



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101948523 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 19

(21) 申请号 201010264251. 2

G01N 30/00(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 26

G01N 23/22(2006. 01)

(71) 申请人 北京交通大学

地址 100044 北京市海淀区西直门外上园村  
3号

(72) 发明人 张莹 洪涛 彭向雷

(74) 专利代理机构 北京市商泰律师事务所  
11255

代理人 毛燕生

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006. 01)

C12N 15/12(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

A61K 38/17(2006. 01)

A61P 25/28(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

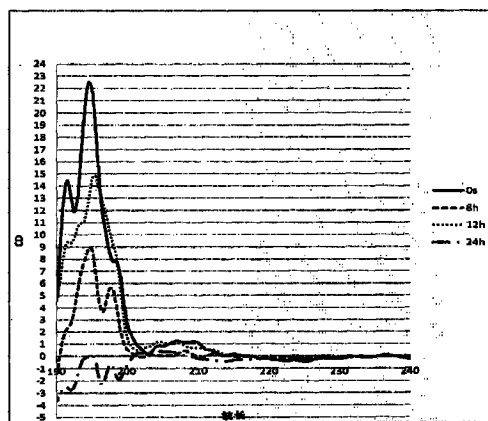
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

## (54) 发明名称

一种低分子量淀粉样肽寡聚体的人工体外制备方法和用途

## (57) 摘要

一种低分子量淀粉样肽寡聚体的人工体外制备方法和用途,其特征是将基因重组方法得到的Aβ多肽的单体用无水二甲基亚砜溶解后,置于缓冲体系中反应,使其自然聚合形成寡聚体。本发明提供的基因重组得到单体的方法经济、环保;以Aβ为原料在体外组装淀粉样肽寡聚体时,通过模拟体内生理条件,改良人工脑脊液组成,所得产物稳定均一。本方法制备的寡聚体可以作为多种阿尔茨海默病检测和治疗研究的标准参照物,在制备阿尔茨海默病诊断试剂和治疗药物中获得应用。



1. 一种低分子量淀粉样肽寡聚体的人工体外制备方法,其特征是将 A $\beta$  多肽的单体用无水二甲基亚砷溶解后,于 4℃置于缓冲体系中反应 22 ~ 26 小时,使其自然聚合形成寡聚体;所述缓冲体系组成是:NaCl 125mmol/L, KCl 3.3mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 26mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2.5mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 2.4mmol/L, 葡萄糖 5mmol/L, 氨基酸 0.3g/L。

2. 权利要求 1 所述的方法,所述 A $\beta$  多肽的单体是用基因重组的方法得到淀粉样肽单体。

3. 权利要求 1 所述的方法,反应时间为 24 小时。

4. 权利要求 1 或 2 所述的方法,所得的寡聚体是在透射电镜下观察直径 100nm 以下的球形颗粒物,分子量为 16 ~ 40kD。

5. 一种基因重组制备 A $\beta$  多肽的单体的方法,在 N 端加组氨酸标签组 6 $\times$ His, C 端加终止子序列 TGA,构建 A $\beta$  42 单体表达载体,在大肠杆菌表达体系内表达,用 Ni 柱纯化目的多肽;然后于室温下将 A $\beta$  42 单体溶于冰预冷 1 ~ 2h 的六氟异丙醇,通过送风挥发,完全除去六氟异丙醇,形成肽膜。

6. 一种人工脑脊液,其组成是:NaCl 125mmol/L, KCl 3.3mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 26mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2.5mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 2.4mmol/L, 葡萄糖 5mmol/L, 氨基酸 0.3g/L。

7. 权利要求 1 所得到的低分子量淀粉样肽寡聚体在制备诊断、预防和治疗阿尔茨海默病的药物、试剂中的应用。

8. 权利要求 7 所述的应用,其特征是将权利要求 1 所得到的低分子量淀粉样肽寡聚体作为标准品,分别利用酶联免疫吸附试验、Western blot 实验、透射电镜或 CD 实验方法,分别制备检测阿尔茨海默病的试剂。

