

基于 SPR 的活性天然产物靶点垂钓方法及其在石杉碱甲上的应用

SPR-based Target Fishing Method for Active Natural Product Huperzine A

陈锡祥^{1,2}, 陈红专^{1,*}, 徐见容^{2,*}

¹交叉科学研究院, 上海中医药大学, 上海, 中国

²中西医结合学院, 上海中医药大学, 上海, 中国

*通讯作者邮箱: hongzhuan_chen@hotmail.com; janker.xu@gmail.com

摘要

目的: 通过在光敏芯片上固定未经修饰的石杉碱甲 (Huperzine A, Hup A) 以及使用 SPR 样品回收技术 (SPR recovery) 垂钓与 Hup A 具有相互作用的潜在靶标。**方法:** 通过紫外活化将 Hup A 固定在光敏芯片上, 使用纯的乙酰胆碱酯酶 (AChE) 验证 SPR 样品回收技术的可行性; 使用总蛋白裂解液进行 SPR 回收, 将回收的样品冷冻干燥浓缩, 进一步进行 WB、银染和质谱检测。**结果:** 银染可检测到 SPR 样品回收得到的纯 AChE; 质谱鉴定中未能检测到 Hup A 的靶标 AChE, 但是鉴定到 Thbs1 和 Tubb5 等影响细胞增殖、分化和细胞程序性死亡相关的潜在靶标。**结论:** 本文使用紫外产生自由基的原理将未修饰的 Hup A 固定在光敏芯片上, 结合 SPR 样品回收技术垂钓到 Hup A 的潜在靶标, 方法可应用于寻找小分子的潜在作用靶标。

关键词: SPR, 靶标垂钓, 石杉碱甲

材料与试剂

1. 光敏芯片 (Xantec, 产品目录号: UVHC1000M)
2. 石杉碱甲 (MCE, 产品目录号: HY-17387)
3. 乙酰胆碱酯酶活性检测试剂盒 (索莱宝, 产品目录号: BC2025)
4. 50 mM NaOH (泰坦生物, 产品目录号: 1310-73-2)
5. Tris (泰坦生物, 产品目录号: 77-86-1)
6. 三色预染蛋白 (白鲨生物, 产品目录号: BL742A)
7. 4~20%梯度胶 (碧云天生物, 产品目录号: P0050A)
8. 快速转膜液 (碧云天生物, 产品目录号: P0575-10L)
9. 快速电泳液 (碧云天生物, 产品目录号: P0562-10L)
10. Anti-AChE 抗体 (生工生物, 产品目录号: D194874)
11. HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (生工生物, 产品目录号: D110058)
12. HRP 显影液 (美仑生物, 产品目录号: MA0186-2)
13. 考马斯亮蓝染液 R250 (考染) (生工生物, 产品目录号: 6104-59-2)
14. 快速银染试剂盒 (银染) (碧云天, 产品目录号: P0017S)
15. BCA 试剂盒 (碧云天生物, 产品目录号: P0012S)
16. Pierce® IP Lysis Buffer (Thermo, 产品目录号: 87787)
17. 1.5 mL 离心管 (Axygen, 产品目录号: MCT-150-C)
18. T25 培养瓶 (Thermo, 产品目录号: 156367)
19. T75 培养瓶 (Corning, 产品目录号: 430641)
20. 高糖 DMEM 培养基 (上海源培生物, 产品目录号: M211125)
21. FBS (澳范, 产品目录号: FBSKM0502)
22. 青霉素链霉素 (上海源培生物, 产品目录号: F121107)
23. L-丙氨酰谷氨酰胺溶液 (上海源培生物, 产品目录号: 39537-23-0)
24. 0.25% Trypsin-EDTA (1×) (Gibco, 产品目录号: 25200-072)
25. 10× PBS (Cytiva, 产品目录号: BR100672)
26. 10× HBS-EP (Cytiva, 产品目录号: BR100669)
27. 1× HBS-EP (见溶液配方)
28. Pierce® IP Lysis Buffer (见溶液配方)
29. 1× PBS (见溶液配方)

仪器设备

1. Biacore T200 (Cytiva, 产品型号: T200)
2. 电泳仪电源 (BIO-RAD, 产品型号: PowerPac™ Basic)
3. Amersham 生物分子成像仪 (Cytiva, 产品型号: ImageQuant™ 800)
4. 冷冻干燥机 (宁波新芝生物, 产品型号: SCIENTZ-12N)
5. LED 紫外线灯 (深圳中联, 产品型号: 365 nm, 10 W)
6. 多功能酶标仪 (BMG LABTECH, 产品型号: PHERAstar FSX)
7. 质谱 (Thermo Scientific, 产品型号: Orbitrap Fusion Lumos)

实验步骤

一、实验前的准备

1. 配体的准备

称取石杉碱甲 1.0 mg，加入 825.4 μ L DMSO 配制成 5 mM 储备液。

2. 待回收总蛋白裂解液的准备

- 使用 T75 细胞培养瓶培养肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (HT22)、小鼠海马神经元细胞系 (PC12) 细胞，汇合度达到 90% 左右收取细胞；
- 弃去培养液，使用 4°C 预冷的 PBS 清洗 3 遍；
- 在冰上加入 800 μ L IP 裂解液 [1]，用细胞刮刀将细胞刮下转移至 1.5 mL 离心管，混匀；
- 在冰上放置 10 min，期间涡旋 2 次；
- 4°C, 13,000 $\times$ g，离心 10 min；
- 弃沉淀物，取上清即为用于回收的总蛋白裂解液。

注：PMSF 与 AChE 的活性位点结合 [2]，可能会影响到 Hup A 与 AChE 的相互作用，因此提取总蛋白的裂解液中不适合含有 PMSF，本实验不添加蛋白酶抑制剂并且需要一直保持在 4 °C 环境中进行。

