

15 生物化学分离纯化

生物化学本身有科学问题，也含可以推动其他学科的技术。

生物化学分析生物体内的分子，尚未结束。生物化学分离纯化生物体系的分子，分析其化学特性和生物学功能，长期以来颠扑不破地对生命科学有重要贡献。在生物问题的分子水平理解完成之前，在未来很长时期，分析和纯化仍将对生物学研究很重要。

生化纯化的关键是：有检测生物学活性的方法，获得足量的含有活性的组织、细胞来源，有合适的分离纯化技术和方法。分离纯化到分子，推动生物学问题的理解。

纯化依赖的典型检测方式是化学反应，也可以是细胞生物学现象，还可以是病理症状。纯化可以很快，也可以很慢。设计的巧妙和长期的坚持，各有所用。

15.1 生物化学分离纯化的重要性

生化提纯当然首先应用于生物化学本身的问题，如酶促反应、代谢、信号转导，但也应用于很多其他学科，例如分离到激素，揭示了内分泌的基础。

脑和神经的功能复杂，但其研究在有些方面也得益于生化分离提纯。十九世纪，德国海德堡的 Willy Kühne 分离视紫红质是视觉研究的里程碑 (Kühne, 1879, 1882)，1950 至 1960 年代，美国华盛顿大学 Victor Hamburger、Rita Levi-Montalcini、Stanley Cohen 分离提纯神经生长因子是发育神经生物学的里程碑、也开启生长因子的研究 (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951, 1953; Cohen, Levi-Montalcini and Hamburger, 1954; Cohen, 1960)，并因为带动表皮生长因子的研究而间接促进了癌症研究 (Cohen, 1962)。分离纯化垂体激素是神经内分泌的重要工作 (Guillemin, 1978; Schally)。分离纯化神经肽是神经传递的重要工作 (Euler and Gaddum, 1931; Chang and Leeman, 1970; Hughes *et al.*, 1975)。分离纯化突触囊泡的膜蛋白，为理解神经递质释放提供了必要基础 (Südhof and Jahn, 1991)。神经纤维连接的重要问题之一是轴突导向，理解其分子机理的途径之一也是分离提纯 (Walter *et al.*, 1987; Luo *et al.*, 1993, 1995; Drescher *et al.*, 1995)。

本章先以轴浆转运的生化研究为例，了解分离纯化的基本要素和意义。再以 Prion (沅蛋白) 的发现为例，看长期坚持分离纯化带来意想不到的概念。

15.2 轴浆转运的发现和描述

神经细胞，形态看起来与其他细胞很不一样。例如，因为其细胞的突起——神经纤维——可以很长，细胞体在脊髓的神经细胞可以有神经纤维到手指、脚趾，负责合成和代谢的细胞体如何与远距离的神经末梢交换物质，显然是重要的问题。从探索神经纤维的轴浆转运，最后发现是细胞内亚细胞器和分子运动的一个普遍问题，而因此发现的分子机理，也是细胞运动的普适性机理。

最初观察到外周的单纯疱疹病毒可能是沿神经纤维进入中枢神经系统 (Goodpasture, 1925)，注射到大脑的脊髓灰质炎病毒迁移到脊髓可能也是沿神经纤维 (Fairbrother and Hurst, 1930)。神经纤维与细胞体之间切断后，外周部分的神经退变，估计是缺乏细胞体运送来的物质 (Cook and Gerard, 1931)。

1943 年，从奥地利被迫移民美国的犹太生物学家、芝加哥大学的 Paul Weiss (1898-1989) 观察到：神经结扎的近端物质堆积造成肿大 (Weiss and Davis, 1943; Weiss, 1944a, 1944b)。

1948 年，Weiss 观察再生神经的实验后提出：神经纤维从细胞体长出，其中轴浆运输不仅在生长期，及时在生长静止期也有轴浆运输，可能运送外周不能合成的物质，如蛋白质 (Weiss and Hiscoe, 1948)。

注射放射性同位素 (^{32}P) 后，可以检测细胞体向神经末梢运输磷的速度 (每天数毫米)，估计磷是以磷酸化蛋白质存在 (Samuels *et al.*, 1951; Ochs and Burger, 1958; Ochs, Dalrymple and Richards, 1962)。电子显微镜观察到神经结扎端线粒体聚集提示线粒体等细胞器也有轴

浆运输 (Weiss, Taylor and Pillai, 1962; Weiss and Pillai, 1962)。

直接以氘标记的亮氨酸注射后,可以不依赖神经纤维结扎的观察间接推断蛋白质的运输 (Droz and Leblond, 1962; Ochs, Dalrymple and Richards, 1962)。

由外周向胞体的运输 (逆向运输) 也有观察, 最早是看见内吞的泡 (Hughes; 1953), 后见胆碱酯酶 (Lubińska, 1963, 1964), 肾上腺素 (Dahlström and Fuxe, 1964; Dahlström, 1965), 同位素标记的亮氨酸 (Lasek, 1967), 蛋白质 (辣根过氧化物酶, Kristenson and Olsson, 1971), 同位素标记的神经生长因子 (Hendry et al., 1974)。

到 1980 年 (Grafstein and Forman, 1980), 已知轴浆转运多种分子 (氨基酸、核苷酸、糖等小分子、神经递质、酶等)、细胞器 (突触囊泡、线粒体、溶酶体等), 和一些外源分子, 既有生理意义、也有病理意义。轴浆转运速度分为 (Lasek, 1982): 快速转运 (最快每天 400 毫米, 平均每天 300 毫米, 依赖微管和钙离子, 需要能量), 慢速转运 (一种每天 0.2 到 2 毫米, 一种 3、4 倍于此, 秋水仙碱也能抑制至少一些)。逆向运输速度为正向快速运输的 50-70%。

15.3 轴浆转运的机理研究

早期考虑过蠕动为轴浆转运的机制 (Weiss, 1969)。

因为用秋水仙碱抑制微管蛋白形成微管, 结果可以抑制轴浆转运, 说明轴浆转运依赖微管 (Kreutzberg, 1969)。

轴浆转运需要 ATP 提供能量, 而且是沿轴突运输的局部提供 (Lux et al., 1970; Dahlström, 1971; Och, 1971)。

到 1980 年, 机制仍然不清楚 (Grafstein and Forman, 1980; Lasek, 1982), 提出了一些快速转运的可能机制, 如: 棘齿机制 (转运物质与微管相互作用而被推动), 被转运物质被液流裹卷, 滑面内质网形成的过程从胞体进入轴突带动。慢速转运的机制, 如: 蠕动, 微管、神经丝与肌动蛋白作用, 或者慢速转运是快速转运间或停顿的表象。

1981 年, 美国达特茅斯学院的 Robert Allen (1927-1986) 和 Woods Hole 海洋实验室的井上晋也 (Shinya Inoué, 1921-2019) 独立发明和改进了显微镜下视频录像技术 (Allen, Allen and Travis, 1981; Inoué, 1981)。Allen 等用于网足虫, 观察到沿微管运动的亚细胞器 (Allen, Allen and Travis, 1981)。

1982 年, Allen 与合作者直接将其显微录像方法 (视频增强反差-微分干涉反差, VEC-DIC) 用于枪乌贼巨大神经, 观察到沿微管运动的颗粒 (Allen et al., 1983)。三类大小不同的囊泡: 以前没有观察到的最小 (30-50 纳米) 囊泡, 沿线性结构 (微管) 运动, 多半是顺行运输, 也有逆向运输, 速度可达每秒 5 微米。中型囊泡 0.2 到 0.6 微米直径, 大型 0.8 微米直径。中型和大型运动速度慢些, 有停顿和间歇运动。小囊泡的运动和大囊泡在非停顿期都显得是持续运动。

美国西储大学 Raymond Lasek 实验室依据前人发现枪乌贼巨大神经纤维的轴浆可以像挤牙膏一样挤出来之后还有代谢的特征 (Morris and Lasek, 1982), 决定把轴浆挤出来之后用 Allen 的显微录像方法观察转运, 结果发现 (Brady, Lasek and Allen, 1982): 去除细胞膜后单独的轴浆, 在玻璃片上看的更清楚, 运动不需要细胞膜, 同样的线性成分 (估计是微管或神经丝) 上可以有多个囊泡、不同方向运动, 运动需要 ATP 供能。囊泡在线性成分之外时有布朗运动, 而上微管之后沿着线性成分作直线运动, 直到在一端掉下后由开始布朗运动 (Allen et al., 1983)。

15.4 分离纯化

斯坦福大学的研究生 Ronald Vale (1959-) 加入 Michael Sheetz (1946-2025) 和 Tom Reese (1935-2024), 进一步优化检测方法, 之后分离纯化促进运动的蛋白。1985 年, 他们用五篇论文分步发表这一工作。

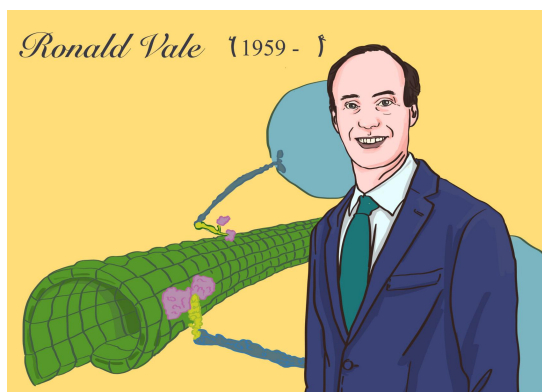


图 15-1 Ronald Vale

Vale 的父母没有读过大学，母亲是演员、父亲是剧作家，后者需要经常快速写电视连续剧的剧本。他的小学同学包括以后的歌星麦克·杰克逊。但 Vale 从 8 岁起就要做科学家，他高中的科研入围了西屋天才奖的前四十位。他在 UCSB 大学期间从老师那里学到科学的热情可以维持到年老。1980 年，他进入斯坦福大学的医学/哲学双博士学位计划。他的研究生导师为神经生物系创系主任 Eric Shooter (1924-2018)，研究 NGF。1982 年，他本该转入医学学习阶段，但他被更令人兴奋的研究所吸引，所以他后来再也没有学医，只以自然科学的博士毕业。