## 一种低分子量淀粉样肽寡聚体的人工体外制备方法和用途

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及一种低分子量淀粉样肽寡聚体的人工体外制备方法。本发明还涉及所述寡聚体在制备阿尔茨海默病的诊断试剂和治疗药物中的应用。

### 背景技术：

[0002] 淀粉样肽寡聚体（亦称为 A $\beta$  寡聚体）被认为是阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）早期病理改变的始动因素。最新研究表明，只有低分子量 A $\beta$  寡聚体才是引起 AD 神经元损伤的毒性物质，高分子量聚集物和纤维成分不具有这种作用。在人体外人工制备该淀粉样肽寡聚体，有助于研究阿尔茨海默病的致病机理和治疗方法。

[0003] 淀粉样肽在体外容易形成包含纤维和不具有纤维形态的高分子量或低分子量聚集物在内的混合物。这种组分不均一的混合物影响研究的准确性和可靠性。因此，获得稳定均一的低分子量 A $\beta$  寡聚体对科研工作非常重要。

[0004] 众多学者曾采用多种方法制备 A $\beta$  寡聚体，但收率和效果比较低，并且所得 A $\beta$  寡聚体的成分不均一，含有较多成分的高分子量聚集物和纤维状成分，难以进一步提纯。如，利用化学交联法制备的寡聚体在成分上有差异，不能真实反应低分子量 A $\beta$  寡聚体的作用特点。而且各制备方法的条件不稳定，所得结果难以比较。有些方法和材料具有较大的不良反应，影响试验者和应用者的健康。

[0005] 因此，研制一种新型人工体外淀粉样肽寡聚体制备方法，获得均一可溶性低分子量的淀粉样肽寡聚体，确有必要。

### 发明内容：

[0006] 本发明的目的是提供一种低分子量淀粉样肽寡聚体的制备方法，直接目的是提供均一分子量的淀粉样肽寡聚体，具有特征性的超微形态和二级结构，可用于制备阿尔茨海默病的诊断试剂和治疗药物。

[0007] 本发明的技术方案如下：

[0008] 一种低分子量淀粉样肽寡聚体的人工体外制备方法，其特征是将 A $\beta$  多肽的单体用无水二甲基亚砷溶解后，于 4℃ 置于缓冲体系中反应 22 ~ 26 小时，使其自然聚合形成寡聚体；所述缓冲体系组成是：NaCl 125mmol/L, KCl 3.3mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 26mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2.5mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 2.4mmol/L, 葡萄糖 5mmol/L, 氨基酸 0.3g/L。

[0009] 所述淀粉样肽特指由其前体蛋白 APP (amyloid precursor protein) 经过蛋白酶降解形成的表观分子量为 4kD 的多肽；

[0010] 本发明所用的缓冲体系是改良的人工脑脊液，在传统人工脑脊液的基础上调整了葡萄糖和氨基酸含量，其改良后的组成接近于正常脑脊液，有利于模拟体内生理条件。

[0011] 最佳反应时间为 24 小时。

[0012] 所得寡聚体是在透射电镜下观察为直径 100nm 以下的球形颗粒物，分子量为 16 ~ 40kD。

[0013] 所述 A $\beta$  多肽的单体可以用传统的化学合成方法制备,如,以 A $\beta$  42 为原料,通过六氟异丙醇 (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, HFIP) 的作用使其单体化。

[0014] 所述 A $\beta$  42 基因序列是已知的, Genbank 登录号 BC065529 ;

[0015] 本发明提供了一种用基因重组的方法得到淀粉样肽单体,更为经济和环保,所得到的淀粉样肽单体质量更好,方法是:在 N 端加组氨酸标签 (6 $\times$ His), C 端加终止子序列 TGA, 构建 A $\beta$  42 单体表达载体,按照常规方法在大肠杆菌表达体系内表达,用 Ni 柱纯化目的多肽。然后于室温下将 A $\beta$  42 单体溶于冰预冷 1 ~ 2h 的六氟异丙醇,通过送风挥发,完全除去六氟异丙醇,形成肽膜。

