



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180348

数字出版日期: 2019-10-16; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20191016.1503.008.html>

α -突触核蛋白的高效表达纯化及表征

贾龙刚, 王 英, 路福平, 刘夫锋

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: α -突触核蛋白的错误折叠和聚集形成不溶性的淀粉样纤维与帕金森病的发生和发展密切相关. 对 α -突触核蛋白结构与功能的深入研究及开发抗聚集药物成为当今研究的热点, 因此需要大量的蛋白样品. 本文提供了一种简便、高效的 α -突触核蛋白在大肠杆菌中的表达纯化方法, 并利用硫磺素 T 荧光检测和细胞毒理学实验进一步证明了该重组蛋白具有良好的聚集性, 且形成的聚集体具有较强的细胞毒性. 该重组蛋白可广泛应用于研究其聚集特性及筛选聚集抑制剂等方面.

关键词: 帕金森病; α -突触核蛋白; 大肠杆菌; 表达与纯化; 聚集特性; 细胞毒性

中图分类号: Q814.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2020)02-0001-05

Efficient Expression, Purification and Characterization of α -Synuclein

JIA Longgang, WANG Ying, LU Fuping, LIU Fufeng

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Misfolding and aggregating of α -synuclein into unsolvable fibrils are closely related with the occurrence and development of Parkinson's disease (PD). A better understanding of the structure and function of α -synuclein and developing new drugs to inhibit its aggregation have become the focus of extensive studies, thus a great amount of α -synuclein is needed. This study described an efficient and convenient method to express and purify recombinant α -synuclein in *Escherichia coli*. Thioflavin T fluorescence assay test shows that the recombinant α -synuclein has good aggregation properties, and the corresponding aggregates have strong cytotoxicity. It can be widely used in the study of the aggregation behavior of α -synuclein and the screening of aggregation inhibitors.

Key words: Parkinson's disease; α -synuclein; *Escherichia coli*; expression and purification; aggregation; cytotoxicity

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种典型的中枢神经系统慢性病^[1]. 世界帕金森病协会统计资料显示, 目前全球已有 500 多万 PD 患者, 是继脑卒中后遗症、癫痫之后危害神经系统的第 3 大类疾病. 据报道^[2-3]: 每年每 10 万人中就有 10~18 个人患 PD, 其中男性与女性患者比例约为 3:2. 随着年龄增长, 发病率会逐年增加, 80 岁以上发病率和年龄呈指数增长. 预计^[4]到 2030 年, 全球 50 岁以上中老年人中, PD 患者将达 870~930 万.

虽然对于 PD 的发病机制和致病机理尚未完全解析, 但现有研究^[5-6]表明多种因素参与其中, 包括细

胞自发性过程如自噬和溶酶体功能障碍等. PD 的主要病理特征是在病人黑质致密部或其他有颜色的核心结构的多巴胺能神经元中含有一种嗜酸性细胞质内含物, 即路易小体, 而 α -突触核蛋白 (α -synuclein, α SN) 是路易小体的主要成分^[7-8]. α SN 能够聚集形成一系列大小和形状各异的聚集体, 这些聚集体会毒害细胞、破坏神经信号传递, 从而与 PD 的发生发展密切相关^[7]. 因此, α SN 的聚集及其抑制剂开发就成为近年来的研究热点.

目前, 该蛋白的来源主要有以下两种: 生物表达法和组织提取法. Zhao 等^[9]将 α SN 基因连接至

收稿日期: 2018-10-09; 修回日期: 2018-12-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (21576199, 21878234); 天津市科技支撑计划项目 (18JCZDJC33000)