3. Running Buffer 的准备

1 $\times$ HBS-EP 溶液（见溶液配方）。

4. 其它准备内容

- 乙酰胆碱酯酶活性试剂盒检测备选细胞中 AChE 活性（按照说明书操作进行）。
- Western Blot (WB) 鉴定 AChE。
- 考染定性验证 AChE。

取凝胶放入考马斯亮蓝染色液中，置于摇床上缓慢摇动，室温染色至凝胶的颜色和染色液的颜色非常接近，可以认为已染色充分。加入适量考马斯亮蓝染色脱色液，置于摇床上缓慢摇动，室温脱色 4~24 小时。期间更换脱色液 2~4 次，直至蓝色背景基本上全部被脱去，并且蛋白条带染色效果达到预期。拍照留存即可。

注：脱色期间可以在脱色液中加入一片吸水纸，可以使部分染料吸附在吸水纸上，加快脱色。另外，脱色时间过长也会导致蛋白条带的颜色变浅。

- 银染鉴定进行 AChE 定性验证（按照说明书操作进行）。

5. 仪器准备

- 仪器开机进行常规维护后将缓冲液更换为 MQ H₂O 进行系统冲洗，选择 Tools-Prime；
- 将仪器左边的缓冲液更换为 HBS-EP，芯片更换为光敏芯片，进行系统冲洗，选择 Tools-Prime。

注：更换缓冲液或芯片都需要运行一次 prime。

6. Hup A 的紫外固定（小分子配体的偶联）

- 选择并运行 Run-manual run 模式，使用 HBS-EP 进样 60 秒，等待 30 秒，运行 3 个循环，记录基线值；
- 退出光敏芯片，使用 MQ H₂O 冲洗后再装载芯片，进行系统冲洗后重复步骤 6.1；
- 步骤 6a-6b 重复 3 次；
- 室温（25 °C），打开 LED 紫外线灯预热 10 分钟；
- 退出光敏芯片；
- 使用 PBS 将 Hup A 稀释成 200 μ M，量取 20 μ L Hup A 滴加在芯片表面。关闭 LED 紫外线灯，将芯片转移至紫外灯下，距离约 2~3 cm，再打开紫外处理 5 分钟（图 1；图 2）[3~5]；



图 1. 光敏芯片紫外固定装置



图 2. 用于装载紫外处理光敏芯片的托盘（基于 CM5 外壳改造）

- g. 紫外处理结束后，取出芯片，用 PBS 冲洗；
 - h. 将处理后的芯片装载进仪器中，使用 HBS-EP 进行系统冲洗；
 - i. 选择并运行 Run-manual run 模式，使用 HBS-EP 进样 60 秒，等待 30 秒，运行 3 个循环，记录基线水平。
 - j. 退出光敏芯片，使用 MQ H₂O 冲洗后再装载芯片，进行系统冲洗后重复步骤 6.9；
 - k. 步骤 6i-6j 重复 3 次；
 - l. 退出芯片，更换为 Control 组芯片，除不添加 Hup A 外其它处理与 Hup A 组相同。
- 注：为计算 Hup A 固定在芯片上的量，需要记录紫外处理前后基线变化，固定量= $|(Hup A \text{ 组紫外处理后基线均值}-紫外处理前基线均值)|-(Control \text{ 组紫外处理后基线均值}-紫外处理前基线均值)|$ ；实验采用水溶性的反应体系，在紫外固定前需要检查 Hup A 是否有析出。
7. 样品回收条件
- 使用 20~50 $\mu\text{g/mL}$ 纯的 AChE 作为验证对象，测试 SPR 样品回收的流程以及确定再生条件。按照下述分析方法流程，进样样品为 20~50 $\mu\text{g/mL}$ 纯的 AChE，其余的实验条件不变，进行方法、流程以及再生条件的验证。同时结合使用银染实验作为验证，以确保回收实验的有效性。

注：需要确定蛋白的再生条件，以确保样品回收的有效性。固定的小分子一般优先考虑使用碱液进行再生。

二、利用 Biacore T200 样品回收系统进行小分子潜在靶标回收

1. 方法设置

- a. 打开设置方法界面，点击 General Setting，选择 Detection 中的 Multi，在 Buffer setting 中填写 A 的名称 HBS-EP，其它默认（图 3.1）。

Position	Name
A	HBS-EP
B	
C	
D	

图 3.1 方法设置第一步：General Settings 相关参数设置

- b. 点击 Assay Steps 中的 New 进行添加分析步骤，包括 Startup（仪器预运行）、HT22 Total Lysate 和 PC12 Total Lysate 三部分，分别选择对应的 Purpose（图 3），此时没有可选择的 Connect to cycle type 选项，需点击 Cycle Types 进行设置（图 3.2）。

注：HT22 Total Lysate 和 PC12 Total Lysate 两个 sample 选择不同的 Purpose，如 Sample 和 Control of sample，便于在确定样品位置时区分离心管的位置，避免混淆。

图 3.2 方法设置第二步：Assay Steps 设置

- c. 在 Cycle Types 界面选择 New 新建对应 Startup、HT22 Total Lysate 和 PC12 Total Lysate 三部分。选中 Startup, 在 commands 中选择 sample, 点击 insert, 然后设置具体的实验条件, 将 Sample solution 设置为 HBS-EP, 其它默认 (图 3.3)。

