蛋白冠对NPs的基因口服递送的影响及机制

复旦大学印春华教授课题组于*Biomaterials*杂志上发表题为“**In Situ Customized Apolipoprotein B48-Enriched Protein Corona Enhances Oral Gene Delivery of Chitosan-Based Nanoparticles**”的文章 (Lin Z. et al. *biomaterials.2024.122704*)。在研究过程中，印教授课题组利用国重平台的**Talos L120C 120kV透射电镜**，对不同血清中TC7 NPs的状态进行了观察，发现随着 FBS 浓度的增加，TC7 NPs 的形态由棒状变为球形，进一步验证了蛋白冠的形成导致了颗粒大小的变化。利用**Olympus FV3000 激光共聚焦显微镜**对载FITC-pDNA TC NPs在Caco-2单层和小肠组织中的分布情况进行拍摄，直观发现TC7 NPs与高尔基体大量共定位，TC7 NPs易被M细胞摄取，继而进入派氏结并引流至淋巴循环，为后续基因治疗动物实验奠定基础。

Talos L120C 120kV
透射电镜
仪器位置：E101
负责老师：毛建江
联系电话：31246568

Olympus FV3000
激光扫描共聚焦显微镜
仪器位置：E101
负责老师：杨建鸽
联系电话：31246565

仪器预约网址：http://lifesupporting.fudan.edu.cn/

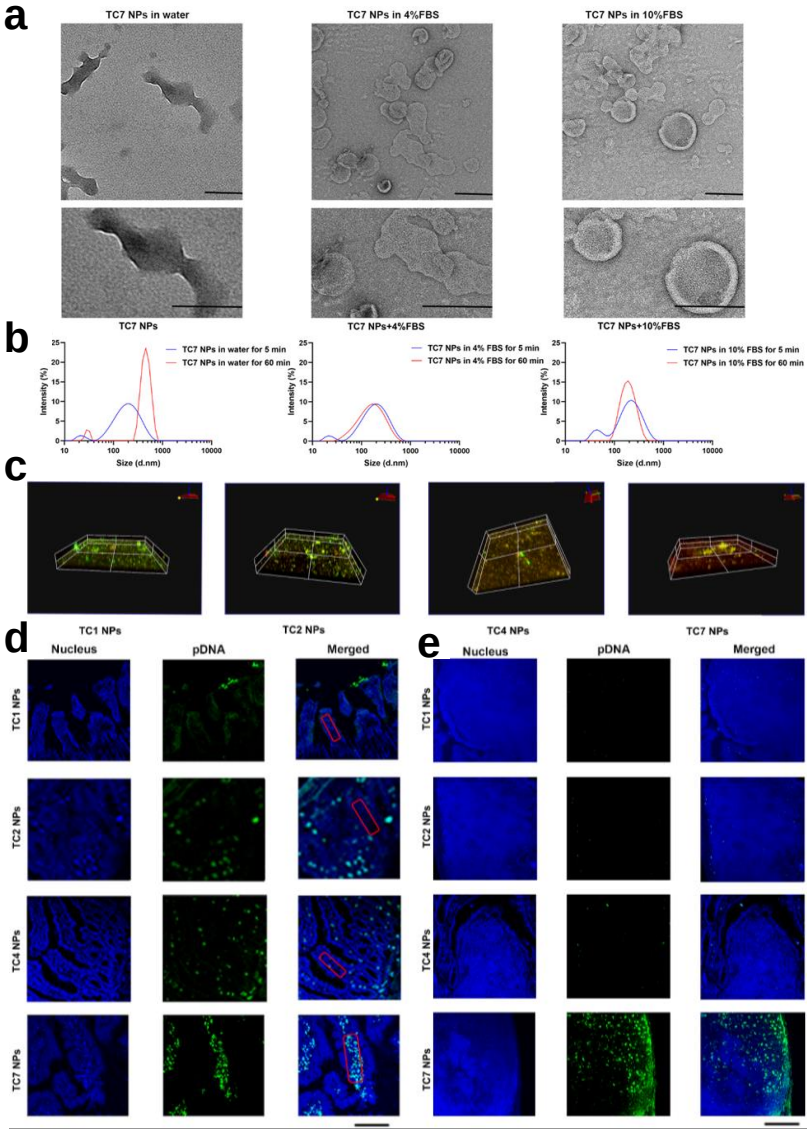


图1：TC7 NPs在水、4% FBS 和 10% FBS 中的 TEM 图像(a)和粒径 (b) ；（c）Golgi-tracker 染色的 Caco-2 单层细胞与载 FITC-pDNA TC NPs 共孵育 4 h 后 Z 轴共定位 3D 照片；载FITC-pDNATCNPs在不含派氏结（d）和含派氏结（e）小肠段在体吸收2h的CLSM照片。

Different molecular weight chitosans were sequentially modified by quaternization and cysteine to obtain TC1-TC7. After oral administration, the gene-loaded nanoparticles interacted with various ionic components and proteins in physiological environments, forming a protein corona (PC) that significantly altered their in vivo physicochemical properties and composition, thus affecting oral delivery and therapeutic efficacy. However, few studies have focused on the changes and impacts of nanocarriers