

1 杨辉 基因编辑与应用

By 神经所

(考试重点: 基因编辑工具, **crisper** 相关的工具, 以及应用原理)

1.概念:

DNA 在生物的基因组内进行插入、删除、修饰或者替代。DNA is inserted, deleted, modified or replaced in the genome of a living organism.

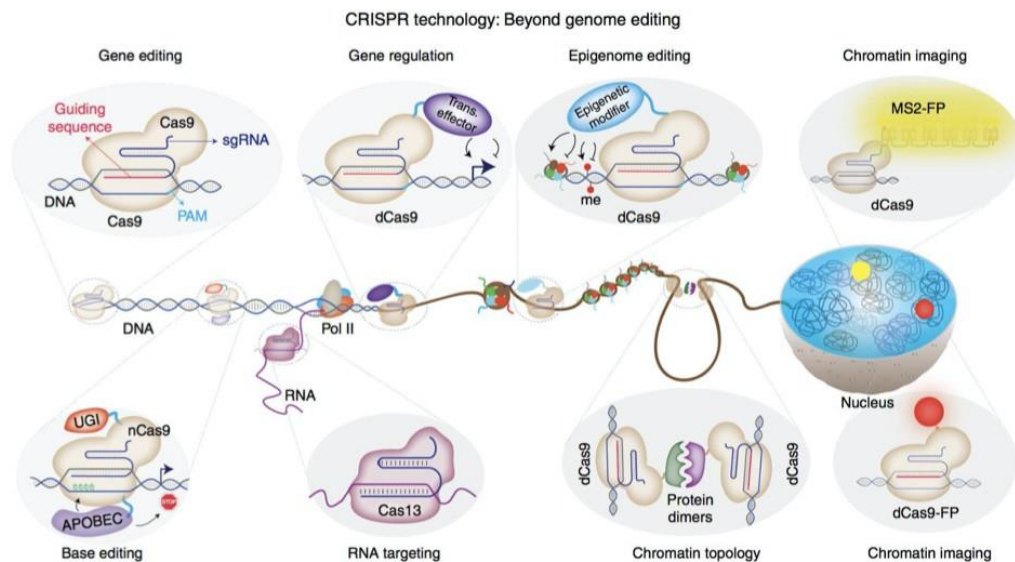
2.基因编辑技术的发展:

大范围核酸酶 (megannuclease) —— 锌指核酸酶 (zinc finger nucleases) —— TALEN —— CRISPR/Cas9

3.CRISPR 技术的优点: 简易、效率高、成本低、多位点、多种衍生技术

4.基于 CRISPR 的技术 (CRISPR-based Technologies)

Gene KO and KI、Gene activation、Epigenetic editing、Base editing、RNA editing



5.基因编辑对罕见病的治疗

i. 罕见病现状: 7,000 种罕见病; 80%是单基因遗传病, 50%发生在儿童时期; 全球 3 亿病人; 预计 2022 年 40 种基因治疗新药上市。

举例:

杜氏肌营养不良症 Duchenne Muscular Dystrophy

杜兴氏肌营养不良 (DMD) 是一种严重的肌营养不良。肌肉无力的症状通常在男孩 四岁左右开始, 并迅速恶化。这种疾病是 X 连锁隐性疾病。

在 CRISPR-edited 胚胎中会出现镶嵌现象 (Mosaicism) 即出现包括 WT, 半突变胚胎, 全突变胚胎混合在一起的现象。

ii. 生殖细胞基因治疗 (Germline Gene Therapy) 有效率: >99%。脱靶现象: 无

iii. C-CRISPR: cocktail of targeting sgRNAs in the CRISPR/Cas9 system (when a single exon is targeted with two or more closely spaced sgRNAs)

iv. CRISPR-stop: If base editing occurs in-frame of a protein-coding sequence, a stop

codon can be prematurely introduced and disrupt gene function (如果碱基编辑发生在蛋白质编码序列的读框内,则可以过早引入终止密码子并破坏基因功能;这种方法被称为 CRISPR-stop)

与 C-CRISPR 相比, CRISPR-stop 有 Defined editing、Low off-target 的优点。

v.体细胞基因治疗

有效性: 1-100%, 脱靶: 无致癌突变

vi.使用 base editing 校正人类胚胎中的致病性杂合突变

特点: 较低的脱靶效应, 如果脱靶会产生单核苷酸变异。

6. 基因编辑技术难点

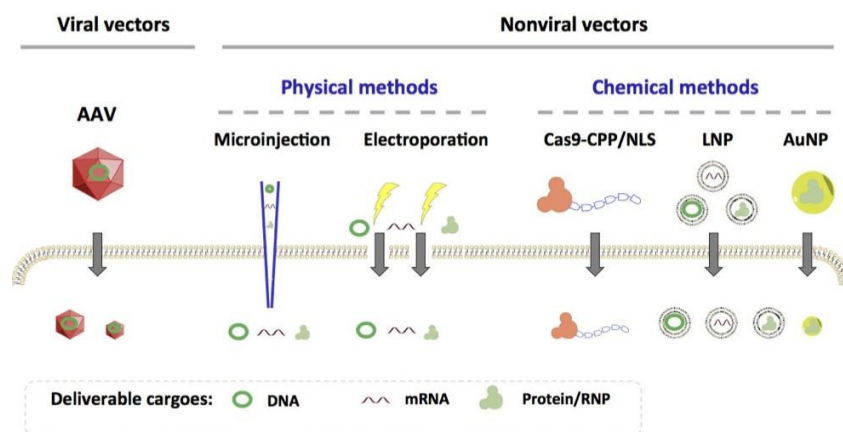
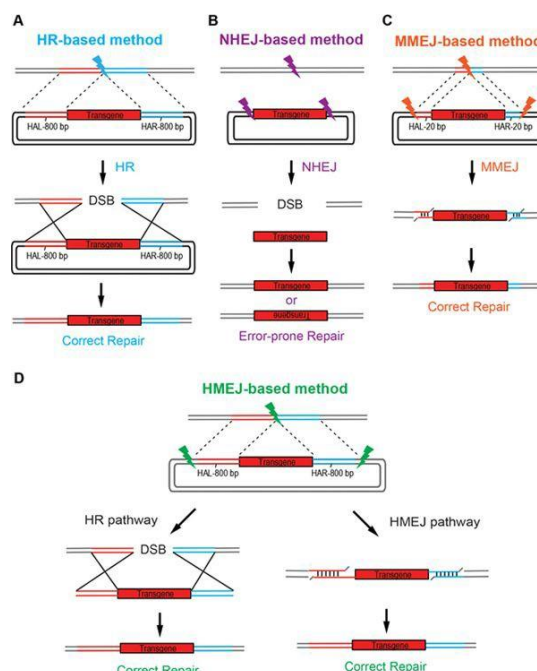
i. 精确编辑效率 (原代细胞 (如免疫细胞) 和成体细胞中基因敲入效率很低) 同源重组 homologous recombination (HR) editing efficiency 0.1-1% 非同源末端连接 non-homologous end joining (NHEJ) editing efficiency ~10% 微同源介导的末端连接 microhomology-mediated end joining (MMEJ) editing efficiency ~10%

基于同源介导的末端连接 homology-mediated end joining (HMEJ) editing efficiency ~50%

原理如下:

Tild-CRISPR 是一种与线性化 dsDNA-CRISPR 进行定向整合的策略, 该方法通过 PCR 扩增或精确酶切的转基因供体 (具有 800 bp HA) 使用体外线性化 DNA, 可在小鼠中有效实现 DNA 定向整合以及人类胚胎, 以及体内的老鼠大脑。Tild-CRISPR (targeted integration with linearized dsDNA-CRISPR)-based strategy, using in vitro linearized DNA by PCR-amplified or precisely enzyme-cut transgene donor with 800 bp HA, which efficiently achieved DNA-targeted integration in mouse and human embryos, as well as mouse brain in vivo.

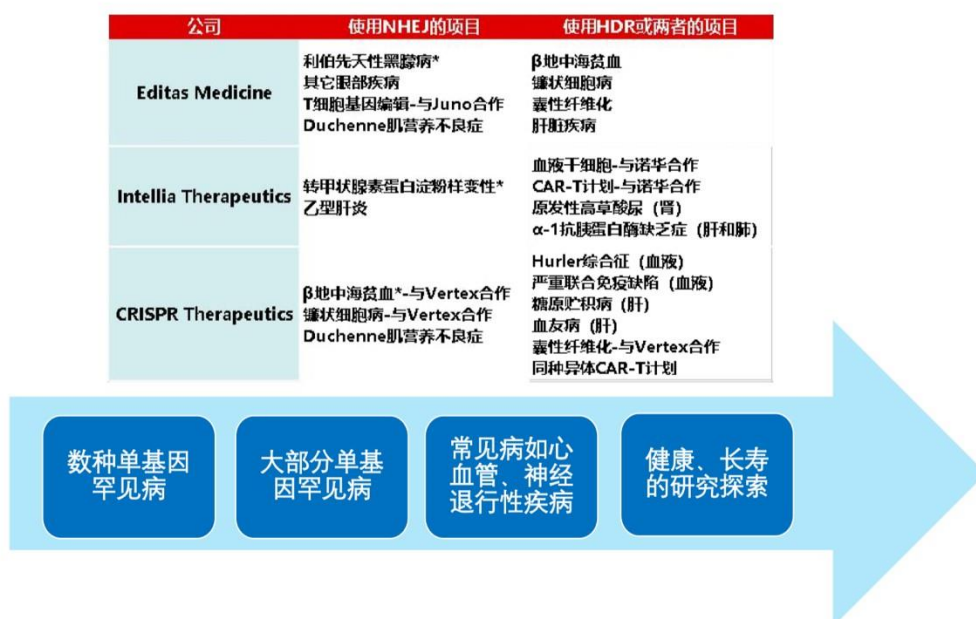
ii.递送载体效率的优化



iii.脱靶情况

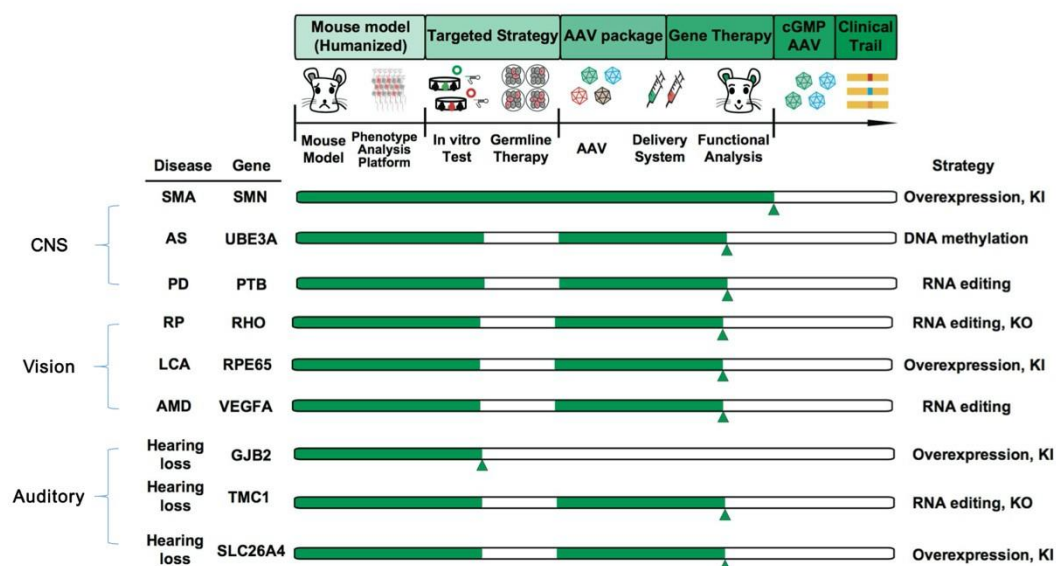
7. 基因治疗现状及展望

基因治疗现状及展望



Ps: 最后还有辉大治疗的 pipeline

Yang lab Gene therapy Pipeline



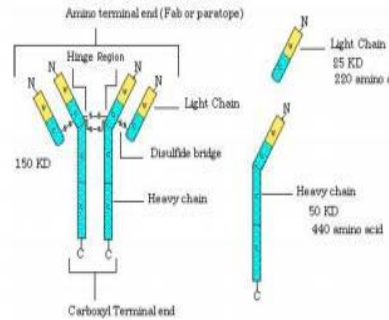
2 孙兵 抗体工程

By 生化所

一、基本概念

1. 免疫球蛋白的基本结构

- ◆ 四肽链结构，链间二硫键连接
- ◆ 两条重链（H）和两条轻链（L）
- ◆ 每条肽链的 N 端为可变区（V），其余为恒定区（C），肽链之间由二硫键连接。



2. 重链&轻链

(1) 根据重链分类：

- ◆ 根据重链靠近羧基末端氨基酸组成及排列顺序不同

将重链分为 5 种： γ 、 α 、 μ 、 δ 、 ϵ

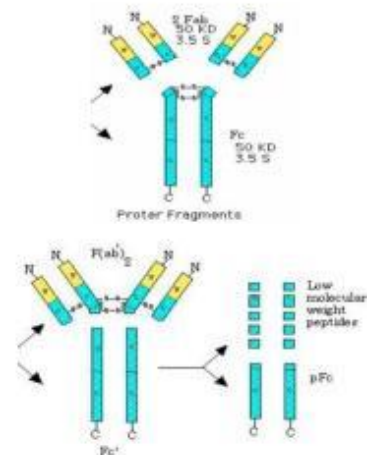
- ◆ 根据重链组成不同，将 Ig 分为五类：IgG、IgA、IgM、IgD、IgE

(2) 根据轻链分型： κ 、 λ 型

- 天然 Ig 分子中，重链同类，轻链同型

3. 水解片段

- ◆ 木瓜蛋白酶(papain)水解 IgG：得到两个相同的 Fab 段(特异性结合)和一个 Fc 段(发挥功能)。



- ◆ 胃蛋白酶(pepsin)裂解 IgG：得到一个具有双价活性的 F(ab')₂ 段和若干个小分子多肽碎片 (pFc')

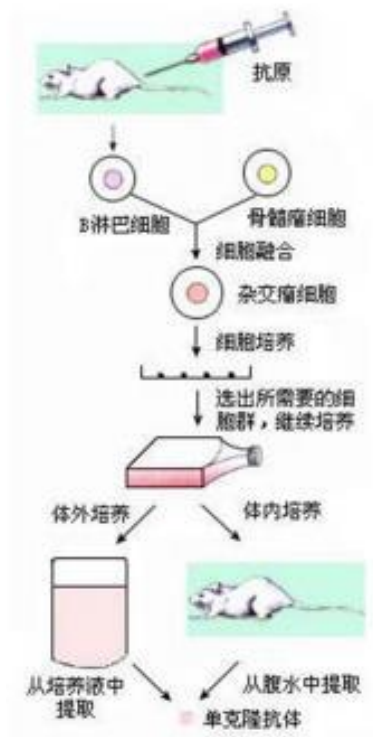
4. 多克隆和单克隆抗体制备

【多克隆抗体】多克隆抗体的制备较为简单，只需将抗原（纯度越高越好）直接注入动物体内进行免疫，经过 3-4 次免疫，ELISA 检测其效价合格后，收集血液，离心得到上清，纯化后就能得到多克隆抗体。

【单克隆抗体】用杂交瘤技术制备抗小分子多肽单克隆抗体的主要步骤如下：

A. 获得免疫的 B 淋巴细胞

用此小分子多肽作为抗原注射进小鼠体内，使其淋巴细胞产生相应的抗体。对小鼠做三次免疫，并在取其脾脏的前三天做一次加强免疫，可使得到的抗体亲和力较好，此过程中不用分离脾脏中的 B 细胞和 T 细胞，因为与骨髓瘤融合的过程本身就是一个选择 B 细胞的过程。



取与免疫小鼠同系的小鼠的骨髓瘤细胞,可用不分泌型和酶缺陷型,现多用酶缺陷型,缺乏 TK (胸腺嘧啶核苷激酶) 和 HGPRT (次黄嘌呤鸟嘌呤 磷酸核糖转移酶)。

B. 融合 可用化学融合法和电融合法等。常用的化学融合剂为 PEG (聚乙二醇), 其分子量越大,融合率越高,但同时毒性也越强,故用作细胞融合剂的 PEG 一般选用分子量为 4000 及以下的,在 pH8.0~pH8.8 左右的碱性环境中。电融合用电脉冲,无毒且融合率也高。

C. 选择性培养 选择性培养的目的是筛选融合的杂交瘤细胞,一般采用 HAT 选择性培养基 (培养基中加次黄嘌呤 HyPoxanthine H, 氨基喋呤 Aminoopterin A 及胸腺嘧啶 Thymidine T)。在 HAT 培养基中,未融合的骨髓瘤细胞因缺乏 TK 和 HGPRT,不能利用补救途径合成 DNA,而只能利用谷酰胺与尿核苷酸单磷酸合成 DNA,这一途径又被氨基喋呤所阻断,故不可避免的要死亡。

停用 HAT 培养基后,用 HT 培养基。未融合的 B 细胞和 T 细胞在正常培养的情况下都会自然消亡。

这样,只有融合的杂交瘤细胞由于从脾细胞获得了 TK 和 HGPRT,并具有骨髓瘤细胞能无限增殖的特性,因此能增殖。

D. 筛选 在 HAT 培养基中生长的杂交瘤细胞,只有少数是分泌预定特异性单克隆抗体的细胞,因此必须进行筛选。常用酶联免疫吸附测定 (ELISA),筛选出能产生所需单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞。

E. 克隆化 对于检测抗体阳性的杂交克隆应尽早进行克隆化,否则抗体分泌的细胞会被抗体非分泌的细胞所抑制。常用的克隆化方法有有限稀释法和 FACS (荧光激活分选仪) 分离法。

F. 大量繁殖

单克隆抗体的大量制备可用体外培养法和腹水法。

克隆化的细胞可以在体外进行大量培养,收集上清液而获得大量的单一的克隆化抗体。不过体外培养法得到的单克隆抗体有限,其不能超过特定的细胞浓度,且每天要换培养液。

而体内杂交瘤细胞繁殖可以克服这些限制,取同系小鼠,先在其腹腔注入降植烷进行预处理,1~2 周后 腹腔注入杂交瘤细胞,一周后有明显腹水产生。用这种方法制备的腹水抗体含量高,腹水中的杂蛋白也较少,便于抗体的纯化。

5. 各功能区作用

- ◆ VH 和 VL: 识别和结合抗原
- ◆ CH 和 CL: 同种异型的遗传标志
- ◆ CH2: 补体 C1q 结合位点, IgG 可通过胎盘
- ◆ CH3/CH4: 与多种细胞表面的 FcR 结合 (免疫调理, I 型超敏反应)

6. 免疫球蛋白功能

1) 中和作用: 免疫球蛋白的重轻链可变区能够识别并结合特定抗原,中和其毒性,并且与之形成沉淀或细胞集团,从而被吞噬细胞吞噬,阻止了病原体的入侵。

2) 活化补体: 溶解细胞或细菌; 联合调理作用 (免疫球蛋白重轻链恒定区的 CH2 段能够与补体结合,活化补体。补体是一种血清蛋白,存在于人和脊椎动物血清或组织液中,活化后具有酶活性,能够介导免疫应答和炎症反应。)

3) 结合 Fc 受体: 当抗体的 Fab 段识别并结合病毒感染细胞或肿瘤细胞表面的特定抗原, Fc 段与免疫细胞 (如 NK 细胞、巨噬细胞等) 表面的 Fc 受体结合,介导免疫细胞直接杀伤靶细胞。这一机制被称为 ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)。

另外,介导吞噬细胞吞噬特定抗原 (调理作用)。

4) 通过胎盘: 被动免疫

二、基因工程抗体的基本原理 (Antibody engineering)

1. 基因工程抗体：借助基因工程手段，将编码抗体的重链轻链可变区（保留主要与抗原结合的 CDR 功能区）的基因重组到真核表达载体上进行表达，从而形成的各种功能抗体。

- ◆ 重点：如何获得重轻链可变区的基因→CDR (complementarity determining regions)，找到 CDRs 就可知道接合头部序列。

2. 分类

- 1) 人源改造抗体
- 嵌合抗体 (chimeric antibody)：人源性 60~70%；
 - 人源化抗体 (humanized antibody)：人源性 90~95%
 - 完全人源抗体 (Full human antibody)：利用转基因小鼠、噬菌体抗体库技术、稳定性和融合率高的人骨髓瘤细胞或者 B 细胞永生生化技术制备完全人源抗体

2) 小分子量抗体

A. Fab 片段

B. 单链抗体 (single chain antibody, scFv)、双链抗体、三链抗体

基因工程抗体的最小单位：scFc (可变区)，必须保留

C. 微型抗体 (minibody, 两个 scFv 与抗体 CH3 区连接)

D. 其他形式抗体 (细胞内抗体、催化抗体、免疫脂质体、最小结合单位等)

E. Nanobody：驼类产生的单链抗体

3) 双特异性抗体 (Bispecific antibody)

- ◆ 同时结合两种不同的抗原 (靶点)
- ◆ 应用于肿瘤免疫治疗、感染性疾病治疗及药物递送等

4) 抗体药物偶连 (ADCs, Antibody-drug conjugates)

- ◆ ADCs 是由抗体与具有生物活性的细胞毒 (抗癌) 药物相连接组成的复杂分子
- ◆ ADC 中抗体部分靶向癌细胞，细胞毒性药物被释放并杀死癌细胞
- ◆ Kadcyla: anti-HER2+DM1

3. 抗体药物在研发与应用中存在的问题：

- A. 一般必须用小鼠骨髓瘤制备单抗，故所得鼠源性单抗，必须人源化，在临床上可减少异源性蛋白所引起的过敏反应和增加疗效；
- B. 鼠源抗体人源化后，抗体效价明显降低，导致临床疗效降低；
- C. 全长抗体药物分子量较大，进入胞内、穿过生理屏障或者进入肿瘤微环境发挥作用可能会受限
- D. 临床治疗需要大量的抗体 (克级)，故需要生物反应器制备抗体。由于抗体的研发及生产成本较高，造成药物价格较高。