作者简介: 贾龙刚 (1988—), 男, 河北人, 博士研究生; 通信作者: 刘夫锋, 教授, fufengliu@tust.edu.cn

pET15b 载体中,在大肠杆菌中表达获得含有标签的融合蛋白,利用 TEV 蛋白酶将融合标签切除后获得 α SN. 然而,切除标签的过程复杂,后期还需经过离子交换、分子筛、Ni 柱亲和层析等繁琐的纯化步骤,效率较低. 另外,乙酰基修饰的 α SN 也在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中成功表达,重组细胞经蒸煮和硫酸铵沉淀法得到粗蛋白,再依次经过离子交换层析和凝胶过滤层析获得较纯的 α SN 蛋白^[10]. 然而,蒸煮过程中可能造成蛋白失活或沉淀,同时多步骤纯化会大大降低蛋白的产量. 综上所述,目前 α SN 的表达纯化方法尚存在步骤繁琐和产量较低等问题^[11]. 这些均制约着对 α SN 聚集特性研究及相关抑制剂的开发.

本研究提供了一种简便高效的在大肠杆菌中表达纯化 α SN 的方法,优化了表达及纯化条件,并通过硫磺素 T(ThT) 荧光实验分析了该重组蛋白的聚集特性,利用细胞毒理学实验研究了 α SN 聚集体的细胞毒性.

1 材料与方法

1.1 材料

本实验室保存的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Jm109 和 BL21 (DE3) 用于本研究中 α SN 的表达.

表达载体质粒 pET22b, Novagen 公司; Ni-NTA 琼脂糖树脂, Qiagen 公司; 高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I, 宝生物工程(大连)有限公司; 质粒小量提取试剂盒, 北京索来宝科技有限公司; 硫磺素 T(ThT), Sigma 公司; 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG), Tocris 公司; 其他试剂均为分析纯, 上海生工生物工程股份有限公司.

1.2 DNA 片段、引物设计合成及 pET- α SN 表达载体的构建

根据 α SN 氨基酸序列, 经密码子偏好性优化后获得相应 DNA 序列. DNA 片段、PCR 引物和测序由苏州金唯智公司完成.

将合成的 α SN 基因用 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 回收酶切产物 α SN, 与具有相同黏性末端的 pET22b 载体于 16 °C 连接 4 h; 转化大肠杆菌 Jm109 感受态细胞, 37 °C 培养 12 h; 挑取阳性转化子进行菌落 PCR 验证 (*Nde* I -F: GGAATTCATATGGATGTGTTTATGAAAGGCT, *Xho* I -R: CCGCTCGAGGGCTTCCGGTTCATAATCCT), 并提取质粒进行测序鉴定.

1.3 重组 α SN 表达及纯化

将上述构建好的重组质粒 pET22b- α SN 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 获得转化子 BL21- α SN, 37 °C 静置过夜培养. 挑取单菌落至 5 mL LB 培养基中 37 °C 培养过夜. 按 1% 接种量转接至 200 mL 新鲜 LB 培养基中, 37 °C 培养至 $A_{600} = 0.6 \sim 0.8$. 然后, 加入终浓度 0.5 mmol/L IPTG 诱导, 诱导温度为 16 °C 或 37 °C, 诱导时间分别为 16 ~ 18 h 或 4 h. 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体. BL21 为对照组, 诱导条件: IPTG 浓度 0.5 mmol/L, 诱导温度 16 °C, 诱导时间 18 h.

用裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L DTT) 将上述所得菌体重悬, 加入终质量浓度为 30 μ g/mL 的溶菌酶和体积分数为 1% 的苯甲基磺酰氟 (PMSF), 冰浴 30 min 后超声破碎 (超声功率 250 W, 开启 2.5 s, 关闭 3 s, 总时间 15 min). 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液. 将上清液与 Ni⁺树脂在 4 °C 下结合 30 min 后加入到亲和层析柱中. 待流出液完全流出后, 用 10 倍柱体积含不同浓度咪唑的清洗液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 咪唑浓度分别为 10、20、30、40 mmol/L, 1 mmol/L DTT) 洗涤树脂, 最后用 10 倍柱体积的洗脱液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 100 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L DTT) 洗脱, 最终获得目标蛋白溶液.

