4 倍稀释后, 用荧光分光光度计对其进行 3D 扫描。

[0060] (2) 扫描结果如图 4 所示, 与未经过修饰的牛血清白蛋白比较, 经过丙二醛修饰的牛血清白蛋白出现了明显的新的荧光峰。

[0061] 2. 新生成荧光峰激发波长与发射波长的确定

[0062] (1) 取 12mM 丙二醛修饰四天后的牛血清白蛋白样品, 4 倍稀释后, 用不同波长激发

光对其进行激发,记录 400nm 到 700nm 波长范围内的发射光谱。

[0063] (2) 结果如图 5 所示,可以发现当激发光在 380nm 到 420nm 波长范围内,都能够在 460nm 波长附近形成峰值较高的发射峰,当激发光波长等于 400nm 时,其发射光谱在 460nm 处的峰值最大。

[0064] 3. 丙二醛浓度以及修饰时间对新生成荧光强度的影响

[0065] (1) 取与 12mM 的丙二醛共同保温不同时间后的牛血清白蛋白样品和与不同浓度丙二醛保温 60 小时后的牛血清白蛋白样品,4 倍稀释后,测定其在波长为 400nm 激发光激发下在 460nm 处产生的发射光的荧光强度。

[0066] (2) 检测结果如图 6 所示,可以发现随着丙二醛与牛血清白蛋白反应时间的增长(图 6A),随着丙二醛浓度的增大(图 6B),荧光强度逐渐增加,并在 96h 达到平台期。

[0067] 实施例 6:修饰后牛血清白蛋白的量子产率

[0068] 实验方法与结果

[0069] 1. 荧光分光光度计 F-4500 的校准。以罗丹明 B(购自美国 Ameresco 公司)作为标准品分别校准仪器的激发和发射光谱。

[0070] 2. 罗丹明 B 在不同波长下荧光量子产率的测定。将罗丹明 B 配置成浓度为 0.25 μ g/ml 的溶液,分别测定激发波长为 380nm,390nm,400nm,410nm,420nm,490nm 和 495nm 的荧光吸收和对应波长的吸光值。已知罗丹明 B 在激发光波长为 495nm 时的荧光量子产率为 1,按照以下公式 1,根据罗丹明 B 在其他波长的吸光度与积分荧光强度计算对应波长下的量子产率。

$$[0071] \quad Y_u = Y_s \cdot \frac{F_u}{F_s} \cdot \frac{A_s}{A_u} \quad (\text{公式 1})$$

[0072] 公式 1 中, Y 代表量子产率, F 代表积分荧光强度, A 代表吸光度, S 表示标准品, u 表示待测物质。

[0073] 3. 丙二醛修饰的牛血清白蛋白荧光量子产率测定。分别测定适当稀释的修饰后牛血清白蛋白在激发波长为 380nm,390nm,400nm,410nm,420nm,490nm 和 495nm 的荧光吸收和对应波长的吸光值。然后按照公式 1 计算其在不同激发波长时的荧光量子产率。同时测定 0.2 μ M 的丙二醛的量子产率作为对照。

[0074] 4. 量子产率的测定结果见表 1 及表 2。由此结果可以看出,丙二醛自身的荧光量子产率很小,而丙二醛修饰后的牛血清白蛋白在 380nm 至 420nm 激发波长范围内,其荧光量子产率接近 0.5,高于常用荧光染料罗丹明 B。

[0075] 表 1 丙二醛修饰牛血清白蛋白的荧光量子产率。

[0076]

EX/nm	罗丹明 B				MDA 修饰的 BSA		
	积分荧光强度 F*	吸光度 A	荧光量子产率 Y	Y/Y ₄₉₅	积分荧光强度 F**	吸光度 A	荧光量子产率 Y
380	2815.206	0.00199	0.35242	0.39597	29863.471	0.01667	0.44617
390	2980.172	0.002	0.3712	0.41708	35457.942	0.02063	0.42813
400	2901.872	0.002	0.36145	0.40612	39095.287	0.02086	0.4668
410	2779.384	0.002	0.34536	0.38805	34559.035	0.01734	0.49655
420	2401.608	0.00137	0.4367	0.49067	26936.436	0.01275	0.52638
490	21973.974	0.00597	0.91693	1.03026			
495	28545.403	0.00799	0.89	1			

[0077] 表 2 丙二醛的荧光量子产率。

[0078]

EX/nm	罗丹明 B				MDA		
	积分荧光强度 F*	吸光度	荧光量子产率	Y/Y ₄₉₅	积分荧光强度 F**	吸光度	荧光量子产率
350	72844.94	0.00402	0.40612	0.45626	3092.68	0.03235	0.00214
355	78984.53	0.00498	0.35542	0.3993	3548.3	0.03027	0.00263
360	72605.06	0.00402	0.40427	0.45418	1228.06	0.02615	0.00105
370	40945.96	0.00286	0.32082	0.36042	3895.435	0.01624	0.00537
380	28504.48	0.00199	0.32086	0.36047	2495.917	0.00686	0.00815

[0079]

390	30258.53	0.002	0.3389	0.38074	1364.453	0.00212	0.01444
490	237948.4	0.00597	0.89327	1.00355			
495	317452.5	0.00799	0.89	1			

[0080] 实施例 7 :共聚焦显微镜观察进入 BV-2 细胞的带有自发荧光标记的牛血清白蛋白

[0081] 实验方法与结果

[0082] 1. 细胞系即培养条件 :小鼠小胶质细胞系 BV-2 培养基为 DMEM 高糖培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, 购自美国 Invitrogen 公司), 同时加入 10% 的胎牛血清 (购自奥地利 PAA 公司) 和青霉素 - 链霉素溶液 (终浓度为 100units/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素, 购自美国 HyClone 公司)。培养条件为 CO₂ 培养箱, 37°C 培养。

[0083] 2. 将丙二醛修饰 3 天的牛血清白蛋白用 Millipore Amicon Ultra-15 离心超滤管进行超滤, 除去样品中的丙二醛。用 BCA 蛋白定量法检测超滤后的蛋白浓度。