once inside the body. Here, we present the electron microscopy structures of nanoparticles at different serum concentrations. These structures indicate that after serum incubation, TC7 NPs change shape from rod-like to spherical, with size variations primarily due to the formed PC. CLSM results show that, unlike other nanoparticles, TC7 NPs rely on a Golgi-related transport pathway to enter systemic circulation, with optimal absorption occurring in the small intestine, primarily distributed in intestinal villi, basal lymphatic capillaries, and Peyer's patches.

不同分子量壳聚糖依次经季铵化修饰和半胱氨酸修饰制得TC1-TC7。载基因纳米粒口服后在体内与胃肠液及小肠上皮组织等生理环境中多种离子成分和蛋白质发生作用，形成蛋白冠（PC），赋予其完全不同的在体理化性质和组成，影响其口服递送与治疗功效，但鲜有研究关注纳米载体进入体内后的变化及其影响。在这里，我们利用国重平台的**Talos L120C 120kV透射电镜**展示纳米粒在不同血清浓度下的电镜结构。这些结构表明，血清孵育后TC7 NPs的形状发生转变，由棒状变为球形，纳米粒粒径变化主要由所形成PC所致，文中不同表面性质的纳米粒对血清中不同蛋白质的吸附存在明显差异。此外，CLSM结果表明，与其它纳米粒不同，TC7 NPs依赖高尔基体相关转运途径转运进入体循环,TC7 NPs在体小肠吸收最佳，其主要分布在小肠绒毛及基底毛细淋巴管处，和其派氏结内。

供稿人:印春华课题组　　撰稿人:吴秋吉　　编辑:刘鹤华

流式细胞仪检测双特异性抗体与靶标蛋白结合

复旦大学王鹏飞青年研究员课题组于Emerging Microbes & Infections杂志上发表题为‘Bispecific antibodies provide broad neutralization of emerging beta-coronaviruses by targeting ACE2 and viral spikes’的文章（https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2404166）。在研究过程中，王鹏飞青年研究员课题组基于创新型的双特异性抗体改造技术开发了多个针对冠状病毒的广谱中和抗体，利用国重平台的的 BD LSR Fortessa流式细胞检测仪，检测双特异性抗体与细胞表明多个靶标蛋白的结合，证实了开发的双特异性抗体具有多靶向性和多功能性。

