

2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080012
參展科別 生物化學
作品名稱 建立細菌系統的雙分子螢光互補試驗做為
 α -突觸核蛋白聚集抑制物篩檢平台
得獎獎項 大會獎：二等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學
指導教師 李桂楨、陳怡旻
作者姓名 黃郁婷、林佳蘭

關鍵字 雙分子螢光互補、蛋白質摺疊報告者、
 α -突觸核蛋白

作者簡介



大家好！我們是黃郁婷和林佳蘭，目前就讀於北一女中二年級。到了高中後，才知道有專題研究這門課，可以讓我們有機會提早接觸自己喜歡的實驗，探索不同領域的新知，不只是侷限在教科書裡。

我們在這段日子裡，學到很多實驗方法、原理及精神，雖然真的很累，假日寒暑假及放學，都待在實驗室，但更多時候是非常有趣的，尤其是成果出來時！做研究的這段時光，我們很感謝教授、老師、學長姐和同學們，有了你們的幫助，讓我們開開心心的進行實驗，過程中有時會有些小挫折，但在大家的努力下都一一解決，謝謝你們！

摘要

帕金森氏症(PD)是一種慢性中樞神經系統退化性疾病，患者臨床症狀包括靜止時震顫、動作遲緩、僵直及黑質緻密部多巴胺神經元的漸進性退化等。PD的主要病理特徵為多巴胺神經元中出現包含 α -突觸核蛋白(SNCA)錯誤摺疊、聚集的路易小體。雖然PD的治療方法包括給予左旋多巴或其他藥物、物理治療、手術等，至今尚未有根治的方法。本研究建立雙分子螢光互補試驗與蛋白質摺疊報告者試驗兩種原核細胞平台，作為篩檢可幫助 α -突觸核蛋白摺疊的化學伴隨蛋白平台。雙分子螢光互補試驗是將Venus黃螢光蛋白改進版切開成N端(VN₁₋₂₁₁)及C端(VC₂₁₂₋₂₃₉)二段，分別接在SNCA的N端(VN-SNCA)或C端(SNCA-VC)，原本沒有螢光的片段可藉融合的SNCA聚集的再組裝而出現螢光。當構築的VN-SNCA and SNCA-VC質體共表現於大腸桿菌後，蛋白質染色及免疫轉漬可偵測到表現的VN-SNCA、SNCA-VC蛋白，並出現伴隨著SNCA聚集所導致的互補螢光。我們以可干擾SNCA聚集的海藻糖來測試此聚集抑制物篩選平台，發現在不影響大腸桿菌生長的狀況下，海藻糖的濃度與螢光下降程度呈正相關，推測因其能減少SNCA聚集，導致螢光分子互補的機率下降。蛋白質報告者試驗是將野生型(WT)與突變型(35/46/61 E-to-K)的 α -突觸核蛋白與綠螢光蛋白的融合蛋白(SNCA-GFP)分別表現於大腸桿菌，突變型的 α -突觸核蛋白的傾向錯誤摺疊，會影響融合的綠螢光蛋白摺疊，而導致綠螢光下降，而海藻糖的化學伴隨蛋白活性可幫助突變型的 α -突觸核蛋白摺疊，因而改善融合的綠螢光蛋白的摺疊，導致綠螢光上升。未來我們用此兩種原核細胞平台，來篩檢可幫助 α -突觸核蛋白摺疊的新穎化學伴隨蛋白。

Abstract

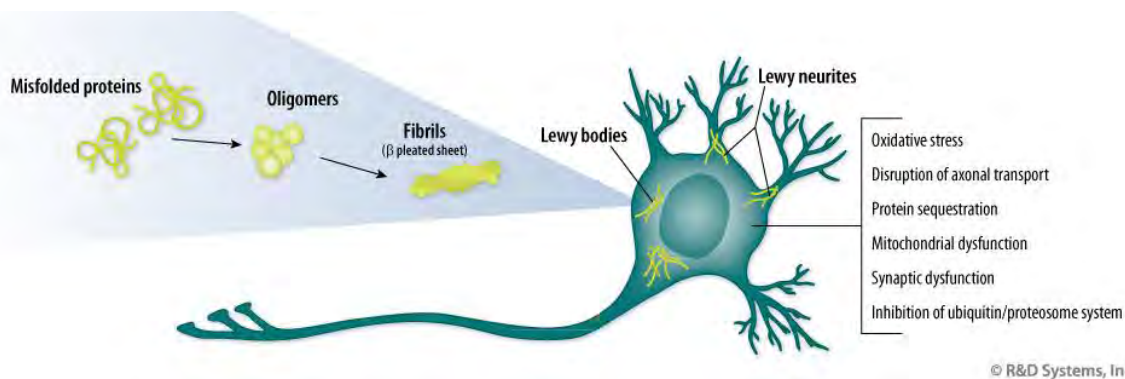
Parkinson's disease (PD) is a kind of chronic central nervous system degenerative disease associated with resting tremor, bradykinesia, rigidity, and progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. Characteristic pathological features of PD include proteinaceous α -synuclein (SNCA) positive inclusions called Lewy bodies in dopaminergic neurons. Although there are some effective treatments including levodopa and other drug therapies, physical therapy, and surgery for PD, there is no cure for PD at present. In this study we established prokaryotic bimolecular fluorescence complementation (BiFC) and protein folding reporter assays as platforms to screen chemical chaperones assisting α -synuclein folding. BiFC assay is based on the reassembly of fluorescent Venus protein (an improved version of YFP) from its two split nonfluorescent fragments (VN, N-terminal amino acids 1-211; VC, C-terminal amino acids 212-239) which is facilitated by the interaction between two α -synuclein proteins fused to each fragment. When the constructed VN-SNCA and SNCA-VC plasmids were co-expressed into *E. coli*, the expressed VN-SNCA and SNCA-VC proteins were detected by protein staining and immunoblotting, accompanied with complementary fluorescence facilitated by α -synuclein aggregation. Treatment with trehalose, a known disaccharide interfering with α -synuclein's aggregation, reduced complementary fluorescence in a dose-dependent manner. In protein misfolding reporter assay, GFP fluorescence was used to reflect α -synuclein's folding status as α -synuclein misfolded rapidly to lead to decreased GFP fluorescence. When wild type and pro-aggregation mutant (35/46/61 E-to-K) of SNCA-GFP plasmids were expressed into *E. coli*, significantly decreased GFP fluorescence was observed with the mutant plasmid as compared to the wild type plasmid. Trehalose significantly increased green fluorescent intensity in mutant cells. The two established prokaryotic platforms will be used to screen novel chemical chaperones to assist α -synuclein folding.

一、前言

(一)研究背景

帕金森氏症

帕金森氏症是一種慢性中樞神經系統退化性疾病，普遍症狀為肌肉僵直、震顫，嚴重者甚至會喪失運動功能和平衡感，這些症狀皆源自於多巴胺分泌不足所導致的神經訊息傳遞障礙，而在多巴胺神經元裡的路易小體(Lewy body)便是帕金森氏症患者腦內共同發現的徵狀(圖一)。路易小體是蛋白質異常聚集形成的類澱粉斑塊，主要成份為 α -突觸核蛋白。遺傳性的 α -突觸核蛋白第53個胺基酸由丙胺酸(alanine)替換成蘇胺酸(threonine)時， α -突觸核蛋白傾向於以 β 構形折疊形成單元體，並聚集成纖維狀的類澱粉斑塊，對多巴胺神經元造成毒性，造成黑質細胞死亡，在缺少多巴胺的情況下，患者無法控制自己的身體。



圖一、 α -突觸核蛋白形成路易小體示意圖。 α -突觸核蛋白原為細絲狀蛋白，其突變與遺傳性的帕金森氏症有關。 α -突觸核蛋白突變後 β 構形增加，易造成錯誤摺疊，導致路易小體的形成與堆積，而路易小體因其不可溶的性質，對細胞產生毒性，導致多巴胺神經元凋零死亡。

