

# 总结

2021年4月27日 11:56

## 导论

技术突破

1991	膜片钳	诺贝尔生理学医学奖
2003	核磁共振成像 (2002, 1952, 1944)	诺贝尔生理学医学奖
2014	超分辨率荧光显微技术	诺贝尔化学奖
2017	冷冻电镜技术	诺贝尔化学奖
2018	光镊	诺贝尔物理学奖

## 蛋白质结构生物学

### 方法

X射线晶体学	分辨率高、范围广、便宜	需要晶体，只有单一状态	非常成熟
电子显微镜	不需要晶体、复杂结构	分辨率不足，样品制备难，难以研究小分子	比较成熟
核磁共振	不需要晶体，可以测定 <b>生理状态大分子动态</b>	分子不能太大，三维结构精度低	比较成熟，发展空间大

冷冻电镜：将待测物质冻在玻璃态的冰里

### 分子相互作用

键能：分开的原子系统势能与结合的原子系统势能之差

强相互作用不易受热运动影响，弱相互作用则易被影响，本质是能量差别

强相互作用 几百KJ/mol	共价键、配位键、离子键、共轭体系
弱相互作用 < 100KJ/mol	氢键（距离合适，有H和极性基团）、范德华力、疏水相互作用

### 结构生物学与医学

常染色体多囊性肾病：85%患者16chr PKD1(TRPP1)，15%患者4chr PKD2(TRPP2)

PKD1和PKD2是共定位的纤毛蛋白，PKD2形成离子通道

PKA蛋白激酶A：识别底物

指导药物设计：基于蛋白质三维结构

聚焦库：针对特异靶标的蛋白

片段库

虚拟高通量筛选

先导化合物改进

### 核酸蛋白质机器

CRISPR的应用：治疗遗传病、地中海贫血，纠正碱基突变，调控基因转录，带上GFP标记定位

### 序列特异性蛋白-DNA互作

a. 以DNA为底物的酶促反应

- (1) 序列特异性的DNA切割 (e.g., 限制性酶切)
- (2) 序列特异性的DNA甲基化
- (3) 序列特异性的重组

b. 以DNA为模板的酶促反应

- (1) 转录 (transcription)
- (2) 复制 (replication)

c. 转录调控

- (1) 转录激活(activation)
- (2) 转录抑制(repression)

回文序列

★ DNA序列的长度与出现概率关系：

非回文序列	$f=2/4^n$
回文序列	$f=1/4^n$

细菌基因组特异序列 (5million)  $\geq 10-12bp$

人类基因组特异序列 (3billion)  $\geq 16bp$

Q: 为什么RE喜欢识别回文序列呢?

A: ①节省蛋白质, 只需要一种切割亚基②长度限制让同一个结构域可以识别,  $1bp=3.5A$

蛋白质-DNA亲和力

聚电解质效应 (释放反粒子) :

$$K = \frac{[PD] \cdot [M^+]^n}{[P] \cdot [D]}$$

表观解离常数  $K_{obs} = \frac{[PD]}{[P] \cdot [D]} = \frac{K}{[M^+]^n}$  外界条件不变K不变, 阳离子浓度越大亲和力越小

疏水作用

氢键

直接识别碱基序列

读取请见受体还是氢键供体

DNA大沟	高度特异性
DNA小沟	只能区别AT和CG

DNA结合域: 通过 $\alpha$ 螺旋插入DNA大沟读取碱基对

间接识别碱基序列

磷酸集团

DNA形变

染色质重塑

核小体146bp, 1.75圈

①通过移动结合在 Histone 上的一段序列, 暴露并编辑之

②直接移出

③切除P

④组P突变

染色质重塑蛋白基因突变→癌症

e.g. 恶性横纹肌样肿瘤 BAF47

恶性胶质瘤 ATRX

每个 histone 都有一个可被修饰的  
碱性尾巴

若每个 histone 被甲基化了,  
Chd1 就会被招募过去

研究Chd1: 用BeF3模拟ATP, 将ATPase锁定在结合而未水解的位置

Chd1移动方法: 动力冲程机制, Chd1水解一个碱基DNA就移动一个碱基的距离

## 解旋酶

1%的真核基因编码解旋酶, 人类基因组编码了95个解旋酶: 64个RNA解旋酶和31个DNA解旋酶。

分类

以单体形式发挥功能的SF1、SF2和六聚体SF3、SF4、SF5、SF6

六聚体解旋酶可同时结合6个ATP



## 单体和六聚体解旋酶

聚合状态	解旋速率	耐力	功能
单体	低	差	DNA损伤 修复 DNA重组
六聚体	高	好 (DNA从孔 穿过, 不易落下)	DNA复制

容易从DNA上  
掉下来

一次水解6个ATP  
移动6bp距离

核苷酸切除修复	着色性干皮病 (XPD基因)
同源重组	Bloom综合征 BLM基因 Rothmund-Thomson综合征 RECQL4基因 Werner综合征 WRN基因

