

金属蛋白酶 ADAMTS1 的活性检测及其在 血液异常疾病预测方面的潜在应用

徐艺彤

生命科学学院

生物科学

11307110328

2015 年 6 月 17 日

指导小组成员

Prof. Timothy F. Lane, UCLA

Prof. Luisa Iruela-Arispe, UCLA

目 录

摘要	1
Abstract	2
一、前 言	3
二、材料与amp;方法	5
2.1 实验材料	5
2.2 实验试剂	5
2.3 实验方法	7
三、研究结果	10
3.1 ADAMTS1 敲除小鼠胚胎巨核细胞水平显著下降	10
3.2 ADAMTS1 活性检测分子的构建	12
3.3 检测分子反应灵敏度的优化	14
3.4 不同抑制条件下 ADAMTS1 作用于检测分子活性的鉴定	16
四、讨 论	18
参考文献	20
致谢	21

摘要

含 I 型凝血酶致敏蛋白基序的解联蛋白样金属蛋白酶 1 (ADAMTS1, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, family member 1) 是在生物体内广泛分布的分泌型金属蛋白酶，在多种发育及生理过程中发挥重要作用。根据小鼠遗传学研究发现，人们推测 ADAMTS1 与血小板发育可能具有潜在关联；而人类研究亦揭示其在某些血液异常疾病的发生过程中可能发挥重要作用。我们设想 ADAMTS1 活性检测将能为相关人群未来血栓性异常疾病的发生提供一有力的诊断工具。本篇研究中我们研发了一 ADAMTS1 活性检测分子，通过引入点突变提高了其检测灵敏度，并验证了一系列不同抑制条件对 ADAMTS1 活性的影响，为未来应用中提高检测效率与精确度提供了参考。随着后续评估和优化的跟进，这一检测分子将有望成为 ADAMTS1 相关血液异常疾病的有效诊断工具，并在相关巨核细胞世系恶变的预防方面提供重要帮助。另一方面，与过去对 ADAMTS1 敲除小鼠的观察发现相一致，我们发现 ADAMTS1 敲除小鼠胚胎肝脏的巨核细胞水平较正常水平显著降低。这一结果从一个新的角度支持了人们对 ADAMTS1 在巨核细胞发育过程中起到重要作用的推测。对相关机制的深入研究也将为临床诊断、治疗及预防提供重要参考。

关键词：

ADAMTS1，巨核细胞发育，活性检测，诊断工具

Abstract

ADAMTS1 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif) is a widely distributed, secreted metalloprotease known to play important roles in multiple developmental and physiological processes. A link between ADAMTS1 and platelet development was suspected in previous mouse genetic study, while human studies have indicated its potential role in the pathogenesis of certain blood abnormalities. We propose that detection of ADAMTS1 activity can offer a powerful diagnostic tool for future thrombotic anomalies in related patient groups. In this study, we developed a reporter molecule of ADAMTS1 proteolytic activity as a potential diagnostic tool in future clinical application. Cleavage sensitivity was improved by introducing point mutations, and a series of inhibitory conditions were verified to be applied in promoting detection efficiency. With further evaluation and optimization, this reporter molecule will be able to serve as a very promising diagnostic approach for ADAMTS1 related blood abnormalities, and further help with prevention of certain megakaryocyte lineage malignancies. On the other hand, consistent with previous observation on ADAMTS1 knock-out mice, we found a significant decrease in the number of megakaryocytes in ADAMTS1 null embryonic liver. This provides an additional evidence that ADAMTS1 may play a key role in megakaryocytic development, and further investigation into related mechanisms will be of great value in clinical diagnosis, treatment as well as prevention.

Keywords,

ADAMTS1, megakaryocyte development, activity detection, diagnostic tool

一、前言

含凝血酶致敏蛋白基序的解联蛋白样金属蛋白酶 ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs) 是在生物体内广泛表达及分布的分泌型金属蛋白酶家族^[1]。迄今为止, 人类 ADAMTS 家族共发现 19 个成员, 其共有特征为同时具有金属蛋白酶结构域, 解联蛋白样结构域, 以及一系列不同数目的 I 型凝血酶致敏蛋白基序 (或称重复序列)^[1,2]。ADAMTS 以及基质金属蛋白酶 (matrix metalloprotease, MMP) 家族、解联蛋白样金属蛋白酶 (a disintegrin and metalloprotease, ADAM) 家族等金属蛋白酶在基质蛋白、生长因子等细胞外蛋白的酶解作用中发挥重要作用, 从而实现对多种发育、生理及病理过程的调节^[3, 4]。

1999 年, 研究者们在一项寻找具有抑制血管生成作用的蛋白研究中克隆得到了人类 ADAMTS 家族中的首个成员 ADAMTS1^[5]。此后的研究逐步揭示了 ADAMTS1 针对多种底物的催化活性, 如催化可聚蛋白聚糖 (aggrecan) 降解从而调节关节软骨生理机能, 以及非催化活性如结合并阻碍血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 发挥其生物活性从而调节血管生成^[2]。此外, 遗传学研究也显示 ADAMTS1 参与了诸多发育及生理过程的调节。ADAMTS1 的突变失活可导致胚胎期死亡或严重肾功能失常造成的产后死亡^[4, 6]。此外, 敲除小鼠表现出生长迟缓, 雌性育性严重下降, 肾上腺、脂肪组织、子宫、卵巢等多个器官发育畸形^[6]。

在本研究小组的以往研究中, ADAMTS1 敲除小鼠除具有极高的新生死亡率外, 还普遍表现为腹腔出血。因此我们猜测这些小鼠可能具有凝血功能障碍。与此相一致, 我们还观察到在一只出生后存活了 7 天的小鼠体内, 外周血的血小板数量较正常小鼠大为减少 (降低约 87%)。综合考虑以上因素, 我们推测 ADAMTS1 与血小板发育之间可能存在潜在关联。

有趣的是, 人类 ADAMTS1 基因位于 21 号染色体, 且其蛋白水平在唐氏综合征患者中也显著增加^[7]。长久以来, 人们一直怀疑 21 三体与巨核细胞的发育异常之间存在联系, 其依据主要聚焦于暂发性骨髓增生紊乱 (transient myeloproliferative disorders, TMDs) 及髓细胞白血病 (myeloid leukemia)。TMD 是

一种巨核细胞世系疾病，在唐氏综合症新生儿中发病率约 5-10%；极少数情况下也可见于非唐氏综合症的新生儿，但是这类患者的骨髓均表现为嵌合型 21 三体^[8]。尽管 TMD 引起的异常病征绝大多数情况下会自发消退，约有 20%罹患 TMD 的幼儿会在 2-4 年后发展为髓细胞白血病（一种急性巨核细胞世系白血病）^[8-10]。

