

医学物理学

2022年3月29日 9:52

计算生物学

Computational Biology

教学内容	教学目标
<ul style="list-style-type: none">Sequence analysis: 1) 氨基酸序列性质 2) 二级结构预测等Molecular modeling: 1) 同源建模与从头建模 2) 分子对接 3) 分子动力学模拟	<ul style="list-style-type: none">1) 了解在序列分析与分子建模中的基本概念2) 初步学会应用一些基本的计算生物学工具3) 了解计算生物学在医药领域的应用

参考书：
Biophysical Chemistry, Chapter 18

长什么样，为什么能够有这种功能，如何调控功能
从序列空间到构象空间的映射以及反过来。

Computational Structural Biology

氨基酸序列空间

蛋白质构象空间

- 理解机制：**
 - 1) 模拟缺失的结构
 - 2) 揭示相互作用细节
 - 3) 动态构象变化
- 发现、创造新分子：**
 - 1) 虚拟筛选 Virtual screening for compounds
 - 2) 理性设计 Rational design of molecules

DNA-RNA-蛋白质

蛋白质一级结构：

工具1：

检索：蛋白质结构和序列储存在数据库中（PDB）；如果数据库中有，那么所有包括结构都有

如果数据库中没有，可以通过网上分析初步得到蛋白质的分子性质

蛋白质二级结构：

工具2：quick2D, blast算法

根据经验，每种氨基酸对螺旋和片层的倾向性，根据概率得到大致是那种二级结构，并且能够根据带电性得到跨膜区。但是预测得到的结构是需要优化和比较的，结构也是多样的可变的。

蛋白质N端和C端通常是不确定的结构，将几个最有可能的结构叠加在一起可以得到动态模型。

蛋白质三维结构：

先建立大致的模型，将每个小区域拼在一起，然后进行修正、模拟——分子动力学模拟（捉虫）

工具3：

modeler (同源建模工具)

foldit (对蛋白质的预测结构进行优化，调整到能量最低的状态。主链随机运动，观察能量变化的大小。计算即给出对自由能的估计)

1、同源建模/从头建模（人工智能.....）

同源建模：选择相似的同源性高的，在此基础上进行调整。

从头建模（de novo）：

局限性：蛋白质的构象空间非常庞大，其最稳定的能量最优的状态比较难找到。

foldit：因此先构建，再根据分子动力学进行打分——寻找能量最低的模型。

实际：小片段分别构建，蒙地卡罗模型（随机状态动来动去采样打分）进行拼接。能量函数，打分，哪个好哪个不好，用好的相互作用拼接。

alphafold预测了很多蛋白，可以提供参考。

分子对接的构象：

小分子配体-蛋白相互作用：

什么角度？怎么打开通道？

范德华力、氢键、静电相互作用.....进行能量预测。蒙地卡罗模型，与蛋白质三维结构建立有关。

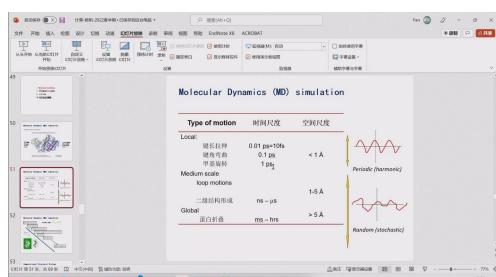
例如辣椒素与受体的结合，氢键决定其稳固性

蛋白蛋白相互作用：

有数据库提供了信号转导网络中蛋白蛋白结合方式。

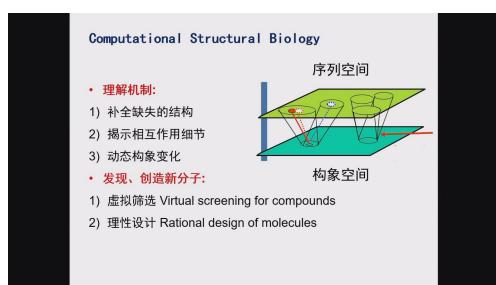
分子动力学模拟：

如何模拟在高于绝对零度的温度中动的模型？蛋白质变化的时间尺度？



给每个初始构象的一个位点/原子一个初速度，再用蒙地卡罗模型计算和预测每一个飞秒的变化。

例如voltage sensor 在电压下的运动。s4往上/下运动，带动通道开放



涉及靶向分子：虚拟筛选和理性设计

虚拟筛选：

工具：visual flow

流程：先确定靶向蛋白质的什么位点——在小分子库中一个一个放进去做分子对接——实际化学合成，生物筛选。

理性设计：

结构空间到序列的映射。

设计镇痛药物的思路：靶向trpv1的通道，疼痛通道，不是堵上而是让它打开更多，让它脱敏。

- 1) 让它能够匹配上去的钉子
- 2) 让它有一些氢键等相互作用力更加稳定

核磁共振

理解核磁共振的原理

核磁矩 (Magnetic dipole moments)

- 核磁矩以 μ 表示，存在绕z轴的进动
- μ 的种类量子数: $m_I = I, I - 1, I - 2, \dots, -I$
- 当 $I = 1/2$ 时, $m_I = \pm 1/2$

Precession 进动

H1, C13, C15常用的核磁共振的元素

能级和能级跃迁

氧原子上的氢是看不见的

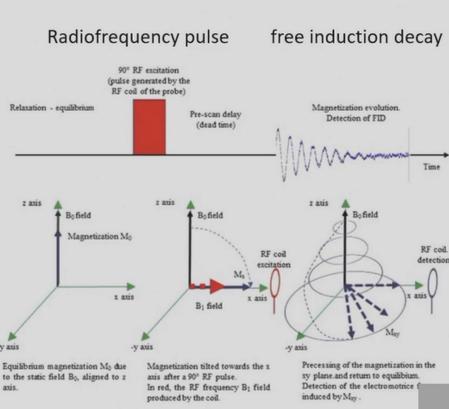
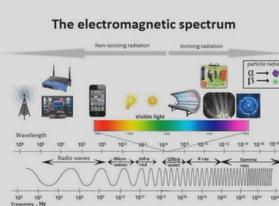
拉莫尔频率

拉莫尔频率 (Larmor frequency)

- 以电磁脉冲 ν 实现能级跃迁

$$h\nu = \Delta E = \frac{\gamma h B_0}{2\pi}$$

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$



核磁共振：给予一个电子脉冲，后来电子能级没有能量维持，就会衰

变，产生电磁波

傅里叶变换 (Fourier transformation)：任意周期函数可以分解成频率递

增的正余弦函数的和。

拟合给予的方波，在峰值无法很好拟合

时域 (time domain) : x轴为时间

频域 (frequency domain) : x轴频率, y轴振幅, 可以看什么频率的强度大, 对整合信号的贡献多

核磁信号的弛豫时间

弛豫时间常数决定核磁比分辨率

分子量越大, 弛豫时间越短, 分辨率越低, 所以核磁共振没法识别大分子

NMR电磁脉冲

sinc/pix, sinc函数

方波覆盖中央明纹, 二者呈倒数关系 (中央明纹才式有效的波段)

需要短而强的方波

NMR (核磁共振) 的设备情况

光源有特殊的要求, 加速器要求高

铁罐: 产生磁场, 样品 (溶液, 固体) 在磁场正中间

核磁共振的好坏与场强相关 (MHz, H₁核在磁场中; 800MHz是最低级的高端核磁共振)

盒子: 产生电子脉冲, 接受free induction decay的信号

一维核磁谱 (H₁)

化学位移 (Chemical shift)

电子屏蔽导致的化学位移变化

拉莫尔频率: 与gama, 磁场有关

δ : 样品拉莫尔频率-对照四甲基硅烷拉莫尔频率/核磁共振工作频率

影响化学位移的因素: 原子核的化学环境

H=电子屏蔽 标量耦合 偶极耦合

电子自旋产生的磁场抵消外加磁场, 电子密度 (H的电子云密度)

越高, 屏蔽的外加磁场越大, 电子屏蔽效果越强。高电子密度向四甲基硅烷 (右边, 高场) 移动。

苯环内部抵消外加磁场, 苯环外面加强外加磁场

苯环去屏蔽效应, 比卤素更靠左 (极性约弱越偏右)

H₁核磁峰面积: 代表同等地位的氢原子的数量/比例

核磁峰的分裂: 相邻碳原子上的左右氢原子数量+1

帕斯卡面积 (121, 1331) : 旁边的碳上的氢原子多, 分裂多

二维核磁谱

为了降低H₁核磁谱的复杂程度

cosy:

通过标量耦合: 三个以内的共价键耦合信号

对角线上每个峰代表一个氢原子

对角线以外的峰是交叉峰 (三个以内的共价键)

吡喃糖 (六碳糖) 的特征峰是左下角 (氧、羟基)

峰归属的确定

noesy (nuclear overhauser effect spectroscop)

偶极耦合: 通过空间

noe峰的强度与距离的六次方成反比（距离很近，才能有峰，峰越强）

六个氨基酸以内

蛋白质的二维NMR

氨基酸：从左到右：N上的， $\text{C}\alpha$ 上的，侧链C上的

蛋白质处于重水中

多肽主链上的HH耦合

上个C上的H和下一个氨基酸的N： $\text{NH}_{i+1}-\text{C}\alpha\text{H}_i(\text{noe})$

同氨基酸： $\text{NH}-\text{C}\alpha\text{H}$ (2D cosy)

上个氨基酸N上的H和下一个N上的H： $\text{NH}_i-\text{NH}_{i+1}(\text{noe})$

NH-C α H区域——这个区域每一个峰对应一个氨基酸

大多数对应一个峰

脯氨酸没有峰

甘氨酸有两个峰

$\text{NH}_{i+1}-\text{NH}_i$ ——说明两个氨基酸很近，说明此处可能有折叠结构

确定两个氨基酸是哪个氨基酸（交叉峰的归属）

NN峰和CN峰最重要

案例：牛胰酶抑制剂（左上noe，右下cosy）

起点在cosy的右下角CN区（舍弃了侧链区，四个轴都是N和C上的H），是46号K赖氨酸

前面一些部分的靠指纹谱——cosy区与上一个C

后面的N的交叉区，是自己的N和下一个N ($\text{N}_i, \text{N}_{i+1}$)

确定了左右峰的归属之后，去掉所有用过的峰（之前用过的所有峰都是依赖碳骨架的关系不依赖于空间构象的），剩下的峰都是依赖空间构象的

+J coupling确定二面角+范德华力……得到了一组构象（N端和C端的灵活部分有许多解）

解析二维结构：

隔一段靠的近，有规律， i 和 $i+4$ —— α 螺旋

i 和 $i+1$ —— β 折叠

HSQC（异核）：

偶联氢原子和与之相连的异核（N15和C13）同属于一个氨基酸——指纹谱

研究动力学（移动的峰有相互作用）

看蛋白和蛋白互作；翻译后修饰（消失的位点是被磷酸化的位点）

三位NMR（HSQC）

H1-N15-C13,保留C13的频宽，特定N上的C

单分子技术



掌握量子产率、荧光寿命的概念，荧光偏振、荧光共振能量转移、非天然氨基酸标记、共聚焦成像、全内反射荧光的原理，DNA拓扑学，B型双链DNA的结构特点，磁镊和光镊的原理、实验设计、结果分析