α -突觸核蛋白的 35/46/61 E-to-K 點突變

α -突觸核蛋白大量表現在中樞神經系統，可以是錯誤折疊的 β 構形單元體，或是正確折疊的 α 構形四元體。先前國外學者的研究顯示， α -突觸核蛋白第36、46、

61 個胺基酸由麩胺酸(glutamic acid)替換成離胺酸(lysine) (35/46/61 E-to-K 點突變) 時， α -突觸核蛋白傾向於以錯誤折疊的 β 構形折疊形成單元體，並聚集成纖維狀的類澱粉斑塊。

雙分子螢光互補試驗

雙分子螢光互補試驗是將螢光蛋白在某特定位點切開，形成不發螢光的 N 和 C 端 2 個片段。這 2 個片段在細胞內共表達時，不能組裝成完整的螢光蛋白。但當這 2 個螢光蛋白片段分別連接到目標蛋白上，在細胞內共表達時，由於目標蛋白質的相互作用，2 個螢光蛋白片段因互相靠近互補，重新構建成完整的具有活性的螢光蛋白分子。本研究將利用 α -突觸核蛋白聚集堆積導致的互補螢光的情形，來瞭解小分子化學伴隨蛋白幫助 α -突觸核蛋白摺疊抑制聚集的情形。

蛋白質摺疊報告者試驗

蛋白質摺疊報告者試驗是將一摺疊較慢的螢光蛋白接在一摺疊較快的蛋白質後，此摺疊較快的蛋白質若錯誤摺疊，將導致摺疊較慢的螢光蛋白亦錯誤摺疊，造成螢光通量的降低。本研究將利用野生型及傾向錯誤摺疊的突變型 α -突觸核蛋白 (35/46/61 E-to-K 點突變)與綠螢光蛋白的融合蛋白表現於細菌細胞的情形，來瞭解小分子化學伴隨蛋白幫助 α -突觸核蛋白摺疊的情形。

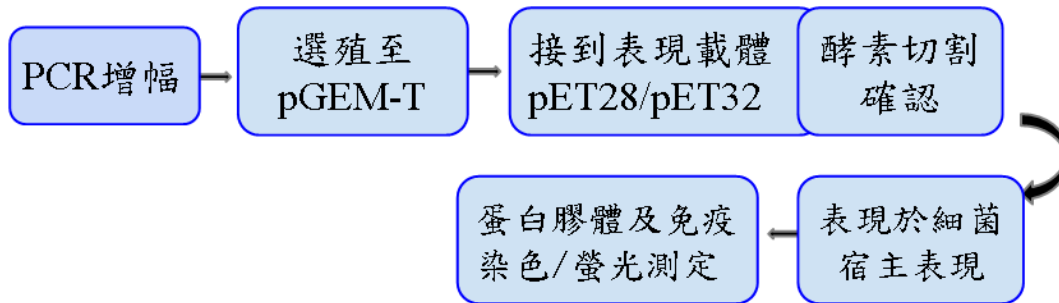
(二)研究動機及目的

巴金森氏症至今尚未有完全治癒之療法，目前藥物只能減緩巴金森氏症的症狀。由於 α -突觸核蛋白摺疊、聚集與疾病相關，因此我們想以原核細胞建構檢測 SNCA 摺疊、聚集的平台，來篩檢可幫助 α -突觸核蛋白摺疊的新穎化學伴隨蛋白，以期能從源頭抑制類澱粉斑塊的生成，來應用在巴金森氏症治療上。

二、研究方法與過程

雙分子螢光互補試驗

(一)實驗設計

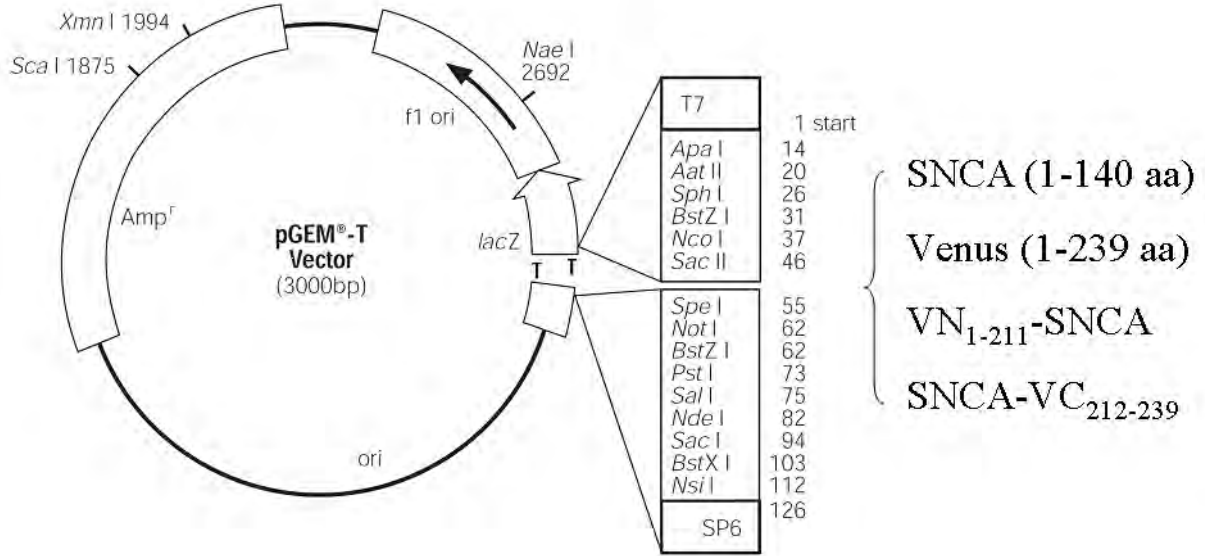


以 Venus 螢光蛋白 N 端與 C 端序列分別接在 SNCA 序列上的片段為模板，利用 PCR 增幅後，選殖入 pGEM-T 載體，經定序確認序列無誤後，再置入原核表現載體 pET28/pET32。所構築的重組質體以限制酵素切割確認後，共表現於大腸桿菌，再藉 SNCA 聚集所導致的互補螢光變化，來反應 α -突觸核蛋白聚集的情形。除了 SNCA 融合 Venus 螢光蛋白 N、C 端共轉的實驗組外，也設置了 SNCA 與 Venus 螢光蛋白各自獨立但共表現的對照組，和實驗組共表現之互補螢光值做比較。在檢測共表現的蛋白及螢光後，我們再以已知可干擾 α -突觸核蛋白聚集的海藻糖來測試此聚集抑制物篩選平台。

(二)增幅基因片段、定序及選殖

以實驗室已有 SNCA、VN₁₋₂₁₁-SNCA、SNCA-VC₂₁₂₋₂₃₉ 及 Venus 序列(位於真核表現載體上)作為模板，設計引子引入適當限制酵素切位，利用聚合酶連鎖反應放大標的基因片段(煉合溫度為 56°C 並加入 10% DMSO)。PCR 產物經酵素切割確認後，以膠體電泳分離、純化並接合入 pGEM-T 載體(圖二)，並以電穿孔(electroporation)方式轉型(transformation)入 *E. coli* 轉型勝任細胞內。隔日挑選單一菌落，小量抽取質體 DNA，進行限制酵素切割圖譜與 DNA 定序，確認其正確性。

選殖用載體&選殖片段



圖二、pGEM-T 載體及選殖片段。

(三) 建構基因表現重組質體

包含上述基因片段之 pGEM-T 質體，於細菌內大量複製重組質體 DNA 後，以適當限制酵素切出基因片段，純化後置入 pET-28a 或 pET-32a/b 表現載體(圖三)。接合好的重組質體轉型入 *E. coli* 轉型勝任細胞內。隔日挑選單一菌落，抽取質體 DNA，進行限制酵素切割圖譜確認其正確性。