鉴于以往研究 ADAMTS1 水平上升与某些血液异常疾病存在关联，我们设想 ADAMTS1 的活性检测将能为 ADAMTS1 异常人群中高风险的血栓性疾病发生提供强有力的诊断及预测工具。在本篇研究中，我们研发了一种体外检测 ADAMTS1 活性的检测分子，评估了其对人类重组 ADAMTS1 蛋白酶活性的检测能力，通过引入点突变构建了检测性能更优的突变体检测物，并探究了一系列酶活性抑制条件下 ADAMTS1 对该检测物的作用活性。另一方面，我们也检测了 ADAMTS1 敲除小鼠胚胎的巨核细胞水平，从而为未来研究 ADAMTS1 在巨核细胞发育及血液异常发生机制中的作用提供了参考。

二、材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 组织切片

ADAMTS1 野生型及敲除小鼠胚胎切片：福尔马林固定-石蜡包埋组织切片，厚 5 μ m，实验室以往制得。

2.1.2 载体与宿主菌

载体：mRuby2-pBAD 质粒，购自 Addgene。

宿主菌：DH5 α 感受态细胞，购自 Bioline；LMG194 菌株，购自 ATCC。

2.1.3 其他

磁珠：HisPur Ni-NTA magnetic beads，购自 Thermo Scientific。

2.2 实验试剂

2.2.1 免疫组织化学试剂

1) 抗体及血清

一抗：Rabbit anti-von Willebrand Factor (vWF)，购自 DAKO。

二抗：Biotinylated goat anti-rabbit，购自 Vector labs。

山羊血清：Normal goat serum，购自 Fisher Scientific。

2) TE 缓冲液 (pH 9):

10mM Tris

1mM EDTA

0.05% Tween-20

pH 9

3) ABC 反应液：由 ABC 试剂盒 (Vector labs) 配制

1 滴 reagent A

1 滴 reagent B

加入 2.5ml PBS (不含 Tween-20) 中并混匀。

4) DAB 反应液：由 DAB 过氧化物酶底物试剂盒 (Vector labs) 配制

1 滴 Buffer

2 滴 Substrate

1 滴 H₂O₂

加入 2.5ml ddH₂O 中并混匀，现配现用。

2.2.2 细菌裂解液

50mM Tris

500mM NaCl

10mM imidazole

0.2% Triton X-100

pH 8

每次使用前加入 protease inhibitor cocktail – cOmplete, EDTA-free (Roche)

2.2.3 酶解反应缓冲液 (2x)

100mM Tris

20mM CaCl₂

160mM NaCl

pH 7.4

2.3 实验方法

2.3.1 免疫组织化学染色

1) 脱蜡：依次将附有组织切片的载玻片放入二甲苯-二甲苯-100%乙醇-95%乙醇-70%乙醇-50%乙醇-ddH₂O-ddH₂O，每步 5min。

2) 内源过氧化物酶封闭：将载玻片从 ddH₂O 中转入含 3%H₂O₂ 的甲醇中，室温下作用 30min。封闭结束后，PBS 洗涤 2 次，5min/次。

3) 抗原修复：将载玻片转入预先加热至 95°C 的 TE 缓冲液 (pH 9)，95°C 作用 20min，而后室温冷却 20min。PBS 洗涤 2 次，5min/次。

4) 血清封闭：载玻片稍沥干，用防水笔框出组织切片外围以防止后续孵育液体流散。将载玻片水平架在铺有湿润纸巾的玻璃片收集盒中，每个切片框内滴加 200 μ l 3%山羊血清。盖上盒盖以减少蒸发，潮湿盒内室温下作用 1h。

5) 一抗孵育：倒掉封闭液，兔抗-vWF 抗体以 3%山羊血清 1:1000 稀释，每个切片框内滴加 200 μ l 一抗稀释液，对照组切片滴加等量 3%山羊血清。载玻片置于潮湿盒内于 4 $^{\circ}$ C 反应过夜。

6) 二抗孵育：倒掉一抗（注意实验组血清不要污染到对照组），PBS 洗涤 3 次，5min/次。生物素标记的抗兔抗体以 3%山羊血清 1:1000 稀释，每个切片框内滴加 200 μ l 二抗稀释液，于潮湿盒内室温反应 1h。

7) 信号放大反应：倒掉二抗，PBS 洗涤 3 次，5min/次。每个切片框内滴加 200 μ l 提前配好的 ABC 反应液，于潮湿盒内室温反应 30min。

8) 显色：倒掉 ABC 反应液，PBS 洗涤 2 次，5min/次。稍沥干载玻片，置于显微镜下。滴加数滴提前配好的（每次实验现配）DAB 反应液，显微镜下观察显色情况，视显色情况适时停止反应、倒掉反应液、浸入 ddH₂O，反应不超过 5min。

9) 复染：用 ddH₂O 稍漂洗载玻片，稍沥干，水平放置，滴加数滴苏木精，染色 20s。用 ddH₂O 漂洗至洗涤液无色澄清。

10) 脱水：依次将载玻片放入 ddH₂O-50%乙醇-70%乙醇-95%乙醇-95%乙醇-100%乙醇-100%乙醇-二甲苯-二甲苯，每步 20s。

11) 封片：载玻片浸入二甲苯中转移至通风橱内，取出载玻片，稍沥干，玻片一侧滴加适量封片剂 Permount (Fisher Scientific)，用盖玻片自该侧起小心盖上，避免气泡。载玻片水平置于通风橱内晾干，48h 后取出。

2.3.2 mRuby2-hTSP1 质粒构建

mRuby2-pBAD 载体以 *Xho*I (NEB) 单酶切处理，CIP (NEB) 去磷。hTSP1 插入序列长度为 45bp：

5'- TCCAGCGGATCCGCGCTGGCGAACGAACCTGCGCCGCCCGCCGGGC -3'

序列的插入通过 Gibson Assembly (NEB) 反应完成。

2.3.3 荧光蛋白表达及纯化

1) 经测序验证正确的质粒转化 LMG194 感受态细胞，得到单克隆后，挑单克隆于含 AMP（氨苄青霉素）及 SM（链霉素）的 2ml LB 培养液，37°C 过夜培养约 16h。

2) 次日早晨，测定 OD₆₀₀ 为 1-2 时，接种 1ml 菌液于 50ml 含 AMP 及 SM 的 LB 培养液，37°C 培养约 2.5-3h，至 OD₆₀₀ 约 0.5-0.7 时取出置于室温下。取 1ml 菌液至洁净 Ep 管，13000rpm 离心 1min，弃上清，沉淀于-20°C 保存，作为诱导表达前对照。

3) 待菌液冷却至室温后，加入 5μl 20% L-阿拉伯糖（终浓度 0.002%），25°C 诱导表达过夜。

4) 次日早晨，将菌液转移至 50ml 离心管，取 1ml 菌液至洁净 Ep 管，13000rpm 离心 1min，弃上清，沉淀于-20°C 保存，作为诱导表达结束时对照。余下 50ml 离心管内菌液 4°C 4000rpm 离心 15min。