Vale 的研究生论文研究 (NGF) 很“高产”，超出一般学生的文章数量，但他还对其他感兴趣。斯坦福大学的 James Spudich (1942-) 与当时在康乃狄克大学的 Sheetz 合作发表了一篇文章，观察到表面附着肌球蛋白的荧光玻璃珠可以沿来自藻类的肌动蛋白丝运动 (Sheetz and Spudich, 1983)。Vale 想，轴浆转运是否有某种类似的机理 (Vale, 2012)。他和 Spudich 决定研究轴浆转运的分子机理。他们本来准备 1983 年在斯坦福位于加州 Monterey 的霍普金斯海洋研究站捕捞乌贼，用其巨神经做实验。但那年因为厄尔尼诺现象导致加州海岸抓不到乌贼，他们最后没有办法只好跨美国去麻省 Woods Hole 海洋生物学实验室。而 NIH 的 Reese 和 Bruce Schnapp 在那有实验室，光学和电子显微镜技术都非常好。他们四人合作，结果发表于 1984 年的五篇论文，其中四篇 Vale 为第一作者，一篇 Schnapp 为第一作者。

首先，Vale 等重复把枪乌贼轴浆挤出的实验 (Brady, Lasek and Allen, 1982)，保持轴浆完整的情况下观察亚细胞器沿“转运丝” (transport filaments) 的运动。其次，他们把挤出的轴浆经过载玻片挤压后分离，仍然可以观察到亚细胞器可以沿着丝运动，而且无论亚细胞结构的大小，运动速度都是每秒 2.2 微米，不同实验、不同次轴突所得轴浆中观察到的运动速度高度一致。不再有快速、中速和慢速轴浆转运的区别，从而认为运动速度只有一个、而且是匀速运动，而在轴突内表现的慢速是因为亚细胞碰到细胞膜减慢速度所致，体积大的慢、体积小的快 (Vale, Schnapp, Sheetz and Reese, 1985)。

他们进一步的实验确定所谓“转运丝”就是微管 (Schnapp, Vale, Sheetz and Reese, 1985)。这是在分离轴浆观察到运动后，用电子显微镜分析转运丝，发现每一根转运丝就是单根微管，而且用抗 α -微管蛋白的抗体也验证转运丝是微管。微管是已知对细胞运动重要的管状结构，由微管蛋白多聚化组成的微管每一周微管蛋白数量、微管直径都恒定，在电镜下可识别。

Vale 等用前人发明的用乌贼视叶制备微管的办法，制备相对纯化的微管。而把乌贼巨神经轴突的组分分成亚细胞器沉淀部分和轴浆的可溶部分。如果把轴突的亚细胞器部分加到纯化的微管，一般不能观察到亚细胞器的运动，但如果再加入 ATP 和轴浆的可溶部分，亚细胞器运动显著增加。加入不能水解的 ATP 类似物 AMP-PNP 可以抑制这一运动。胰蛋白酶或加热处理亚细胞器组分、或者可溶组分，都可以抑制这一运动，说明两种组分中都有蛋白质参与。把羧基乳胶微球加入，也可以如亚细胞器一样在微管上匀速运动。如果把两个组分和 ATP 稀释，加到载玻片，可以看到微管也可以运动，玻璃片等于微球或亚细胞器，而与

微管的相对运动呈现为微管运动。这些实验成功地把原来在细胞内的运动，在无细胞体系重组，而且可以直接观察微管在载玻片上的运动，不需要观察亚细胞器（Vale, Schnapp, Reese and Sheetz, 1985）。

有了以上体外重组体系，Vale 等就以此为功能检测方法，分离纯化促进运动的蛋白质（Vale, Reese and Sheetz, 1985）。

蛋白质分离纯化的基本工作流程是：用不同特征的化学填料填充形成所谓“色谱柱”，将样本加到柱的顶端，灌流溶液，让样本流过柱，从底端流出，接到试管。试管装在圆盘里面，每个试管（按体积设定机器转动圆盘的时间）接一定量的流出，每一个试管接的量为一个组分。再从每一个组分取一小部分用于活性检测。例如用于检测是否能够促进微管在载玻片上的运动。有活性的组分合并在一起，再用第二根柱重复以上过程。每一根柱的特征不同，有的因为孔径不同而让不同分子大小的蛋白质传流速度不同（大分子先出、小分子后出）、有的因为带电不同而区分带电量不同的分子流出不同、有的因为疏水性不同等等。经过多次过柱后，活性组分含的分子越来越少。过最后一根柱后再上聚丙烯酰胺凝胶，银染后显示的蛋白质条带含蛋白质种类少。比较有活性和没有活性的组分在银染凝胶的情况，推测哪条、哪几条带可能含活性蛋白。切下这类条带，用质谱仪检测其中蛋白质。

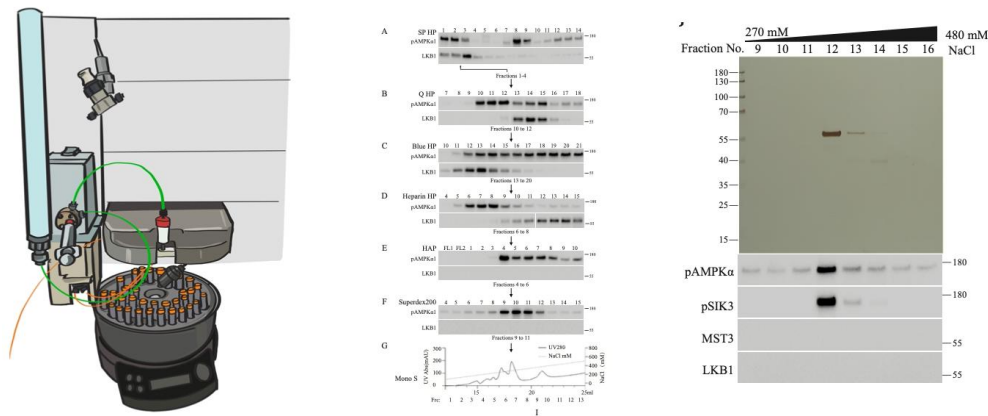


图 15-2 分离器、多个层析柱分离后的组分与活性、从最后一根柱的成分纯化活性带

为了增强运动蛋白与微管的结合，从而更好分离，Vale 等用 AMP-PNP 处理样本（乌贼巨神经轴浆或乌贼视球）。结果确实有更多蛋白质与微管结合，然后可以被 ATP 所释放。在分离纯化过程中见轴浆中约 110 kD 的蛋白，其行为与运动蛋白一致。在乌贼视球分离过程中，也找到一个 110 kD 的运动相关蛋白，还有相关的 65/70 kD 的蛋白质。他们用同样方法，在猪脑也分离到运动相关的 120 kD 和 62 kD 蛋白。

他们推测乌贼巨神经轴浆和乌贼视球中 110 kD 和 65/70 kD 的蛋白共同组成复合体，为运动蛋白。猪脑 120 kD 和 62 kD 蛋白组成运动蛋白的复合体。他们称之为 kinesin（驱动蛋白）。

此后，他们意识到 kinesin 只驱动顺向转运（从细胞体到神经末梢），而不能促进逆向转运（神经末梢到细胞体）。他们制备了抗 kinesin 蛋白 110 kD 组分的抗体。如果事先用这一抗体处理巨神经轴浆，移除其结合的 110 kD 蛋白，轴浆其余组分不促进体外重组系统的顺向转运，但逆向转运活性仍然存在。他们因此认为有不同的蛋白质促进不同方向的运动（Vale *et al.*, 1985）。美国西南医学中心的 Scott Brady 再 1985 年也报道，从鸡脑中分离到 130 kD 的与微管结合的 ATP 酶，认为应该是快速轴浆转运相关的蛋白（Brady, 1985）。

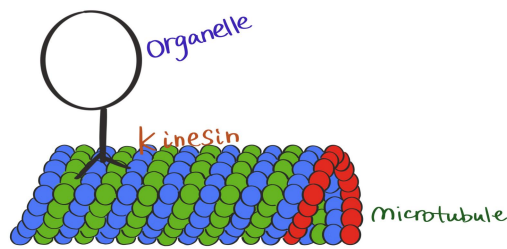


图 15-3 Kinesin 与依赖微管的运动

原本在完整细胞中观察到的运动，最后化简为运动分子推动亚细胞器沿微管运动，深化了细胞生物学的理解。而实验虽然是用神经纤维做的，发现的规律并非神经系统特异的，而是一个基本的细胞生物学过程，神经纤维只是因为长而便于观察，粗而便于开始进行体外无细胞体系的重建。实际上，一开始就可以用其他细胞进行分类纯化，不仅如竞争者 Brady 用鸡脑，也可以用非神经细胞制备“可溶成分”，依赖功能进行分离纯化。

此后，研究者从线虫和果蝇都分离到微管结合蛋白，从中找到分子量接近、有 ATP 酶活性、可以促进运动的蛋白质 (Lye *et al.*, 1987; Saxton *et al.*, 1988)。在果蝇还制备了抗体 (Saxton *et al.*, 1988)，结果发现与枪乌贼的 kinesin 类似 (Saxton *et al.*, 1988)。首先是果蝇编码 kinesin 的基因得以克隆 (Yang, Saxton and Boldstein, 1988; Yang, Laymon and Goldstein, 1989)。

Vale 等分离的现在称为 kinesin I，由一条重链 (~110 kD) 两条轻链 (~65 kD) 组成。重链的 N 端为运动端，C 端由重链和轻链链接被转运的亚细胞器。现在知道 Kinesin 是一个家族，人有 45 个成员 (KIFs)。它们中大多数将亚细胞器或分子由微管的-端移向+端。家族可以分为 14 个亚家族，结构不同。它们分布在不同组织细胞，通过转运不同物体而起不同功能。其中一个有趣的功能是在胚胎发育早期，Kif3b 参与左右轴的形成。

15.5 小结

生物化学分离纯化，很好的检测方式不仅可以是常规的化学反应，也可以是细胞生物学的现象。如果设计巧妙，可以帮助很有效地进行分离纯化。

15.6 羊的痒病及其传染

动物的疾病，或人的罕见病，研究有什么意义？值得进行坚持不懈的研究吗？况且还要经常与人发生争论；与众不同或被嗤之以鼻；出现初步研究结果时又担心被竞争？

一项研究，如果研究者做几天实验知道结果，不难等待。但如果要等几十天、上百天才知道结果，而且还要反复很多次，那还做吗？

1732 年就有文献记载绵羊的痒病 (McGowan, 1914)，后来有过多种名称，最后定为 scrapie。1913 年被认为是传染病 (Stockman, 1913)，提出致病原因可能是寄生虫感染 (McGowan, 1914) 或遗传因素 (Stockman, 1926)。此病曾在欧洲、美洲、亚洲、大洋洲、非洲多次爆发 (Detwiler, 1991)。德国科学家最初未见行为或病理变化 (Cassirer, 1898)，但法国科学家则发现在脊髓的前角细胞有空泡 (Besnoit and Morel, 1898a, 1898b)。英国农业部首席兽医 Stewart Stockman (1869-1926) 在多个部位观察到神经细胞的空泡样病变 (Stockman, 1926)。冰岛科学家提出绵羊的几种病 (包括痒病) 是由慢病毒造成的进行性脑炎 (Sigurdsson, 1954)。