重組質體

pET-32b/SNCA

NcoI SNCA XhoI

pET-28a/Venus

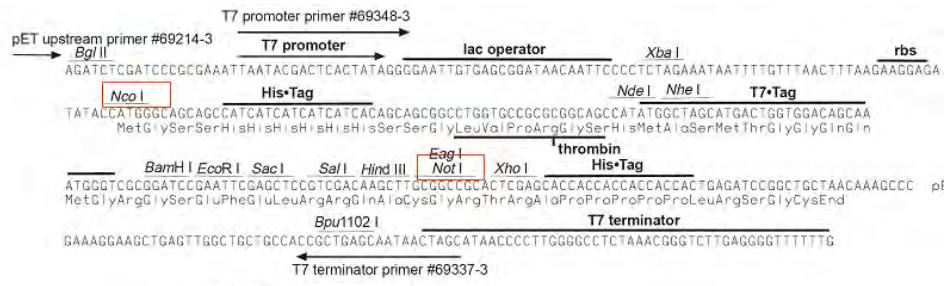
NcoI Venus NotI

pET32a/VN₁₋₂₁₁-SNCA

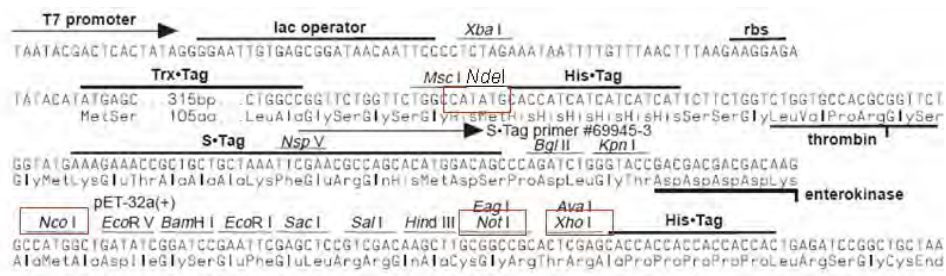
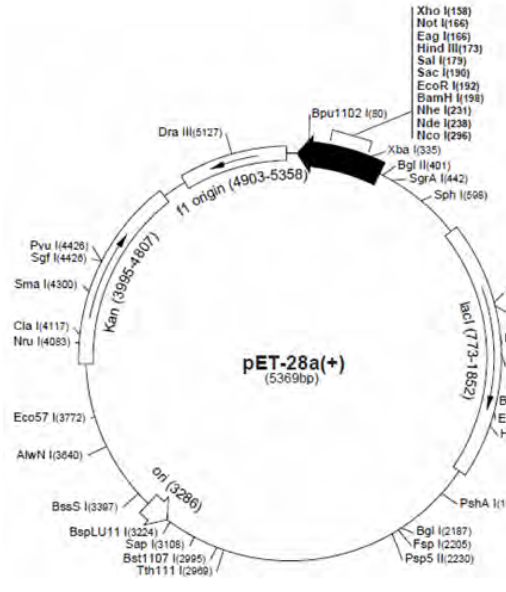
NdeI VN₁₋₂₁₁ TCTAGA
AGATCT SNCA NotI

pET28a/SNCA-VC₂₁₂₋₂₃₉

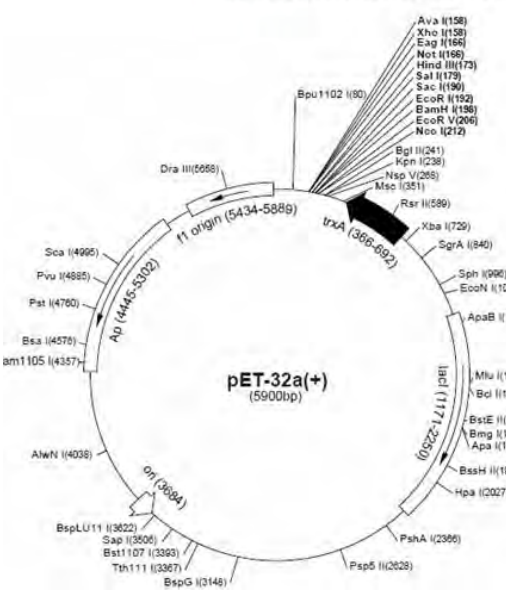
NcoI SNCA GGCAATTCA
CCGTTAAGT VC₂₁₂₋₂₃₉ NotI



表現載體pET-28a(+) & *Nco*I、*Not*I切位



表現載體pET-32a/b(+)
& *Nde*I、*Nco*I、*Not*I、*Xho*I切位



圖三、pET 載體及選殖片段置入切位。

(四)原核細胞的蛋白誘導表現

上述 pET 重組質體以電穿孔方式轉型入表現宿主 BL21(DE3)細胞內，塗盤至含有抗生素 kanamycin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，pET-28a 重組質體)或 ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，pET-32a/b 重組質體)的培養盤中。隔夜培養後挑單一菌落，接種於 1 ml 培養液中，以 37°C、250 rpm 隔夜培養後，取 0.6 ml 倒入 30 ml 培養液中(1:50 稀釋)，於 37°C、250 rpm 培養 3 小時(OD₆₀₀ 值約 1.3)。如為測試加海藻糖後影響的組別，此時加入海藻糖(0 mM、1 mM、10 mM、100 mM)於 37°C 前處理一小時後，加入 IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside, 1 mM)於 30°C、250 rpm 進行蛋白質誘導表現 3 小時。取 1 ml 誘導前及誘導後菌液，離心沉澱細菌後，保存於-20°C 冰箱備用。抽取蛋白時，先以 PBS 緩衝液清洗並懸浮細菌後，加入 60 μl PBS 以 sonication 懸浮細菌後，再加入 20 μl SDS 膠體電泳樣本溶液震盪將細菌打破，煮沸、離心後取 15 μl 上清液跑 10% SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳，電泳膠片以 Comassie blue 染色。

此外，將未經染色的蛋白質樣品由電泳膠片轉漬到硝化纖維膜(nitrocellulose membrane, 0.45 μm)上。轉漬完成後，以 blocking buffer (5% skim milk in 1 \times PBS)浸泡數小時。硝化纖維膜經清洗後，加入 α -突觸核蛋白及綠螢光蛋白一級抗體(1:500 稀釋)，在常溫下作用兩小時。之後以 wash buffer 清洗三次，再加入二級抗體 horseradish peroxidase (HRP)共軛之羊抗鼠或羊抗兔 IgG (1:5000 稀釋)，作用於室溫兩小時。之後以 wash buffer 清洗三次，再以冷光呈色劑處理後放入 ImagerReader LAS-4000 儀器中，偵測表現的 α -突觸核蛋白及 Venus 螢光蛋白。

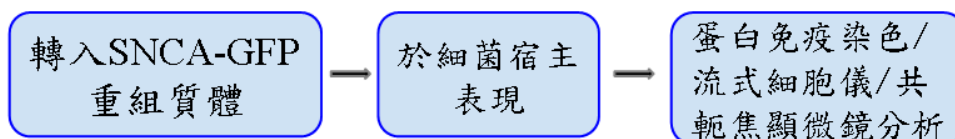
(五) Venus 螢光測定

如上述進行蛋白質誘導表現 3 小時。取 1 ml 誘導前及誘導後菌液以 PBS 清洗數次後，再以 100 μl PBS 懸浮細菌後，置於 96 孔黑盤(SPL 30296)中，並以 Bio-Tek FLX800 機器激發光譜(485/20 nm)、散發光譜(528/20 nm)測量 Venus 螢光亮度。另外取誘導後菌液 1 ml，以 Becton Dickinson FACS Calibur 流式細胞儀分析其螢光，

每次收取 50000 顆細菌。

蛋白質摺疊報告者試驗

(一)實驗設計



Wild type	35/46/61 E-to-K
MDVFMKGLS KAKEGV VAA	MDVFMKGLS KAKEGV VAA
AEKTKQGVAEAAAG KTKKEG	AEKTKQGVAEAAAG KTKKEG 35
V LYVGS SKTKKEGV VHGVAT	V LYVGS SKTKKEGV VHGVAT 46
V A E KTKKQV TNVGGAVVT	V A E KTKKQV TNVGGAVVT 61
GVTAVAQKTVEGAGSIAA	GVTAVAQKTVEGAGSIAA
ATGFVKKDLGKNEEGAP	ATGFVKKDLGKNEEGAP
QEGILEDMPVDPDNEAYE	QEGILEDMPVDPDNEAYE
MPSEEGYQDYEPEA	MPSEEGYQDYEPEA