[0084] 3. 将 BV-2 细胞接种多聚赖氨酸包被过的激光共聚焦显微镜专用培养皿培养 (购自美国 Corning 公司) 过夜。将超滤后的丙二醛修饰的牛血清白蛋白溶液用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌。用 DMEM 培养基稀释成浓度为 0.5mg/ml 的蛋白溶液, 用此蛋白溶液处理细胞 24h 后, 共聚焦显微镜选取波长为 405nm 激发光进行观察。

[0085] 4. 激光共聚焦显微镜活细胞拍照结果见图 7。由此结果可以看出, 丙二醛修饰的牛血清白蛋白可以进入 BV-2 细胞, 经激光共聚焦显微镜拍照看到胞内荧光颗粒的存在。

[0086] 实施例 8 :丙二醛修饰突触核蛋白

[0087] 实验方法与结果

[0088] 1. 突触核蛋白的提取与纯化实验

[0089] (1) 将大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) (质粒 DE3 含有人源突触核蛋白序列) 接种于 LB 固体培养基 (含 100mg/L 的氨苄青霉素) 中, 37°C 培养过夜。挑取单菌落接种于 10ml 的 LB 液体培养基 (含 100mg/L 的氨苄青霉素), 37°C 摇床中培养 6-7h。将培养物以 100 倍的稀释比例接种于 1000ml 的液体 LB 培养基中, 37°C 摇床中培养至菌液在分光光度计中检测时, 600nm 的吸光值处于 0.3-0.4 之间, 此时, 向培养基中加入 IPTG (终浓度为 100 μ M) 诱导蛋白表达, 5h 后停止培养。

[0090] (2) 将菌液 6500rpm, 4°C 离心 15min, 收集菌体。1L 培养物重悬于 100ml Osmotic shock 缓冲液 (30mM Tris-HCl, 40% 蔗糖, 2mMEDTA 二钠, pH 7.2), 室温放置 10min 后 12,000rpm 离心 20min。将沉淀用 90ml 冷水悬起后加入 37.5 μ l 饱和氯化镁, 冰上放置 3min 后 12,000rpm 离心 20min 后, 收集上清于沸水浴中 20min, 15,000rpm, 4°C 离心收集上清液。将上清液过 Q-Sepharose 离子交换柱, 用含 0-0.5mol/L NaCl 的 20mM Tris-HCl 缓冲液进行梯度洗脱, 收集被离子交换柱特异结合的突触核蛋白洗脱液。

[0091] (3) 将蛋白洗脱液取样, 通过 SDS-PAGE 电泳检测, 挑取纯蛋白的洗脱液收集, 经 NH₄HCO₃ (20mM, pH 8.2) 缓冲液透析 12h 后, 于冻干机中 -40°C 冻干。称取适量冻干的突触核蛋白, 溶于 PBS 中, 加入 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 10 分钟, 进行 15% SDS-PAGE, 最后

以考马斯亮蓝染色。SDS-PAGE 结果见图 8。结果显示提取的突触核蛋白为纯度高的蛋白。

[0092] 2. 丙二醛（终浓度为 12mM）与突触核蛋白（终浓度为 3mg/ml）于 37℃ 避光温育，分别于 0, 0.5, 1, 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 和 168h 取样。同等条件下设定突触核蛋白、丙二醛和 PBS 作为对照。

[0093] 3. 将上述丙二醛修饰的突触核蛋白取适量，加入同等体积的 2×SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 10 分钟，进行 15% SDS-PAGE 电泳蛋白质免疫印迹试验，突触核蛋白的小鼠单克隆抗体 Syn211 购自美国 Millipore 公司。

[0094] 4. 免疫印迹试验结果见图 9。结果显示丙二醛修饰可使突触核蛋白产生大分子量的聚集。在 0.5h 时，突触核蛋白已经形成二聚体和多聚体，在 0.5-72h 多聚体的量随着温育时间的延长而增加，72-168h 的大分子量的蛋白聚集逐渐减少，这是由于修饰产生更大分子量的聚集体无法进入胶孔导致的。

[0095] 实施例 9：丙二醛修饰突触核蛋白后生成新荧光

[0096] 实验方法与结果

[0097] 1. 取不同时间点丙二醛修饰的突触核蛋白 20 μl，用 PBS 稀释 50 倍后测定荧光值。荧光分光光度计的参数设置如下：激发光 (Ex)：400nm；发射光 (Em) 范围：410-700nm；扫描速度 (Scan speed)：1200nm/min；激发与发射光栅：0.5nm。同时测定突触核蛋白、PBS、丙二醛对照组所有时间点样品在同等条件下的荧光值。

[0098] 2. 统计三个平行的荧光值，取波长为 460nm 发射光强度进行统计，结果见图 10。结果显示丙二醛修饰后的突触核蛋白产生的荧光值随着修饰时间延长而增强。

[0099] 实施例 10：共聚焦显微镜观察进入 BV-2 细胞的带有自发荧光标记的突触核蛋白

[0100] 实验方法与结果

[0101] 1. 本实施例的实验方法同实施例 7。不同之处在于此实施例所选取的蛋白是突触核蛋白。

[0102] 2. 激光共聚焦显微镜活细胞拍照结果见图 11A。由此结果可以看出，丙二醛修饰的突触核蛋白可以进入 BV-2 细胞，经激光共聚焦显微镜拍照看到胞内荧光的存在。而同等条件下的对照突触核蛋白加入 BV-2 细胞后，激光共聚焦显微镜观察显示胞内无荧光。

[0103] 实施例 11：共聚焦显微镜下观察进入 SH-SY5Y 细胞的带有自发荧光标记的突触核蛋白

[0104] 实验方法与结果

[0105] 1. 实验方法基本同上例，SH-SY5Y 细胞的培养方法同 BV-2 细胞的培养方法除 SH-SY5Y 细胞接种于激光共聚焦显微镜专用玻底培养皿时不用预先包被；SH-SY5Y 细胞培养液中加入蛋白的浓度与培养时间同 BV-2 细胞；激光共聚焦显微镜的拍照方法同 BV-2 细胞。