4. 基因工程抗体目的：

- A. 人源化减小鼠/兔源性成份，仅保留抗体的抗原结合能力，降低 HAMS 反应 (human against mouse syndrome)
- B. 工程化，易于大规模生产和应用于临床。
- C. 小分子量抗体组织穿透量强，具有独特的理化性质。
- D. 双特异性抗体发挥独特生理功能

5. 基本原理：借助基因工程手段，将编码抗体的重轻链可变区基因重组到真核表达载体上并进行抗体的重组表达。

6. 基因工程抗体的表达

- 1) 原核细胞和酵母可以用于表达小分子量抗体和抗体片段
- 2) 大部分完整抗体和双特异性抗体等需要在 CHO 等哺乳动物细胞中表达

3) 利用完整的动植物体通过转基因的方法表达外源蛋白；如利用转基因烟草生产抗狂犬病毒抗体，抗 Ebola 病毒抗体。

7. 基因工程抗体的优点和缺点

- ♦ 优点：
 - A. 不受动物品系（species）和抗体类型（isotype）的限制。
 - B. 利用嵌合抗体，使动物来源抗体人源化，减少潜在的抗原表位，降低抗体药物免疫原性，增强抗体的疗效。
 - C. 全人源化抗体，可以降低抗体的异源性和免疫源性，最大化提升抗体的疗效。
- ♦ 缺点：不成熟的人源化技术活亲合力成熟技术可能带来更加严重的抗药抗体反应

三、基因工程抗体制备的主要方法：

1. 人鼠嵌合抗体：

- ♦ 原理：利用基因重组技术，把鼠抗体的重轻链可变区部分与人抗体重轻链恒定区的进行重组，减少鼠源结构，增加人源结构，而保持抗体与原抗原的特异性结合。（可变区域代表特异性）
- ♦ 优点：既保留了抗体与抗原结合的特异性，又大大降低了鼠源抗体的免疫原性。
- ♦ 缺点：
 - A. 鼠抗体部分亦能作为一种异种抗原，多次反复使用在人体产生抗体及过敏反应（HAMS 反应，human against mouse syndrome）。
 - B. 嵌合抗体可保持特异性结合和外源性抗原降低，但亲和力明显下降。
- ♦ 制备方法：
 - A. 分泌单一抗体的效应 B 细胞与骨髓瘤细胞融合后，获得相应的杂交瘤细胞株。
 - B. 借助 RT-PCR，获得鼠单抗重轻链可变区的基因片段。

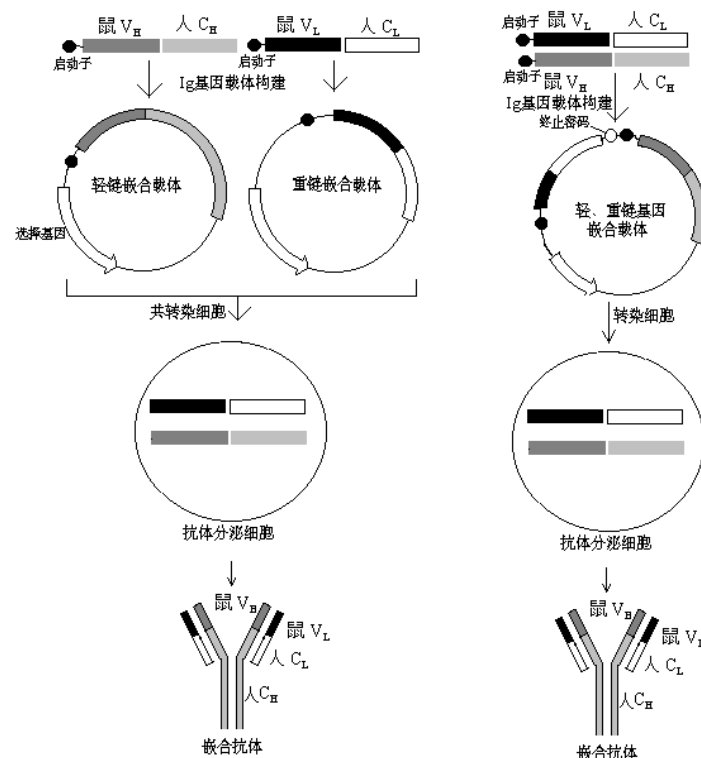
C. 酶切得到目的

基因片段后，将目的片段与克隆载体（T 载体）连接并以之转化原核表达系统。

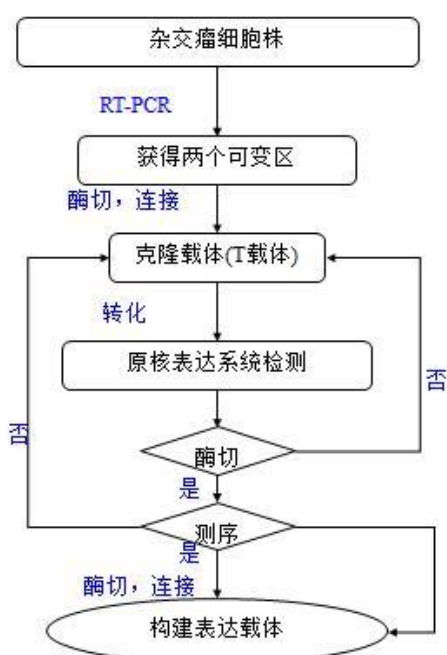
人鼠嵌合抗体的真核表达在 CHO 细胞（共转染模式和单载体转染模式）见图

D. 克隆载体在原核表达系统中扩增培养一段时间后，利用酶切、测序等手段检测载体是否携带目的片段。

E. 验证为阳性后，将目的基因片段插入含有人抗体重轻链恒定区基因的表



达载体，构建真核表达载体转染真核表达系统（如 CHO 细胞）。



2. 人源化抗体（CDR 移植抗体）：将鼠互补决定区（CDR）移植到人可变区框架上来将鼠单克隆抗体的完整抗原特异性和结合亲和力转移至人抗体，目的是更少的鼠源，更低的免疫原性。

3. 完全人源抗体（最多）

A. 噬菌体抗体库技术（Phage antibody library technique）

- 原理：把人的 Ig 重轻链可变区基因片段展示在噬菌体表面，组成抗体库，然后用抗原从抗体库中筛选特异性抗体。

- 流程：

- 通过 PCR 扩增编码 VH 和 VL 结构域的 DNA 序列
- VH 和 VL 结构域随机配对，增加了文库中的功能多样性
- 使用掺入限制性位点的引物通过 PCR 扩增 scFV 序列
- 克隆到噬菌粒载体中
- 通过电穿孔转化到大肠杆菌中
- 用辅助噬菌体 rescue 后，抗体的随机组合文库可在噬菌体表面展示出来

- 优点：

- 通过噬菌体把抗体的表型和基因型相偶联，易进行分子克隆和基因操作；
- 可以直接筛选大量不同特异性的抗体，并通过感染宿主菌进行扩增；
- 可在体外直接制备针对抗原特异性的人源化抗体片段；
- 由于其高效的抗原筛选系统，使特异性抗体得到富集，高度简化了筛选过程，增加了筛选容量，扩大了筛选范围。

- 局限/缺点：

- 从未经免疫动物的抗体库获得的抗体亲和力不高，往往存在亲和力低，功能单一，稳定性差等不足
- 抗体库的来源影响筛选结果（免疫和正常人），且抗体库的容量不足以涵盖某种动物的抗体多样性。

B. 转基因小鼠（Transgenic mice）

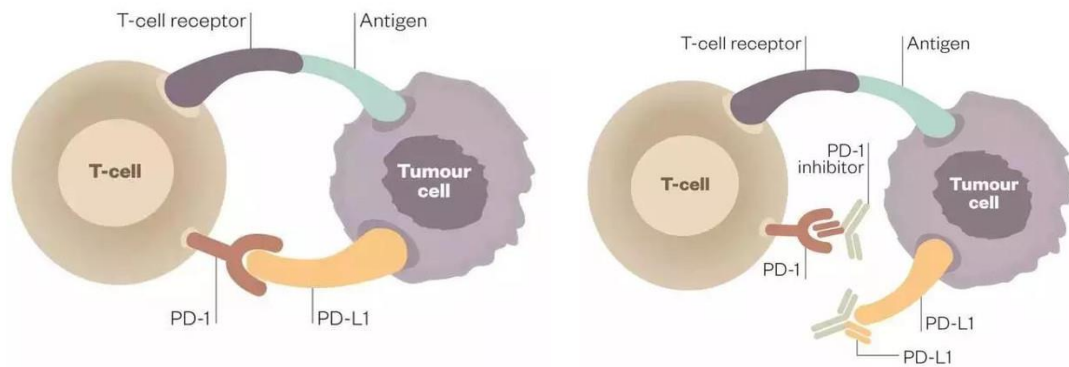
- ◆ 流程：
 - a) 首先获得编码 Ig 重轻链的基因剔除的小鼠。
 - b) 制备表达人的 Ig 重轻链的转基因小鼠。
 - c) 上二种小鼠回交，获得只表达人 Ig 重轻链的基因的小鼠。
 - d) 当用抗原免疫后，小鼠可产生完全人源抗体。
 - ◆ 优点：抗体的重轻链都是人源的，在临床应用中不会引起过敏反应。
 - ◆ 缺点：
 - a) 转基因小鼠免疫能力可能比较差，需要大剂量的抗原；
 - b) 由于遗传背景的不同，可能不产生相应的免疫应答反应；
 - c) 由于抗体是在小鼠体内装配，因而产生的单抗具有鼠糖基化模式，所以这些单抗最终并不是全人的；
 - d) 转基因小鼠表达的人 Ig 多样性较少；
 - e) 转基因小鼠造价高，保种困难，尚无法商业化。
- C. 用人的骨髓瘤细胞直接制备全人抗体
 - ◆ 关键点：建立好的人骨髓瘤细胞。
 - ◆ 优点：稳定性好、融合性高；方便、快捷，能够直接产生特异性和亲和力高的人源抗体
 - ◆ 缺点：人的效应 B 细胞与骨髓瘤细胞难以融合，且融合产生的杂交瘤细胞不稳定。
- D. B 细胞永生技术：
 - ◆ 原理：用 EB 病毒将人淋巴细胞永生可产生分泌抗体的 B 细胞克隆；或直接分离分泌抗体的 B 细胞，用 PCR 获得重轻链，构建全人抗体。
 - ◆ 特点：这一技术较为成熟，但是存在抗体分泌不稳定的缺点，限制了其应用。
- E. Platform for the development of human mAbs using single-cell RT-PCR：从外周血中分离记忆 B 细胞 (FACS)，即直接分离分泌特定抗体的人源效应 B 细胞，通过 RT-PCR 获得抗体重轻链编码基因，构建合适的真核表达载体制备全人抗体。

四、抗体工程的发展历史和应用

1. 抗体工程：就是指利用分子生物学、基因工程等手段对抗体进行各种不同的改造并在原核、真核细胞中表达制备的工程技术。
2. 抗体药物
 - ◆ 优点：市场巨大，前景广阔。
 - ◆ 应用领域：抗肿瘤、抗自身免疫病、抗感染为主。
 - ◆ 开发类型：人源化及全人为发展方向。
 - ◆ 目前单抗用作治疗药物的研究趋势为：
 - 1) 寻找新的分子靶点；
 - 2) 抗体的人源化；
 - 3) 偶联物分子的微小化；
 - 4) 单抗药物的高效化；
 - 5) 双特异性抗体以激活宿主效应细胞；
 - 6) 改变某些氨基酸以增加抗体的亲和力；
 - 7) 抗体导向的酶活化前体药物技术。

五、未来展望

肿瘤的抗体免疫治疗是一个重要方向：PD-1/PD-L1 抗体药物



重点及历年考题整理

1、基因工程抗体的基本原理

基因抗体：通过基因工程手段，保留抗体重轻链可变区中主要与抗原结合的 CDR（complementarity determining regions）功能区，而形成的各种功能抗体。

优点：1、不受动物品系（species）和抗体类型（isotype）的限制。2、利用嵌合抗体，使鼠源抗体人源化，减少潜在的抗原表位，增强抗体的疗效。3、全人源化抗体，可以降低抗体的异源性和免疫源性，最大化提升抗体的疗效。

缺点：抗体的亲和力减弱，与完整抗体结构相比，功能明显降低。

基本原理：借助基因工程手段，将编码 Ab 的重轻链可变区基因重组到真核表达载体上并进行表达。

全鼠抗体—嵌合抗体—人源化抗体—全人抗体

一般认为：人源化抗体包括嵌合抗体、CDR 移植抗体和全人抗体。主要应用在肿瘤治疗、自身免疫性疾病、器官移植、心脑血管疾病以及抗病毒等等。

2、基因工程抗体制备的主要方法：

1) 人鼠嵌合抗体：

原理：利用基因重组技术，把鼠抗体的重轻链可变区部分与人抗体重轻链恒定区的进行重组，减少鼠源结构，增加人源结构，而保持抗体与原抗原的特异性结合。（可变区域代表特异性）

缺点：1、鼠抗体部分亦能作为一种异种抗原，多次反复使用在人体产生抗体及过敏反应（HAMS 反应，human against mouse syndrome）。2、嵌合抗体可保持特异性结合和外源性抗原降低，但亲和力明显下降。

制备方法：1、获得鼠单抗重轻链可变区的基因片段。2、基因片段插入含有人 IgG 重轻链恒定区的表达载体。

2) 人源化抗体（CDR 移植抗体）：（更少的鼠源，更低的免疫原性）

原理：把鼠源抗体中的 CDR 区域（抗体特异性和结合特异性）插入到人抗体的可变区域中。

CDR grafting: exemplifies humanization. CDR residues from variable region of a mouse mAb are transferred to human antibody frameworks that have high sequence homology with the mouse counterparts.

humanization-advantage:

A、Murine mAbs have been extensively characterized and have desirable antiviral properties

and/or superior fully human mAbs are hard to obtain.

B、This viable approach is the classic and simplest strategy of humanization among many other available strategies, such as grafting specificity determining residues¹⁷.

C、The fact that nearly half of all US Food and Drug Administration (FDA)-approved therapeutic mAbs are humanized antibodies testifies to their safety and tolerance by humans.

3) 全人源抗体

制备方法:

A、转基因小鼠: 1、首先把小鼠编码 Ig 重轻链的基因剔除。2、制备表达人的 Ig 重轻链的转基因小鼠。3、上二种小鼠回交, 获得只表达人 Ig 重轻链的基因的小鼠。当用抗原免疫后, 小鼠可产生完全人源抗体。

B、噬菌体抗体库技术: 1、把人的 Ig 重轻链可变区基因片段展示在噬菌体表面, 组成抗体库。2、通过噬菌体把抗体的表型和基因型相偶联, 易进行分子克隆和基因操作。3、抗体库的来源影响筛选结果(免疫和正常人)。4、高通量筛选与抗原结合的抗体, 但亲和力低。

噬菌体抗体库技术是指利用分子生物学手段将外源 DNA 片段插入噬菌体基因, 与编码噬菌体外壳蛋白的基因相连接, 通过侵染宿主, 在噬菌体表面表达成融合蛋白的过程, 经过对目标分子如蛋白、糖蛋白、病毒及小分子物质等的特异性结合筛选过程, 从而富集得到针对的目标分子的噬菌体展示抗体。(类似于噬菌体展示, 需要“吸附—洗脱—扩增”多次循环)

C、用人的骨髓瘤细胞直接制备全人抗体

D、B 细胞永生技术: 用 EB 病毒将人淋巴细胞永生可产生分泌抗体的 B 细胞克隆。这一技术较为成熟, 但是存在抗体分泌不稳定的缺点, 限制了其应用。或直接分离分泌抗体的 B 细胞, 用 PCR 获得重轻链, 构建全人抗体。

E、单个 B 细胞 RT-PCR

优点: 1、方便, 常规分子克隆实验条件; 2、快速, 条件优化后仅需要 30 天; 3、高通量, 针对抗原特异抗体库; 4、亲和力和特异性: 亲和力很高, 获得针对抗原各表位的抗体; 5、适用通过疫苗治疗的各种疾病。

缺点: 慢期炎症或致死性病原体如 HIV, 癌症和自身免疫病方面应用受到限制。

考题

1.请比较说明三种主要制备人源化抗体方法的优缺点

制备人源化抗体主要有以下三种方法, 对其优缺点分述如下:

(1) 嵌合抗体

利用基因重组技术, 把人抗体和鼠抗体的部分结构进行重组, 减少鼠源结构, 增加人源结构, 而保持抗体与抗原的特异性结合。

优点: 既保留了抗体抗原结合的特异性, 又大大降低了鼠源抗体的免疫原性。

缺点: (1) 嵌合抗体的亲和力始终弱于鼠源的单克隆抗体;

(2) 鼠抗体亦能作为一种抗原, 这类抗体的鼠源性并没有完全消除掉, 多次反复使用在人体产生抗体及过敏反应 (HAMS 反应)。

(2) 完全人源抗体

首先把小鼠编码 Ig 重轻链的基因剔除。制备表达人的 Ig 重轻链的转基因小鼠。上二种小鼠回交, 获得只表达人 Ig 重轻链的小鼠。用抗原免疫后, 小鼠可产生完全人源抗体。

优点: (1) 功效优于其他人源化抗体制备方法; 小鼠识别抗原和产生抗体的系统保持完整;

(2) 抗体在体内产生，保证正常的装配和成熟过程，故保证了具有较高的靶亲和力和。

缺点：小鼠造价高，保种困难。尚无法商业化

(3) 噬菌体抗体库技术

在噬菌体外壳表达抗体片段，组成抗体库。将多肽或蛋白以融合蛋白的形式表达在噬菌体表面，并将其编码基因包含在噬菌体内。

优点：(1) 通过噬菌体把抗体的表型和基因型相偶联，易进行分子克隆和基因操作；

(2) 可以直接筛选大量不同特异性的抗体，并通过感染宿主菌进行扩增；

(3) 可在体外直接制备针对抗原特异性的人源化抗体片段；

(4) 由于其高效的抗原筛选系统，使特异性抗体得到富集，高度简化了筛选过程，增加了筛选容量，扩大了筛选范围。

缺点：(1) 从未经免疫动物的抗体库获得的抗体亲和力不高，往往存在亲和力低，功能单一，稳定性差等不足

(2) 抗体库的来源影响筛选结果（免疫和正常人），且抗体库的容量不足以涵盖某种动物的抗体多样性。

2.设计一个制作抗小分子多肽单克隆抗体的流程

用杂交瘤技术制备抗小分子多肽单克隆抗体的主要步骤如下（示意图见下图）：

1、获得免疫的 B 淋巴细胞

用小分子多肽作为抗原注射进小鼠体内，使其淋巴细胞产生相应的抗体。对小鼠做三次免疫，并在取其脾脏的前三天做一次加强免疫，可使得到的抗体亲和力较好，此过程中不用分离脾脏中的 B 细胞和 T 细胞，因为与骨髓瘤融合的过程本身就是一个选择 B 细胞的过程。

取与免疫小鼠同系的小鼠的骨髓瘤细胞，可用不分泌型和酶缺陷型，现多用酶缺陷型，缺乏 TK（胸腺嘧啶核苷激酶）和 HGPRT（次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶）。

2、融合

可用化学融合法和电融合法等。常用的化学融合剂为 PEG（聚乙二醇），其分子量越大，融合率越高，但同时毒性也越强，故用作细胞融合剂的 PEG 一般选用分子量为 4000 及以下的，在 pH8.0~pH8.8 左右的碱性环境中。电融合用电脉冲，无毒且融合率也高。

3、选择性培养

选择性培养的目的是筛选融合的杂交瘤细胞，一般采用 HAT 选择性培养基（培养基中加次黄嘌呤 HyPoxanthine H，氨基喋呤 Aminoopterin A 及胸腺嘧啶 Thymidine T）。在 HAT 培养基中，未融合的骨髓瘤细胞因缺乏 TK 和 HGPRT，不能利用补救途径合成 DNA，而只能利用谷酰胺与尿核苷酸单磷酸合成 DNA，这一途径又被氨基喋呤所阻断，故不可避免的要死亡。

停用 HAT 培养基后，用 HT 培养基。未融合的 B 细胞和 T 细胞在正常培养的情况下都会自然消亡。

这样，只有融合的杂交瘤细胞由于从脾细胞获得了 TK 和 HGPRT，并具有骨髓瘤细胞能无限增殖的特性，因此能增殖。

4、筛选

在 HAT 培养基中生长的杂交瘤细胞，只有少数是分泌预定特异性单克隆抗体的细胞，因此必须进行筛选。常用酶联免疫吸附测定（ELISA），筛选出能产生所需单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞。

5、克隆化

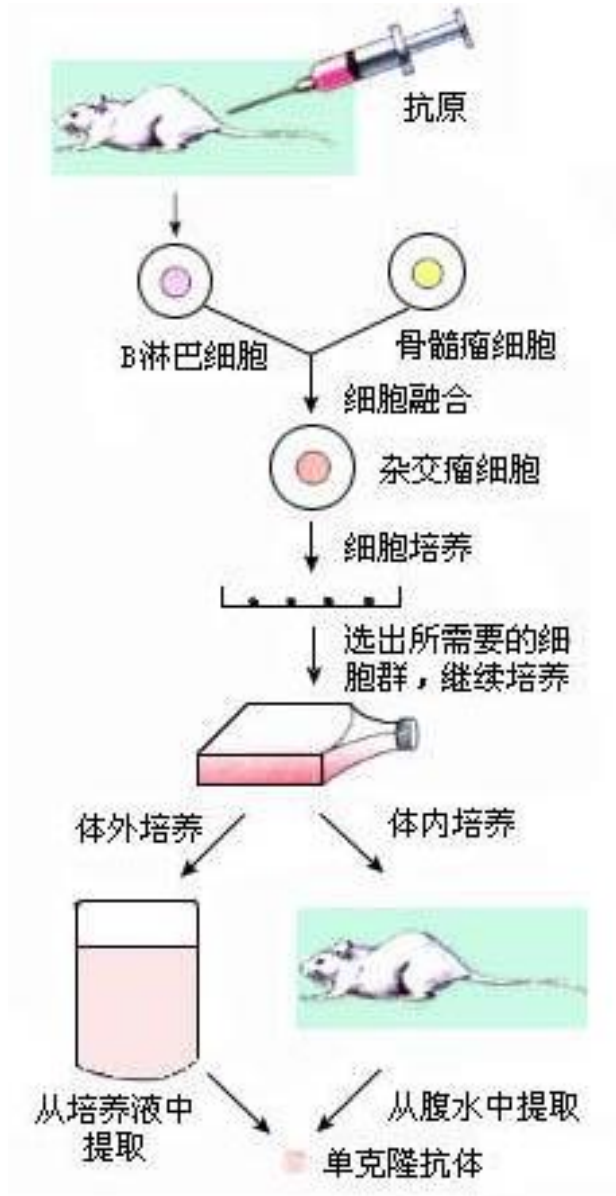
对于检测抗体阳性的杂交克隆应尽早进行克隆化,否则抗体分泌的细胞会被抗体非分泌的细胞所抑制。常用的克隆化方法有有限稀释法和 FACS（荧光激活分选仪）分离法。