## 聚合酶

DNA聚合酶是以DNA或者RNA为模板,  
以四种dNTP为底物合成DNA的酶。

DNA聚合酶具有校对功能。

DNA聚合酶合成DNA需要引物。



错误率:  $1/10^9$  碱基

速率: 1000 碱基/秒

1956年, Arthur Kornberg首次从大肠杆菌  
杆菌中发现DNA聚合酶I (Pol I)。

RNA聚合酶是以DNA为模板，以四种NTP为底物合成RNA的酶。

RNA聚合酶具有校对功能。

RNA聚合酶不需要引物。



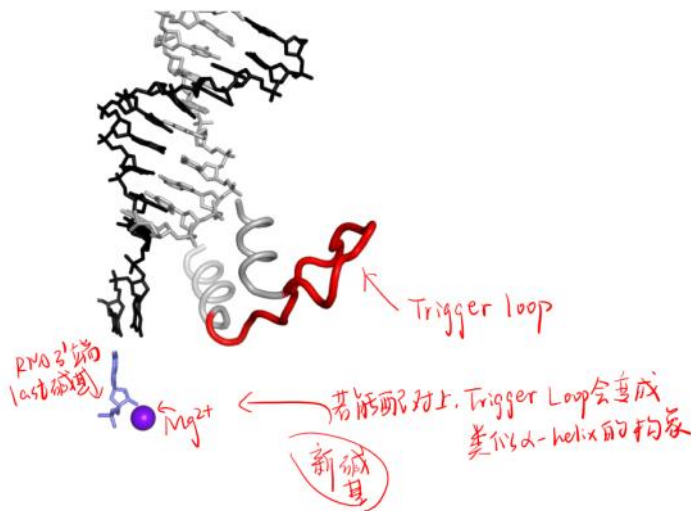
错误率:  $1/10^5$  bases  
速率: 30 bases/second

Severo Ochoa因为发现RNA聚合酶和Arthur Kornberg分享1959年诺贝尔生理医学奖，但是他发现的其实是多核苷酸磷酸化酶，真正的RNA聚合酶1960年被发现。

多亚基RNA聚合酶具有保守性

"转录流产": 并不是每次RNA pol都能顺利起反应  
会多次流产, 产生一些短链RNA

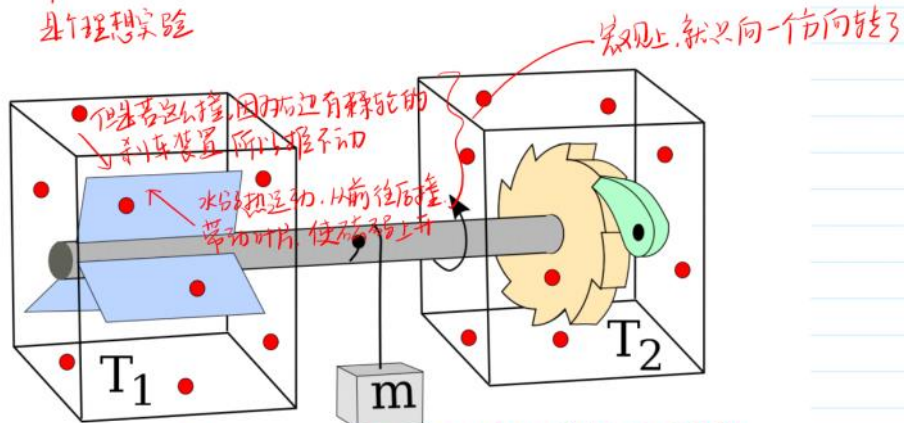
## 转录延伸



布朗棘轮

## 布朗棘轮 (Brownian ratchet)

是个理想实验



这是个永动机, 本身不可能实现, 但能用于解释  
RNA pol 的移动: RNA pol 已合成了一个碱基,  
无法向后动, 总体上就会  
向前移了

# 分子马达机制比较

机制	构象变化	能量来源	是否可逆	例子
动力冲程	整体构象变化 (inchworm、hand-over-hand)	结合能、化学能	不可逆	肌球蛋白 驱动蛋白 动力蛋白 染色质重塑蛋白 解旋酶
布朗棘轮	局部构象变化	动能	可逆	DNA聚合酶 RNA聚合酶