[0016] 本发明所制备的人工体外淀粉样肽寡聚体在电子显微镜下分析,可以看到纳米级的微粒。利用圆二色谱 (Circular dichroism, CD) 法分析其二级结构,可以检测到特征性的寡聚体负峰。

[0017] 利用蛋白免疫印迹的方法可以验证制备出分子量在 16.5kD 范围内的 A $\beta$  寡聚体。

[0018] 本研究首先构建了 A $\beta$  单体的原核表达杂载体,诱导表达并且纯化后,通过 HFIP 将其单体化,用蛋白免疫印迹的方法验证获得了所需的单体。

[0019] 本发明对制备的人工体外淀粉样肽寡聚体进行了如下实验:

[0020] 1、免疫印迹 (Western blot) 实验

[0021] 目的:验证所得寡聚体是成分均一的,并且具有免疫反应性。

[0022] 结果显示:所得寡聚体能够被抗人 A $\beta$  单克隆抗体 6E10 特异性识别,并且在 16.5kD 左右的范围内有均一条带 (见实施例 3)。说明所得寡聚体是低分子量的均一成分,并且具有免疫反应性。

[0023] 用于蛋白质免疫印迹的最佳淀粉样肽寡聚体样品质量为 5 $\mu$ g/孔。

[0024] 2、透射电镜检测

[0025] 目的:验证所得寡聚体是纳米级的均一微粒。

[0026] 结果显示:在透射电镜下观察到 5nm 到 10nm 左右的球形寡聚体,随着聚集过程,出现颗粒状以及 20-30nm 的卷曲结构和丝状或分枝状的纤维 (见实施例 4)。说明所得寡聚体具有特征性的超微结构。

[0027] 3、圆二色谱检测

[0028] 目的:验证所得寡聚体具有特征性的二级结构。

[0029] 结果显示:聚集过程中  $\alpha$  螺旋向  $\beta$  折叠转变 (见实施例 5)。说明所得寡聚体获得了特征性的二级结构。

[0030] 用本发明获得的淀粉样肽寡聚体可以制备出诊断、预防和治疗阿尔茨海默病的药物、试剂等。

[0031] 例如,可以采用基因工程方法,构建和 / 或表达多种小分子基因工程疫苗、多肽疫苗,以便用于 AD 预防和早期治疗的基础与临床研究和应用。

[0032] 本发明人以所获得的淀粉样肽寡聚体作为标准品,利用夹心 ELISA 法 (酶联免疫吸附试验)、Western blot 实验、透射电镜和 CD 等实验方法,分别制备出了四种不同方法的检测阿尔茨海默病的试剂。

[0033] 本发明的优点:

[0034] 首先,本发明模拟体内生理条件,以 A $\beta$  为原料在体外组装淀粉样肽寡聚体,所得

产物稳定均一。这一点优于其它“化学交联”法的效果。

[0035] 其次,本发明优化了制备中的关键参数,所得产物可以作为多种 AD 检测和治疗研究的标准参照物。确定了获得 A $\beta$  单体的最佳方法、改良人工脑脊液组成、确定关键时间点为 24h。

[0036] 第三,用基因重组方法得到单体的好处是,经济、环保、基因能够在体外扩增和表达,可再生性强。

#### 附图说明:

[0037] 图 1 为 Western blot 实验验证单体的获得。单体条带位于 6.5kD 下方附近约 4kD 的位置。

[0038] 图 2 为 Western blot 实验验证淀粉样肽寡聚体形成的结果。图中 1 为淀粉样肽的单体;图中 2 为淀粉样肽的寡聚体,条带位于 16.5kD 下方位置。