6、大量繁殖

单克隆抗体的大量制备可用体外培养法和腹水法。

克隆化的细胞可以在体外进行大量培养,收集上清液而获得大量的单一的克隆化抗体。不过体外培养法得到的单克隆抗体有限,其不能超过特定的细胞浓度,且每天要换培养液。

而体内杂交瘤细胞繁殖可以克服这些限制,取同系小鼠,先在其腹腔注入降植烷进行预处理,1~2 周后腹腔注入杂交瘤细胞,一周后有明显腹水产生。用这种方法制备的腹水抗体含量高,腹水中的杂蛋白也较少,便于抗体的纯化。



3 廖泽鸿 药理学实验技术

By 药物所 肖剑 李昌耀

Part 1 知识点整理

1. 简述药理学在生命科学研究中的地位和作用

地位：药理学是研究药物与机体(含病原体)相互作用及作用规律的学科，是连接医学、药学、分子细胞生物学等生命科学的桥梁学科，也是研究分子、细胞、组织、整体(动物和人体)水平及其药物的实验科学。

作用：药理学发现、揭示、阐明新的生命现象和规律，并为其它生命科学研究探索提供重要的科学依据和研究方法(基础研究)，与 RNA 干扰、基因敲除/过表达等相似，以药物分子作为工具，根据其产生的特定作用/效应，可以揭示新的生命现象或规律。药理学阐明药物的作用及作用机制，为临床合理用药、发挥药物最佳疗效、防治不良反应提供理论依据(临床指导)；药理学可研究开发新药，发现药物新用途(新药研发)。

药理学研究促进生命科学发展的典型事例(举例)

- 1) 吗啡镇痛与成瘾机制研究与阿片受体
- 2) 青霉素与细胞壁结构
- 3) 喜树碱抗肿瘤作用机制与拓扑异构酶 I
- 4) 长春碱类/紫杉醇抗肿瘤作用机制与微管聚合和解聚

2. 简述药物的量效关系曲线和时量关系曲线及其意义

药物的量效关系是指药物的药理效应与剂量在一定范围内成比例，以效应强度为纵坐标、以药物剂量或药物浓度为横坐标作图得到药物的量效关系曲线。

药物的药理效应根据性质可分为量反应和质反应：

量反应(graded response)指药物效应的强弱呈连续增减的变化，可用具体数量或最大反应的百分率表示；

质反应(quantal response)指药理效应不随药物剂量或浓度的增减呈连续性量的变化，而是表现为反应性质的变化，质反应以阴性或阳性、全或无的方式表现，其研究对象为一个群体。

量反应量效曲线中的一些重要参数可以评价药物作用特性：

最小有效量/最低有效浓度：能够引起效应的最小药量或最小药物浓度；

最大效应：随着剂量或者浓度的增加，效应也增加，但是当效应增加到一定程度后，若继续增加药物的剂量或者浓度其效应不再增强，这一药理效应的极限即为最大效应，也称效能；

半最大效应浓度(EC₅₀)：能够引起 50%最大效应的浓度；

效价强度：是指能引起等效反应(一般采用 50%效应量)的相对浓度或剂量，其值越小则强度越大。

质反应量效曲线中的一些参数可以评价药物的安全性：

半数有效量(ED₅₀)：能够引起 50%实验动物出现阳性反应时的药物剂量；

半数致死量(LD₅₀)：能够引起 50%实验动物死亡时的药物剂量；

治疗指数(TI): 药物的 LD_{50}/ED_{50} 的比值, 常用来表示药物的安全性;

药物安全性评价指数: 治疗指数大的药物相比较治疗指数小的药物安全。但以治疗指数来评价药物的安全性并不完全可靠, 因为药物的有效剂量与致死剂量之间存在重叠。

安全范围: $ED_{95} \sim TD_5(LD_5)$ 间距;

可靠安全系数: $CSF=LD_1/ED_{99}$ 。

药物的时量关系是指体内药量随时间而变化的过程, 是药动学研究的中心问题。药物的时效关系是指药物效应随时间而变化的过程。以时间为横坐标, 体内药量或药物效应为纵坐标作图, 即得到药物的时量关系曲线或时效关系曲线, 两者通常平行。

单次给药时量关系曲线的重要参数可以评价药物的代谢特性:

峰浓度: 一次给药后的最高浓度, 此时吸收与消除达到平衡;

达峰时间: 从给药时至峰浓度的时间;

曲线下面积(AUC): 反映进入体循环药物的相对量;

消除半衰期($T_{1/2}$): 血浆药物浓度下降一半所需的时间, 反映药物消除的速度。

3. 简述药物的一般作用机制

药物分子与目标细胞组织等中的靶分子、基团、残基或者原子结合, 形成药物-靶点复合物, 进一步发挥相应的治疗作用, 治疗作用可以是细胞、组织、器官、系统或者整体水平的, 当药物分子与非目标细胞或者组织中的靶点相结合, 引起相应的生物学效应则被称为不良反应, 而这是药物作用中应提高选择性和特异性尽量避免的。药物与靶分子、基团、残基、原子水平结合的专一性称为药物作用的特异性; 药物在目标细胞、组织、器官、组织发生作用, 称为药物的选择性。

4. 简述通用性和专用性药理学实验技术的基本特点

通用性药理学实验技术的特点:

- 1) 强调通用性: 即各种疾病、生理功能等的研究均适用
- 2) 遵循药理学实验设计的基本原则: 重复、随机、对照
- 3) 分子水平: 药物、靶点、非靶点、信号转导、分子间相互作用、提取与纯化、分子生物学操作
- 4) 细胞水平: 细胞培养、数量/形态/功能检测、细胞内组分分级分离、转染、克隆、遗传学操作、流式、显微镜术、免疫组化
- 5) 组织器官水平: 离体、切片、免疫组化、显微镜术
- 6) 整体水平: 给药技术

专用性药理学实验技术的特点:

- 1) 专用性: 适用于特定组织、器官、系统发生的疾病或生理功能的研究
- 2) 专用的实验模型: 高血压模型、糖尿病模型、裸鼠移植瘤模型等
- 3) 专用的实验仪器设备: 血压计、膜片钳等
- 4) 专用的实验评价指标: 血压、瘤体积等

5. 简述药理学实验设计的基本原则

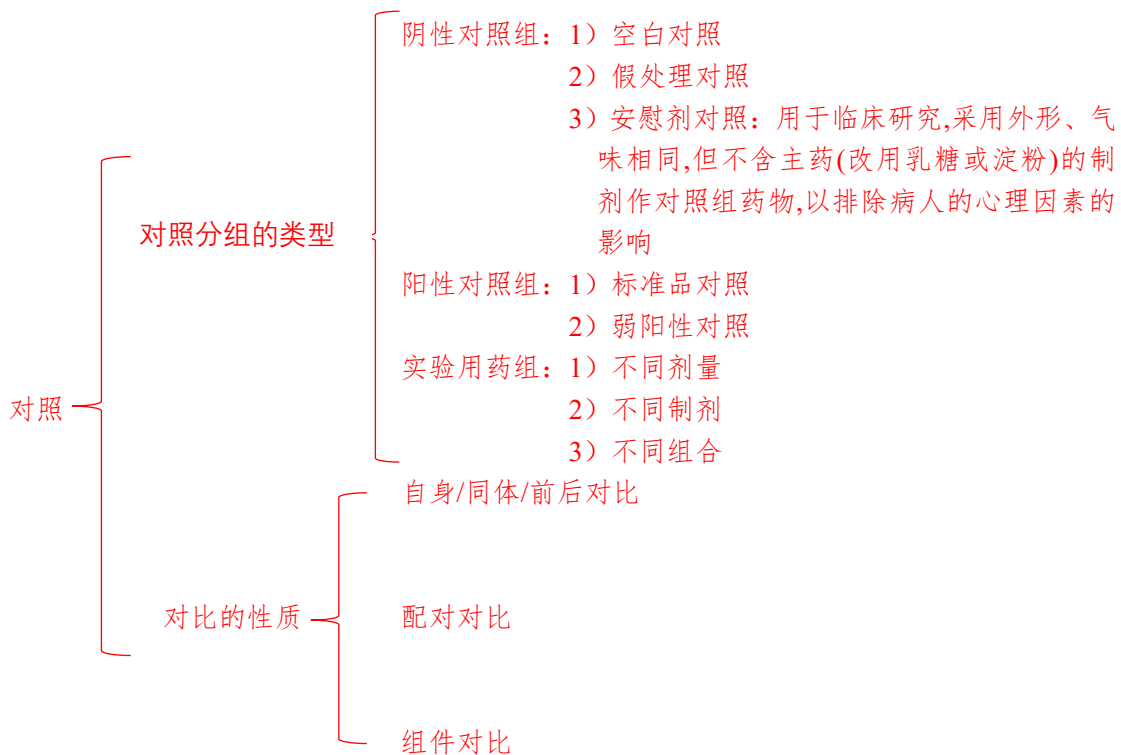
药理学实验设计的基本原则包括: 重复、随机、对照。

重复: 两方面内容: 良好的重复稳定性(或称重现性)、足够的重复数。有足够的重复数才会取得较高的重现性; 为了得到统计学所要求的重现性, 必须选择相应的适当的重复数。

统计学中的显著性检验规定的 $p < 0.05$ 及 $p < 0.01$ 反映了重现性的高低;“p”表示不能重现的概率。保证实验重复数的数量和质量。

随机:指每个实验对象在接受处理(用药、化验、分组、抽样等等)时,都有相等的机会,随机而定。随机可减轻主观因素的干扰,减少或避免偏性误差,是实验设计中的重要原则之一。随机抽样的方案有单纯随机、均衡/分层随机、均衡顺序随机。

对照:“对照”是比较的基础;对照应符合“齐同可比”的原则,除了要研究的因素(如用药)外,对照组的其他一切条件应与给药组完全相同,才具有可比性。



Part 2 历年考题汇总 (注: 以下往年考题为以前上课的王逸平老师所出, 仅供参考, 现在上课的缪泽鸿老师去年出过题)

一、简述受体的功能与特性, 以及放射配体受体结合试验的应用 (2004, 2015)

简述受体的特点, 并举例说明受体与配体结合试验的测定方法。(2005)

答:

1、概念: 受体是细胞在进化过程中形成的细胞蛋白组分, 是一种能够识别和选择性结合某种配体 (信号分子, 周围环境中某种微量化学物质) 的大分子, 通过信号转导作用与放大系统, 将胞外信号转换为胞内化学或物理的信号, 触发随后的生理反应或药理效应, 即表现为生物学效应。

受体存在于细胞膜、胞浆、细胞核中, 类型包括: 门控离子通道型受体, G 蛋白偶联型受体, 具有酪氨酸激酶活性受体和细胞内受体等。受体与配体的结合是化学性的, 二者通过范德华力、离子键、氢键等分子间的吸引力结合。

2、特点: 受体一般至少包括两个功能区域, 与配体结合区域及产生效应区域, 分别具

有结合特异性和效应特异性。其特点有

1) 特异性: 对配体具有高度选择性, 这种选择性是由分子的几何形状决定的, 与其在空间结构上互补, 但并不是简单的一对一关系, 不同细胞对同种配体可能具有不同受体。

2) 饱和性: 受体在生物体内的数量是有限的, 与其配体的结合能力有限。受体-配体结合曲线 (Scatchard 曲线) 为矩形双曲线, 增加配体浓度, 可使受体饱和。

3) 可逆性: 受体与配体结合后可解离, 可置换。

4) 高亲和性和敏感性: 受体具有极高的识别能力。

5) 特定的作用模式: 受体在细胞内分布, 从数量到种类, 均有组织特异性, 并有特定的作用模式, 提示某受体与配体结合后, 能引起特定的生理效应。

3、功能: 1) 识别和结合; 2) 信号转导; 3) 产生相应的生理功能

4、放射配体受体结合试验:

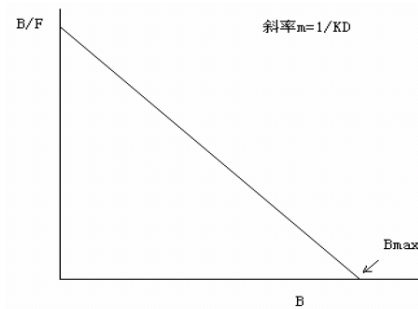
原理: 药物与受体结合位点间的相互作用, 遵守质量作用定律。利用不同浓度的放射性配基与一定量的受体结合, 即可以用数学作图推导出受体含量, 并计算出解离常数作为受体与配基亲和力的一个指标。

如果放射性配基浓度足够大, 受体全部被其结合, 这时的放射性配基的结合量即反映出受体含量, 我们将其称为最大结合量, 以 B_{max} 表示。若以 B 代表与受体结合的配基量, F 代表配基浓度, KD 代表解离常数, 根据 Clark 受体理论:

• $B = B_{max} \cdot F / (F + KD)$ B 与 F 作用是一条直角双曲线

• 将 $B = B_{max} \cdot F / (F + KD)$ 变形得: $B/F = B_{max} / KD - B / KD$

从图中可以读出 B_{max} , 即受体的最大结合量, 以及 KD 解离常数



2 一个配基一种受体情况下的Scatchard作图

放射配体结合法的应用领域:

- 阐明药物作用机制;
- 新药设计和药物筛选;
- 探讨疾病的病因, 发病机理, 提高临床合理用药和诊断水平;
- 测定组织或血液中药浓度;
- 探寻新的受体, 受体亚型和内源性配体.

5、受体与配体结合试验的测定方法

1) 受体与配体结合试验常用放射性配体结合法(RBA)进行测定, 放射配体结合法原理为: 利用受体和配体结合的高度特异性以及放射性核素测量的高灵敏度的特点, 用放射性核素标记配体, 在一定的条件下, 使其与受体结合, 形成受体-配体复合物, 通过测量此受体-配体复合物的放射活性, 达到了了解受体结合活性的目的。

2) 近年来新出现的一种研究受体-配体相互作用的方法是亲和磁共振法 (affinity NMR), 它的基本前提是当配体与受体结合时, 该低分子量配体的扩散速率发生明显的变化, 其结果是结合和非结合配体的扩散系数明显不同, 从而允许采用 PFG 实验 (PFG 实验常用于测定分子的扩散系数), 从该配体和众多与靶蛋白无结合作用的分子的混合物中对该配体进行识别。

该方法已经成为研究小分子配体和生物大分子相互作用的一种非常重要的手段。可检测小分子配体信号在作用过程中的变化以识别药物分子, 是核磁共振进行药物筛选的主要方法

之一。但与其他技术相比，NMR 方法在筛选混合物中的应用受到其相对不灵敏的限制。

3) 还有一种测定受体-配体作用是通过测量其作用力来完成的，是原子力显微技术 (atomic force microscopy, AFM)。该技术可提供在内力及外力影响下受体-配体之间相互作用的动态变化信息。AFM 是作为一种成像工具而设计的，还能以力扫描方式进行操作。在这种力模式下，它能以 10^{-12} 牛顿的精度测量两相对表面之间的作用力。在受体-配体间作用力的研究中，配体被偶连于的 AFM 弹性悬臂表面，受体则被固定于适当的基底表面。在悬臂接近和离开基底的过程中，通过悬臂的偏折便可测得受体-配体间的作用力。

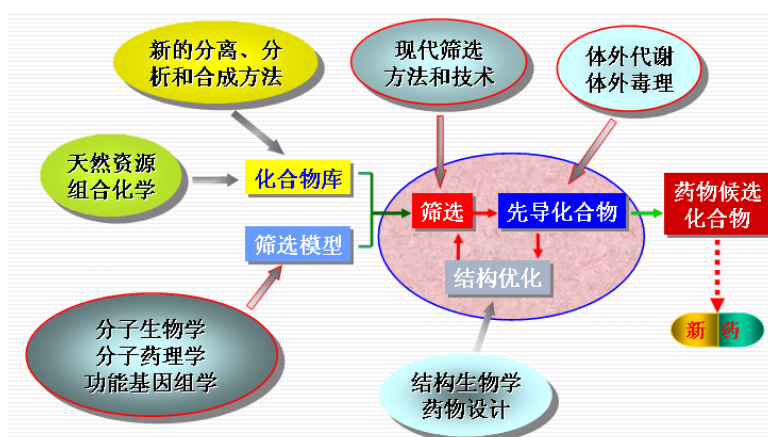
AFM 作为检测受体-配体间相互作用的一种超高灵敏度的力传感器，已应用于对生物素-链亲和素复合物之间作用力的测量，红细胞的亲和力成像，钙离子通道识别，活体细胞上钙通道拮抗剂与受体之间结合力的测量等研究中。

二、简述衡量一个新药效果及安全性的指标有哪些？

答：药效、阈剂量、效能、效价、半数有效量 (ED_{50})、半数致死量 (LD_{50})

三、简述一个新药产生的流程，举例说明。

流程：根据下图总结



技术：计算机辅助的药物设计、生物信息学（基因组测序——序列分析及定位——功能基因组——蛋白质组——靶标蛋白确证及结构模建）、高通量筛选技术、遥测实验系统、激光扫描共聚焦显微镜测定技术等。

内容：临床前药学研究 ➡ 临床前药理毒理学研究 ➡ 临床研究

四、先导化合物的优化的目的是什么？主要有哪些方法，请举例说明。

答：提高先导物对靶点的专一性，优化化合物的药物动力学特性和生物利用度，在动物身上进行化合物的药效学试验。例子：神经氨酸酶抑制剂的设计。

五、简述药物的量效关系曲线和时量关系曲线及其意义。(2018，缪泽鸿老师)

4 于翔 定量荧光分析

By 生化所

I、色彩和亮度

一. 颜色, 亮度和灵敏度

1. 每个颜色的**亮度**的量度都是以黑白为尺度的。亮度是以从黑(0)到白(100)的百分数来量度的。在 0%的亮度时, 谈色调和饱和度都是没有意义的。我们一次只能对一种波长/颜色下的亮度进行量度, 且在实验条件下都是对亮度的一个相对值作比较的。

2. 人眼对**灰度图**比彩色图有更好的灵敏性。为了获得较好的灵敏度基本上所有的高级相机拍摄出来的图都是黑白的。

3. **颜色**用于区分不同的蛋白或染料; 亮度用于确定在不同条件下每种蛋白或染料的水平。我们是在可见光 400-700nm 的范围里, 取其中很具体的一个或一段波长, 在这个颜色里看荧光标记染料的亮度。不同的蛋白用不同的颜色标记, 定量的时候是每个颜色单独定量, **定量的是亮度**。

二. 荧光现象和荧光染料

1. 处于基态的荧光分子在受到光照射的时候, 可以吸收一个一定波长范围(激发光光谱)的激发光的光子, 之后跃迁到激发态, 经过振动旋转损失一定的能量, 在非常短的时间内再放出一个一定波长范围(发射光光谱)能量较小的光子, 回到基态。

2. 对于给定的一种荧光染料, 图表往往给出的是激发或发射峰位处的波长值。

三. 荧光显微镜

1. 光源

(1) 传统的荧光显微镜用**汞灯**作为光源。因为其激发的 **Peak** 和我们使用的染料很相似。

(2) **激光共聚焦显微镜**使用**激光**作为光源, 有单激光和多激光系统。激光的激发光是很特异的波长: 405 (近紫外), 488, 543, 633 (红外) nm。多激光器系统在可见光范围使用多谱线**氩离子**激光器, 发射波长为 457nm、488nm 和 514nm 的蓝绿光, **氮氛绿激光器**提供发射波长为 543nm 的绿光, **氮氛红激光器**发射波长为 633nm 的红光, 新的 405nm 半导体激光器的出现可以提供近紫外谱线, 但是小巧便宜而且维护简单。

2. 分光部件——滤光片

A. 激发光滤片 (excitation filter): 从光源中分析出所需的特定光谱, 只让一部分波长合适的激发光通过, 以激发标本产生荧光。

B. 双色滤光片 (分光镜) (dichroic mirror): **反射短波长的光线**, 让长波长的光线通透

C. 发射光滤片 (emission filter): **把标本上发出的荧光透过成像**, 将其它光阻挡不参与成像。

(2) 分类:

a bandpass 如果有比要看的東西波长更长的蛋白, 一定要选用bandpass

b longpass 所有荧光分子(蛋白, 染料)被激发而发射的光都可以收到, 但是只能用于最长波长的染料, 否则会出现串色。

例如GFP比RFP波长短, 只染GFP, 可以用longpass。但是GFP,RFP共存时, 虽然激发光主要是激发GFP, 但是如果RFP足够量也会激发一点, 如果用longpass emission filter, RFP也能看到就会串色。通常的做法是**分别激发分别收集**, 串色的概率会减小。即先在488通道激发GFP, 收集样本, 再激发RFP, 收集样本。另外, 做共定位时, 如果觉得两个蛋白亚细胞定位可能很像的话, 一般单独染很亮, 放到一起共定位比较有把握。