1.4 SDS-PAGE 检测

取 20 μ L 上述各组分样品, 加入 5 μ L 蛋白上样缓冲液, 沸水浴 10 min 后离心, 取上清液进行检测. 电泳过程: 60 V 保持 30 min, 调节电压至 120 V, 约 1 h 后停止电泳. 将凝胶取下, 切除浓缩胶部分, 将剩余胶块放入考马斯亮蓝染液中, 室温染色 30 min, 之后将胶块置于漂洗液中过夜漂洗.

1.5 Dot blot 检测

取诱导后的 BL21 和 BL21- α SN 细胞破碎上清液及沉淀, 沸水浴 10 min 后离心, 取 2 μ L 上清液滴定至 PVDF 膜上. 另外选择带有 His 标签的脂肪酶蛋白作为阳性对照, 同样取 2 μ L 上清液滴到 PVDF 膜上, 待晾干后将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 1 h. 之后用 pH 8.0 的 TBS-T 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 体积分数 0.05% 吐温 20) 清洗 4 次. 将封闭后的 PVDF 膜放入鼠抗 His 抗体溶液中, 4 °C 过夜孵育. 将孵育一抗后的 PVDF 膜用 TBS-T 缓冲液 (pH 8.0) 清洗 4 次, 放入羊

抗鼠抗体 IgG 中, 室温孵育 2~3 h. 经 TBS-T 缓冲液清洗 4 次后, 用化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)检测结果. 抗体稀释倍数均为 1:10 000, 一抗用 5% 脱脂奶粉溶液稀释, 二抗 IgG 用 TBS-T 缓冲液稀释.

1.6 MALDI-TOF 质谱检测

将上述 SDS-PAGE 蛋白胶中目标蛋白条带切下, 置于 1.5 mL EP 管中, 送至天津国际生物医药联合研究院分析测试中心进行质谱分析.

1.7 硫磺素 T 荧光检测

利用 ThT 荧光实验来检测 α SN 聚集特性^[12-13], α SN 采用非原位培养法. 取适量上述 α SN 冻干粉, 用 20 mmol/L TBS 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 5.4, 150 mmol/L NaCl)溶解, 超声 10 min 后, 4 °C、16 000 r/min 离心 20 min, 取上层溶液体积的 75%. 利用 Nanodrop 2000(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)检测蛋白浓度, 并配成终浓度为 50 μ mol/L 的 α SN 溶液. 将上述溶液在含与不含 EGCG 条件下置于 37 °C 摇床 180 r/min 振荡培养.

ThT 溶液同样利用 TBS 缓冲液配制, 终浓度为 250 μ mol/L. 在不同时间点分别取 10 μ L 上述培养液, 加入 90 μ L ThT 溶液, 充分混匀. 利用 Infinite 200 PRO 多功能酶标仪(奥地利 TECAN 公司)检测各样品荧光强度, 激发波长为 440 nm, 发射波长为 485 nm.

1.8 MTT 实验分析重组 α SN 的细胞毒性

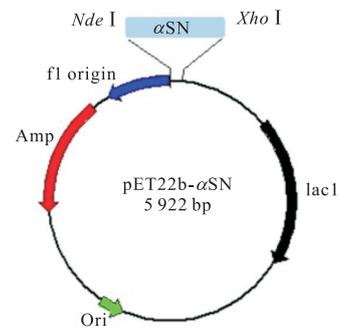
利用 MTT 比色法来检测 α SN 聚集体的细胞毒性. 首先用 DMEM 培养基(10% FBS, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 100 IU/mL 青霉素和 100 μ g/mL 的链霉素)在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 PC12 细胞. 然后将细胞接种于 96 孔板中(5 000 个/孔), 培养 24 h 后, 加入已培养 5 d 的待测样品, 使得蛋白的终浓度为 5 μ mol/L. 细胞中加入相同体积 PBS 缓冲液为空白对照组. 共培养 48 h 后, 加入终质量浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h 后取出. 离心后丢弃上清液, 加入 100 μ L DMSO 溶解细胞, 37 °C 孵育 10 min 后利用多功能酶标仪检测上述样品在 570 nm 处的吸光度.

