

復旦大學

本科畢業論文



論文題目：探究 alpha-Synuclein 聚集對細胞自噬水平的影響

姓名：楊 箬 楠 學 號：19307110512

院 系：復旦大學生命科學學院

專 業：生物科學

指導教師：魯 伯 埧 職 稱：教授

單 位：復旦大學生命科學學院

完成日期：2023 年 05 月 15 日

探究 alpha-Synuclein 聚集对细胞自 噬水平的影响

完成人

杨箬楠

指导小组成员

鲁伯坝 教授

目 录

摘要	I
Abstract	II
一、前言	1
1.1 α -Synuclein 聚集	1
1.2 α -Synuclein 聚集与细胞自噬的联系	1
1.3 α -Synuclein 聚集与细胞自噬标记物 LC3 的结合	2
二、材料与方法	4
2.1 实验材料	4
2.1.1 细胞系	4
2.1.2 载体和宿主菌	4
2.1.3 α -Synuclein 聚集体	4
2.2 实验试剂	4
2.2.1 细胞系传代培养	5
2.2.2 脂质体转染	5
2.2.3 Western Blot 免疫印迹	5
2.2.4 均相时间分辨荧光技术 (HTRF)	7
2.2.5 免疫荧光染色	7
2.3 实验仪器	7
2.4 实验软件	7
2.5 实验方法	8
2.5.1 细胞系传代培养	8

2.5.2 脂质体转染.....	9
2.5.3 Western Blot 免疫印迹.....	10
2.5.4 均相时间分辨荧光技术 (HTRF).....	12
2.5.5 免疫荧光染色.....	12
三、研究结果	14
3.1 向细胞内引入 α -Synuclein 聚集体.....	14
3.2 α -Synuclein 聚集体抑制细胞自噬.....	15
3.3 α -Synuclein 聚集体对细胞自噬的抑制与 LC3 有关.....	17
3.4 α -Synuclein 聚集体对细胞自噬的抑制与 LC3 的结合有关.....	18
四、讨论	20
4.1 向细胞内引入 α -Synuclein 聚集体.....	20
4.2 α -Synuclein 聚集体对 LC3 的影响.....	20
4.3 展望.....	21
参考文献	22
致谢	24

摘要

alpha-synuclein (α syn) 的异常聚集及其在细胞间的播散是包括帕金森病在内的多种突触核蛋白疾病的重要病理学特征，然而 α syn 异常聚集是否及如何导致疾病的机制尚未明确。国内外先前研究表明， α syn 可能通过多种机制影响细胞自噬——一种通过溶酶体降解生物大分子和细胞器的重要胞内分解代谢过程。本课题与合作者的前期实验发现，用于模拟神经内一种 α syn 聚集形式：原纤维的 α syn 预制纤维 (alpha-synuclein pre-performed fibrils, α syn PFF) 可在体外和一种参与自噬体形成的关键蛋白 LC3 结合，并影响后者结合其他自噬底物的生理功能。在本研究中，通过 Western Blot 实验与双荧光标记自噬蛋白检测自噬流实验，我们在多种细胞系内证明了 α syn PFF 对细胞的抑制，进一步在 LC3 相关自噬缺陷细胞系中验证了这一抑制与 LC3 有关，最后，利用不与 LC3 结合的 $\Delta\alpha$ syn PFF 初步证明抑制效应与 α syn PFF 和 LC3 的结合有关。本研究可能为理解 α syn 相关神经退行的病理学机制提供新思路。

关键词： alpha-Synuclein 蛋白，LC3 蛋白，细胞自噬，神经退行

Abstract

Synucleinopathies, including Parkinson Disease, are characterized by the accumulation and intracellular spreading of alpha-synuclein (α syn) aggregates. However, the potential pathogenic mechanisms of α syn aggregates remain elusive. Recent studies suggest that α syn alters the lysosomal degradation of proteins and organelles, an essential cellular catabolism termed autophagy. Our previous collaborative study discovered the in vitro binding between α syn pre-performed fibrils (PFF) and LC3, a central autophagosome protein that plays a critical role in autophagosome biogenesis, and further influence LC3's function of binding to other autophagic substrates. Here, by Western Blot and tandem fluorescent-tagged proteins for autophagy flux detection, our findings suggest that α syn PFF can inhibit autophagy flux in multiple in vitro cultured cells. In autophagy-deficient cells we prove the relation between the inhibition and LC3, and with LC3 un-linked α syn PFF we further relate it with LC3- α syn PFF connection. Our study might provide new insights for understanding α syn-related neurodegeneration.

Keywords: alpha-Synuclein, LC3, autophagy, neurodegeneration

一、前言

1.1 α -Synuclein 聚集

人 α -Synuclein (α syn) 由 4q21.3-q22 上的 *SNCA* 基因编码, 140 个氨基酸组成, 是一种在突触前神经末梢高水平表达的神经元蛋白。 α syn 的正常生理功能还未完全阐明, 但它在突触前末端的定位以及 α syn 基因敲除动物模型的研究表明, α syn 可能参与调控神经末梢突触囊泡的释放^[1], 以及多巴胺等神经递质的传递^[2]。

在自然生理条件下, α syn 通常以稳定的未折叠的可溶性单体形式存在。体内外实验表明, 氧化应激、翻译后修饰, 其他溶液条件 (例如 pH、温度、金属离子强度), 以及 *SNCA* 突变 (例如帕金森病相关的点突变 A30P, E46K 和 A53T)^[3]均会影响单体 α syn 的构象, 诱导其形成部分折叠的有序结构, 从而增强单体 α syn 的聚集倾向。一般认为, α syn 的聚集遵循“成核-延伸-聚合” (nucleation-elongation-polymerization) 的三步走策略^[4]: 部分折叠的可溶性单体 α syn 聚集为不太稳定的低聚物核心, 进一步转化为原纤维等更高级、稳定的聚集体, 最终形成不溶的、富含 β -sheet 折叠的淀粉样纤维。 α syn 在聚集中形成的各种聚集体在大小、结构、稳定性, 尤其是神经毒性方面各不相同。

临床与动物模型中的大量数据表明, α syn 聚集与其在神经元间的朊病毒样播散是一类包括帕金森病、路易体痴呆和多系统萎缩等在内的神经退行性疾病——突触核蛋白病 (synucleinopathy) 的重要病理学特征, 具神经毒性的 α syn 聚集体可能在相关病理机制中发挥关键作用。然而, α syn 聚集体的神经毒性的具体性质、 α syn 聚集导致神经退行或神经元功能丧失的细胞和分子机制仍然未知。

1.2 α -Synuclein 聚集与细胞自噬的联系

自噬 (autophagy) 是一种高度保守的分解代谢过程, 可将胞内冗余蛋白质等多种生物大分子和细胞器隔离在自噬体 (autophagosome) 中, 随后转运至溶酶体降解回收。自噬对于调节细胞稳态、应激适应和细胞存活等至关重要。

α syn 聚集与神经退行的紧密联系引出了对于 α syn 聚集与细胞自噬关系的众多研究。在过表达 *SNCA* 的多种细胞模型中的研究表明, α syn 聚集可通过多种途