5) 弃上清，沉淀置于冰上，以预冷的 4ml 裂解液重悬。

6) 以探针式超声仪进行超声裂菌，功率设定为 6 档，工作时间 10s/ 间歇时间 15s，超声 20 次。

7) 超声结束后，分别取 30μl 细菌裂解液于两洁净 Ep 管，其中一管不加处理，另一管 13000rpm 离心 1min，转移上清至新 Ep 管，三管样品分别作为全细胞裂解液、裂解沉淀、裂解上清，于-20°C 保存。

8) 转移余下细菌裂解液至两洁净 2ml Ep 管，4°C 13000rpm 离心 15min。

9) 分装裂解上清液至洁净 Ep 管，-80°C 冻存。

2.3.4 ADAMTS1 酶解反应

1) 从-80°C 取出待用蛋白的裂解上清液，置于冰上融化。

2) 取 50μl 上清液于新 Ep 管，加入 250μl 平衡缓冲液并混匀作为蛋白样品。

3) 将磁珠用平衡缓冲液洗好（依据磁珠生产商使用指南），加入蛋白样品充分重悬，置于转动摇床上 4°C 孵育 30min。

4) 用磁力架吸附磁珠，收集 flow-through，余下磁珠以 300μl 洗涤缓冲液洗涤 3 次。以一定体积 2x 酶解缓冲液重悬磁珠。

5) 配置酶解反应体系，最后加入酶解缓冲液重悬的磁珠，37°C 反应 3h。

6) 反应结束后，以磁力架吸附磁珠，分离出上清液用于荧光测定。测定参数：激发波长 544nm，发射波长 620-10nm。

注：

(1) 37°C 反应前各步骤均在冰上进行。

(2) 涉及抑制剂的酶解反应，在加入磁珠前首先进行 ADAMTS1 与抑制剂的预反应：室温条件，抗体 3h，其他抑制剂 1h。

三、研究结果

3.1 ADAMTS1 敲除小鼠胚胎巨核细胞水平显著下降

以往研究发现，具有 ADAMTS1 功能丧失型突变的小鼠表现出极高的新生死亡倾向。其死亡原因并不明确，但是人们注意到这些小鼠同时表现出腹腔出血的表型。与此相一致的是，对其中一只出生后存活了 7 天的小鼠的研究显示，其外周血血小板数量较正常水平急剧减少（约下降 87%）。目前这一 ADAMTS1 敲除小鼠品系在低温下保存，我们决定首先利用实验室已有的敲除小鼠胚胎切片进行一项初步研究。

在胚胎期的造血过程中，肝脏作为最主要的暂时性造血器官，造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 在其中经历复杂的分化与发育过程，产生多种祖细胞及成熟血细胞。这一过程在小鼠胚胎发育期内主要发生于 E12.5 至 E16.5，此后 HSC 及各类祖细胞等逐渐转移至脾脏及骨髓^[1]。鉴于此，我们挑选出 E12.5 至 E16.5 的胚胎期肝脏切片，利用免疫组织化学方法对其中巨核细胞进行染色，通过探究血小板发育上游过程——巨核细胞发育情况以研究敲除小鼠的血小板发育情况。我们首先在野生型 E15.5 的胚胎切片中测试了一抗：抗 von willebrand 因子 (von Willebrand Factor, vWF)。染色后可见巨核细胞通过细胞质中大量 α 颗粒被染色而显示出来（图 1A, 1B）。经鉴定一抗有效后，我们对均处于相同年龄 E15.5 的 3 个野生型胚胎、2 个 ADAMTS1 敲除胚胎切片进行染色鉴定。结果显示，敲除小鼠胚胎肝脏中的巨核细胞水平较野生型约有 50% 的下降（图 1C-1E）。这一结果与之前观察到的新生敲除小鼠血小板减少表型相一致，为我们猜测 ADAMTS1 影响血小板发育提供了初步的支持性证据。

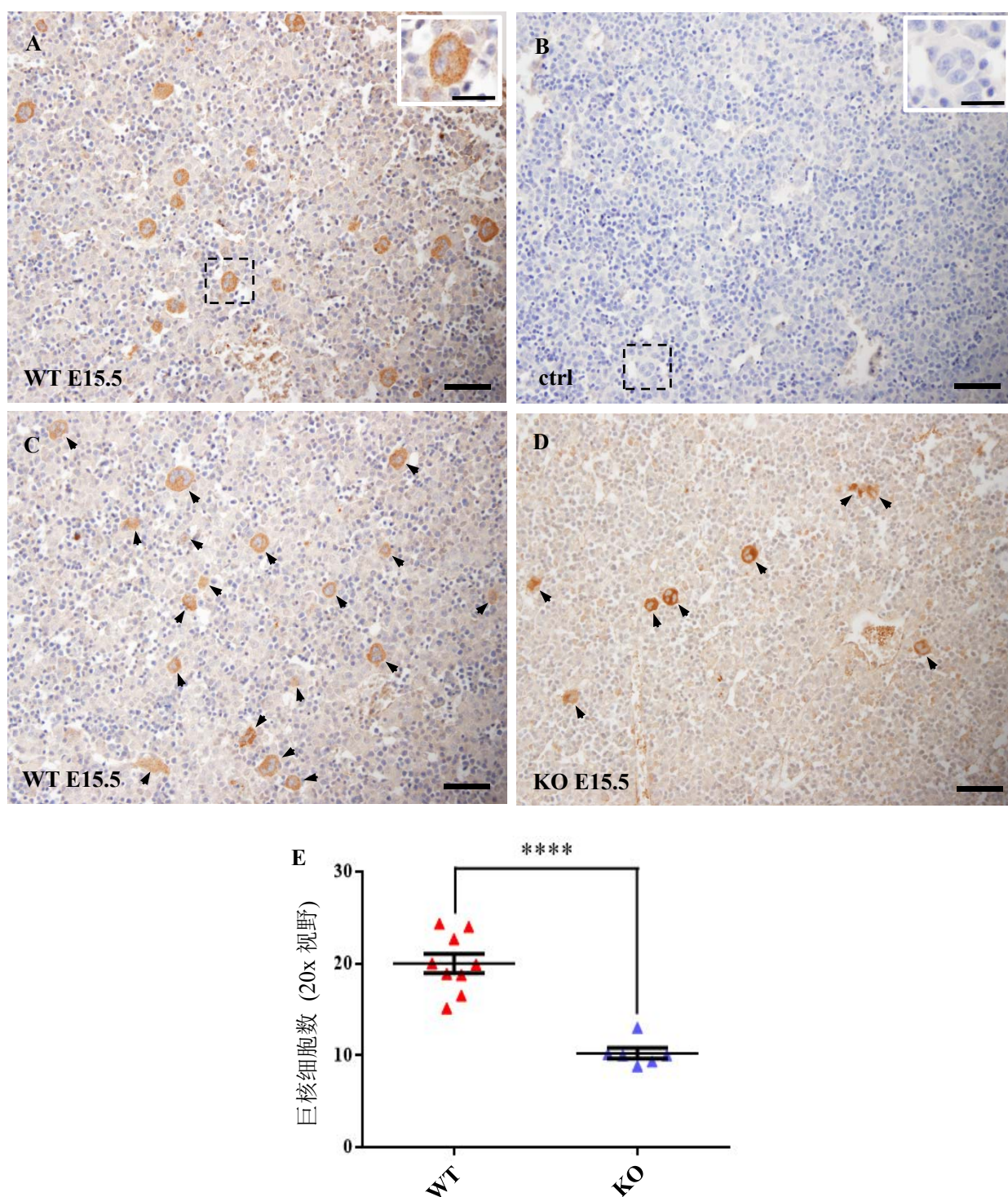


图 1. ADAMTS1 敲除小鼠胚胎肝脏中巨核细胞水平明显降低。

(A-B) 野生型(WT) E15.5 小鼠胚胎肝脏切片的免疫组织化学染色结果，(A)为使用一抗 anti-von Willebrand 因子，(B)为无一抗对照。比例尺：50 μm 。放大图展示了巨核细胞的形态特征，比例尺：20 μm 。