细菌RNA聚合酶是重要的抗生素靶标

利福平	与口袋结合，突变则耐药
非达霉素	卡住钳子使之无法打开DNA
myxopyronin	
甲尿嘧啶PUM	UTP的竞争性抑制剂，耐药机会小
salinamide	抑制RNA聚合酶变构

创新：Mfd是结核分枝杆菌产生耐药突变的关键蛋白，这是一种解旋酶，在DNA上移动消耗ATP但是不解旋→①针对ATP结合口袋设计ATP竞争性抑制剂②针对TRG motif设计变构调节剂

## 生物膜和GPCR

生物膜

生物膜2 GPCR

## 物质的跨膜运输

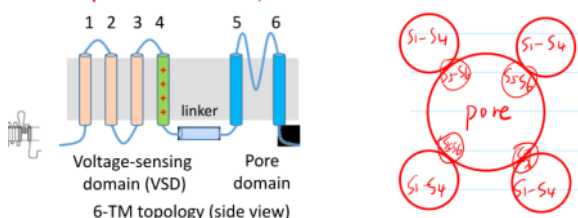
- **主动运输 (active transport)**：膜蛋白介导，消耗能量，可以从低浓度向高浓度运输
- 1. **初级主动运输 (primary active transporters)**：能量直接来自ATP的水解 (ABC transporter, pump)
- 2. **次级主动运输 (secondary active transporters)**：能量来自另一种小分子的跨膜电势

	PORES	CHANNELS	CARRIERS
Example	Water channel (AQP1)	Shaker K <sup>+</sup> channel	Glucose transporter (GLUT1)
Conduit through membrane	Always open	Intermittently open	Never open
Unitary event	None (continuously open)	Opening	Cycle of conformational changes
Particles translocated per "event"	—	$6 \times 10^4$	1-5
Particles translocated per second	Up to $2 \times 10^9$	$10^6$ - $10^8$ when open	200-50,000

## 离子通道

离子通道按照门控机理分类：①电压门控②配体门控③机械力敏感通道

命名时有个V → voltage  
6次跨膜 { S1-S2-S3-S4 — 电压感受器结构域  
              { S5-S6 — pore 结构域  
4个VSP共同组成一个 pore



一个钾离子通道有4个钾离子结合位点，有TVGYG motif选择性过滤器给钾离子形成“去水化”

状态

钠离子通道有快速失活原件IFM motif

通透比根据反转电位reverse potential来计算

电压门控机理：电场驱动带正电的精氨酸从下往上依次移动，蛋白质构象变化

## 总结：电压门控voltage gating

- Vertical motion of S4
- Rotation of S4-S5 linker
- The coupling movement of S4-S5 linker and S6

## 转运蛋白

Major facilitator superfamily MFS e.g. GLUT1

ABC超家族：6次跨膜



抗肿瘤药物的识别和外排：ABCB1 p-glycoprotein1

P型离子泵

- 8 or 10 TM
- Na+K+ ATPase
- H+ ATPase
- SERCA
- Cu2+ ATPase

## 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)
- 心磷脂亦称双磷脂酰甘油，是潘伯恩 1941 年从新鲜的牛心肌中分离出来的，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。

心脏中心磷脂含量高是因为心脏中线粒体多

#### 线粒体 DNA(mtDNA )

- 双链环状的 mtDNA 分子
- 人类线粒体 37 个基因
  - 用于蛋白质 (多肽)
- 22 个用于转移核糖核酸
- 2 个用于核糖体核糖核酸的大小亚基
- 遗传疾病
  - 运动不耐症
  - 卡恩斯 - 塞尔综合征 (KSS)
  - MELAS 和 MERRF 综合征

外膜	单胺氧化酶、脂肪酸链延长酶、 $\beta$ -sheet构成的孔蛋白
膜间腔	腺苷酸激酶、诱导癌细胞凋亡的蛋白
内膜	细胞色素氧化酶，心磷脂20%，高度不通透性

线粒体有蛋白质转运系统

线粒体运动效应分子：Miro1、Miro2（都是GTPase，促进线粒体基于微管的运动，调控 fission&fusion，调控线粒体自噬，调控线粒体与内质网互作形成的钙稳态）