径抑制自噬，如通过 Rab1a 导致自噬蛋白 Atg9 的错误定位、减少自噬体前体的形成^[5]；结合 HMGB1，阻断其结合 BECN1 并加强与 BCL2 的结合^[6]；降低介导自噬体和溶酶体融合的 v-SNARE 蛋白 SNAP29 的丰度，抑制两者融合降低自噬周转率^[7]；通过 Tlr4 依赖性 p38 和 Akt-mTOR 信号通路级联抑制自噬活性^[8]。 α syn 聚集抑制或损坏自噬，自噬的抑制导致 α syn 难以被降解而进一步积累聚集，这构成了导致神经元死亡的双向正反馈循环。然而也有研究报道了 α syn 聚集对自噬的过度激活，诱导细胞器通过自噬降解，导致神经元死亡^[9]。

通过过表达或突变 SNCA 的遗传学手段向实验模型内引入 α syn 聚集，先前众多研究在功能上将细胞自噬和 α syn 聚集及与其紧密相关的神经退行病理学联系起来，研究 α syn 聚集对细胞自噬的影响及机制对于理解突触核蛋白病的致病机制与疾病进展有重要意义，也是本研究的关键科学问题之一。

1.3 α -Synuclein 聚集体与细胞自噬标记物 LC3 的结合

在自噬体的形成阶段，胞质中的 LC3-I 与磷脂酰乙醇胺偶联形成 LC3-II 被招募至自噬体膜上；随后，自噬体直接或间接与溶酶体融合，LC3-II 与自噬体内的细胞质一同被降解回收。因此，LC3 是参与自噬体的生物合成的关键蛋白，而 LC3-I 与 LC3-II 的周转能反映自噬活性的变化。

本课题组及合作课题组的前期研究发现，LC3 能结合体外重组的模拟 α syn 聚集体的 α syn 预制纤维 (α syn pre-performed fibrils, α syn PFF)，并解析出 α syn-LC3 结合物的具体结构。进一步的体外生化实验发现，除了结合 LC3 外， α syn PFF 还能干扰 LC3 与选择性自噬关键受体蛋白 p62 的结合，且这一影响程度与 α syn PFF 的孵育浓度具相关性。这启发了我们对于 α syn 聚集通过与 LC3 结合抑制其生理功能、并进一步抑制自噬的假设。

基于前期生物化学的体外研究成果，本研究在 HEK-239T、稳转 A53T 突变的 SH-SY5Y 与 HeLa 体外培养细胞系中进一步探索 α syn PFF 对细胞自噬的影响。本研究首先确认将 α syn PFF 高效引入胞内环境的方法为脂质体转染，并在野生型 HEK-239T、HeLa 细胞，以及稳转 A53T 突变的 SH-SY5Y 细胞中验证了 α syn PFF 对细胞自噬的抑制。随后，我在 *Atg5*KO/LC3BKO HEK-293T 细胞中确认了这一抑制效应与 LC3 有关；最后，使用不与 LC3 结合而其他生理功能正常

的 α syn PFF-100，我在以上细胞系中进一步确认细胞自噬的抑制与 α syn-LC3 结合有关。

本研究的意义为，在体外培养细胞系内验证了细胞自噬标记蛋白 LC3 与 α syn 聚集体的直接结合影响细胞自噬流的新假说，这可能为 α syn 聚集相关神经退行的致病机制带来新的理解。

二、材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞系

- a) HEK-293T: 人胚肾细胞
- b) HeLa: 人宫颈癌细胞
- c) 稳转 A53T 的 SH-SY5Y (5Y-A53T) : 人神经母细胞瘤细胞

A53T 是编码 αsyn 的 SNCA 基因的一个错义点突变, 导致 αsyn 单体的第 53 个氨基酸由丙氨酸 (A) 突变为苏氨酸 (T), 促使其容易聚集; 此外, A53T 与一种常染色体显性遗传的早发型帕金森病有关^[8]。因此, A53T 稳转是一种广泛应用于构建帕金森病理模型与胞内过表达 αsyn 的实验手段。

- d) ATG5 knockout HEK-293T
- e) LC3B knockout HEK-293T

2.1.2 载体与宿主菌

- a) DH5 α 、BL21(de3) 感受态细胞
均由复旦大学生命科学学院丁灏课题组提供。
- b) 双荧光标记质粒
pC3-EGFP-mCherry-LC3、pC3-EGFP-mCherry-p62

2.1.3 α -Synuclein 聚集体

- a) 体外重组的野生型 αsyn 构建的 αsyn PFF
- b) 体外重组的不与 LC3 结合的 $\Delta\alpha\text{syn}$ 构建的 $\Delta\alpha\text{syn}$ PFF

以上均由合作实验室提供, 母液浓度均为 200 μM . 在进行细胞实验时, 应首先根据实验需求适当使用 PBS 稀释聚集体至一定浓度后, 敞口、用紫外灯照射 30min 进行消毒灭菌, 避免支原体感染。

2.2 实验试剂

2.2.1 细胞系传代培养

a) 细胞培养基

表 1 各细胞系培养基

适用细胞	基础培养基	添加剂
HeLa、 ATG5KO/LC3BKO/wt HEK-293T	DMEM 细胞培养基(1×), Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot:2186828	10% (体积比) FBS 胎牛血清, Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot: 10099141C; 1%双抗, Thermo Fisher® Scientific®, Lot:15240062
5Y-A53T	DMEM/F12 (1:1) (1×), Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot: 11320033	15% (体积比) FBS 胎牛血清, 同上; 1%双抗, 同上

b) TrypLETM Express 溶液, Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot:2187241

c) 1×PBS, Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot: 20012027;

d) DMSO 二甲亚砷, Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot: 85190

e) 台盼蓝染色剂 (0.4%), Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot: T10282

2.2.2 脂质体转染

a) Opti-MEM 溶液 (1×), Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot:2120763

b) Lipofectamine® 3000, Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot: L3000001

c) Bafilomycin A1 (Baf A1, 95%), Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot: 10295441;

用 DMSO 稀释至母液浓度为 1mg/ml.

2.2.3 Western Blot 免疫印迹

a) 裂解液

RIPA 裂解液 (中), Beyotime® P0013C;

添加剂: Complete Tablets Cocktail 蛋白酶抑制剂, Roche® Ref:
04693132001

b) BCA 试剂

A 液: Beyotime® P0011-1

B 液: Beyotime® P0011-2

c) LDS Sample Loading Buffer (4×), Novex® Lot:2201445

d) DTT 二硫苏糖醇固体, Thermo Fisher Scientific® Gibco® Lot: 11896744;
用 ddH₂O 稀释至 1M 浓度使用。

e) SDS-PAGE 电泳

PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (12.5%), 雅酶® cat. no. PG113;

SurePAGE™, Bis-Tris, 10×8, 4-12%, 15 wells, GenScript Lot: M00654

Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液 (10×), 雅酶® cat. no. PS105, Lot:03511040

f) 转膜

Immun-Blot® PVDF membranes for protein blotting, BIO-RAD® CAT:
#1620177;

iBlot®2 NC Regular Stacks, Invitrogen® Lot: 2NR241220-01

转膜缓冲液 (10×), 雅酶® CAT:PS109, Lot:034A1040

g) 封闭

Non-Fat Powdered Milk, Sangon Biotech® Lot: GB02BA0003;