法国科学家发现,从患痒病的绵羊获取脑匀浆后,注射到正常山羊脑内,可以导致后者发生痒病 (Cuillé and Chelle, 1936), 揭示其传染性。英国也发现, 为了其他目的的生物制品, 因为无心用了患有痒病的绵羊脑组织, 误把痒病传染给了其他绵羊或猪 (Gordon, 1946), 从另一个侧面支持了其传染性。介导传染的“病毒”可以通过滤膜, 在 0°~4°C 存活很长时间, 有时达两年, 而通过脑注射引起疾病的潜伏期需要 4、5 个月 (Wilson, Anderson and Smith, 1950)。

从 1930 至 1960 年代, 研究者已观察到: 绵羊传绵羊 (Cuillé and Chelle, 1936; Gordon, 1946; Wilson, Anderson and Smith, 1950), 绵羊传山羊 (Cuillé and Chelle, 1939; Pattison, Gordon and Millson, 1959; Stamp *et al.*, 1959), 山羊传山羊 (Pattison, Gordon and Millson, 1959), 山羊传小鼠 (Chandler, 1961; Zlotnik and Rennie, 1962), 山羊传大鼠和小鼠传大鼠 (Chandler and Fisher, 1963), 小鼠传金仓鼠 (Zlotnik, 1963); 绵羊传大鼠、小鼠和金仓鼠 (Zlotnik and Rennie, 1965), 小鼠传绵羊 (Zlotnik and Rennie, 1965)。而且观察到, 患痒病绵羊的多种组织, 如脑、脾脏、淋巴结、脑脊液, 都具有传染力 (Stamp *et al.*, 1959)。

不过, 曾有英国科学家认为痒病不是环境因素造成, 而是遗传病 (Parry, 1960, 1962), 并且是典型的孟德尔常染色体遗传 (Draper and Parry, 1962)。也曾怀疑痒病类似多发性硬化 (Field, Miller and Russell, 1962), 但被后来研究所否定 (Dick *et al.*, 1965)。还有观点认为羊的痒病是肌肉的疾病 (Bosanquet, Daniel and Parry, 1956; Parry, 1957), 但后来还是明确它是神经系统的退行性病变 (Beck, Daniel and Parry, 1964; Zlotnik and Rennie, 1965)。

15.7 人的库鲁病及其传染

太平洋岛国巴布亚新几内亚曾为澳大利亚管辖。1950 年代, 澳大利亚巡警们多次注意到 Fore 部落有人发生不伴有发烧的颤抖、最后进展至死亡, 当地人称“kuru” (Liberski *et al.*, 2019)。片区医生 Vincent Zigas (1920-1983) 感兴趣研究, 与来访的美国科学家 D. Carleton Gajdusek (1923-2008) 合作, 描述了库鲁病的典型症状, 发现家族聚集性 (Zigas and Gajdusek, 1957; Gajdusek and Zigas, 1957)。有科学家因为其家族性而提出是单基因显性遗传病的可能性 (Bennett, Rhodes and Robson, 1958), 病理切片发现神经细胞中空泡形成 (Fowler and Robertson, 1958)。

羊的痒病和人的库鲁病在发病症状、发病进程、神经细胞空泡形成、神经退行性病变等特征上都有相似性 (Hadlow, 1959)。

人类学家们发现当地习俗可能造成了此病的传染 (Liberski *et al.*, 2019)。在此基础上, Gajdusek 等将病人脑匀浆注射到猩猩和猴, 均引发库鲁病 (Gajdusek, Gibbs and Alpers, 1966), 从而证明库鲁病是由脑内某种物质导致的传染病。因为从感染到发病间隔数个月甚至年计, Gajdusek 提出病原体为“慢病毒”。

Gajdusek 认为慢病毒不仅造成库鲁病, 也造成多种其他疾病, 当然包括羊的痒病, 还包括人类的多发性硬化、帕金森病、侧枝硬化、阿兹海默病、亨廷顿舞蹈病等等 (Gajdusek, 1977)。

15.8 痒病病原体化学本质的讨论

在早期的接种实验中, 研究者发现羊的痒病可通过接种病羊神经组织而传播, 病原体很小可以通过除菌滤器, 后来的硝酸纤维膜过滤研究表明病原体表观尺度约 27 纳米 (Cuillé and Chelle, 1936, 1938; Stamp *et al.*, 1959)。

痒病的病原体具有不同寻常的热稳定性, 沸水煮 30 分钟, 甚至更长的时间都不足以灭活 (Wilson, Anderson and Smith, 1950, Stamp *et al.*, 1959, Pattison and Millson, 1961; Chandler, 1963; Hunter and Millson, 1964; Zlotnik and Rennie, 1967)。对尿素和苯酚处理也有相当的抵抗性 (Eklund, Hadlow and Kennedy, 1963; Hunter *et al.*, 1969)。0.35% 的福尔马林三个月处理痒病病原体也不能灭活它 (Gordon, 1946), 甚至也在 3% 的福尔马林在 37 °C

处理 13 天后仍有活性 (Stamp, 1962; Pattison, 1965)。

所以,虽然接种实验证明痒病是传染病,而其传染因子对高温和化学因素的抵抗性引起科学家们的困惑:不像一般的核酸蛋白复合体 (Stamp *et al.*, 1959)。

当时在英国工作的犹太物理学家 Tikvah Alper (1909-1995)和同事,通过分析辐射对病原体灭活的特征,推测痒病的病原体分子量很小,如果是核酸应该少于 800 个碱基对 (Alper, Haig and Clarke, 1966)。病原体到底是核酸还是蛋白质,被作为问题而提出,并被怀疑可能是“自我复制的蛋白质” (Pattison and Jones, 1967)。Alper 等进一步用 254nm 波长紫外辐射,几乎完全不能降低痒病病原体的传染性,因此不支持病原体依赖核酸而复制。但因为 280 至 285nm 波长的辐射对病原体的灭活作用也不强,她们未能证明是否就是蛋白质,因此讨论了病原体是多糖的可能性 (Alper *et al.*, 1967)。

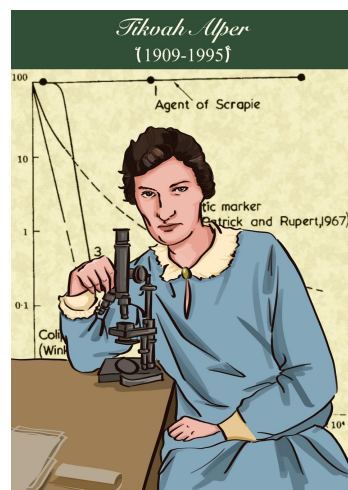


图 15-4 Tikvah Alper (1909-1995)

本科念剑桥数学和生物化学、研究生专业为理论化学的英国科学家 John Griffith (1928-1972), 1967 年就任伦敦大学 Bedford 学院数学系主任的第一个学术报告为“意识决策的神经基础”。他当年发表文章蛋白质自我复制的模型:如果是多聚体,一个亚基可以催化改变另外一个亚基的构型 (Griffith, 1967)。

痒病病原体影响细胞膜结构的可能性也被提出 (Gibbons and Hunter, 1967; Hunter *et al.*, 1969), 二十多年后还被 Alper 重新提出讨论 (Alper, 1992)。

15.9 探索分离纯化痒病的病原体

生物化学分离纯化痒病的病原体,是理解它的重要途径,事后看是“必由之路”。

分离纯化的努力始于 1960 年 (Butler and Smith, 1960)。最初,需要用绵羊作为检测的对象。从正常或感染痒病的绵羊在不同的 pH 条件提取脑匀浆、用丁醇等进行萃取,不同速度离心,得到上清和沉淀,注射到正常绵羊脑内,观察到:正常脑匀浆未引起 30 只受体绵羊的痒病,而痒病的脑匀浆(包括煮沸处理过的)都可以引起受体绵羊发生痒病(分别为 3/15 和 1/30,发病/接种绵羊数),潜伏期为 6 到 11 个月 (Mould and Smith, 1962)。萃取方法不同、不同离心条件均能影响感染后的发病率 (Le Q Darcel *et al.*, 1963; Hunter and Millson, 1964)。不同离心条件的实验也显示了其传染性跟细胞核、线粒体、髓鞘没有相关性 (Millson, Hunter and Kimberlin, 1971)。

在这些努力的过程中,科学家们试过不同来源的病原体、不同动物用于检测。如曾经将绵羊的痒病脑注射到小鼠后,用小鼠脑匀浆作为病原体的来源,稀释后用多个剂量注射到正常小鼠作为检测动物 (Siakotos A *et al.*, 1976), 观察一年发病情况,并通过剂量推算半数致死率 (LD₅₀)。也比较过不同的组织,发现痒病感染的小鼠疾病进程较快 (Siakotos, Raveed and

Longa, 1979)。

1960 年代发现,将患痒病的小鼠匀浆注射到金仓鼠脑后,可以在 4 个月后发病 (Zlotnik and Rennie, 1965)。1970 年代发现,在金仓鼠多次传代后,可以在六十多天就发病 (Kimberlin and Walker, 1977)。从而将需要等待 6 到 11 个月才能观察到发病,缩短到 2 个月,对于研究来说非常宝贵。

15.10 痒病病原体的分离纯化

犹太裔美国科学家 Stanley Prusiner (1942-) 念过医学院之后到 NIH 进行生物化学研究,然后到 UCSF 任住院医师。1972 年,他看过的一位六十多岁的病人,因患罕见的神经退行性疾病 (Creutzfeldt-Jakob 病, CJD) 而丧失记忆、几个月后死亡,两年后其脑匀浆注射给猴引起 CJD 样病变 (Prusiner, 2014)。

1974 年, Prusiner 成为 UCSF 神经内科助理教授,原来研究生物化学、已经发表过二十多篇论文的 Prusiner 决定研究羊的痒病。高年资同事普遍认为他不识时务。当时有笑话称痒病的假设多于研究痒病的科学家,因此是一个理论上充满含糊不清和争议的领域。他原先研究的脑内谷氨酸和谷胺酰胺是脑内富含的分子,而他转而研究在人里面类似的、也属于罕见病的兽医问题,这对于一个需要担心如何晋升终身教职的助理教授来说,是一种具有很大风险的职业选择。如果按当时用小鼠做实验的话,估计一年需要 7 万多小鼠,而观察期要一年,初算年度经费两百万美元,连续十年,如果不是绝对不可能,也是极为困难。