3.不串色的小贴士

- (1) 不要过分染色样本
- (2) Multitrack (多磁道): 分别激发和收集通道样本数据
- (3) 用合适的filter (longpass只能用于最长波长的染料)
- (4) 设置合适的对照: 在可见区分别染色

II.抗体染色和荧光

一. 基本组成

- 抗原: 蛋白A
- 一抗: 对抗原特异的一个抗体 (**determines specificity of staining**)
- 二抗: 带有不同荧光基团的一抗的抗体 (**determined channel/color through which protein A's location is detected**)

二. 抗体之间的相互干扰

要注意: 共定位时一抗和二抗不能来源于同一种动物。

三. 抗原抗体荧光标记

1. Western通常用的是结合了酶 (通常是辣根过氧化物酶) 的二抗

好处: 由于二抗上结合了酶, 一个酶上可以有很多酶反应, 呈现一个放大的过程。(一个抗原上可以结合多个一抗, 一个一抗上又可以结合多个二抗, 如果还是看不见可能有两个原因: 抗原很少或者一抗不好。)

坏处: 一般只有一个颜色, 很难两个颜色一起做。

2. ABC (Avidin-biotin complex, 即抗生物素蛋白-生物素复合物) for more amplification
一抗、二抗是一样的, 但二抗上连接的不是荧光基团, 是biotin。可以和带有biotin的avidin结合, 逐步放大信号, 最后加个酶或者荧光基团使信号被检测到。可以用于观察精确的亚细胞定位, 但是背景很高。
3. 有的时候可以把荧光基团直接标记在一抗或者蛋白上, 没有放大, 高特异性, 适于活细胞筛选

四. 常见的荧光染料

1. 细胞核染料: DAPI, PI, TOPRO, TOTO...2. 钙离子染料: Fura, Fluo3. 细胞膜染料: DiI, DiO (脂溶性的染料) 4. 突触膜染料: FM1-43, FM4-64 (活细胞突触前膜) 5. 细胞器染料: MitoTracker (活细胞细胞器的marker) 6. 细胞骨架染料: Phalloidin (F-actin) (细胞骨架marker)

五. 荧光蛋白的特点:

1. 没有放大作用2. 适于活细胞亚细胞定位成像3. 可用来制造转基因动物4. 可以标记感兴趣的细胞5. GFP与感兴趣蛋白的融合蛋白可以用于追踪感兴趣的蛋白, 但是较大的GFP标签可能会影响蛋白质的功能6. 可以同时使用很多颜色

图像的收集

一. 在对得到的图像进行定量分析时要注意: 1. 不同的蛋白质用不同的波长(颜色)标记, 对得到的图像进行定量分析时是分析其强度、形状和密度。2. 从荧光图像上得到的强度信息是相对和非线性的(一旦测定过程中出现参数的变化是无法通过换算的方法调回去的) 3. 在对不同的细胞不同的样品进行比较时, (cross sample comparison) 要有比较多的细胞才能确认所看到的现象是可靠的; 在对活的单一细胞进行 before and after treatment (如观察加入药物前后细胞状态的变化) 时, 注意要进行空白对照。4. 保存未经处理的原始数据, 便于以后进行再分析。5. 在进行数据采集过程中一些设置是不能被改变的, 包括: 采用相同的激光,

相同的激光强度，相同的 pinhole size ,放大倍数，相同的 scanning speed 和曝光时间、bin6.对初学者在实验过程中要不时的 re-check 参数，因参数可能会自发的发生改变。7.数据最好在同一天采完（因荧光的淬灭或者激光的变动都会对实验结果不利）

二.设计实验时要注意合适的 control 1.在每个实验中都要包含一个 control 例如：GFP 转染时，用周围未转染的细胞进行 control；加药实验要有 vehicle control 2.所有的样品同时分析，因为数据是相对的不是绝对的 3.在对抗体进行定量时，需要的抗体溶液现用现配。4.一个实验要有多次的重复实验进行验证（至少 3 次）5.分析实验时最好是 blind 6.一般来讲，细胞间的信息差别最少达到 20%才算有效

三.图像收集过程中一些要注意的问题 1.激光的强度：定量时，对波长 488 的激光一般功率要开到 3% 因为激光的功率越小，越不稳定。2.不同的 light path 会消耗掉 10%--15%的光，light path 一旦改变，不可能改回来。一般来讲 488 和 633 的激光不会有串色现象，可以同时收集；RFP 单独激发单独收集。3.要选同一物镜，Zoom 程度要一样，不然会影响分辨率。4.Scan speed 指在一点上停留的时间，采的越慢，噪音越小；Averaging 越多，信噪比越好，但是如果同时达到这两个条件会出现一定的问题，如：信号采集的时间会延长，样品会被漂白，同时 scan 的面积越小，越易漂白，因采集过程中会有荧光淬灭，采的面积越大，荧光淬灭就有较长的恢复时间 5.Detector gain 拉大会提高 laser intensity 6.把样品的 slice 叠在一起时要注意间隔要保持一定 7.对相机调节：曝光时间、gain 、bin（把多个点合并为一个点）

四.体视学（Stereology）

通过随机的计数样本上几个区域的一些部分，从而推断整体的数量。是基于几何学和统计学的原理。与 computed tomography 不同的是，后者要把整体完全三维重构出来。

V. 共定位

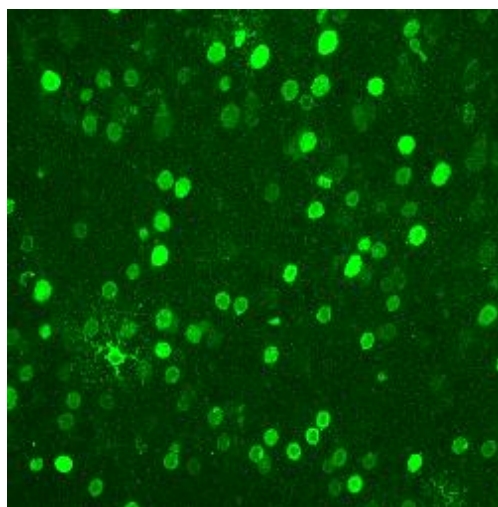
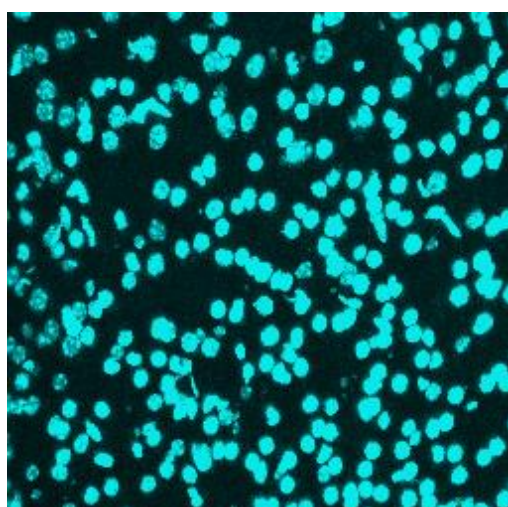
一.共定位过程中比较重要的几个概念

Resolution 与 N.A.和 wavelength 的关系：N.A. 越大，能分辨越近的两个点，分辨率越好；波长越短，分辨率越好。

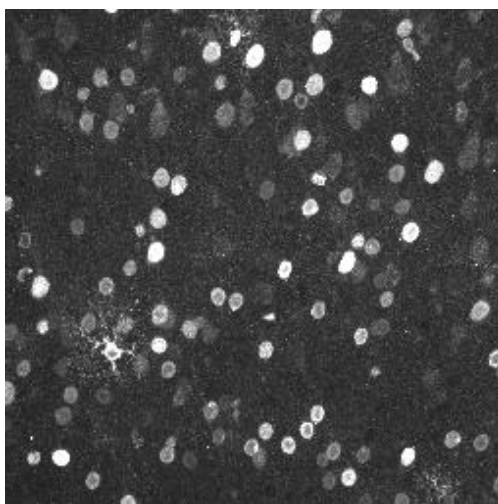
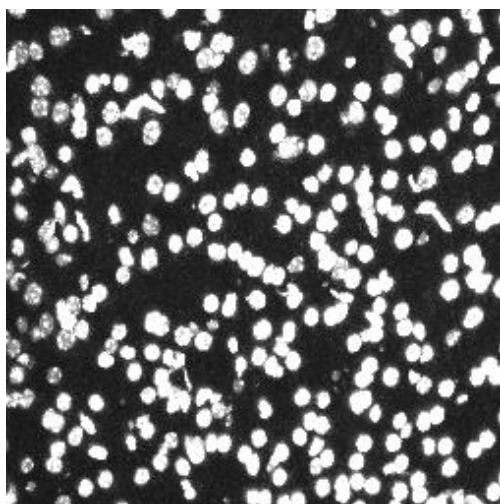
Resolution, Area and Brightness 的关系：gain（采图的亮度）变大，点的面积会相应变大，分辨能力会降低。

二.共定位图像分析举例

Step1：分别用不同的染料标记了细胞核（即所有的细胞），和 LacZ 阳性的细胞。得到

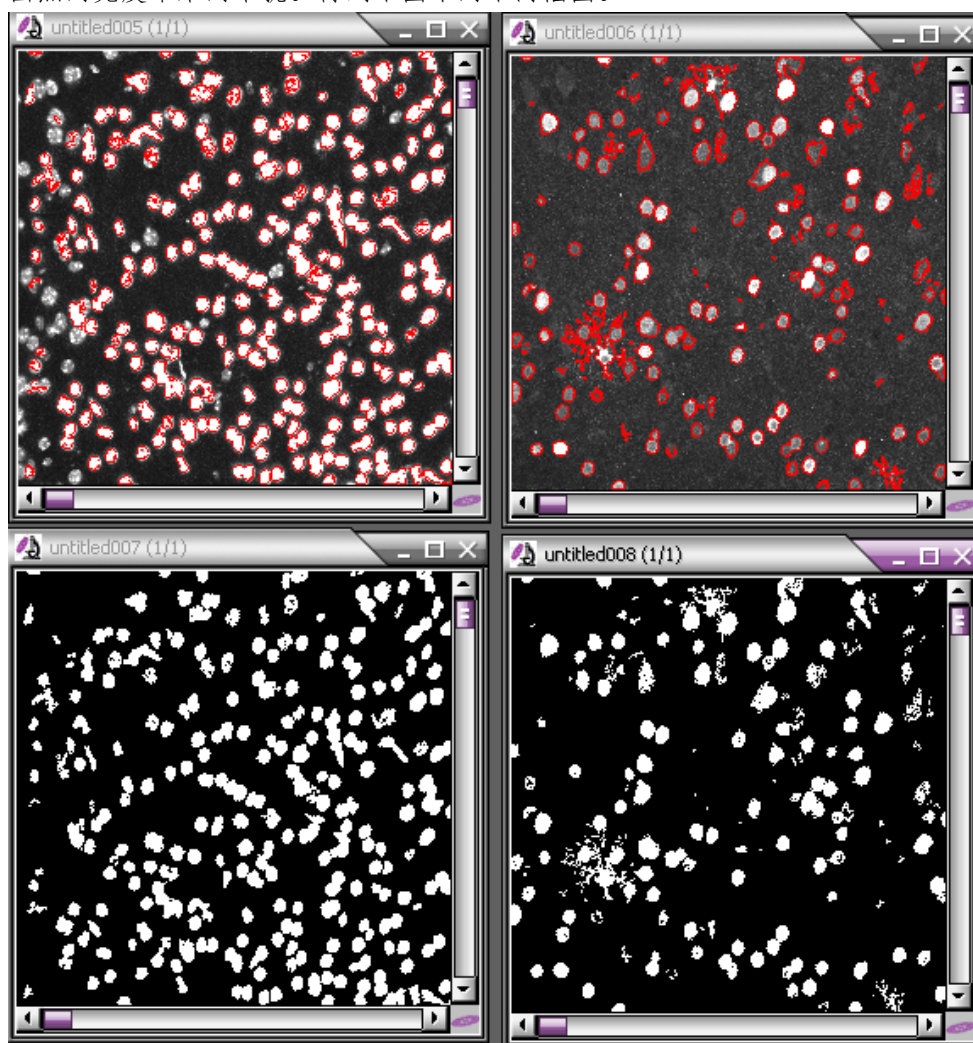


均调成灰色后得到：



Step2 :调节阈值来选择所需要的信号,(图示是用 8bit 的相机得到的图像,最大阈值是 256.) 标记细胞核得到的信号往往比较亮,因此选择阈值大于等于 200 并且大于等于 50 pixels 的作为有用的信号;选择阈值大于等于 80 并且大于等于 50 pixels 的作为 LacZ 阳性的信号。得到下图中的上两幅图;

Step3: 将所有得到的点的**亮度调到最大**,即我们知道所有我们需要点的密度信息,排除了因点的亮度带来的干扰。得到下图中的下两幅图。



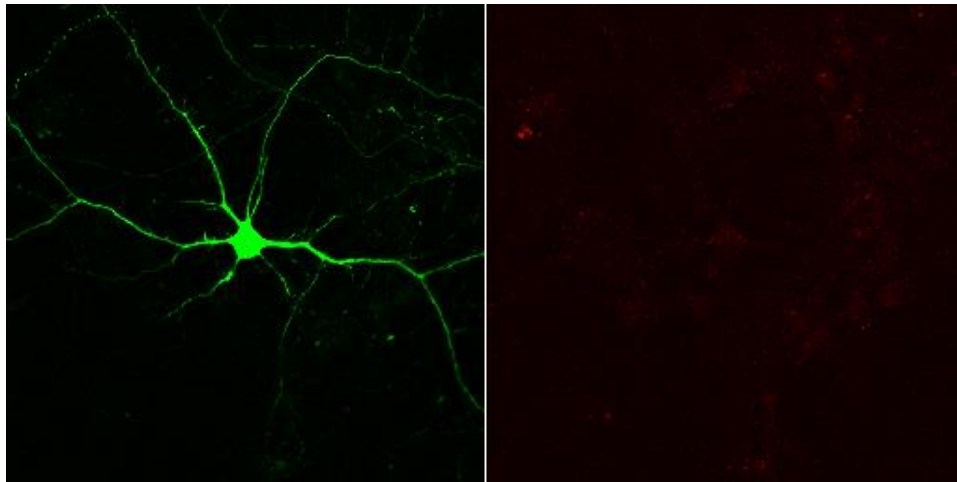
Step4: 将上图 LacZ 阳性的细胞与 ALL Nuclei 进行 **overlap**, 得到 LacZ 阳性存在于细胞

核里的细胞

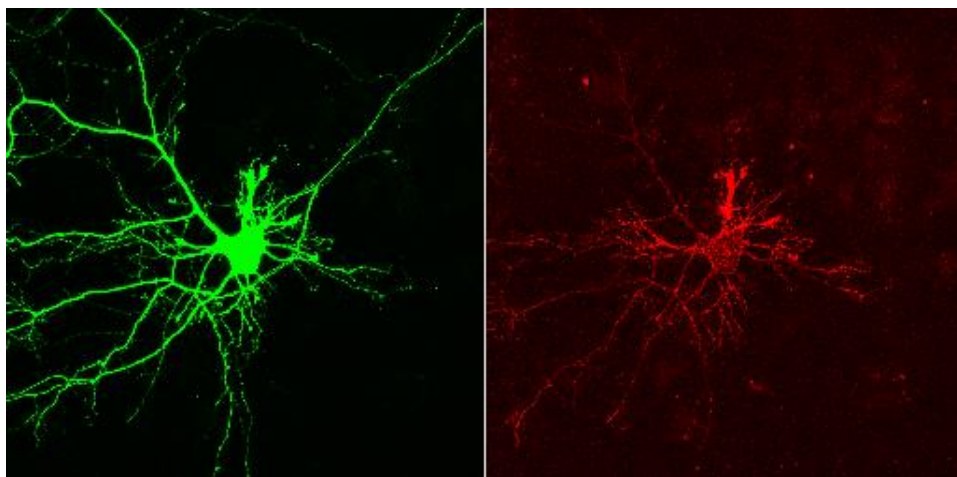
Step5: 分析得到的参数

Example2: How does activity affect the surface level of an HA-tagged protein?

两个细胞，分别用 GFP 和 HA-tag 标记细胞中的某种蛋白得到下图，图一



分别加入高钾刺激后：图二



我们想得到高钾刺激对细胞 **HA-tagged protein** 表达水平的影响，反映到到图像上就是图像的平均亮度，即用总的亮度除以信号的面积。

从图一可以看到右边图得到的信号面积基本不可见，因此我们以 GFP 标记的细胞的面积为标准，即尽管是两个细胞，我们都以为他们的面积都是 GFP 标记细胞的面积，用 HA-tag 标记细胞的亮度除以 GFP 标记细胞得到的面积，得到平均亮度。

V、神经元树突形态分析

一、蝌蚪是研究树突形态的理想材料。

将电极放在蝌蚪的一个神经细胞外面，通电后让 GFP 进入细胞，让蝌蚪在水中游，每隔一段时间将蝌蚪麻醉后放在显微镜下观察并拍照，可以比较同一个细胞从某个特定时间到 120 小时以后树突发育的情况。一般在用激光共聚焦显微镜拍出原始图片后，还需要进行图像的手动三维重构，重构后才可以进行许多相关参数的分析。

二、树突形态分析的几个参数（以下的参数同样可以应用到轴突的分析中）：

1.TDBL: total dendritic branch length，即所有树突分支的总长度，计数方法是先在图中通过软件手动将树突部分标记出来，然后让电脑去计数树突的长度。用一些软件对图像进行三维重构后还可以得到除了 TDBL 以外的很多参数。

2. ADBL: average dendritic branch length, 即平均树突分支的长度。ADBL = TDBL / TDBTN
即平均树突分支的长度=树突分支的总长度/树突分支的总数目。

3.TDBTN: total dendritic branch tip number, 即所有树突分支尖端的数目, 计数方法是拿到图像后用 Image-Pro Plus 软件先手工在树突分支尖端的部位点上点, 然后电脑可以自动记数点的数目。在点点的时候需要首先区分出树突和轴突, 树突的特点是靠近细胞体的地方比较粗, 远离细胞体的地方比较细。轴突比较细, 而且粗细在距离细胞体不同位置不会有变化。这个参数在论文中常用单个神经元 TDBTN 数目的直方图, 单个神经元 TDBTN 数目的累积分布概率以及与 sister cultures 之间的比较等不同形式展现出来。

4.树突的生长率(um/hr):即单位时间内树突的增长的量。

5.Scholl analysis: 即以细胞体为中心, 以一定长度梯度为半径, 画很多同心圆, 计数每个同心圆的圆周上包含的树突的数目。当神经元的图像经过三维重构以后, 可以用软件进行 Scholl analysis,当然也可以人工计数。Scholl analysis 可以反映神经元细胞树突的复杂程度。

6.初级, 次级和第三级树突的数目: 这个参数在计数时存在一定的问题, 即人跟人, 人跟机器在计数时对于初级, 次级和第三级树突的定位并不一定相同。如人认为某一个树突是第二级树突, 而其它人或机器可能认为它们是第三级树突。另外计数不同级别的树突还会受到计数时一些实验操作的影响。

7.树突的动态分析: 可以分析每两个小时中树突分支的增加和减少率, 树突骨架(即六小时内树突未发生变化的部分)的情况以及树突分支的平均寿命。

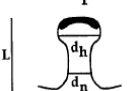
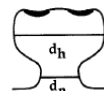
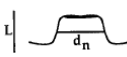

8.根据树突的形态的不同可以将神经细胞进行分类。这种分类在果蝇中做得比较多。

三、图像的采集及其分析过程中遇到的问题:

1.转染效率太高, 导致其它非目的细胞的轴突和树突与目的细胞混杂, 无法分清目的细胞的树突。这种图片不能用于分析。2.同一个图片中有不止一个细胞, 这些细胞的轴突和树突混杂在一起, 无法分析。3.由于神经元不太健康导致固定过程出现问题, 图像上全是一些点, 连不成图像所以无法分析。4.图片太暗, 计数出来的树突数目与真实情况比将变少, 也不能用于分析。5.图片中除了神经元细胞以外还有胶质细胞。这种情况下只要胶质细胞与神经原细胞没有重叠的部分, 这种图片是可以用来分析的。6. 如果一个图片中的神经元细胞的树突分支非常多、非常复杂, 也是可以分析的, 只不过分析过程中需要些耐心罢了。

四、树突棘(dendritic spines)形态分析的几个参数:

1.棘密度。2.棘类型: 包括 thin, mushroom, stubby, branched 四种形态。

Category	Shape	Criteria
Thin		$d_n \ll L$ $d_n \leq d_h$
Mushroom		$d_n \ll d_h$
Stubby		$d_n \approx L$
Branched		> 1 head

3.棘形状: 即棘头部的宽度和长度, 对图像的质量要求非常高, 最好来源于脑片。软件可以用来计算棘的形状因子(shape factor), 当它等于1时为圆形, 当它等于零时为非常不圆的形状。4.棘的动态分析: 即分析棘的运动情况。

VI、图像处理过程中的违规操作:

一、图像处理中不能进行的操作: 1.不能将图像中的个别点(如可能是污染的杂点)用

photoshop 的方法移除。2.将其它图片中的部分东西挪到一张新图片中来拼凑出一张图片是不允许的。3.不能将一个图片中的一部分 photoshop 出去（如将一个神经细胞图片中的胶质细胞移走是不允许的）。4.图片的**非线性调整**（即处理图片时调整图片的 γ 值）必须在这幅图的图例中有所说明。

二、图像处理中允许进行的操作：1.可以将显微镜拍摄出来的原始的黑底白色图像的状态变成黑底其它颜色的图像(即变成**伪彩**)，或者是变成白底黑色图像(即 **color reversion**)。（其实比起彩图来，人们更容易分辨原始的黑白亮度图）2.允许图像的旋转。3.当图像之间的差别在20%以下肉眼不容易分辨时，可以对图片进行如下处理，但是必须在图例中说明：1) **Range indicator**：即有颜色可以指示图片的曝光情况，蓝色指示没有曝光，红色指示过分曝光。有时为了显示一些很暗的点，少量的过曝也是可以的。但是要注意的是，**过曝情况下，由于亮度提高了100%，图像上的亮度信息已经不能用了，但是面积信息还是可以用的。**（2）**Glow scale**：可以让**10%的亮度差别**变得肉眼可见。（3）**Rainbow**：钙成像中常用的处理方法，即把0—256的亮度范围变成一个彩虹范围的颜色。