[0106] 2. 激光共聚焦显微镜活细胞拍照结果见图 11B。由此结果可以看出，丙二醛修饰的突触核蛋白可以进入 SH-SY5Y 细胞并被检测到荧光，而对照组的蛋白则不能。

[0107] 实施例 12：丙二醛修饰的突触核蛋白进入细胞后免疫荧光定位实验

[0108] 实验方法与结果

[0109] 1. 将 BV-2 细胞或 SH-SY5Y 细胞接种于 24 孔培养板中的无菌小玻片上 (BV-2 细胞接种前小玻片需预先用多聚赖氨酸包被处理)，接种密度为 10,000 个 /ml 培养基，培养过

夜。

[0110] 2. 丙二醛修饰的突触核蛋白经同实施例超滤、蛋白定量与过滤除菌处理后,用 DMEM 培养基稀释为 0.5mg/ml 的蛋白溶液,24 孔培养板每孔加入 500 μ l,于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 的培养箱中培养 24h 后进行免疫细胞化学实验。

[0111] 3. 免疫细胞化学方法依次如下:

[0112] (1) 固定。用 PBS(pH 7.4)洗去 24 孔培养板小玻片上残留的培养基。用 4%多聚甲醛固定 10min 后用 PBS 洗 3 次,每次 5min。

[0113] (2) 透膜。向每个孔中加入 0.1% Triton X-100(PBST),在冰上处理细胞 15min,然后用 PBS 洗 3 次,每次 5min。

[0114] (3) 封闭。将 10%山羊血清滴在玻片表面使其被完全覆盖,在 37 $^{\circ}$ C 放置 1h。

[0115] (4) 一抗孵育。用 1%牛血清白蛋白 1 : 200 倍稀释 β -actin 抗体(肌动蛋白抗体购自美国 Sigma 公司)或者 Syn 211(突触核蛋白抗体购自美国 Millipore 公司),将稀释后的抗体滴在小玻片上,玻片置于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

[0116] (5) 二抗孵育。将一抗吸走,用 PBS 洗 3 次,每次 5min 后,在玻片上滴加 FITC(异硫氰酸荧光素,绿色荧光标记基团)或者 TRITC(四甲基异硫氰酸罗丹明,红色荧光标记基团)标记的二抗,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 45min 后用 PBS 洗 3 次,每次 5min。

[0117] (6)PI(碘化丙啶)染色。将孵育完二抗的细胞上滴加 1 : 1000 稀释的 PI(可标记死细胞的细胞核,红色),染色 15min 后用 PBS 洗掉(洗 3 次,每次 5min)。

[0118] (7) 封片。在载玻片上滴适量封片剂,将玻片长有细胞的一面朝下覆盖在封片剂上封片。将载玻片进行标记后,置于暗处干燥后保存于 -20 $^{\circ}$ C 以备观察。

[0119] 4. 在激光共聚焦显微镜下观察免疫荧光染色的玻片,其中丙二醛修饰突触核蛋白观察选取激发光为 405nm, FITC 标记的抗体观察选择激发光为 494nm,发射光为 518nm; TRITC 标记的抗体观察选择激发光为 547nm,发射光为 562nm;PI 染色选择激发光 536nm,发射光为 617nm。

[0120] 5. 免疫细胞化学的实验结果见图 12。由此结果可以看出,经丙二醛修饰的突触核蛋白与突触核蛋白抗体的荧光共定位,证明了细胞内发出蓝色荧光的物质为丙二醛修饰的突触核蛋白。

[0121] 实施例 13:丙二醛修饰的突触核蛋白进入细胞后细胞器定位实验

[0122] 实验方法与结果

[0123] 1. 本实施例的实验方法第一部分同实施例 10。在经同实施例 10 的处理后,换带有溶酶体荧光探针(购自美国 Invitrogen 公司)的培养基继续培养 2h 后换无血清的 DMEM 用于激光共聚焦显微镜观察。

[0124] 2. 激光共聚焦显微镜活细胞拍照结果见图 13。由此结果可以看出,丙二醛修饰的突触核蛋白可以进入 BV-2 细胞,在细胞中显示蓝色荧光(图 13C),溶酶体的染料标记的溶酶体显示红色荧光(图 13B),且经丙二醛修饰的突触核蛋白荧光与溶酶体的荧光存在共定位现象(图 13A)。