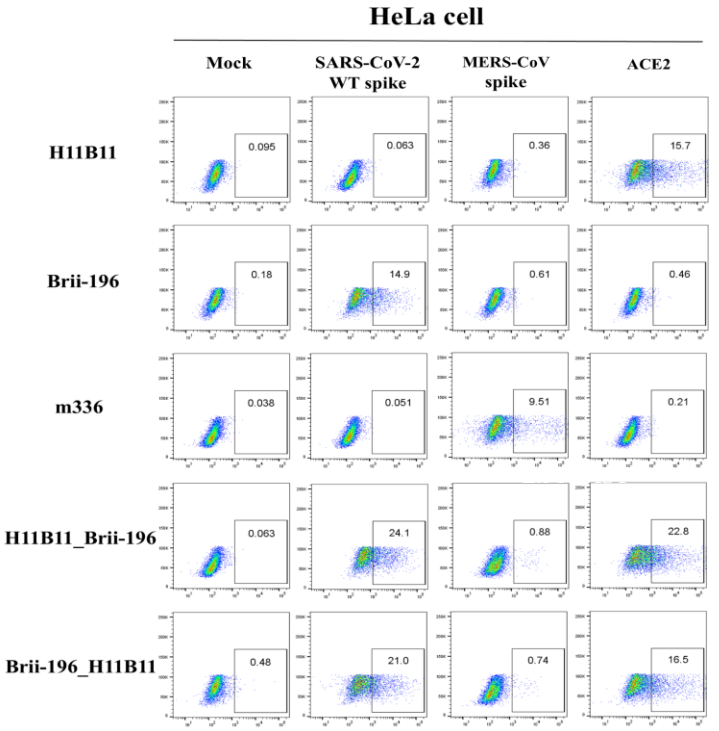


Figure S4. Detecting bispecific and parental antibodies binding ability by flow cytometry.

We then developed a new bsAb format, the “IgG-scFv” format, by fusing the single-chain variable fragments (scFvs) of parental antibodies to the C-terminus of a standard IgG antibody. This configuration allows each antibody to retain two binding arms, potentially overcoming the avidity limitations encountered with the “Knob-into-Hole” format. Drawing from our previous work, we paired H11B11 with Brii-196 or m336 to create four “IgG-scFv” bsAbs (Bispecific antibodies). The “IgG-scFv” bsAbs demonstrated strong binding to both the ACE2 protein and their respective viral targets, including either the SARS-CoV-2 or MERS-CoV S trimers, as determined by FACS using cell surface-expressed proteins (Figure S4). Compared to the above binding results, these bsAbs exhibited higher binding affinities compared to their “Knob-into-Hole” counterparts, potentially due to their multivalent binding capabilities with sACE2 or the S trimers.

高端流式细胞分析仪
BD FACSAria Fusion

高端流式细胞分析仪
BD LSRFortessa

目前已知的冠状病毒主要分为四大类：α、β、γ、和δ。其中，已发现能够感染人类的有七种冠状病毒，其中SARS-CoV、MERS-CoV和SARS-CoV-2均属于β冠状病毒。非典病毒（SARS-CoV）和新冠病毒（SARS-CoV-2）均使用人类的血管紧张素转换酶2（ACE2）作为其受体，引起严重急性呼吸综合征。SARS-CoV-2因其更高的传播率和免疫逃逸能力，据世界卫生组织（WHO）报告，已造成超过7亿感染病例和超过70万死亡案例。此外，动物源性病毒的不断溢出增加了人类面临新流行病的风险，这凸显了开发有效针对具有大流行潜力的β冠状病毒的防控措施的重要性。因此，研发针对β冠状病毒的高效、广谱中和抗体显得至关重要。我们团队开发的双特异性抗体采用一种创新策略：一端与病毒抗原结合，有效中和病毒并阻止其附着及进入宿主细胞；另一端则靶向特定细胞受体，阻断病毒与受体的相互作用。我们运用了“Knob-Into-Hole” CrossMab或IgG-scFv技术，将针对SARS-CoV-2或MERS-CoV的抗体与针对ACE2的抗体成功配对，构建了一套全面的双抗文库。特别地，抗体H11B11_m336 和 m336_H11B11展示出对所有测试的SARS-CoV-2变异株、SARS-CoV、MERS-CoV以及多种动物冠状病毒的有效中和作用。这一策略不仅有效应对当前疫情带来的挑战，而且还为预防未来可能的人畜共患病毒溢出事件提供了强有力的工具。