荧光极化、荧光共振能量转移、共聚焦、全内反射、磁镊、光镊的应用场景

单分子荧光

单分子荧光共振能量迁移

荧光发出原理：

荧光物质吸收光能或电磁辐射后发出光子

斯托克斯位移：

激发波长臂发射波长短，由于发光放热，发射光能量变小

量子产率：

发射光/激发光

荧光寿命：

当去掉激发光后，荧光强度降到激发时的荧光强度的 $1/e$ 所需要的

时间，称为荧光寿命，常用 τ 表示

荧光极化/荧光偏振：

荧光极化强度；对于完全静止的物体，光的方向是固定的， $p=1$ ；对于无限快速的物体，平行光与垂直光相等， $p=0$ 。

标记配体，因为结合前后 p 值改变大。

$IC50$ ：荧光变化一半的时候抑制剂的浓度

$$P = \frac{(F_{\parallel} - F_{\perp})}{(F_{\parallel} + F_{\perp})}$$

荧光共振能量转移（FRET）：

当第一个荧光物质（供体）发出的荧光与第二个荧光物质的激发光（受体）接近的时候，能诱发第二个荧光物质发出荧光。

供体与受体的荧光激发效率：与供体受体之间的距离有关，选择 R_0 比较接近的供体受体。 E 是效率。

$$E(r) = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

如何标记荧光？

非天然氨基酸标记：

识别空白密码子并加上非天然氨基酸，加上一个叠氮基；再向水中加入与叠氮基反应产生高能的带有荧光基团的化合物。

共聚焦显微镜：

光能照射的区域很小，意味着可以照到单分子

双色激光交替激发：DD，AD（无意义），DA，AA（xx的激发

光，xx的发射光)

荧光效率；化学计量参数

$$S = (I_{DA} + I_{DD}) / (I_{DD} + I_{DA} + I_{AA})$$

$$E = I_{DA} / (I_{DD} + I_{DA})$$

由E可以算出距离——发现RNA聚合酶的钳子呈现三种构象

那么是有三种聚合酶还是一个在动？长时间观察——全内反射

全内反射荧光TIRF：

固定RNA聚合酶

隐矢波激发荧光：

光线在界面处发生全内反射（光密到光疏中入射角大于临界值，折射消失全部反射）时，仍会向较低折射率的介质中投射一段很短的距离，一般在一百纳米左右，被称为隐矢波。隐矢波的电磁场沿界面法线方向迅速衰减。

CCD检测器可以检测光的强度和位置，可以观察多个分子，但是分辨率降低，时间分辨率较小。

得到结果：DD波谷，DA波峰，说明DA之间的距离在不断变化

DD波谷代表什么？DD远吗？不是，总能量恒定，

DD波谷表示能量传递给A。

E高，钳子合上。发现形成开链复合物之后，RNA聚合酶钳子关闭，转录延伸复合物不动，钳子关闭。

非达霉素将钳子锁定在开放构象，阻止转录。

STORM

纳米操作

磁镊

原理：根据衍射环的大小反推磁珠的高度

如何用磁珠检测DNA的解旋？

DNA一个螺旋10个碱基，两对之间距离3.5A。

DNA拓扑学：

linking number = twist (双螺旋的个数) +
writhe (超螺旋的个数)，不解开超螺旋linking
number就会不变，因此每打开一个负超螺旋就会减少
一个双螺旋，打开一个正超螺旋就增加一个双螺旋

应用：

每打开一个双螺旋上升/下降56A

正超螺旋：z比较小代表解旋，负超螺旋反之

为什么负超螺旋不连续？

DNA解旋时间远低于DNA闭合时间。负超螺旋帮助DNA解旋。维持更长解旋时间

检测转录机制：

1、转录泡不变大

转录起始

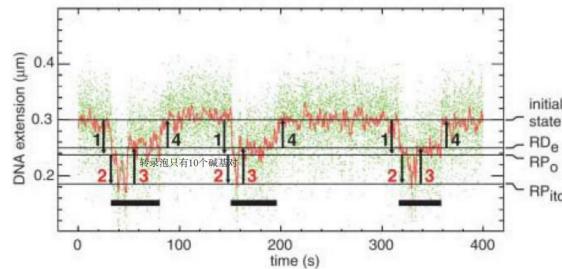
2、转录泡变大

转录延伸：先打开8个，又打开10个，突变小变成

10个碱基对恢复双螺旋，保持10个碱基对

1: 转录起始; 2: 转录泡变大; 3: 转录泡大小保持10个碱基对; 4: 转录终止

正超螺旋DNA



光镊

用光移动物体，将物体向焦点移动

如何用光镊研究RNA聚合酶的移动？

让光镊与转录产生阻力；控制平台让小球与光相对不变；看位移

如何减少噪音？

1、用氦气代替空气。由于空气流动有噪音，且噪音在低频，高频部分的噪音是由分子热运动造成的。

2、哑铃设计减少平台漂移的噪音

3、计算机控制力的大小相同，控制移动可以产生噪音。“被动力钳”避免“反馈环”的误差。

原子力显微镜

纳米孔

荧光标记技术

- ① 化学生物学及荧光标记技术
- ② 化学荧光标记技术
- ③ 非天然氨基酸标记技术
- ④ 抗体免疫荧光标记技术*
- ⑤ 荧光蛋白标记技术*
- ⑥ 显微镜的基础知识
- ⑦ 荧光标记技术的发展前景

一、化学生物学与荧光标记技术

分子探针与信号转导

二、化学荧光标记技术

荧光标记技术分类:

- 化学荧光标记技术
- 非天然氨基酸标记技术
- 抗体免疫荧光标记技术
- 荧光蛋白标记技术

化学荧光标记技术

荧光标记所依赖的化合物称为**荧光物质**。荧光物质是指具有共轭双键体系化学结构的化合物，受到紫外光或蓝紫光照射时，可激发成为激发态，当从激发态恢复基态时，发出荧光。荧光标记技术指利用荧光物质共价结合或物理吸附在所要研究分子的某个基团上，利用它的荧光特性来提供被研究对象的信息。荧光标记的操作简便，让荧光标记物质在蛋白的功能研究、药物筛选等领域有着广泛的应用。

最常用的：FITC

例子：钙离子探针（fluo-3，平时不发光，结合到钙离子才发光）；线粒体膜电位探针（用于细胞凋亡检测，线粒体膜通透性增高，探针释放发出荧光）

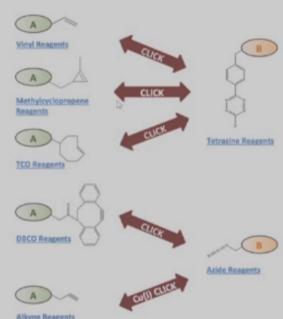
化学发光探针的缺点（藏在说明书里）

- 清洗（背景），不同人操作，结果不一样
- 观察时间限制
- 毒性

非天然氨基酸以及点击化学

点击化学原理

点击化学的原理是在一定环境条件（温和、含水）下，一对功能性基团彼此快速、有选择性地相互反应（“咔嚓”）。即两个相兼容的具有点击功能基团A和B被激活，被激活的两个分子形成稳定的偶联体。



点击反应后生成的氮杂唑基团具有**芳香环的稳定性**，不易分解，可耐受强酸、强碱，并能在多种氧化还原条件下保持稳定。因此点击化学广泛应用于多肽环化，DNA-多肽偶联，荧光染料标记等热点领域。

类型：有没有铜

抗体免疫荧光标记技术

荧光蛋白标记技术

初期：直接融合荧光蛋白

- 生物传感器的概念
- 荧光共振能量转移探针
- cpGFP技术: GCaMP
- 相变探针
- FlipGFP技术

1. 生物传感器的概念

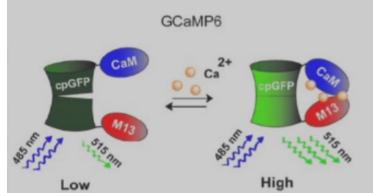
生物探针/传感器，通常以质粒DNA的形式被整合进细胞和器官中，然后利用细胞的转录和翻译机器表达成为一个有功能的生物传感器。这些传感器可以特异性的指示细胞内的离子，分子或者酶活性。

2. 一个好的生物传感器的金指标

- ✓ 检测内源水平的离子和酶活性
- ✓ 高分辨率的体内成像

FRET探针比较不清楚，相变探针相对比较清楚，肉眼就能看到将GFP打的比较松散，如果有钙离子就可以把上面两个基团连载一起，形成可发出荧光的GFP。

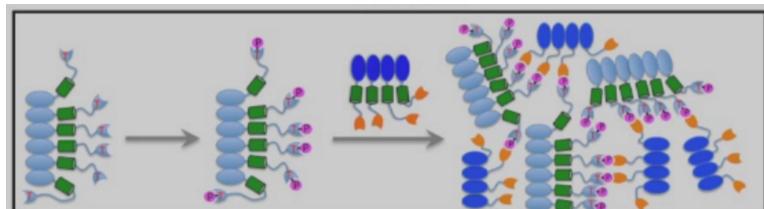
- 优势 vs 化学探针**
- 生理，实时（细胞水平类似）
 - **亚细胞定位**
 - 活体成像（发育，疾病）



荧光标记技术分类小结:

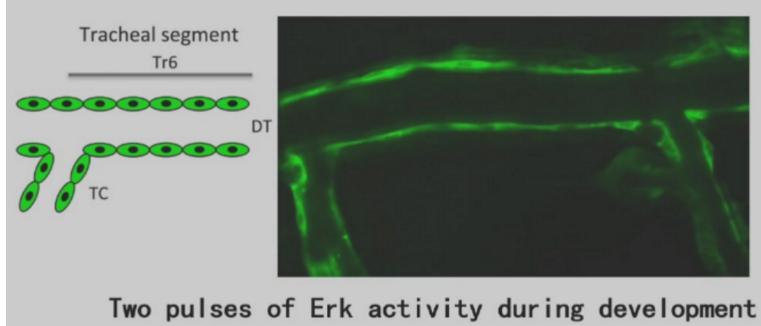
- 化学荧光标记技术（活细胞）
- 非天然氨基酸标记技术（活细胞）
- 抗体免疫荧光标记技术（**死细胞**）
- 荧光蛋白标记技术（活细胞）

相变探针:



spark探针最亮的探针

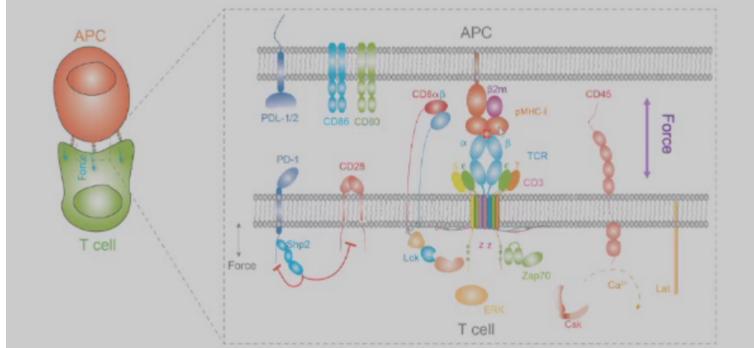
相变探针应用举例2# 追踪果蝇气管内干细胞的ERK激酶活性



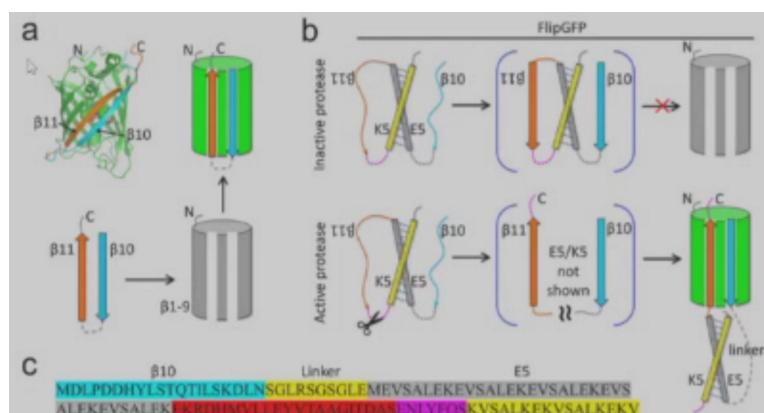
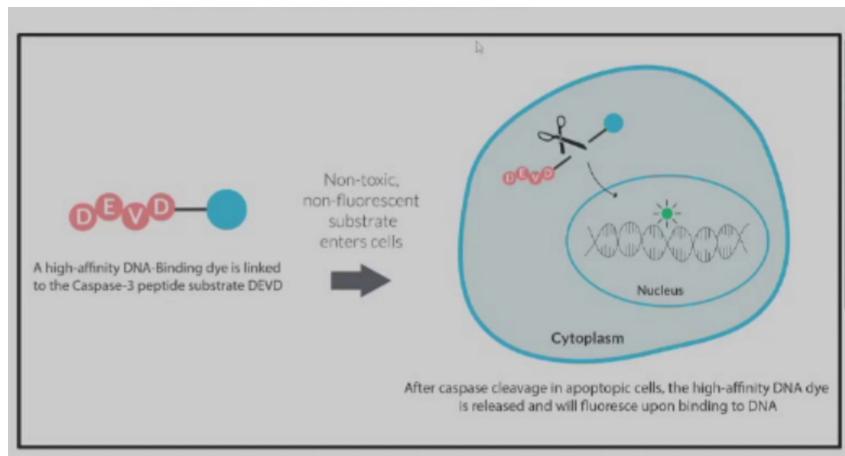
Two pulses of Erk activity during development