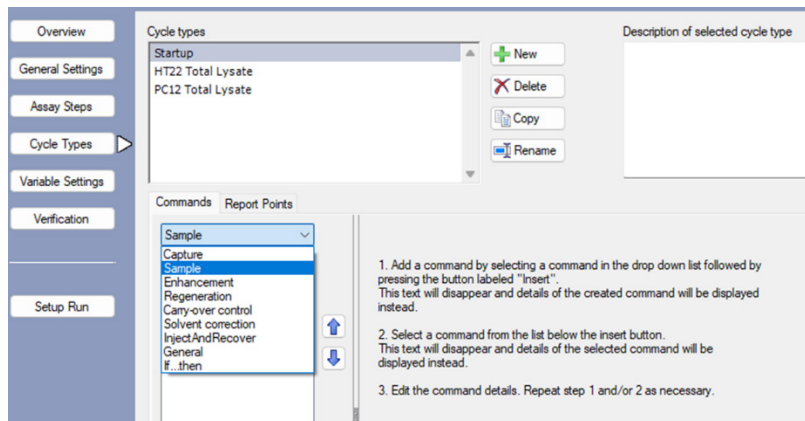


图 3.3 方法设置第三步: Cycle Types 设置

- d. 选中 HT22 Total Lysate, 在 commands 中选择 Inject And Recover, 点击 insert, 然后后选中进行具体的方法参数设置。Contact time 设置为 120 秒, 流速设置为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, Wash solution 设置为 HBS-EP, Recovery solution 设置为 50 mM NaOH, Incubation times 设置为 45 秒, Deposition solution 设置为 150 mM Tris-HCl, pH6.0, Deposition solution volume 设置为 20 μL , Number of repetition 设置为 8 其它默认。PC12 Total Lysate 组别进行同样设置 (图 3.4)

注: 样品结合时间, 流速以及 number of repetition (重复次数) 需要调整好, 结合这三个条件计算总体积需要在 2~100 μL 范围之内, 否则会出现报错: “flow rate or contact time for command 'InjectAndRecover 1' must be changed because the total required injection volume is invalid. It must be in the range 2–100”; deposition 体积至少设置为 20 μL , 体积过小会导致无法正常回收; deposition 的溶液和 recovery 的溶液的 pH 最好能中和, 使得两者混合之后的 pH 约为 7.4。

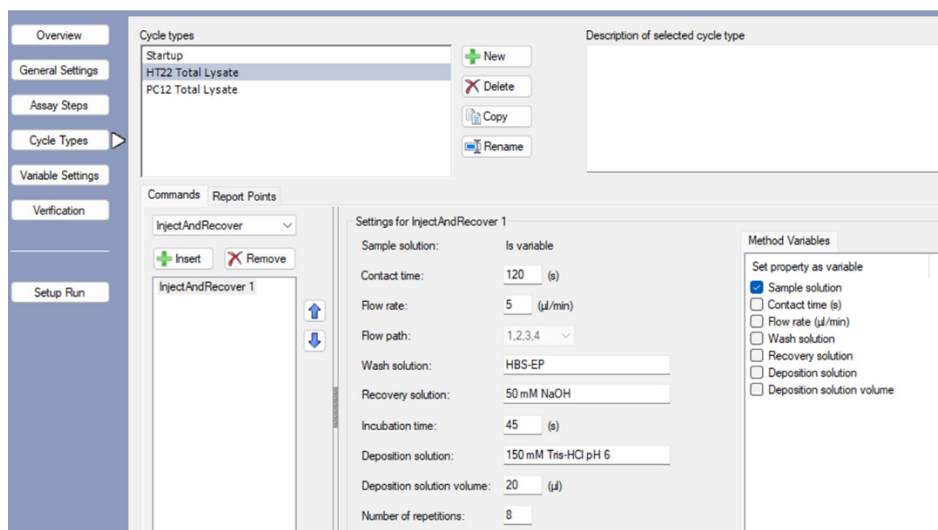


图 3.4 方法设置第四步: 样品回收关键程序 Inject And Recover 设置

- e. 在 Assay Steps 界面，点击 Startup，选中 Connect to cycle type 中的 Startup，Number of replicates 设置为 5 times。HT22 Total Lysate 和 PC12 Total Lysate 选中 Connect to cycle type 中的对应项目即可，其它默认不变（图 3.5）。

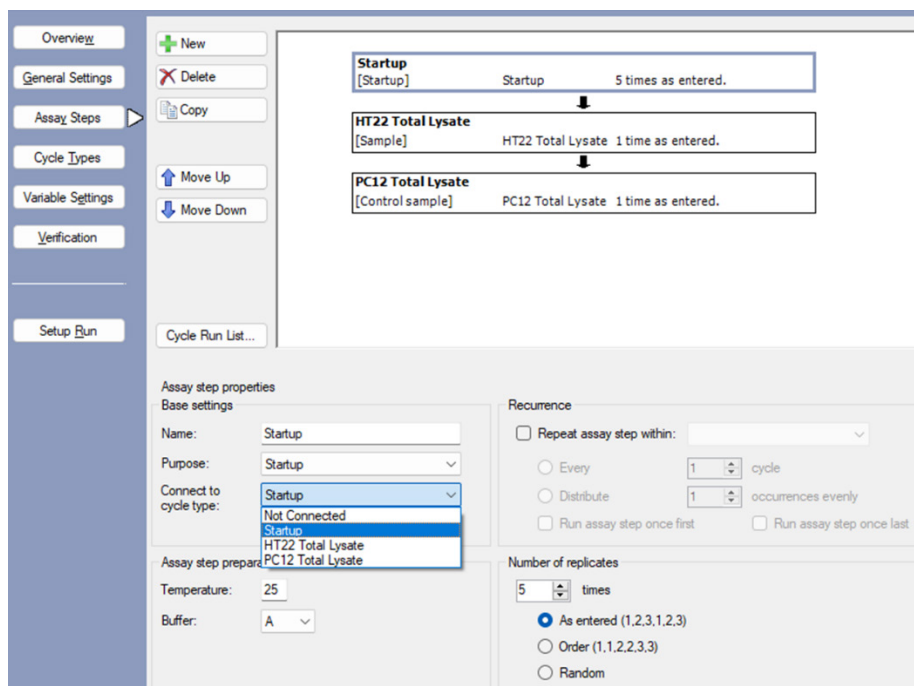


图 3.5 方法设置第五步：Connect to cycle type 设置

- f. 在 Variable Settings 界面，选中 HT22 Total Lysate 或 PC12 Total Lysate，点击 Define all values in method，设置样品使用的数量（图 3.6）。