负责老师: 沈素芹　　仪器位置: 国重平台G107　　Tel: 31246713
仪器预约网址：http://lifesupporting.fudan.edu.cn/

供稿人:王鹏飞课题组　　撰稿人:王勋　　编辑:刘鹤华

人皮层类器官揭开亨廷顿舞蹈病大脑发育异常机制

复旦大学基础医学院解剖与组织胚胎学系马丽香与复旦大学生命科学学院赛音贺西格联合团队于*Molecular Psychiatry*杂志上发表题为“**Endogenous mutant Huntingtin alters the corticogenesis via lowering Golgi recruiting ARF1 in cortical organoid**”的文章 (Liu, Yang et al. Molecular psychiatry, 10.1038/s41380-024-02562-0. 23 Apr. 2024; IF=11.1)。在研究过程中，联合团队利用国重平台的**超分辨共聚焦显微镜Zeiss LSM880 with Airyscan**，发现HD-hCOs表现出异常的皮层发育轨迹，而内源性mHTT所参与的polyQ组装可能降低了神经前体细胞中高尔基体招募ARF1的能力，是HD-hCO皮质发育异常的潜在机制。本研究丰富了对于亨廷顿病异常皮层发育的认识，一定程度上揭示了神经前体细胞中内源性mHTT所参与的polyQ组装如何影响高尔基体，并为HD-hCO中异常的皮层发育机制提供了全新的视野。

