

文章编号:1000-6281(2003)02-0116-04

# 原子力显微镜在 $\alpha$ -Synuclein 积聚和解聚研究中的应用

唐琳<sup>1</sup>,李洪涛<sup>2</sup>,杜海宁<sup>2</sup>,吉丽娜<sup>1</sup>,张峰<sup>1</sup>,李民乾<sup>1</sup>,胡红雨<sup>2</sup>,胡钧<sup>1,3,\*</sup>

(1 中国科学院上海原子核研究所纳米生物医药实验室,上海 201800;

2 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,上海 200031;

3 上海交通大学 BIO-X 研究中心,上海 200030)

**摘要:** 研究  $\alpha$ -Synuclein 蛋白纤维的积聚和解聚过程对于帕金森症等神经退化性疾病的预防和治疗有着重要意义。本文利用原子力显微镜对  $\alpha$ -Synuclein 的积聚过程的不同阶段进行了研究,并在此基础上对已经积聚形成的  $\alpha$ -Synuclein 纤维在溶液中的解聚过程进行了原位观察。实验结果表明: $\alpha$ -Synuclein 积聚过程包括单体、寡聚体、短纤维、长纤维这几个阶段;而  $\alpha$ -Synuclein 纤维在浓度降低的情况下,会发生解聚,解聚是从纤维的中间发生断裂开始,经过一段时间后,长的蛋白纤维会解聚成为一些短纤维和很多蛋白颗粒。

**关键词:** 原子力显微镜; $\alpha$ -Synuclein;神经退化性疾病;帕金森氏综合症;积聚;解聚

**中图分类号:** TN16;R745.1 **文献标识码:** A

近年来,神经退化性疾病如:老年痴呆症、帕金森氏综合症、阿尔茨海默症等越来越成为研究的热点。这些神经退化性疾病的一个重要的标志是:神经细胞发生选择性死亡,而在这些死亡的神经细胞及其周围的神经细胞内都出现了淀粉样的蛋白纤维沉淀<sup>[1]</sup>。虽然这些蛋白纤维和神经细胞死亡的确切关系还不清楚,但已有很多实验证明,这些蛋白纤维的出现与神经细胞的死亡有着密不可分的关系<sup>[2-4]</sup>。

$\alpha$ -Synuclein 是一种有 140 个氨基酸组成的在脑组织中表达水平较高的前突触蛋白<sup>[5,6]</sup>,正常情况下,它在溶液中没有二级结构,以无规卷曲的形式存在<sup>[7]</sup>,但在帕金森氏综合症患者的脑中,它却形成了纤维状的积聚物<sup>[8]</sup>。除了帕金森氏综合症以外, $\alpha$ -Synuclein 还与好几种神经退化性疾病有关<sup>[9,10]</sup>。因此,研究  $\alpha$ -Synuclein 的积聚和解聚过程,对于研究这些疾病的发病机理和治疗手段无疑有着重要意义。

研究蛋白质的积聚和解聚过程,直接、客观的实验数据是最有效的。但由于这些过程都发生在活体内的神经细胞里,目前的实验手段还不能对其中的生理过程直接观察,故研究都在体外进行。这样的实验结果虽不能完全代表在活体内的真实情况,但在一般机理方面还可提供很有价值的信息。

利用原子力显微镜直接观察  $\alpha$ -Synuclein 的积聚和解聚过程,无疑是最合适的工具。自原子力显微镜诞生以来,它就成为生物学研究的一种重要工具,用于观察和操纵生物样品<sup>[11,12]</sup>。其主要优势在于:制样过程简单,能够在近生理的条件下,对生物样品进行长时间的原位观察,且在观察的同时可以改变样品所处的环境,这就使得对生物样品的活性过程进行原位研究成为现实。

本文利用原子力显微镜,不仅对  $\alpha$ -Synuclein 的积聚过程进行了静态观察,还对  $\alpha$ -Synuclein 纤维的解聚过程进行了动态原位的观察。获得了  $\alpha$ -Synuclein 由单体、寡聚体、短纤维、长纤维的积聚过程的数据和  $\alpha$ -Synuclein 积聚纤维由长纤维,经过断裂、解离等一系列过程,最终解聚为短纤维和颗粒状的蛋白寡聚体的直接实验数据。