T细胞激活的标准是LCK的活性上升

Mechano-Chemo regulations on cross-membrane TCR triggering and T-cell activations



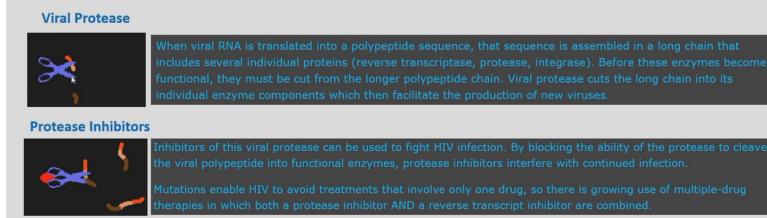
水解酶探针技术 (考点)



把水解酶针对的位点放在10和11连接链之间，释放11就能使得11结合到GFP-2然后发光。

问题，考点

- FLIP-GFP病毒探针的工作原理是？
- FLIPGFP技术的病毒药物筛选为什么不需要P3实验室？



Cell-Based High-Throughput Screening Protocol for Discovering Antiviral Inhibitors Against SARS-CoV-2 Main Protease (3CLpro)

Hussin A. Rothan¹ · Teow Chong Teoh²

电生理

电生理定义

以多种形式的能量（电、声等）刺激生物体，测量、记录和分析生物体发生的电现象（生物电）和生物体的电特性的技术。可以测量生物电，得到电阻、电容、电感。只有测量心电图脑电图和肌电图，因为这些是可兴奋细胞。

电生理发展史

细胞外记录

主要记录突触可塑性。

海马之所以作为研究对象，是因为海马中锥体束的神经元排列整齐。

心电图脑电图。

是把引导电极安放在神经组织的表面或附近引导神经组织的电活动。由于活动部位的神经元产生去极化，未活动的部位处于正常极化状态，在容积导体中的两部位间电位不同，电流从一点流向另外一点。放置于细胞表面的电极就会记录出两者之间所产生的电位差。

细胞内记录

肌电图

可以记录膜电位的变化，利用胞内和胞外的电位差。

细胞内记录是用一个传导媒介（如用电解液灌注吸管，例如1-3 M KCl）以最小限度的损害插入细胞膜。由于细胞内（插入点）和胞外反应点的电位不同，以记录细胞内发生的电生理变化。目前仍然是研究神经信号传递的主要方法。

膜片钳记录

原理：电压：一个通道放出多少电压，几个通道就放出几倍电压，通道打开，电流改变电压下降，就给他补偿多少电压，使得膜电位维持平衡。补偿的电流。保持电流不变

设备：显微镜（能看清纳米级级别）；微操作系统；给药（激动剂、拮抗剂等等）；防震台

操作：

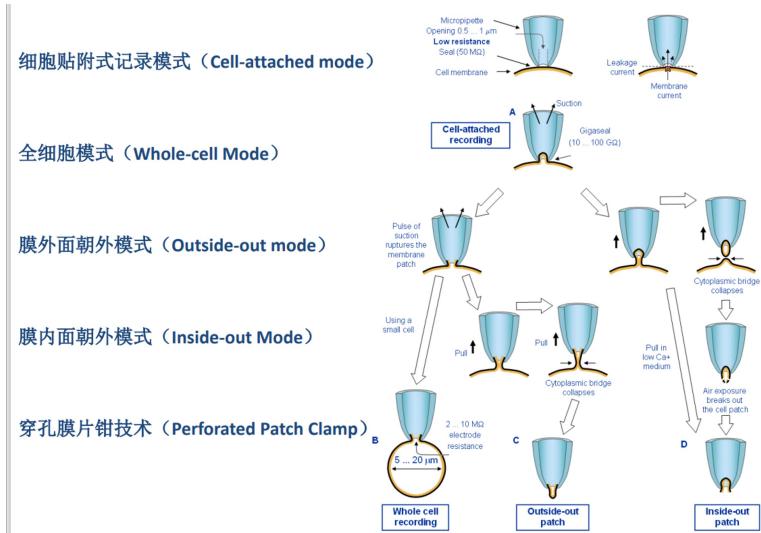
电机拉制

冲灌电极内液

形成吉欧分接

记录电信号

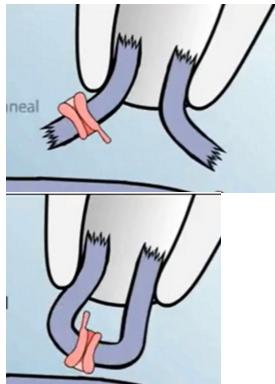
记录方式:



贴附式

全细胞: 吸破, 电极和包浆可以发生交换, 改变外环境 (比如加入激动剂等小分子), 电压大。

膜外面朝外: 全细胞基础上, 把膜拎起来形成小囊泡, 改变胞外环境来记录。一片膜, 膜的外面朝外。



膜内朝外: 可以记录细胞内环境对离子通道膜电位的改变

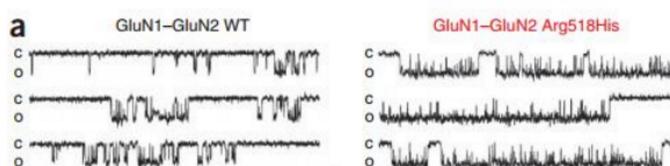
穿孔膜片钳

应用:

例与荧光技术结合: 可以看到配体给体等对离子通道激活的影响, 看到电流的改变。荧光可以观察到构象的变化。膜片钳可以看离子流。子: 看突触前膜和后膜的强直刺激对其兴奋性的影响 (频率和幅度)

与疾病关系的例子:

NMDA受体GluN2A突变引发癫痫



EA2型疾病Cav2.1亚基各种突变位点的二维示意图

先天性的血胰岛素过多症 congenital hyperinsulinism (CHI)

一个氨基酸从负电 (谷氨酸) 变成了正电 (赖氨酸) 造成通道直接失效

蛋白质结构

生物分子间相互作用

氨基酸基本性质和二级结构特征

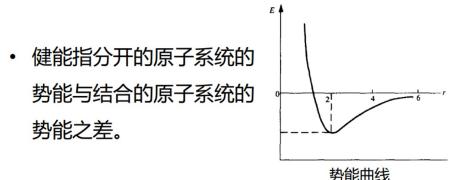
蛋白激酶的结构

分子间和分子内相互作用

- 两个粒子的吸引力 $E_1 = \int_{\infty}^r \frac{q^2}{r^2} dr = \frac{-q^2}{r}$

- 两个粒子的斥力 $E_2 = be^{-r/a}$

- 两个粒子体系的势能 $E = E_1 + E_2 = \frac{-q^2}{r} + be^{-r/a}$



强相互作用：共价键，配位键，离子键

共价键：CH1.09；CC1.54；CO1.43；

二硫键：长度2a，固定结构，感受氧化还原环境，s-s桥

共轭：pi键堆叠

离子键：异号氨基酸。天冬谷，赖精组，容易收到ph影响

配位键：

弱相互作用：氢键、范德华力、疏水相互作用、离子（？），多肽链折叠

氢键：电负性原子（氧、氮）和氢，长度2.5/3.5a

弱相互作用：疏水残基倾向于形成簇，排水，这是蛋白质折叠的驱动

力。ACVFLIM（脂肪族除去甘，芳香只有苯丙氨酸，别的有N或者OH，含硫氨基酸）

范德华力：

来源：两个极性基团、一个极性基团和一个非极性基团或两个非极性基团之间的弱静电相互作用。

力的大小与 r^6 成反比，但是太近会排斥

范德华半径：是吸引和排斥的平衡

Atom	van der Waals radii (nm)
Hydrogen	0.120
Oxygen	0.152
Nitrogen	0.155
Carbon	0.170
Sulfur	0.180
Phosphorus	0.180

pi键

中间带有正电，两边带负电

离子键

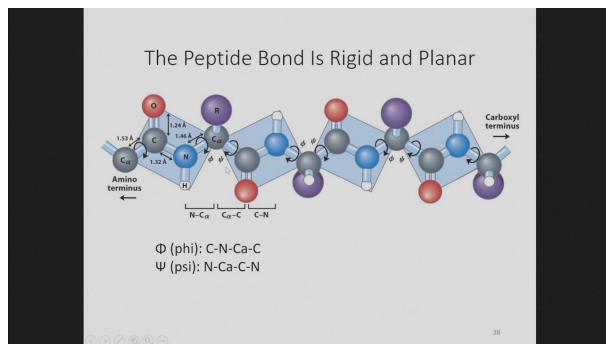
解离的带电基团

氨基酸的结构

一级

肽平面，肽键有双键的性质

c_nf_i角； c_c p_eth_y角



二级结构

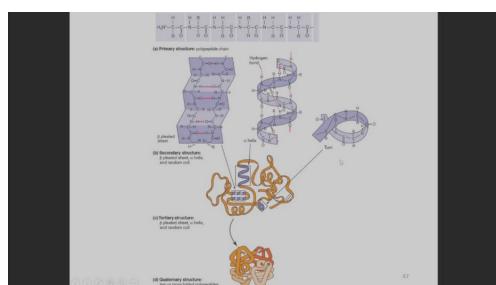
a: 一个螺旋3.6残基，上下距离5.4Å, $i+4$; n上h和c上o形成氢键（主链肽键之间的氢键相互作用）

b: 两条平行链之间co和nh形成氢键

b turn

三级结构：疏水相互作用

四级结构：多个亚基



生化机制：磷酸化去磷酸化

磷酸基团带负电，一团负电，给予一个化学信号

磷酸化基团：st_k

激酶是仅次于g蛋白偶联的第二大家族

loop是结合位点。

lobe叶，N lobe b折叠，有一个a螺旋；c lobe a螺旋。

催化基团：D166，可以直接极化KST，使得oh极化

有一些稳定atp的基团

activation segment，激活片段，KS等被磷酸化的位点

磷酸化之后变得有序，底物结合位点就空出来了

蛋白激酶通过识别受体周围的序列识别结合位点：

st_k激酶识别的序列特征很多都是带正电 (r) ; k激酶很多带负电 (e, d)