QuickBlock™ Western 封闭液, Beyotime® P0252-100ml

h) 一抗

p62 (1:1500), Thermo Fisher® Scientific®, cat. no. PA5-27247;

Lys63 (1:1000), Sigma-Aldrich®, cat. no. 05-1313;

LC3B (1:1200), Thermo Fisher Scientific, cat. no. PA1-16930;

αsyn (1:1500), BD, cat. no.610787

anti-β-tubulin antibody (1:2000), Abcam® Lot: ab6046

i) 二抗

Goat-anti-mouse IgG-HRP 2nd antibody (1:5000), Abmart® Lot:324379

Goat-anti-rabbit IgG-HRP 2nd antibody (1:5000), Abmart® Lot:324674

- j) 通用型 ECL 发光底物, 圣尔生物® Lot:MN11
- k) TBS/Tween 缓冲液 (10×), 雅酶® CAT:PS103

2.2.4 均相时间分辨荧光技术 (HTRF)

- a) 抗体
Alpha-Synuclein aggregation Kit HTRF®, Cis-bio®, cat. no. 6FASYPEG

2.2.5 免疫荧光染色

- a) 可溶性聚四氟乙烯 PFA, Sigma-Aldrich®, cat. no. 430943
使用 ddH₂O 稀释至 4% 使用。
- b) DAPI 核酸染料, Thermo Fisher® Scientific®, Lot: D1306;
- c) 抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI), Beyotime® P 0131-25ml.

2.3 实验仪器

- a) Countess™ 3 自动细胞计数器, Thermo Fisher® Scientific®, Lot: AMQAX2000
- b) BioTek Synergy Neo2 Hybrid 多功能微孔板检测仪
- c) PowerPac™ 通用电泳仪电源
- d) E-BLOT® 接触式化学发光电子压片成像仪
- e) 显微镜
ZEISS LSM 880 激光共聚焦显微镜
ZEISS AxioScope 5 智能显微镜
高内涵成像系统

2.4 实验软件

- a) ImageJ
- b) Excel
- c) ZEN lite3.0
- d) Harmony 软件 (Harmony High-Content Imaging and Analysis Software)
- e) GraphPad Prism 8

2.5 实验方法

2.5.1 细胞系传代培养

a) 细胞培养

- 本研究所有使用细胞系培养条件均为 37°C、CO₂ 浓度~5%，培养皿为 t25 细胞培养瓶；
- 所有直接加入培养皿/与细胞直接接触的试剂均需提前预热至 37°C~42°C（不宜过长以免试剂成分失效或变质），避免过冷刺激细胞造成不利影响；所有向细胞加入或吸去的操作均应紧贴瓶壁小心、缓慢加入，以免对细胞造成机械损伤；
- 对于 ATG5KO/LC3BKO/wt HEK-293T 等难贴壁细胞，需要提前对细胞板进行包被，以使其更易于贴壁，有利于后续实验的展开和分析；
 - i. 对于 24 孔板，每孔加入 200μl 多聚赖氨酸 PLL (200μg/ml)，室温过夜；
 - ii. 回收包被液，用 PBS 清洗 3 遍；
 - iii. 放置于 37°C 培养箱晾干，约 1~2d 后即可使用。

b) 细胞传代

在普通光学显微镜下检查细胞状态与密度，当密度近 95%且细胞形态正常时即可传代。

- i. 小心吸去瓶内原培养基；
- ii. 加入 1ml PBS，轻轻摇晃洗去细胞表面残留的原培养基，随后吸去；
- iii. 加入 1ml TrypLE，轻轻摇晃使其均匀分布于瓶底，随后放置 37°C 培养箱静置 3~7min (HeLa~7min, 5Y-A53T~5min, ATG5KO/LC3BKO/wt HEK-293T~3min)；
- iv. 加入 1ml 对应的培养基以中和 TrypLE，终断消化反应；
- v. 轻轻吹打细胞形成悬浊液，转移至 15ml 离心管中；
- vi. 1200 rpm 离心 3min 后，小心吸去上清；
- vii. 加入 1ml 对应的培养基重悬细胞并充分混匀，若后续实验需要，可用细胞计数板进行计数。

c) 细胞冻存

- 因冻存液成分对细胞毒性较大，将其加入后的每一步操作均需迅速。
- 前半部分步骤同（上）。
 - i. 取 500~1000μl 细胞悬液至冻存管；

- ii. 以体积比 1:2:7 = DMSO : FBS 胎牛血清 : 细胞悬浊液的比例混合悬液;
 - iii. 迅速转移至-80°C 环境冻存至 1~2d;
 - iv. 将冻存管转移至液氮罐中长期保存。
- d) 细胞复苏
- i. 预热无菌水浴锅至 42°C;
 - ii. 从液氮罐中取出细胞, 迅速转移至 42°C水浴, 快速摇晃、使之与水浴充分接触迅速冻融;
 - iii. 将融化后的冻存细胞悬液转移至 15ml 离心管;
 - iv. 后续步骤如上。

2.5.2 脂质体转染

- a) 提前铺细胞至 24 孔板, 使第二天转染时细胞密度约 80% (根据细胞生长速度差异, ATG5KO/LC3BKO/wt HEK-293T, HeLa~ 1.8×10^5 细胞/孔; 5Y-A53T~ 2.3×10^5 细胞/孔)
 - b) 转染前, 各孔加入 400 μ l Opti-MEM 以饥饿处理, 提高转染效率;
 - c) 配制转染体系 (每孔)
 - i. 双荧光质粒转染
 体系 A: 50 ul Opti-MEM + 1 μ g 质粒 + 1.5 ul P3000
 体系 B: 47 ul Opti-MEM + 3 ul Lipofectamine
 - ii. α syn PFF 转染
 体系 A: 50 ul Opti-MEM + 5 ul α syn PFF (40 μ M, 即使得体系中 α syn PFF 终浓度 400nM) + 1.5 ul P3000
 体系 B: 47 ul Opti-MEM + 3 ul Lipofectamine
- *特别注意: 对于既需转染双荧光质粒, 又需转染 α syn PFF 的实验, 必须分开转染 (间隔 1~3d), 不能同时转染。因 α syn PFF 对体系渗透压及细胞膜通透性等产生的影响, 将极大地降低双荧光质粒转染的效率。该现象对于 HeLa 与 5Y-A53T 细胞系尤其明显。
- d) 小心混合体系 A 与体系 B, 静置 10~15min 后, 使用悬滴法将 100 ul 混液加入各孔中;

- e) 时间过短会导致待转染成分未能充分被脂质体包裹，时间过长会导致已形成脂质体不稳定、解体释放包裹的待转染成分，这些操作均会降低转染效率。
- f) 置于 37°C 培养箱内静置 4~6h 后，吸去孔内全部培养基，更换为对应的细胞培养基；
- g) 约 3d 后，可以用于后续实验。
- h) 对于需添加 Bafilomycin A1 (Baf A1) 的实验组，应在转染后约 2d 时更换为含对应浓度的细胞培养基，并在 24h 后准时中断反应，开展后续实验。