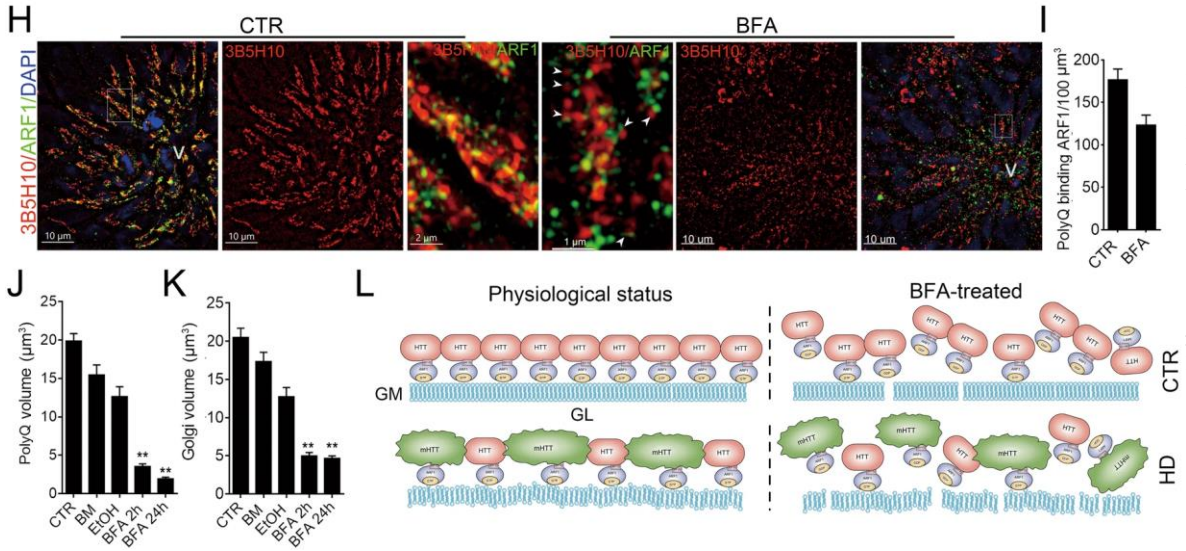


图1 ARF1介导了htt与高尔基体的结合，而mHTT通过招募ARF1减少了高尔基体 H. BFA处理2小时的ctrhco (H9)神经管中3B5H10和ARF1抗体的免疫染色显示，BFA处理的hCOs中的polyQ点状碎片被ARF1连接(白色箭头表示polyQ碎片与ARF1连接)。框区域是中间面板内部插入的放大部分。v,心室。I.在bfa处理的hCOs和ctrl -hCOs的网元中，连接到3B5H10+ polyQ组件的ARF1+点状点的计数。利用IMARIS表面测量polyQ组装，IMARIS斑点计数ARF1点状。将距离≤0μm定义为共轭点。J,K.定量BFA, EtOH和BM处理的ctrhcos (H9)中3B5H10+ polyQ组装体和GM130+高尔基体的体积。数据，均值±s.e.m.，单因素方差分析。**p < 0.001。重复，n = 3。L. hts与ARF1, ARFIP2和高尔基体关系的图解。GM，高尔基体膜;GL，高尔基腔。

To further investigate the underlying mechanism of impaired cortical development in HD, we turned to the region of neural precursor cells (neural tubule-like area) in hCO. We found that polyQ assemblies in this region were directional, guide Golgi structures and sort Clathrin+ vesicles. We further hypothesized that Golgi structures link polyQ assemblies through ADP ribosylation factor 1 (ARF1) and demonstrated this using Brefeldin A (BFA) inhibition of ARF1 activation, which dissociates polyQ assemblies from the Golgi. In the neural tubule-like regions of HD-hCOs, mhTT-bearing polyQ assemblies had less ARF1 and shorter polyQ assemblies as well as shorter Golgi structures than normal hCOs. Therefore, endogenous mHTT polyQ participation by the assembly may reduce the Golgi apparatus in the epithelial cells of the nervous recruit ARF1 ability, damage to the structure of Golgi apparatus and activity, is the potential mechanism of HD hCO cortical dysplasia.

该研究使用国重平台的**超分辨共聚焦显微镜Zeiss LSM880 with Airyscan**，首先利用HD患者多能干细胞衍生的皮层类器官（hCO）模拟了HD胎儿大脑皮质的改变，包括神经管中的连接复合体缺陷、有丝分裂后神经元成熟延迟、皮质神经元亚型的命运规范失调以及皮质发生过程中早期HD皮质下投射的异常。上述病理表型与HD胚胎样本病理表型高度吻合，也提示了HD大脑中受损的神经前体细胞与混乱的皮质神经元分层之间可能的因果联系。为了进一步研究HD皮层发育受损的潜在机制，我们将目光转向hCO神经前体细胞区域（神经管样区域）中，发现了这个区域polyQ组装体的富集具有一定的方向性，并可引导高尔基体结构并分拣clathrin+囊泡；我们进一步推测高尔基体结构通过 ADP 核糖基化因子 1（ARF1）连接 polyQ 组装体，并使用Brefeldin A （BFA）对于ARF1活化的抑制证明了这一点，BFA的干预可使高尔基体中与 polyQ 组装体解离。与正常的hCOs相比，在HD-hCOs的神经管样区域中，带有mHTT的polyQ组装体上的ARF1更少， 同时表现出更短的polyQ组装体以及更短高尔基体结构。因此内源性mHTT所参与的polyQ组装可能降低了神经上皮细胞中高尔基体招募ARF1的能力，损害了高尔基体的结构和活性，是HD-hCO皮质发育异常的潜在机制。