(C-D) 相同年龄(E15.5)下野生型(C) 及 ADAMTS1 敲除小鼠胚胎(D) 肝脏切片的免疫组织化学染色结果。箭头所指为计数的巨核细胞。比例尺：50 μm 。

(E) 对分别取自 3 个野生型(WT)及 2 个敲除(KO)小鼠胚胎的切片进行染色，肝脏中巨核细胞数的统计结果。每个数据点代表一个切片的平均值。均值标准误差(SEM) 如图所示，**** $P < 0.0001$ 。

3.2 ADAMTS1 活性检测分子的构建

为开发一体外检测 ADAMTS1 水平及活性的诊断物，我们设想将一段已知的 ADAMTS1 作用位点序列插入荧光蛋白 mRuby2 以构建一检测分子。目前已知的 ADAMTS1 底物中，只有包括凝血酶致敏蛋白 1 (thrombospondin 1, TSP1) 和 TSP2 在内的少数几个其酶切位点得到定位^[4]。TSP1 是这一广泛分布的糖蛋白 TSP 家族的首个成员。TSP 可由多种细胞类型表达，在调节细胞迁移，增殖，细胞间/细胞与基质间相互作用等方面发挥重要作用^[3]。TSP2 与 TSP1 具有相同结构特征及相近的 ADAMTS1 作用位点，此外 TSP2 还具有另一未经定位的作用位点^[4]。基于 ADAMTS1 作用于人类 TSP1 (hTSP1) 的位点，我们选取了该位点处一段十肽（酶切位点位于正中间）插入 mRuby2 的 N 端，作为检测分子中 ADAMTS1 的靶点（图 2A）。

我们首先测试了 ADAMTS1 作用下该检测分子 (mRuby2-hTSP1) 报告酶切活性的能力。检测分子首先通过 N 端 His-tag 与表面结合了镍离子的磁珠结合，而后在 37°C 与 ADAMTS1 共同孵育 3 小时。反应结束后，将磁珠分离，检测反应上清液的荧光强度。结果显示 mRuby2 载体组即产生一定的荧光，表明 ADAMTS1 可作用于 mRuby2 N 端某处，释放 C 端片段从而产生一定背景酶切（图 2C）；而检测分子 mRuby2-hTSP1 组荧光水平显著高于 mRuby2 载体自身（图 2C）。

为证实检测分子组荧光水平的显著增加确实源于 ADAMTS1 在 hTSP1 插入片段处的特异性酶切活性，我们进一步构建了另两个对照组检测分子 EL-a 及 EL-b。二者均含有十肽的插入片段，其中间两个氨基酸 EL 与 hTSP1 的酶切位点相同，而两侧的氨基酸序列不尽相同（图 2B）。以相同条件与 ADAMTS1 孵育，EL-a 及 b 组荧光水平近似于 mRuby2 载体一组，显著低于检测分子 mRuby2-hTSP1 组（图 2C）。净荧光水平（各检测分子与 mRuby2 载体的荧光水平比值）的比较进一步表明检测分子 mRuby2-hTSP1 的酶解大部分发生于 hTSP1 插入序列内部（图 2D）。此外，两个对照检测分子与 mRuby2-hTSP1 的不同表现也说明决定酶切发生位点的因素不仅仅是酶切位点处的两个氨基酸（在 hTSP1 中即为 E, L），同时其旁侧氨基酸序列也在 ADAMTS1 的识别和酶解过程中发挥作用。