2.5.3 Western Blot 免疫印迹

a) 收集蛋白样

因蛋白质在室温条件下极易降解，降低收样效率，因此本步骤全程应在冰上或 4°C 环境中进行；

- i. 吸去培养基；
- ii. 使用预冷的 PBS 轻柔地清洗细胞，重复 1~2 次后吸去；
- iii. 根据各孔细胞密度与状态向各孔加入不同量的裂解液（例，24 孔的细胞密度约 90% 的 5Y-A53T 细胞，添加 45 ul 左右裂解液为宜），于 4°C 摇床上摇晃 80r/min~30min，或于室温摇床上振荡 650r/min~20min，充分裂解；
- iv. 收集细胞裂解液，在预冷至 4°C 的离心机中 12000rpm 离心 10min；若涉及超声操作，则在离心前进行超声，程序设置为 0.5s~30 次~200kW.
- v. 小心、充分地收取上清即为蛋白样品，弃去沉淀；

b) BCA 法总蛋白浓度定量

i. 配制 BCA 工作体系

样品：18 ul PBS + 2 ul 蛋白样品 + 200 ul BCA 工作液（A 液 : B 液 = 50 : 1）

标准 BSA 样品：0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 至 2 ul；18 ul PBS + 2 ul 蛋白样品 + 200 ul BCA 工作液（A 液 : B

液 = 50 : 1)

- ii. 避光静置于 37°C 培养箱约 30min, 使用微孔板读数仪读数, 使用 Excel-数据-回归功能分析结果。

c) Western Blot 免疫印迹

i. 煮蛋白

根据实验需求(例如需统一上 50µg 总蛋白)配制蛋白样品: 使用 PBS 提前配平浓度, 并按比例稀释 4×sample loading buffer 与 10×DTT (母液浓度为 1mg/ml) 至 1×.

置于 75°C 水浴锅中煮 10min, 结束后立即转移至 4°C/冰上冷却。

ii. SDS-PAGE

表 2 本研究使用电泳胶类型

类型	电泳 Buffer	一般电泳条件	优缺点	优势蛋白
雅酶 12.5%自配分离胶	Tris Running Buffer	层积: 85V~20min; 分离: 130V~60min	较小分子量蛋白能分离较开; 大分子量蛋白分离效果不佳	LC3-I/II
金斯瑞 4~15%预制梯度胶	MOPS Running Buffer	145V~60min	与上相反	Lys 63 泛素链

将前面煮好的蛋白样品加入电泳胶各槽内; 按各胶适宜条件进行电泳。

iii. 转膜

表 3 本研究使用的转膜方法

转膜方法	电压-时间	膜类型	转膜 Buffer	优势蛋白
湿转	80V-50~60min	甲醇预先激活 60s 的 PVDF 膜 (孔径约 22µm)	4°C充分预冷的湿转 buffer	LC3-I/II
干转	20V-10min	iBlot 2 干式转印系统		Lys 63 泛素链

按照表 3 所示对应条件转膜;

使用 5%脱脂牛奶, 在室温 20r/min 的摇床上封闭 1h (或使用碧云天快速封闭液可缩短至 10~30min)。

iv. 抗体孵育

使用各蛋白对应的一抗，于 4°C, 20r/min 的摇床上孵育 24~36h;
使用 1×TBS/Tween 洗膜，于室温 80r/min 的摇床上洗 10min (3 次);
使用对应的二抗，于室温 20r/min 的摇床上孵育 1h;
使用 1×TBS/Tween 洗膜，于室温 80r/min 的摇床上洗 10min (3 次);

d) 分析

对于 c) 中得到的结果，由 Image J 软件圈定蛋白条带并测量分析条带灰度，并根据内参蛋白 β -Tubulin 水平进行调平。最后使用 Excel 基本公式及绘图功能处理作图。

2.5.4 均相时间分辨荧光技术(HTRF)

a) 光敏梯度测定

- i. 根据 BCA 法总蛋白浓度定量的结果，按照 5 μ l 含总蛋白 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 μ g 的浓度用相应裂解液配制;
- ii. 1:1 加入 5 μ l α syn aggregates Tb/D2 抗体，于 17°C 避光静置反应 12h;
- iii. 使用微孔板读数仪读数，使用 Excel-数据-回归功能分析结果，选取适宜蛋白工作浓度。

b) 蛋白样品测定

- i. 根据梯度测定的适宜蛋白工作浓度的结果，利用相应裂解液配平蛋白样品至总体积为 5 μ l;
- ii. 1:1 加入 5 μ l α syn aggregates Tb/D2 抗体，于 17°C 避光静置反应 12h;
- iii. 使用微孔板读数仪读数，使用 Excel-数据-回归功能分析结果，并用 Excel-绘图功能处理作图。

2.5.5 免疫荧光染色

a) 吸去细胞培养基，用预冷的 1×PBS 清洗两遍;

b) 固定

向各孔加入 200 μ l 4%可溶性聚四氟乙烯 PFA，室温静置，避光固定 15min;
用预冷的 1×PBS 洗去固定液，于室温 20r/min 的摇床上温和地避光洗 5min (3 次);

c) 染色

DAPI 染细胞核，室温静置，避光染色 10min;

用预冷的 1×PBS 洗去固定液，于室温 20r/min 的摇床上温和地避光洗 5min
(3 次)；

d) 制片

向干净的载玻片上滴加封片剂；

小心地倒扣玻片（长有细胞的一面朝向盖玻片），避免气泡产生；

用指甲油沿玻片边缘点四点固定，室温避光晾干约 20~20min.

e) 利用 ZSM 880 共聚焦显微镜拍摄

f) 利用 ImageJ 对拍摄照片进行荧光对比分析，以及 puncta 计数，利用 Excel-
绘图功能处理作图。

三、研究结果

3.1 向细胞内引入 α -Synuclein 聚集体

在体外将重组单体 α -Synuclein (α syn) 蛋白转化为原纤维形式的 α syn PFF (pre-performed fibrils), 再将其注射入大脑或直接加入体外培养细胞系的培养基中, 是用于研究 α syn 在帕金森病等突触核蛋白病发病机制中作用的常用的疾病模型^{[9][10]}。与其他基于病毒载体和转基因模型相比, 该模型诱导的 α syn 水平更接近真实生理水平, 且其病理学变化为加入 α syn PFF 后启动内源性 α syn 产生^[11]。

据此, 最初我尝试将一系列梯度浓度 (1, 2.5, 5, 10 μ g/mL) 的 α syn PFF 直接加入 HEK-293T 细胞的培养基, 孵育培养 7~14d 后收集细胞内蛋白进行 Western Blot (测定总 α syn 水平) 与 HTRF (测定内源性 α syn 水平) 实验发现, 尽管相比对照组总 α syn 水平有所提高, 但并不随 α syn PFF 浓度变化而变化, 且内源性 α syn 水平的提高不明显(图 1.a)。这可能源于本研究制备的 α syn PFF 体积较大, 直接将其加入培养基跨膜效率较低。

因此, 我尝试用高效转染试剂 Lipofectamine 3000 形成脂质体包裹一系列梯度浓度 (200, 400, 600, 800nM) α syn PFF 转染进入 HEK-239T 细胞, 转染 3d 后收集细胞内蛋白进行 Western Blot 与 HTRF 实验发现, 内源性 α syn 水平均随 α syn PFF 浓度的不同而变化, 且总 α syn 及内源性 α syn 水平均高于对照 (图 1.b)。