Prusiner 决定集中全力研究痒病,系统地分离纯化其病原体。在 Prusiner 之前,已经有科学家在十几年前就开始分离纯化痒病的病原体,凭什么前人没有做到的, Prusiner 可以做到? 他研究动物的经验显然不仅不如其他人,而且他立即遇到能否获得足够的养传染病的动物空间问题。他获得的实验室空间,碰巧是爱因斯坦的媳妇 Elizabeth Roboz-Einstein (1904-1995) 退休空出来,但养动物的空间则费了很大周折,而且以后还几次有问题。他最初找蒙大拿州的痒病科学家 William Hadlow (1921-2015) 合作,在旧金山实验室分离纯化,然后送到蒙大拿州请合作者实验室用动物检测病原体传染活性。

他以自己的生化特长,认为以前做的不够系统。他仔细探索分离纯化方法,还专门为用固定角度转子的离心速度和方法发表文章 (Prusiner, 1978),并以分析性差速离心探索痒病病原体“沉淀特征”为其研究痒病的起点 (Prusiner, Hadlow, Eklund and Race, 1977)。他们开始用的痒病病原体来源是小鼠的脾脏,因为 Hadlow 和其他实验室以前发现病羊的脑匀浆注射到小鼠后,在脾脏中的痒病传染性升高最快 (Eklund, Kennedy and Hadlow, 1967; Hunter, Kimberlin and Millson, 1972)。每次分离的组分稀释几个剂量,注射到正常小鼠,12 个月每周观察临床症状 (运动迟缓、尾巴弹性、体表粗糙,偶尔解剖脑和脊髓通过病理验证临床诊断)。最初拿到 20 倍的富集 (Prusiner *et al.*, 1978),并摸索了不同种类和浓度的去垢剂、阴离子、核酸酶、蛋白酶等如何影响分离纯化 (Prusiner *et al.*, 1980a)。他们意识到需要改用仓鼠作为检测的动物,而且只看注射后到发病之间的潜伏期长短,不用同一个组分多个剂量来确定量效关系,因为潜伏期就于量效关系直接相关,这样可以极大地节省实验时间和实验动物 (Prusiner *et al.*, 1980b)。

痒病感染金仓鼠是以前发现的 (Zlotnik and Rennie, 1965),其中包括长期看不上 Prusiner 的科学家 (Marsh and Kimberlin, 1975)。他们发现在金仓鼠传几代之后,潜伏期缩短到 60-70 天 (Kimberlin and Walker, 1977)。

但是, Prusiner 再次遇到困难。蒙大拿的科学家不再与 Prusiner 合作,除非他搬过去。他只好在旧金山到处找养传染病动物的空间 (Prusiner, 2014)。好不容易找到后,他用金仓鼠做感染对象。虽然养金仓鼠的价格是小鼠价格的五倍,但用金仓鼠的潜伏期做检测指标,每个样本只要 4 只、而不是 60 只小鼠的,观察期也从小鼠的一年减为 70 天。改进方法后,他们进一步分离纯化并分析其组分。他们发现用 RNA 和 DNA 的水解酶都不能降低提取物的感染性,而用蛋白酶 K 可以部分降低感染性,用化学修饰蛋白质的焦碳酸二乙酯 (Et₂PC)

可以降低感染性 (Prusiner *et al.*, 1981)。而用还原剂羟胺后, 可以逆转 Et₂PC 降低的感染性 (McKinley, Masiarz and Prusiner, 1981), 因此支持蛋白质是病原体的重要成分。

他们也换了病原体来源。初期用金仓鼠的脾脏是因为感染后, 脾脏的感染性上升比较快, 但比较下来感染后金仓鼠脑中含的病原体的总量是脾脏的百倍, 只是在分离纯化时先需要去除脑中的脂肪 (Prusiner *et al.*, 1982a)。



图 15-5 Stanley Prusiner (1942-)

1982 年, Prusiner 给《科学》写了一篇独特的有趣文章, 明确提出“新的蛋白质颗粒导致痒病” (Prusiner, 1982)。这篇综述文章因其结论超前结果而被广为诟病, 它提出导致痒病的病原体为 prion。它提出人的 CJD 不仅可以传给猴和猩猩, 也可以传给山羊和绵羊, 而后者有可以传给猴和猩猩, 也许可以传染给人? 它总结了支持痒病病原体是蛋白质的结果 (对蛋白水解酶的敏感性、化学修饰和逆转、对一部分去垢剂的敏感性, 对一部分离子和尿素的敏感性, 对甲醇乙醇等有机溶剂的抵抗而对苯酚的敏感)。它总结了不支持核酸是病原体的结果 (对氢离子抵抗、对氢氧根敏感、对 RNA 酶和 DNA 酶抵抗、对 254 nm 波长紫外辐射的抵抗、对二价阳离子锌的抵抗、对羟胺的抵抗等)。其中, 254 nm 波长紫外辐射对多种噬菌体、多种病毒、类病毒都可以灭活, 而痒病病原体的抵抗力远高于动物病毒和噬菌体。它的分子量大约 50kD。Prusiner 提出: 要么病原体含核酸, 编码 prion 蛋白质或激活宿主编码 prion 蛋白质的基因; 要么病原体不含核酸, 由蛋白质激活宿主编码 prion 的基因, 或者蛋白质通过反向翻译编码自己的复制、或通过蛋白质指导的蛋白质合成编码自己的复制。

在同年, 但以上文章发表之后, Prusiner 实验室再在《科学》发表其分离纯化的结果 (Bolton, McKinley and Prusiner, 1982)。他们用碘的放射性同位素 (¹²⁵I) 在感染痒病的金仓鼠脑中找到一个分子量在 27 到 30kD 的蛋白质, 在正常金仓鼠脑中没有见到。有趣的是, 这个蛋白质对蛋白酶 K 有较高的抗性。作者解释这是相对的, 与病原体一样, 在 37°C 用蛋白酶 K 处理三个小时以上可以灭活病原体、也可以降解这一蛋白质, 抵抗力是相对的。他们用 ¹⁴C 标记的实验, 需要曝光 720 小时, 也可以看到相应分子量的蛋白质 (Prusiner *et al.*, 1982b)。病羊脑中提取的 prion 蛋白 (PrP) 对蛋白酶 K 的敏感性低于正常羊脑的 PrP, 感染性与对蛋白酶 K 的抗性相关 (McKinley, Bolton and Prusiner, 1983)。在纯化的样本中, 观察到短状的淀粉样纤维 (rod, 杆): 直径 10 到 20nm、长度 100-200nm (Prusiner *et al.*, 1983)。

Prusiner 实验室进一步坚持, 并大规模分离纯化, 从九百到一千只感染了 70 到 75 天之后的金仓鼠脑, 提取痒病的 PrP, 到 1984 年获得足够的大量、并且足够纯度的蛋白, 与加州理工学院 Lee Hood (1938-) 实验室合作, 用后者的蛋白质测序特长, 得以分析 PrP 蛋白质的部分氨基酸序列 (Prusiner *et al.*, 1984)。

15.11 找到 PrP 基因: Prnp

Prusiner 与瑞士的 Charles Weissmann (1931-) 合作, 找到了编码 PrP 的基因, 他们称为 Prnp。他们根据 PrP 蛋白质的部分序列设计核酸探针, 用感染了痒病的金仓鼠的脑子制备 cDNA 文库。金仓鼠一般接种患病脑匀浆 60 到 65 天之后开始有症状, 两周后死亡。他们用的是接种 35 天后的金仓鼠脑。用这个方法, 他们找到了编码 PrP 蛋白质的基因 Prnp (Oesch *et al.*, 1985)。

找到 Prnp 的 cDNA 后, 用它制备探针发现: 在接种后的金仓鼠, 无论是 24 小时, 还是 20 天、40 天、60 天, PrP 基因表达都一样。而且与正常金仓鼠也毫无差别 (Oesch *et al.*, 1985)。

那么, 这怎么可能是致病的病原体?

一个竞争实验室也克隆了 Prnp, 也发现无论是金仓鼠还是小鼠, 无论是脑还是肝、脾, Prnp 基因的表达都不因为感染痒病而有变化, 他们的结论自然就是: PrP 不可能是痒病的病原体 (Chesebro *et al.*, 1985)。

Weissmann 和 Prusiner 进一步证明: 痒病 (Sc) 和正常细胞 (C) 的 PrP 都是由同一个基因所编码, 而且 Prnp 基因就在正常细胞的染色体上 (Basler *et al.*, 1986)。

此时, 绝大多数人认为 PrP 致病的假说被颠覆, 外界一片哗然, 合作者 Weissmann 也不相信。Prusiner 自己实验室做过 PrP 重要工作的博士后也不信, 不仅不信还被反对他的人挖走 (Prusiner, 2014)。只有极少数的人认为 Prusiner 的研究不是笑话, 而继续支持。绝大多数人认为致病因子应该还是核酸, 只是 Prusiner 没有分离纯化到, 而错误地纯化了一个蛋白质 PrP, 以自己名字命名一个没有证明功能的蛋白质。

15.12 两型 PrP 蛋白质

Prusiner 坚持认为自己分离纯化是正确的, 并接受所有已有结果, 只是认为解释应该不在核酸, 而在蛋白质。

他带领实验室其他人进一步研究 PrP。

他们分析正常的 PrP (PrP^C) 与致痒病的 PrP (PrP^{Sc}) 有同有异 (Meyer *et al.*, 1986):

前者存在于正常脑中、由细胞染色体的基因编码、mRNA 长度 2.1kb、蛋白质水平在正常与感染脑中不变、浓度低于 1 微克/每克脑组织、分离的病原体中没有、定位于在细胞膜上、细胞外没有、溶于去垢剂、容易被蛋白水解酶所降解;

后者不存在于正常脑中、也由细胞染色体的基因编码、mRNA 长度也是 2.1kb、而在感染的脑中增加、浓度约为 10 微克/每克脑中、每 ID₅₀ 感染病原体中含 10⁴ 分子、也定位于细胞膜上、在细胞外称淀粉样丝状斑块、去垢剂促淀粉样杆形成、蛋白水解酶导致它变成 PrP 27-30。

15.13 Prnp 与痒病感染

检验 PrP 功能方式之一是看 Prnp 基因型与痒病感染是否相关。

早期的研究发现, 小鼠的遗传背景显著地影响痒病的潜伏期 (Dickinson and Mackay 1964; Dickinson, Meikle and Fraser 1968), 这与 Prnp 基因有什么关系呢? Prusiner 等比较两种小鼠, 它们感染痒病后发病的潜伏期差别很大, 一种是 110 天左右、另一种是 250 天左右, 并且这种潜伏期的差异可以稳定地遗传。Prusiner 发现两种小鼠的 Prnp 基因不同, 在小鼠交配的遗传实验中观察到基因差别与潜伏期相关 (Carlson *et al.*, 1986)。进一步分析发现 Prnp 基因的具体碱基变化(第 108 密码子和 189 密码子)的差别与感染潜伏期相关 (Westaway *et al.*, 1987)。另外一种以前研究更长时间的小鼠, 其潜伏期的差别也可以由 Prnp 基因的差异来解释 (Hunter *et al.*, 1987)。