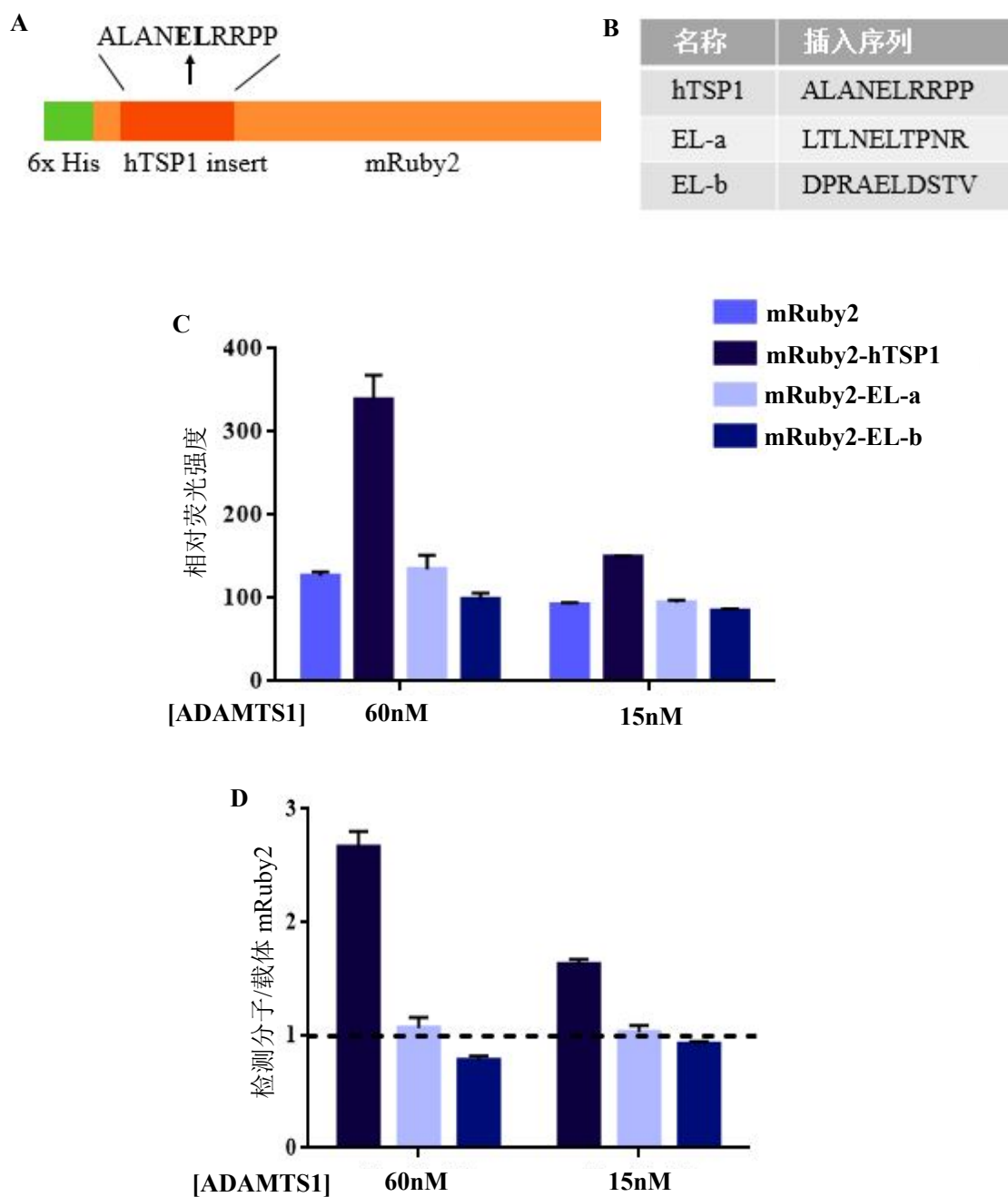


图 2. ADAMTS1 酶解检测分子 mRuby2-hTSP1 活性显著高于载体 mRuby2。

(A) 检测分子 mRuby2-hTSP1 结构示意图。hTSP1 十肽插入序列如图所示，箭头所指处为 ADAMTS1 酶切位点(EL)。

(B) hTSP1 插入序列及两对照插入序列的序列信息。

(C) ADAMTS1 酶解反应中，ADAMTS1 浓度分别为 60nM 及 15nM 条件下各载体、检测分子反应上清液荧光强度统计结果。标准差(SD) 如图所示。

(D) ADAMTS1 浓度分别为 60nM 及 15nM 条件下，各检测分子与载体 mRuby2 反应上清液荧光强度比值统计结果。标准差(SD) 如图所示。

3.3 检测分子反应灵敏度的优化

考虑到 ADAMTS1 作用于 hTSP1 位点的特异性相对有限（图 2D），我们设想通过在 mRuby2 载体上引入点突变以降低背景酶切，提高检测分子特异性。过去研究者们对 ADAMTS1 作用于可聚蛋白聚糖 (aggrecan)、多能蛋白聚糖 (versican) 等底物酶切位点的研究发现这些位点具有一定的共同特征：在酶切位点的 N 端氨基酸为一谷氨酸 (E)，而 C 端为一非极性或极性不带电氨基酸（如 A, L, G）^[12-14]。因此我们假定 mRuby2 载体上发生酶切的位点在某一个或数个谷氨酸处，并在 mRuby2 蛋白序列中进行搜索。由于载体的背景酶切可产生荧光，表明酶切位点接近于蛋白 N 端，我们筛选出 mRuby2 荧光生色团 MYG 之前的共 8 个谷氨酸，其中包含一个 EL 位点及 4 个 EG 位点（图 3A）。另一方面，mRuby2 的 3D 结构显示 N 端的 5 处谷氨酸均位于第一个 β -折叠及之前，余下 3 处谷氨酸则位于更深入蛋白内部的位点（图 3B, SWISS-MODEL, <http://swissmodel.expasy.org/>）。

综合以上考虑，我们构建了两个 mRuby2 突变体：突变体 I (mut I, E41A E42A) 仅在唯一的 E⁴²L 位点引入突变，以除去潜在的 ADAMTS1 酶切位点 EL；突变体 II (mut II, E27A E41A E42A E46T E55T) 则突变了 N 端的 5 处谷氨酸，余下 3 处考虑其突变可能对蛋白结构及荧光特性产生较大影响而保留不变。同时我们也将十肽 hTSP1 序列分别插入两突变体对应 N 端，构建相应的突变型检测分子。在同样条件下测试 ADAMTS1 对三组载体/检测分子的作用活性，结果显示在不同 ADAMTS1 浓度下，两突变体载体荧光产生量均近似于野生型 mRuby2（除 mut I 在 60nM ADAMTS1 下约有 30% 的增加）（图 3C），表明 mut I、mut II 均未除去 ADAMTS1 的背景酶切。然而突变型的检测分子相比于野生型其荧光产量均显著提高（图 3C, 3D）。鉴于 mut II 相较于 mut I 更好地维持了低背景酶切，同时 ADAMTS1 作用于 mut II 检测分子的活性明显高于 mut I，我们决定自此采用 mut II 组载体/检测分子代替野生型作为后续研究、开发的对象。