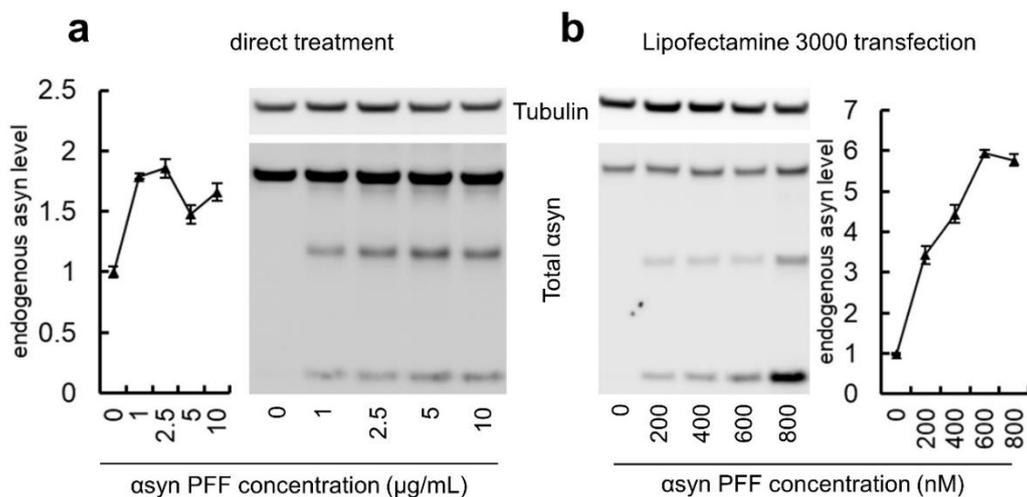


图 1 向 HEK-293T 内引入 α syn PFF 的两种方案

a) 向 HEK-293T 培养基中直接添加系列浓度的 α syn PFF (direct treatment) 后, HTRF 测定内源性 α syn (endogenous α syn) 水平 (左)、Western Blot 测定总 α syn (total α syn) 水平

(右); b) 用 Lipofectamine 3000 向 HEK-293T 转染系列浓度的 α syn PFF (transfection) 后, Western Blot 测定总 α syn 水平 (左)、HTRF 测定内源性 α syn 水平 (右)。

3.2 α -Synuclein 聚集体抑制细胞自噬

确定通过 Lipofectamine 3000 转染 α syn PFF 进入细胞的方法后, 设置转染等体积 PBS 为阴性对照, 加入自噬阻断剂 BafA (Bafilomycin A₁) 处理 (30~100nM, 1d) 为阳性对照, 实验组为转染 α syn PFF (400nM, 3d)。

选择性自噬关键受体 p62/SQSTM1 是一类广泛用于检测自噬活性的标志蛋白, 当自噬受到抑制时, p62 因无法通过自噬途径降解而积累^[12]; 由 K63 (Lysine-63) 连接的多泛素链与选择性自噬紧密相关^[13], 类似地, 当自噬被抑制时, K63 无法被降解而积累。收集实验组、阴性和阳性对照组的细胞蛋白进行 Western Blot 实验, 结果表明, 在野生型 (wild type, wt) HEK-293T、HeLa 细胞, 以及内源性 α syn 水平更接近真实生理状态的稳转 A53T 突变的 SH-SY5Y 细胞 (5Y-A53T) 中, 转染 α syn PFF 后, 胞内 p62 与 Lys63 水平均上调, 说明自噬均被抑制 (图 2.a)。

在 pH 值约 4~5 的溶酶体 (lysosome) 内, EGFP (pKa = 6.0) 的荧光淬灭, 而 mCherry (pKa = 3.8) 的荧光则相对稳定。利用两种荧光对溶酶体内酸性环境的不同敏感性, mCherry-EGFP 双荧光标记 (tandem fluorescent-tagged) LC3/p62 可用于可视化该蛋白从中性的自噬体内到酸性的溶酶体内的转变^[14]: 自噬受抑制时, 自噬体与溶酶体的融合被抑制, LC3/p62 滞留于中性环境的自噬体内, GFP 的绿色荧光得以更多地存在, 与 mCherry 的红色荧光叠加呈黄色; 此外, 由于自噬体数量增加, 红色、绿色荧光共定位发光产生的黄色荧光斑块 (puncta) 也随之增加 (图 2.b)。

通过分子克隆构建并向 wt HEK-293T 内转入 pC3-mCherry-EGFP-p62/LC3 质粒后, 使用普通荧光显微镜 ZEISS AxioScope 5 观察发现, pC3-mCherry-EGFP-LC3 的荧光呈片状而面积大, 难以辨识 puncta, 因此选用 pC3-mCherry-EGFP-p62 观察自噬活性 (图 2.c)。

使用高通量的高内涵细胞成像系统观察并记录荧光信号, 并用 Harmony 软件 (Harmony High-Content Imaging and Analysis Software) 内置算法对红色和绿色荧

光的相对强度以及黄色荧光 puncta 数量等参数进行统计分析，结果表明：转染 α syn PFF 后，EGFP/mCherry 的绿/红相对荧光强度比 (relative spot intensity) 上升，说明与 p62 连接的 EGFP 更多地定位于中性的自噬体内而不被淬灭，即自噬被抑制；而荧光 puncta 的数量 (number of spots) 则并不规律，这可能源于内置算法对 puncta 的判定和面积圈定不够准确 (图 2.d)。

进一步使用 ZEISS LSM 880 激光共聚焦显微镜观察并记录荧光信号(图 2.e)，使用 ImageJ 软件对选定视野内红绿荧光相对强度比进行统计分析，并对黄色荧光 puncta 进行手动计数统计，结果表明：转染 α syn PFF 后，EGFP/mCherry 的绿/红相对荧光强度比上升，荧光 puncta 数量 (number of EGFP⁺mCherry⁺ spots) 增加，即自噬被抑制 (图 2.f)。