提供发病机制

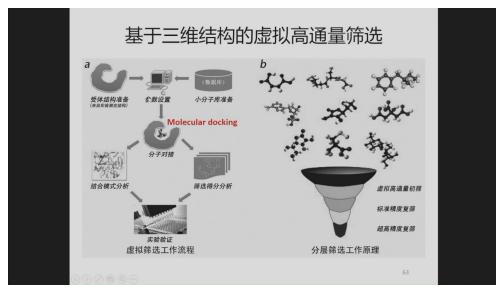
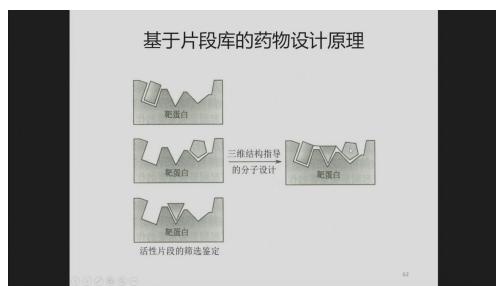
多囊肾病：pkd1/2结合的通道蛋白突变导致的，异源四聚体是没有功能的通道

pkd1限制过多pdk2形成有功能的四聚体

指导药物设计（了解）

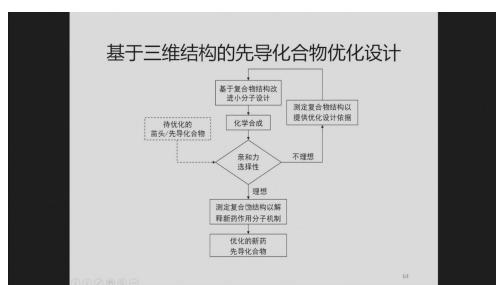
基于聚焦库的设计，聚焦于某些蛋白（激酶）和结构域

基于片段库的设计



可以先筛选出比较少的可能性分子

初筛稳定性，最后还是需要经过实验验证



看一下教材！！

基于结构的药物设计策略

- WZ-4002的骨架设计采用了2-氨基嘧啶内核，可以与EGFR激酶形成两对氢键，增强小分子结合能力；
- 与老一代抗-EGFR小分子药物Iressa和Tarceva相比，WZ-4002去掉了会与M790侧链发生抵触的4-苯胺取代基，因此它结合于EGFR T790M时不会与M790发生空间抵触；
- 嘧啶第5位氢原子用氯原子取代，这个氯原子和M790侧链上的硫原子会发生相互作用促进小分子结合，因此这一小分子对T790M的亲和力比对野生型EGFR的亲和力高；
- WZ-4002被设计为一个不可逆型抑制剂，它可以与EGFR的ATP结合口袋边缘的C797侧链的巯基发生化学反应，共价连接到EGFR上，由此可以逐步消耗掉所有EGFR激酶，使ATP再也无法结合到激酶上，这一策略可以解决ATP对EGFR T790M结合能力增强的问题；
- 嘧啶的2-苯胺取代基上的邻位甲氨基增强了抑制剂的选择性。

课后阅读：参考教材《医学生物物理学》P33：结构生物学指导抗-EGFR L858R/T790M/C797S耐药性突变新抑制剂EAI045的研发

67

1和激酶掌握；其他了解。

总结

1. 蛋白质结构基础

- 蛋白质晶体学和冷冻电镜技术发展的标志性事件
- 强相互作用
- 弱相互作用
- 二十种基本氨基酸的基本性质
- 主要的二级结构的基本特征

2. 蛋白质结构生物学与医学

- 蛋白激酶基本的结构特征
- ADPKD的主要突变致病基因，结构揭示的致病机理
- 基于蛋白质结构进行药物设计的主要方法

物质的跨膜运输

离子通道和离子转运蛋白

跨膜运输通过蛋白，降低自由能，原本要克服一个疏水相互作用，就需要比较大的能量，通过亲水的蛋白来降低这个能量。

离子通道和直接跨膜的小分子是被动转运，主动转运分为初级（直接依靠ATP）和次级（依靠另一个离子的跨膜浓度差，势能，转化成ATP的能量）

离子通道是打开了之后可以通过一群离子，转运蛋白是一个一个转运，结合、释放。像推拉门和旋转门。

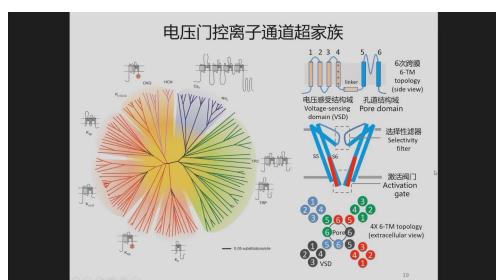
钠钾离子通道结构特点和门控机制

小分子结合激活。掌握门控分类。

离子通道的分类

- | | |
|------------|------------|
| 按离子的选择性： | 按门控机理： |
| • 钾通道 | • 电压门控离子通道 |
| • 钠通道 | • 配体门控离子通道 |
| • 钙通道 | • 机械力敏感通道 |
| • 氯通道 | |
| • 非选择性离子通道 | |

56个亚基组成一个孔道，上面有一个选择性滤器，决定了什么能进去；下面是阀门，决定什么时候能进去。



钾通道：

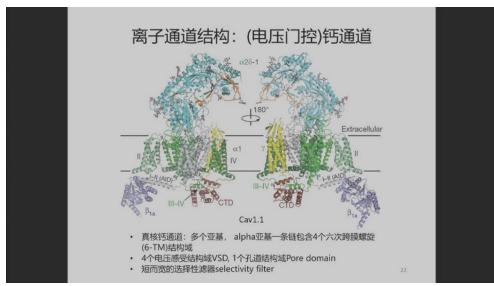
四聚体；VSD；pore domain；selectivity filter

钠通道：

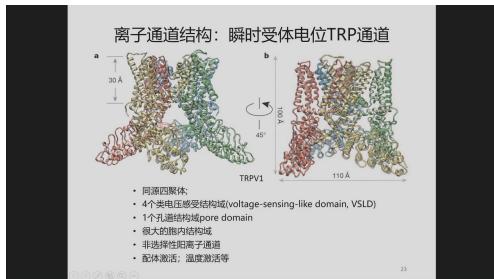
原核：VSD和PD都一样，选择性滤器比较宽短

真核：a链有6*4次跨膜螺旋；b链一次跨膜螺旋

Ca通道：



trp通道



分辨率革命

量化离子通道选择性

给定内外离子浓度带电荷数量相等，在电压为0的时候，两边离子相同，跨膜电流也应该是0。如果把na换成rb，给定电压为0的时候，电流还是正（从内往外流），说明离子通道乐于让na+经过，直到-20，rb才开始流入，离子通道对na选择性高于rb，cs高于rb。

反转电压。

钾离子通道选择性滤器 (理解, 记住)

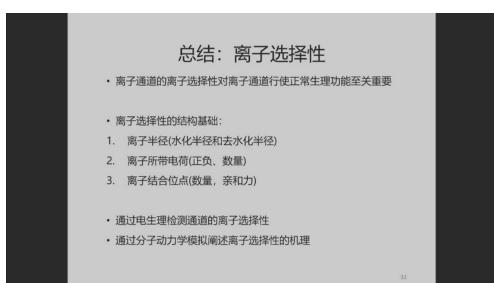
四亚基。

TVGY/FG motif, 羧基氧都指向中心, 四个位点。高度保守。

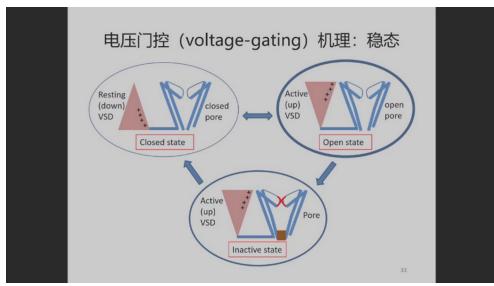
k和o距离3A左右。离子有水化半径, co代替水配位k, 一个k, 8个o。在通道中移动耗能小, 化学环境相似。进来一个出去一个。

na进入需要脱出四个水, 但是通道提供的氧不足以取代四个水, 比如只能与一边的氧结合。需要克服比较大的自由能。

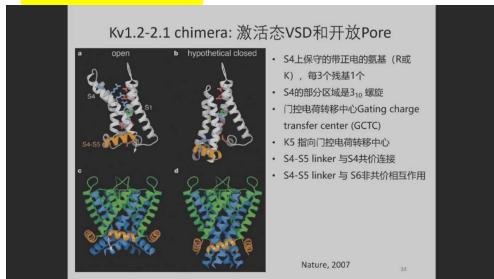
了解性: 必须要四个位点才能选择; 亲和力不一定相同。但是一定有2个高亲和力位点。同时结合, 才能形成比较大的电流, 有助于通过。



电压门控机制



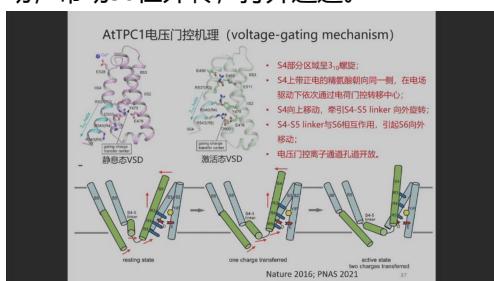
钾离子电压门控要记忆



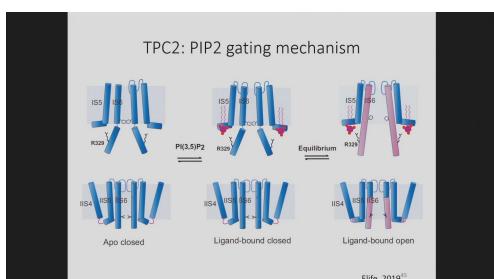
带正电的都在同一侧

两个亚基，每一个是 2×6 个跨膜螺旋

s4在电压带动下向上移动（指向中心的从k3变成k5），带动s4-s5linker转动，带动s6往外转，打开通道。

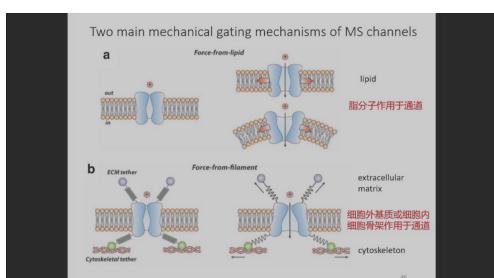


配体门控



两个柔性区合成了一个。开放

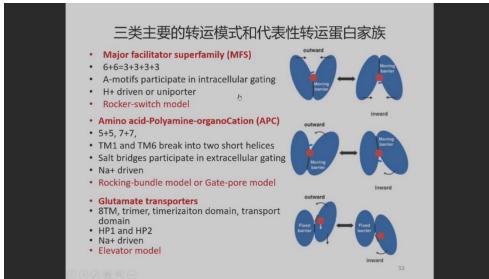
机械力敏感



脂分子表面张力，弯曲就开放了通道。

给细胞外基质施加力，细胞外基质与离子通道相连，直接拉开

转运蛋白



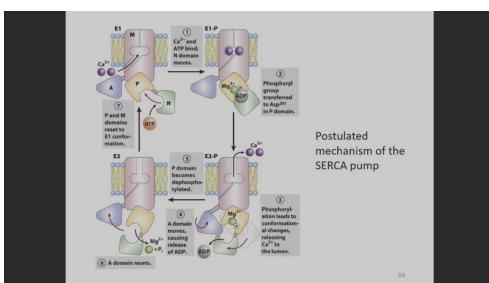
glu转运蛋白与 离子通道蛋白的区别

ABC转运蛋白 (ATP结合的转运蛋白)

pdp1: 容易将抗癌药物转移出来。抑制这个通道的作用。

ctfr: 囊肿纤维化的隐性突变基因

npa domain跨膜区。



nak泵的工作意义，维持膜电位，维持浓度梯度，后面的钠通道和钾通道的工作才有意义。膜蛋白的内参。

线粒体

第二节 线粒体的结构和能量代谢																																																											
线粒体膜的脂类构成																																																											
富含心磷脂 (Cardiolipin)																																																											
心磷脂又称双酰胆碱甘油，是潘伯恩1941年从新鲜的牛心脏中分离出来的，心磷脂主要存在于动物细胞中线粒体的内膜，15%的心磷脂存在于心肌。																																																											
心磷脂 疏水性强 ，这一特性使内膜通透性和流动性比较低，利于保持呼吸链复合物的构象。																																																											
Table 1 Lipid composition of subcellular fractions of rat liver.																																																											
<table border="1"><thead><tr><th></th><th>Mitochondria</th><th>Endoplasmic reticulum</th><th>Lysosomes</th><th>Golgi</th><th>Plasma membrane</th></tr></thead><tbody><tr><td>Stearoylglycerol (mg/g lipid)</td><td>0.003</td><td>0.014</td><td>0.028</td><td>0.028</td><td>0.108</td></tr><tr><td>Phosphatidylcholine</td><td>44</td><td>60</td><td>48</td><td>21</td><td>40</td></tr><tr><td>Phosphatidylethanolamine</td><td>34</td><td>23</td><td>17</td><td>21</td><td>24</td></tr><tr><td>Phosphatidylserine</td><td>5</td><td>50</td><td>5</td><td>12</td><td>5</td></tr><tr><td>Phosphatidylinositol</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>6</td><td>9</td></tr><tr><td>Cardiolipin</td><td>14</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr><tr><td>Phosphatic acid</td><td><1</td><td>1</td><td>1</td><td><1</td><td>1</td></tr><tr><td>Sphingomyelin</td><td>1</td><td>2</td><td>24</td><td>8</td><td>17</td></tr></tbody></table>							Mitochondria	Endoplasmic reticulum	Lysosomes	Golgi	Plasma membrane	Stearoylglycerol (mg/g lipid)	0.003	0.014	0.028	0.028	0.108	Phosphatidylcholine	44	60	48	21	40	Phosphatidylethanolamine	34	23	17	21	24	Phosphatidylserine	5	50	5	12	5	Phosphatidylinositol	1	2	3	6	9	Cardiolipin	14	1	1	1	1	Phosphatic acid	<1	1	1	<1	1	Sphingomyelin	1	2	24	8	17
	Mitochondria	Endoplasmic reticulum	Lysosomes	Golgi	Plasma membrane																																																						
Stearoylglycerol (mg/g lipid)	0.003	0.014	0.028	0.028	0.108																																																						
Phosphatidylcholine	44	60	48	21	40																																																						
Phosphatidylethanolamine	34	23	17	21	24																																																						
Phosphatidylserine	5	50	5	12	5																																																						
Phosphatidylinositol	1	2	3	6	9																																																						
Cardiolipin	14	1	1	1	1																																																						
Phosphatic acid	<1	1	1	<1	1																																																						
Sphingomyelin	1	2	24	8	17																																																						
Lipids of mitochondria, 2013																																																											

