

第七次作业

- 1.描述核磁共振波谱法在蛋白质结构分析中的特点。
- 2.简述单分子荧光共振能量转移技术的优势和不足。
- 3.请简述冷冻电镜的工作流程和优缺点。
- 4.与NMR、XRD、冷冻电镜等技术相比，SAXS在解析蛋白质结构方面的优势与不足分别是什么？

问题分析：1.核磁共振波谱法在蛋白质结构分析中的特点：一方面，核磁共振波谱法是在溶液状态下测定蛋白质的结构，因此不需要结晶，而且能研究生物分子的动态性质，或是蛋白质折叠的过程，抑或是检测生物分子中的少数构象；但另一方面，核磁共振波谱法解析时间长，且随着分子量的增大，核磁信号数量迅速增多，解析难度逐渐增大，因此核磁共振波谱法无法解析分子量太大的蛋白质。

2.单分子荧光共振能量转移技术的优势：能在不破坏生命体正常生理状态的情况下，清晰地观察单个分子的行动，有助于确定蛋白质/DNA/RNA折叠动力学、构象动力学及相互作用；能结合原子力显微镜（AFM）、光镊（OT）或磁镊（MT），同时研究单个分子的不同性质。

不足：目前实现单分子荧光共振能量转移的两种测量方法——共聚焦显微镜和全内反射荧光显微镜，尚无法同时具备高时间分辨率与高通量的特点，前者在一个小区域对自由扩散溶液的荧光物种进行FRET效率统计，其时间分辨率高，与荧光相关光谱（FCS）兼容，但不能长时间关注同一分子的时间轨迹，如果将其固定化，则会有视野小，通量低的问题；后者对固定在表面的荧光物种进行FRET统计，能长时间关注同一分子的时间轨迹，通量极高，但时间分辨率低，难以进行FCS分析。

3.冷冻电镜的工作流程：首先，将高纯度的（蛋白质）样品溶液分散在载网的多孔碳膜上，接着在液氮温度下迅速冷冻，将样品封存在玻璃态的溶剂（一般为水）中，随后用电子显微镜拍摄样品，得到处于不同朝向的样品的二维投影，再利用傅里叶变换重构出分子的三维结构

冷冻电镜的优势：经过多年的发展，如今冷冻电镜的分辨率已经能达到4埃以下，甚至在部分生物分子中能达到与X射线衍射相近的分辨率；冷冻电镜解析结构时不需要准备复杂的样品；能对溶液中的样品进行分析，从而得到分子的动态信息。

冷冻电镜的不足：目前真正能在原子水平上测量生物分子结构的只有X射线衍射和核磁共振这两种方法，相比之下，冷冻电镜的分辨率还需进一步提升；冷冻电镜拍摄到的待测分子不同朝向的照片，需要通过专门的软件才能重构成相应的三维结构，而实现这个过程的算法还有改进的空间；冷冻电镜操作繁琐，初学者上手难度较大。

4.SAXS在解析蛋白质结构方面的优势：（1）几乎不受粒子大小的限制；（2）实验时间短，若采用第三代同步辐射光源，测量时间可达到毫秒甚至微秒数量级；（3）用于SAXS的样品处于溶液状态，与生物体内的环境相似；（4）实验对样品的pH和离子强度没有特殊要求；（5）样品用量少，一次SAXS测量只需要约2~10 mg纯蛋白样品（此处存疑，因为NMR同样需要5~10 mg纯蛋白样品）；（6）可以用于蛋白质折叠和构象变化等动力学方面的研究

不足：根据SAXS得到的蛋白质结构，其分辨率低于从X射线衍射或核磁共振得到的蛋白质结构