在克隆了 Prnp 基因后, 不仅可以观察小鼠自然出现的 Prnp 基因变异与痒病的关系, 也

可以通过转基因引入 Prnp 基因。已知金仓鼠感染痒病的潜伏期远低于小鼠的, Prusiner 实验室把金仓鼠的 Prnp 引入小鼠。转了金仓鼠 Prnp 基因的小鼠感染痒病的潜伏期大大下降, 病理切片也显示典型的淀粉样变 (Scott *et al.*, 1989)。进一步发现, 小鼠表达转基因的 PrP 越多, 感染的潜伏期越短 (Prusiner *et al.*, 1990)。转金仓鼠 prnp 基因的小鼠, 只对金仓鼠来源的痒病脑匀浆的潜伏期缩短, 而对来源于小鼠的痒病脑匀浆的潜伏期不变 (Prusiner *et al.*, 1990)。

15.14 Prnp 与人类传染性神经退行性疾病

Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) 是人类的一种家族遗传的神经退行性病变 (Gerstmann, Sträussler and Scheinker, 1936)。病人的脑匀浆注射到小鼠可以引起病变 (Tateishi *et al.*, 1979)。Prusiner 实验室的 Karen Hsiao (1955-) 研究了两个家系, 美国的有四代 12 人, 对其中三个正常人、一个 GSS 患者的基因比较后发现病人的 Prnp 不同于其正常的亲戚。英国的家系 4 代 54 人, 比较其中六位正常人和两位患者, 观察到另外患者的 Prnp 基因变异 (Hsiao *et al.*, 1989)。这一差异是人的第 102 位脯氨酸的密码子突变编码亮氨酸, 他们在小鼠 (第 101 脯氨酸) 制造同一位点的突变, 观察到小鼠当突变基因高表达的时候, 小鼠在 166 天左右自发出现神经退行性变, 而且小鼠遗传发现只有得到突变的小鼠才自发神经退行性变、遗传了突变的绝大多数小鼠发病 (Hsiao *et al.*, 1990)。

Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) 是人类一种可以家族遗传的神经退行性疾病 (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921)。CJD 的脑匀浆注射到猩猩或豚鼠, 都可以传染 CJD (Gibbs *et al.*, 1968; Manuelidis *et al.*, 1976)。有趣的是, CJD 病人也被发现含有 prnp 基因的突变 (Owen *et al.*, 1989; Goldgaber *et al.*, 1989)。

人类的家族性致命失眠症 (FFI), 也是神经退行性变, 也被发现含 prnp 基因突变 (Medori *et al.*, 1992)。后来也被证明可以传染 (Tateishi *et al.*, 1994)。

15.15 “全”prion

到 1991 年, 可以确定 PrP 为痒病和人类神经退行性变的重要蛋白质。

但是, 是异常结构的 prion 单独致病, 还是它只是致病因素的一部分, 是否还有其他因素? 例如核酸?

总之, 学界仍然难以接受蛋白质独自致病的理论, 尤其是对痒病传播中所表现的种属屏障、株系, 和株系突变等类似病毒传播的特征。

Prusiner 的合作者 Weissmann 指出, 有多种可能性可以解释 prion 如何导致疾病, 并表现出非常强的种属屏障和株系特征。他提出, prion 蛋白质只是致病源一部分, 为 apoprion, 而与核酸 (coprion) 结合后成为完整的 prion, 为 holoprion。传播和致病性由 prion 蛋白质 (apoprion) 所决定, 不受核酸 coprion 影响。但与核酸 coprion 结合会影响 prion 蛋白的内在特性如蛋白构象, 从而表现出种属屏障和株系特征 (Weissmann, 1991)。

15.16 Prnp 基因敲除小鼠

Weissmann 实验室在小鼠敲除了 prnp, 没有观察到小鼠发育和生长与野生型的小鼠有何不同 (Büeler *et al.*, 1992)。

但是, prnp 基因敲除的小鼠, 对痒病脑匀浆接种具有完全的抗性, 不会发病。而且如果再转基因导入金仓鼠的 prnp 基因, 小鼠又可以被金仓鼠的痒病脑匀浆所感染 (Büeler *et al.*, 1993; Prusiner *et al.*, 1993; Sailer *et al.*, 1994)。

Prusiner 实验室发现, 如果将人类 GSS 突变基因引入小鼠, 高水平表达转基因的小鼠自发地产生疾病, 但低水平表达时, 小鼠本身不发病。将高表达转基因的发病小鼠的脑匀浆注射给后者, 可以显著提高发病率。高表达 GSS 突变但尚未发病的小鼠脑匀浆不能导致低表达 GSS 突变的小鼠发病。没有 GSS 突变的小鼠脑匀浆也不能引起低表达 GSS 突变小鼠发病。

(Hsiao *et al.*, 1994)。

显然, prnp 肯定对于痒病的传染是必需的。

15.17 PrP 蛋白质的初步理解

在 1980 年代提出 PrP 蛋白质有致病的 PrP^{Sc} 和正常的 PrP^C 两型后, 在各种批评中, Prusiner 继续研究。

人类正常细胞的 Prnp 基因编码 PrP 蛋白质, 它的 N 端含信号肽。切断信号肽和 C 段部分序列之后的 209 个氨基酸是 PrP^{Sc} 和 PrP^C 的序列, 而分离纯化到的 PrP 27-30 是再切掉对蛋白酶敏感的 N 端后剩下的 142 氨基酸 (Prusiner, 1998)。

对 PrP^{Sc} 蛋白质的结构分析发现, 它含约 47% 的 b 折叠结构, 仅约 14% 的 a 螺旋结构 (Caughey *et al.*, 1992)。

要理解 PrP^{Sc} 和 PrP^C 的差别, 就不仅需要分离纯化和分析 PrP^{Sc}, 也需要分离纯化和分析 PrP^C。

分离纯化正常的 PrP^C 蛋白质, 也经过努力 (Pan *et al.*, 1992)。获得后, Prusiner 实验室的 Keh-Ming Pan 等分析了其结构, 并与 PrP^{Sc} 的结构进行比较。他们发现, PrP^C 的 a 螺旋占 42%、b 折叠占 3%, 而 PrP^{Sc} 的 a 螺旋占 30%、b 折叠占 43%, 所以提出正常 PrP^C 变成致病的 PrP^{Sc} 主要原因是 a 螺旋降低、b 折叠增加, 也就是 a 螺旋构象改变成 b 折叠构象 (Pan *et al.*, 1993)。更好的结构分析方法也支持这种差别 (Prusiner, 1998)。

至此, PrP 蛋白质的构象、致病和传染的模型确定: 正常细胞编码 PrP^C 蛋白质, 病原体为 PrP^{Sc} 蛋白质。前者富含 a 螺旋, 后者富含 b 折叠。当 PrP^{Sc} 感染时, 相应的 PrP^C 蛋白质被改变, 其 a 螺旋改变为 b 折叠。这一过程可以复制, 从而传染 (Prusiner, 1998)。

15.18 PrP 蛋白质构象的间接遗传学支持

1996 年, Prusiner 实验室与合作者获得一个很有趣的遗传学结果, 支持蛋白质影响蛋白质的构象。

CJD 病人脑中对蛋白酶相对抵抗的 PrP^{Sc} 蛋白质在去除糖基化修饰后的大小为 21kD, FFI 病人脑中对蛋白酶相对抵抗的 PrP^{Sc} 蛋白质大小为 19kD。它们分别接种转入 PrP 基因的小鼠后, 小鼠患病, 而小鼠脑中的对蛋白酶相对抵抗的 PrP^{Sc} 分别为 21 和 19kD。也就是说, 同样的小鼠, 在接种不同来源的病人脑匀浆后, 分别出现不同分子量的蛋白质。这种不同分子量是在蛋白酶水解后的结果。对这些结果的最简单推论是因为 PrP 构象不同, 细胞内的不致病 PrP^C 被来自人的 PrP^{Sc} 影响后, 出现由感染的 PrP^{Sc} 构象所影响的鼠的 PrP 构象, 所以对蛋白酶抵抗的区域大小有所不同。这种结果及其理解, 支持蛋白质可以影响蛋白质构象, 也就可能传播构象 (Telling *et al.*, 1996)。

15.19 酵母的现象

如果有 Prion 这样以蛋白构象为基础的传播模式, 那么, 不可能只是为了传染病?

1971 年, 法国科学家在酵母中观察到一种遗传现象, 不符合简单的孟德尔遗传学, 曾认为也许是线粒体遗传, 但也不符合线粒体遗传的预期 (Lacroute, 1971)。1994 年, 美国的 Reed Wickner (1944-) 用酵母中也有类似 prion 的传播现象, 成功地解释了所谓两种基因的表型实际是由同一基因编码的、具有不同构象的蛋白质导致 (Wickner, 1994)。

美国芝加哥大学的 Susan Lindquist (1949-2016) 实验室更发现实际上在酵母中有很多遗传表型是由类似 prion 的蛋白质构象改变所致 (Halfmann *et al.*, 2012)。因为这些表型均为正常的酵母所有, 符合她之前提出的蛋白构象也是遗传信息载体的理论 (Halfmann and Lindquist, 2010)。

15.20 体外复制

对体内现象的观察、分析和推理，可以有很好的见解。

但是，不需要核酸，只需要蛋白质改变其他蛋白质的构象，是非常特别的想法，需要严密的证明，只依赖体内实验及其分析不足以证明。

1994 年，用金仓鼠的分离到的 PrP^{Sc} 蛋白质，在体外可以被一定浓度的盐酸胍变性、然后再稀释后能复性回具有蛋白酶 K 抗性的构象。而如果复性过程中与大肠杆菌表达的小鼠重组 PrP^C 蛋白质孵育，观察到后者也能获得相对的蛋白酶抵抗性 (Kocisko *et al.*, 1994)。当同样的重组 PrP^C 蛋白质与不同特性的 PrP^{Sc} 蛋白质共育后，获得的特性类似来源的 PrP^{Sc} 蛋白质 (Bessen *et al.*, 1995)。这些实验说明了 PrP^{Sc} 确实具有 prion 所需的模版功能，但不能导致疾病呢？