## 1 实验仪器与方法

### 1.1 实验仪器

美国 Digital Instrument 公司提供的 Nanoscop 型原子力显微镜,130 $\mu$ m  $\times$  130 $\mu$ m 扫描范围的 J 扫描头,针尖为 DI 公司生产的 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 针尖。

### 1.2 $\alpha$ -Synuclein 蛋白的提纯和保存

$\alpha$ -Synuclein 蛋白的提纯参照文献[13],提纯好

收稿日期:2003-03-01

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. NSFC39990600, No. 19890385);中国科学院特别支持项目(No. STZ97-2-02, STZ00-07);国家杰出青年基金(No. 19725415);上海市优秀学科带头人资助计划(No. 00XD1444029)资助项目。

作者简介:唐琳(1971-),女(汉族),上海市人,博士研究生。

\*通讯作者:胡钧(1964-),男(汉族),上海市人,教授。

的 $\alpha$ -Synuclein 保存在 PBS 溶液中,浓度为 200 $\mu$ mol/L,放在 -70 冰箱中。

### 1.3 $\alpha$ -Synuclein 积聚过程的静态研究

取出 4 支新提纯的 $\alpha$ -Synuclein 蛋白溶液(每支约 200 $\mu$ l,一直放在 -70 保存),从其中一支蛋白溶液中取 10 $\mu$ l 用 PBS 溶液稀释 100 倍后,马上取 5 $\mu$ l 滴在新解离的云母表面上,吸附 5min 后,用纯水轻柔冲洗,将多余的缓冲液和没有吸附牢的蛋白质洗去。然后将样品置于干燥器中干燥。将其余 3 支蛋白溶液置于 37 摇床上分别温浴 9h、15h 和 48h 后,分别取 10 $\mu$ l 用 PBS 溶液稀释 100 倍,再重复上面的制样过程。4 个样品经过干燥器干燥后,分别取出置于 AFM 的样品台上观察成像。所有的静态图像都是在空气中用 Tapping 模式获得的。

### 1.4 $\alpha$ -Synuclein 蛋白纤维解聚过程的动态原位观察

将一支浓度为 200 $\mu$ mol/L,放在 -70 冰箱中的 $\alpha$ -Synuclein 取出,并置于 37 摇床上温浴 96h。样品已出现絮状物,这表明已有大量的蛋白纤维生成。然后取 2 $\mu$ l 已经积聚了的 $\alpha$ -Synuclein 蛋白纤维溶液,滴在新解理的云母上,将云母放在原子力显微镜的样品台上,把装有针尖的液体槽放在样品上面,通过液体槽向云母表面注入 100 $\mu$ l 的 PBS 溶液。稳定几分钟后开始观察。在选定一个观察区域后,每隔 2h 对这个区域扫描一次,一直到蛋白纤维已经明显解聚。成像方式依然为 Tapping 模式,为了减免扫描时针尖对样品的作用力对解聚过程产生影响,在整个实验过程中,针尖对样品的作用力一直控制在最小范围内。由于整个动态观察的时间较长,约 20h,为避免在观察时液体的挥发,我们在实验过程中一直使样品周围的环境保持约 95% 的相对湿度。

## 2 实验结果和讨论

对 $\alpha$ -Synuclein 积聚过程的静态观察实验显示, $\alpha$ -Synuclein 的积聚过程主要包括下面几个阶段:1. 没积聚前的 $\alpha$ -Synuclein 蛋白大部分是以单体的形式存在的,在图像中为高度是 0.3~0.5nm 的球形颗粒(如图 1a 所示);2. 在 37 摇床上温浴 9h 后,蛋白已经形成了大小不一寡聚体,寡聚体的高度在 0.5~1.8nm 范围内(如图 1b 所示);3. 在 37 摇床上温浴 15h 后,蛋白样品中已经出现了一些短纤维,这些短纤维的长度约为几百 nm(如图 1c 所示);4. 在 37 摇床上温浴 48h 后,蛋白溶液中已经有长度在 1 $\mu$ m 以上的长纤维形成(如图 1d 所示)。