取本實驗室製備的野生型(wild type)及傾向錯誤摺疊的突變型(35/46/61 E-to-K 點突變) α -突觸核蛋白-綠螢光蛋白重組質體(pET-28a/SNCA-GFP)，轉型入大腸桿菌表現宿主後，檢測蛋白表現後，再加入已知可幫助 α -突觸核蛋白摺疊的海藻糖，藉流式細胞儀螢光測定及共軛焦顯微鏡觀察，來測試此蛋白質摺疊報告者平台。

(二)原核細胞的蛋白誘導表現

野生型及突變型 α -突觸核蛋白-綠螢光蛋白重組質體的轉型入表現宿主如上述。隔夜培養後挑單一菌落，接種於 2 ml 培養液中，以 37°C、250 rpm 隔夜培養後，取 0.6 ml 倒入 30 ml 培養液中(1:50 稀釋)，於 37°C、250 rpm 培養 3 小時(OD₆₀₀ 值約 1.3)。如為測試加海藻糖後影響的組別，此時加入海藻糖(0 mM、0.1 mM、1 mM、10 mM)於 37°C 前處理一小時後，加入 IPTG 於 37°C、250 rpm 進行蛋白質誘

導表現 3 小時。取 1 ml 誘導前及誘導後菌液，如上述抽取蛋白質，以綠螢光蛋白及新黴素磷酸轉移酶(1:1000 稀釋)一級抗體進行免疫染色分析。

(三) GFP 螢光測定

如上述進行蛋白質誘導表現 3 小時。取 1 ml 誘導後菌液，以 Becton Dickinson FACS Calibur 流式細胞儀分析其螢光，每次收取 50000 顆細菌。

(四) 共軛焦顯微鏡觀察

如上述進行蛋白質誘導表現 3 小時。取 10 μ l 誘導後菌液，與 10 μ l SouthernBiotech Fluoromount-G 螢光封片劑混合，取 10 μ l 混合液滴於載玻片上，覆蓋蓋玻片後，以透明指甲油封片，再用共軛焦顯微鏡於 100 倍油鏡下觀察。

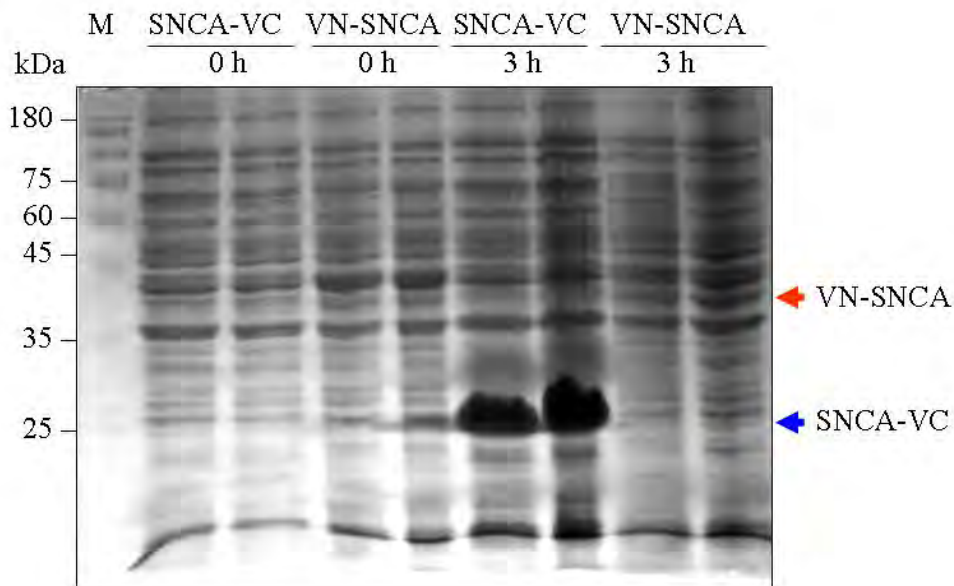
三、研究結果與討論

雙分子螢光互補試驗

(一) VN-SNCA、SNCA-VC 各自獨立誘導表現的蛋白質分析

pET28a/SNCA-VC₂₁₂₋₂₃₉、pET32a/VN₁₋₂₁₁-SNCA 在誘導表現 3 小時後，以 Comassie blue 染色時可以看見明顯誘導的 25 kDa 較小分子量的 SNCA-VC 融合蛋白，而 40 kDa 較大分子量的 VN-SNCA 融合蛋白則不明顯(圖四)，但可經蛋白質的免疫染色確認無誤。較大分子量的 VN-SNCA 融合蛋白可能因為溶解性差而隱藏於細菌的包涵體(inclusion body)，導致僅萃取出微量的 VN-SNCA 融合蛋白。當調整誘導表現的溫度為 25°C 時，可稍微提升可溶性 VN-SNCA 融合蛋白的量。

SNCA-VC、VN-SNCA 獨立誘導表現



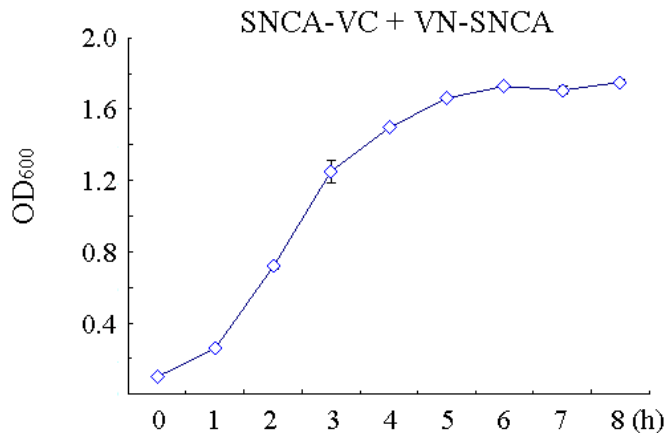
圖四、VN-SNCA、SNCA-VC 各自獨立誘導表現的蛋白質分析。紅色箭頭：VN₁₋₂₁₁-SNCA 蛋白，藍色箭頭：SNCA-VC₂₁₂₋₂₃₉ 蛋白。

(二) VN-SNCA、SNCA-VC 共轉型細菌的生長曲線

取帶有 VN-SNCA、SNCA-VC 兩個重組質體的大腸桿菌隔夜培養液(OD 值約

1.6-1.7)，稀釋 50 倍後每小時測量細菌生長的 OD 值，得到圖五生長曲線。放大培養 3 小時後細菌宿主的 OD 值達 1.3，此時細菌生長速度較趨緩，並於放大培養 5 小時後達到飽和。依據此結果，之後的實驗我們選擇在放大培養 3 小時後進行 VN-SNCA、SNCA-VC 的共誘導實驗。