5 徐春 电生理研究技术

By 神经所

一、什么是电生理学

电生理学:以作用于生物体的电作用和生物体所发生的电现象为主要对象的生理学的一个分支领域。

电生理技术:是指以多种形式的能量(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,是电生理学 research 的主要技术。

二、电生理基础

(1) 生物电

【定义】生物的器官、组织和细胞在生命活动过程中发生的电位和极性变化。它是生命活动过程中的一类物理、物理—化学变化,是正常生理活动的表现,也是生物活组织的一个基本特征。

生物电的基础:细胞内外的电势差(与细胞膜两侧的离子浓度差有关,由细胞膜上的离子泵(钠钾泵)和电压门控离子通道等其他离子通道的开放关闭状态有关)

(2) 细胞膜的电学特性

(3) 突触结构

突触是指一个神经元的冲动传到另一个神经元或传到另一细胞间的相互接触的结构。突触前细胞借助化学信号,即递质(见神经递质),将信息转送到突触后细胞者,称化学突触,借助于电信号传递信息者,称电突触。

电突触和化学突触的比较

	电突触	化学突触
信号传导速度	快	慢
突触间隙	小	大
有无囊泡	无	有
释放物质	生物电和离子	神经递质
传递方向	双向	单向
作用时间	更持久	短暂
是否有延迟	无	是
选择性	无	有
环境因素	不受影响	易受环境影响
缝隙连接	孔径较大	无
是否易疲劳	否	是

三、电生理的研究方法

(一) 细胞外记录

使用两个尖端是碳纤的特殊电极,1 个电极放在细胞上,另一个电极放在远端(如皮下组织),作为参考电极。测出 2 个电极之间电压差,从而知道细胞外电位的变化。电极的碳纤放在中间,周围包裹了一些像玻璃管一样的东西,当记录到细胞的膜电位后,通过细胞周

围这些玻璃管往局部的组织内给予一些药物,如一些受体的阻断剂,观察记录神经元的反应。

1.metal electrode 金属电极

2.glass micropipette 玻璃微管

(二) 细胞内记录

1.patch-clamp recording 膜片钳

膜片钳又称单通道电流记录技术,用特制的玻璃微吸管吸附于细胞表面,使之形成10~100的密封(giga-seal),又称巨阻封接,被孤立的小膜片面积为 μm 量级,内中仅有少数离子通道。然后对该膜片实行电压钳位,可测量单个离子通道开放产生的pA(10的负12次方安培)量级的电流,这种通道开放是一种随机过程。

【原理】取一个玻璃的吸液管,上面有一个非常小的孔,让这个小孔非常的紧密接触神经元细胞膜的表面。当它与膜非常紧密的连接时,没有离子能在它们之间穿过。因此所有的离子都只有在神经元细胞膜上某一个离子通道打开的时候进入管子中。这样的话,产生的微小电流就可以被连接在管上的超敏感的电子放大器检测到了。

【模式】

(1) voltage clamp 电压钳 excitatory post-synaptic current (EPSC) 兴奋的突触后膜电流
电压钳(voltage clamp)技术是通过插入细胞内的一根微电极向胞内补充电流,补充的电流量正好等于跨膜流出的反向离子流,这样即使膜通透性发生改变时,也能控制膜电位数值不变。

【缺点】电压钳技术目前主要用于巨大细胞的全细胞电流研究,特别在分子克隆的卵母细胞表达电流的鉴定中发挥其它技术不能替代的作用。但也有其致命的弱点:

- ①微电极需刺破细胞膜进入细胞,以致造成细胞浆流失,破坏了细胞生理功能的完整性;
- ②不能测定单一通道电流。因为电压钳制的膜面积很大,包含着大量随机开放和关闭着的通道,而且背景噪音大,往往掩盖了单一通道的电流。
- ③对体积小的细胞(如哺乳类中枢神经元,直径在10-30 μm 之间)进行电压钳实验,技术上有更大的困难。由于电极需插入细胞,不得不将微电极的尖端做得很细,如此细的尖端致使电极阻抗很大,常常是60~80M Ω 或120~150M Ω (取决于不同的充灌液)。这样大的电极阻抗不利于作细胞内电流钳或电压钳记录时在短时间(0.1 μs)内向细胞内注入电流,达到钳制膜电压或膜电流之目的。再者,在小细胞上插入的两根电极可产生电容而降低测量电压电极的反应能力。

(2) Current clamp 电流钳 excitatory post-synaptic potential (EPSP) 兴奋的突触后膜电压

钳式电流表是电流表的一种,用来测量电路中的电流值,简称电流钳。在电气和电子工程中,电流钳(或称电流探头)是有两个可打开的钳式探头,用于夹紧电气设备周围的电导体,并且探头无需与设备导电部分接触,即无需断开设备导线用于探针插入,来测量电流在导体的属性。通常用普通电流表测量电流时,需要将电路切断后才能将电流表接入进行测量,这是很麻烦的,有时正常运行的电动机不允许这样做。此时,使用钳式电流表就显得方便多了,可以在不切断电路的情况下来测量电流。

(3) cell-attached patch 细胞吸附式记录

电极向细胞靠近时,给一个正压,使电极往外“吹”,当靠近细胞后去掉正压,使得细胞膜与玻璃之间形成一个非常紧密的高阻抗封接,使从缝隙外泄的电流非常小(电阻非常大)。在细胞膜表面隔离出一小片膜,即通过微管电极对膜片进行电压钳制,从而测量膜电流。可在电极液中加入药物等物质,研究其对膜上离子通道(如配体门控通道)的作用,缺陷在于1次patch只能测定1种物质浓度对膜细胞外侧上通道的作用。

(4) Inside-out patch 膜内面向外模式

cell-attached 后高阻封接形成, 将微管电极轻轻提起, 使其与细胞分离, 电极端形成密封小泡, 在空气中短暂暴露几秒钟后, 小泡破裂再回到溶液中, 使小泡的外半部分破裂得到一小片膜, 且膜的细胞外的这一面对的是电极液, 而细胞内的这一面对的是细胞外溶液, 就是 inside-out patch。

由于细胞膜的内面朝向外溶液, 可以调节细胞外溶液中的成分来研究改变膜上离子通道的细胞内环境对膜造成的影响, 如研究一种配体在细胞内与受体连接激活膜上离子通道, 研究其不同浓度对通道的激活作用。但无法研究细胞外环境改变对膜上通道的影响。

(5) Outside-out patch 膜外面面向内模式

阻封接形成后, 继续以负压抽吸, 膜片破裂, 再将玻管慢慢从细胞表面提起, 断端游离部分自行融合成脂质双层而得到。膜的细胞外的这一面对的是细胞外液, 形成 outside-out patch 与细胞吸附式记录的区别为细胞吸附式记录不能改变电极液中加入药物的浓度, 1 次 patch 只能实现单一膜外物质浓度对通道影响的记录。而 outside-out patch 可更换细胞外溶液, 1 次 patch 可实现膜外物质的多种不同浓度对通道影响的记录。

(6) Whole-cell patch 常规全细胞模式

形成高阻抗封接后, 给予一个非常短促的负压, 使膜被吸破, 电极内的溶液和细胞里的溶液导通, 就能记录到细胞膜电位的变化, 为全细胞记录。

全细胞记录模式可应用于记录:

神经元上某些通道和受体的电信号

神经元突触后电流 (电压钳)

神经元突触后电位 (电流钳)

神经元动作电位、静息电位 (电流钳)

(7) 开放细胞吸附膜内面向外模式

将细胞吸附模式的膜片以外的某部位的胞膜进行机械地破坏, 经破坏孔调控细胞内液并在细胞吸附状态下进行内面向外的单一离子通道记录。

(8) 穿孔囊泡膜外面面向外模式

从穿孔膜片模式[4]将膜片微电极向上提起, 便在微电极尖端处形成一个膜囊泡, 如果条件较好, 此膜囊泡内不仅有细胞质因子还可有线粒体等细胞器存在。

2.cut-open oocyte recording 卵母细胞破开记录

3.two-electrode recording 双电极记录

【优缺点】

(1) 细胞外记录

①记录群体或单细胞的电活动。

① 容易得到信号, 机械稳定性要求低。

② 电极粗大, 对组织损伤大。

(2) 细胞内记录

①记录单个神经元, 电位变化精确可控, 可进行电压钳、电流钳实验。

②电极尖端很小, 大分子无法进入细胞, 对细胞内过程影响小。

③ 只能记录细胞胞体, 机械稳定性要求高。

(3) 全细胞记录

①记录单个神经元, 电位变化精确可控, 可进行电压钳、电流钳实验, 对亚细胞

结构进行记录。

②机械稳定性要求低。

③电极大，电极内的物质进入细胞内，对细胞内过程影响大（除穿孔全细胞记录，用抗生素打孔，可防止大分子进入，影响相对小）。

四、电生理发展趋势

①通道数量增加（Increase channel count）：多电极同时记录。

②电极（electrode）改良：更加稳定、更具生物组织友好性。现用的人体内长时间记录电极最多使用半年，生物友好性电极的研究在不断深入。其硬度大大降低，从而增强生物友好性。

③无线化（Wireless）。无线记录电生理信号。

④光学成像（Optical imaging）：传统钙离子成像是利用单光子激发荧光探针。而双光子钙成像是用两个能量较低的光子代替能量较高的光进行激发。双光子成像最大的优点是避免了非特异性的激发（out-of-focus excitation），只在聚焦点而非整个光路上激发，降低了光漂白。此外双光子技术也降低了光毒性，即降低光激发样本产生有毒物质带来的损伤。双光子成像对针孔的要求也较低。

⑤钙离子成像+光遗传学（光遗传学其主要原理是首先采用基因操作技术将光感基因(如 ChR2, eBR, NaHR3.0, Arch 或 OptoXR 等)转入到神经系统中特定类型的细胞中进行特殊离子通道或 GPCR 的表达。光感离子通道在不同波长的光照刺激下会分别对阳离子或者阴离子的通过产生选择性，从而造成细胞膜两边的膜电位发生变化，达到对细胞选择性地兴奋或者抑制的目的。)

⑥电压敏感染色

⑦微型示波器

例题：结合自身的研究背景，举例说明膜片钳技术在生命科学研究中的应用。

膜片钳技术被称为研究离子通道的“金标准”。是研究离子通道的最重要的技术。目前膜片钳技术已从常规膜片钳技术（Conventional patch clamp technique）发展到全自动膜片钳技术（Automated patch clamp technique）。

1. 应用学科

膜片钳技术发展至今，已经成为现代细胞电生理的常规方法，它不仅可以作为基础生物医学研究的工具，而且直接或间接为临床医学研究服务，目前膜片钳技术广泛应用于神经（脑）科学、心血管科学、药理学、细胞生物学、病理生理学、中医药学、植物细胞生理学、运动生理等多学科领域研究。随着全自动膜片钳技术（Automatic patch clamp technology）的出现，膜片钳技术因其具有的自动化、高通量特性，在药物研发、药物筛选中显示了强劲的生命力。

2. 应用的标本种类

使用的标本种类繁多。从最早的肌细胞（心肌、平滑肌、骨骼肌）、神经元和内分泌细胞发展到血细胞、肝细胞、耳窝毛细胞、胃壁细胞、上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞、精母细胞等多种细胞；从急性分散细胞和培养细胞（包括细胞株）发展到组织片（如脑片、脊髓片）乃至整体动物；从蜗牛、青蛙、蝾螈、爪蟾卵母细胞发展到鸡细胞、大鼠细胞、人细胞等等；从动物细胞发展到细菌、真菌以及植物细胞。此外，膜片钳技术还广泛地应用到平面双分子层（Planar bilayer）、脂质体（Liposome）等人工标本上。

3. 研究对象

研究对象已经不局限于离子通道。从对离子通道（配体门控性、电压门控性、第二信使介导的离子通道、机械敏感性离子通道以及缝隙连接通道等等）的研究发展到对离子泵、交换体以及可兴奋细胞的胞吞、胞吐机制的研究等。

4. 应用举例：

(1). 膜片钳技术在通道研究中的重要作用

应用膜片钳技术可以直接观察和分辨单离子通道电流及其开闭时程、区分离子通道的离子选择性、同时可发现新的离子通道及亚型，并能在记录单细胞电流和全细胞电流的基础上进一步计算出细胞膜上的通道数和开放概率，还可以用以研究某些胞内或胞外物质对离子通道开闭及通道电流的影响等。同时用于研究细胞信号的跨膜转导和细胞分泌机制。结合分子克隆和定点突变技术，膜片钳技术可用于离子通道分子结构与生物学功能关系的研究。利用膜片钳技术还可以用于药物在其靶受体上作用位点的分析。如神经元烟碱受体为配体门控性离子通道，膜片钳全细胞记录技术通过记录烟碱诱发电流，可直观地反映出神经元烟碱受体活动的全过程，包括受体与其激动剂和拮抗剂的亲和力，离子通道开放、关闭的动力学特征及受体的失敏等活动。使用膜片钳全细胞记录技术观察拮抗剂对烟碱受体激动剂量效曲线的影响，来确定其作用的动力学特征。然后根据分析拮抗剂对受体失敏的影响，拮抗剂的作用是否有电压依赖性、使用依赖性等特点，可从功能上区分拮抗剂在烟碱受体上的不同作用位点，即判断拮抗剂是作用在受体的激动剂识别位点，离子通道抑或是其它的变构位点上。

(2). 与药物作用有关的心肌离子通道

心肌细胞通过各种离子通道对膜电位和动作电位稳态的维持而保持正常的功能。近年来，国外学者在人类心肌细胞离子通道特性的研究中取得了许多进展，使得心肌药理学实验由动物细胞模型向人心肌细胞成为可能。

(3). 对离子通道生理与病理情况下作用机制的研究

通过对各种生理或病理情况下细胞膜某种离子通道特性的研究，了解该离子的生理意义及其在疾病过程中的作用机制。如对钙离子在脑缺血神经细胞损害中作用机制的研究表明，缺血性脑损害过程中， Ca^{2+} 介导现象起非常重要的作用，缺血缺氧使 Ca^{2+} 通道开放，过多的 Ca^{2+} 进入细胞内就出现 Ca^{2+} 超载，导致神经元及细胞膜损害，膜转运功能障碍，严重的可使神经元坏死。

(4). 对单细胞形态与功能关系的研究

将膜片钳技术与单细胞逆转录多聚酶链式反应技术结合，在全细胞膜片钳记录下，将单细胞内容物或整个细胞（包括细胞膜）吸入电极中，将细胞内存在的各种 mRNA 全部快速逆转录成 cDNA，再经常规 PCR 扩增及待检的特异 mRNA 的检测，借此可对形态相似而电活动不同的结果做出分子水平的解释或为单细胞逆转录多聚酶链式反应提供标本，为同一结构中形态非常相似但功能不同的事实提供分子水平的解释。目前国际上掌握此技术的实验室较少，我国北京大学神经科学研究所于 1994 年在国内率先开展。

(5). 对药物作用机制的研究

在通道电流记录中，可分别于不同时间、不同部位（膜内或膜外）施加各种浓度的药物，研究它们对通道功能的可能影响，了解那些选择性作用于通道的药物影响人和动物生理功能的分子机理。这是目前膜片钳技术应用最广泛的领域，既有对西药药物机制的探讨，也广泛用在重要药理的研究上。如开丽等报道细胞贴附式膜片钳单通道记录法观测到人参二醇组皂苷可抑制正常和“缺血”诱导的大鼠大脑皮层神经元 L-型钙通道的开放，从而减少钙内流，对缺血细胞可能有保护作用。陈龙等报道采用细胞贴附式单通道记录法发现乌头碱对培养的 Wistar 大鼠心室肌细胞 L-型钙通道有阻滞作用。

(6). 在心血管药理研究中的应用

随着膜片钳技术在心血管方面的广泛应用，对血管疾病和药物作用的认识不仅得到了不断更

新,而且在其病因学与药理学方面还形成了许多新的观点。正如诺贝尔基金会在颁奖时所说:“Neher 和 Sadmamnn 的贡献有利于了解不同疾病机理,为研制新的更为特效的药开辟了道路”。

(7). 创新药物研究与高通量筛选

目前在离子通道高通量筛选中主要是进行样品量大、筛选速度占优势、信息量要求不太高的初级筛选。最近几年,分别形成了以膜片钳和荧光探针为基础的两大主流技术市场。将电生理研究信息量大、灵敏度高等特点与自动化、微量化技术相结合,产生了自动化膜片钳等一些新技术。

6 周虎 质谱技术

By 药物所 黄玉琦

一、定义：质谱法(Mass Spectrometry,MS)即用电场和磁场将运动的离子（带电荷的原子、分子或分子碎片）按它们的质荷比分离后进行检测的方法。测出离子准确质量即可确定离子的化合物组成。

质谱的特点：

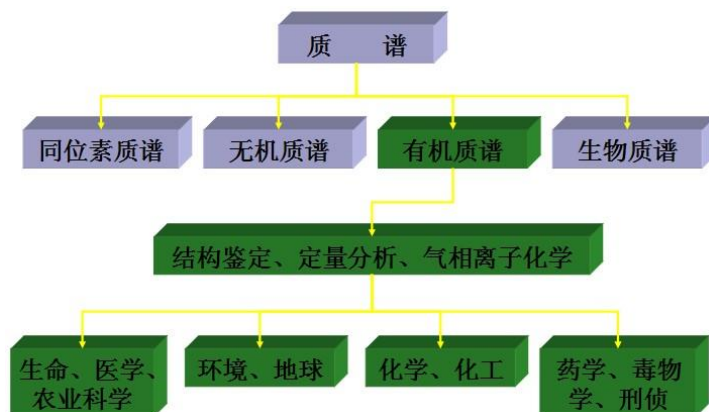
- ◆质谱不属波谱范围，谱图与分子结构有关
- ◆质谱是分子离子及碎片离子的质量与其相对强度的谱，谱图与分子结构有关。
- ◆质谱法进样量少，灵敏度高，分析速度快
- ◆质谱是唯一可以给出分子量，确定分子式的谱学方法。
- ◆仪器结构复杂，价格昂贵，使用及维修比较困难(磁质谱仪)。对样品有破坏性。

二、质谱的发展历史

1、质谱的沿革与发展

- 1912 年 Thomson 研制第一台世界上质谱仪
- 1946 年 飞行时间质谱 (Time-of flight mass analysis)
- 1953 年 四极杆分析器(Quadrupole analyzers)
- 1954 年 Tandem 系统，即串联的质谱系统 (MS/MS)
- 1956 年 气相色谱-质谱联用(GC/MS)
- 1973 年 液相色谱-质谱联用 (LC/MS),
- 1960 年 尼尔(Nier) 双聚焦质谱仪
- 1984 年 第一台电喷雾质谱仪(ESI)
- 1989 年 基质辅助激光解吸电离(MALDI)
- 2000 年 静电轨道离子阱质谱 (Orbitrap)

2、质谱的分类



环保：化工厂爆炸二噁英

地球：C14 测地壳的年代

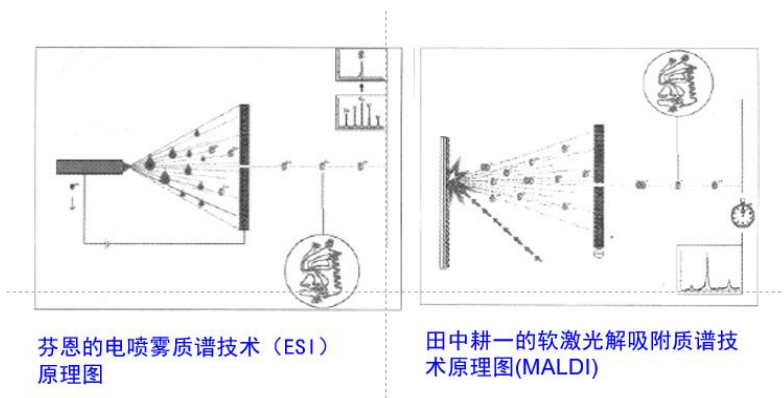
毒物学：头发验毒

刑侦：毒品建库比对，吸毒的验证。酒驾及兴奋剂检测。

质谱特点：用量少，灵敏度高，应用广

3、质谱与诺贝尔奖

John. B. Fenn 和田中耕一因发明了对生物大分子进行识别和结构分析的质谱方法获 2002 年诺贝尔化学奖。(与 NMR 方法分享) 解决了测定 DNA 和蛋白质等生物大分子的结构问题



4、质谱仪器的类型和用途

(1) 质谱仪：

质谱仪是一种测定气相离子的质量和丰度的仪器，由**进样系统、离子源、质量分析器、检测系统、真空系统、电子线路和数据采集系统**组成。

(2) 真空系统

质谱仪的离子源和质量分析器需要保持真空状态，压力一般在 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ Pa 和 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ Pa。

- 氧会烧坏离子源的灯丝；
- 用作加速离子的几千伏高压会引起**放电**
- 引起额外的离子—分子反应，改变裂解模型，谱图复杂化。

(3) 进样系统

- 在不破坏真空度的情况下，使样品进入离子源。
- 气体可通过储气器进入离子源。
- 易挥发的液体，在进样系统内汽化后进入离子源。
- 难挥发的液体或固体样品，通过探针直接插入离子源

(4) 离子源

也称电离和加速室，在这里，被分析物质被电离，生成带电荷的离子。

离子化方法

- 电子轰击电离 Electron Impact Ionization (EI)
- 化学离子化 Chemical Ionization (CI)
- 场电离，场解吸 Field Ionization (FI), Field Desorption (FD)
- 快原子轰击 Fast Atom Bombardment (FAB)
- 基质辅助激光解析电离 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)
- 电喷雾电离 Electrospray Ionization (ESI)

- 大气压化学电离 Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

电子轰击电离 (EI)