[0039] 图 3 为透射电镜下淀粉样肽寡聚体的形态特征。A. 只有寡聚体形成,没有纤维状或分枝状的结构;B. 有大量纤维形成。

[0040] 图 4 圆二色谱检测淀粉样肽寡聚体二级结构特征(于 24h 时可见明显的负峰)。

#### 具体实施方式:

[0041] 实施例 1 淀粉样肽单体的获得

[0042] 1、基因重组法

[0043] A $\beta$  42 基因(Genebank 登录号 BC065529)委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成,并安装在带有 6 $\times$ His 标签的原核表达载体上组成 NAbeB-pET30a 表达质粒。然后转化大肠杆菌 BL21,进行诱导表达。取 NAbeB-pET30a-BL21 冻存菌液,在 Kana 抗性的 LB 培养板上划线,37 $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 16h;挑取生长良好的单菌落到 7ml 具有 Kana 抗性的 LB 培养液中,260rpm,37 $^{\circ}$ C 过夜培养;大约培养 4h 后菌液 OD 值达到 0.6,此时加入终浓度为 1mmol/l 的 IPTG 进行诱导,6h 后 12000rpm,4 $^{\circ}$ C 离心 15min 收集菌体;用 PBS 洗涤菌体两次,12000rpm,4 $^{\circ}$ C 离心 15min 收集菌体;每 500ml 菌液收集的菌体中加入 30ml 裂解液重悬细菌,充分混和,300w,工作 10s,间歇 15s 超声破碎菌体 90 分钟;12000rpm,4 $^{\circ}$ C 离心 15min,将上清转移到新的离心管中,-80 $^{\circ}$ C 保存。

[0044] 对表达产物进行纯化。平衡 Ni 柱子,每个 15ml 离心管中取 0.6ml Ni-NTA Agarose(QIAGEN 公司产品),分别加入 2ml 裂解缓冲液(QIAGEN 公司产品),混匀,室温 5440g 离心 1min 弃上清,重复 3 次;将菌液上清 30ml 于 Ni-NTA Agarose 混合后,室温 200rpm 摇动 10min;5440g 离心 1min,上清转入一新的离心管中,标记为 FL;每个离心管中的 Ni-NTA Agarose 用 5ml 的洗涤缓冲液(washing buffer)(QIAGEN 公司产品)洗涤两次,5440g,离心 1min,上清转入新的离心管中,标记为 W1 和 W2;每管用 2ml 的洗脱缓冲液(elution buffer)(QIAGEN 公司产品)洗脱三次,5440g,离心 1min,上清转入新的离心管中,标记为 E1;将上述得到的上清取少量行 SDS-PAGE 电泳,其余 -80 $^{\circ}$ C 保存。E1 即为 A $\beta$  42 多肽。

[0045] 对淀粉样肽进行单体化处理。将其 1mg 溶于冰预冷的六氟异丙醇(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, HFIP)(Sigma),室温,风速 4.5m/s,2.5h 后使 HFIP 挥发殆尽。

这时,在微量离心管的底部管壁形成薄薄的一层肽膜。

#### [0046] 2、化学合成法

[0047] A $\beta$  42 肽 (Genebank 登录号 BC065529) 也可以由上海生工生物工程技术有限公司合成。单体化的方法同“基因重组法”的处理

[0048] 所获得的单体溶解后取样,通过免疫印迹验证,详细步骤见实施例 3,结果见图 1。

#### [0049] 实施例 2 淀粉样肽寡聚体的组装

[0050] 将实施例 1 所得的肽膜用无水二甲基亚砜 (DMSO) (Sigma) 20  $\mu$  l 溶解,最后将其置于改良的人工脑脊液缓冲体系 (体积相应补足至 1ml)、置 4 $^{\circ}$ C, 24h,使其自然聚合,用 Western blot 检测寡聚体的制备情况。