**Miro- 介导的线粒体运动**

(a) 线粒体外膜的受体分子：Miro 和

Mfn (b) 运动调控分子：Pink1, Parkin

等 Parkinson 基因, 与帕金森病有关

(c) 微管上的蛋白马达

(d) 线粒体运动模式图

介导线粒体 fission &amp; fusion 的关键因素：膜电位（膜电位越高说明线粒体越健康）

缺血缺氧紫外光照 → 线粒体分裂

衰老 → 线粒体融合

运动过度 → 自由基 → 漏电 → 衰老

线粒体融合：Mfn 二聚化

线粒体自噬：Parkin 积累 → 泛素化标记 → 自噬小体包裹 → 降解

自噬的意义：①清除 ROS ②抗衰老 ③神经系统疾病

**膜接触位点 (MAM)** 也可用于免疫治疗

➢ MAM 被认为是磷脂膜间转运、Ca<sup>2+</sup> 交换、及激活三羧酸循环的线粒体的中心。

➢ MAM 也可能参与胆固醇、神经酰胺、ATP 和蛋白质的细胞器间运输，以及蛋白酶体蛋白降解和脂滴形成。

➢ MAM 在 mtDNA 合成、线粒体动态、脂类的生物合成等过程中都有重要作用。

。

➢ 最近的研究已经开始揭示在先天免疫系统对病毒感染的反应中细胞器间通讯的重要性。

**α-突触核蛋白**：帕金森病发病机制中最重要的蛋白，生理状态下为无序单体，病理状态下开始聚合产生毒性

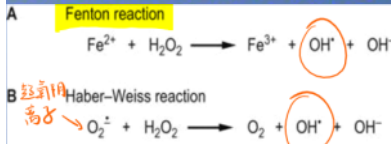
肌萎缩性脊髓侧索硬化症 ALS：TDP-43 诱导线粒体损伤

## 自由基

首次发现：三苯甲基自由基

·O<sub>2</sub>·、·OH、R··O 和 R·O·O 统称为氧自由基。

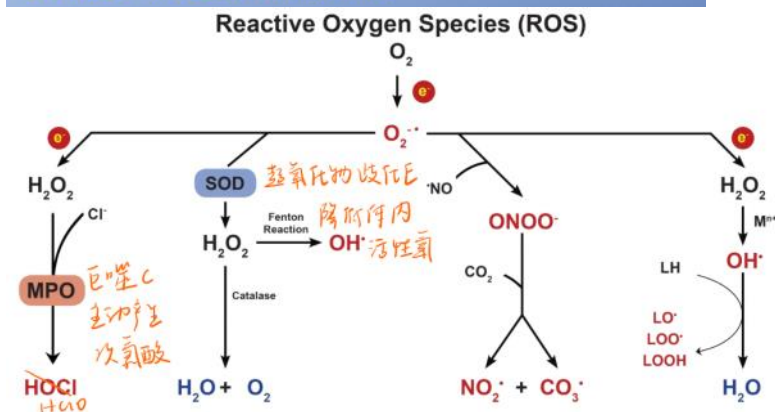
按自由基定义，元素周期表 D 区第一列元素（除铯外）均为自由基  
·OH 是攻击生物大分子、损伤组织能力最强的氧自由基



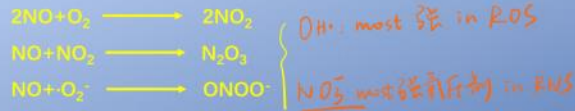
铁死亡：转铁蛋白 Tf 将铁离子转入细胞 → Fenton 反应将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成羟基自由基 → 脂质过氧化损伤

血红蛋白也有类似功能，但是 RBC 寿命短而且含有丰富的抗氧化酶

活性氧 (reactive oxygen species, ROS)：是体内一类氧的单电子还原产物，是电子在未能传递到末端氧化酶之前漏出呼吸链并消耗大约 2% 的氧生成的，包括氧的一电子还原产物超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)、二电子还原产物过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、三电子还原产物羟基自由基(·OH)。



**活性氮 (reactive nitrogen species, RNS):** 是一氧化氮 (NO) 及其在体内的一系列氧化产物。



其中,  $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$  为强氧化剂, 类似  $\text{OH}^\cdot$ , 可启动脂质过氧化。该氧化剂生成的反应速率极高, 因此, 在氧化应激情况下, NO 的毒性来自于  $\text{ONOO}^-$ 。