以类似的方式得到的、具有 PrP^{Sc} 生化特征的 PrP 蛋白质，注射到动物却不能导致疾病 (Hill, Antoniou and Collinge, 1999)。瑞士科学家发明体外用发病的脑匀浆与正常脑匀浆混合之后扩增具有 PrP^{Sc} 生化特征蛋白质的方法 (Saborio, Permanne and Soto, 2001)。体外扩增的含 PrP^{Sc} 的产物具有感染性 (Castilla *et al.*, 2005)。

因为上述实验的产物是脑匀浆的混合物，它们的结果依然不足以完全证明蛋白质是致病源，公认的金标准是用重组 PrP 蛋白，在体外转变成具有蛋白酶 K 抗性的 PrP^{Sc} 构象，并在动物体内证明其致病性。

2004 年，Prusiner 实验室在大肠杆菌制造小鼠的 PrP 蛋白质 89 至 230 片段，当在体外多聚化成为淀粉样纤维后，注射到高表达编码小鼠 89-231 片段的转基因小鼠脑中，可以导致发病。但是潜伏期很长：380 到 660 天。其脑中有蛋白酶抵抗的 PrP^{Sc} 蛋白质。从这样感染的小鼠中获得脑匀浆，注射到正常小鼠在 150 天导致发病，而如果是高表达全长 PrP 的转基因小鼠，接受注射后 90 天就发病。因此，Prusiner 实验室认为这是证明 PrP 具有传染性的强有力证据 (Legname *et al.*, 2004)。但这一实验并没有平息争议 (Couzin 2004)，有科学家指出由于实验只在高表达 PrP 89-231 片段小鼠中成功（转基因表达量是小鼠内源 PrP 的 16 倍），而高表达 PrP 的转基因小鼠在老年会自发得病，注射的 PrP 淀粉样纤维可能只是压垮骆驼的最后一根稻草。

发病潜伏期太长和需要高表达转基因鼠的问题，于 2010 年为马继延实验室解决。他们在大肠杆菌表达小鼠 PrP 蛋白质之后，在体外摸索许多影响 PrP 构象的条件，他们最终获得一种条件可以将重组 PrP 在体外变构成具有 PrP^{Sc} 理化特征的构象，这样得到的 PrP 可以在 130 天导致野生型小鼠发病，与注射发病的脑匀浆完全一致 (Wang *et al.*, 2010)。

在酵母中，也做过类似的研究 (King and Diaz-Avalos, 2004; Tanaka *et al.*, 2004)。

15.21 小结

对痒病的研究，从绵羊的罕见传染病，到人的罕见遗传病，从传染和遗传的混淆，到可能兼有，都是一般疾病研究过程。

而提出可能有不含核酸的病原体，是很特别的想法，但虽然有人提出过如此新颖的想法，如何研究它、是否持之以恒研究它，却并非热点。而且有些提出者自己也不坚信，后来放弃想法。

进行生物化学分离纯化，已经开始，但研究传染病的人不一定很在行分离纯化。

一个初出茅庐的医生，不研究人的疾病，却研究绵羊的疾病，而且是罕见病，已经有人提出想法、至少十几年前就有人开始分离纯化病原体，领域还有获得诺贝尔奖并且对自己不友好的大人物，不顾研究经费和研究条件的艰辛，不怕自己职位尚未稳定的危险，开始系统地分离纯化病原体。在研究过程中遭遇各种冷嘲热讽，也有自己莽撞过早引来批评。

但是，用自己的特长，坚持不懈，严谨实验，不畏人言，以事实说话，推进了一个看似“罕见”，但在应用上的意义可以后面明显，在基础上需要很多不同方面的研究并入，在概念上非常新颖。

这与孟德尔有明显的不同，但也有相同。

科学, 实验为主的生物学, 选择正确的途径, 按照实验观察到的事实而提出、或支持概念, 新颖并非错误, 虽然需要首先自己对自己有批判性, 之后接受大家和时间的检验。

参考文献

Kinesin

Allen RD, Allen NS and Travis JL (1981). Video-enhanced differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: a new method capable of analyzing microtubule-related movement in the reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*. *Cell Motility* 1:291-302.

Allen RD, Metuzals J, Tasaki I, Brady ST and Gilbert SP (1982). Fast axonal transport in squid giant axon. *Science* 218:1127-1128.

Allen RD, Brown DT, Gilbert SP and Fujiwaka H (1983). Transport of vesicles along filaments dissociated from squid axoplasm. *Biological Bulletin* 765:523.

Brady ST (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* 317:73-75.

Brady ST, Lasek RJ and Allen RD (1982). Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science* 278:1129-1131.

Burdwood W (1965). Bidirectional particle movement in neurons. *Journal of Cell Biology* 27:115A.

Chang MM and Leeman SE (1970). Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *Journal of Biological Chemistry* 245:4784-4790.

Cohen S (1960). Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurotoxic antiserum. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 46:302-11.

Cohen S (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *Journal of Biological Chemistry* 237:1535-62.

Cohen S, Levi-Montalcini R and Hamburger V (1954). A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 40:1014-18.

Cook DD and Gerard RW (1931). The effect of stimulation on the degeneration of a severed peripheral nerve. *American Journal of Physiology* 97:412-425.

Dahlström A and Fuxe K (1964). A method for the demonstration of adrenergic nerve fibres in peripheral nerves. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 62:602-607.

Dahlström A (1965). Observations on the accumulation of noradrenalin in the proximal and distal parts of peripheral adrenergic nerves after compression. *Journal of Anatomy* 99:677-689.

Dahlström A (1971). Axoplasmic transport (with particular respect to adrenergic neurons). *Philosophical Transaction of the Royal Society (London) Series B* 261:325-358.

Drescher U, Kremoser C, Handwerker C, Löschinger J, Noda M and Bonhoeffer F (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82:359-70.

Droz B and Leblond (1962). Migration of proteins along the axons of the sciatic nerve. *Science* 137:1047-1048.

Fairbrother R and Hurst E (1930). The pathogenesis of, and propagation of the virus in, experimental poliomyelitis. *Journal of Pathology and Bacteriology* 33:17-45.

Godina G (1956). L'activite protoplasmique des neurites dans les cultures "in vitro" étudiée par la microcinématographe en contrast de phase. *Comptes rendus de l'Association des Anatomistes* 42:582-591.

Goodpasture EW (1925). The axis-cylinders of peripheral nerves as portals of entry to the central nervous system for the virus of Herpes Simplex in experimentally infected rabbits. *American Journal of Pathology* 1:11-28.

Grafstein B and Forman DS (1980). Intracellular transport in neurons. *Physiological Reviews* 60:1167-1283.

Guillemin R (1978). Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Science* 202:390-402.

Hendry IA, Stockel K, Thoenen H and Iverson LL (1974). The retrograde transport of nerve growth factor. *Brain Research* 68:103-121.

Hughes A (1953). The growth of embryonic neurites. A study on cultures of chick neural tissues. *Journal of Anatomy* 37:150-162.

Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA and Morris HR (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577-580.

Inoué S (1981). Video image processing greatly enhances contrast, quality and speed in polarization-based microscopy. *Journal of Cell Biology* 89:346-356.

Kerkut GA, Shapira A and Walker RJ (1967). The transport of ^{14}C -labelled material from CNS-muscle along a nerve trunk. *Comparative Biochemistry and Physiology* 23:729-748.

Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P and Rosenbaum JL (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:5519-5523.

Kreutzberg GW (1969). Neuronal dynamics and axonal flow. IV. Blockage of intra-axonal enzyme transport by colchicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 62:722-728.

Kristenson K and Olsson Y (1971). Retrograde axonal transport of protein. *Brain Research* 29:363-365.

Kühne W (1879). Chemische Vorgänge in der Netzhaut. Hermann L. eds. Handbuch d. Physiologie d. Sinnesorgane Erster Theil, Gesichtssinn. F.C.W. Vogel Leipzig, Germany.

Kühne W (1882). Beiträge zur Optochemie. Untersuchungen aus dem physiologischen Institute der Universität Heidelberg 4:169-249.

Lasek RJ (1967). Bidirectional transport of radioactivity labelled axoplasmic components. *Nature* 216:1212-1214.

Lasek R (1968). Axoplasmic transport in cat dorsal root ganglion cells: as studied with ^3H -l-leucine. *Brain Research* 7:360-377.

Lasek R (1982). Translocation of the neuronal cytoskeleton and axonal locomotion. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B* 299, 313-327.

Levi-Montalcini R and Hamburger V (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology* 116:321-61.

Levi-Montalcini R and Hamburger V (1953). A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology* 123:233-287.

Lorenz T and Willard M (1978). Subcellular fractionation of intraaxonally transported

polypeptides in the rabbit visual system. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75:505-509.

Lubińska L, Niemierko S, Oderfeld B, Szwarc L and Zelena J (1963). Bidirectional movements of axoplasm in peripheral nerve fibres. *Acta Biol exp (Warsz)* 23:239-247.

Lubińska L, Niemierko S, Oderfeld-Nowak B and Szwarc L (1964). Behaviour of acetylcholinesterase in isolated nerve segments. *Journal of Neurochemistry* 11:493-503.

Luo Y, Raible D and Raper JA (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75:217-27.

Luo Y, Shepherd I, Li J, Renzi MJ, Chang S and Raper JA (1995). A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron* 14:1131-40.

Lux HD, Schubert P, Kreutzberg GW and Globus A (1970). Excitation and axonal flow: autoradiographic study on motoneurons intracellularly injected with a ³H-amino acid. *Experimental Brain Research* 10:197-204.

Ma J and Lindquist (2002). Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. *Science* 298:1785-1788.

Morris JR and Lasek RK (1982). Stable polymers of the axonal cytoskeleton: the axoplasmic ghost. *Journal of Cell Biology* 92:192-198.

Ochs S and Burger E (1958). Movement of substance proximo-distally in nerve axons as studied with spinal cord injections of radioactive phosphorus. *American Journal of Physiology* 194:499-506.

Ochs S, Dalrymple D and Richards G (1962). Axoplasmic flow in ventral root nerve fibers of the cat. *Experimental Neurology* 5:349-363.

Ochs S (1971). Local supply of energy to the fast axoplasmic transport mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 68:1279-1282.

Paschal BM and Vallee RB (1987). Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature* 330:181-183.

Samuels AJ, Boyarsky LL, Gerard RW, Libet B and Brust M (1951). Distribution, exchange and migration of phosphate compounds in the nervous system. *American Journal of Physiology* 164:1-5.

Saxton WM, Porter ME, Cohn SA, Scholey JM, Raff EC and McIntosh JR (1988). Drosophila kinesin: characterization of microtubule motility and ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85:1109-1113.

Schnapp BJ, Vale RD, Sheetz MP and Reese TS (1985). Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. *Cell* 40: 455-462.