[0051] 改良的人工脑脊液缓冲体系的组成: NaCl 125mmol/L, KCl 3.3mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 26mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2.5mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 2.4mmol/L, 葡萄糖 5mmol/L, 氨基酸 0.3g/L。

[0052] 在肽膜刚刚被 DMSO 溶解加入到改良的人工脑脊液缓冲体系时,也就是组装过程中的 0s 取样品 5  $\mu$  L,以备 Western blot 检测来验证单体的获得。在组装过程中的 24h 取样品,以备 Western blot 检测来验证寡聚体的获得。详细步骤见实施例 3。

#### [0053] 实施例 3 免疫印迹 (Western blot) 实验

##### [0054] 1、实验目的

[0055] 通过分子量和免疫反应性验证单体和寡聚体的获得

##### [0056] 2、实验方法

[0057] 取组装过程中 0s 和 24h 留取的 5  $\mu$  g 样品,加上 1/4 体积的 5 $\times$  样品缓冲液,混匀后上样,先以 100V 电压使蛋白通过浓缩胶。当样品进入分离胶时,调节电压使其恒定在 120V。当溴酚蓝泳动至凝胶底部时,结束电泳,取下凝胶,常规用考马斯亮蓝 R-250 染色法染色;将凝胶和硝酸纤维素膜分别放入装有印迹缓冲液的容器里平衡 10min,依次在放入滤纸、凝胶、NC 膜、滤纸,成“三明治”状,倒入转膜缓冲液,胶面朝负极,NC 膜面朝向正极,小心避免并赶去气泡。接通电源,使恒流 80mA 连续转移 2h,切断电源。

[0058] 转膜结束后,用丽春红 S 染色液 (10 $\times$  丽春红 S 贮存液配制方法为:称取丽春红 S 2g,三氯乙酸 30g,磺基水杨酸 30g,加水至 100ml;用时按照 1:10 的比例用去离子水稀释) 确定蛋白条带位置,做相应的标记。用封闭液封闭硝酸纤维素膜 (称取脱脂奶粉 5g,溶于 0.1mol/LPBST (NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44g, Tween-200.05ml, 补 ddH<sub>2</sub>O 至 1L, pH7.2 ~ 7.4) 100ml), 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。用封闭液稀释单抗 6E10 (Sigma), 浓度一般为 0.2 ~ 1  $\mu$  g/ml, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 12 ~ 14h, 或于 20 ~ 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。用 0.1mol/L PBST 洗涤硝酸纤维素膜 4 次, 每次 5 ~ 10min。用 PBS 稀释 HRP 标记的二抗, 稀释度为 1:1000, 室温孵育 1h。用 0.1mol/L PBST 洗涤硝酸纤维素膜 4 次, 每次 5min。按照 PIERCE 化学发光试剂盒说明, 将 A 液和 B 液等体积混合, 加在硝酸纤维素膜上, 2 ~ 5min 后, 用 X 光片曝光显影, 观察结果。用 Quantity One software (BIO-RAD) 软件进行条带半定量。

##### [0059] 3、实验结果

[0060] 组装 0s 时样品内的蛋白条带位于 6.5kD 下方附近约 4kD 的位置, 这是对 A $\beta$  42 单体化以后的结果, 见图 1 和图 2 的第 1 泳道。组装 24h 时样品内的蛋白条带位于 16.5kD 下方附近约 15kD 的位置, 这是对 A $\beta$  42 寡聚体的位置, 可能是 3 ~ 4 聚体的位置, 见图 2 的第

2 泳道。

[0061] 4、结论

[0062] 通过基因重组的方法获得了 A $\beta$  42 单体,约 4kD 左右,分子量大小符合。在体外组装后获得了 A $\beta$  42 寡聚体,约 15kD 左右。并别这些蛋白能够被抗人 A $\beta$  单抗 6E10 特异性识别,说明其具有正确的免疫反应性。