以上 NO 及其与氧的多种化合物都有明显的生物学活性, 因此将 NO、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{N}_2\text{O}_3$  与  $\text{ONOO}^-$  归属为活性氮。

氧化应激  $\sim \text{ROS}$

硝化应激  $\sim \text{RNS}$

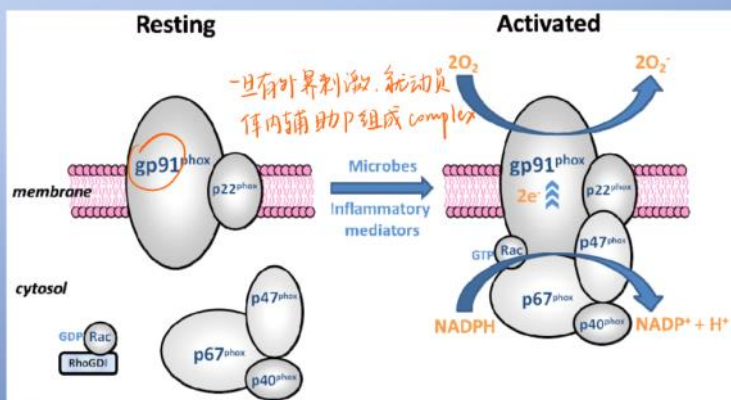
活性氧来源

- ① NADPH 氧化酶 NOX
- ② 线粒体
- ③ 黄嘌呤氧化酶 XO
- ④ 另外酶类 单胺氧化酶、尿酸盐氧化酶

ROS 来源

- ① NOX
- ② mito 的 ETC
- ③ XO
- ④ Cyt ...
- ⑤ eNOS

NOX2 是最早发现的 NADPH 氧化酶, 由催化核心和几个调节亚单位构成。



NOX2 催化核心与调节亚单位相互协调, 生成活性氧

活性氧效应器 TRPM2 通道: 放大损伤级联反应, 与氧化应激互为因果

活性氮来源

一氧化氮合酶 NOS  $1.5\text{NADPH} \sim 1\text{NO}$

活性氮的信号转导: 蛋白质半胱氨酸谷胱甘肽化

NMDA 受体激活 NOS, 进而产生 NO 去激活鸟苷酸环化酶, 进而 S-亚硝基化下游蛋白, 反之, NO 也能通过亚硝基化 NMDAR 和 NOS 来负反馈抑制其功能。

机体抗自由基防御系统

① 超氧化物歧化酶 SOD (真核细胞含有 Cu-Fe-SOD 和 Mn-SOD, 原核细胞是 Fe-SOD)

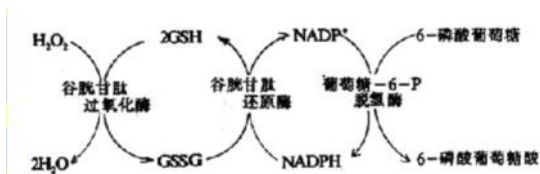


SOD 突变  $\rightarrow$  ALS

② 过氧化氢酶

③ 谷胱甘肽过氧化物酶





④谷胱甘肽还原酶



## 疾病



大气污染与氧化应激

## 生物热力学

### 生物热力学

人体的能量平衡式:

$$\Delta E = Q_p + Q_E + Q_C + Q_R - W$$

代谢产热      发汗、对流、辐射与外界交换      肌肉收缩对外界做功

热力学第一定律 (封闭体系的能量守恒定律):  $\Delta U = \text{体系吸收的热量 } Q - \text{体系对外做功的能量 } W$

热力学第二定律: 绝热或孤立体系, 自发过程是朝着熵增大的方向进行

## 病毒学

caspid衣壳

螺旋体病毒Helical V、二十面体病毒

Tupanvirus has the most complete translational apparatus

Virus particles are metastable

病毒中的蛋白质的作用:

- ①保护病毒基因
- ②传递病毒基因
- ③复制、组装新的病毒

病毒进入细胞使用受体: Ex. CD4, PVR, CD46, CAR, Integrins, LDL receptor family

SARS-CoV-2 spike protein

病毒治疗:

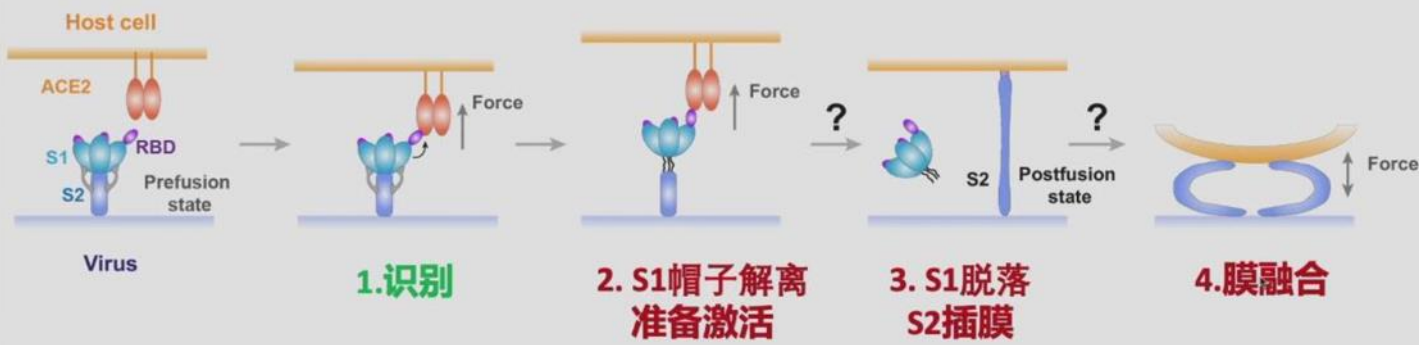
①

### 5.1. Successes in viral gene therapy

- Severe combined immunodeficiency (重症联合免疫缺陷)
- Adenosine deaminase (腺苷脱氨酶缺乏症)
- Leber congenital amaurosis (先天性视网膜病)
- Hemophilia (血友病)
- $\beta$ -Thalassemia (地中海贫血)
- Lipoprotein lipase (脂蛋白脂酶缺乏症)
- ②Delivering viral antigens→疫苗
- ③Viral oncotherapy: 用病毒治疗肿瘤, target and kill tumors, often with immune enhancement e.g. Adenovirus Oncorine
- ④噬菌体治疗

## 生物力学

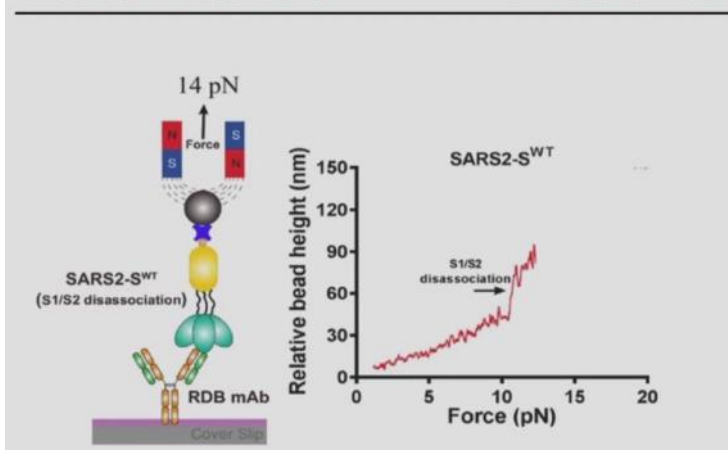
## 新冠病毒入侵宿主过程突刺蛋白的激活过程



新冠突刺蛋白比非典突刺蛋白受力转动更显著

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

### 单分子磁镊检测Spike S1/S2动态解离过程



生物力诱导并加速新冠突刺蛋白S1帽子的解离

核磁共振

核磁共振

计算生物学

无

冷冻电镜

## 病毒三维重构3.3Å 分辨率

一、单颗粒冷冻电镜技术  
(Single Particle)

对象：均一性的大分子复合物

二、电子断层三维重构  
(Electron Tomography)

对象：均非一性的蛋白、病毒（如  
包膜病毒）、细胞器、细  
胞等

## 单分子技术

### 单分子荧光共振能量转移

斯托克斯位移：发射波长总是大于吸收波长

量子产率：

$$\Phi = \frac{\text{Number of photons emitted}}{\text{Number of photons absorbed}}$$