2 结果与讨论

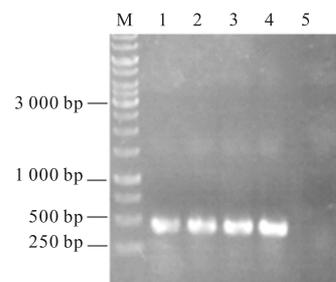
2.1 pET22b- α SN 表达载体及重组 α SN 工程菌的构建

α SN 含 140 个氨基酸, 相对分子质量约为 1.5 \times

10⁴^[14]. α SN 的 N 端(1—60 位氨基酸)包含一个高度保守肽段 KTKEGV, 这种重复序列是典型的载脂蛋白结合域^[15]. C 端(96—140 位氨基酸)序列中富含酸性氨基酸残基和脯氨酸. 中间 61—95 位氨基酸序列为非 β -淀粉样蛋白组分区域(NAC), 该肽段在 α SN 聚集过程中扮演重要角色^[16-17]. 首先基于大肠杆菌密码子偏好性, 对目标基因进行密码子优化, 获得完整的 α SN cDNA 序列. 将合成的 α SN 基因片段与含有相同黏性末端的表达载体框架 pET22b 连接, 构建 pET22b- α SN 表达载体(图 1(a)). 连接产物转化大肠杆菌 Jm109, 转化子经菌落 PCR 验证, 结果如图 1(b)所示. 图中结果显示 4 个转化子的 PCR 产物大小与 α SN 基因(429 bp)理论值一致. 提取质粒进一步测序验证, 结果显示未发生突变, 证明表达载体构建成功.



(a) pET22b- α SN 表达载体示意图



M. 1 kbp marker; 1—4. 4 个 pET22b- α SN 转化 Jm109 转化子; 5. 大肠杆菌 Jm109 空菌

(b) 菌落 PCR 验证

图 1 表达载体 pET22b- α SN 的构建

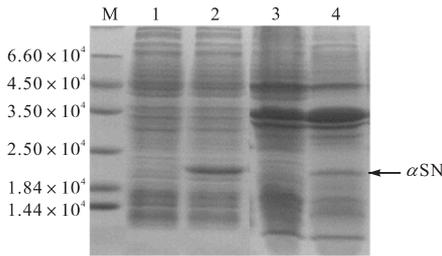
Fig. 1 Construction of expression plasmid pET22b- α SN

将上述验证正确的表达载体质粒 pET22b- α SN 转化大肠杆菌表达宿主 BL21(DE3), 获得重组工程菌, 命名为 BL21- α SN.

2.2 α SN 蛋白表达及鉴定

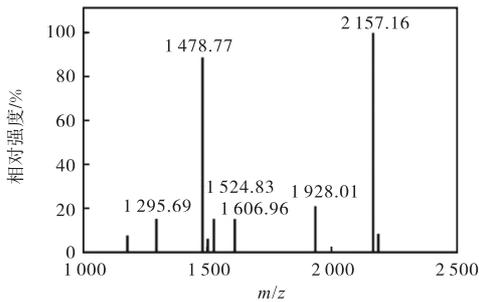
上述构建好的 BL21- α SN 工程菌利用 IPTG 进行诱导表达, 收集菌体经细胞破碎后, SDS-PAGE 分别检测细胞破碎上清液和沉淀, 结果如图 2(a)所

示. 目标蛋白主要位于破碎上清液中, 沉淀中少量的目标蛋白可能是由于破碎不完全或分离不完全造成的, 而空白对照组 BL21 野生菌的细胞破碎上清液和沉淀都没有目的条带, 说明 α SN 已成功可溶性表达. 图 2(a)中显示目的条带大小约为 2.0×10^4 , 与理论大小 (1.5×10^4) 有一定的差距, 这主要是由目标蛋白 C 端的酸性氨基酸区域结合 SDS 能力较弱所造成的^[18].