Schally AV (1978). Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Science* 202:18-28.

Sheetz MP and Spudich JA (1983). Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. *Nature* 303:31-35.

Südhof TC and Jahn R (1991). Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 6:665-677.

Tsukita S and Ishikawa H (1980). The movement of membranous organelles in axons. *Journal of Cell Biology* 84:513-530.

Vale RD, Schnapp BJ, Sheetz MP and Reese TS (1985). Movement of organelles along filaments dissociated from the axoplasm of the squid giant axon. *Cell* 40: 449-454.

Vale RD, Schnapp BJ, Reese TS and Sheetz MP (1985). Organelle, bead and microtubule translocations promoted by soluble factors from the squid giant axon. *Cell* 40: 559-569.

- Vale RD, Reese TS and Sheetz MP (1985). Identification of a novel force generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39-50.
- Vale RD, Schnapp BJ, Mitchison T, Steuer E, Reese TS and Sheetz MP (1985). Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules *in vitro*. *Cell* 43: 623-632.
- Vale RD (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112:467-480.
- Vale RD (2012). How lucky can one be? A perspective from a young scientist at the right place at the right time. *Nature Medicine* 10:1486-1488.
- Van Breemen VL, Anderson E and Reger JF (1958). An attempt to determine the origin of synaptic vesicles. *Experimental Cell Research (Supplement)* 5:153-167.
- Walter J, Kern-Veits B, Huf J, Stolze B and Bonhoeffer F (1987). Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons *in vitro*. *Development* 101:685-96.
- Watson WE (1968). Centripetal passage of labelled molecules along mammalian motor axons. *Journal of Physiology* 196:122-123P.
- Weiss P (1943). Nerve regeneration in the rat, following tubular splicing of severed nerves. *Archives of Surgery* 46, 525-547.
- Weiss P (1944a). Damming of axoplasm in constricted nerve: a sign of perpetual growth in nerve fibers. *Anatomical Records* 88 (Supplement):464.
- Weiss P (1944b). Evidence of perpetual proximo-distal growth of nerve fibers. *Biological Bulletin* 87:160.
- Weiss PA (1969). Neuronal dynamics and neuroplasmic ("axonal") flow. *Symposium of the International Society of Cell Biology* 8:3-34.
- Weiss P and Davis H (1943). Pressure block in nerves provided with arterial sleeves. *Journal of Neurophysiology* 6:269-286.
- Weiss P and Hiscoe HB (1948). Experiments on the mechanism of nerve growth. *Journal of Experimental Zoology* 107:315-395.
- Weiss P, Taylor AC and Pillai PA (1962). The nerve fiber as a system in continuous flow: microcinematographic and electromicroscopic demonstrations. *Science* 136:330.
- Weiss P and Pillai PA (1962). Convection and fate of mitochondria in nerve fibers: axonal flow as vehicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 54:48-56.
- Yang JT, Saxton WM and Boldstein LSB (1988). Isolation and characterization of the gene encoding the heavy chain of *Drosophila* kinesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85:1864-1868.
- Yang JT, Laymon RA and Goldstein LSB (1989). A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. *Cell* 56:879-889.
- Zelena J and Lubińska L (1962). Early changes in the acetylcholinesterase activity near the lesion in crushed nerves. *Physiologia bohemoslov* 11:261-268.

Prion

- Alper T, Haig DA and Clarke MC (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 22:278-284.
- Alper T, Cramp WA, Haig DA and Clarke MC (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214:764-766.
- Alper T (1992). The infectivity of spongiform encephalopathies: does a modified

membrane hypothesis account for lack of immune response? *FEMS Microbiology Immunology* 89:235-242.

Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse MEJ, Watt CJ, Udy HJ, MaWhinney S, Dunstan SP, Southwood TRE, Wilesmith JW, Ryan JBM, Hoinville LJ, Hillerton JE, Austin AR and Wells GAH (1996). Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382:779-925.

Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB and Weissmann C (1986). Scrapie and cellular Prp isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46:417-428.

Beck E, Daniel PM and Parry HB (1964). Degeneration of the cerebellar and hypothalamoneurohypophyseal systems in sheep with scrapie; and its relationship to human system degenerations. *Brain* 87:153-176.

Bennett JH, Rhodes FR and Robson HN (1958). Observations on Kuru: I. A possible genetic basis. *Australasian Annals of Medicine* 7:269-275.

Besnoit C and Morel C (1898a). Notes sur les lésions nerveuses de la tremblante du mouton. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales (Paris)* 5:536-538.

Besnoit C and Morel C (1898b). Note sur les lésions nerveuses de la tremblante du mouton. *Revue De Medecine Veterinaire (Toulouse)* 23 (55):397-400.

Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, and Caughey B. (1995). Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 375:698-700.

Bieschke J, Weber P, Sarafoff N, Beekes M, Giese A, and Kretzschmar H (2004). Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:12207-12211.

Bolton DC, McKinley MP and Prusiner SB (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309-1311.

Bosanquet FD, Daniel PM and Parry HB (1956). Myopathy in sheep: its relationship to scrapie and to dermatomyositis and muscular dystrophy. *Lancet* 271:737-746.

Büeler H, Fisher M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp H-P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M and Weissmann C (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356:577-582.

Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M and Weissmann C (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73:1339-1347.

Butler EJ and Smith W (1960). An attempt to separate the scrapie agent from brain tissue. *Veterinary Records* 72:417-418.

Carlson GA, Kinsbury DT, Goodman PA, Coleman S, Marshall ST, DeArmond S, Westaway D and Prusiner (1986). Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell* 46:503-511.

Cassirer R (1898). Über die Traberkrankheit der Schafe: pathologisch-anatomische und bakterielle Untersuchung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 153:89-110.

Castilla J, Saá P, Hetz C and Soto C (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121:195-206.

Caughey BW, Dong A, Bhat K, Ernst D, Hayes SF and Caughey WS (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy.

Biochemistry 30:7672-7680.

Chandler RL (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* i:1378-1379.

Chandler RL (1963). Experimental Scrapie in the mouse. *Research in Veterinary Science* 4:276-285.

Chandler RL and Fisher J (1963). Experimental transmission of scrapie to rats. *Lancet* i:1165.

Chandler RL and Turfrey BA (1972) Inoculation of voles, Chinese hamsters, gerbils and guinea-pigs with scrapie brain material. *Research in Veterinary Science* 13:219-224.

Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, Garon C and Haase A (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315:331-333.

Clark MC and Haig DC (1970) Multiplication of scrapie agent in cell culture. *Research in Veterinary Science* 11:500-501.

Clark MC and Millson GC (1976). The membrane location of scrapie infectivity. *Journal of General Virology* 31:441-445.

Couzin J (2004). The end to the prion debate? Don't count on it. *Science* 305:589.

Creutzfeldt HG (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie* 57:1-19.

Cuillé J and Chelle PL (1936). La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *Comptes rendus Hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences* 203:1552-1554.

Cuillé J and Chelle PL (1939). Experimental transmission of trembling to the goat. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences* 208:1058-1160.

Detwiler LA (1991). Scrapie. *Reviews of Science and Technology* 11:491-537.

Dick G, McAlister JJ, McKeown F and Campbell AM (1965). Multiple sclerosis and scrapie. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 28:560-562.

Dickinson AG and MacKay JMK (1964). Genetical control of the incubation period in mice of the neurological disease, scrapie. *Heredity* 19:279-288.

Dickinson AG, Meikle VMH and Fraser H (1968). Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *Journal of Comparative Pathology* 78:293-299.

Draper GJ and Parry HB (1962). Scrapie in sheep: the hereditary component in a high incidence environment. *Nature* 195:670-672.

Eisele YS, Obermüller U, Heilbronner G, Baumann F, Kaeser SA, Wolburg H, Walker LC, Staufenbiel M, Heikenwalder H and Jucker M (2010). Peripherally applied Ab-containing inoculates induce cerebral b-amyloidosis. *Science* 330:980-982.

Eklund CM, Hadlow WJ and Kennedy RC (1963). Some properties of the scrapie agent and its behavior in mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 112:974-979.

Eklund CM, Kennedy RC and Hadlow WJ (1967). Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *Journal of Infectious Diseases* 117:15-22.

Enari M, Flechsig E and Weissmann C (2001). Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:9295-9299.

Field EJ, Miller H and Russell DS (1962). Observations on glial inclusion bodies in a case of acute disseminated sclerosis. *Journal of Clinical Pathology* 15:278-284.

Fowler M and Robertson EG (1958). Observations on Kuru. III. pathological features. *Australasian Annals of Medicine* 8:16-26.

Fraser H and Dickinson AG (1968). The sequential development of the brain lesions of scrapie in three strains of mice. *Journal of Comparative Pathology* 78:301-311.

Gabizon, R., McKinley, M.P., Groth, D. and Prusiner, S.B. (1988). Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85:6617-6621.

Gajdusek DC (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearance of Kuru. *Cell* 73:1339-1347.

Gajdusek DC and Zigas V (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. *New England Journal of Medicine* 257:974-978.

Gajdusek DC, Gibbs CJ and Alpers M (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209:794-796.

Gerstmann J, Sträussler E and Scheinker I (1936). Über eine ei enarti e hereditär-familiäre erkrankun des Zentraler-Nervensystems. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 154:736-762.

Gibbons RA and Hunter GD (1967). Nature of the scrapie agent. *Nature* 215:1041-1043.

Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM and Matthews WB (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161:388-389.

Goldgaber D, Goldfarb LG, Brown P, Asher DM, Brown WT, Lin S, Teener JW, Feinstone SM, Rubenstein R, Kascsak RJ, Boellard JW and Gajdusek DC (1989). Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler syndrome. *Experimental Neurology* 106:204-206.

Gordon WS (1946). Advances in veterinary research. *Veterinary Record* 58:516-525.

Grieg JR (1950). Scrapie in sheep. *Journal Comparative Pathology* 6:263-266.

Griffith JS (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* 215:1043-1044.

Hadlow WJ (1959). Scrapie and kuru. *Lancet* 274:289-290.

Hadlow WJ, Eklund CM, Kennedy RC, Jackson TA, Whitford HW and Boyle CC (1974). Course of experimental scrapie virus infection in the goat. *Journal of Infectious Diseases* 129:559-567.

Halfmann R and Lindquist S (2010). Epigenetics in the extreme: prions and the inheritance of environmentally acquired traits. *Science* 330:629-632.

Halfmann R, Jarosz DF, Jones SK, Chang A, Lancaster AK and Lindquist S (2012). Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts. *Nature* 482:363-368.

Hill A, Antoniou M and Collinge J (1999). Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *Journal of General Virology* 80:11-14.