特点：可提供分子结构信息；

缺点：强电离，有时不能出现 M^+

基质辅助激光解析电离 (MALDI)

MALDI 可使热敏感或不挥发的化合物由固相直接得到离子。

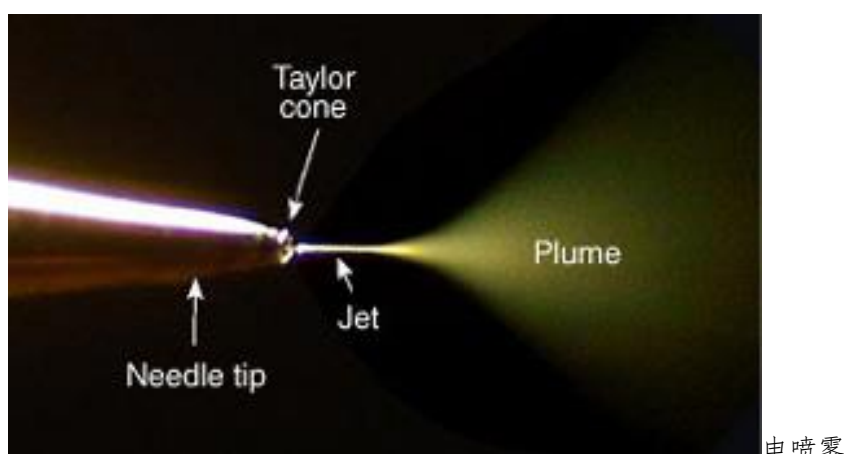
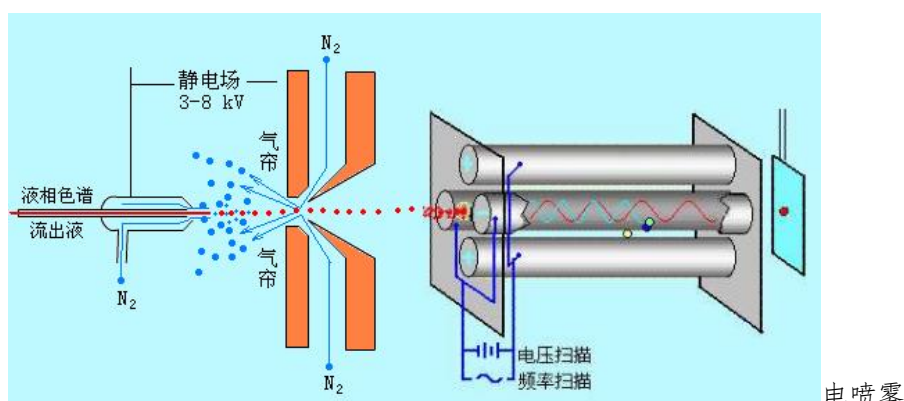
待测物质的溶液与基质的溶液混合后蒸发，使分析物与基质成为晶体或半晶体，用一定波长的脉冲式激光进行照射时，基质分子能有效的吸收激光的能量，使基质分子和样品分子进入气相并得到电离。

MALDI 适用于生物大分子，如肽类，核酸类化合物。可得到分子离子峰，无明显碎片峰。此电离方式特别适合于飞行时间质谱(TOF)

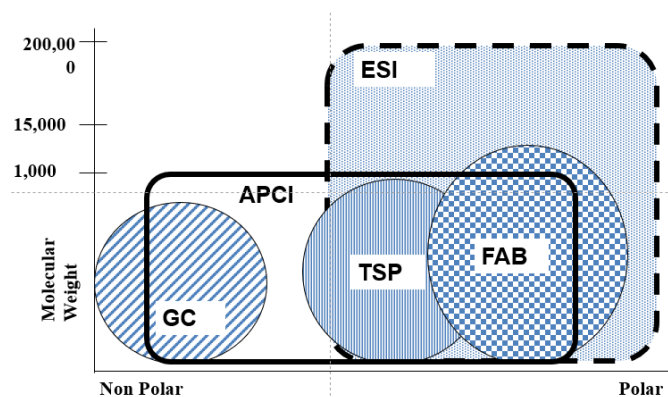
电喷雾电离 (ESI)

流出液在高电场下形成带电喷雾，在电场力作用下穿过气帘；

气帘的作用：雾化；蒸发溶剂；阻止中性溶剂分子



电离方式的互补性：



(5) 质量分析器

质量分析器是质谱中将离子化室产生的不同质荷比 (m/z) 的离子分离的核心组件，不同的质量分析器构成了不同种类的质谱仪。

不同类型质量分析器：

- 扇形磁场质量分析器
 - 单聚焦(single-focusing)
 - 双聚焦(double-focusing): 双聚焦质谱仪体积大
- 四极质量分析器 (quadrupole mass analyzer)
- 离子阱 (ion trap)
- 飞行时间质谱 (time of flight, TOF)
- 傅立叶变换质谱 (Fourier transform mass spectrometer) (FT ICR)
- 静电轨道阱质谱 (Orbitrap)

色谱-质谱联用仪器的发展及仪器小型化(台式)需要体积小、质量分析器：

1. 四极杆质量分析器：结构简单，价廉，体积小，易操作，无磁滞现象，扫描速度快，适合于 GC-MS, LC-MS。分辨率不高
2. 飞行时间质量分析器：适合于生物大分子，灵敏度高，扫描速度快，结构简单，分辨率随 m/z 的增大而降低。
3. 离子阱质量分析器：将离子储存在阱里，然后改变电场按不同质荷比(m/z)将离子推出阱外进行检测。

区别：

- ◆ 离子阱质谱可以很方便地进行多级质谱分析，对于物质结构的鉴定非常有用。
- ◆ 四极杆只能做到二级 MS (三重四极杆仪器)，且价格较贵。
- ◆ 在质谱的使用过程中，离子阱被认为做定性方面有较大优势；而四极杆在定量方面有优势。

静电轨道阱 Orbitrap 分辨率最高

(6) 检测系统

质量分析器分离并加以聚焦的离子束，按 m/z 的大小依次通过狭缝，到达收集器。经接收放大后被记录。

(7) 质谱仪的主要指标

① 质量范围:

仪器所检测的质荷比范围。对单电荷离子即为离子的质量范围；对多电荷离子，所检测的离子质量则扩展到离子电荷数相应的倍数。

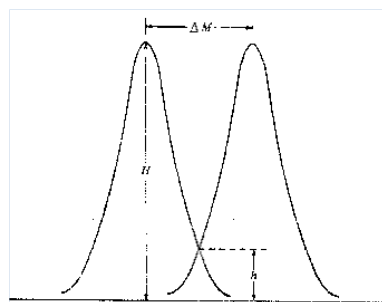
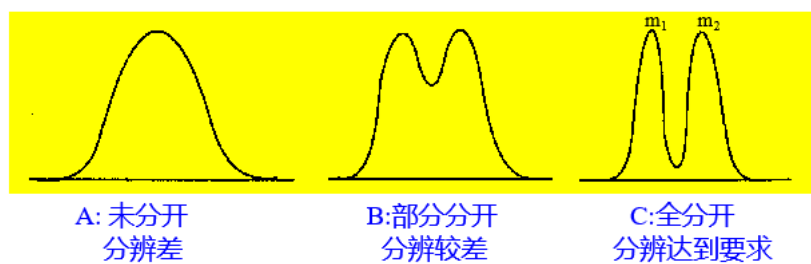
② 灵敏度(sensitivity)

出峰强度与所用样品量之间的关系；或对选定的样品在一定分辨率下产生一定信噪比的分子离子峰所需的样品量

③ 分辨率(resolution):

分开两个邻近质量峰的能力。若两个相邻峰的峰谷低于峰高的 10%(或 5%, 50%), 则认为是分开的。

M 为可分辨的两峰的平均质量。 ΔM 为可分辨的两峰的质量差。一般低分辨仪器在 2000 左右。10000 以上时称高分辨。(PPT 有计算例题)



质谱学上的高分辨:

- 高的分辨本领
- 良好的线性行为
- 良好的稳定性

高分辨质谱仪: 分辨率、线性和稳定性好

磁质谱, 飞行时间质谱仪, 离子回旋共振质谱仪

准高分辨质谱仪: 分辨率高, 线性低

离子阱质谱仪

非高分辨质谱仪: 分辨率低, 线性好

四极杆质谱仪

一级质谱:

蛋白消化—>肽段离子化—>质量分析

二级质谱:

蛋白消化—>肽段离子化—>分离肽段—>进一步碎片化—>肽段碎片质量分析

(8) 联用仪器

联用仪器：**GC/MS 气质联用** 和 **HPLC/MS 液质联用**

样本经过液相/气相色谱组分分离后再用质谱进行分析。

三、质谱的应用

1、电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS):

电感耦合等离子体 (ICP) 作为离子源产生离子，氩等离子体 (中心温度达 7000K)

质谱流式细胞仪 (CyTOF2 Mass Cytometer):

利用质谱原理对单细胞进行多参数检测的流式技术。

2、MALDI-TOF 质谱的应用：互作蛋白分析、聚合物分析、肽图分析、基于 MALDI 的质谱成像

3、交联质谱技术 (Cross-linking)

用交联剂交联有空间结构的蛋白，使**空间结构上较近的氨基酸形成交联**

利用质谱鉴定，得到鉴定的肽段对就意味着这两个肽段在空间距离上相互接近

应用：鉴定直接作用蛋白、研究蛋白内折叠、分析蛋白复合物间位置关系

4、氢氘交换质谱 (HDX-MS)

氢氘交换原理：**重水(D₂O)中的氘(D)和蛋白质肽键上的氢(H)发生交换。**

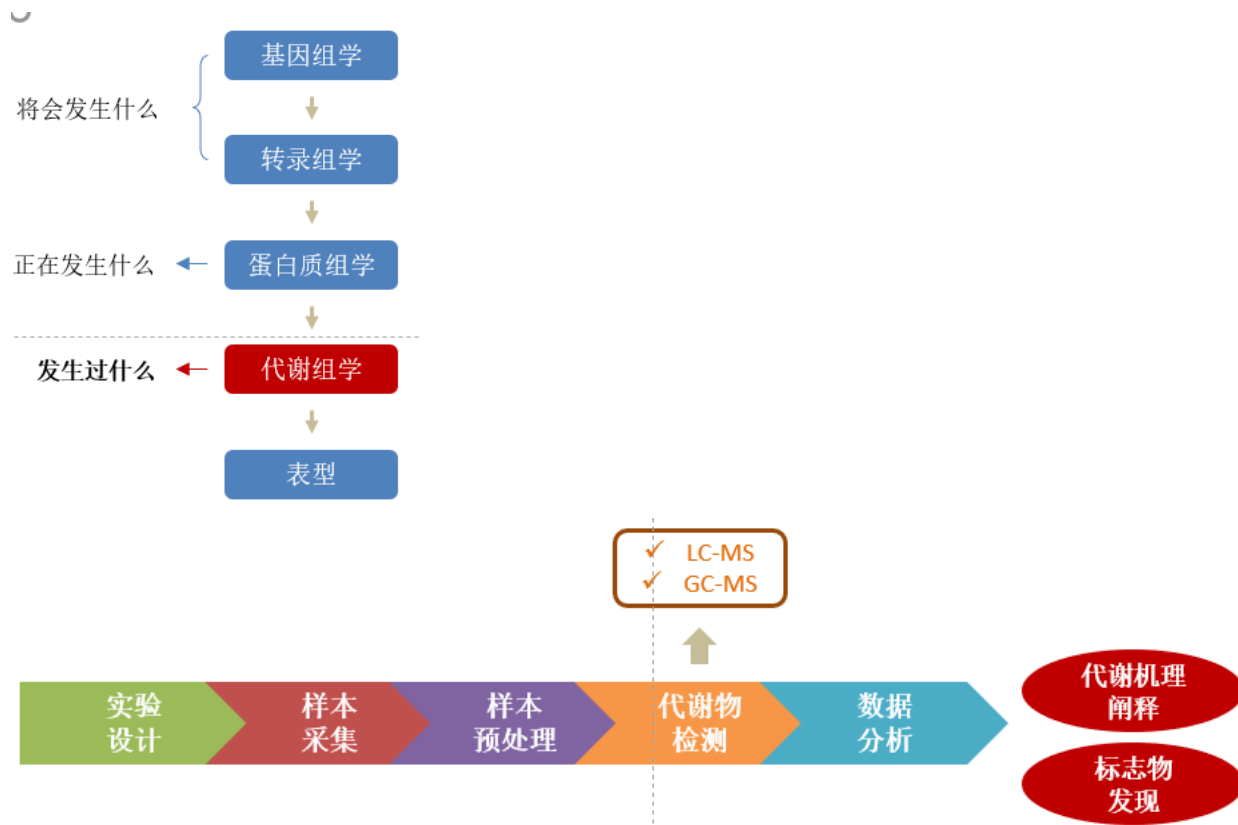
实验流程：

多个反应时间点取样在线分析。例如，通过在蛋白质-蛋白质相互作用前后或加药前后，比较同一蛋白相同肽段氢氘交换速率的变化，可发现蛋白质结构动态变化、蛋白质相互作用界面或者药物结合位点。

应用：

- (1) 小分子-蛋白质相互作用
- (2) 蛋白质-蛋白质相互作用 (ex: HSP90N 端蛋白与赤壳菌素(Radicicol)的 HDX-MS 分析)
- (3) 抗原表位分析
- (4) 抗体药质量分析

5、基于质谱的代谢组学



研究生命体对于内在基因突变、病理生理变化及外在环境等因素刺激作用下的体内动态多元的代谢物。

(GC-MS):衍生物处理，使样本的极性变小。

	优点	缺点
GC-MS代谢组学	<ol style="list-style-type: none"> 1. 仪器稳定、重复性好 2. 灵敏度、分离效率高 3. 保留指数可辅助定性 4. 丰富的质谱数据库 5. 适合挥发性和半挥发性物质的分离检测 6. 衍生化后可对含有活泼H的代谢物进行检测 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 质谱数据库信息不完全 2. 预处理耗时（衍生化处理） 3. 不适合分析高沸点、热不稳定、分子量较大的代谢物的分析
LC-MS代谢组学技术	<ol style="list-style-type: none"> 1. 高分辨、高灵敏、动态范围广 2. 方法选择性大、预处理相对简单 3. 代谢物覆盖面广 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 不适用于沸点高、热稳定性差代谢物 2. 不适用于非极性化合物

6、基于质谱的蛋白质组学

蛋白质组学的应用范围



用于蛋白质结构分析的质谱技术开发:

- 二硫键解析
- 交联质谱方法学研究
- 氢氘交换质谱方法学研究

蛋白组学应用举例:

- PAR3 外显子 12 的可变剪切蛋白质序列鉴定
- 半胱氨酸的氧化和谷胱甘肽化修饰鉴定
- 蛋白质磷酸化鉴定: 由“地毯式轰炸”转向“精确制导”
- 4 蛋白质组用于生物标志物发现
- 个体蛋白质组学用于精准医疗基于组学技术的精准医学计划

临床肿瘤蛋白质组学分析联盟(CPTAC)

CPTAC 的分析流程:

发现 (10 例样本*10000 种分析物~~~100 个候选)

→证实(100 例样本*100 种分析物~~~10 个候选)

→临床确证(10000 例生物样本*10 种分析物, 免疫实验验证候选生物标志物)

生物质谱和蛋白质组学技术的发展趋势

质谱技术:

扫描速度 (40~100 Hz), 灵敏度 (离子漏斗 Ion Funnel),

分辨率 (≥ 100 万), 数据采集处理算法等

蛋白质组学:

灵敏度 (单细胞蛋白质组)、蛋白质翻译后修饰、鉴定定量数目、定量准确性重复性、

组学数据处理分析 (瓶颈)

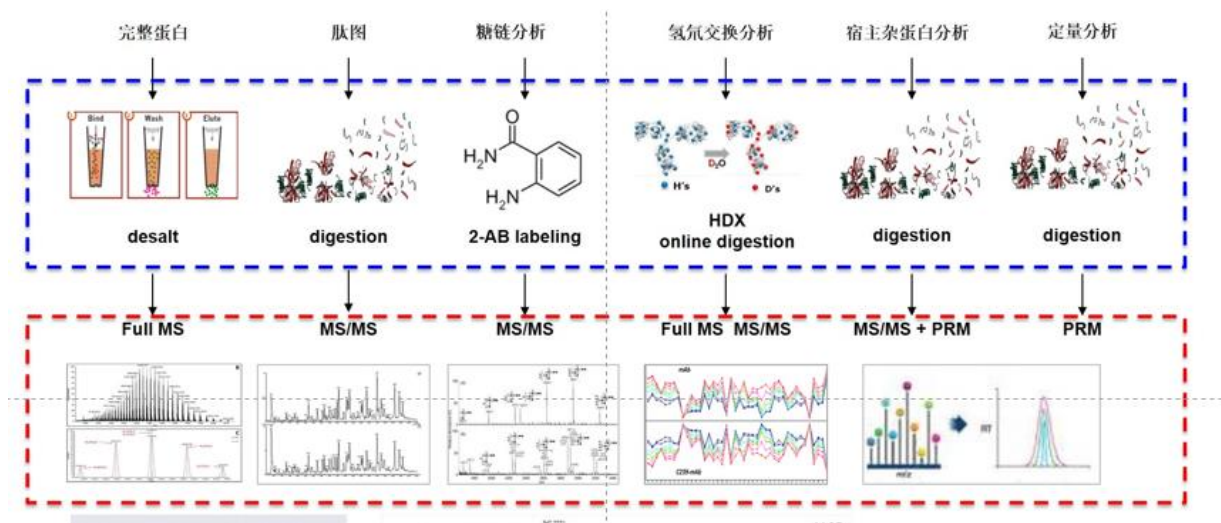
7、质谱在药物研究中的应用

(1) 化学药的成分明确, 分析方法相对比较好建立

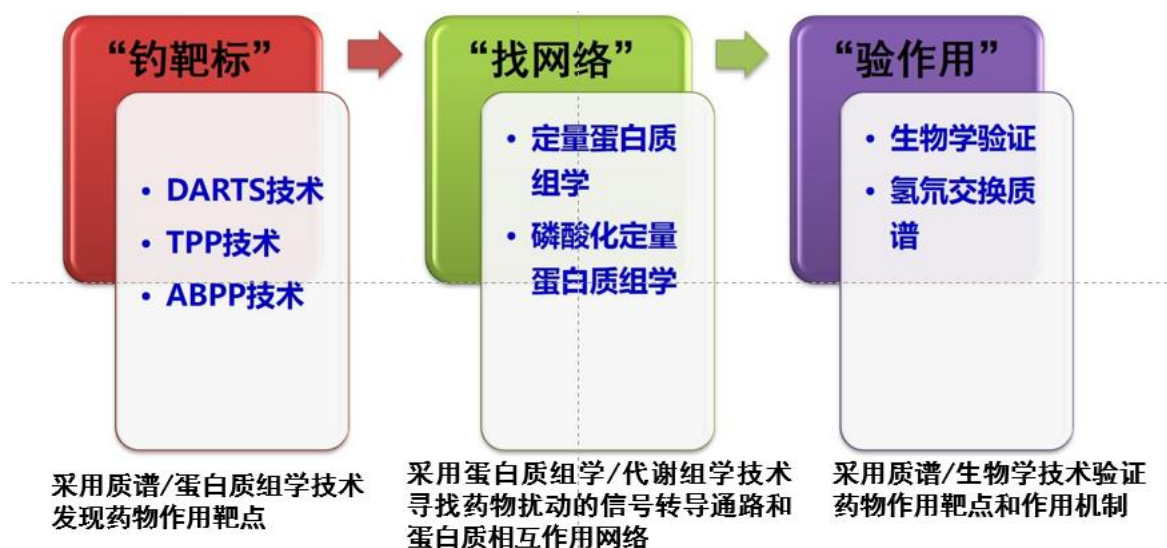
(2) 蛋白类药物的分析需求

确认完整蛋白分子量、主要糖型和其他翻译后修饰 (PTM), 是表征治疗性蛋白和了解其功效与稳定性的关键测量。

质谱仪是进行所有这些分析的主要工具，能在单一平台上实现高质量精度、高特异性和高灵敏度。



基于质谱的组学技术在药物作用机制研究中的应用展望



寻找药物作用靶标和作用机制，验证药物小分子和靶标蛋白的相互作用

7 杨晟 酶工程

By 植生所 杨思琪

一、目标：了解酶重组表达和改造的基本概念与方法+独立设计酶重组表达和改造实验方案

二、酶工程：又称蛋白质工程，指工业上有目的的设置一定的反应器和反应条件，利用酶的催化功能，在一定条件下催化化学反应，生产人类需要的产品或服务于其它目的的一门应用技术。