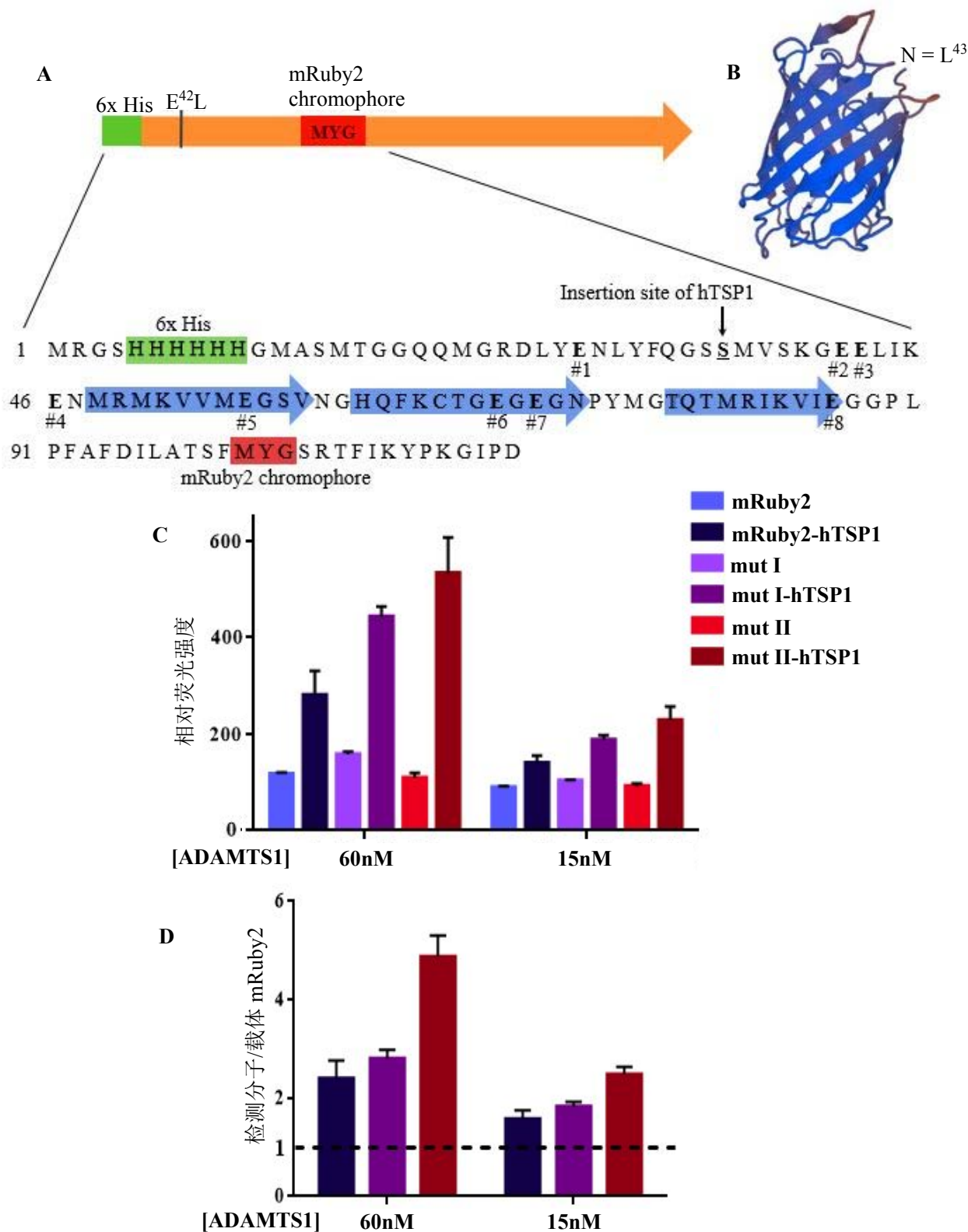


图 3. 突变型检测分子具有更高的 ADAMTS1 酶解灵敏度并维持低背景酶切。

(A) mRuby2 组成示意图及 N 端序列。荧光生色团 MYG 之前所有谷氨酸(E) #1-8 如图中标注。蓝色箭头代表相应序列形成的 β -折叠结构。

(B) mRuby2 蛋白 3D 结构图，图片来自 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)。

(C) ADAMTS1 酶解反应中，ADAMTS1 浓度分别为 60nM 及 15nM 条件下，各组野生型及突变型载体/检测分子反应上清液荧光强度统计结果。标准差(SD) 如图所示。

(D) ADAMTS1 浓度分别为 60nM 及 15nM 条件下，各野生型、突变型检测分子及相应载体 mRuby2 反应上清液荧光强度比值统计结果。标准差(SD) 如图所示。

3.4 不同抑制条件下 ADAMTS1 作用于检测分子活性的鉴定

考虑到人体样品（如血液等）中存在的多种内源蛋白酶、抑制因子及其他成分对检测分子准确鉴定 ADAMTS1 活性的潜在影响，我们试图改善检测条件以提高检测分子的检测特异性，测试了一系列不同抑制条件下 ADAMTS1 作用于 mut II 载体/检测分子的表现。

BB-94 是一个强效的广谱基质金属蛋白酶小分子抑制剂。我们首先测试了 BB-94 存在条件下 ADAMTS1 的活性。结果显示在 BB-94 浓度为 3 μ M 或更高时，ADAMTS1 作用于 mut II 检测分子的活性几乎被完全抑制（图 4A）。随后，我们测试了一常用商品化蛋白酶抑制剂鸡尾酒 cOmplete, EDTA-free (Roche)。该抑制剂鸡尾酒包含针对多种哺乳动物蛋白酶的抑制剂，包括丝氨酸及半胱氨酸蛋白酶抑制剂，但不包括哺乳动物金属蛋白酶抑制剂。结果显示，不同浓度抑制剂鸡尾酒的使用对 ADAMTS1 活性几乎没有影响（图 4B）。这一结果也为检测分子未来应用于人体样品时，利用抑制剂鸡尾酒以除去其他非金属蛋白酶、提高 ADAMTS1 活性检测精确度提供了可能。

最后，为了实现对 ADAMTS1 的特异性抑制，我们使用了一种实验室过去制得的抗重组人 ADAMTS1 单克隆抗体^[12]。在测试中，随着抗体浓度提高，ADAMTS1 活性抑制程度亦逐渐提高，在 14.2 μ g 抗体共同孵育条件下，可达到活性的完全抑制（图 4C）。