SNCA-VC + VN-SNCA 共轉型細菌的生長曲線

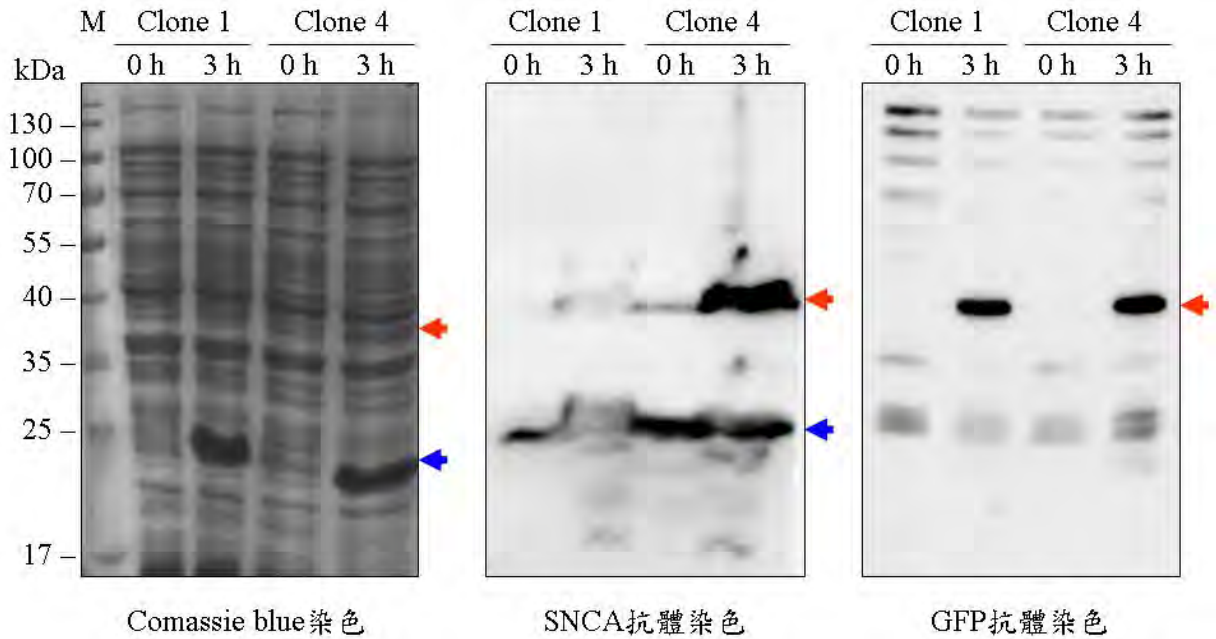


圖五、VN-SNCA、SNCA-VC 共轉型細菌的生長曲線。

(三) VN-SNCA、SNCA-VC 的共誘導表現的蛋白質分析

將 pET32a/VN₁₋₂₁₁-SNCA 重組質體以電穿孔方式轉型入表現宿主 BL21(DE3) 細胞內後，製備成轉型勝任細胞(內含 VN₁₋₂₁₁-SNCA 重組質體)，再轉型入 pET28a/SNCA-VC₂₁₂₋₂₃₉，即可篩選出 VN₁₋₂₁₁-SNCA、SNCA-VC₂₁₂₋₂₃₉ 共轉型的表現宿主。此表現宿主細胞經誘導後可同時表現 SNCA-VC、VN-SNCA 蛋白(圖六)。

SNCA-VC + VN-SNCA 共誘導表現



圖六、VN-SNCA、SNCA-VC 共誘導表現的蛋白質分析。挑取 VN₁₋₂₁₁-SNCA、SNCA-VC₂₁₂₋₂₃₉ 共轉型的表現宿主 clone 1 & clone 4，誘導 VN-SNCA、SNCA-VC 共表現後的蛋白膠片(Comassie blue 染色)及西方墨點法(SNCA 抗體染色 & GFP 抗體染色)影像。所使用的 GFP 抗體染色僅能辨識螢光蛋白的 N 端。紅色箭頭：VN₁₋₂₁₁-SNCA 蛋白，藍色箭頭：SNCA-VC₂₁₂₋₂₃₉ 蛋白。

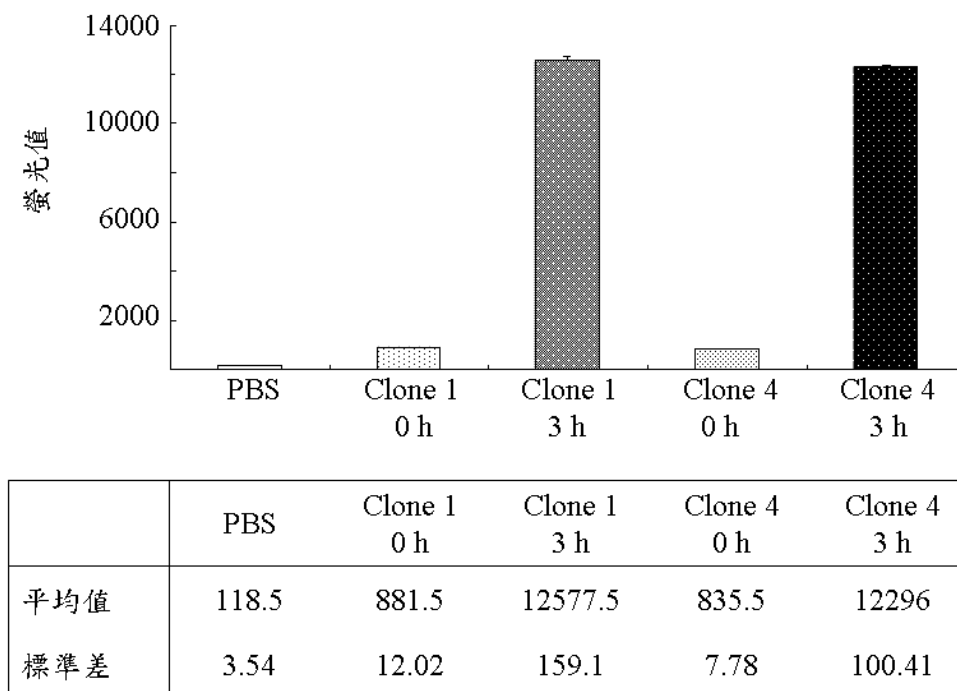
剛開始時我們嘗試同時將 VN-SNCA (以 ampicillin 篩選)、SNCA-VC (以 kanamycin 篩選) 共轉型入 BL21(DE3) 表現宿主，但無法篩選出同時帶有兩種重組質體的菌落。以 SNCA (以 ampicillin 篩選)、Venus (以 kanamycin 篩選) 共轉型的實驗，也是無法一次篩選出同時帶有兩種重組質體的菌落。此或許與質體的不相容性 (plasmid incompatibility，即同種的或親緣關係相近的兩種質體不能同時穩定地保持在一個細胞內的現象) 相關。經與老師討論後，我們嘗試先將一個質體轉型入表現宿主後，做成轉型勝任細胞，再轉入第二個質體。結果發現只有將 VN-SNCA (以 ampicillin 篩選，40 kDa 融合蛋白) 先做成勝任細胞再轉入 SNCA-VC (以 kanamycin

篩選，25 kDa 融合蛋白)，或是將 SNCA (以 ampicillin 篩選，16 kDa α -突觸核蛋白) 做成勝任細胞再轉入 Venus (以 kanamycin 篩選，26 kDa 螢光蛋白)，才能長出菌落。如此單一方向的原因，尚有待進一步的探討。

(四) VN-SNCA、SNCA-VC 的共誘導表現的螢光分析

上述 VN-SNCA、SNCA-VC 的共誘導表現的菌落 1 & 4 在誘導前及誘導後的螢光分析顯示於圖七。扣除 PBS 的背景值後，菌落 1 & 4 在誘導 3 小時後的互補螢光值分別為誘導前的 16.3 & 17.0 倍。

SNCA-VC + VN-SNCA 共誘導表現螢光分析



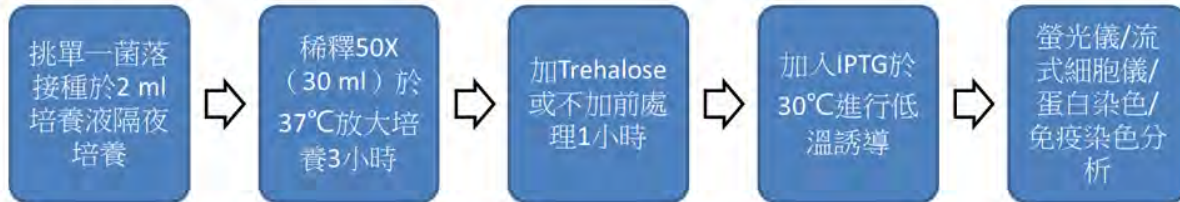
圖七、VN-SNCA、SNCA-VC 共誘導表現的螢光分析。挑取 VN₁₋₂₁₁-SNCA、SNCA-VC₂₁₂₋₂₃₉ 共轉型的表現宿主 clone 1 & clone 4，誘導 VN-SNCA、SNCA-VC 共表現後的螢光數值。