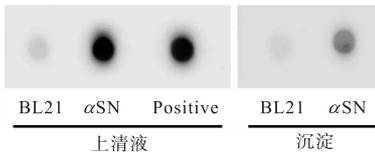


M. 蛋白 marker; 1—2. BL21 和 BL21- α SN 细胞破碎上清液; 3—4. BL21 和 BL21- α SN 细胞破碎沉淀

(a) SDS-PAGE 检测 α SN 蛋白的表达



(b) MALDI-TOF 质谱检测



(c) Dot blot 点印迹分析

图 2 α SN 的表达及鉴定

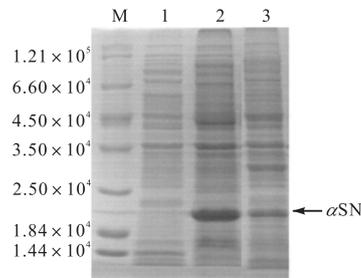
Fig. 2 Expression and identification of α SN

为验证目标产物为 α SN, 将目标蛋白条带切下, 利用 MALDI-TOF 质谱鉴定, 结果如图 2(b)所示. 荷质比为 1295.69 的肽段为 α SN₄₆₋₅₈ (理论相对分子质量为 1295.70), 荷质比为 1478.77 的肽段为 α SN₈₁₋₉₆ (理论相对分子质量为 1478.78), 荷质比为 2157.16 的肽段为 α SN₅₉₋₈₀ (理论相对分子质量为 2157.0). 目标蛋白实际检测理论相对分子质量为 15518.8, 与理论相对分子质量 (15515.7) 基本一致. 基于上述结果, 可以确定所得目标蛋白为 α SN. 利用免疫点印迹法进一步验证, 结果如图 2(c)所示, 重组 α SN 具有

较强的 His 免疫原性, 进一步表明目标蛋白已成功表达.

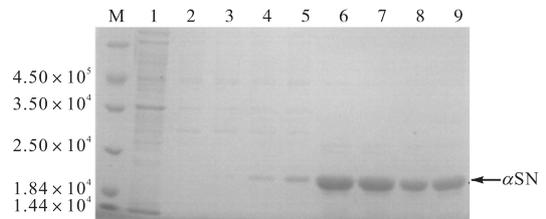
2.3 α SN 蛋白表达纯化条件优化

为提高目标蛋白表达量, 对诱导温度和诱导时间分别进行优化, 结果如图 3(a)所示. 当诱导温度为 37 °C、诱导时间为 4 h 时, 目标蛋白的产量相对较高. 因此, 后期诱导条件选择诱导温度为 37 °C, 诱导时间为 4 h. 由于利用 pET22b 质粒表达的蛋白 C 端含有 His 标签, 因此利用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化目标蛋白. 对漂洗液中咪唑浓度进行优化, 结果如图 3(b)所示, 当漂洗液中咪唑浓度为 20 mmol/L 时纯化效果最好. 利用优化好的条件, 每升菌液可获得 α SN 蛋白 54.9 mg, 纯度约为 96.4% (利用 Image J 软件分析).