Zeiss LSM880 with Airyscan
超分辨共聚焦显微镜

Zeiss LSM710
高感度激光扫描共聚焦显微镜

负责老师: 史丹　仪器位置: 国重平台E101　Tel: 31246565
仪器预约网址：http://lifesupporting.fudan.edu.cn/

供稿人:赛音贺西格题组　撰稿人:宋晨韵　编辑:刘鹤华

锌离子激活通道ZAC的首次解析

复旦大学服部素之研究员团队于*Proc Natl Acad Sci U S A*杂志发表题为“**Cryo-EM structure of the zinc-activated channel (ZAC) in the Cys-loop receptor superfamily**”的文章（**F. J. et al, M. Hattori *PNAS* 121(44):e2405659121 (2024)**）。在该研究中，服部研究员课题组利用国重平台的**蛋白质微量纯化系统AKTA Micro**，**冷冻电镜样品制备仪Vitrobot和200kV冷冻电子显微镜Glacios03040701**，完成了对锌离子激活通道ZAC的冷冻电镜样品制备与筛选实验，并利用单颗粒冷冻电子显微镜技术，首次解析了Cys-loop受体超家族中的一类锌离子激活通道ZAC，并通过电生理技术对通道进行了突变分析。团队在胞外结构域中鉴定出锌离子活性相关位点，并发现该蛋白的通道构造有别于超家族其他成员，且找到离子选择性相关的重要位点，为理解ZAC的离子传导机制奠定了结构基础。

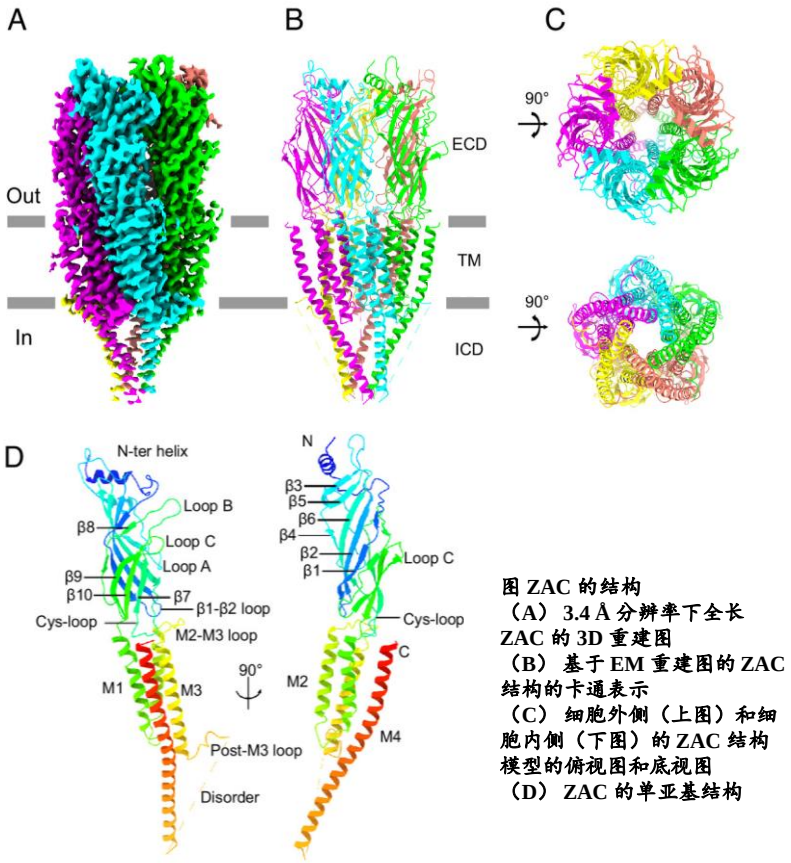


图 ZAC 的结构
（A）3.4 Å 分辨率下全长 ZAC 的 3D 重建图
（B）基于 EM 重建图的 ZAC 结构的卡通表示
（C）细胞外侧（上图）和细胞内侧（下图）的 ZAC 结构模型的俯视图和底视图
（D）ZAC 的单亚基结构

Cys-loop receptors are a class of pentameric ligand-gated ion channels with a crucial role in the human body, especially in the central nervous system. They have been implicated in various diseases, particularly neurodegenerative diseases. Among them, the zinc-activated ion channel (ZAC) is the most recently discovered member. However, only the structure of ZAC remains missing in the Cys-loop receptor family. In this work, we report the cryo-EM structures of the ZAC protein from Japanese rice fish. The overall structure of the ZAC channel adopts a bullet-like pentameric architecture. Each subunit of ZAC contains four transmembrane (TM) helices and an extracellular domain with an N-terminal helix and ten β-strands, exhibiting the common architecture of the Cys-loop receptor superfamily. We identified a few residues in the extracellular domain whose mutations had a mild impact on Zn^{2+} sensitivity. The constriction site in the ion-conducting pore differs from the one in other Cys-loop receptor structures, and further mutational analysis identified a key residue that is important for ion selectivity. In summary, our work provides a structural framework for understanding the ion-conducting mechanism of ZAC.