(五) 海藻糖處理對 VN-SNCA、SNCA-VC 的共誘導表現的螢光及蛋白質分析

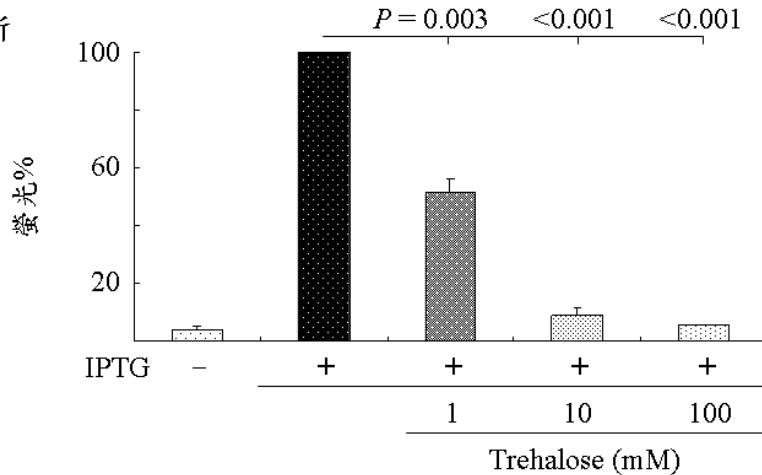
此外，我們以已知可干擾 α -突觸核蛋白聚集的海藻糖，來測試此聚集抑制物篩選平台。結果如圖八所示，若以未加入海藻糖的組別所偵測到的螢光為 100%，1-100 mM 海藻糖可顯著抑制 α -突觸核蛋白聚集所導致的互補螢光(螢光儀分析結果: 51%-5%， $P = 0.003 - <0.001$; 流式細胞儀分析結果: 60%-19%， $P = 0.002$)，海藻糖濃度與螢光下降程度呈正相關，而兩者下降程度略有差異，估計與測定波長有關。蛋白質免疫染色分析結果表現的融合蛋白並未與螢光下降程度相關。推測因海藻糖能減少 SNCA 聚集，導致螢光分子互補的機率下降。

海藻糖前處理的SNCA-VC + VN-SNCA共誘導表現螢光/蛋白分析

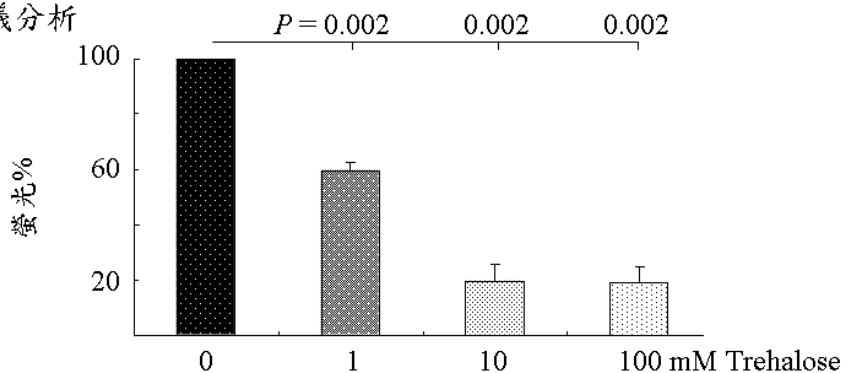
實驗流程圖

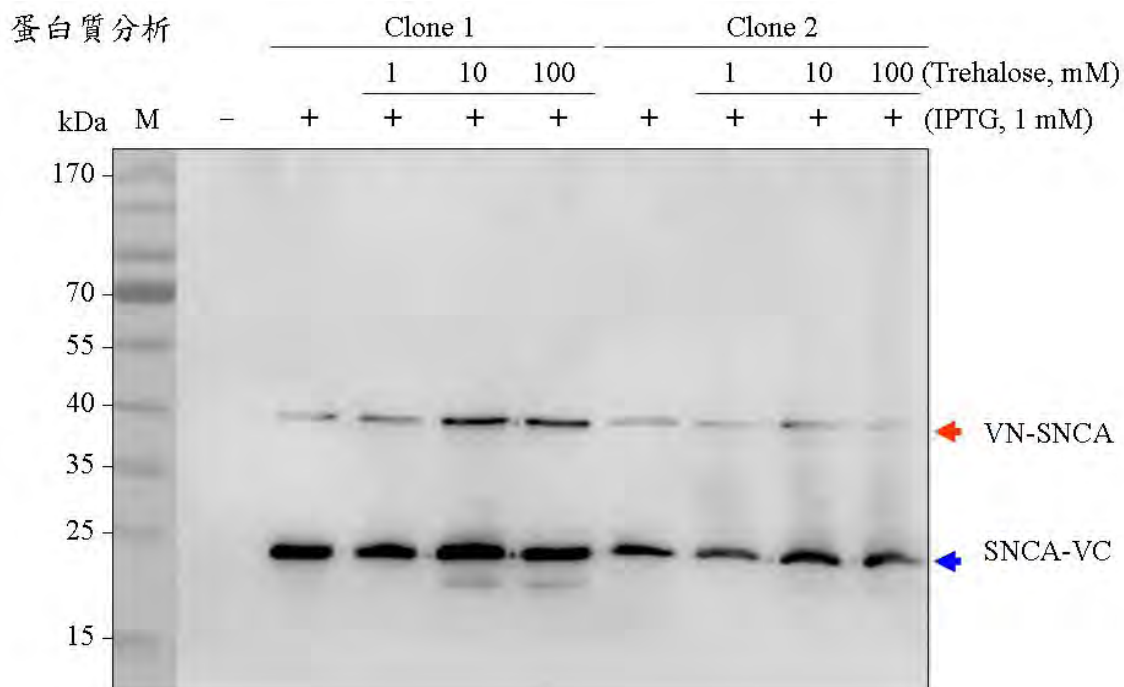


螢光儀分析



流式細胞儀分析





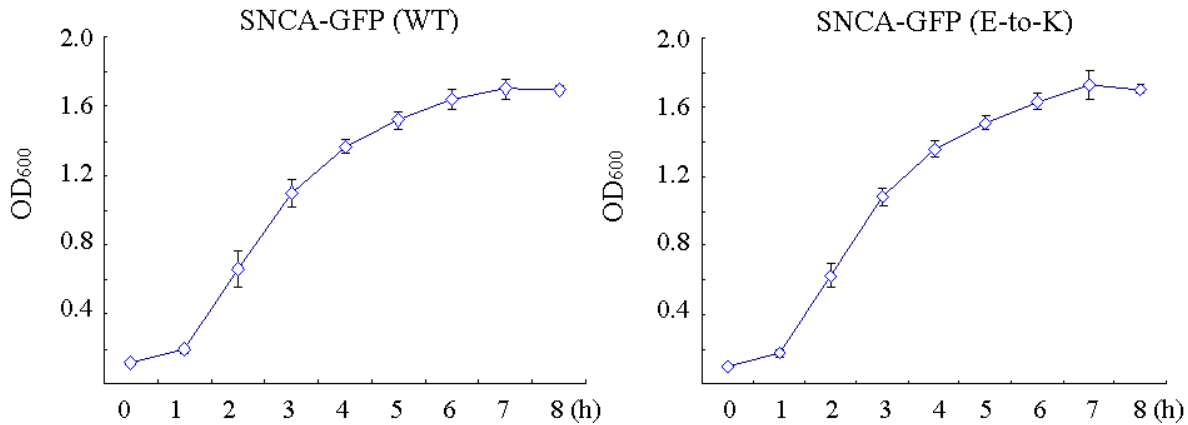
圖八、VN-SNCA、SNCA-VC 共表現細菌加海藻糖前處理後的螢光及蛋白質分析。加入海藻糖(Trehalose, 1-100 mM) 前處理 1 小時後，於 30°C 誘導 VN-SNCA、SNCA-VC 蛋白表現 3 小時，以螢光儀及流式細胞儀分析螢光數值，並以 SNCA 抗體的免疫染色分析表現的融合蛋白。紅色箭頭：VN₁₋₂₁₁-SNCA 蛋白，藍色箭頭：SNCA-VC₂₁₂₋₂₃₉ 蛋白。