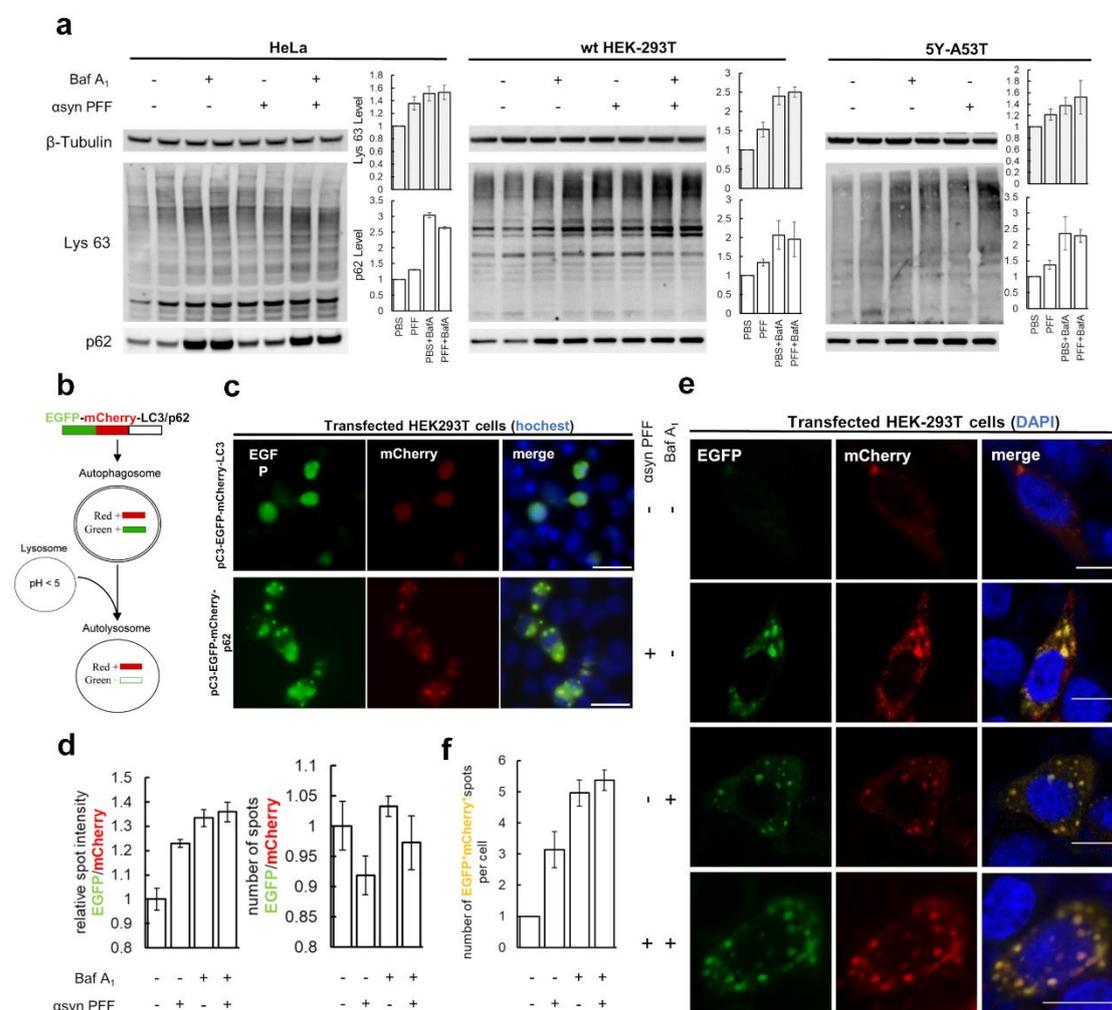


图 2 α syn PFF 的转染在多个细胞系内抑制自噬水平

a) Western Blot 测定 HeLa (左)、wt HEK-293T (中) 和 5Y-A53T 细胞系中各组 Lys63 泛素链、p62 蛋白水平的结果，条带为代表性结果，柱状图为生物重复 (N = 5) 的统计结果；b)

mCherry-EGFP 双荧光标记 LC3/p62 标志细胞自噬流的原理示意图; c) 向各组细胞内分别转染 pC3-EGFP-mCherry- LC3/p62 双荧光质粒后, 使用普通荧光显微镜 ZEISS Axioscope 5 拍摄的代表性照片, 细胞核为 hocheist 染色 (1:1000), 比例尺实际长度为 20 μ m; d) 使用 Harmony 软件对高内涵细胞成像系统拍摄的红、绿荧光信号进行分析统计的结果; e) 向各组细胞内转染 pC3-EGFP-mCherry-p62 双荧光质粒后, 使用 ZEISS LSM 880 激光共聚焦显微镜拍摄的代表性照片, 细胞核为 DAPI 染色 (1:100), 比例尺实际长度为 10 μ m; f) 对 ZEISS LSM 880 拍摄照片的黄色 puncta 数量的统计分析结果。

总之, 通过 Western Blot 实验观察自噬相关蛋白, 以及 EGFP-mCherry 双荧光标记 p62 检测自噬流, 我首先在 wt HEK-293T、HeLa 与 5Y-A53T 三个体外培养细胞系内初步验证了 α syn PFF 对细胞自噬的抑制作用, 下一步是探究这一抑制效应的具体机制。

3.3 α -Synuclein 聚集体对细胞自噬的抑制与 LC3 有关

要验证 α syn PFF 通过结合 LC3 抑制细胞自噬的假设, 首先要验证 α syn PFF 对细胞自噬的抑制与 LC3 有关, 我们需要在排除 LC3 或抑制其自噬相关生理功能的体系加以检验。

Atg5 是一个自噬关键功能基因。ATG5 二聚体和共轭 ATG12-ATG16 形成的蛋白质复合物与自噬体外膜结合并促进其弯曲和伸展, 此外, ATG5 在募集 LC3-II 至自噬体膜的过程中发挥关键作用^[15]。因此, ATG5 敲除 (knockout, KO) 是构建 LC3 相关自噬缺陷细胞模型的常用手段。

除了 ATG5 KO HEK-293T (ATG5 KO 293T) 细胞系, 我还在直接敲除 LC3B 的细胞系 LC3B KO HEK-293T (LC3B KO 293T) 中验证了 α syn PFF 的转染对细胞自噬的影响, Western Blot 实验结果表明: 在两个 LC3 相关的自噬缺陷细胞系内, 转染 α syn PFF 后, 胞内 p62 与 Lys63 维持在较高基线, 但基本无变化, 说明 α syn PFF 未能发挥自噬抑制作用 (图 3.a)。

同样地, 向 ATG5 KO 293T 与 LC3B KO 293T 中转入 pC3-mCherry-EGFP-p62 后, 高内涵细胞成像系统拍摄与 Harmony 软件的分析表明: 转染 α syn PFF 后, EGFP/mCherry 的绿/红相对荧光强度比不变, 说明 α syn PFF 未能影响自噬; 基于

3.2 中荧光 puncta 数量变化的不规律，虽然转染 α syn PFF 后，数量变化不明显，但因技术原因难以据此作出判断（图 3.b）。ZEISS LSM 880 激光共聚焦显微镜拍摄（图 3.c）与 ImageJ 软件的分析表明：转染 α syn PFF 后，EGFP/mCherry 的绿/红相对荧光强度不变，荧光 puncta 数量几乎不变，即 α syn PFF 未影响自噬（图 3.d）。