Vitrobot
冷冻电镜样品制备仪
负责老师: 申红芸
位置: 国重平台E101
Tel: 31246713

Glacios03040701
200kV冷冻电子显微镜
负责老师: 周德健
位置: 国重平台E101
Tel: 31246568

AKTA Micro
蛋白质微量纯化系统
负责老师: 刘鹤华
位置: 生科院A201室
Tel: 31246713

Cys-loop受体超家族是一类五聚体的配体门控离子通道，在人体神经系统中扮演关键角色，与多种神经退行性疾病相关。锌离子激活通道ZAC是最近才发现的一类Cys-loop受体蛋白，而它的结构信息在过去一直缺失。在此项工作中，我们利用国重平台的**蛋白质微量纯化系统AKTA Micro，冷冻电镜样品制备仪Vitrobot和200kV冷冻电子显微镜Glacios03040701**解析了来自青鳉的ZAC蛋白结构。该结构呈现子弹性状的五聚体构造，构成通道的每个单体都由四个跨膜螺旋和一个含N端螺旋和10个β-折叠的胞外结构域组成，表现出Cys-loop家族的常见构造。我们在细胞外结构域中鉴定了一些突变对 Zn^{2+}敏感性有轻微影响的残基。ZAC的离子通道最窄处与其他 Cys-loop受体结构中的最窄处不同，进一步的突变分析确定了对离子选择性重要的关键残基。综上所述，我们的工作为理解ZAC的离子传导机制奠定了结构基础。

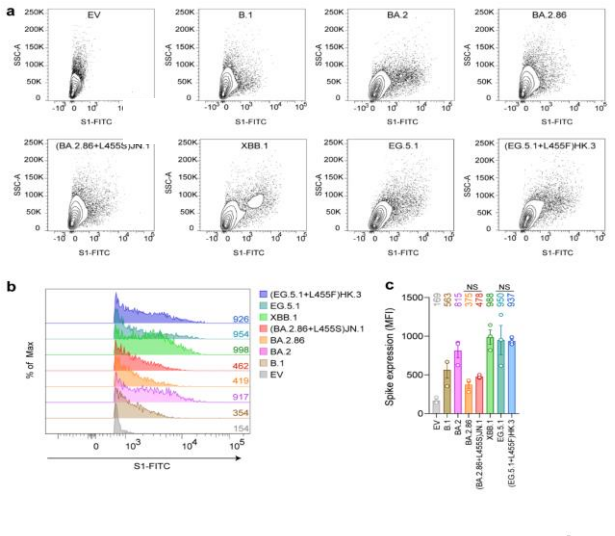
供稿人:服部素之课题组　撰稿人:沈成　编辑:刘鹤华

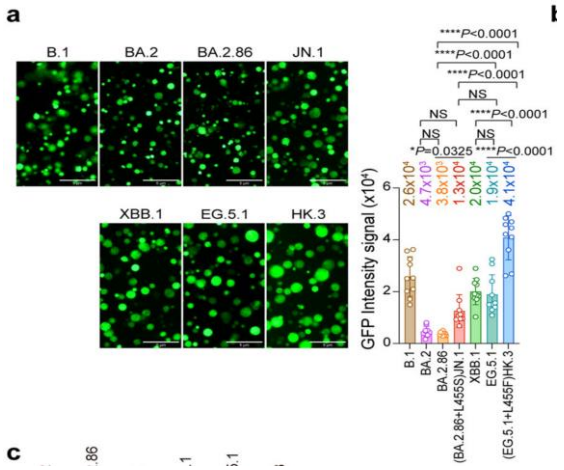
流式细胞仪(Fortessa)评估SARS-CoV-2 BA.2.86/JN.1和EG.5.1/HK.3变体的体外病毒学特征