流动性低，稳定性高，有助于线粒体膜上的蛋白质工作。

线粒体膜有水化力，互相排斥，避免膜结构的相互融合（一种说法）

含有DNA，突变导致运动不耐症。

外膜：脂质组成与细胞膜类似。

标志性酶：单胺氧化酶。降解色氨酸，多巴胺，肾上腺素。——线粒体在神经细胞中重要

外膜孔道： β 孔蛋白。控制进入线粒体的蛋白大小。孔聚集，使得DNA暴露，调控线粒体的死亡。

间隙：6-8nm，蛋白都比间隙大。

标志性没：腺苷酸激酶

内膜：呼吸链和atp合酶。

标志性酶：色素氧化酶。

组成：心磷脂占0.2。高度不通透性，形成H浓度梯度，是氧化磷酸化的基础。

转运系统：tom40（主要孔）、70、20.....

想看见线粒体，就是标记tom40家族

能量代谢：化学渗透学说。质子浓度梯度，通过atp合酶流进来，让它转动，从而促进atp合成。atp合酶是二聚体，转动工作。（FOF1-atp的旋转催化和结合变构）

二甲双胍减少细胞中的atp，因此合酶转动慢一点好一点。

线粒体的可以在50度工作

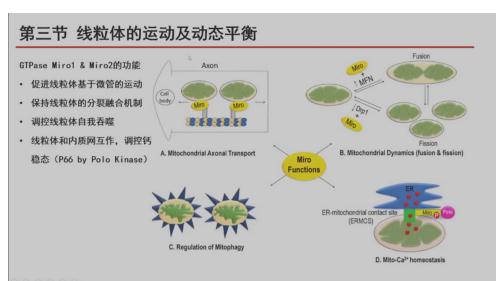
线粒体动力学

运动就会造成线粒体的运动，迁移、分裂融合.....自噬、与细胞器的互作。

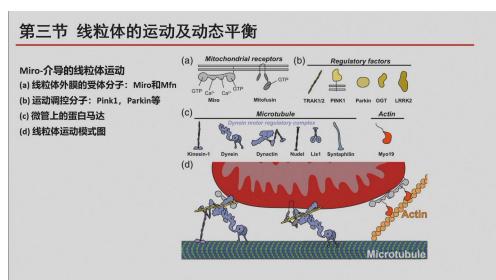
考点：

重要分子：miro1/2，是gtpase，在微管上拉着线粒体运动。突变线粒体不运动，致死。

消耗ca和gtp。内质网和线粒体的交流是为了交换ca。



miro运动，与别的蛋白互作。



功能：呼吸缺陷，生殖缺陷，退行性疾病，衰老.....

上游原因：修复损伤；保持健康

只和膜电势相同的融合。

damage：环境；突变；ROS（漏电）

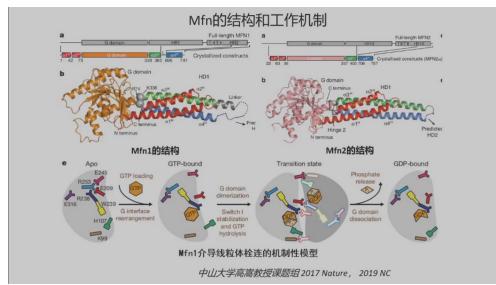
需要长期积累，parkin

造模：ROS导致氧化损伤——鱼藤酮（呼吸链复合体I的抑制剂）强烈分裂，加入的浓度和时间

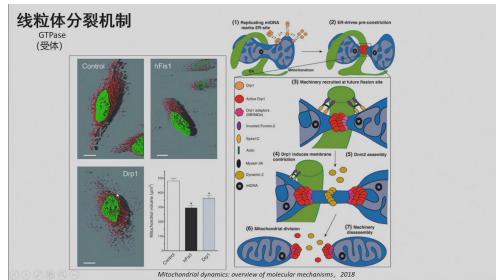
融合和分裂（记住几个分子）

外膜融合: mfn1 (gtpase, domain)

内膜: opa1



分裂: drp1记住 (有临床突变)



与疾病:

drp突变, 使得线粒体产能有问题。在146 (! ! !) 位点产生点突变, 使得gtpase功能失去, 不能分裂。

动态平衡

自噬: 为维持细胞的正常活动状态, 受损伤或不需要的线粒体需被及时清除掉。其中磷脂与蛋白质的质量为细胞通过自噬机制选择性地清除受损伤或不需要的线粒体, 这一过程被称为线粒体自噬 (mitophagy)。(控制质量膜电位, 清除损伤)

通过线粒体自噬受体蛋白, 发送自噬信号。

parkin可以找到膜电势低的蛋白。

自噬生理意义: 防止损伤的线粒体产生ROS损伤细胞; 质量控制, 维持细胞年轻, 防止老化的线粒体使得氧化磷酸化酶的功能削弱; 自噬失调会导致神经元疾病 (为什么多巴胺神经元会丢失)

细胞器互作

线粒体与内质网:

大部分线粒体分裂在内质网附近

内质网的节点可以把线粒体勒断

膜接触位点 (MAM) 考点:

1、物质交换 (与线粒体: 磷脂、钙离子, 调节三羧酸循环; 所有: 胆固醇, ATP, 蛋白质, 蛋白酶体, 神经酰胺)

2、线粒体分裂

通过β桶vdac等三个进行接触

接触位点的厚度对交换物质的种类有关, 薄的lipid, ca; 20, ca; 30, 没了。

疾病：神经退行性疾病 (TAU蛋白，线粒体产能与tau蛋白有关)

阿尔兹海默：tau，调控围观形成

过度磷酸化tau蛋白

与融合分裂运动都有关系

帕金森：parkin——多巴胺神经元

磷酸化能够找到需要被自噬的线粒体。cys突变，对感受氧分压有作用。突变

导致其过度聚集形成固体，主要在高尔基体附近？

运动性：TDP43

总结：

组成：

酶：

外膜：单胺氧化酶

间隙：腺苷酸激酶

内膜：色素氧化酶

磷脂：

内膜心磷脂多，硬

转运蛋白：

tom40

动力学：

运动：miro1/2

融合：miro+MFN/OPA1

分解：miro+drp (146位点)

都是gtpase

自噬：parkin

细胞器互作：

MAM膜结合位点：

物质交换和线粒体分裂

自由基

自由基种类：

氧自由基：

超氧阴离子自由基

羟自由基

烷氧基

烷过氧基

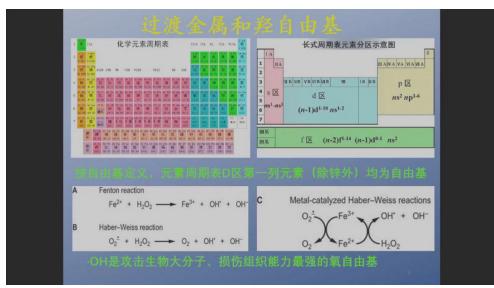
氮自由基：

onoo-与羟自由基相似

自由基喜欢去抢电子，抗氧化物主动给电子。

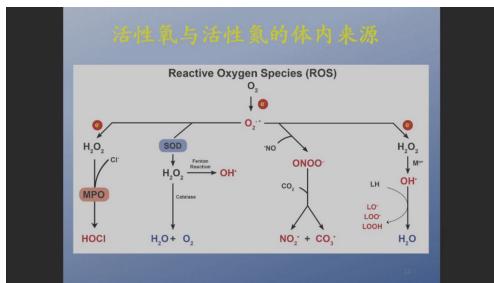
过渡金属也是自由基。

fenton反应：反应速度慢



二价铁+双氧水=三价铁+羟自由基

双氧水是活性氧，不是自由基



活性氧可以被鉴别

活性氮: NO , NO_2 , NO_3^- , ONOO^\cdot (与羟自由基相似)

硝基化修饰导致蛋白质剪切出错，造成损伤

活性氧和活性氮的生成 (重点)

目的：内在质量保持和外来病原体清除

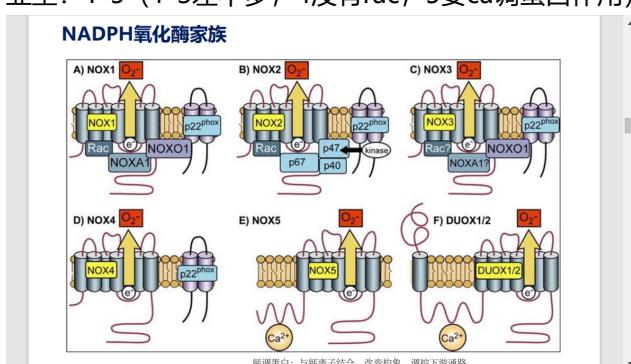
1、NADPH酶 (最重要，考点)

与外界有关：诱导性，受到外界刺激才产生活性氧

gp91 (催化反应的发生)、p22核心元件

调节组分：p47、67、40, rac (不同亚型组装不同，还有一些不需要rac，需要ca)

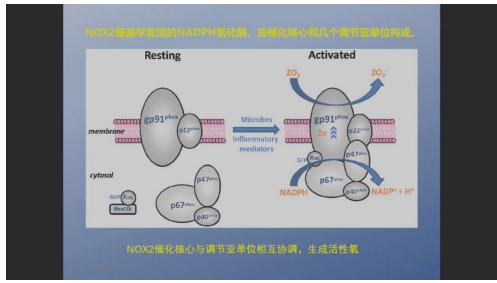
亚型：1-5 (1-3差不多，4没有rac，5要ca调蛋白作用)



核心功能：从内到外传递电子，形成超氧阴离子，特异性针对NADPH，

静息状态2+3亚基分开，2在微膜上的。3游离在包浆中，rac静息和gdp结合

(失活，是G蛋白激酶)；激活后组装形成，正向调节需要磷酸化修饰，rac与gtp结合，三个辅助因子 (FAD+2血红素，不是从血红素内过去的，是绕过的)



2、线粒体：主动型



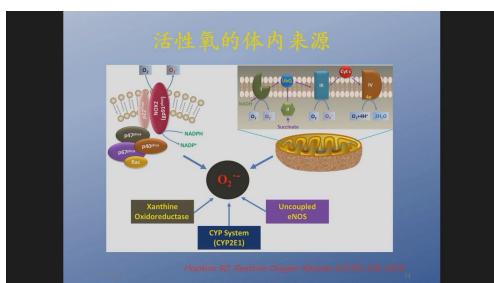
电子漏：

氧气在还原的过程中接受的电子不对等，形成活性氧，例如形成了超氧阴离子自由基

3、黄嘌呤氧化酶 (XO)