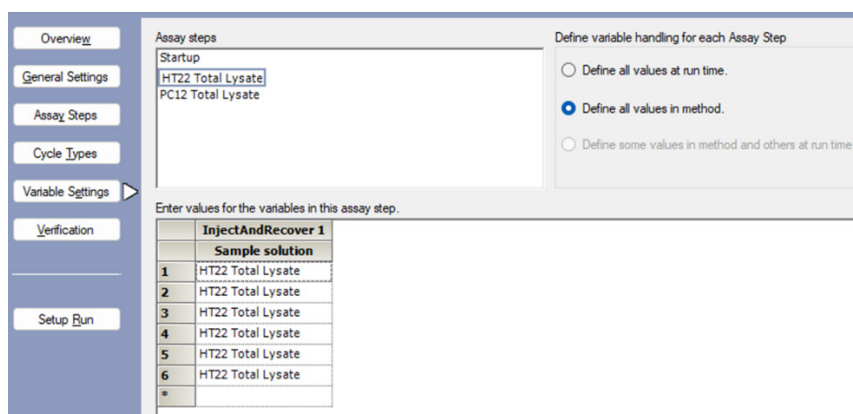


图 3.6 方法设置第六步：Variable Settings 设置

- g. 方法设置完成后点击 verification，检查方法是否可以运行，如果没有问题会出现提示：The method has been verified and can be used to set up a run（图 3.7）。

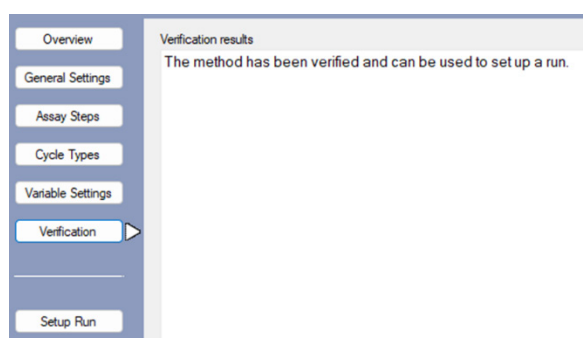


图 3.7 方法设置第七步：verification 方法可以正常运行

- h. 点击 Setup Run 进行下一步，flow path 选择 1,2,3,4 即可，然后点击 next 浏览整个实验的进样顺序，确保其与我们设置的分析顺序一致（图 4.1；图 4.2）。

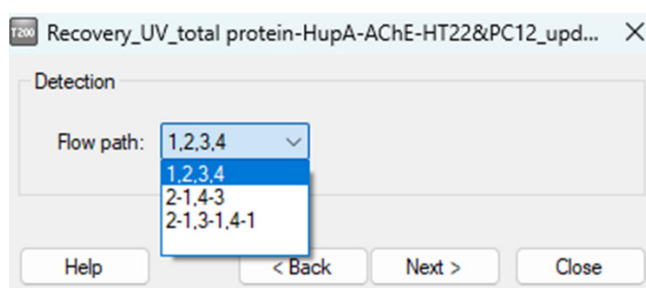


图 4.1 方法运行第一步：flow path 的选择

Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	InjectAndRecover 1 Solution
1	Startup	HBS-EP	
2	Startup	HBS-EP	
3	Startup	HBS-EP	
4	Startup	HBS-EP	
5	Startup	HBS-EP	
6	HT22 Total Lysate		HT22 Total Lysate
7	HT22 Total Lysate		HT22 Total Lysate
8	HT22 Total Lysate		HT22 Total Lysate
9	HT22 Total Lysate		HT22 Total Lysate
10	HT22 Total Lysate		HT22 Total Lysate
11	HT22 Total Lysate		HT22 Total Lysate
12	PC12 Total Lysate		PC12 Total Lysate
13	PC12 Total Lysate		PC12 Total Lysate
14	PC12 Total Lysate		PC12 Total Lysate
15	PC12 Total Lysate		PC12 Total Lysate
16	PC12 Total Lysate		PC12 Total Lysate
17	PC12 Total Lysate		PC12 Total Lysate