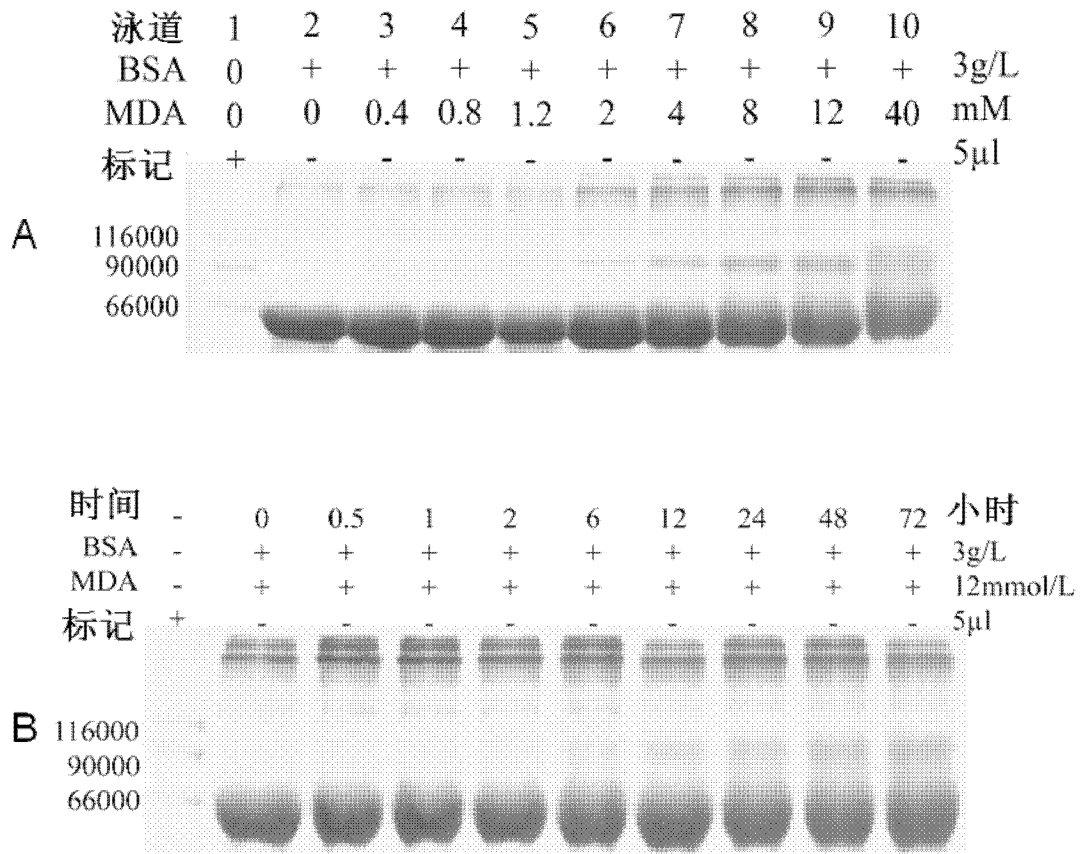


图 1

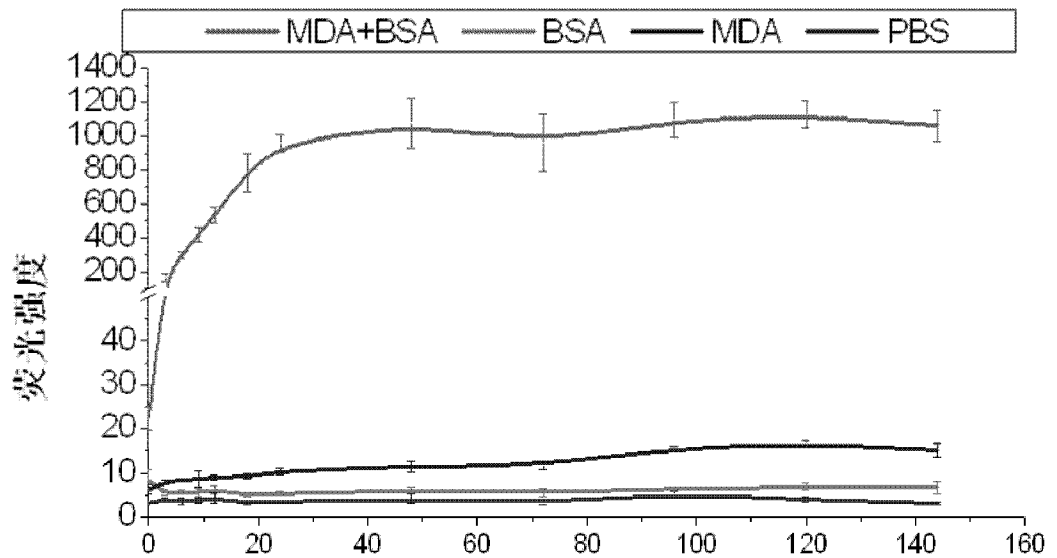


图 2

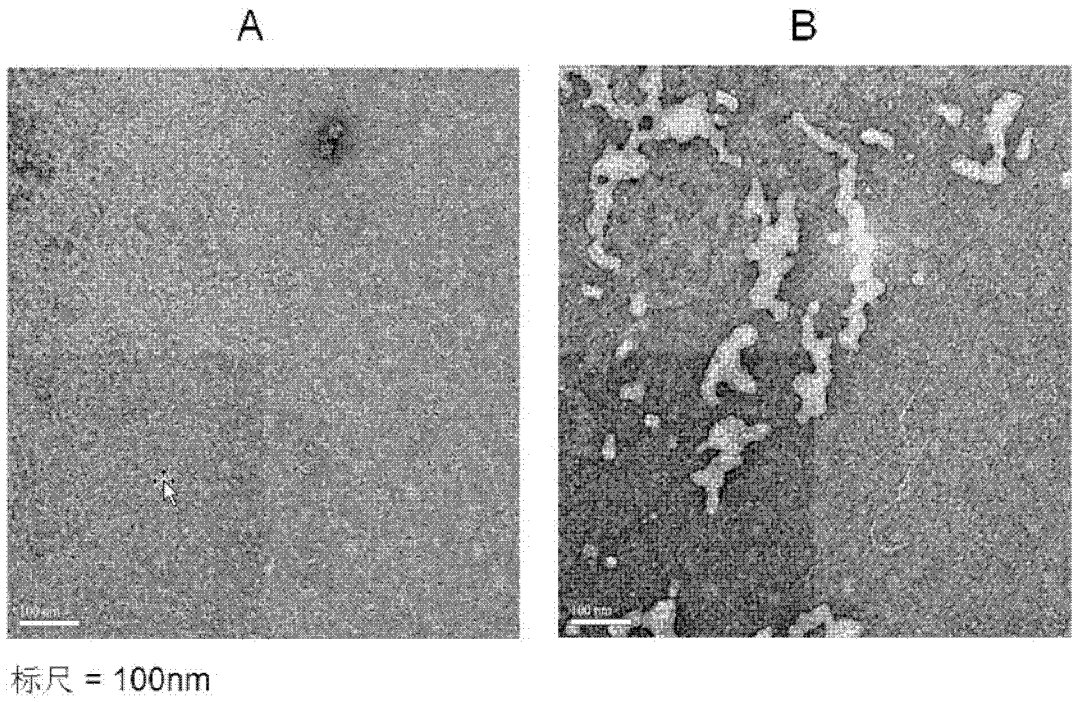


图 3

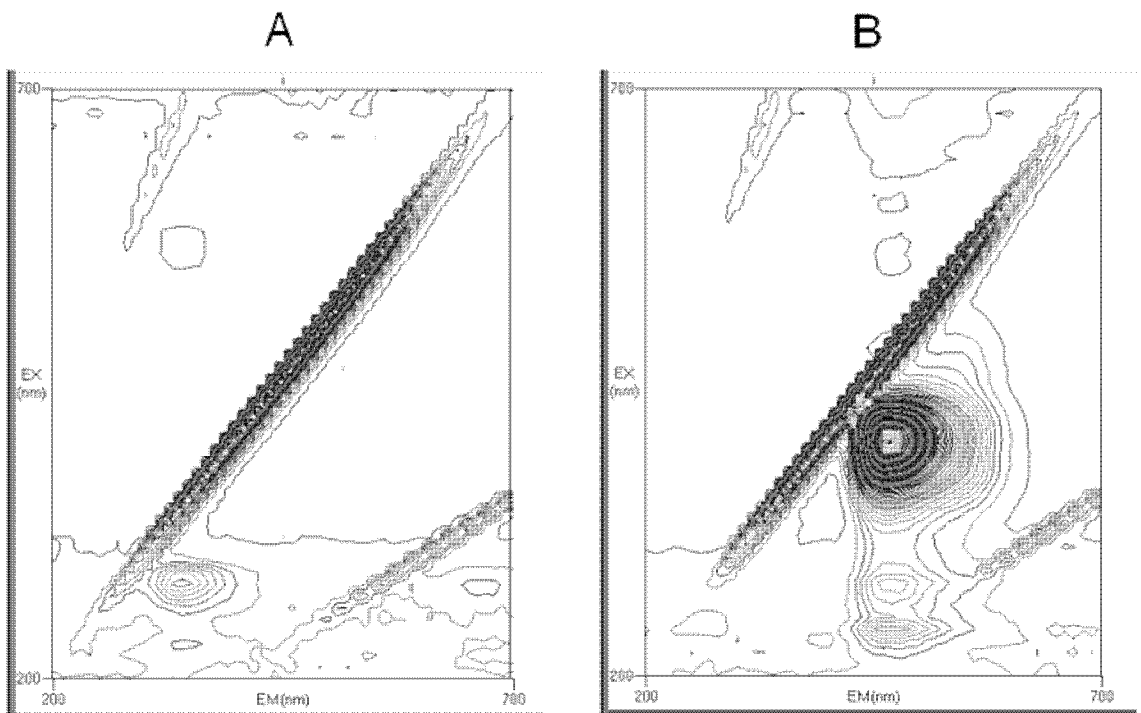


图 4