可以通过雌黄和黄的切换，不断产生活性氧。



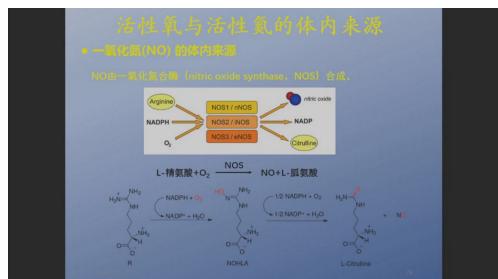
活性氧感受：

过氧化氢：蛋白甲基化修饰；直接作用于蛋白；作用于离子

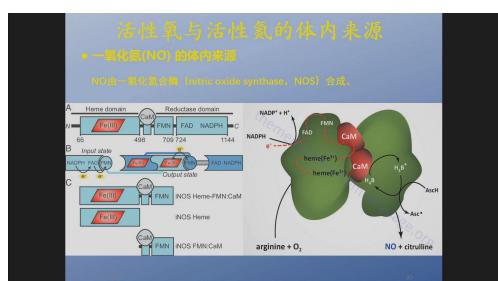
通道: trpm2, 可以被过氧化氢直接激活, 产生电位变化, 引起胞内Ca²⁺稳态变化。

活性氮来源:

一氧化氮: 一氧化氮合酶nos (重要)



精氨酸带正电, 先在nos下上一个羟基, 进一步氧化加上羰基, 产生瓜氨酸和NO



两个亚基; 还原区FAD、FMN; 氧化区heme, 将电子传递给精氨酸, 最后产生NO+瓜氨酸

自由基与生命过程

氧自由基

1、病毒清除

2、信号转导: 氧化修饰和直接作用 (PI3K, AKT等等)

生长因子通过磷酸化促进nox产生ros

氮自由基

活性氮信号转导

na-k atp酶: 转运3na (出去) 2k (进来), 转运能力很强, 1min转运

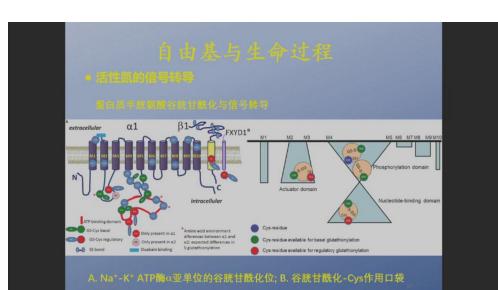
1500-10000次离子。

cys谷胱甘酰化

有很多cys, 疏基不稳定, 容易反应。a、b、fyd1。a主要, 其余两个辅助。

基础态 (维持蛋白质正常结构, 和酶调节无关) 和调节态, 构象改变调节态才能翻出来反应。

b亚基的一个cys在动与离子转运偶联



NMDA调控nos生成no，作用于下游受体.....

01:11:08

抗氧化

超氧化物歧化酶 (SOD)

锌离子没有催化作用。cu通过的电子，让超氧阴离子变成氧气或者过氧化氢。

突变导致als渐冻症脊椎侧索硬化

机体抗自由基防御系统

- 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)

超氧化物歧化酶于1968年被发现，其功能是移除细胞中的 O₂⁻。真核细胞系统有Cu-Zn-SOD和Mn-SOD，原核系统有Fe-SOD。

Cu-Zn-SOD的催化反应如下：

$$\begin{array}{c} \text{E-Cu}^{2+} + \text{O}_2^- \longrightarrow \text{E-Cu}^+ + \text{O}_2 \\ \text{E-Cu}^+ + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{E-Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \\ \text{总反应: } \text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 \end{array}$$

酶中的铜离子在反应中起交替氧化/还原作用，Zn无催化功能，起稳定酶的作用。

SOD催化的反应产物是H₂O₂，因此该酶清除活性氧的有效功能必须依赖其他酶对H₂O₂的清除。

过氧化氢酶

谷胱甘肽 (GSH)

谷胱甘肽过氧化物酶：将过氧化物还原为氧化物，产生GSSG

谷胱甘肽还原酶：利用NADPH将GSSG还原为GSH，维持GSH/GSSG平衡

机体抗自由基防御系统

- 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxide)

催化H₂O₂或有机过氧化物还原为相应的醇，同时将GSH变为GSSG。
其催化的反应式如下：

$$\text{ROOH} + 2\text{GSH} \longrightarrow 2\text{ROH} + \text{GSSG}$$
- 谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase)

谷胱甘肽过氧化物酶的表达使GSSG增加，为了保证机体GSH/GSSG的恒定比例，有多种机制维持GSH在恒定的高水平，其中之一是谷胱甘肽还原酶。
其催化的反应式如下：

$$\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{GSH}$$

维生素c亲水，在胞质；维生素e亲脂，在包膜；类黄酮，酚羟基；金属

(zn, xi)

机体抗自由基防御系统

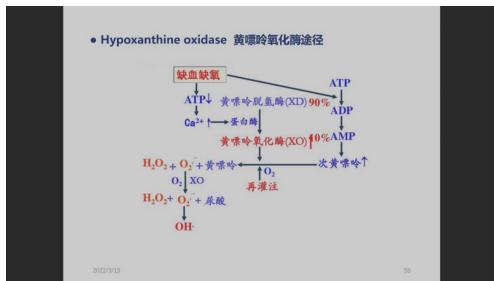
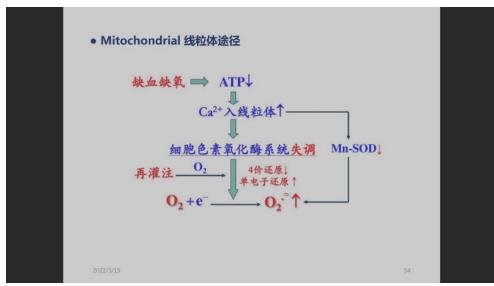
- 低分子抗氧化物质
 - 1. 铁蛋白与过氧化物酶
 - 2. 还原型辅酶Q₁₀ (UQ₁₀)
 - 3. 维生素E
- 膳食中抗氧化物质
 - 1. 维生素E
 - 2. 维生素C (抗坏血酸)
 - 3. 胡萝卜素
 - 4. 类黄酮 (主要是酚羟基发挥抗氧化功能，儿茶素)
 - 5. 全谷 (硒和锌)

在肿瘤环境中，ROS过少不好。要保持活性氧的平衡。

氧化应激

活性氧失调，但是不同器官氧化应激不同。

缺血再灌注损伤



膜生物物理学

· 膜生物物理学：

生物膜将细胞内液和细胞外成分隔开；可以吸收周围的营养物质，将废物排出
 生物膜的**结构特点**：脂类和蛋白质以非共价键相互作用结合，流动体系；连续双分子层；具有双亲性(hydrophilic head; hydrophobic tails)；各组分分布的不对称性（功能方向性）

生物膜的**功能**：功能活动区域化 (compartmentalization)；跨膜运输 (选择透性)；化学信号传递 (信号转导/突触) 与能量转化 (线粒体)；细胞识别 (受体配体)

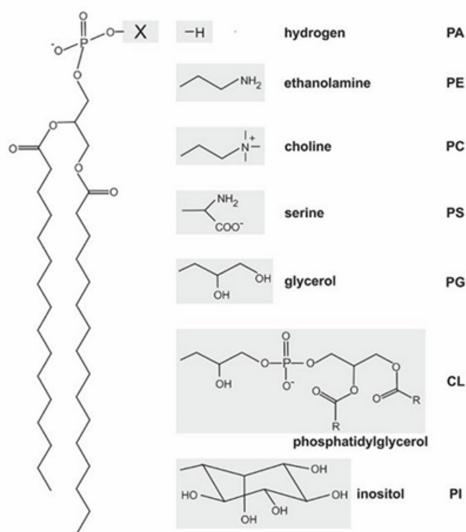
液体镶嵌模型(the fluid mosaic model)：膜结构的流动性，膜组分的不对称性，膜蛋白的不同镶嵌方式；未考虑蛋白质对流动性影响以及局部流动性差异。

脂筏：脂膜上富含胆固醇和鞘磷脂 (SM) 的结构区，聚集特定蛋白 (能发生构象变化)，流动性较差，周围是富含不饱和磷脂的高流动性液态区

生物膜：生物体内所有膜结构的总称。封闭的有选择透过的屏障。细胞膜：4~10nm

影响流动性：脂肪酸链不饱和程度与长度；胆固醇的固定；**卵磷脂与鞘磷脂比例 (正比)**；膜蛋白影响；温度、PH、离子等

温度变化使脂双层在凝胶态和液晶态之间转换 (相变温度，以上为液晶态)



脂类: phospholipid, sterol, glycolipid

磷脂: 甘油磷脂, 鞘磷脂

PE: 磷脂酰乙醇胺 (脑磷脂, 极性, 链短小, 膜薄)

PC: 磷脂酰胆碱 (卵磷脂), 带正电

PS: 磷脂酰丝氨酸 (带负电, 羧基)

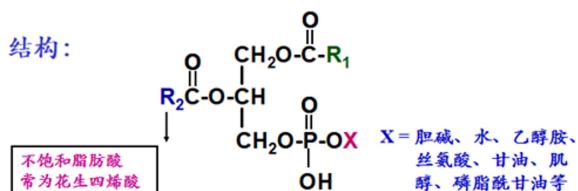
CL: 心磷脂, 双磷脂酰甘油 (比较硬、厚)

PG: 磷脂酰甘油, 极性、亲水

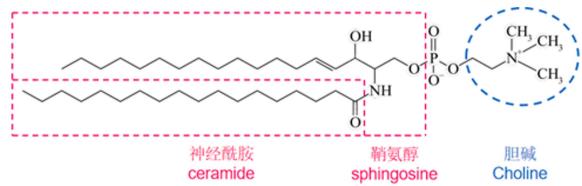
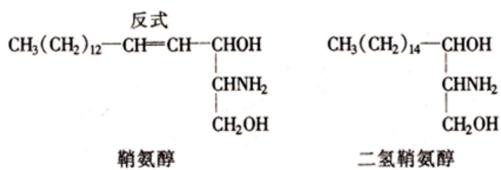
PI: 磷脂酰肌醇

鞘磷脂: 比较硬

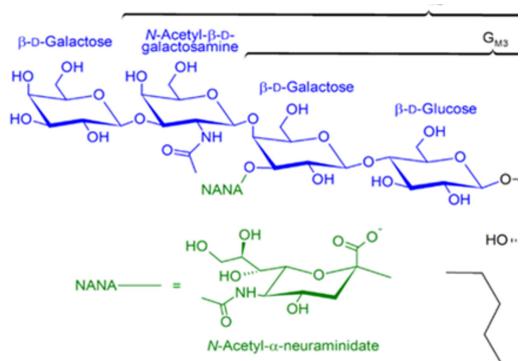
甘油磷脂



鞘磷脂



鞘磷脂脂肪链长, 导致膜较厚, 增强膜的刚性和稳定性。年轻组织PC/SPH>1



鞘氨醇 (双氢鞘氨醇也可) 的氨基通过酰胺键与1分子长链脂酸相连形成神经酰胺(ceramide)，为鞘脂的母体结构。

脂肪酸链双键多为顺式构型，覆盖面积增大

胆固醇 (cholesterol) :类固醇环提高刚性和微粘度；脂肪链运动无序性。控制膜的流动性，生物活性物质前体 (胆汁酸, 类固醇激素, VitD)