图 4.2 方法运行第二步：确认样品进样顺序

- i. 点击 next，选择 Prime before run（图 4.3）

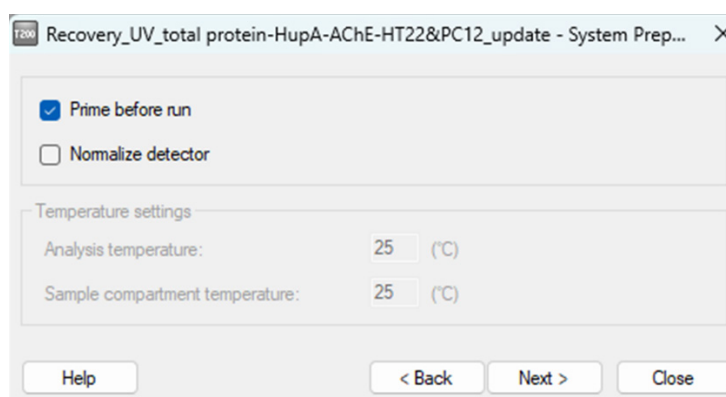


图 4.3 方法运行第三步：选择 Prime before run

- j. 点击 next，设置样品以及回收样品空管的位置，一般可直接使用系统的默认设置（图 4.4）

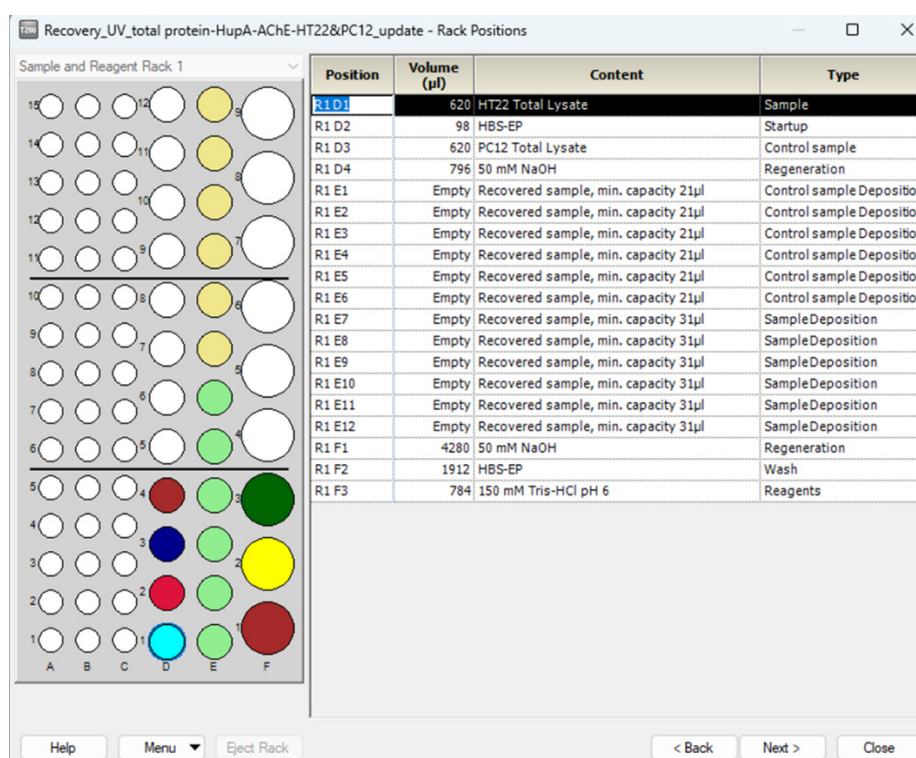


图 4.4 方法运行第四步：确认样品以及回收样品空管的位置并正确放置

- k. 将样品放在对应位置之后点击 next，根据系统提示准备对应的缓冲液，确认无误后点击 Start 开始运行程序（图 4.5）。

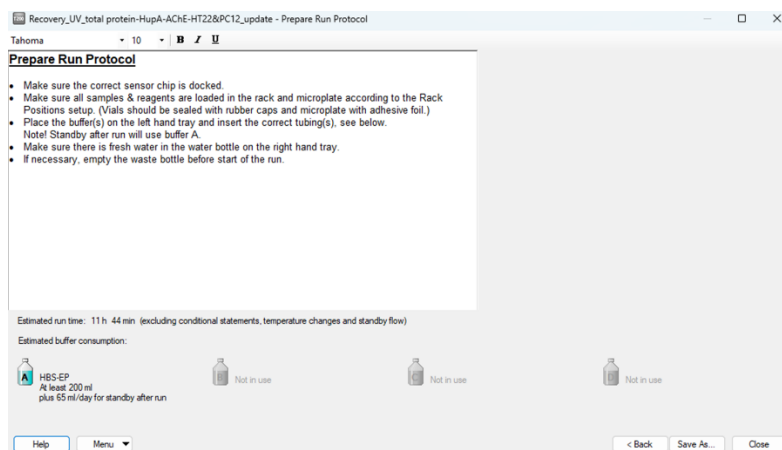


图 4.5 方法运行第五步：确认缓冲液的体积以及其余注意事项

2. 总蛋白裂解液的回收

a. 上机检测

将 HT22 和 PC12 对应的蛋白裂解液样品（1.5~2 mg/mL）稀释 5 倍后进行检测，观察进样后的传感曲线变化，判断结合情况以及再生情况。

b. 后续检测

将回收得到的蛋白样品使用冷冻干燥机进行冷冻干燥，使用 PBS 进行溶解浓缩，最后结合 WB、银染实验进行 AChE 检测。

3. 数据分析与数据解析

a. 判断样品与 Hup A（或 Control）结合的情况。随着样品进样响应值持续升高，在进样结束后缓慢解离，之后进行短暂的系统冲洗（wash）以及使用 50 mM NaOH 进行再生，将与 Hup A 结合的蛋白回收下来，整体的基线回归正常水平。

注：在运行的过程中会突然有向下的峰出现，是由于在进行孵育，不影响整体实验，属于正常现象；再生完成后，整体水平可能会比基线低，由于碱性强，会再生掉芯片上的其它物质，不影响整体实验。

b. NaOH 再生之后基线回归正常水平，每个循环的变化相似，因此可以评估实验条件的合理性。

c. 结合使用其它手段进行检测与分析，如 WB、银染和质谱鉴定等实验，主要通过使用纯的 AChE 比较回收样品中条带出现的位置以及其它蛋白的情况，进行综合分析评价。

结果与数据分析

1. 技术路线

本实验利用紫外照射使得 Hup A 以及光敏芯片产生自由基，两者接触发生共价结合从而将 Hup A 固定在芯片上，使用 5 倍稀释后的细胞裂解液进行 SPR 回收富集，在缓冲液冲洗之后使用 NaOH 将结合的蛋白回收，对回收的蛋白使用冷冻干燥机进行干燥和浓缩，之后用于银染或酶解后进行质谱检测（图 5）。