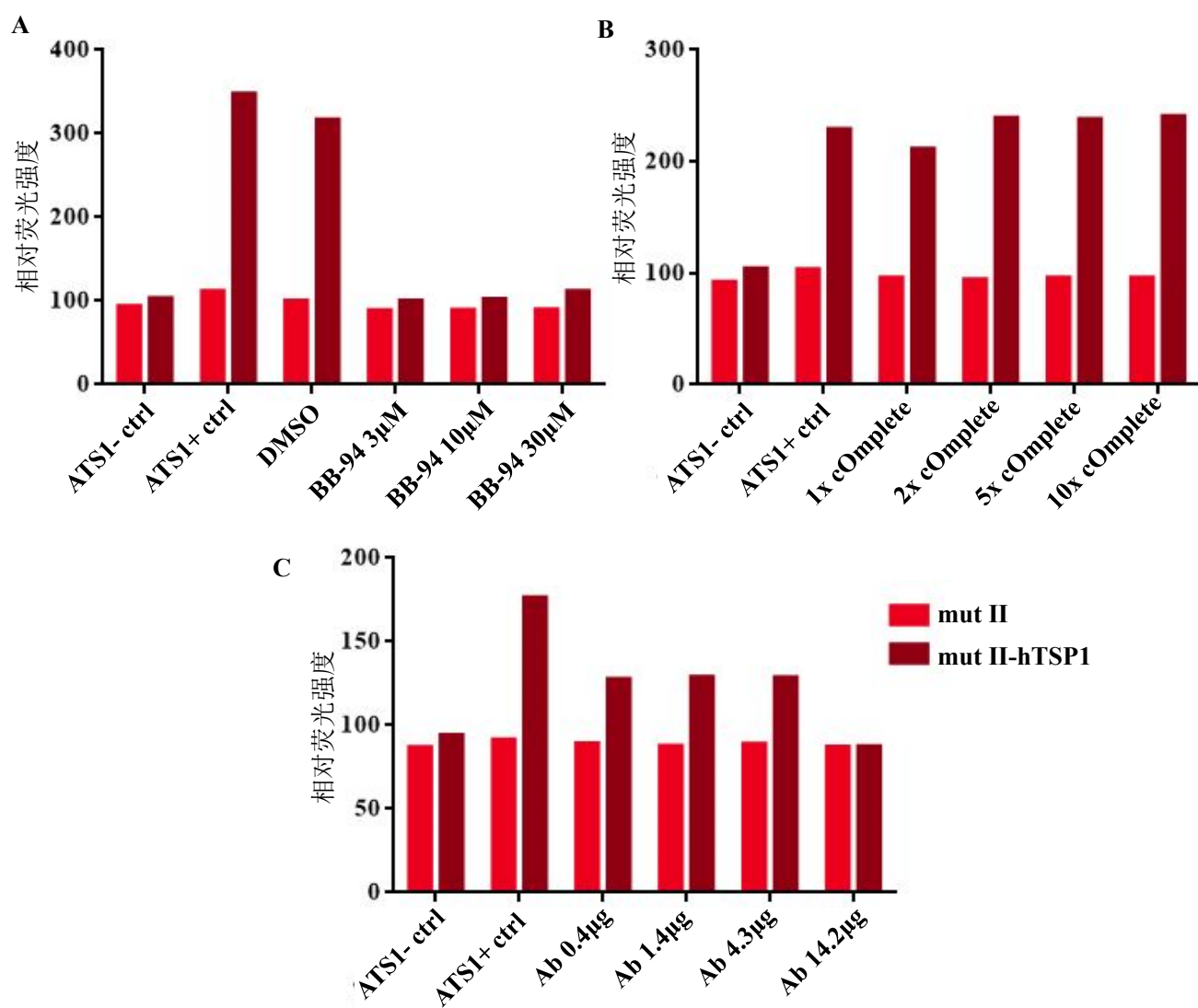


图 4. 不同抑制条件对 ADAMTS1 作用于检测分子活性的影响。

(A) 不同浓度 BB-94 存在条件下，反应上清液荧光强度统计结果。ATSI, ADAMTS1。

(B) 不同浓度蛋白酶抑制剂鸡尾酒 cOmplete 存在条件下，反应上清液荧光强度统计结果。ATSI, ADAMTS1。

(C) 不同浓度抗 ADAMTS1 单克隆抗体存在条件下，反应上清液荧光强度统计结果。ATSI, ADAMTS1。Ab, Antibody 抗体。

四、讨 论

在本篇研究中，我们研发了一检测 ADAMTS1 蛋白酶解活性的检测分子 mRuby2-hTSP1，通过在载体 mRuby2 中引入点突变提高了 ADAMTS1 在 hTSP1 序列的特异性酶切活性，并证实了一系列不同抑制条件对 ADAMTS1 活性的影响。另一方面，我们也证实了 ADAMTS1 敲除小鼠胚胎肝脏中巨核细胞较正常水平的大幅减少。

根据本研究小组以往的观察发现，ADAMTS1 敲除小鼠的外周血血小板数量较正常水平严重减少。这里我们在胚胎肝脏中确证的巨核细胞减少从更为上游的发育过程中为 ADAMTS1 功能丧失影响血小板发育提供了一致性证据。进一步揭示这一严重发育异常背后的机制需要后续对敲除小鼠个体及其血小板功能的深入研究。十分可能的是，ADAMTS1 的蛋白酶解活性在加工、激活某些巨核细胞或血小板生长因子的过程中发挥重要作用。因此，探究与此相关的造血过程生长因子及其他介导体，并进一步寻找其中潜在的 ADAMTS1 底物将具有重要意义。

以往研究发现，在唐氏综合症患者中 ADAMTS1 蛋白水平显著增加^[7]。各方有关 21 三体与巨核细胞世系恶变之间联系的发现增强了 ADAMTS1 在巨核细胞世系某些异常发生过程中起到关键作用的可能性。因而，评估 ADAMTS1 水平将可能在相关病人群体中为未来血栓性异常疾病的预测提供一有力的诊断工具。以往研究中对于 ADAMTS1 水平的评估均仅限于检测蛋白水平，而很多情况下蛋白水平并不能真实反映发挥生物学功能的蛋白酶数量。本篇研究中我们利用一检测底物开发了一种 ADAMTS1 活性评估方法。ADAMTS1 的活性检测将能为诊断及预防某些血液异常疾病提供具有实际意义的参考。

现有表达分析研究显示，血浆及包括血小板在内的多种血细胞内均存在 ADAMTS1 (MOPED, PaxDb)。我们认为血液将是最合适的检测 ADAMTS1 活性的人体样品。为实现利用本研究中的检测分子对血液进行测试，许多前期工作仍有待完成，包括评估血液中 ADAMTS1 水平，以及基于该 ADAMTS1 水平而进行优化的检测反应条件等。

此外，考虑到血液中的复杂成分及各成分间的多种相互作用对检测 ADAMTS1 金属蛋白酶活性的潜在干扰，开发出一套特定的检测条件以准确评估 ADAMTS1 活性水平也是十分必要的。本篇研究中我们通过利用一商品化的蛋白酶抑制剂鸡尾酒实现了对非金属蛋白酶的抑制作用。这一应用可在很大程度上帮助排除血液中多种蛋白酶的干扰，然而仍存在部分金属蛋白酶可对 ADAMTS1 的检测造成影响，例如血液中的 ADAMTS13（又称 von Willebrand 因子(vWF)蛋白酶）。值得注意的是，目前报道的 ADAMTS13 作用于 vWF 的酶切位点不同于任一已知的 ADAMTS1 酶切位点^[15]，增加了 ADAMTS1 检测分子不受 ADAMTS13 影响的可能性。当然，其中各方影响仍需深入细致的研究。

最后，对于检测分子中的短肽插入序列，其可被 ADAMTS1 识别并酶切的充分且必要长度仍需进一步探究。以往对于 ADAMTS1 蛋白酶解的研究均聚焦于原始的底物蛋白，本篇研究则显示取自 hTSP1 酶切位点处的十肽插入序列足以作为 ADAMTS1 的识别及酶切靶标。尚不明确的是，一方面，在 hTSP1 的序列背景下，是否只需短于十个氨基酸的插入序列就已足够作为 ADAMTS1 底物；另一方面，鉴于研究报道 ADAMTS1 酶切可聚蛋白聚糖 (aggrecan) 需要更长的酶切位点旁侧序列^[12]，本研究中取自 hTSP1 本身的十肽可能并不足以作为靶标，而 mRuby2 载体在插入序列附近的氨基酸序列甚至结构可能对 ADAMTS1 的识别及酶切起到了协助作用。基于这两方面考虑，后续研究若能明确 hTSP1 短肽序列自身作为 ADAMTS1 底物的最小有效长度，将为开发一短肽检测分子提供可能。可以想见，这样的短肽检测分子较之目前的检测分子 mRuby2-hTSP1 更为小巧，便于生产及操作，且不需额外的载体蛋白 mRuby2 处在旁侧，避免了背景酶切、空间位阻等多方面的潜在影响，将可能成为更加高效、准确的活性检测物。以上各方面的改进与完善将能为未来 ADAMTS1 活性检测的实际应用提供有价值的参考，以最大程度上帮助血液异常疾病的诊断及预防。