糖脂 (glycolipids) : X为一些单糖残基

中性糖鞘脂：半乳糖脑苷脂。脑苷脂重要鞘脂，定位于脂双层外层

酸性糖鞘脂：神经节苷脂 (gangliosides) ; 占神经细胞质膜总脂

糖脂决定了人的血型

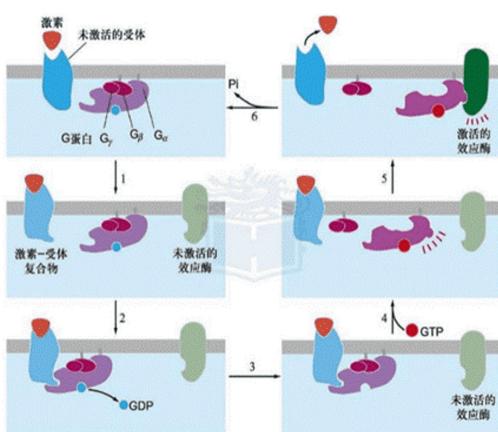
G蛋白

·G蛋白 (三聚体GTP结合调节蛋白) 偶联受体 (G protein-coupled receptor)

七次跨膜螺旋蛋白，G蛋白在胞质侧由 α 、 β 、 γ 蛋白亚基三聚体组成，G蛋白根据 α 亚基分类， $G\alpha$ 亚基有GTPase活性，关键蛋白。

第二信使：细胞表面受体活化后胞内产生的非蛋白类小分子，浓度变化应答。

受体配体结合：配体和G蛋白受体结合之后，发生构象变化，表现出鸟苷酸交换因子 (GEF) 的特性，GTP将结合在蛋白三聚体上的GDP替换，从而导致 $G\alpha$ 和三聚体脱离，G蛋白变成激活状态， α 亚基启动下游的信号转导 (cAMP、磷脂酰肌醇和cGMP) 。



第二信使信号转导(效应器蛋白不同)分成：

激活离子通道的G蛋白偶联受体，cGMP为第二信使

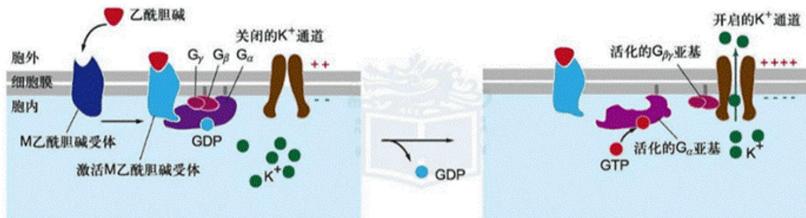
激活或抑制腺苷酸环化酶 (AC) , 以cAMP作为第二信使

激活磷脂酶C (PLC) , 以IP₃和DAG (1, 2-二酰甘油, 激活PKC, 位于膜

上) 作为双信使

1) 激活离子通道GPCR下游

许多神经递质受体 (如Ach) 是G蛋白偶联受体, 效应器蛋白多数为钠离子和钾离子通道, 神经递质和G蛋白受体结合导致离子通道打开或关闭, 引起膜内外电位差的改变。



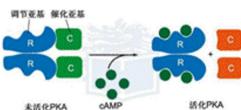
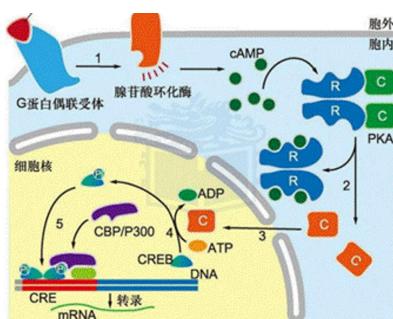
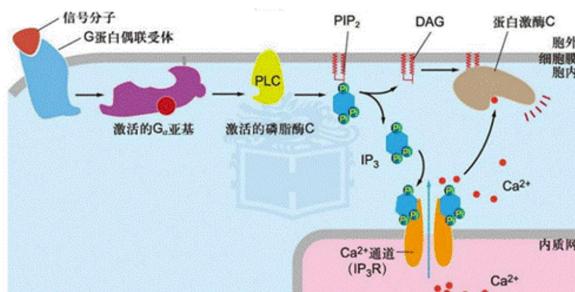
2) 激活PLC, 以IP₃和DAG (1, 2-二酰甘油, 激活PKC) 作为双信使

配体—GPCR—激活的α亚基—激活磷脂酶C (PLC) —将

PIP₂ (phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate) 分成IP₃和DAG—IP₃和钙离子通道受体结合—内质网钙离子释放到细胞质—钙离子与经DAG激活的PKC结合—调节代谢和基因转录。

IP₃-Ca²⁺:几乎所有真核细胞内钙离子动员的主要途径, 内质网膜上IP3门控钙离子通道, 浓度暂时升高, 钙泵调节。

DAG-PKC: PKC是Ser/Thr蛋白激酶, 激活基因转录



3) cAMP作为第二信使

G_α亚基首要效应酶是腺苷酸环化酶, 调节cAMP的浓度水平。激活和抑制取决于不同的激素受体复合物的α亚基。cAMP激活PKA, 释放催化亚基。细胞应答依赖于细胞表达的特殊PKA异构体和PKA底物 (激素对细胞效应的差异性)

P300-CBP转录因子: 组蛋白乙酰基转移酶

G蛋白偶联受体的特异性（三个亚基的组合，以及不同的腺苷酸环化酶）

Space filling model 和ribbon model (飘带模型)

G蛋白偶联受体——arrestin-mediated signaling

通路：拮抗剂结合引起arrestin-mediated signaling，结合到GPCR—使静息的GRK5（G-protein-coupled receptor kinase 5）激活并结合到receptor上使其C端磷酸化—招募 β -arrestin并激活—引发MAPK信号通路（细胞有丝分裂）。

——G蛋白怎么被激活的？

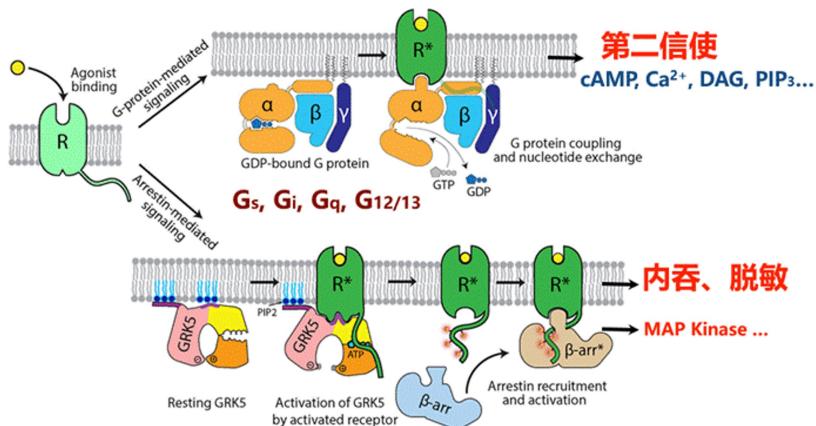
大部分G蛋白的TM6（第六次跨膜螺旋）在G蛋白结合到激动剂后构象发生改变——打开（往外面伸，和前一次的跨膜螺旋夹角变大）。其含有的氨基酸形成 conserved motif，激活和失活状态完全不一样，主要是形成氢键相互作用进而成为氢键网。而class C的G蛋白（主要是钾离子等离子通道）则不需要TM6内源性配体结合到正构口袋（orthosteric site），非内源性配体蛋白的口袋称为变构/异构口袋。

TM6的本体活性，配体（拮抗剂或者激活剂）的结合改变了跨膜螺旋的随机可逆运动，变化定向

受体的胞外区域（C 端）更具柔性，容易和配体的结合或者推开。

PTH（甲状旁腺激素）和GPCR的快结合、快解离能促进骨生成；慢结合会促进破骨。

GPCR信号转导的偏向性：G protein or arrestin(repressive)



GPCR胞质内底部氨基酸和arrestin/G protein之间的互作，决定结合的稳定性；

胞外受体和配体结合的稳定性（时间长短），氢键网络变化

力学生物学

Mechano-Biology 力学生物学

Molecular biology → genomics → convergence

Dimensions(size, shape, position)

Dynamics(moving speed)

Kinetics 动力学 (reaction rate)

Force (gravity, binding force, interaction forces)

Systems biology (network): single cell (molecule)-based analysis

Control biological system

Forces existed in various cellular processes

PD-1抗体

Treg为调节性T细胞，帮助肿瘤生长

血流冲刷会产生剪切力，白细胞要黏附在血管壁上

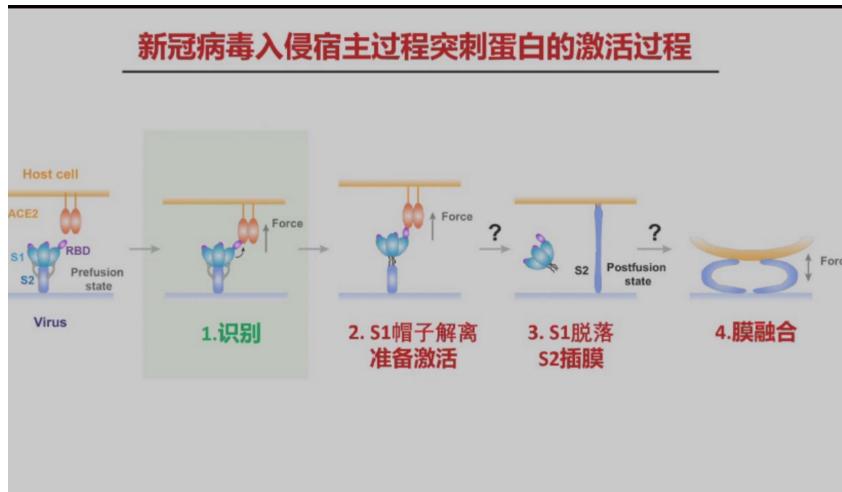
Shear flow enhances cell rolling adhesion. (炎症发生、动脉硬化时血流速度格外快，但是白细胞仍然能够黏附)

→分子机制：血流剪切力强，整合蛋白（刹车作用）锚定细胞能力更强了（抵抗生物力学，利用拉力实现黏附）

Integrin 20nm

蛋白约10-20nm

新冠病毒100 nm左右



一般的细胞10-50微米

ACE2受体与新冠病毒的亲和力affinity是与SARS病毒的10到20倍

→COVID-19传染力强

Spike突刺蛋白 20nm

膜张力→分子拉力

膜融合后激活spike蛋白质机器，把病毒RNA注射到细胞中去

三个重要抗病毒靶标：阻断识别、融合、病毒复制组装

膜融合比较难：病毒膜与宿主膜都呈正电，互斥，拉力需要克服排斥的静电力。由蛋白质储存的能量克服斥力。

新冠病毒入侵宿主过程突刺蛋白的激活过程：识别→S1帽子解离，准备激活

→S1脱落，S2插膜（产生很大的构象变化）→膜融合

加力后，SARS2的突刺蛋白发生旋转，产生新的相互作用，产生解离路径，与ACE2的结合力增强；SARS就不行。

新冠病毒突刺蛋白D614G突变能够更好响应生物力，增强和ACE2结合

生物力能够加速新冠突刺蛋白S1帽子的快速解离，激活膜融合蛋白

单分子磁镊检测Spike S1/S2动态解离过程，将蛋白质一端连在磁球上，另一端通过抗体连在基底上。

一个氨基酸的突变使得在力学响应下结合更紧，脱帽更快

还能突变抗体治疗靶点

新冠中和抗体能够阻断突刺蛋白S1“帽子”的受力快速解离，从而阻断新冠病毒的膜融合机器形成，抑制其感染。

结合在S1S2的结合面上的抗体能阻断病毒。

How to “see” cell force?