Hope J, Reeke LJD, Hunter N, Multhaup G, Beyreuther K, White H, Scott AC, Stack MJ, Dawson M and Wells GA (1988). Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein. *Nature* 336:390-392.

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J and Prusiner (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Nature* 338:342-345.

Hsiao KK, Scott M, Foster D, Groth DF, DeArmond SJ and Prusiner SB (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science*

250:1587-1590.

Hsiao KK, Groth D, Scott M, Yang S-L, Serban H, Rapp D, Foster D, Torchia M, DeArmond SJ and Prusiner SB (1994). Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:9126-9130.

Hunter GD and Millson GC (1964). Studies on the heat stability and chromatographic behavior of the scrapie agent. *Journal of General Microbiology* 37:251-258.

Hunter GD, Gibbons RA, Kimberlin RH and Millson GC (1969). Further studies of the infectivity and stability of extracts and homogenates derived from scrapie affected mouse brains. *Journal of Comparative Pathology* 79:101-108.

Hunter GD, Kimberlin RH and Millson GC (1972). Absence of eclipse phase in scrapie mice. *Nature New Biology* 235:31-32.

Jakob A (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie* 64:147-228.

Kaneko K, Ball HL, Wille H, Zhang H, Groth D, et al. (2000). A synthetic peptide initiates Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) disease in transgenic mice. *Journal of Molecular Biology* 295:997-1007.

Kimberlin RH and Marsh RF (1975). Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. I. biochemical studies of brain during development of disease. *Journal of Infectious Diseases* 131:97-103.

Kimberlin RH and Walker CA (1977). Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *Journal of General Virology* 34:295-304.

Kimberlin RH and Walker CA (1979). Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. *Journal of Comparative Pathology* 89:551-562.

King CY and Diaz-Avalos R (2004). Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* 428:319-323.

Kocisko, D.A. Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370:471-474.

Lacroute, F (1971). Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. *Journal of Bacteriology* 106:519-522.

Le Q Darcel C, Merriman M, Beauregard M, Avery RJ and Kasting R (1963). Scrapie I. Transmission and pathogenesis. *Canadian Journal of Comparative Medical and Veterinary Sciences* 27:81-84.

Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ and Prusiner SB (2004). Synthetic mammalian prions. *Science* 305:673-676.

Liberski PP, Gajos A, Sikorska B and Lindenbaum S (2019). Kuru, the first human prion disease. *Viruses* 11:232.

Manuelidis EE, J. Kim J, Angelo JN and Manuelidis L (1976). Serial propagation of Creutzfeldt-Jakob disease in guinea pigs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 73:223-227.

Marsh RF and Kimberlin RH (1975). Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology and pathogenesis. *Journal of Infectious Diseases* 131:104-110.

Mastrianni JA, Nixon R, Layzer R, Telling GC, Han D, DeArmond SJ and Prusiner SB (1999). Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia. *New England Journal of Medicine* 340:1630-1638.

McGowan JP (1914). Investigations into the disease of sheep called scrapie with special reference to its association with sarcosporidiosis. Rept. 223, Edinburgh and East of Scotland College of Agriculture. Blackwood, Edinburgh.

McKinley MP, Masiarz FR and Prusiner SB (1981). Reversible chemical modification of the scrapie agent. *Science* 214:1259-1261.

McKinley MP, Bolton DC and Prusiner SB (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35:57-62.

Medori R, Tritschler H-J, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, Xue R and Gambetti (1992). Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *New England Journal of Medicine* 326:444-449.

Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA and Prusiner SB (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83:2310-2314.

Millson GC, Hunter GD and Kimberlin RH (1971). An experimental examination of the scrapie agent in cell membrane mixtures. II. The association of scrapie activity with membrane fractions. *Journal of Comparative Pathology* 81:255-265.

Mould DL and Smith W (1962). The causal agent of scrapie. I. Extraction of the agent from infected sheep tissue. *Journal of Comparative Pathology* 72:97-105.

Mould DL and Smith W (1962). The causal agent of scrapie. II. Extraction of the agent from infected goat tissue. *Journal of Comparative Pathology* 72:106-112.

Oesch B, Westway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB and Weissman C (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40:735-746.

Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Collinge J, Crow TJ, Rishy D, Baker HF, Riley RM, Hsiao K and Prusiner SB (1989). Insertion of a prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* i:51-52.

Palmer AC (1959). Scrapie, a review of the literature. *Veterinary Reviews and Annotations* 5:1-15.

Pan KM, Stahl N and Prusiner SB (1992). Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Science* 1:1343-1352.

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE and Prusiner SB (1993). Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:10962-10966.

Parry HB (1957). Scrapie and related myopathies in sheep. Preliminary observations on their investigation and attempted control by a voluntary health scheme. *Veterinary Record* 69:43-55.

Parry HB (1957). Scrapie: a transmissible hereditary disease of sheep. *Nature* 185:441-443.

Parry HB (1960). Scrapie: a transmissible hereditary disease of sheep. *Nature* 185:441-443.

Parry HB (1962). Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep. *Heredity* 17:75-105.

Pattison IH (1965). Resistance of the scrapie agent to formalin. *Journal of Comparative Pathology* 75: 159-164.

Pattison IH, Gordon WS and Millson GC (1959). Experimental production of scrapie in goats. *Journal of Comparative Pathology* 69:300-312.

Pattison IH and Jones KM (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Veterinary Record* 80:2-9.

Pattison IH and Millson GC (1961). Further experimental observations on scrapie. *Journal of Comparative Pathology* 71:350-359.

Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, and Prusiner SB (2001). Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* 412:739-743.

Prusiner (1978). An approach to the isolation of biological particles using sedimentation analysis. *Journal of Biological Chemistry* 253:916-921.

Prusiner SB (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.

Prusiner SB (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:13363-13383.

Prusiner SB (2014). Madness and memory: the discovery of prions—a new biological principle of disease. Yale University Press, New Haven.

Prusiner SB, Hadlow WJ, Eklund CM and Race RE (1977). Sedimentation properties of the scrapie agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74:4656-4660.

Prusiner SB, Hadlow WJ, Garfin DE, Cochran SP, Baringer JR, Race RE and Eklund CM (1978). Partial purification and evidence for multiple molecular forms of the scrapie agent. *Biochemistry* 17:4993-4997.

Prusiner SB, Garfin DE, Cochran P, McKinley MP, Groth DF, Hadlow WJ, Race RE and Eklund CM (1980a). Experimental scrapie in the mouse: electrophoretic and sedimentation properties of the partially purified agent. *Journal of Neurochemistry* 35:574-582.

Prusiner SB, Groth DF, Cochran SP, Masiarz FR, McKinley MP and Martinez HM (1980b). Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* 21:4883-4891.

Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, Bowman KA, Mock NI, Cochran SO and Masiarz FR (1981). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 78:6675-6679.

Prusiner SB, Cochran SP, Groth DF, Downey DE, Bowman KA, Martinez HM (1982a). Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Annals of Neurology* 11:353-358.

Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP and McKinley MP (1982b). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21:6942-6950.

Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF and Glenner GG (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35:349-358.

Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB and Hood LE (1984). Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38:127-134.

Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan K-M, Groth D, Mirenda C, Torchia M, Yang S-L,

Serban D, Carlson GA, Hoppe PC, Westaway D and DeArmond SJ (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63:673-686.

Prusiner SB, Groth D, Serban A, Koehler R, Foster D, Torchia M, Burton D, Yang S-L and DeArmond SJ (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gen in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:10608-10612.

Saborio GP, Permanne B and Soto C (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411:810-813.

Sailer A, Büeler H, Fischer M, Aguzzi A, and Weissmann C (1994). No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 77:967-968.

Scott M, Foster D, Mirenda C, Serban D, Coufal F, Wälchli M, Torchia M, Groth D, Carlson G, DeArmond SJ, Westaway D and Prusiner SB (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59:847-857.

Siakotos AN, Gajdusdek DC, Gibbs CJ, Traub RD and Bucana C (1976). Partial purification of the scrapie agent from mouse brain by pressure disruption, filtration, and zonal centrifugation in a sucrose-sodium chloride gradient. *Virology* 80:230-237.

Siakotos AN, Raveed D and Longa G (1979). The discovery of a particle unique to brain and spleen subcellular fractions from scrapie-infected mice. *Journal of General Virology* 43:417-422.

Sigurdsson B (1954). Observations on three slow infections of sheep. *British Veterinary Journal* 110:255-270.

Stamp JT (1962). Scrapie: a transmissible disease of sheep. *Veterinary Record* 74:357-362.

Stamp JT, Brotherston JG, Zlotnik I, Mackay JM and Smith W (1959). Further studies on scrapie. *Journal of Comparative Pathology* 69:268-280.

Stockman S (1913). Scrapie, an obscure disease of sheep. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 26:317-327.

Stockman S (1926). Contribution to the study of the disease known as scrapie. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 39:42-72.

Tanaka M, Chien P, Naber N, Cooke R and Weissman JS (2004). Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* 428:323-328.

Tateishi J, Ohta M, Koga M, Sato Y and Kuroiwa Y (1979). Transmission of chronic spongiform encephalopathy with kuru plaques from humans to small rodents. *Annals of Neurology* 5:581-584.

Tateishi J, Brown P, Kitamoto T, Hoque ZM, Roos R, Wollman R, Cervenakova and Gadjusek DC (1994). First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* 376:434-435.

Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P and Prusiner SB (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274:2079-2082.

Wang F, Wang X, Yuan C-G and Ma J (2010). Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327:1132-1135.

Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M,

Dawson M and Bradley R (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Veterinary Record* 121:419-420.

Wells GA, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A and Smith PG (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347:921-925.

Weissman C (1991). A unified theory of prion propagation. *Nature* 352:679-683.

Wickner RB (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264:566-569.

Wilson DR, Anderson RD and Smith W (1950). Studies in scrapie. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 62:267-282.

Zigas V and Gajdusek DC (1957). Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the eastern highlands of Australian New Guinea. *Medical Journal of Australia* 2:745-754.

Zlotnik I (1963). Experimental transmission of scrapie to golden hamsters. *Lancet* ii:1072.

Zlotnik I and Rennie JC (1962). The pathology of the brain of mice inoculated with tissues from scrapie sheep. *Journal of Comparative Pathology* 72:360-365.

Zlotnik L and Rennie JC (1965) Experimental transmission of mouse passaged scrapie to goats, sheep rats and hamsters. *Journal of Comparative Pathology* 75:147-157.

Zlotnik I and Rennie JC (1967). The effect of heat on the scrapie agent in mouse brain. *British Journal of Experimental Pathology* 48:171-179.

阅读

Vale RD, Reese TS and Sheetz MP (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved microtubule-based motility. *Cell* 42:39-50.

Prusiner SB (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.