复旦大学/上海市重大传染病和生物安全研究院王鹏飞团队、孙蕾团队与香港大学朱轩团队、陈福和团队及中国科学院深圳先进技术研究院张宝中团队合作，于期刊*Nature Communications*发表题为“**Lineage-specific pathogenicity, immune evasion, and virological features of SARS-CoV-2 BA.2.86/JN.1 and EG.5.1/HK.3**”（Liu, Yuanchen et al. *Nature communications* vol. Oct. 2024, doi:10.1038/s41467-024-53033-7.）的论文。在这项工作中，王鹏飞课题组全面调查了JN.1的体内和体外病毒学特征，在评估SARS-CoV-2 BA.2.86/JN.1和EG.5.1/HK.3变体的体外病毒学特征中使用了国重平台BD公司的流式细胞分析仪(Fortessa)，用于检测293T细胞表面B.1、BA.2、 BA.2.86、JN.1、XBB.1、EG.5.1以及HK.3毒株刺突蛋白的表达。

高端流式细胞分析仪
BD FACSAria Fusion

高端流式细胞分析仪
BD LSRFortessa





图左：流式细胞分析仪(Fortessa)评估了293T细胞表面B.1、BA.2、BA.2.86、JN.1、XBB.1、EG.5.1以及HK.3毒株刺突蛋白的表达。
图右：SARS-CoV-2刺突蛋白在体外介导效应细胞293T细胞之间的细胞融合。

To investigate the virological features of SARS-CoV-2 BA.2.86/JN.1 in comparison to EG.5.1/HK.3, we first performed a split GFP-based cell-cell fusion assay to assess the fusogenicity of their spike proteins in 293T cells. Our results showed that BA.2.86 and JN.1 spike appeared to mediate cell-cell fusion less efficiently than the spike of XBB descendent variants XBB.1, EG.5.1, and HK.3. Interestingly, by comparing BA.2.86 and JN.1 spike-mediated fusion, we found that the L455S mutation in JN.1 spike significantly increased fusogenicity by 3.4-folds. Similarly, by comparing EG.5.1 and HK.3 spike-mediated fusion, the L455F mutation in HK.3 spike significantly increased fusogenicity by 2.2-folds. We evaluated the surface expression of the spike proteins on 293T cells with flow cytometry and found that the increased fusion mediated by L455S and L455F was not due to increased surface expression of the expressed spike proteins.

BD 流式细胞分析仪(Fortessa)的优势主要体现在以下几个方面：1、高通量和高纯度细胞分选：能够进行高速分选，每秒可分选数千个细胞，同时实现高纯度的样品分离；2、多参数分析能力：支持多个参数的分析和排序，可以同时检测多种标记物并进行多重细胞表型分析；3、高灵敏度：能够检测到低浓度的细胞和微粒，提供高质量的数据；4、精确集成的射流和光学系统：可最大限度地提高信号检测，提高了多色检测中对各种颜色的敏感度和分辨率。

通过Fortessa流式细胞仪的使用，王鹏飞课题组成功检测了293T细胞表面B.1, BA.2, BA.2.86, JN.1, XBB.1, EG.5.1以及HK.3毒株刺突蛋白的表达，分析出了L455S和L455F突变介导的细胞融合增加不是由于刺突蛋白的表面表达增加。与此同时，使用携带B.1、BA.2、BA.2.86、JN.1、XBB.1、EG.5.1和HK.3的刺突蛋白的基于VSV的假病毒评估了假病毒进入。与母本相比，L455S和L455F突变都促进了JN.1和HK.3的细胞融合和假病毒进入，成功评价了不同变体的体外病毒学特征。

负责老师：沈素芹 仪器位置：国重平台E101-14 Tel：31246566
仪器预约网址：http://lifesupporting.fudan.edu.cn/

供稿人:王鹏飞课题组　撰稿人:李嘉言　编辑: 刘鹤华