用 AFM 对 PBS 溶液中吸附在云母表面上的 $\alpha$ -Synuclein 蛋白纤维解聚的原位观察实验结果显示:在间断扫描的情况下,经过 4h 后, $\alpha$ -Synuclein 蛋白纤维开始断裂,随着时间的延长,断点不断扩大且越来越多的蛋白颗粒出现在纤维周围,在纤维上还会有其它的断点出现。19h 后,原来的蛋白长纤维已经明显解聚为短纤维和蛋白颗粒。解聚的原位观察结果如图 2 所示。从图中可以发现蛋白纤维的解聚并不是在纤维的两头开始,而是在纤维的中间发生断裂,然后不断有蛋白寡聚体的颗粒从断点的位置上解离下来,这样断裂的缺口慢慢扩大,在云母上也就有越来越多的从蛋白纤维上解聚下来的蛋白颗粒。

因为 AFM 的成像原理是当针尖与样品之间的距离很近时,样品和针尖之间的相互作用力会使得针尖依附的悬臂发生偏折,通过探测悬臂的偏折程度来判断样品的高度。也就是在 AFM 成像的过程中,针尖会对蛋白纤维有一个作用力,虽然在我们的实验中,我们将这种作用力控制在最小范围内,但是这么小的力的扰动是不是导致蛋白纤维解聚的主要因素呢?为了验证观察到的解聚过程并不完全是由针尖的扰动造成的,我们做了对照实验:即在相同的实验条件下,在 2h 内用相同大小的力对样品连续扫描 40 次,其结果是:经过 40 次的不间断扫描的蛋白纤维依旧保持完整。这说明,我们在间断扫描的情况下观察到的蛋白纤维解聚并不是由于针尖的扰动造成的,也就是说我们观察到的解聚过程基本上是在当浓度降低后,蛋白纤维自发的一种过程。

在积聚过程中,蛋白单体先后形成寡聚颗粒、短纤维和长纤维,而当蛋白浓度降低时,蛋白纤维会自发地发生解聚,这种解聚并不是蛋白纤维由粗逐渐变细的过程,也不是纤维从两端开始逐渐缩短的过程,而往往是在纤维的中间出现断裂开始。这说明在长纤维的形成过程中,由于一些微观因素的影响,导致纤维内部一些亚单位的结合并不是很牢固(纤维内部的亚单位可能是短纤维,也可能是蛋白寡聚颗粒,还有待于进一步的实验研究),当蛋白浓度降低,又有溶液中各种小分子的影响,时间一长,这些不牢固的相互作用就会被破坏,最终导致纤维的断裂。所以我们观察到的蛋白纤维的解聚并不一定是从纤维的两端开始,而往往是在纤维中间开始。在溶液中各种小分子的作用下,蛋白纤维的亚基也会逐渐从纤维的两端解离下来,由于我们的实验体系中蛋白浓度很低,其值为 4 $\mu$ mol/L,远远低于它发生

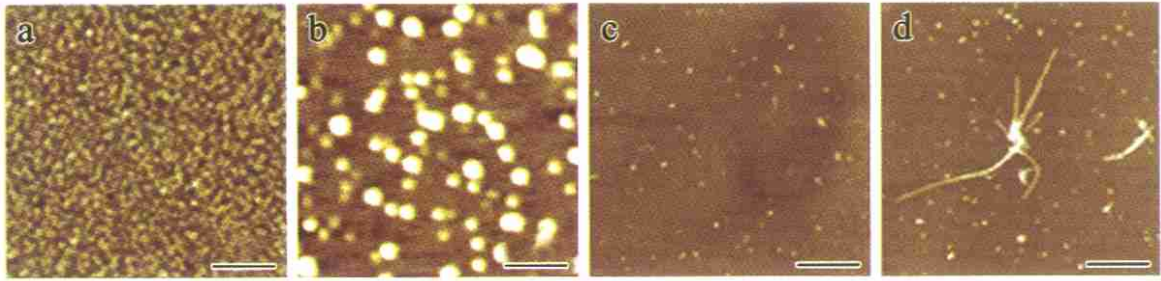


图 1 AFM 观察到的在积聚过程中不同阶段的  $\alpha$ -Synuclein。图中 a、b、c、d 依次是积聚前、积聚 9h、积聚 15h 和积聚 48h 的  $\alpha$ -Synuclein 图像。图 a 和图 b 的高度标尺为 5nm, 图 c 和图 d 的高度标尺为 60nm。图像显示了  $\alpha$ -Synuclein 蛋白由单体开始, 经过寡聚体、短纤维等阶段, 最终形成长纤维的过程。图 a, b Bar = 100nm; 图 c, d Bar = 1 $\mu$ m