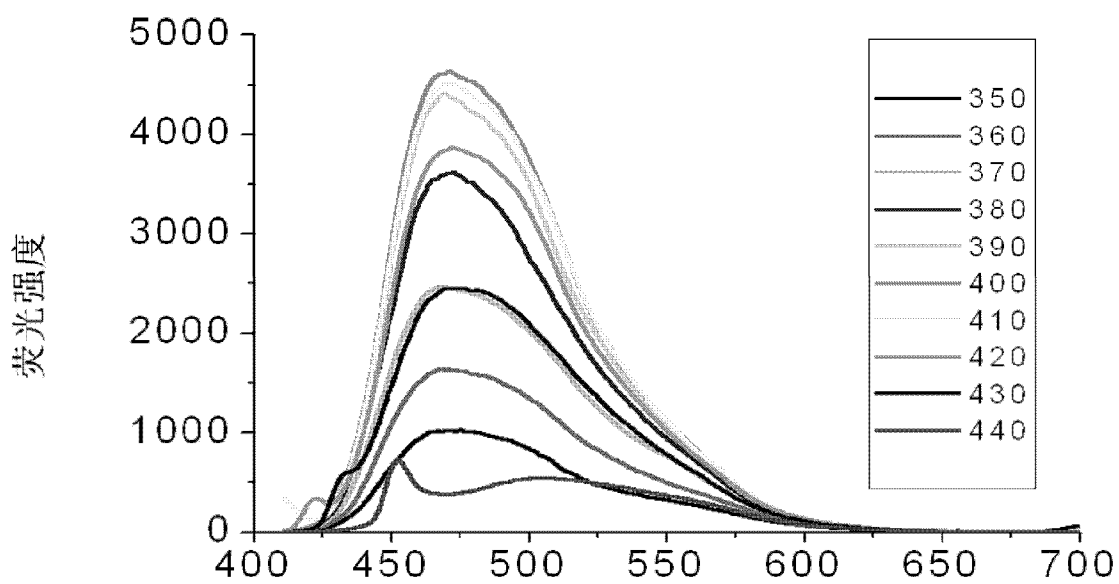


图 5

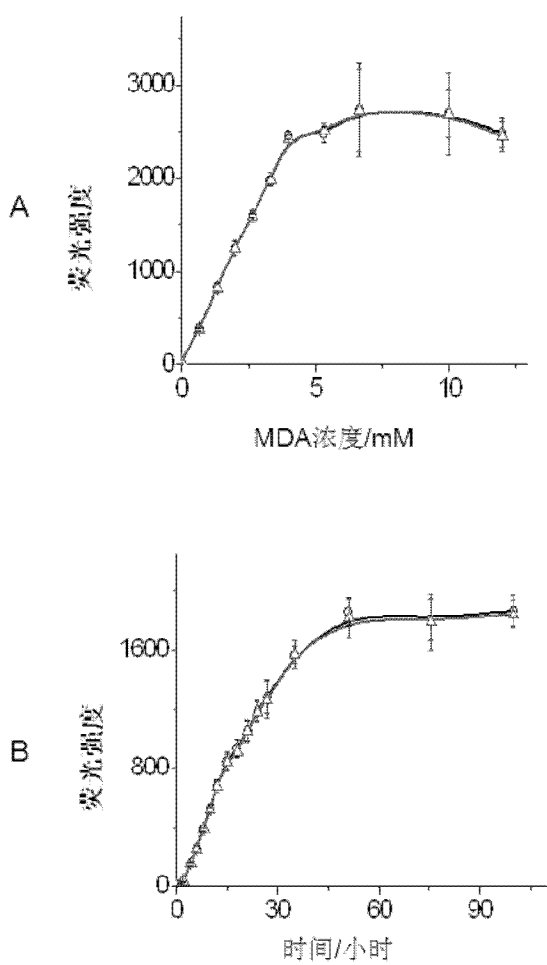
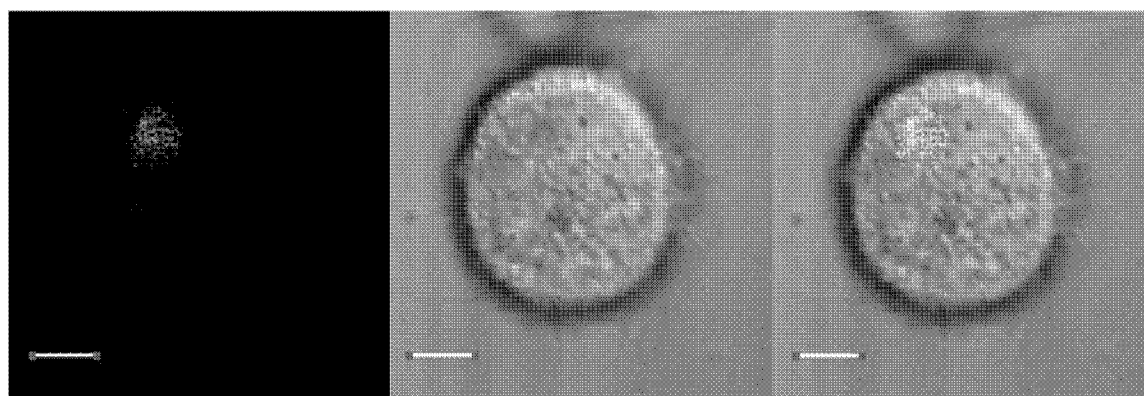


图 6



标尺 = 5 μ m

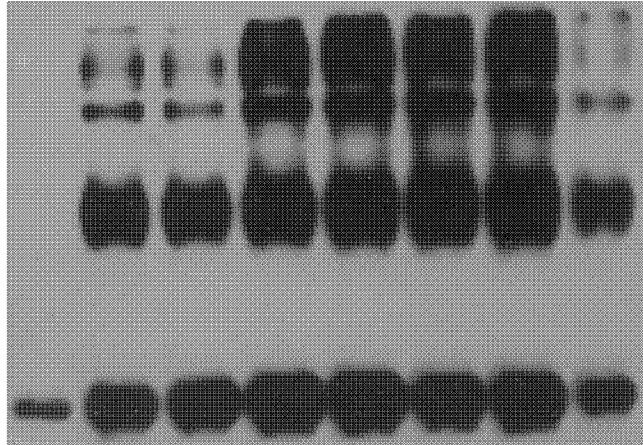
图 7



图 8

A

泳道	1	2	3	4	5	6	7	8	
时间	0	0.5	1	2	4	6	8	12	小时
AS	+	+	+	+	+	+	+	+	3 mg/ml
MDA	+	+	+	+	+	+	+	+	12 mM

**B**

时间	16	24	48	72	96	120	144	168	小时
AS	+	+	+	+	+	+	+	+	3 mg/ml
MDA	+	+	+	+	+	+	+	+	12 mM