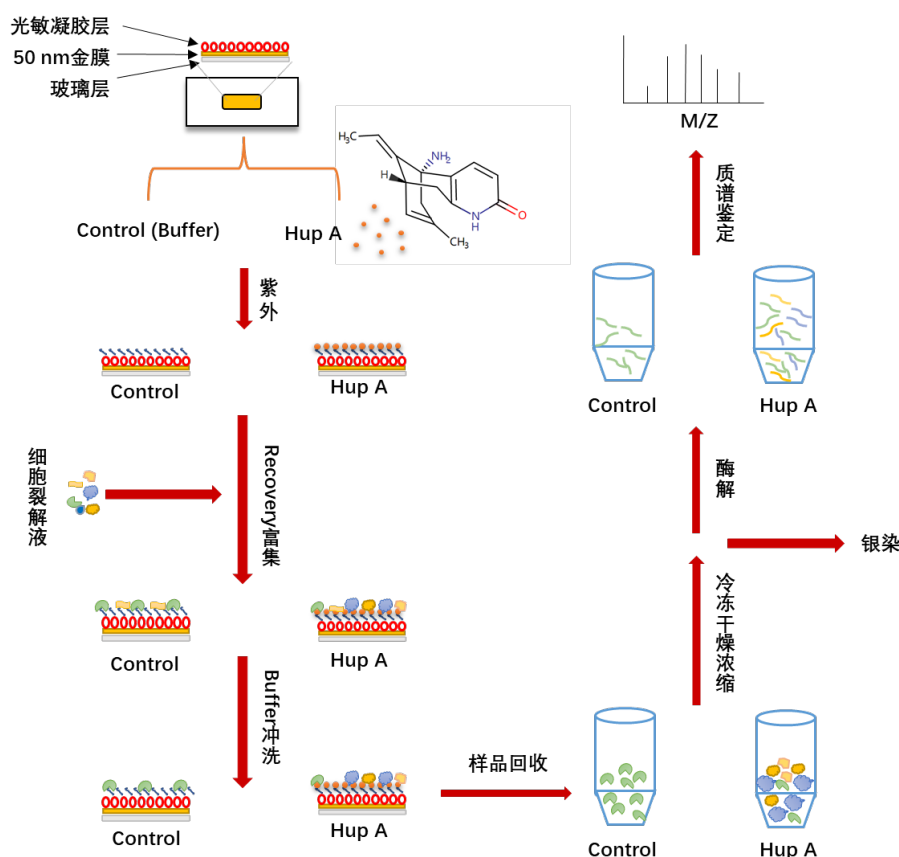


图 5. 技术路线

2. 验证模式细胞中 AChE 的表达

通过资料调研发现 PC12 细胞[6], HT22 细胞[7]的 AChE 含量相对高, 为了进一步确定研究对象, 考察 HT22 细胞和 PC12 细胞中 AChE 的表达情况, 通过 WB 实验, 定量 30 μ g, 使用 AChE 抗体检测两种细胞中的 AChE。结果显示两种细胞中均含有 AChE, 但蛋白的表达量均不高, 低于 100 ng AChE 水平。为了进一步考察 HT22 和 PC12 的总蛋白裂解液中 AChE 的位置, 使用银染和考染进行定位 (图 6)。结果显示在 63~75 kDa 之间存在和纯 AChE 相同位置的条带, 明确两种细胞系可以用于后续样品检测。

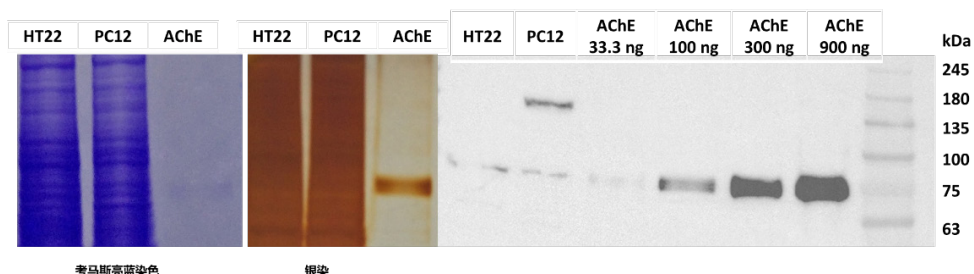


图 6. AChE 在 HT22 细胞和 PC12 细胞中的验证 (左: 考染; 中: 银染; 右: WB)

3. Hup A 的固定

引用格式: 陈锡祥, 陈红专, 徐见容. (2024). 基于 SPR 的活性天然产物靶点垂钓方法及其在石杉碱甲上的应用. *Bio-101* e1011016. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011016.

How to cite: Chen, X. X., Chen, H. Z. and Xu, J. R. (2024). SPR-based Target Fishing Method for Active Natural Product Huperzine A. *Bio-101* e1011016. Doi: 10.21769/BioProtoc.1011016. (in Chinese)

为了计算 Hup A 的固定量，将紫外处理前后的光敏芯片基线的变化与对照组进行扣减，计算得出 Hup A 的固定水平为 186.13 RU（表 1）。

表 1. Hup A 的固定水平

	紫外处理前基线均值 (RU)	紫外处理后基线均值 (RU)	紫外前后差值 (RU)	Hup A 固定水平 (RU)
Hup A	27471.98	26889.52	595.41	186.13
NC	27834.35	27425.06	409.29	

4. SPR 样品回收程序验证
- 为了证明 SPR 样品回收程序以及后续检测流程的合理性，使用纯的 AChE (low: 20 $\mu\text{g/mL}$, high: 50 $\mu\text{g/mL}$ 两种浓度) 进行验证。AChE 的结合随着浓度增加而增强，再生之后基线回归，显示该循环的样品回收正常（图 7）。在所有的循环回收结束之后对回收样品进行真空冷冻干燥、浓缩，再使用银染进行检测。银染结果显示纯的 AChE 两个浓度都能被回收，且回收的量与浓度相关（图 8）。AChE 测试结果表明程序设置正常且能够正常回收蛋白用于后续的检测，具有继续探索 Hup A 未知靶标的可行性。