荧光寿命 $\tau$ ：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，一般在0.5-20纳秒之间

荧光极化/荧光偏振：单一平面的偏振光照→荧光物质激发态→发射出单一平面的偏振荧光

物质在溶液中会有 rotation，激发光与发射光方向不同

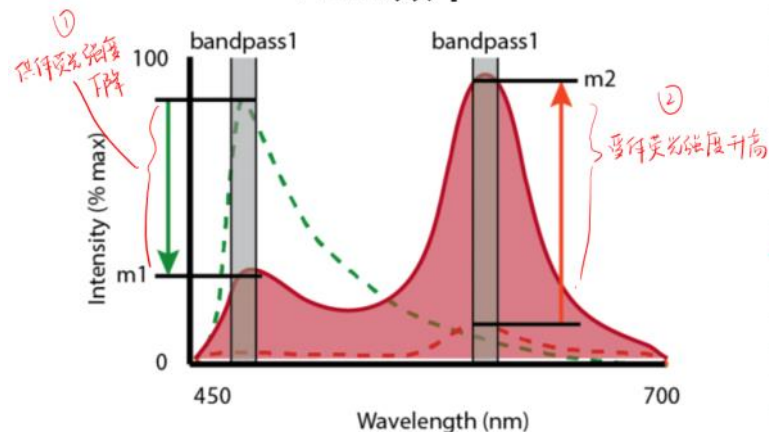
实验时在检测器前放2个偏光片（分别平行和垂直于入射光）然后测P

用于判断受体物质分子大小，分子量↑P↑

eg. 测DNA与P亲和力

荧光共振能量转移FRET：当一个荧光分子（供体）的发射光谱与另一个荧光分子（受体）的激发光谱相重叠时，供体荧光分子的激发能诱发受体分子发出荧光，同时供体荧光分子自身的荧光强度衰减

### FRET效率



只有供体和受体足够靠近时才有FRET

测量时应选择 r 尽量接近  $R_0$  的 Donor 和 Receptor 荧光，因为  $R_0$  附近曲线斜率最大最陡

你要测分子互作， $R_0$  就用它们互作距离间的距离

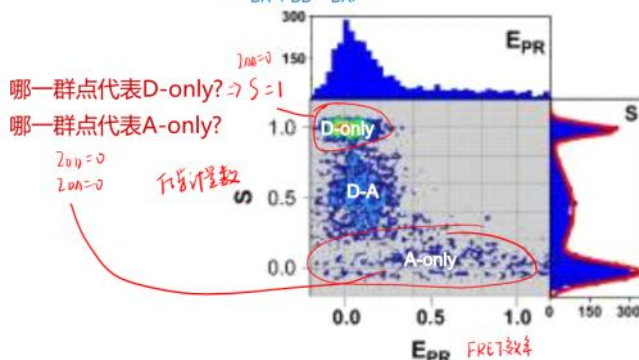
研究RNA聚合酶：在两个钳子尖上标记，但是不能标记天然氨基酸

非天然氨基酸标记：空白密码子+正交氨酰tRNA合成酶+tRNA+目标非天然氨基酸

### 化学计量参数

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

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



### 磁镊

研究DNA拉伸

衍射环大小 $\propto$ 磁珠高度

## DNA拓扑学

Linking number=twist+ writhe

正超螺旋解旋→高度下降

RNA pol 先打开 -10 ~ +1 的小转录泡

① transient excursions: E 顺着 RNA 滑动, 一边解旋一边合上, 转录泡大小不变

② scrunching: E 的一边一直结合在 DNA 上不放手, 另一边把 DNA 扯过来, 转录泡越来越大

研究方法: 在一段 RNA 起始只放 AT, 体系中只加入 ATP 和 UTP

转录起始阶段——scrunching: 西格玛因子结合, 将 RNA 聚合酶和启动子牢牢结合在一起

转录延伸阶段——transient excursions

## 光镊

用激光移动物体: 光折射, 动量变化→物体受到力

研究驱动蛋白在微管上移动

减小噪音的三种策略:

- ① 氦气减小光折射的低频噪音 (高频噪音来自热运动, 不可消除)
- ② 哑铃设计减少平台漂移的低频噪音
- ③ 被动力钳避免反馈环的误差

RNA 聚合酶的步距是 1 个碱基, 有阻力会倒退, 但有时候也会迎难而上

## 荧光标记技术

### 化学荧光标记

钙离子荧光探针: Fluo-3AM (吸收 488, 发射 525-530)

线粒体膜电位探针: Rhodamine123 (依赖膜电位进入线粒体, 凋亡时释放, 荧光增加)

### 非天然氨基酸标记技术

点击化学: 一定环境下, 一对功能性基团彼此快速有选择地相互反应, 形成稳定的偶联体

Cu 催化: 慢、有毒、死细胞标记

无 Cu 催化: 反应快、无毒

荧光非天然氨基酸 Anap 标记: ANAP 本身就是荧光分子, 发射光谱对疏水性敏感, 标记通道蛋白看构象变化

### 抗体免疫荧光标记

免疫组化

样本类型	检测标记物	
	组织 (Histo-)	细胞 (Cyto-)
酶 (Chemistry -)	IHC	ICC
荧光素 (Fluorescence -)	IHF	ICF