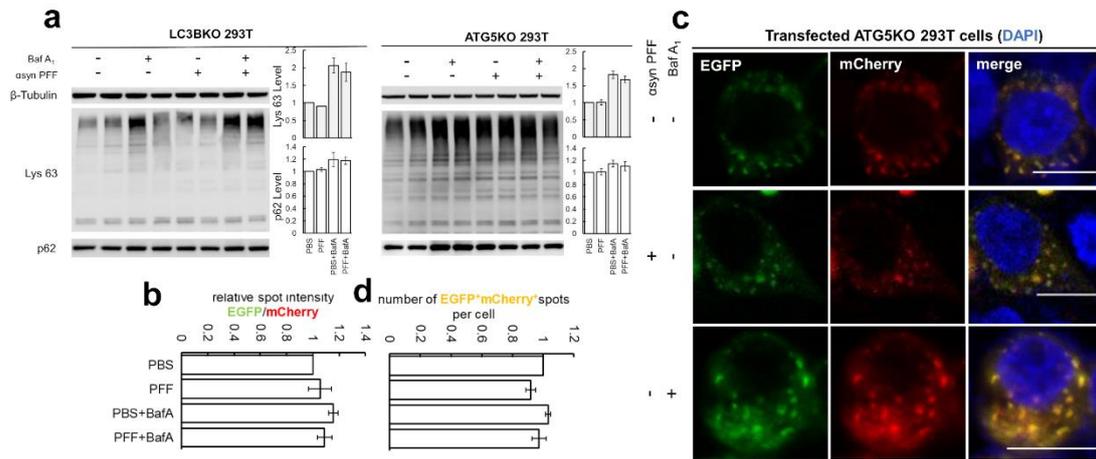


图 3 α syn PFF 在自噬缺陷细胞系内无法抑制自噬

a) Western Blot 测定 LC3B KO 293T（左）和 ATG5 KO 293T（右）细胞系中各组 Lys63 泛素链、p62 蛋白水平的结果，条带为代表性结果，柱状图为生物重复 (N = 4) 的统计结果； b) 用 Harmony 软件对高内涵细胞成像系统拍摄的红、绿荧光信号进行分析统计的结果； c) 向各组细胞内转染 pC3-EGFP-mCherry-p62 双荧光质粒后，使用 ZEISS LSM 880 激光共聚焦显微镜拍摄的代表性照片，细胞核为 DAPI 染色 (1:100)，比例尺实际长度为 10 μ m； f) 对 ZEISS LSM 880 拍摄照片的黄色 puncta 数量的统计分析结果。

总之，在 ATG5 KO 293T 和 LC3B KO 293T 两个 LC3 相关自噬缺陷细胞系内，我通过 Western Blot 实验检测 p62、Lys63 水平，以及 EGFP-mCherry 双荧光标记 p62 检测自噬流，说明了 α syn PFF 对细胞自噬的抑制与 LC3 及 LC3 自噬相关生理功能有关。接着，我们将进一步探索这一抑制效应是否与我们基于体外实验发现作出的假设有关： α syn PFF 与 LC3 的结合。

3.4 α -Synuclein 聚集体对细胞自噬的抑制与和 LC3 的结合有关

合作课题组前期通过体外重组的不与 LC3B 结合的 α syn 突变体合成了 $\Delta\alpha$ syn

PFF, 基于此设计转染等体积 PBS 为阴性对照, 加入自噬阻断剂 BafA (Bafilomycin A₁) 处理 (30~100nM, 1d) 为阳性对照, 实验组为转染 α syn PFF (400nM, 3d) 与 $\Delta\alpha$ syn PFF (400nM, 3d)。

收集 wt 293T 与 5Y-A53T 中各组细胞蛋白进行 Western Blot 实验, 结果表明: 转染 $\Delta\alpha$ syn PFF 后, 胞内 p62 水平相比转染 α syn PFF 组更低, 且基本与阴性对照组相同 (图 4)。这不仅再次验证了 α syn PFF 的转染对自噬的抑制, 还说明了不与 LC3 结合的 $\Delta\alpha$ syn PFF 的转染无法再影响自噬, 即 α syn PFF 对自噬的影响与和 LC3 的结合有关。在目前有限的两次生物学重复中, 转染 α syn PFF 组与转染 $\Delta\alpha$ syn PFF 组的相对 Lys63 水平截然相反 (图 4), 考虑到本实验室所使用的 Lys63 抗体在此前实验中多次出现杂蛋白不稳定、均匀的情况, 且降解极快的缺点, 该部分数据还需要更多的进一步实验确认。

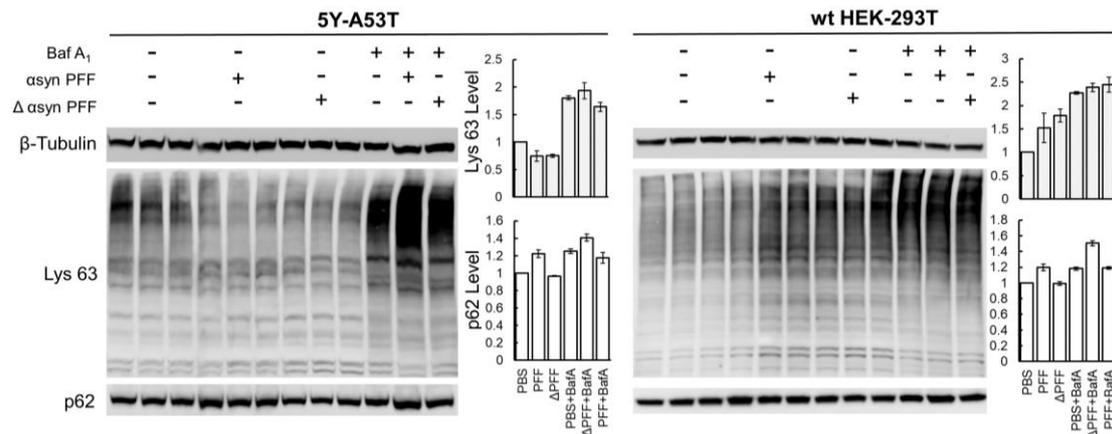


图 4 不与 LC3B 结合的 $\Delta\alpha$ syn PFF 在细胞系中无法抑制自噬水平

Western Blot 测定 5Y-A53T (左) 和 wt HEK-293T (右) 细胞系中各组 Lys63 泛素链、p62 蛋白水平的结果, 条带为代表性结果, 柱状图为生物重复 (N = 2) 的统计结果。

四、讨 论

4.1 结论

课题组前期在体外的结构生物学、生物化学研究发现：与包括帕金森病在内的多种突触核蛋白疾病的神经退行紧密联系的 αsyn 聚集和自噬关键蛋白 LC3 结合，且可能进一步影响 LC3 结合其他自噬相关蛋白的生理学功能。

基于这一现象，本研究首先在体外培养细胞系 HEK-293T、5Y-A53T 与 HeLa 中探索了将 αsyn PFF 通过脂质体转染进入细胞的方法，随后设计 Western Blot 实验、EGFP/mCherry 双荧光标记选择性自噬关键受体 p62 检测自噬流变化等实验验证了 αsyn PFF 对细胞自噬水平的抑制。进一步地，我在两个经典的 LC3 相关的自噬缺陷细胞系 ATG5 KO 293T 与 LC3B KO 293T 中验证了这一抑制效应与 LC3 有关。最后，利用合作课题组体外重组并构建的不与 LC3 结合的突变体 $\Delta\alpha\text{syn}$ PFF，我在 HEK-293T 与 5Y-A53T 细胞系中验证了这抑制效应与 LC3 和 αsyn PFF 的结合有关；但在较有限的生物学重复间，Western Blot 实验中 Lys 63 泛素链蛋白水平的异常，以及双荧光标记 p62 检测自噬流实验部分数据的缺失，该结果仍需进一步实验检验。