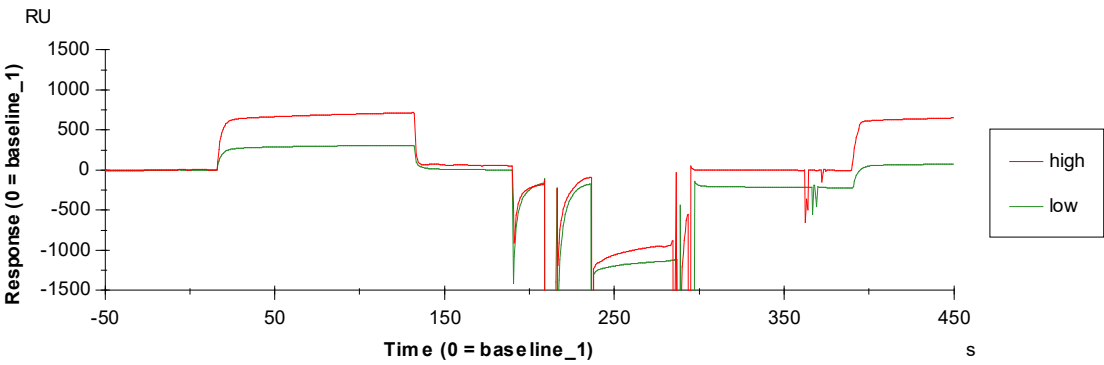


图 7. 高浓度和低浓度 AChE 回收传感图（合并）

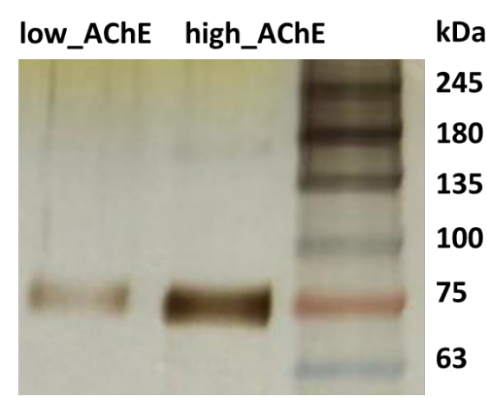


图 8. AChE 回收后银染鉴定结果图

5. 细胞总蛋白裂解液的回收与验证
- 使用 HT22 和 PC12 的总蛋白裂解液进行 SPR 样品回收。总蛋白裂解液与紫外固定在光敏活性芯片的 Hup A 结合，进样结束后整体水平比基线高，且呈现出缓慢解离的状态，再生之后基线回归，显示蛋白裂解液的样品回收正常（图 9）。

为了检测总蛋白裂解液经过 SPR 样品回收和真空冷冻干燥浓缩之后是否含有 AChE，使用 WB 和银染进行实验。结果显示 WB 未能在 63~75 kDa 检测出对应的 AChE（约 68 kDa）（图 10，左），银染在相应位置存在较浅的条带（图 10，右）。

研究发现差异的原因可能是 WB 的检测灵敏度和银染灵敏度差异所导致[8–10]，但两者都可能达不到检测回收的蛋白中 AChE 的灵敏度，因此考虑使用灵敏度更高的质谱做进一步鉴定[11]。WB 结果显示 PC12 蛋白裂解液中可能有类似于二聚体的存在，可能会影响检测结果，后续质谱只检测 HT22 的蛋白回收液。回收的样品质谱结果显示，鉴定到的蛋白中没有 AChE，但是通过蛋白质量（Unique Peptides ≥ 2 ），丰度值（Hup A VS Ctrl Ratio ≥ 1.5 ）比较以及蛋白功能筛选，得到 7 个潜在的备选靶标（Tubb5, Thbs1, Npm1, Jup, Fermt3, Atp5f1b, Alb）（表 2）。备选靶标功能上主要与细胞骨架、细胞发育、分化、黏附、迁移、增殖、抑制程序性细胞死亡、线粒体 ATP 合成和核糖体功能等相关，与 Hup A 的神经保护、抗氧化作用、抗凋亡作用、促进细胞增殖、轴突生长的功能密切相关[12–15]，后续可以此为线索进一步确认上述蛋白是否为 Hup A 的直接靶标。

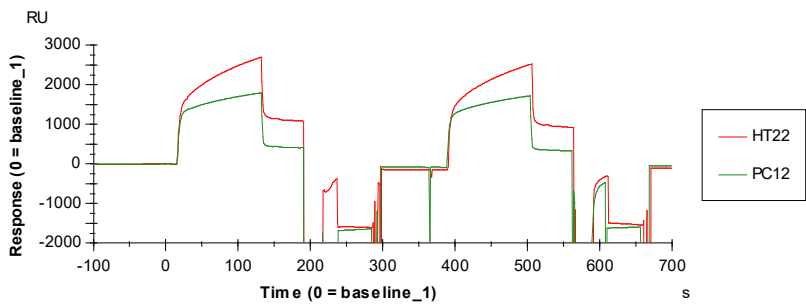


图 9. HT22 和 PC12 的总蛋白裂解液回收传感图（合并）

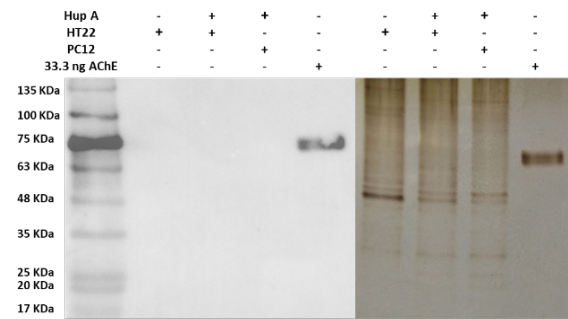


图 10. 总蛋白裂解液回收结果鉴定（左：WB；右：银染）

表 2. HT22 细胞中 Hup A 潜在的作用靶标

Accession	Gene Symbol	Unique Peptides	HupA_VS_Ctrl_Ratio	Mean_HupA	Mean_Ctrl
P07724	Alb	2	121.26	1774667.1	14635.2
P56480	Atp5f1b	3	1.84	1170437.0	636616.2
Q8K1B8	Fermt3	3	1.77	4176365.7	2360138.4
Q02257	Jup	5	4.82	1308024.0	271284.8
Q61937	Npm1	2	1.85	4282350.8	2314211.0
P35441	Thbs1	2	3.30	965955.4	292346.6
P99024	Tubb5	5	14.26	68270592.3	4786716.9