[0063] 实施例 4 透射电镜检测

[0064] 1、实验目的

[0065] 从形态上验证获得了 A $\beta$  42 寡聚体。

[0066] 2、实验方法

[0067] 以铜网正面吸附样品 1.5min,吸去铜网上过量的样品。将铜网正面贴附于 pH6.8 的磷钨酸 1min,然后吸去铜网上多余的磷钨酸,将铜网置室温干燥。利用透射电镜 TECNAI12(FEI, Eindhoven, Netherlands) 在加速电压 100KV,放大倍数为 5-11 万倍条件下观察。

[0068] 3、实验结果

[0069] 结果显示,体外组装 24h 时,寡聚体最稳定。在透射电镜下,观察到从 5nm 到 10nm 左右的球形、颗粒状无定形结构,见图 3A。此外,可以观察到这种小颗粒进一步聚集,形成直径约 5-10nm,长约 20-30nm 的卷曲分支样结构。未观察到丝状、棒状长短不同的纤维状结构。但是,24h 之后,就进入快速纤维化的过程。在透射电镜下,观察到丝状和分枝状的纤维结构,见图 3B。

[0070] 4、实验结论

[0071] 本方法制备的 A $\beta$  42 寡聚体具有正确的超微形态特征。

[0072] 实施例 5 圆二色谱检测

[0073] 1、实验目的

[0074] 从分子二级结构上验证获得了 A $\beta$  42 寡聚体。

[0075] 2、实验方法

[0076] 取体外组装的 A $\beta$  42 寡聚体,进行圆二色谱 (Circular dichroism, CD) 检测。CD 色谱仪为 JASCO-J700Spectropolarimeter (中科院生物物理研究所大分子国家重点实验室)。扫描条件:范围 240 ~ 190nm,石英杯径 1mm,灵敏度 5m<sup>o</sup> /cm,分辨率 0.5nm,狭缝 1nm,时间常数 8sec,扫描速度 5mm/min,每个样品累计 3 次。测定温度为室温,以同种离子条件的缓冲液作为参比。

[0077] 3、实验结果

[0078] 结果发现,在本研究的实验体系中,在 0s、8h、和 12h 抽取的样品检测到正峰,代表其二级结构以  $\alpha$ -螺旋结构为主;从 24h 的样品中检测到明显的负峰,提示形成了  $\beta$ -折叠,见图 4。