杨老师定义：运用酶学知识设计具有目标催化活性的蛋白质制剂及其应用条件。

DBTL 循环：设计（Design）-制备（Build）-测试（Test）-酶学（Learn）

三、酶学知识：

- 酶：有催化活力的蛋白质
- 酶催化：稳定过渡态、变通反应途径、降低底物基态稳定性
- 酶分类：氧转水裂异连+易位酶

四、酶的生产

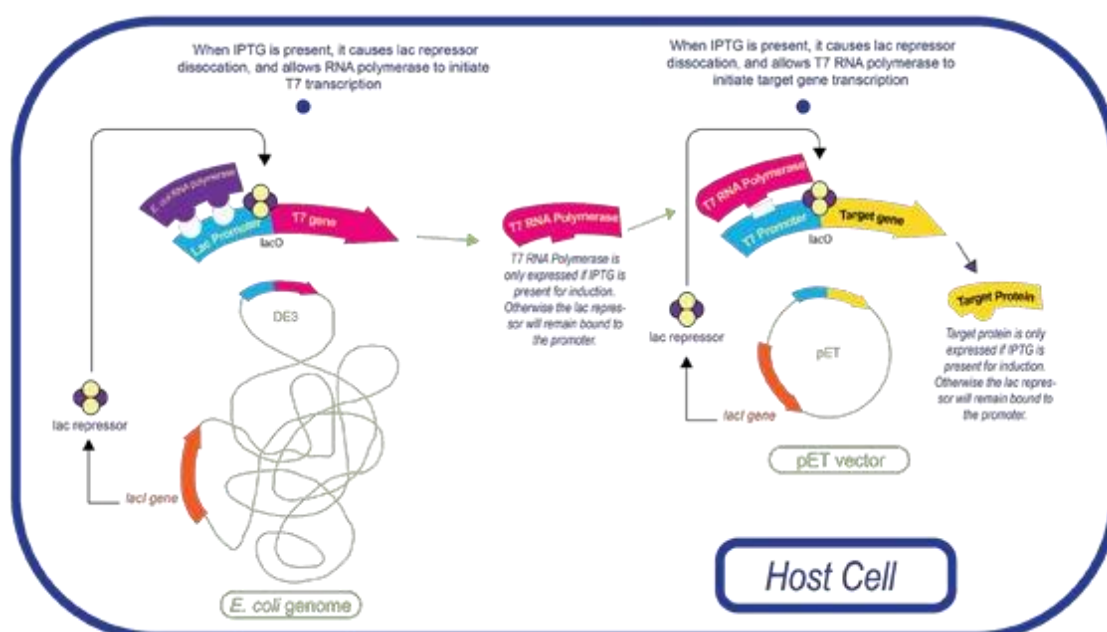
1. 菌种选育——发酵工艺优化——重组表达

2. 大肠杆菌重组表达系统：

A. 优点：生长极快、实验操作最方便、可高密度发酵、遗传背景清楚、容易获得各种载体和宿主

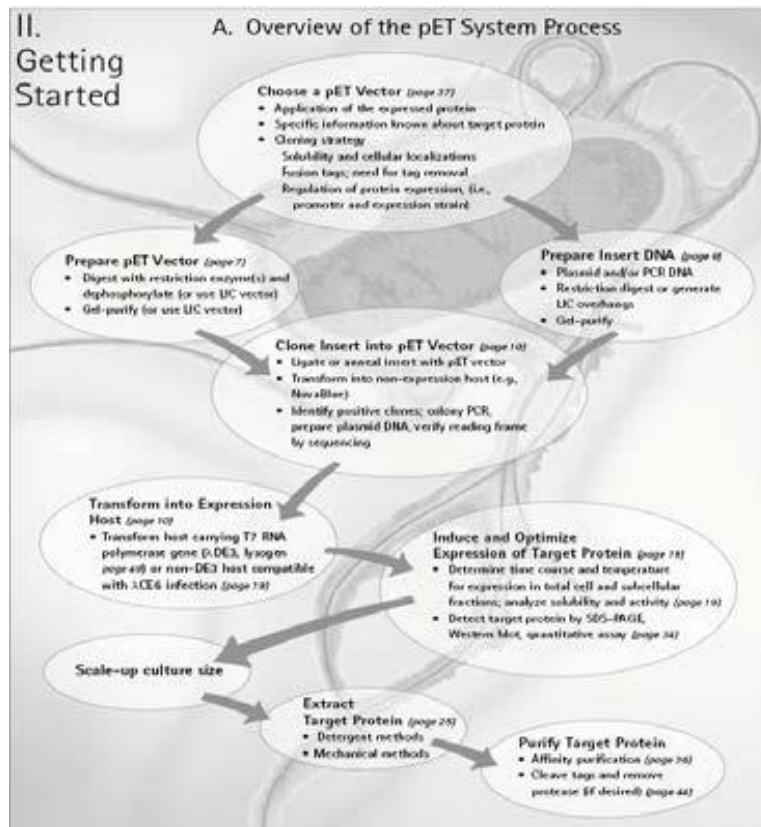
缺点：分泌表达能力弱、二硫键形成困难、无翻译后修饰

B. 载体首选pET 系统（pET24 或pET28（有His-tag）与BL21（DE3）TB 培养基37°



生长到1-1.5OD，18℃生长1小时到3OD，0.5mM IPTG 诱导19小时至OD达10。

流程：



高表达低可溶的解救措施：降温低至 15°C、换培养基为 2xYT 或 ZYP5052(自诱导)，换表达宿主、截短 N 端和/或 C 端 2-10 个氨基酸残基、与 MBP 等高可溶性蛋白融合表达、化学诱导分子伴侣、共表达分子伴侣/作用蛋白或提供配体。

标准产酶菌株：T7 启动子+强核糖体结合位点+转录起始位点 CAR+ATG 密码子优化序列+抗性+中拷贝复制子+不同酶基因

3、酵母（毕赤酵母）表达系统

A. 优点：外源基因稳定整合

醇氧化酶基因的启动子（AOX1）强，且可用甲醇严格调控表达重组蛋白质可以以胞内或胞外形式表达

含有真核表达系统共有的翻译后修饰功能有商品化宿主/载体，操作简便

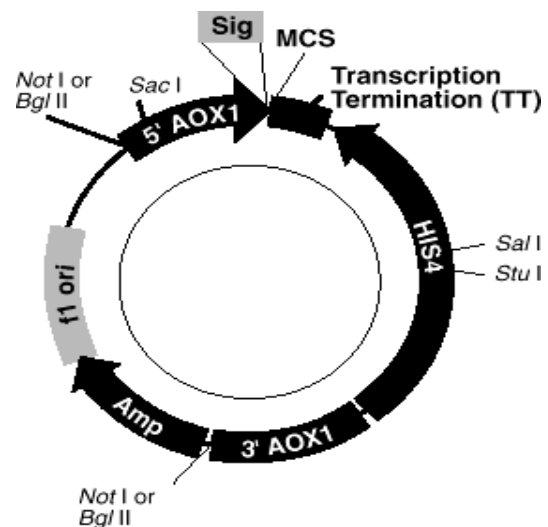
放大方便，发酵密度极高缺点：翻译

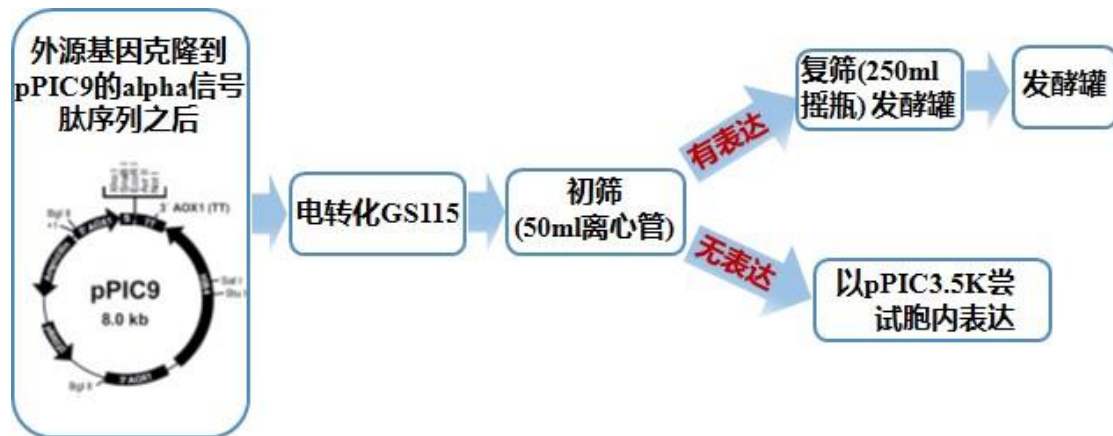
后加工形式有独特性

存在过度糖基化问题

B. 载体：

aox1 启动子：强启动子；甲醇诱导；葡萄糖，甘油等快速碳源阻遏；表达调控技术较成熟流程：





4、重组酶表达：

首选文献报道表达系统——次选大肠——无活性选酵母根据基因来源选表达系统
基因加亲和标签便于纯化

五、酶的改造（原因：天然酶不适用于生物技术；目的：高专一性高活性高稳定性）

1、获取新酶途径：自然界、有理设计、随机筛选

2、酶的设计方法：有理设计（知道关键基因、蛋白质工程）无理设计（随机突变）天然设计

A. 有理设计：根据蛋白质结构，确定活性位点，改造与配体适配（PCR 定点突变）

多重联配——序列保守性信息（ClusralW2）

结晶/同源模建——获得立体结构（SWISS-MODEL） 三维结构分析——分子图像分析（Pymol）

B. 定向进化

选择出发基因——**建立突变库**

——质粒表达——**高通量筛选**

——生产**建立突变库**

高频随机突变方法：易错 PCR

、逐点饱和突变、DNA

shuffling

DNA shuffling：

单基因 shuffling 引起较少点突

变，Family shuffling 整合 DNA

随机突变和同源基因随机重组定向进化方法比较：

error-prone PCR

2-6 nucleotide mutations / DNA

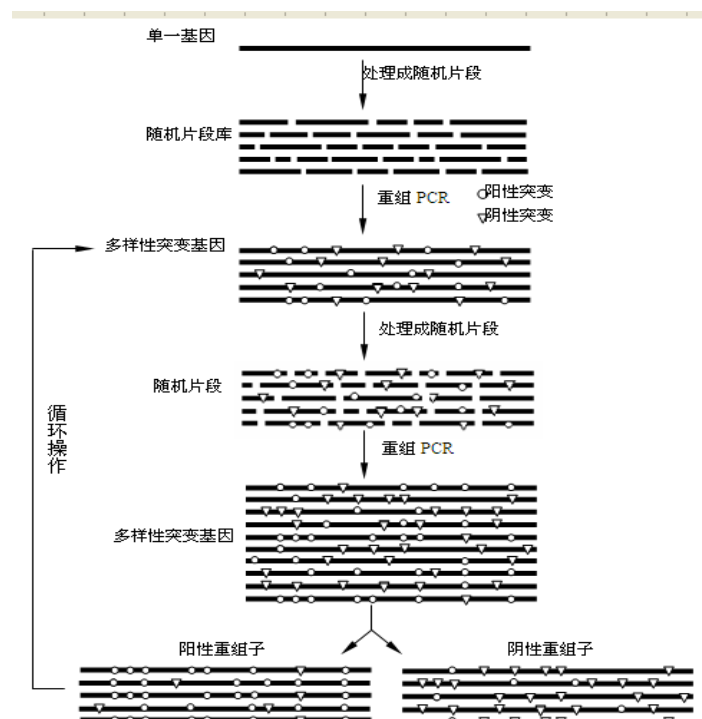
molecule

1-3 amino acid substitutions /

protein molecule

DNA shuffling

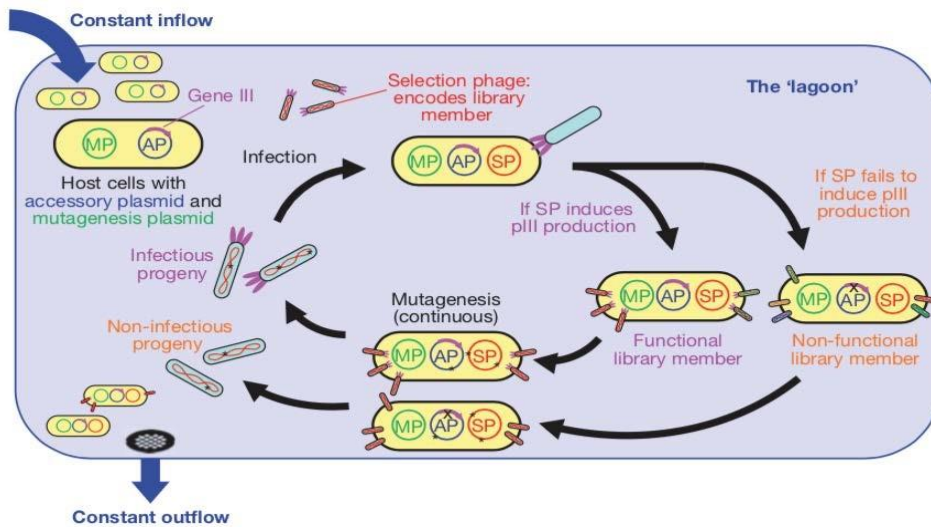
high homology at DNA level (> 60% identity)



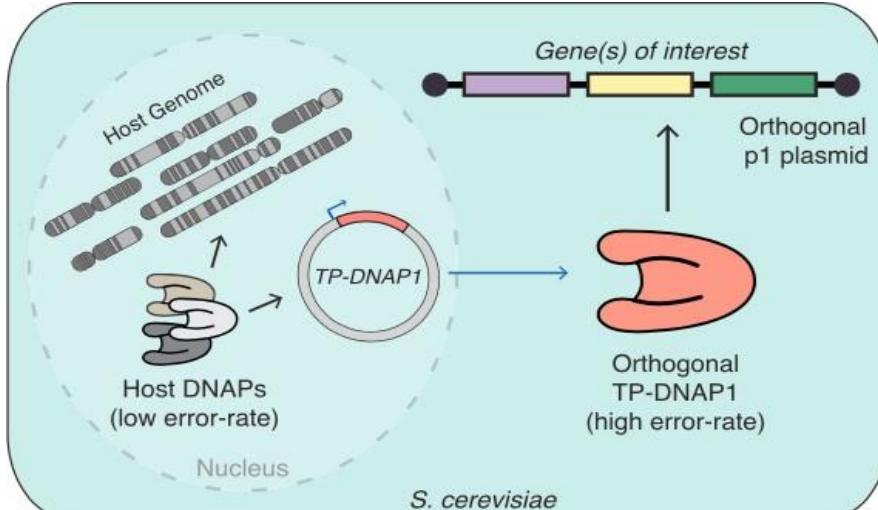
- fragmentation by DNase (multiple recombination)
- restriction enzymes (multiple recombination)
- low homology at DNA level**
- domain swapping (single-site recombination; ITCHY)
- shuffling of “synthetic genes” (multiple recombination)

高通量筛选

PACE



OrthoRep



小结：

选择起始基因重组表达，建立测活体系和/或筛选方法如果知道结构功能关系，第一步先采用有理设计方法

此后，以随机突变技术微调得到的突变体，并辅以高效的体内或体外筛选

2017 题目：《详述重组表达你所感兴趣的某个蛋白质的技术路线》总分 16.5（及格分 9.9 分）

得分段分布：

8~9.5 分：不合格分段：5 份（1 份 8 分，1 个 9 分，3 个 9.5 分）

对题意理解不明，答题毫无逻辑；三大块主要内容（序列获取、表达系统选择和表达优化

) 最多提到一块内容。

10~11.5 分: 及格, 低分段: 27 份

有基本逻辑, 答题中能艰难看出三大块主要内容, 或者只提到其中两块内容并有基本描述。

11.5~13.5: 中等分段: 32 份

提到三块主体内容, 并给出基本描述。

14~15.5: 高分段: 31 份

逻辑清楚, 三块主要内容都能答到, 但有明显缺漏或部分描述有误。

16 分: 5 份评分标准:

三块主要内容明确, 且得分项按条罗列明确, 表述基本无误。

1、 序列(目的基因)获取(共 5 分, 提到就给 3 分。下列具体方法两条各 1 分; 对于具体案例, 只要提到获取相应基因, 3-5 分酌情给分)

1.1 序列已知: 文库中亚克隆, 直接(RT)PCR 获得, 合成

1.2 序列未知: 联配同类酶的已发表序列, 根据保守氨基酸序列设计简并引物扩增基因; 纯化酶, 测定部分氨基酸序列, 设计简并引物扩增基因; 以方法 1, 2 设计 DNA 探针进行

southern 杂交和/或菌落杂交; 纯化酶, 制备抗体, 用免疫印迹的方法筛选阳性克隆; 基因组测序

2、 表达系统选择(共 4.5 分, 提到就给 2 分; 提到大肠杆菌/pET 系统加 1 分, 描述出优势加 0.5 分。提到优先根据文献中条件, 次选大肠系统-酵母系统-其他系统, 并阐述优势及选择标准, 打3.5分及以上)

3、 表达优化(共 7 分, 提到就给 3 分。提到需要提高表达量&可溶性加 1 分, 下列具体策略三条各 1 分)

A 高表达低可溶: 降低 IPTG 浓度 (1uM, 10uM, 100uM), 降温低至 18°C; LB 换TB培养基; 用弱启动子/生长缓慢宿主菌(DH5a); 与 MBP 融合表达; 共表达分子伴侣改善可溶性; 蛋白质工程改造

B 高可溶低表达: 换 Rosetta 宿主; 密码子优化

C 低表达低可溶: 优化可溶性——优化表达

8 金玫蕾 实验动物与行为分析

By 逆境中心 吴庆兵 王肖肖 赵宇航 李智慧

Part 1 知识点整理

1、实验动物和实验动物科学

1.1 实验动物、实验用动物和实验动物科学

实验动物是在一定条件下人工饲养繁殖，具有特定生物学特性，用于科学研究的动物。实验动物是生命科学不可缺少的支撑条件，是为人类的健康和发展做出贡献和牺牲的生命体。

用于科学实验的动物都可称为实验用动物，包括实验动物，家畜和野生动物等。实验动物科学包括实验动物和动物实验，是生命科学中的重要分支。

1.2 实验动物的质量控制

实验动物的质量控制=生产管理+质量检测

实验动物的质量检测包括：

- (1) 遗传质量监测
- (2) 微生物质量监测
- (3) 营养质量监测
- (4) 环境质量监测
- (5) 生物学特性质量检测

1.3 当前实验动物科学发展的趋势

从偏重微生物学质量控制到偏重遗传学质量控制——>倡导 3R：替代（Replacement）减少（Reduction）优化（Refinement）——>与高新技术结合，与多种学科交叉，加强实验动物科学本身的研究

2、动物行为学在整体动物学水平生命科学研究中的作用

2.1 动物行为学的基本研究方法

- (1) 行为学模型的建立和改进应有明确的目的。
- (2) 行为学实验一定要建立量化指标，才能进行比较研究。
- (3) 由于整体动物的复杂性以及个体差异，一定要保证经过重复性验证的数据，才能作为下一步实验的基础和依据。
- (4) 符合正确（exact），高效（efficient），容易（easy），经济（economic）的“4E”标准。

2.2 在基因功能研究领域的作用

整体动物学水平上的基因功能研究已经越来越受到国际学术界的重视，这方面的研究与分子生物学相关研究的结合，已经成为阐述基因功能的强有力手段。而实验动物科学在其中所起的作用是不可替代的，实验动物科学将会因基因功能研究的展开而得到进一步的发展。大规模筛选新基因功能的动物行为学检测平台的建立和应用
反义核酸技术、RNA 干扰技术与动物行为学实验的结合
功能检测平台的优越性：快速简便直观，可与遗传工程动物的性状进行比较
动物学与分子生物学、细胞学以及遗传学的交叉和结合

小鼠的行为学检测模型为：

- (1) 考察日常代谢能力的摄食量和摄水量
- (2) 考察 Locomotion（移动）和 rearing（直立）的旷场行为
- (3) 考察疼痛阈值的甩尾试验
- (4) 考察认知能力和环境适应性记忆的洞板试验
- (5) 考察记忆能力的步下法实验和步入法实验

2.3 在人类疾病动物模型的建立和疾病机理研究中的作用

动物模型的分类：自发性模型动物

诱导性模型动物

动物实验模型

生命科学研究离不开动物模型的培育，使用和研究

(1) 诱导性动物模型

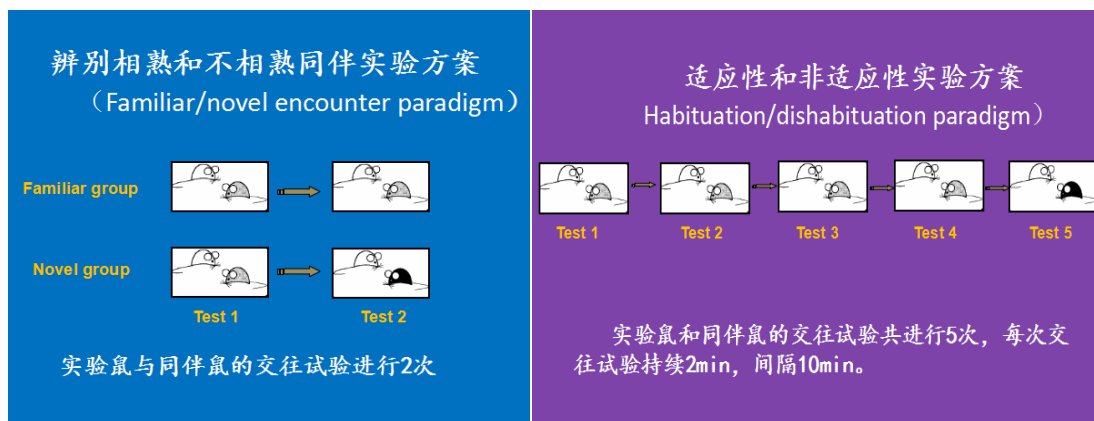
a. 精神分裂症的小鼠模型

用 MK-801 诱导实验小鼠建立的精神分裂症动物模型可以用来研究该病的发病机理，相关基因以及治疗药物的筛选。

b. MK-801 诱导的亚慢性动物模型

(2) 考察社交认知和社交记忆的方法

小鼠在与同伴的初次交往中建立对同伴的认知，如果与认识的同伴再次交往，小鼠对同伴的亲密度下降，即社会探索行为减少；如果再次交往的是新同伴，则亲密度保持不变。小鼠社交行为模型就是利用这一特性，考察小鼠的社交认知和社交记忆。



(3) 多种多样的动物模型

- AD（老年痴呆症）模型
- 帕金森氏症模型
- 不可预知慢性温和应激模型（抑郁症模型的一种）
- II 型糖尿病模型
- 社交行为模型
- 嗜酒精模型
- 疲劳模型
- 代谢模型
- 感染动物模型等

2.4 实验动物在药物研究和新药开发方面的应用

(1) 人类疾病动物模型的建立

- (2) 新药筛选
- (3) 相关功能基因筛选
- (4) 毒理研究

2.5 实验动物伦理

近年来我国实验动物科学领域内关于伦理问题的进展

- (1) “3R”研究概念的传入
倡导 3R：替代（Replacement）减少（Reduction）优化（Refinement）
- (2) 实验动物纪念碑的出现
- (3) 2002 年 4 月 180 次香山科学会议的召开：主题一我国生命科学研究中的伦理问题
- (4) 《实验动物管理条例》修订稿增加了动物福利的相关内容，2006 年科技部颁发了《关于善待实验动物的指导性意见》
- (5) 动物实验技术操作的规范化