Fig. 1 The  $\alpha$ -synuclein at different stages of aggregation process observed by AFM. (a)  $\alpha$ -synuclein without aggregation. (b) aggregated for 9 hours. (c) aggregated for 15 hours. (d) aggregated for 48 hours. The data scale is 5nm for (a) and (b) and is 60nm for (c) and (d). These images showed the process that the  $\alpha$ -synuclein monomers underwent from oligomers to short fibrils and finally long fibrils was formed. Fig. a, b Bar = 100nm; Fig. c, d Bar = 1 $\mu$ m

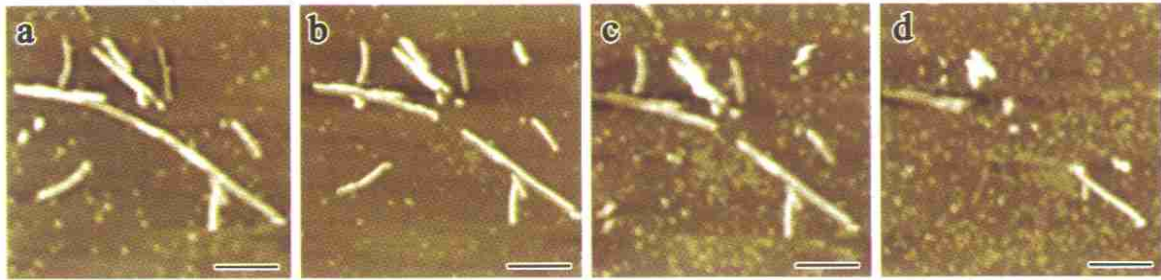


图 2 浓度降低时  $\alpha$ -Synuclein 纤维解聚的原位动态观察结果。图 a 是实验开始时的蛋白纤维; 图 b 是实验开始 4h 后的蛋白纤维, 纤维的中间发生了断裂; 图 c 和图 d 分别是实验开始后 10h 和 20h 后的图像, 在图 d 中,  $\alpha$ -Synuclein 长纤维已经明显解聚成短纤维和蛋白颗粒。图 a ~ 图 d Bar = 300nm

Fig. 2 Disaggregation process of  $\alpha$ -synuclein fibrils observed by *in situ* AFM. (a) long fibrils before scanning. (b) in the same region after 4 hours, broken points began to appear at the middle of the fibrils. (c) in the same region after 10 hours, more broken points appeared and became wider. (d) in the same region after 20 hours,  $\alpha$ -synuclein fibrils have disaggregated into short fibrils and protein particles with different sizes. Fig. a ~ Fig. d Bar = 300nm

积聚时的浓度, 所以解聚下来的蛋白也就很难再积聚起来。在实验的最后我们观察到长纤维已经解聚成了短纤维和蛋白颗粒。我们的这些实验结果可以为  $\alpha$ -Synuclein、 $\alpha$ -Amyloid 以及 Huntingtin 等与神经退化性疾病相关的蛋白质的积聚模式研究提供很好的参考, 从而帮助寻找出有效的预防和治疗这类疾病的方法。

原子力显微镜在对生物样品的研究方面有着独特的优势, 它对生物样品的分子量、种类、结构等等都没有苛刻的要求, 制样过程简单, 成像过程中样品也不会被破坏, 对一个样品可以在同一区域或不同区域反复观察。而且 AFM 还可以在溶液中对生物样品进行观察, 如果条件控制得好, 利用 AFM 可以在近生理的环境中对我们研究的生物对象的活性过程在纳米的水平上进行原位观察。我们和前人的

实验<sup>[14,15]</sup>都证明, 扫描时虽然针尖和样品之间有一个相互作用力, 衬底对样品的自由运动也有一定的束缚, 但只要衬底和观察体系选择合适, 成像条件加以严格控制, 这些不利因素就有可能被克服。能够直接对生物样品的活性过程进行原位观察, 无疑可以为分子生物学的研究提供极有意义的实验数据。

#### 参考文献:

- [1] Spillantini M G, Schmidt M L, Lee V M Y, Trojanowski J Q, Jakes R, Goedert M.  $\alpha$ -Synuclein in lewy bodies[J]. 1997, Nature, 388: 839 - 840.
- [2] El-Agnaf O M, Irvine G B. Aggregation and neurotoxicity of alpha synuclein and related peptides [J]. Biochem Soc Trans, 2002, 30(4): 559-65.