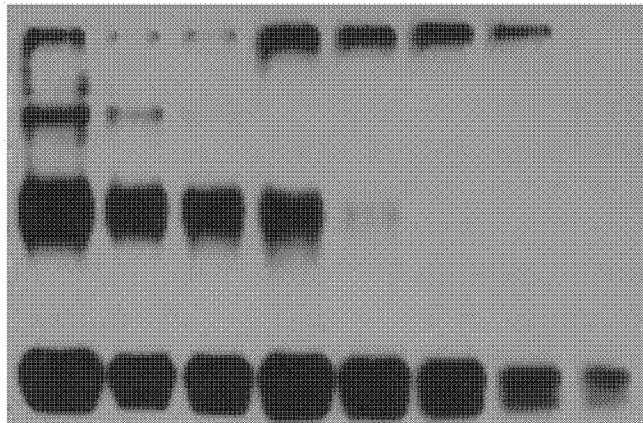


图 9

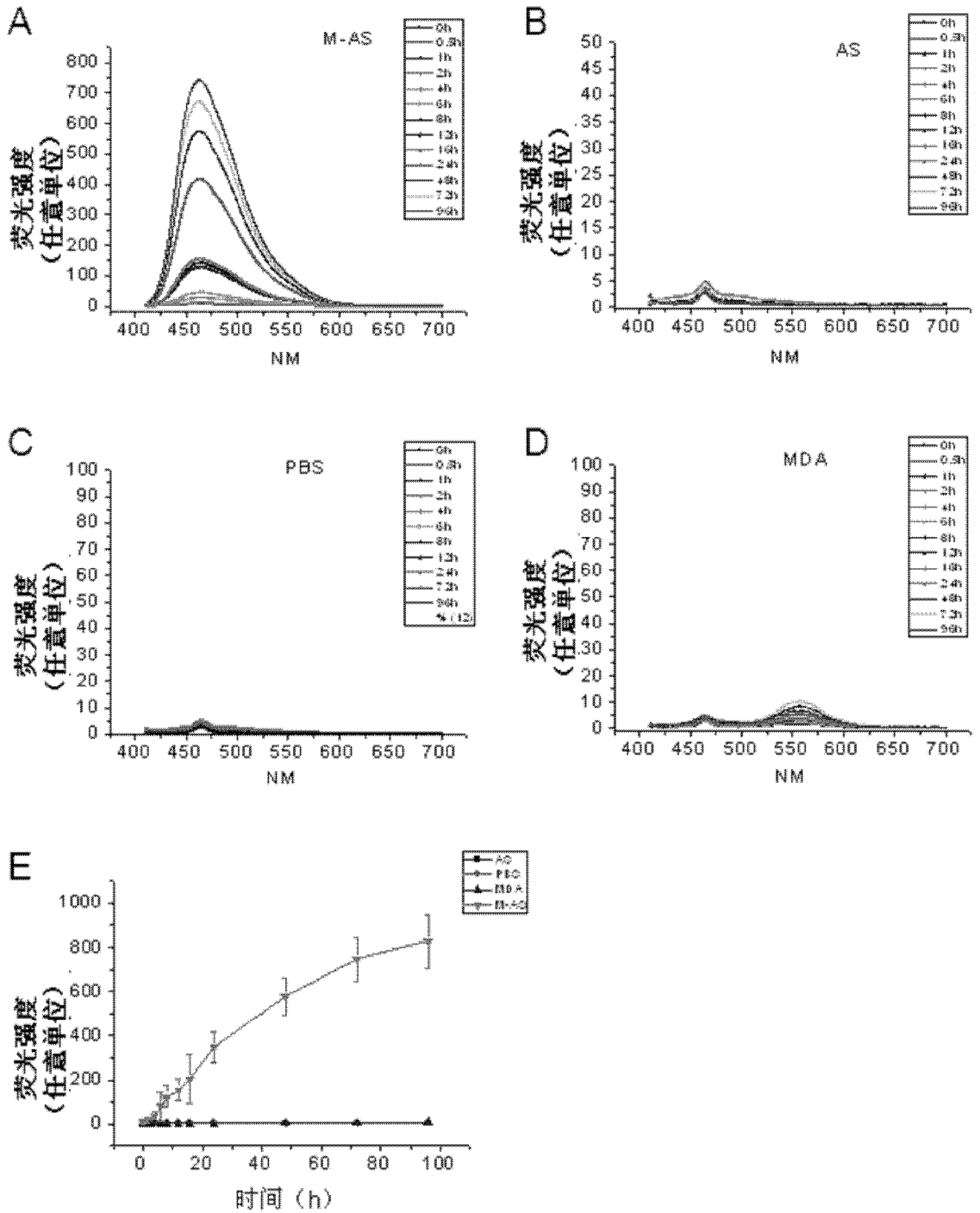


图 10

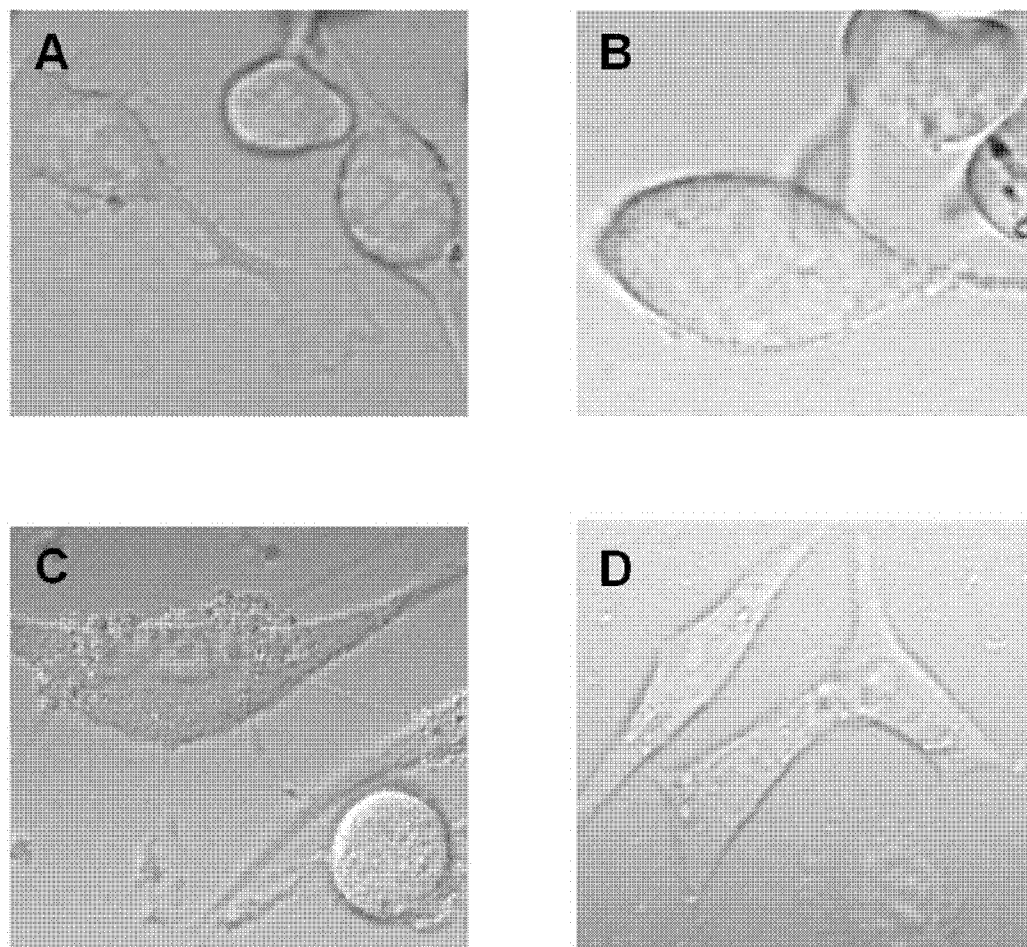