蛋白質摺疊報告者試驗

(一) SNCA-GFP 轉型細菌的生長曲線

我們在進行誘導前將養隔夜的菌液稀釋 50 倍，以每小時為單位測量了帶有野生型(WT)或突變型(E-to-K)重組質體的大腸桿菌宿主的生長曲線，以了解本試驗細菌宿主的生長趨勢，藉此找出最適合進行誘導的時間。如圖九所示，細菌宿主在一到兩小時間的菌液密度快速增加，五到六小時之後菌液密度呈現平緩趨勢，即生長達到飽和期。為避免生長速率受前處理海藻糖不同濃度的影響，我們選擇放大培養 3 小時(OD 值約 1.3)的時候誘導 SNCA-GFP 蛋白表現 3 小時，再以螢光值測定或共軛焦顯微鏡觀察，來檢視 α -突觸核蛋白摺疊的情形。

SNCA-GFP 轉型細菌的生長曲線



圖九、SNCA-GFP (WT)、SNCA-GFP (E-to-K) 轉型細菌的生長曲線。

(二) 海藻糖處理對 SNCA-GFP 誘導表現的螢光及蛋白質分析

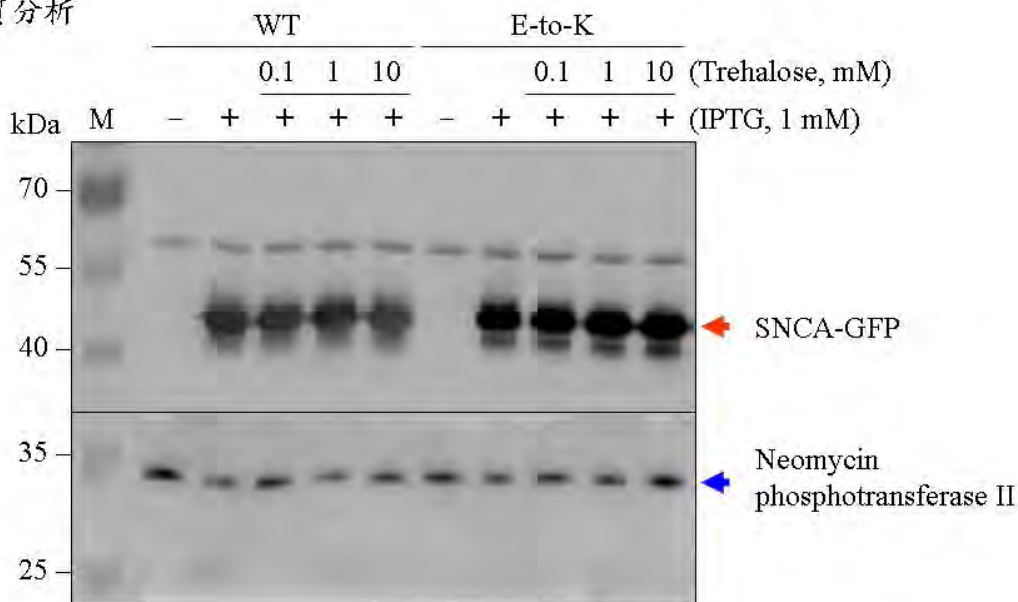
上述大腸桿菌放大培養 3 小時後，加入海藻糖(0.1-10 mM)前處理 1 小時，之後加入 IPTG 於 37°C 誘導 SNCA-GFP 蛋白質表現。3 小時後蒐集細菌，進行 SNCA-GFP 的螢光及蛋白質分析。如圖十所示，以 GFP 抗體免疫染色分析結果可確認誘導的野生型及突變型蛋白都有表現，且可發現加海藻糖對兩者蛋白質表現量均無顯著影響。

海藻糖前處理的 SNCA-GFP 誘導表現螢光/蛋白分析

實驗流程圖



蛋白質分析



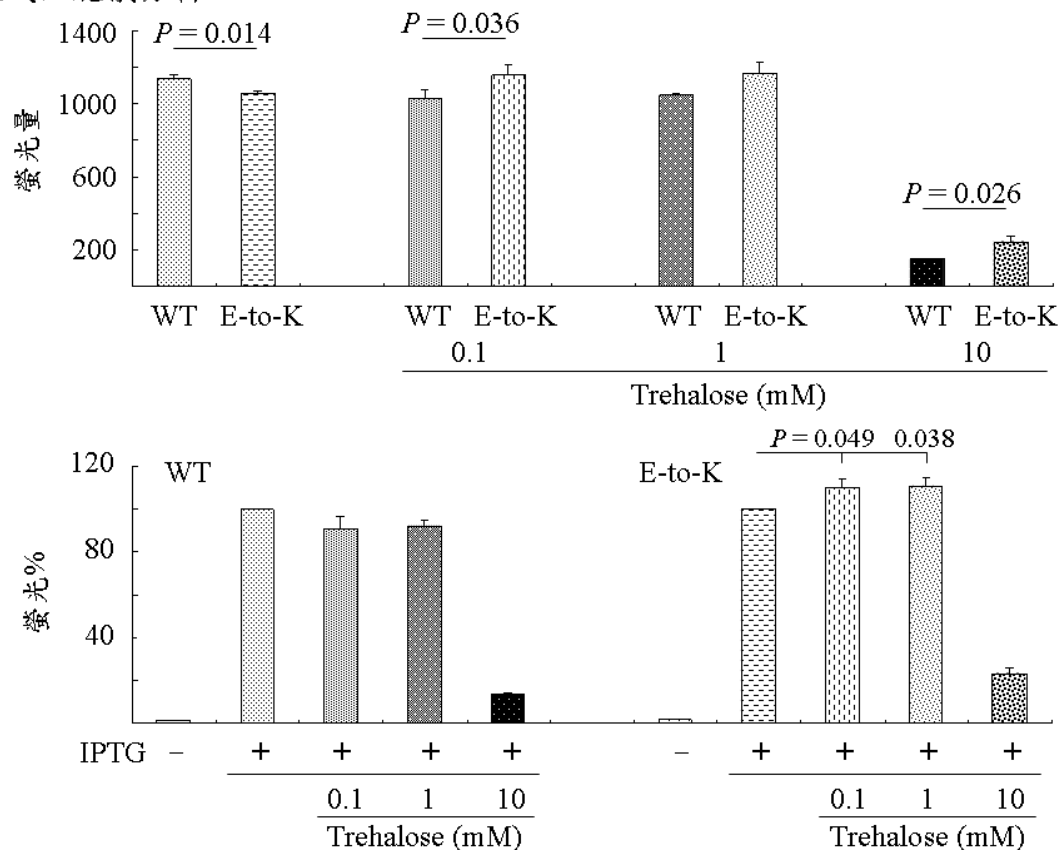
圖十、SNCA-GFP (WT)、SNCA-GFP (E-to-K)轉型細菌加海藻糖前處理後的蛋白質分析。加入海藻糖(Trehalose, 0.1-10 mM) 前處理 1 小時後，於 37°C 誘導 SNCA-GFP (WT)、SNCA-GFP (E-to-K)蛋白表現 3 小時，以 GFP 抗體及 Neomycin phosphotransferase II 抗體(做為內在對照)進行免疫染色，分析表現的融合蛋白。紅色箭頭：SNCA-GFP 蛋白，藍色箭頭：Neomycin phosphotransferase II。

上述大腸桿菌的流式細胞儀螢光測定結果顯示於圖十一。當融合的綠螢光蛋白折疊越好的時候，螢光越亮。加或不加海藻糖的大腸桿菌，所偵測到的 SNCA-GFP 蛋白的平均螢光通量，野生型為 1138 (0 mM)、1030 (0.1 mM)、1047 (1 mM)、150 (10 mM)、突變型為 1054 (0 mM)、1159 (0.1 mM)、1168 (1 mM)、246 (10 mM) (上圖)，即未加海藻糖時，野生型 SNCA-GFP 蛋白螢光通量高於突變型，加入海藻糖前處理一小時後，突變型 SNCA-GFP 蛋白螢光通量高於野生型。已知突變型的 SNCA 蛋白折疊較差，使得融合的綠螢光蛋白折疊不好，可推論野生型 SNCA-GFP 蛋白螢光會比較亮，而海藻糖對於幫助突變型 SNCA 蛋白摺疊的效果較明顯，此推論與圖十一(上圖)相符。