失败经验

1. 本次实验垂钓 Hup A 的靶标未能找到 AChE，可能与没有加蛋白酶抑制剂导致 AChE 降解有关。
2. 可能受限于 AChE 与 Hup A 的接触不充分，即空间位阻问题，导致 AChE 未与 Hup A 结合就被系统冲洗下来。
3. 样品回收程序中分液的体积 (deposition solution volume) 需要估量，过少会无法回收到离心管里 (1.5 mL 离心管最少 20 μ L)，导致实验失败。
4. SPR 回收程序回收到的样品每一管有 30 μ L 左右，但是浓度低，为了提高后续实验检测的成功率，应尽可能多设置重复，以及将所有的回收样品浓缩成约 30~50 μ L 体积再进行后续检测。

溶液配方

1. 1 $\times$ HBS-EP
量取 100 mL 10 $\times$ HBS-EP (100 mM HEPES, 150 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% v/v surfactant P20) 加入 900 mL MQ H₂O 配制 1 $\times$ HBS-EP 溶液;
2. Pierce[®] IP Lysis Buffer
25 mM Tris·HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 5% glycerol;
3. 1 $\times$ PBS
量取 100 mL 10 $\times$ PBS 加入 900 mL MQ H₂O 配制 1 $\times$ PBS 溶液

致谢

感谢国家自然科学基金面上项目 (82173798) 的经费支持。感谢上海中医药大学交叉科学研究院王恺纯博士提供 AChE 活性检测方法、实验细胞以及技术上的支持。

参考文献

1. Jamieson, C., Lui, C., Brocardo, M. G., Martino-Echarri, E. and Henderson, B. R. (2015). Rac1 augments Wnt signaling by stimulating β -catenin-lymphoid enhancer factor-1 complex assembly independent of β -catenin nuclear import. *J Cell Sci.* 128(21): 3933–3946. <https://doi.org/10.1242/jcs.167742>.
2. Kraut, D., Goff, H., Pai, R. K., Hosea, N. A., Silman, I., Sussman, J. L., Taylor, P. and Voet, J. G. (2000). Inactivation studies of acetylcholinesterase with phenylmethylsulfonyl fluoride. *Mol Pharmacol.* 57(6): 1243–1248.
3. 孙瑞, 高银佳 和 史海斌 (2018). 光交联技术的生物应用研究进展. *中国光学*. 11(03): 444–458.
4. 岳莎, 周淑如 和 郭学敏 (2014). 紫外交联合并串联亲和纯化高效鉴定蛋白复合物组分的 RNA 结合活性. *生物化学与生物物理进展*. 41(06): 617–622.
5. Jakubovska, J., Tauraitė, D. and Meškys, R. (2018). A versatile method for the UVA-induced cross-linking of acetophenone- or benzophenone-functionalized DNA. *Sci Rep.* 8(1): 16484. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34892-9>.
6. Ma, J., Si, T., Yan, C., Li, Y., Li, Q., Lu, X. and Guo, Y. (2019). Near-Infrared Fluorescence Probe for Evaluating Acetylcholinesterase Activity in PC12 Cells and In Situ Tracing AChE Distribution in Zebrafish. *ACS Sensors.* 5(1): 83–92. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b01717>.

7. Liu, Y. W., Zhang, L., Li, Y., Cheng, Y. Q., Zhu, X., Zhang, F. and Yin, X.-X. (2015). Activation of mTOR signaling mediates the increased expression of AChE in high glucose condition: in vitro and in vivo evidences. *Mol Neurobiol.* 53(7): 4972–4980. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9425-6>.
8. Cohen, L. and Walt, D. R. (2018). Highly Sensitive and Multiplexed Protein Measurements. *Chem Rev.* 119(1): 293–321. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00257>.
9. 柳荣, 黄建英 和 刘田生 (1999). 蛋白质凝胶电泳的高灵敏度染色法——复合银染. *天津农学院学报* (02): 5–10.
10. Switzer, R. C., 3rd, Merrill, C. R. and Shifrin, S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 98(1): 231–237. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90732-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90732-2).
11. 姜山 (2019). 超高灵敏加速器质谱技术及应用进展. *质谱学报*. 40(05): 401–415.
12. Farooq, M. U., Min, J., Goshgarian, C. and Gorelick, P. B. (2017). Pharmacotherapy for Vascular Cognitive Impairment. *CNS Drugs.* 31(9): 759–776. <https://doi.org/10.1007/s40263-017-0459-3>.
13. Friedli, M. J. and Inestrosa, N. C. (2021). Huperzine A and Its Neuroprotective Molecular Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules* 26(21): 6531. <https://doi.org/10.3390/molecules26216531>.
14. Hao, Z., Liu, M., Liu, Z. and Lv, D. (2009). Huperzine A for vascular dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* (2): Cd007365. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007365.pub2>.
15. Wang, J., Chen, F., Zheng, P., Deng, W., Yuan, J., Peng, B., Wang, R., Liu, W., Zhao, H., Wang, Y., et al. (2012). Huperzine A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via the suppression of T cell-mediated neuronal inflammation in mice. *Exp Neurol.* 236(1): 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.03.024>.