图 11

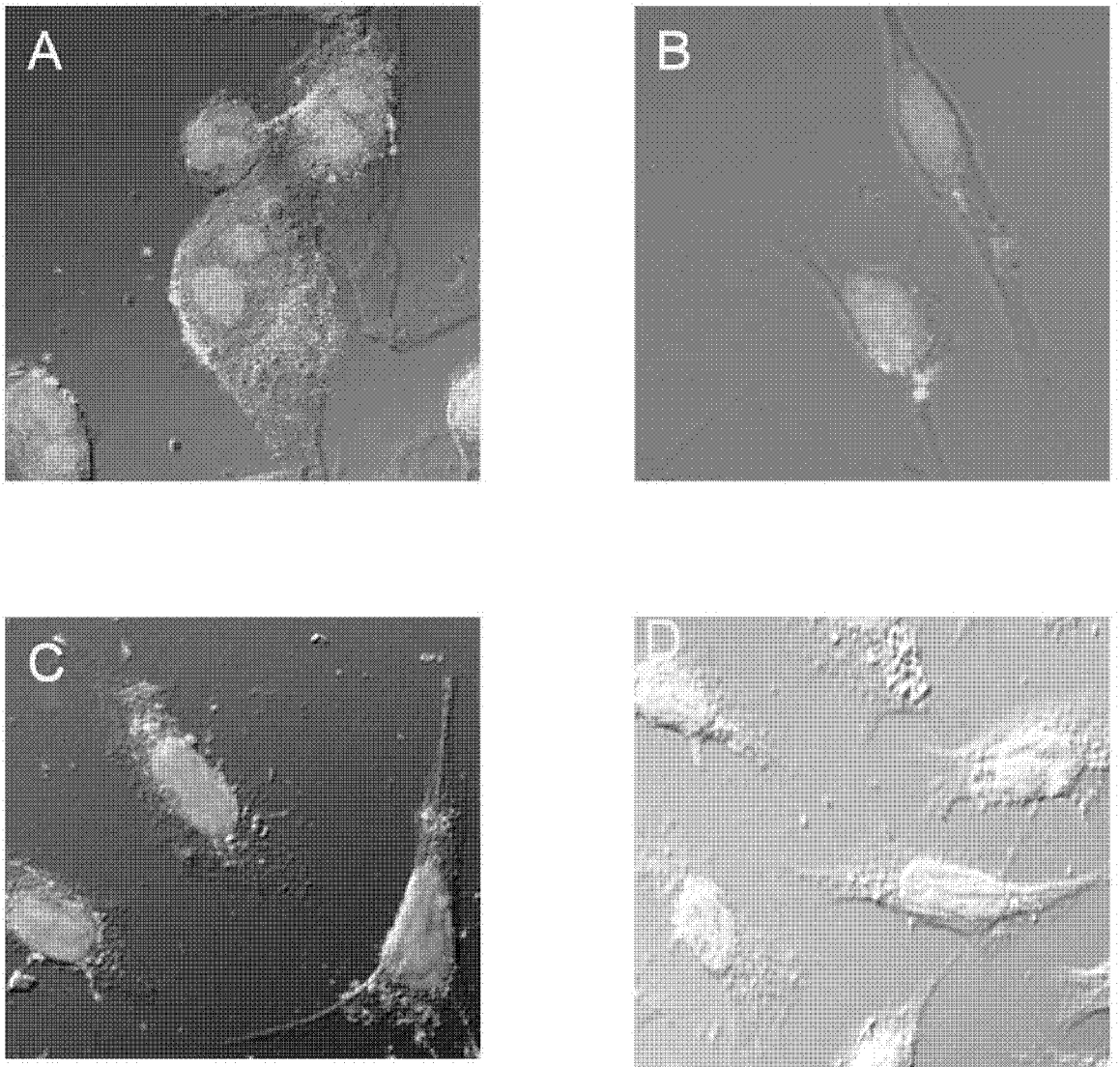


图 12

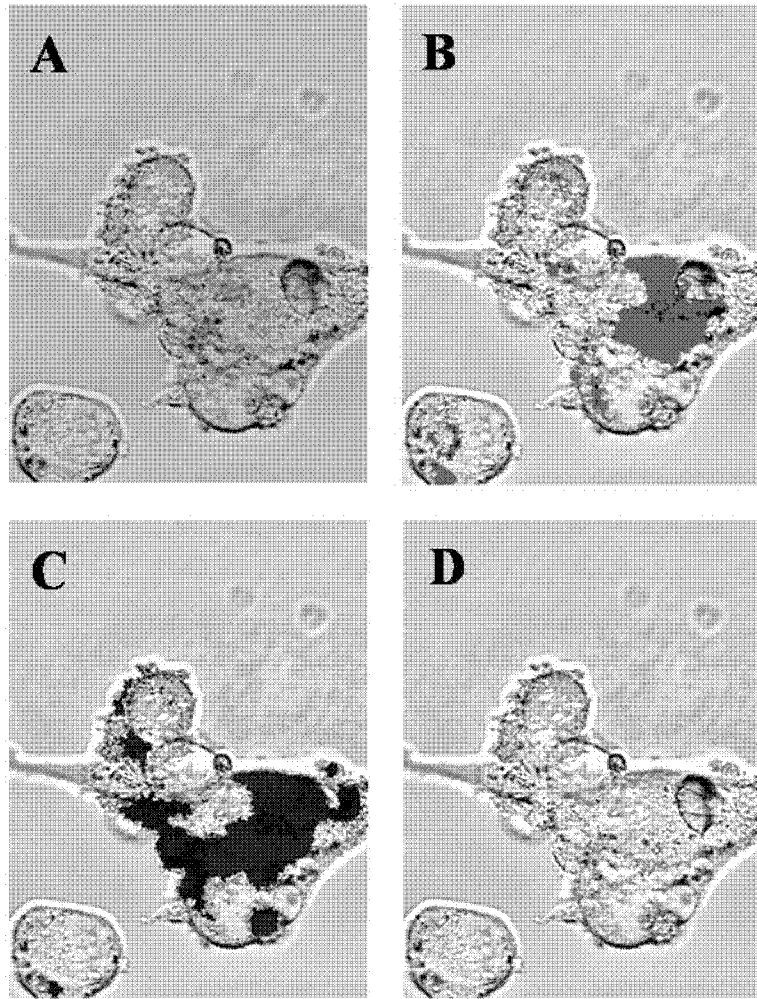


图 13