M. 蛋白 marker; 1. BL21 细胞破碎上清液; 2. 37 °C 诱导 4 h; 3. 16 °C 诱导 18 h

(a) 诱导发酵条件优化



M. 蛋白 marker; 1. BL21 细胞破碎上清液; 2—5. 漂洗液, 咪唑浓度分别为 10、20、30、40 mmol/L; 6—9. 用上述不同咪唑浓度漂洗液漂洗后的洗脱液

(b) 纯化条件优化

图 3 α SN 蛋白表达及纯化条件优化

Fig. 3 Optimization of the expression and purification of α SN

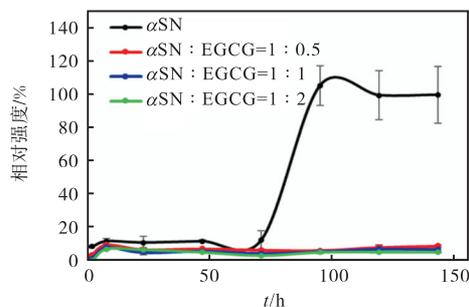
2.4 α SN 蛋白聚集特性及细胞毒理学分析

ThT 荧光染色技术常用于检测淀粉样蛋白的聚集特性和筛选淀粉样蛋白聚集抑制剂^[12-13]. 本研究同样利用该技术来分析重组 α SN 蛋白的聚集特性, 并利用已知的聚集抑制剂 EGCG 进一步验证. ThT 荧光实验结果如图 4(a)所示. 从该图可以看出, α SN 的 ThT 曲线呈现典型的“S”型淀粉样蛋白聚集曲

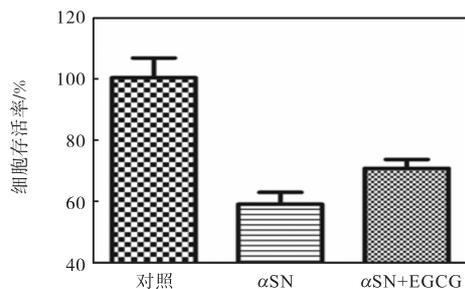
线,共分为3个阶段:0~72 h处于迟缓期,72 h后进入纤维快速伸长期,96 h后进入稳定平台期。当不同浓度 EGCG 与 α SN 共培养时,ThT 荧光信号强度始终较小,说明 EGCG 抑制了 α SN 聚集,从而导致其 ThT 荧光信号的强度降低,与前期研究结果一致^[19]。

利用 MTT 实验进一步研究了重组 α SN 聚集体的细胞毒性。将培养 5 d 的 α SN 聚集体与 PC12 细胞共培养,检测细胞存活率。如图 4(b)所示,当目标蛋白与 PC12 细胞共培养时,细胞存活率为对照组的 59.47%,证明 α SN 聚集形成的聚集体具有较强的细胞毒性。当等浓度 EGCG 和 α SN 共同处理细胞时,细胞的存活率提高了约 11%。上述结果表明 EGCG 抑制了 α SN 的聚集,并降低了 α SN 聚集体的细胞毒性。

综上所述,该重组 α SN 具有良好的聚集性和细胞毒性,因此可应用于筛选聚集抑制剂的研究。



(a) ThT 荧光检测 α SN 的聚集特性



(b) MTT 分析 α SN 对 PC12 细胞的细胞毒性

图 4 重组 α SN 蛋白的特征描述

Fig. 4 Characterization of recombinant α SN

3 结 语

本文开发了一种简便、高效的 α SN 表达纯化方法,实现了该蛋白的可溶性表达。经优化表达及纯化条件,提高了 α SN 的产量,最终每升菌液可获得 54.9 mg,纯度约为 96.4% 的目标蛋白。ThT 和 MTT 实验进一步证明该重组 α SN 具有良好的聚集性,且聚集体具有较强的细胞毒性。本研究为探索 α SN 的

聚集特性及筛选聚集抑制剂提供了性质优良的生物材料。

参考文献:

- [1] Wong Y C, Krainc D. α -synuclein toxicity in neurodegeneration: Mechanism and therapeutic strategies [J]. *Nature Medicine*, 2017, 23 (2) : 1-13.
- [2] Driver J A, Logroscino G, Gaziano J M, et al. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson's disease in advanced age [J]. *Neurology*, 2009, 72 (5) : 432-438.
- [3] Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, et al. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis [J]. *Movement Disorders*, 2014, 29 (13) : 1583-1590.
- [4] Dorsey E R, Constantinescu R, Thompson J P, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030 [J]. *Neurology*, 2007, 68 (5) : 384-386.
- [5] Hirsch E C, Jenner P, Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Movement Disorders*, 2013, 28 (1) : 24-30.
- [6] 陈旭, 耿翔. 帕金森病发病机制新进展 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2014 (9) : 897-898.
- [7] Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2001, 2 (7) : 492-501.
- [8] 邹子昱. α -突触核蛋白在常见神经退行性疾病致病机理研究进展 [J]. *中国校外教育*, 2014 (27) : 109-110.
- [9] Zhao J, Xu L, Liang Q, et al. Metal chelator EGCG attenuates Fe(III)-induced conformational transition of alpha-synuclein and protects AS-PC12 cells against Fe(III)-induced death [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2017, 143 (1) : 136-146.
- [10] Wordehoff M M, Shaykhalishahi H, Gross L, et al. Opposed effects of dityrosine formation in soluble and aggregated alpha-synuclein on fibril growth [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2017, 429 (20) : 3018-3030.
- [11] Huang C, Ren G, Zhou H, et al. A new method for purification of recombinant human alpha-synuclein in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 42 (1) : 173-177.
- [12] LeVine H. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T [J]. *Methods in Enzymology*, 1999, 309 (1) : 274-284.

(下转第 12 页)

- [6] Jiang T X, Xiao D G, Qiang G. Characterisation of maltose metabolism in lean dough by lagging and non-lagging baker's yeast strains[J]. *Annals of Microbiology*, 2008, 58(4) : 655–660.
- [7] Higgins V B M, Bell P, Bissinger P, et al. Genetic evidence that high noninduced maltase and maltose permease activities, governed by *MALx3*-encoded transcriptional regulators, determine efficiency of gas production by baker's yeast in unsugared dough[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1999, 65(2) : 680–685.
- [8] Zhang C Y, Song H Y, Lin X, et al. Expression, purification and characterization of maltase from "Quick" baker's yeast[J]. *Advances in Applied Biotechnology*, 2015: 265–275.
- [9] Soro R Y, Diopoh J K, Willemot R M, et al. Enzymatic synthesis of polyglucosylfructosides from sucrose alone by a novel α -glucosidase isolated from the digestive juice of *Archachatina ventricosa* (Achatinidae) [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2008, 42(1) : 44–51.
- [10] Yao X, Mauldin R, Byers L. Multiple sugar binding sites in α -glucosidase[J]. *BBA-Proteins and Proteomics*, 2003, 1645(1) : 22–29.
- [11] Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, et al. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1) : D200–D203.
- [12] Yamamoto K, Nakayama A, Yamamoto Y, et al. Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(16) : 3414–3420.
- [13] Sun X, Zhang C Y, Dong J, et al. Enhanced leavening properties of baker's yeast overexpressing *MAL62* with deletion of *MIG1* in lean dough[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(10) : 1533–1539.
- [14] Oda Y, Tonomura K, X J X T. Detection of maltose fermentation genes in the baking yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 23(4) : 266–268.
- [15] Lin X, Yu A Q, Zhang C Y, et al. Functional analysis of the global repressor Tup1 for maltose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* : Different roles of the functional domains[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1) : 194.

责任编辑: 郎婧

(上接第5页)

- [13] Jia L, Wang W, Shang J, et al. Highly efficient soluble expression, purification and characterization of recombinant A β 42 from *Escherichia coli* [J]. *RSC Advances*, 2018, 8(33) : 18434–18441.
- [14] Dev K K, Hofele K, Barbieri S, et al. Part II: Alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease[J]. *Neuropharmacology*, 2003, 45(1) : 14–44.
- [15] Clayton D F, George J M. The synucleins: A family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease[J]. *Trends in Neurosciences*, 1998, 21(6) : 249–254.
- [16] Ueda K, Fukushima H, Masliah E, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(23) : 11282–11286.
- [17] Han H, Weinreb P H, Lansbury P T. The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by beta-amyloid: Is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? [J]. *Chemistry & Biology*, 1995, 2(3) : 163–169.
- [18] Weinreb P H, Zhen W, Poon A W, et al. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(43) : 13709–13715.
- [19] Ehrnhoefer D E, Bieschke J, Boeddrich A, et al. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2008, 15(6) : 558–566.

责任编辑: 郎婧