另外，若以未加入海藻糖的組別所偵測到的野生型或突變型螢光為 100%，可

觀察到突變型的大腸桿菌經 0.1 mM 及 1 mM 海藻糖前處理 1 小時後，誘導表現的 SNCA-GFP 蛋白螢光顯著上升(110%-111% vs. 100%， $P = 0.049-0.038$) (下圖)。

流式細胞儀分析



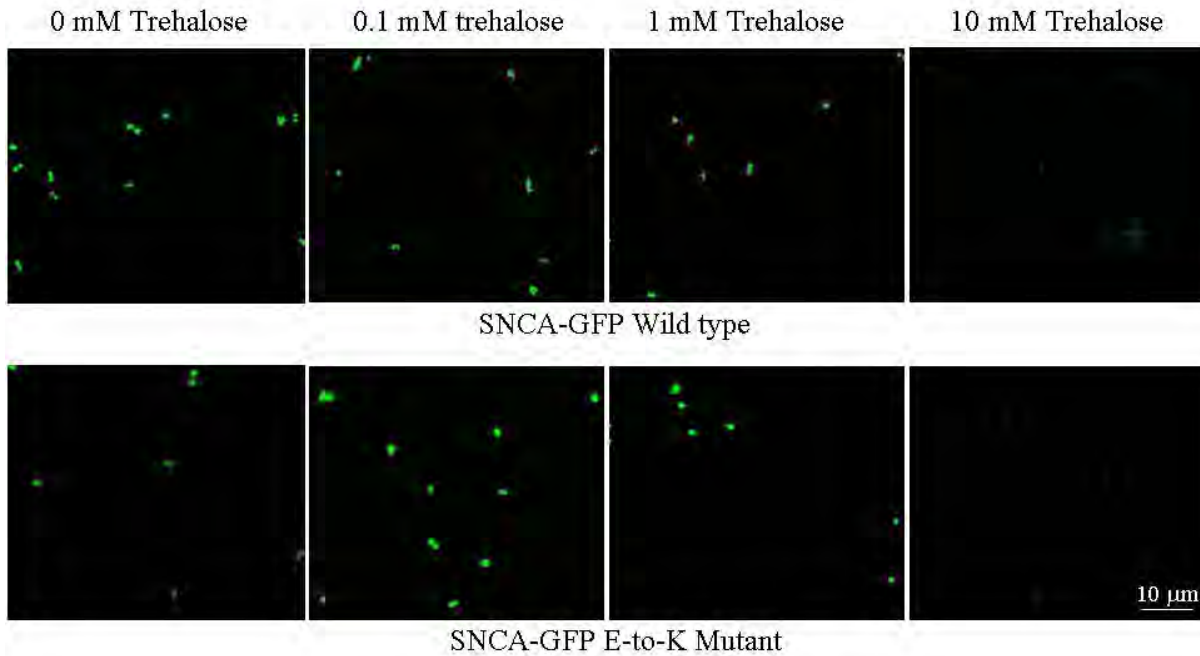
圖十一、SNCA-GFP 轉型大腸桿菌的螢光分析。SNCA-GFP (WT)、SNCA-GFP (E-to-K)加或不加海藻糖(Trehalose, 0.1-10 mM)前處理 1 小時後，於 37°C 誘導 SNCA-GFP 蛋白表現 3 小時，以流式細胞儀分析螢光數值。上圖為平均螢光通量，下圖為以未加入海藻糖處理者為 100%的量化圖。

(二)海藻糖處理對 SNCA-GFP 誘導表現的共軛焦顯微鏡觀察

共軛焦顯微鏡觀察結果如圖十二所示，未經海藻糖前處理的組別中，野生型的 SNCA 蛋白螢光比突變型的 SNCA 蛋白螢光亮，此現象是因突變型的 SNCA 蛋白折疊較差所致。在經海藻糖前處理的組別中，突變型融合蛋白的螢光較野生型融合蛋白亮，推測是海藻糖對於突變型融合蛋白折疊的幫助較大，使得突變型融合蛋白

的螢光上升。

海藻糖前處理的SNCA-GFP 誘導表現共軛焦顯微鏡觀察



圖十二、SNCA-GFP 轉型大腸桿菌的共軛焦顯微鏡觀察影像。SNCA-GFP (WT)、SNCA-GFP (E-to-K)加或不加海藻糖(Trehalose, 0.1-10 mM)前處理 1 小時後，於 37 °C 誘導 SNCA-GFP 蛋白表現 3 小時，以共軛焦顯微鏡於 100 倍油鏡下觀察。

討論

α -突觸核蛋白可以 β 構形折疊形成單元體，此 β 構形單元體容易進一步聚集。 α -突觸核蛋白亦可以 α 構形折疊，此 α 構形單元體容易形成有生理功能的四元體。本研究建立的雙分子螢光互補平台，若源自 β 構形單元體的聚集，則篩選出的聚集抑制物會使互補螢光下降。就本試驗結果所示，加入可干擾 α -突觸核蛋白聚集的海藻糖前處理後，誘導表現出的互補螢光顯著下降，推測是因 SNCA 蛋白聚集減少，使得螢光分子互補發光的機率下降。未來亦可進一步探討所篩選出會影響互補螢光的化合物的作用機制。

另外，本研究建立的蛋白質折疊報告者平台，篩選幫助 α 構形折疊的化學伴隨

蛋白(chemical chaperone)，檢測的化合物若能使螢光上升，推測與蛋白質折疊改善有關，使得融合的綠螢光蛋白能折疊的更好。而本試驗中，突變型的 SNCA 融合蛋白螢光在經海藻糖前處理後，螢光呈上升趨勢，推測是原本折疊的不好，經前處理後蛋白質折疊改善所致。

四、結論與應用

本研究建立的雙分子螢光互補試驗與蛋白質折疊報告者試驗，以螢光變化趨勢探討蛋白質的聚集、折疊與其相關性。我們利用海藻糖能防止蛋白質變性的性質來檢測兩篩檢平台，以確認螢光變化的意義。未來我們將利用此兩種原核細胞平台，來篩檢可幫助 α -突觸核蛋白摺疊的新穎化學伴隨蛋白，提供基礎學理及應用上的新觀點，以助益於帕金森氏症的治療藥物開發。

五、參考文獻

- 林瑞榮(2000)。α-Synuclein 與巴金森氏病之致病機轉。台灣醫界 No. 9。
- 林榮耀等(2008)。生物化學。
- 施孟奇(2014)。探討在帕金森氏疾病中 α-synuclein 基因上產生不同的點突變所造成的影響。
- 曾哲明(2008)。分子生物學。台北：新文京開發出版有限公司。
- 關政平等(2006)。生物技術概論。台中：華格納企業。
- Dettmer U, et al. (2015) Parkinson-causing α-synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. *Nat Commun* 6:7314.
- Dettmer U, et al. (2015) KTKEGV repeat motifs are key mediators of normal α-synuclein tetramerization: Their mutation causes excess monomers and neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:9596-9601.
- Nagai T, et al. (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20:87-90.
- Ohashi K, et al. (2012) Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments. *Biotechniques* 52:45-50.
- Ruzza P, et al. (2015) Effects of trehalose on thermodynamic properties of α-synuclein revealed through synchrotron radiation circular dichroism. *Biomolecules* 5:724-734.

【評語】 080012

建立一個新穎 α -突觸核蛋白(SNCA)聚集抑制物原核篩檢平台，可應用於帕金森氏症治療藥物的篩檢，創新性及應用性均高，後續之測試宜再加強以驗證可行性。