[0079] 4、实验结论

[0080] 本方法制备的 A $\beta$  42 寡聚体具有正确的二级结构特征。

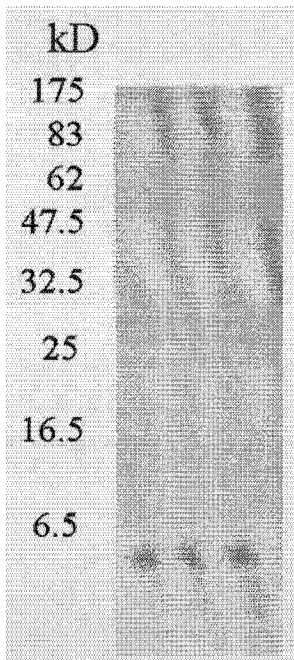


图 1

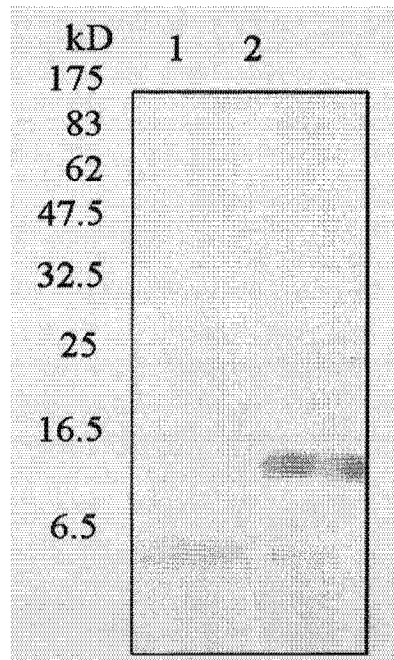


图 2

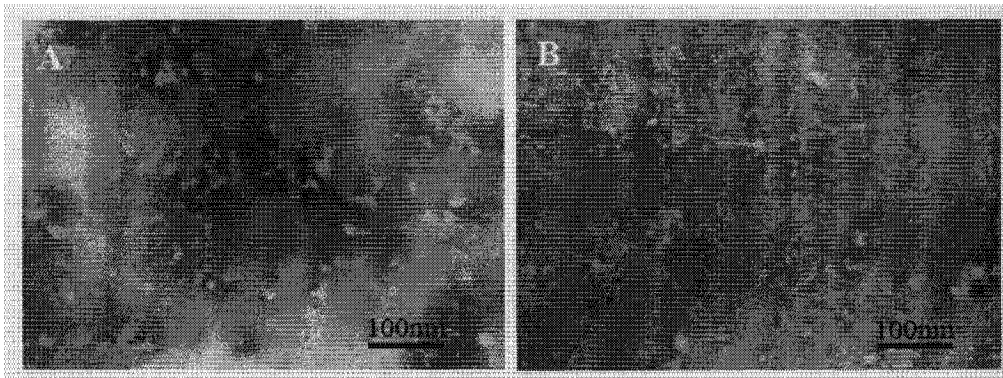


图 3

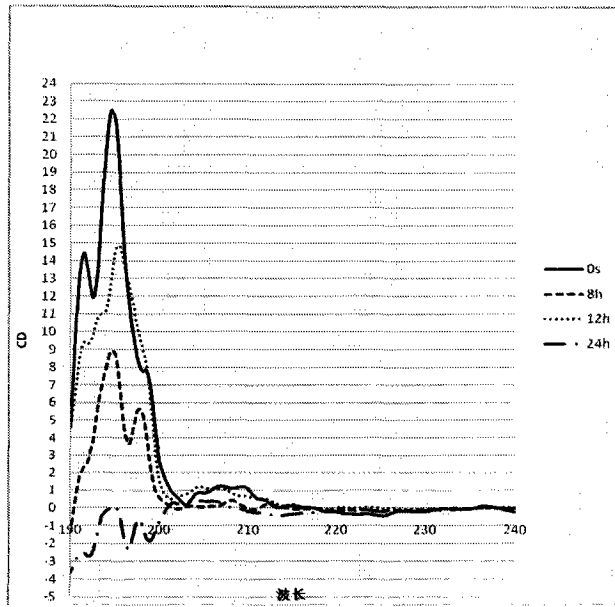


图 4

专利名称(译)	一种低分子量淀粉样肽寡聚体的人工体外制备方法和用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN101948523A</a>	公开(公告)日	2011-01-19
申请号	CN201010264251.2	申请日	2010-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京交通大学		
申请(专利权)人(译)	北京交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京交通大学		
[标]发明人	张莹 洪涛 彭向雷		
发明人	张莹 洪涛 彭向雷		
IPC分类号	C07K14/47 C12N15/12 C12N15/70 A61K38/17 A61P25/28 G01N33/53 G01N30/00 G01N23/22		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种低分子量淀粉样肽寡聚体的人工体外制备方法和用途，其特征是将基因重组方法得到的A $\beta$ 多肽的单体用无水二甲基亚砜溶解后，置于缓冲体系中反应，使其自然聚合形成寡聚体。本发明提供的基因重组得到单体的方法经济、环保；以A $\beta$ 为原料在体外组装淀粉样肽寡聚体时，通过模拟体内生理条件，改良人工脑脊液组成，所得产物稳定均一。本方法制备的寡聚体可以作为多种阿尔茨海默病检测和治疗研究的标准参照物，在制备阿尔茨海默病诊断试剂和治疗药物中获得应用。