- [ 3 ] Bucciantini M, Gannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, Taddei N, Ramponi G, Dobson C M, Stefani M. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases[J]. *Nature*, 2002, 416: 507-511.
- [ 4 ] Dahlgren Karie N, Manelli Arlene M, Stine W Blaine, et al. Oligomeric and fibrillar species of Amyloid- $\beta$  peptides[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(35): 32046-32053.
- [ 5 ] Jakes R, Spillantini M G, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain[J]. *FEBS Lett*, 1994, 345: 27-32.
- [ 6 ] Ueda K, Fukushima H, Masliah E, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 11282-11286.
- [ 7 ] Weinreb P H, Zhen W, Poon A W, Conway K A, Lansbury Jr P T. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded[J]. *Biochemistry*, 1996, 35: 13709-13715.
- [ 8 ] Dickson D W. Alpha-synuclein and the Lewy body disorders [J]. *Curr Opin Neurol*, 2001, 14: 423-432.
- [ 9 ] Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases [J]. *Nature Rev Neurosci*, 2001, 2: 492-501.
- [ 10 ] Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H.  $\alpha$ -Synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy [J]. *Neurosci Letters*, 1998, 249: 180-182.
- [ 11 ] Drake C B, Prater A L, Weisenborn S A C, et al. Imaging crystals, polymers, and processing in water with the atomic force microscope[J]. *Science*, 1989, 243: 1586-1588.
- [ 12 ] Hu J, Zhang Y, Ouyang Z Q, et al. Stretch and align virus in nanometer scale on an atomically flat surface[J]. *J Vac Sci Technol*, 1998, B16: 2841-2843.
- [ 13 ] Hu H Y, Li Q, Cheng H Q, Du H N.  $\beta$ -sheet structure formation of proteins in solid state as revealed by circular dichroism spectroscopy [J]. *Biopolymers*, 2001, 62: 15-21.
- [ 14 ] Blackley H K L, Sanders G H W, Davies M C, Roberts C J, Wilkinson Tendler S J B. In situ atomic force microscopy study of  $\alpha$ -amyloid fibrillization[J]. *J Mol Biol*, 2000, 298: 833-840.
- [ 15 ] Ionescu-Zanetti Cristian, Khurana R, Gillespie Joel R, Petrick Jay S, Trabachino Lynne C, Minert Lauren J, Carter Sue A, Fink Anthony L. Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 13175-13179.

## Applications of atomic force microscopy in studying the $\alpha$ -Synuclein's aggregation and disaggregation

TANGLin<sup>1</sup>, LI Hong-tao<sup>2</sup>, DU Hai-ning<sup>2</sup>, JI Li-na<sup>1</sup>, ZHANG Feng<sup>1</sup>, LI Min-qian<sup>1</sup>, HU Hong-yu<sup>2</sup>, HU Jun<sup>1,3\*</sup>

(1 Shanghai Institute of Nuclear Research, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800;

2 Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Shanghai 200031;

3 Nanobiology Laboratory of Bio-X Life Science Research Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

**Abstract:** Studying the aggregation and disaggregation processes of  $\alpha$ -synuclein fibrils is very meaningful for the therapy of these neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. In this paper, the  $\alpha$ -synuclein at different stages of its aggregation process was observed by atomic force microscopy. And the disaggregation process of  $\alpha$ -synuclein fibrils was monitored by in situ atomic force microscopy in solution. It was found that the process of  $\alpha$ -synuclein fibrillization included several stages: (a) oligomerization from monomers. (b) formation of short fibrils. (c) maturation of fibrils and that  $\alpha$ -synuclein fibrils could disaggregate step by step in solution when diluted to some extent. The disaggregation usually started at the middle of the fibrils, and as time went by, the long fibrils could disaggregate into some short fragments and particles with different sizes. Relevant mechanism has been discussed.

**Keywords:** atomic force microscopy;  $\alpha$ -Synuclein; neurodegenerative disease; Parkinson's disease; aggregation; disaggregation

\* Corresponding author