Cell generated traction forces: Wrinkles on silicone substrate caused by cell contraction,

膜配体相互作用，细胞转导，命运决定

细胞基质由软变硬，干细胞会分化

硬的基质生成成骨细胞，软的基质生成神经细胞。

原子力显微镜下：

巨噬细胞运动时内部的黑色运动颗粒是listeria。listeria穿透细胞膜后，巨噬细胞就死亡了。

ActA能结合actin，产生聚集的网络（actin聚合反应），推着细菌往前走。

Visualization of mechanotransduction

Src FRET Biosensor

Visualize mechanical stimuli conversion into biological signals

研究膜受体配体之间相互作用的强弱

Biomembrane force protein (BFP)

Protein is highly dynamic and can be regulated by force

核酸蛋白机器

核酸蛋白质机器：

学习要求



掌握

DNA序列的长度和出现频率之间的关系，回文序列在进化上的优势，蛋白质-DNA亲和力的产生，蛋白质识别DNA序列的方式，染色质重塑蛋白、解旋酶、DNA聚合酶、RNA聚合酶的功能，单体解旋酶和六聚体解旋酶的区别、动力冲程机制、布朗棘轮机制、抗生素抑制RNA聚合酶的五种机制



了解

常见的核酸蛋白质机器和DNA结合域，解旋酶、染色质重塑蛋白、DNA聚合酶、RNA聚合酶与疾病的关系，三金属离子催化机制

CRISPR技术原理：细菌将病毒核酸序列整合到CRISPR序列中，再一次受到入侵时，转录成CRISPR RNA (sgRNA) 并与Cas9核酸酶蛋白形成复合物，

RNA识别病毒序列结合，Cas蛋白进行切割。

核酸蛋白质机器：通过与核酸相互作用，保证基因表达顺利完成和细胞功能的正常执行

1) 以DNA为底物的酶促反应

DNA序列长度和出现频率之间的关系：**非回文序列:** $f = 2/4^n$; **回文序列:** $f = 1/4^n$

DNA序列长度和功能之间的关系：人类基因组特异序列 (3 billion) $>= 16\text{bp}$

回文序列优势：减小核酸酶体积过于庞大，造成原料浪费（只要反转一下就可以切了）；识别人类特异性序列通常单个结构域为8bp

DNA-蛋白亲和力的产生：聚电解质效应，疏水作用，氢键

蛋白质直接识别碱基序列：1、从DNA大沟上识别，识别碱基对特异性的氢键

和疏水基团，特异性好(A: T vs. T:A vs. G:C vs. C:G); 2、从小沟上识别，识别碱基对特异的氢键基团，特异性差（强强 vs 弱弱）

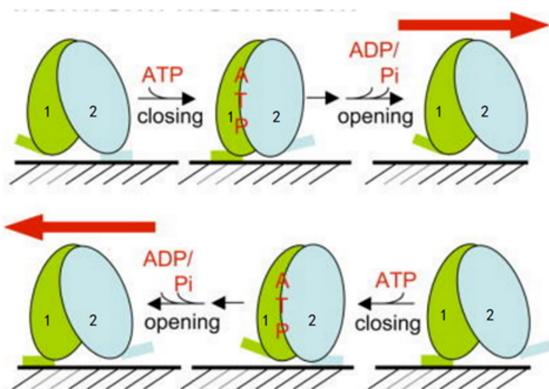
蛋白质DNA结合域：helix-turn-helix, leucine zipper, helix-loop-helix, homeodomain, zinc finger

蛋白质间接识别碱基序列：通过磷酸基团（位置，电荷，溶剂化），通过DNA形变（DNA发生形变的能力），特异性均弱

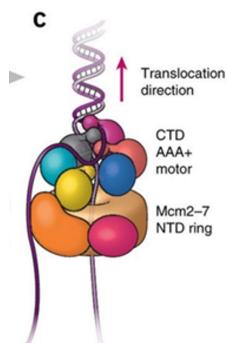
染色质重塑蛋白

将核小体中的DNA释放出来。

Chd1蛋白，有两个ATPase结构域，每次向前移动一个碱基就转36°的螺距——动力冲程机制



前进：结合到DNA上时（ATP也结合），2与DNA亲和力高，ADP释放时，1和DNA结合能力强，机器向前运动，反之向后运动。



解旋酶：

水解ATP的能力打开DNA-DNA, RNA-DNA, RNA-RNA双链；参与复制转录重组修复。

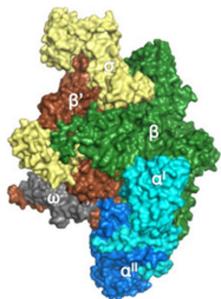
DNA直径20A°，单链10A°

单体解旋酶（UvrA-D）：复合体参与核苷酸切除修复

六聚体解旋酶Mcm2-7，中央口径~10A°，每个亚基都能结合ATP，C端和N端都结合ATP后，解旋酶合拢。每次能解开6个碱基 hand-over-hand model

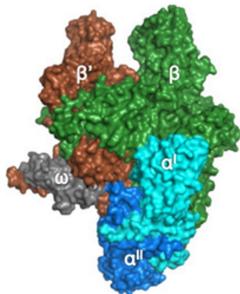
六聚体解旋酶解旋快，耐力好，适用于DNA复制；单体用于DNA损伤修复和重组

RNA聚合酶：



不需要引物，具有校对功能，每秒30个碱基对

单亚基：病毒、线粒体



多亚基RNA聚合酶有很强的保守性。

细菌RNA聚合酶（全酶）结构见右

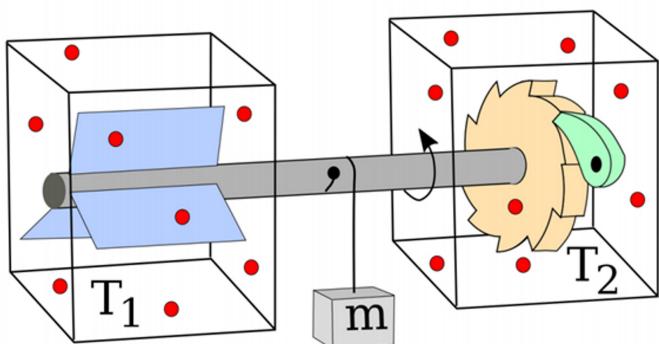
Σ factor在起始阶段识别promoter

开链复合物—闭链复合物— σ 掉落—延伸复合物

问题：RNA聚合酶工作不需要ATP，遇到核小体如何处理。哪来的能量供给做功？

布朗棘轮（Brownian ratchet）

局部构象变化，可逆，如DNA、RNA聚合酶



分子碰撞的涨落做功

T2齿轮加上相应的擎爪，齿轮就只能做单方向的运动，而禁止另一方向的运动；当细胞内分子不断地撞击T1的叶片（只有撞击方向能使齿轮向允许方向转动的才有效），如此可以将中间重物提起。

病毒学

病毒分类：核酸种类，有没有囊膜包被，包被蛋白衣壳（二十面体，螺旋）

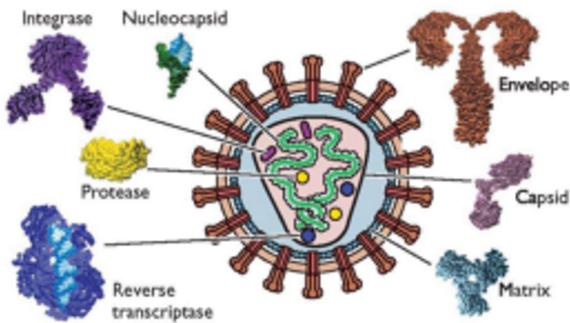
病毒：15-1000nm

亚单位：一条多肽链

结构单位：构成衣壳或核衣壳的单位；一个或多个亚基

capsid：病毒衣壳，绕着核酸的蛋白质

Nucleocapsid



病毒作用：保护；识别并输送遗传物质进入宿主细胞

病毒结构原则：病毒衣壳经济性（最小的基因组编码必须的，比如二十面体的病毒衣壳只需要60个一样的）；自组装；绝大多数非共价相互作用完成组装；非对称、螺旋或二十面体对称性

氨基酸性质表

	缩写	名称	结构	分子量	等电点	溶解度 × (0.20°C)g/L	分类
G	Gly	甘氨酸 Glycine	<chem>NCC(=O)O</chem>	75.07	6.06	141.8 225.2	脂肪族类
A	Ala	丙氨酸 Alanine	<chem>NC(=O)C(C)O</chem>	89.09	6.11	127.3 157.8	脂肪族类
V	Val	缬氨酸 Valine	<chem>NC(=O)C(CC)O</chem>	117.15	6	59.6 68.1	脂肪族类
L	Leu	亮氨酸 Leucine	<chem>NC(=O)C(CC(C)C)O</chem>	131.17	6.01	22.70 23.74	脂肪族类
I	Ile	异亮氨酸 Isoleucine	<chem>NC(=O)C(CC(C)C)O</chem>	131.17	6.05	37.91 40.25	脂肪族类
F	Phe	苯丙氨酸 Phenylalanine	<chem>NC(=O)C1=CC=C(C=C1)O</chem>	165.19	5.49	19.83 27.35	芳香族类
W	Trp	色氨酸 Tryptophan	<chem>NC(=O)C1=CC=C(C=C1)C=C2C=C(O)C=C2</chem>	204.23	5.89	8.23 10.57	芳香族类
Y	Tyr	酪氨酸 Tyrosine	<chem>NC(=O)C1=CC=C(C=C1)C=C2C=C(O)C=C2</chem>	181.19	5.64	0.196 0.384	芳香族类
D	Asp	天冬氨酸 Aspartic acid	<chem>NC(=O)C(=O)CO</chem>	133.1	2.85	2.62 6.33	酸性氨基 羧基类
H	His	组氨酸 Histidine	<chem>NC(=O)C1=CN=C(N1)C(=O)O</chem>	155.16	7.6	41.9 (25°C)	碱性氨基 羧基类
N	Asn	天冬酰胺 Asparagine	<chem>NC(=O)C1=CN=C(N1)C(=O)N</chem>	132.12	5.41	8.49 23.51	酰胺类
E	Glu	谷氨酸 Glutamic acid	<chem>NC(=O)C1=CC=CC=C1O</chem>	147.13	3.15	8.55 17.22	酸性氨基 羧基类
K	Lys	赖氨酸 Lysine	<chem>NC(=O)C1=CC=CC=C1N</chem>	146.19	9.6	400 630	碱性氨基 羧基类
Q	Gln	谷氨酰胺 Glutamine	<chem>NC(=O)C1=CC=CC=C1N</chem>	146.15	5.65	7.2 (37°C)	酰胺类
M	Met	甲硫氨酸 Methionine	<chem>NC(=O)C1=CC=CC=C1S</chem>	149.21	5.74	18.18 29.95	含硫类
R	Arg	精氨酸 Arginine	<chem>NC(=O)C1=CC=CC=C1N</chem>	174.2	10.76	855.6 (25°C)	碱性氨基 羧基类
S	Ser	丝氨酸 Serine	<chem>NC(=O)C1=CC=CC=C1O</chem>	105.09	5.68	22.04 42.95	羟基类
T	Thr	苏氨酸 Threonine	<chem>NC(=O)C1=CC=CC=C1O</chem>	119.12	5.6	13.2 (25°C)	羟基类
C	Cys	半胱氨酸 Cysteine	<chem>NC(=O)C1=CC=CC=C1S</chem>	121.16	5.05	0.11 (25°C)	含硫类
P	Pro	脯氨酸 Proline	<chem>NC1=CC=CC=C1</chem>	115.13	6.3	1620 (25°C)	亚氨基酸
U	Sec	硒半胱氨酸 Selenocysteine	<chem>NC(=O)C1=CC=CC=C1Se</chem>	168.07			
O	Pyl	吡咯赖氨酸 Pyrolysine	<chem>NC(=O)C1=CC=CC=C1C(=O)N</chem>	255.31			

体内20种氨基酸按理化性质可分为4组：

①、非极性、疏水性氨基酸：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和脯氨酸。

②、极性、中性氨基酸：色氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和苏氨酸。

③、酸性的氨基酸：天冬氨酸和谷氨酸。

④、碱性氨基酸：赖氨酸、精氨酸和组氨酸。

也可以按照亲水或者疏水分为两类：

①、疏水氨基酸-AVPFWMLG (注意，其中的G和M的疏水性相比于其他氨基酸较低，所以有人把这两种氨基酸也归入亲水氨基酸，或者另立一类中性氨基酸)

②、亲水氨基酸-其他氨基酸

甘丙缬亮异，脂肪

本phe, f色trp, w络tyr, y, 芳香

天冬asp, d冬, 谷glu, e攻略, 酸性, 负电

组his, h赖lys, k精arg, r碱性, 正电

甲硫met, m半胱cys, c硫

丝ser, s苏thr, t羟基