参考文献

1. Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L. and Edwards, D. R. The ADAMTS metalloproteinases. *The Biochemical journal*. (2005) 386(Pt 1): 15-27.
2. Luque, A., Carpizo, D. R. and Iruela-Arispe, M. L. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *The Journal of biological chemistry*. (2003) 278(26): 23656-65.
3. Iruela-Arispe, M. L. Regulation of thrombospondin1 by extracellular proteases. *Current drug targets*. (2008) 9(10): 863-8.
4. Lee, N. V. et al. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *The EMBO journal*. (2006) 25(22): 5270-83.
5. Vazquez, F. et al. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *The Journal of biological chemistry*. (1999) 274(33): 23349-57.
6. Shindo, T. et al. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *The Journal of clinical investigation*. (2000) 105(10): 1345-52.
7. Miguel, R. F., Pollak, A. and Lubec, G. Metalloproteinase ADAMTS-1 but not ADAMTS-5 is manifold overexpressed in neurodegenerative disorders as Down syndrome, Alzheimer's and Pick's disease. *Brain research Molecular brain research*. (2005) 133(1): 1-5.
8. Marshall, G. M. et al. The prenatal origins of cancer. *Nature reviews Cancer*. (2014) 14(4): 277-89.
9. Malinge, S., Izraeli, S. and Crispino, J. D. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*. (2009) 113(12): 2619-28.
10. Roy, A., Roberts, I., Norton, A. and Vyas, P. Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) and transient myeloproliferative disorder (TMD) in Down syndrome: a multi-step model of myeloid leukaemogenesis. *British journal of haematology*. (2009) 147(1): 3-12.
11. Golub, R. and Cumano, A. Embryonic hematopoiesis. *Blood cells, molecules & diseases*. (2013) 51(4): 226-31.
12. Rodriguez-Manzanique, J. C. et al. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications*. (2002) 293(1): 501-8.
13. Sandy, J. D. et al. Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *The Journal of biological chemistry*. (2001) 276(16): 13372-8.
14. Tortorella, M. D. et al. Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *The Journal of biological chemistry*. (2000) 275(24): 18566-73.
15. Chung, D. W. and Fujikawa, K. Processing of von Willebrand factor by ADAMTS-13. *Biochemistry*. (2002) 41(37): 11065-70.

致谢

本篇毕业论文的内容为本人大四学年在加州大学洛杉矶分校 (UCLA) 交流期间完成。在三个学期近 9 个月的交流过程中，我遇到了许许多多来自世界各地的人，得到了许许多多善意的帮助，在此不胜感谢。首先特别感谢我的导师 Dr. Timothy F. Lane，在整个交流期间以无比的耐心给予我尽可能多的帮助，悉心指导我从课题启动、整理思路、寻找材料、分析解决实验问题，直到最终总结、撰写毕业论文。同样地感谢我的 co-advisor Dr. Luisa Iruela-Arispe，对我自始至终耐心、细致的教导，并将我介绍给实验室的每一位成员，给了我很大自由在实验室进行工作。感谢我在实验室遇到的每一个成员，谢谢 Safiyyah 自我初来乍到之时起的热心帮助，使我很快适应了实验室环境，谢谢 Austin 耐心解答我前前后后数不尽的幼稚问题，谢谢 Anais、Georg 的热情帮助与愉快交谈，谢谢 Julia、Carmen、Melanie 总是在我寻求帮助时尽其所能，谢谢 Michelle 将实验室打理得井井有条，谢谢所有的本科生，Dana、Tiffany、Victoria、Karen、Dai、Vaspour、Will、John、Johnathan，为实验室增添的欢乐与活力——谢谢所有人营造了这样一个轻松愉快而又学术氛围浓厚的实验室环境，使我的交流生活充实而快乐，并在实验及有关理论方面收获颇丰。

此外，十分感谢生科院一起来到 UCLA 交流的同学们，姜 ying 琦、毛涵澄、袁茜煜、张天昊、孙志成、周立波，谢谢大家的陪伴使得这次交流经历充满欢乐，也谢谢大家在实验遇到问题时的共同讨论及相互帮助。同时，十分感谢学院给了我这样一个机会去美国交流学习，谢谢杨继老师的联系及教务处应志峰老师的全力支持，谢谢学院本科生培养办公室张力群老师和钱晓茵老师帮助办理前前后后的手续。感谢 UCLA 的 Dr. Ren Sun 组织此次交流项目，同样谢谢 Jiaying 前前后后操办本项目的各类事宜。感谢学院拔尖计划及国家留学基金委的资助使此次交流能够顺利进行。

特别地，在此感谢我在母校复旦大学的导师蔡亮老师，引导我进入实验室，真正开始接触实际的课题研究。在大三一学年的时间里，感谢蔡老师以无比的耐心教导我一点一点从零学起，并以其对科学研究的热情深深影响了我，在此后我申请研究生及交流学习的过程中也尽可能给予我帮助。感谢蔡亮老师

实验室的所有师兄师姐，徐源、曹淑中、张晓丽、王洁、姚龙芳、陈珺、欧阳华聪，对刚刚进入实验室一窍不通的我给予的热心帮助。

此外，衷心感谢我在大二至大四期间的辅导员丁灏老师及学生辅导员康以萌，对我各类学习上、事务上、未来发展上等等问题的耐心解答与帮助。同样地感谢我在大一期间的书院导师常芳老师，热心帮助、引导刚刚进入大学的我们适应大学生活，并在大二进入生命科学学院后给予我们更多专业相关的帮助，以及引导我进入本科阶段的第一个实验室。感谢马红老师提供实验室的平台让我对真实科研环境有了一个初步的认识，感谢朱恩高师兄、张在宝师兄、崔洁师姐及实验室其他师兄师姐的热心帮助。

最后，真诚感谢我在复旦四年期间遇到的所有老师同学。谢谢生科院的老师们在各类专业课及实验课上的教导，引领我一步步走进生命科学的世界。谢谢其他院系的老师们为我们带来丰富多彩的选修课以开拓视野。谢谢我相处四年的室友何晨曦、张雪纯，陪伴我度过起起伏伏的每一天大学生活。谢谢其他许许多多的同学一起经历了美好难忘的大学生活，军训、一二九、酿米酒、数果蝇、花式解剖各种大动物小动物。谢谢母校复旦大学给了我此生无二的四年大学时光，也接纳我成为了百年复旦洪流中小小的一份子。这里的一人、一事、一景都参与塑造了今天的我，好的我，坏的我，年轻的我，幼稚的我。转眼就要毕业了，即以一篇毕业论文作为本科生涯的句点，其中还有许多不足，留待自己在即将到来的研究生生涯中继续努力、继续成长，希望能以更好的自己做出更优秀的工作。

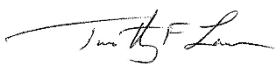
最后的最后，感谢我的父母，每一天的我都有你们的影子，你们是我的一部分，让我想要成为更好的自己。感谢我所有的亲人，何等荣幸可以无尽享用这么多人对我最无私的关切与支持。

带着说不尽的感谢，2015年夏天，我从复旦毕业了。

指导教师评语：

Yitong Xu was a fantastic student. She was given two very ambitious projects and made significant progress on both. Xu encountered a problem of low signal to noise from her initial experiments and created 2 new sets of reagents to address the problem. The first set doubled the signal and the second set tripled the signal making the study possible.

Her work required independence, creativity and rigor. I was very pleased to have Xu in my laboratory and would recommend her highly to anyone. She is capable of grasping advanced concepts quickly and developing novel approaches, unique quality for someone so young. I truly wish her the best in her future career and hope to work with her again.

签名：  日期： June 15 2015

答辩委员会（小组）评语：

同意毕业。

签名： 孙璘 杨青 日期： 2015.06.23