统称为 IF

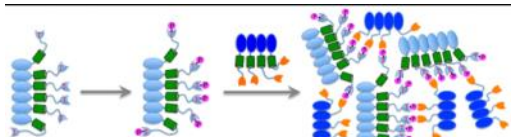
### 荧光标记技术分类小结:

- 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)

### 荧光蛋白标记技术

cpGFP 技术: 钙探针 GCaMP

相变探针



SPARK 探针: 检测 JNK 激酶活性

LCK 活性上升 = T 细胞激活的标准

水解酶探针

Caspase3 商业化探针: FPX

Caspase3 凋亡探针: ZipGFP、FLIPGFP

GFP包含11个 $\beta$ 链和一个中央 $\alpha$ 螺旋，可分为3部分：（1） $\beta$ 链1-9（ $\beta$ 1-9）和一个 $\alpha$ 螺旋，（2） $\beta$ 链10（ $\beta$ 10）和（3） $\beta$ 链11（ $\beta$ 11）。每个部分都包含荧光所必需的成分和残基。当这些部分彼此分离时，蛋白质将无法发出荧光。当 $\beta$ 10和 $\beta$ 11连接在一起但与 $\beta$ 1-9分开时，它们将与附近的 $\beta$ 1-9链快速重组，从而在数十分钟内产生荧光（Cabantoous等，2013）。

Shu Lab利用了这一优势，提出了一种荧光依赖于蛋白酶激活的系统。通常， $\beta$ 10-11是反平行的。为了防止结合，对FlipGFP中的 $\beta$ 链进行了重新设计，使其彼此平行，因此不再适合 $\beta$ 1-9。他们将 $\beta$ 10-11与两个接头（E5和K5）连接，这两个接头一起二聚，并迫使这些链成为平行构象。在 $\beta$ 11和一个连接子之间是共有caspase-3（一个执行子caspase）切割位点（DEVD）。切割该序列后， $\beta$ 10和 $\beta$ 11可重新排列至其正常的反平行位置并发出荧光。

## 高内涵成像系统

快速对大量样本进行图像采集和定量，客观地作出评判生物学现象的结论

全自动高速显微成像+全自动图像分析+数据管理

## 电生理技术

1939年 神经纤维膜内外电位差→“细胞内记录”

临床电生理 $\in$ 细胞外记录

产生电信号的细胞基础：可兴奋细胞

产生动作电位的分子基础：离子通道

## 细胞外记录技术

引导电极放在神经组织表面或附近 e.g. 脑电图、心电图

LTP: 长时程增强 短暂高频率刺激后形成↑ 再给予刺激后对后刺激的反应也↑  
抑制① LTP导致突触反应的变异性↑② 参与反应的突触数↑

突触可塑性→认知的基础（全新的突触形成）

## 细胞内记录技术

研究神经信号传递的主要方法

电解液灌注吸管插入细胞膜

## 膜片钳

1980+之后发展出来的

用一个尖端直径在1.5-3.0 $\mu$ m的玻璃微电极接触细胞膜表面，通过负压吸引使电极尖端与细胞膜之间形成千兆欧姆以上的阻抗封接，此时电极尖端下的细胞膜小区域（膜片，patch）与其周围在电学上分隔，在此基础上固定（钳制，Clamp）电位，对此膜片上的离子通道的离子电流进行监测及记录。

## 3.2 膜片钳设备



步骤：

- ①电极拉制
- ②充灌电极内液
- ③形成吉欧封接
- ④电流记录

模式：

细胞贴附式



Adv: 最简单: 贴片电生理分析

Dis: 无法改变C内外环境

一般用于致电压门控的分析

全细胞模式: 脉冲负压破膜, 使电极与细胞形成连通的整体, 可以胞内给药改变细胞外环境

膜外面朝外: 最难, 先破膜再做好绝缘

膜内面朝外: 也是贴好之后揪电极

穿孔膜片钳: 相对完整地保留细胞内环境, 只漏出一些离子

疾病

NMDA受体GluN2A突变引发癫痫

Arg VS His

**遗传性周期性共济失调(episodic ataxia, EA)**

心血管钠通道SCN5A基因W822X突变能导致该钠通道功能丧失, 从而导致心律失常。

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

**Nav1.4通道SCN4A突变引发先天性肌强直病**