4.2 α -Synuclein 聚集体对 LC3 的影响

LC3 是本研究的主角蛋白，但本研究对 LC3 蛋白水平的检测却屡屡碰壁。

在转染 pC3-EGFP-mCherry-LC3B 以检测自噬流的实验中，荧光呈现片状，难以辨识出代表自噬体的荧光 puncta，进一步的分析统计自然无法开展。

在几乎对本研究使用的所有细胞系的 Western Blot 中，LC3-II 的检测都存在困难：结果不稳定、几乎无规律可循，未添加自噬阻断剂 BafA₁ 的实验组甚至偶尔杂不出条带。起初，我们尝试更换一抗，未见明显变化；其次，我在 wt HEK-293T 内更换多种裂解方法，如：改变裂解时长与温度（4°C~30/40/50min，室温~15/20/25/30min）与裂解液成分（RIPA 中/强/弱以及各种酶抑制剂的添加），超声与否等；更换多种转膜条件，如：膜的孔径大小，转膜电压及时间等等。

对于相关实验结果的解释，一方面可能存在一些仍未能发现和解决的技术原因；另一方面， αsyn PFF 与 LC3 的结合并没有直接改变自噬体的数量（因而不

会影响 LC3 与自噬体膜结合的形式——LC3-II水平的变化), 而是影响 LC3 识别并结合自噬相关底物的能力, 进而影响整体自噬水平 (自噬底物 p62、Lys 63 泛素链等蛋白水平上升), 而这一猜测与课题组前期的体外生化实验研究结果相符。

4.3 展望

从 α syn 聚集的神经退行病理学背景出发, 对 α syn 聚集与细胞自噬相互关系的研究并不少见。国内外众多课题组已在结构生物、细胞生物甚至临床上报道了 α syn 聚集与细胞自噬相互影响的自噬机制。这一方面为进一步理解 α syn 聚集诱导疾病的机制提供证据, 另一方面也为制药新靶点的开发提供了可能。基于课题组前期体外研究中发现 α syn PFF 结合 LC3 的铺垫, 本研究进一步在细胞模型中进行了初步检验, 希望这一微小的工作也能继续成长, 为相关研究作出小小的贡献。

参考文献

1. D.E. Cabin, K. Shimazu, D. Murphy., et al. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α -Syn[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(20):8797-807.
2. A. Abeliovich, Y. Schmitz, I. Farinas, et al. Mice lacking α -Syn display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system[J]. *Neuron*, 25 2000, pp. 239-252
3. Lashuel, H. A., Overk, C. R., Oueslati, et al. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic targe[J]t. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(1), 38–48.
4. S.J. Wood, J. Wypych, S. Steavenson, et al. α -synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. *J Biol Chem*. 1999 9;274(28):19509-12.
5. Winslow, A. R., Chen, et al. α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease[J]. *The Journal of cell biology*, 2010. 190(6), 1023–1037.
6. Song, J. X., Lu, J. H., et al. HMGB1 is involved in autophagy inhibition caused by SNCA/ α -synuclein overexpression: a process modulated by the natural autophagy inducer corynoxine B[J]. *Autophagy*, 2014.10(1), 144–154.
7. Tang, Q., Gao, P., Arzberger, T, et al. Alpha-Synuclein defects autophagy by impairing SNAP29-mediated autophagosome-lysosome fusion[J]. *Cell death & disease*, 2021,12(10), 854.
8. Tu, H. Y., Yuan, et al. α -synuclein suppresses microglial autophagy and promotes neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *Aging cell*, 2021,20(12), e13522.
9. Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A, et al. Mutant A53T alpha-synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy[J]. *The Journal of biological chemistry*, 2011,286(12), 10814–10824.
10. Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease[J]. *Science*,1997, 276(5321), 2045–2047.
11. Volpicelli-Daley, L. A., Luk, K. C., et al. Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death[J]. *Neuron*, 2011,72(1), 57–71
12. Polinski, N. K., Volpicelli-Daley, L. A., Sortwell, et al. Best Practices for Generating and Using Alpha-Synuclein Pre-Formed Fibrils to Model Parkinson's Disease in Rodents[J]. *Journal of Parkinson's disease*, 2018,8(2), 303–322.
13. Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J, et al. Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice[J]. *Science*, 2002,338(6109), 949–953.
14. Jiang, P., & Mizushima, N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells[J]. *Methods*, 2015, 75, 13–18.

15. Erpapazoglou, Z., Walker, O., & Haguenuer-Tsapis, R. Versatile roles of k63-linked ubiquitin chains in trafficking[J]. *Cells*, 2014, 3(4), 1027–1088.
16. Kimura, S., Noda, T., & Yoshimori, T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3[J]. *Autophagy*, 2007,3(5), 452–460.
17. Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms[J]. *The Journal of pathology*, 2010,221(1), 3–12

致 谢

恭喜我，终于到达了这里，先花几分钟“appreciate the moment”吧！

首先感谢我自己。

突如其来的牙髓炎和“二阳”接踵而至，在被病痛折磨得日均睡眠不到5小时，饮食摄入量不如往常1/4的情况下，终于完成了毕业论文的撰写。回望四年，类似的困境并不少见：初入大一的自闭和糟糕成绩表现，每一次亲密关系危机，疫情，登山徒步时的体力耗尽……困难及其引发的消极情绪，就好像ATG5-ATG12-ATG16一样促成了一个人性格、能力与人生经验的螺旋上升。显然我不是那样总是从容的和完成状态的超人，我崩溃、自我放弃和厌弃、犹豫和懦弱的时刻总是在快入睡时将我摇醒。而站在这一段经历的终点，看到它们或多或少被自己一拳打飞而更我能专注、坚持和高质量地实现自己的目标时，这种感谢好像洪水猛兽一般袭来，冲刷了我本就因发烧而空空如也的脑袋。

其次要感谢我的新朋友们。

我的一个偶像马克思说“在其现实意义上，人是其一切社会关系关系的总和”，我的另一个偶像ジン・フリクス在世界树上对他的儿子（读者的代表）说“道中を楽しんでる最中だ、だからもし、お前の行き先が将来オレと重なるようなら、道草を楽しめ大いにな。”室友、实验室的师兄师姐、同学以及在纷繁的校园活动中认识的年龄、性别、来源和性格等五花八门的朋友们，他们以及和他们的交往让我更多地填充和改变自己，让我能最终完成这个旅程。

然后要感谢我的老朋友们。

烧到神志不清时翻了一些老照片，爸爸妈妈的、高中和初中挚友的以及发小的，惊觉变化太大。我们在四年不相交的轨迹中各自走了很远，或许已经变化成不愿意彼此交往的模样，但发源于我目前短暂人生中前期的那部分的联系始终若隐若现地牵在我身后，给人桎梏也给人充足的力量。

特别感谢课题组的王慧兰师姐，直爽、善良、勤奋又科研能力杠杠的江西美女，从李朝阳师兄那里接来我这个懵懂小白，又任劳任怨身体力行地指导我终于成为新手。

特别感谢我的导师鲁伯埭老师，心胸宽阔、可爱而科研实力秒杀众人的老师，在过去的交流中给我深刻的启发和指导、以及一个真正科研工作者应该是什么样子的榜样。感谢鲁老师在毕业设计撰写时期耐心的指导，以及在非工作的“阴间时间”及时回复我消息的无限包容。