3、实验动物在动物实验中的应用方法

3.1 实验动物的选择

- (1) 种的选择
不同种的实验动物适合于不同的实验是显而易见的。例如，药物安全性试验一般先要经过小动物试验，然后进行大动物试验，最后才进入临床试验阶段。
- (2) 品系的选择
不同品系的动物由于遗传背景不一，常常导致同一实验结果的差异；因此了解什么样的品系适合于什么样的实验非常重要。
- (3) 动物的数量和分组
如果应用质量高的动物，数量即可减少；例如应用合格的实验小鼠，每组 8—10 只就可以了。动物实验应分实验组和对照组，根据需要实验组设不同的剂量组，对照组分为阳性对照组，阴性对照组和空白对照组等。

3.2 实验动物的正确使用

在动物实验中正确使用实验动物

- (1) 了解动物的特性：如小鼠的昼夜节律，性别差异等
- (2) 克服应激性反应：如甩尾试验时应正确抓取小鼠，避免应激反应
- (3) 识别假象：如由于不同位置温度的差异导致摄食量的差异

3.3 实验动物的表型观察

- (1) 代谢的观察
摄食量，摄水量，粪蛋白含量等的测定
- (2) 行为的观察
运动，痛觉，认知，记忆等行为的观察
- (3) 生理生化反应的观察
血液中总蛋白，球蛋白，白蛋白量的测定，胆固醇，叶酸，血糖等指标的测定

3.4 实验动物实验数据的分析

- (1) 生物统计学基础
- (2) 选择合适的统计学软件
- (3) 作图的规范化
- (4) 从纷繁的数据中得出科学的结论

3.5 假象的避免和剔除

- (1) 避免由于实验动物种类和品系不同引起的差异
- (2) 避免由于实验动物性别和日龄不同引起的差异
- (3) 避免由于试剂的生产商和批量不同引起的差异
- (4) 避免由于参加实验的动物个数不够引起的差异
- (5) 剔除实验动物中异常个体的实验结果
- (6) 使用合格的实验动物和试剂
- (7) 查找实验失败的原因时采用逐个排除法。

4、动物实验技术

4.1 动物的抓取，保定，麻醉，采血，注射等

(1) 小鼠的抓取保定

小鼠性情较温顺，挣扎力小，比较容易抓取和保定。注意：抓小鼠尾巴应抓住尾巴中部或根部，不能仅捏住小鼠尾巴的尾端，因为这时小鼠的重量全部集中到尾端，如果小鼠挣扎，有可能弄破尾端。

在进行解剖、手术、心脏采血、尾静脉注射时，可将小鼠用线绳捆绑在木版上，或固定在尾静脉注射架及粗试管中。

戊巴比妥钠的用量与麻醉的持续时间

动物种类	用量 (mg/kg)		给药途径
	30min	60min	
小鼠	30	50	腹腔内
大鼠	30	40	腹腔内
沙鼠	30	50	腹腔内
豚鼠	20	30	腹腔内
兔	25	30	腹腔内

(2) 动物的麻醉

选择合适的麻醉药

掌握好麻醉药的药量是麻醉成功的关键

雄性动物对麻醉药更敏感

(3) 采血和注射

眼眶采血，尾静脉采血和心脏采血等

腹腔注射，皮下注射，侧脑室注射和脊髓注射等

4.2 动物的短期饲养和繁殖

在动物实验开始前以及过程中，经常需要对实验动物进行短期的饲养和繁殖，需要注意：

- (1) 尽可能保持与实验动物原有生存环境类似的环境
- (2) 根据实验设计的需要，分笼饲养实验动物
- (3) 注意实验动物伦理问题，不要在饲养动物的室内做实验，尽量减少动物的痛苦

4.3 抗体制作

- (1) 选择实验动物：小鼠，兔等
- (2) 免疫注射方法：腹腔注射，皮下注射等
- (3) 免疫时间流程（以小鼠为例）：首次免疫后间隔 6 周再免疫，以后每隔 2 周免疫 1 次，一共免疫 3—4 次。
- (4) 免疫注射量：每只小鼠不超过 200 μ l

4.4 动物实验中需要注意的问题

- (1) 实验设计要符合实验动物的活动规律
- (2) 选用合适的仪器设备
- (3) 制定科学的实验程序
- (4) 严格执行操作流程
- (5) 避免动物实验差异和动物中途死亡

Part 2 历年考题

1、结合自己的实践经验或学习体会试论述：哪些因素会严重影响动物实验的结果？（2005）

在动物实验中，有多种因素会严重影响动物实验的结果，可分为四大类：

第一是实验的动物因素：

如动物的种属，种系。不同种属动物的基础代谢率差异很大，在解剖，生理特征上和对各种因素的反应也不同。如对某种动物致病的病原体可能对另一种动物完全无害。不同种属动物的药物代谢动力学也不同，对药物的反应也不同。不同种属的实验动物适合于不同的实验是显而易见的。例如，药物安全性试验一般先要经过小动物试验，然后进行大动物试验，最后才进入临床试验阶段。而同一种属不同种系的动物对同一刺激的反应也有很大差异，虽为同一种属但其各个品系由于遗传背景不一，均有独特的品系特征。因此了解什么样的品系适合于什么样的实验非常重要。另外应尽量选用遗传背景明确的品系动物，而不选用随意交配繁殖的杂种动物。要根据不同的需要采用遗传学控制方法培育出来的具有遗传均质性的近交系动物、突变系动物、杂交系动物。

还要考虑动物的年龄和体重。动物的解剖生理特征和反应性随年龄有明显的变化，一般情况下幼年动物比成年动物更为敏感。选用实验动物时，应注意到实验动物之间、实验动物与人之间的年龄对应，以便进行分析和比较。动物的体重与年龄有一定的关系，在同一实验中，尽可能使动物体重一致，若相差悬殊，则易增加动物反应的个体差异，影响实验结果的正确性。

还应考虑实验动物的性别，生理状况，健康情况等。一般来说，实验若对动物性别无特殊要求，则宜选用雌雄各半。但由于雌性动物有性周期的制约，有时优先选择雄性动物进行实验。动物怀孕、哺乳等对实验结果影响很大，而动物换毛季节如鸡换羽，兔换毛时，动物的免疫功能低下。故实验不宜采用处于特殊生理状态下的动物。动物的健康状况对实验的结果正确与否也有直接的影响。一般宜选用健康状况良好的动物。

但有特殊要求和目的的实验研究除外。

第二是环境因素，主要指动物饲养的环境因素：

它包括气候因素：如空气的湿度、温度、气流、风速、换气次数（空气洁净度）等因素。应尽量保证适宜的温度和湿度，保证空气新鲜，注意通风换气。要特别注意饲养箱上下层温差等容易忽视的环节。如由于上下位置不同，温度的差异会导致实验动物摄食量的差异。

还包括环境中的理化因素：如空气中的氨和二氧化碳等成分的含量，环境中杀虫剂和消毒剂的含量、粉尘、噪声、照度。如考虑计算机的运行或荧光设备发光的影响。

以及动物的居住因素：如设施、笼架具、垫料、引水器。

还有生物因素：包括饲养密度、微生物控制（即病毒，细菌和寄生虫等各种病原体的控制）、与人和其他动物的关系等等。

第三是动物饲养的营养因素：如饲料，饮水和工作人员对实验动物的饲养管理等。实验动物品系不同，对各种营养的要求也不一致，要特别注意其饲料的营养比例。

第二点和第三点可统一作实验动物的饲养因素，不同的饲养条件可能会完全改变研究结果。比如：饮用含铅的水会损伤生活条件简陋的老鼠，却不会影响生活条件较好的另一组老鼠；实验室晚上存在的微弱光线会抑制褪黑激素的分泌，加速肿瘤的生长。

另外，我觉得不仅要注意饲养条件的一致，更要特别注意给实验动物营造一个自然的环境条件。动物的行为是基因与环境共同作用的结果。在一个不自然的环境中显然看不到基因的自然表达结果。忽视饲养条件不仅会影响行为研究，还会影响生理学和解剖学研究，每一

个行为都有其生理上的背景，如果行为发生了变化，就有可能是发生了生理上的变化。就像有病的实验对象一样，生活不自然的，不适合其本性的条件下的动物也不适合用作科学研究。

最后是动物实验的技术因素：主要是人为因素和实验操作处理等。

首先应按照不同实验要求选择和正确使用实验动物。如动物的许多功能随季节，昼夜产生变动，不同季节，昼夜交替会导致环境因素的改变，动物的机体反应性也会有一定改变，故应考虑季节因素和昼夜过程的影响。故应了解动物的特性，选择适宜的时间进行实验。

实验中应克服应激性反应，如做甩尾试验时应正确抓取小鼠，避免其产生应激性反应，尽量使动物处在自然的状态。

动物实验中往往要进行麻醉和手术，要注意选择合适的麻醉药，保证适度的麻醉浓度，并且在整个实验过程中保证始终恒定。注意雄性动物对麻醉药更为敏感的事实。同时要特别注意手术技巧，注意给药的方式，减轻动物的创伤，出血程度。另外所有实验操作应尽量熟练，减少对动物的刺激。

最后要注意设计正确的对照和重复实验，减少实验动物的数量，不造成浪费。实验设计要选用合适的仪器设备，制定科学的实验程序，严格执行操作流程，避免动物实验差异和动物中途死亡。

总之，动物实验的进行过程中，需综合考虑多种因素的影响，保持这些因素的一致性，否则这些变量都会严重影响动物的行为并最终影响到实验结果数据的可靠性，造成较大的误差甚至错误。

（精简版）

- a) 动物的品系：我们尽量要选择遗传背景比较纯的品系，这样对照组和实验组才有可比性，同时每组内部的方差也会小；
- b) 动物的批次：不同批次之间的动物会有差异，所以实验中对照组和实验组要用同一批次的小鼠，如果实验所要求的数量太大，同一批次不能满足，那最好能够将同一批次的一部分作为对照组，不能选择另一批次的动物做对照；
- c) 动物年龄的影响：不同年龄的动物，机体的机能代谢各项指标都会不同，年龄太小的小鼠还没有发育健全，太大的小鼠很多机能都开始衰退，都不能检测到最好的指标，所以我们一般都采用 1-2 月龄的小鼠；
- d) 温度的影响：温度对于动物的行为反应也有很重要的影响，小鼠的最适温度为 15-20 度。所以动物房必须要保证温度恒定。温度变动在一定范围内，机体可以本能地进行调节与之适应。但变化过大或过急，对机体将产生各种不良影响，影响实验结果。所以应该先让动物在实验室环境中适应。所以一般都要把动物取来稳定 1-2 小时再开始实验。
- e) 饲料的影响：要保证饲料一致，这点一般没有什么问题，最好能控制好小鼠的摄食量；
- f) 动物体重的影响：在相同年龄下的小鼠，一般体重也会有差异，在实验中我们尽量挑选体重接近的小鼠进行实验。

2、在动物实验中应该怎样正确使用实验动物？请结合自己的体会从几个方面进行阐述。

实验动物通常应该具备个体间的均一性、遗传性能的稳定性和比较容易获得这三个基本要求。具体要求如下：

1. 尽量选用功能、代谢、结构及其它方面机能与人相似的实验动物
一般来说，动物的进化阶段愈高，机能、代谢、结构愈复杂，也就愈接近人类。
2. 选用标准化的实验动物

标准化实验动物指遗传背景明确、饲养环境与动物体内的微生物得到控制、符合一定标准的实验动物。只有选用标准化实验动物，而且实验过程也在标准环境中饲养的动物，在实验中才能排除因动物杂交、遗传上的不均质及环境条件的变化，所引起的个体反应不一致，排除因动物携带细菌、病毒、寄生虫和潜在疾病的影响，才能便于分析实验结果，减少实验误差，提高科学性，准确性，把所获得的结果与同类研究进行比较、交流，并得到承认。在实验研究中应避免使用随意交配繁殖的动物，而应根据研究目的选择用遗传学控制的方法培育出来的近交系、突变系、系统杂交或封闭群动物。同时应对实验动物进行微生物控制，发展使用无菌动物、已知菌动物或无特定病原体（SPF）动物。

3. 选用解剖、生理特点符合实验目的要求的实验动物
4. 选用不同种属品系实验动物某些特殊反应，使适合于不同研究目的的需要
5. 实验动物种属、品系的选择
6. 遵守动物实验的一般规则

1) 年龄、体重

应根据实验目的来选择适龄动物。一般实验均用成年动物进行；幼龄动物一般较成年动物敏感；老年动物的代谢活动及各种机能低下，反应迟钝，除了作老年医学研究外，其它专业很少应用。同一实验所选动物年龄应一致，体重大致相近，一般不应相差 10%

2) 性别

不同性别动物对同一实验处理（如药物、刺激等）的感受性常有差异，在实验研究中如无特殊要求，一般宜选用雌雄各半做实验。

3) 生理状态与健康情况

动物的不同生理状态如怀孕、授乳时对外界刺激的反应常有所改变，在一般研究中应从实验组中删除；必须选用健康动物进行实验。

4) 实验季节和昼夜过程

不同季节和不同昼夜，动物机体反应性会有一定改变，在实验动物选择中也应予以注意。

5) 实验的重复与肯定

由于不同种动物有不同的功能和代谢特点，所以在肯定一个实验结果时，往往采用两种以上动物进行比较观察，尤其将动物实验结果推断到人的实验时应该慎重。例如，所选的实验动物如一种为啮齿类动物，另一种应该为非啮齿类动物。常用的序列是小鼠、大鼠、狗或猴。

7. 动物的品系：我们尽量要选择遗传背景比较纯的品系，这样对照组和实验组才有可比性，同时每组内部的方差也会小；

8. 动物的批次：不同批次之间的动物会有差异，所以实验中对对照组和实验组要用同一批次的小鼠，如果实验所要求的数量太大，同一批次不能满足，那最好能够将同一批次的一部分作为对照组，不能选择另一批次的动物做对照。

9. 动物年龄的影响：不同年龄的动物，机体的机能代谢各项指标都会不同，年龄太小的小鼠还没有发育健全，太大的小鼠很多机能都开始衰退，都不能检测到最好的指标，所以我们一般都采用 1-2 月龄的小鼠；

10. 温度的影响：温度对于动物的行为反应也有很重要的影响，小鼠的最适温度为 15-20 度。所以动物房必须要保证温度恒定。温度变动在一定范围内，机体可以本能地进行调节与之适应。但变化过大或过急，对机体将产生各种不良影响，影响实验结果。所以应该先让动物在实验室环境中适应。所以一般都要把动物取来稳定 1-2 小时再开始实验。

11. 饲料的影响：要保证饲料一致，这点一般没有什么问题，最好能控制好小鼠的摄食量；

12. 动物体重的影响：在相同年龄下的小鼠，一般体重也会有差异，在实验中我们尽量挑选体重接近的小鼠进行实验。

3、选择实验动物应该注意哪些方面？详细说明当准备做一个动物实验时，应从哪些方面来考虑与实验动物有关的问题？

种的选择

不同种的实验动物适合于不同的实验。例如，药物安全性试验一般先要经过小动物试验，然后进行大动物试验，最后才进入临床试验阶段。

品系的选择

不同品系的动物由于遗传背景不一，常常导致同一实验结果的差异；因此了解什么样的品系适合于什么样的实验非常重要。例如：对于位置结果的药理学初筛试验应当选择远交群。而对于已知实验药物的大致药理学作用，而想进一步研究其某一药理作用的实验，应当选用近交系，而且是对设计 assay 反应更为敏感的近交品系。

动物的数量和分组

如果应用质量高的动物，数量即可减少；例如应用合格的实验小鼠，每组 8—10 只就可

以了。动物实验分实验组和对照组,根据需要实验组设不同的剂量组,对照组分为阳性对照组,阴性对照组和空白对照组等。

选择实验动物的原则

科学研究、医疗实践、生物制品的生产和检定都离不开实验动物,为了保证实验结果的科学性、重复性,必须选择标准化及与实验目的相适应的实验动物。在某种意义上讲,选择适宜的实验动物来进行实验,是科学研究成功的关键。一般应遵循以下的原则:

一、选择与人体结构、机能、代谢及疾病特征相似的动物

利用实验动物某些与人类相近似的特性,通过动物实验对人类的疾病发生和发展的规律进行推断和探索。例如,在结构与功能方面,哺乳动物之间存在许多相似点,从解剖学上看,除在体型的大小比例存在差异外,身体各系统的构成基本相似,因此,它们在生命活动中基本功能过程也是相似的。

二、选用结构简单又能反映研究指标的动物

进化程度高或结构功能复杂的动物有时会给实验条件的控制和实验结果的获得带来难以预料的困难。在能反映实验指标的情况下,选用结构简单、例如果蝇的生活史短(12天左右)、饲养简便、染色体数少(只有4对)、唾腺染色体制作容易等诸多优点,所以是遗传学研究的绝好材料,而同样方法若以灵长类动物为试验材料,其难度是可以想像的。

三、选择适龄的实验动物

慢性实验或观察动物的生长发育,应选择幼龄动物。在老年医学研究中,常选用老龄动物,因其机体的代谢和各种功能反应已接近老年。一般实验中应选用成年的动物。

四、选择易获得、经济、易饲养管理的动物

在不影响实验结果正确可靠的前提下,尽量选用容易繁殖,比较经济实用的实验动物。当前“3R”原则已经在国际上被接受和推广,3R是指Reduction(减少)、Replacement(替代)和Refinement(优化),意思为尽量减少动物实验的次数和使用动物数量;尽可能使用替代物和善待动物,使实验设计尽善尽美。所以能用小动物的不用大动物,能用低等动物不用高等动物。

动物实验中需要注意的问题:

- 实验设计要符合实验动物的活动规律
- 选用合适的仪器设备
- 制定科学的实验程序
- 严格执行操作流程
- 避免动物实验差异和动物中途死亡

4、实验动物选择时应注意的问题。

一、年龄、体重

不同品种和品系的实验动物其寿命各不同,有的以日,有的以月,有的以年计算。如果对狗和小鼠均观察一年,所反应的发育过程是不同的,即使同样是狗,不同的年龄阶段所得的实验数据也不尽相同。所以选用实验动物时,应注意到实验动物之间、实验动物与人之间的年龄对应,以便进行分析和比较。同一实验中,动物体重尽可能一致,若相差悬殊,则易增加动物反应的个体差异,影响实验结果的正确性。

二、性别

性别不同对实验的敏感程度可不同。例大鼠皮下注射0.1~0.2ml的30%乙醇溶液,雄性动物死亡84%,而雌性动物死亡30%。有时雌性动物的敏感型较雄性高,如用戊巴比妥钠麻醉大鼠,雌性动物的敏感性是雄性动物的2.5~3.8倍。又如雌雄小鼠对食盐急性毒性与慢性毒性的敏感性不一致,急性毒性雌鼠较雄鼠敏感,而慢性毒性雄鼠较雌鼠敏感。一般来说,实验若对动物性别无特殊要求,则宜选用雌雄各半。

三、生理状况

动物如果怀孕、哺乳等对实验结果影响很大,因此实验不宜采用处于特殊生理状态下的动物进行。如在实验过程中发现动物怀孕,则体重及某些生理生化指标均可受到严重影响,有时应将怀孕动物剔除。动物换毛季节例鸡换羽,兔换毛,动物的免疫功能低下。

四、健康状况

动物的健康状况对实验的结果正确与否有直接的影响。健康动物从外观看, 体型丰满、发育正常、被毛浓密有光泽紧贴身体、眼睛明亮活泼、行动迅速、反应灵敏、食欲良好。微生物检测符合等级要求。

五、微生物等级

等级表示实验动物微生物控制的标准化条件。按微生物学控制分类, 国外将实验动物分成四级, 即普通动物、无特定病原体动物、悉生动物及无菌动物。根据我国实际情况, 国家科委将实验动物分为普通动物、清洁动物、SPF 动物和无菌动物(包括悉生动物)四个级别。各级动物具有不同的特点, 分别适用不同的研究目的。Gf 动物是一种超常生态模型, 即能排除微生物对背景的干扰, 亦减少了免疫功能的影响, SPF 动物是正常的健康无病模型, 应用这类动物, 能排除疾病或病原的背景性干扰; 普通动物具有价廉、易获得、饲养设施简便、容易管理等特点, 但选用时应考虑微生物对实验结果的影响。

六、遗传背景

尽量选用遗传背景明确的品系动物, 而不选用随意交配繁殖的杂种动物。采用遗传学控制方法培育出来的近交系动物、突变系动物、杂交系动物存在遗传均质性, 反应一致性好, 因而实验结果精确可靠, 广泛用于各科研领域。封闭群动物在遗传控制方面虽比未经封闭饲养的一般动物严格, 具有群体的遗传特征, 但是动物之间存在个体差异。因此, 其反应的一致性不如近交系动物。

5、当你准备做一个动物实验的时候, 你会从哪些方面来考虑有关实验动物的问题?

(1) 根据不同实验目的需要选择不同种属的动物

a. 从微生物学和寄生虫学标准去选择实验动物。目的: 使实验研究处于没有或很少外源干扰的情况下进行, 使实验结果正确可信。

按微生物学和寄生虫学标准选择: 普通级、清洁级、SPF 动物、无菌动物

b. 从遗传学的观点来选择实验动物: 近交系动物、突变系动物

c. 从效果上来选择实验动物: 效果比较就是要与人比较, 是否接近与人的条件。一般说来实验动物愈高等, 进化程度愈高, 其功能、代谢、结构愈复杂, 反应就愈接近人类。如诱发性动物的高血脂症或动脉粥样硬化, 猴的病变与人相似。

在不影响实验质量的前提下, 应选择最易获得、最经济、最易饲养管理的动物。如半数致死量测定---小鼠

选用解剖、生理特点符合实验目的要求的动物, 减少操作难度, 确保实验成功。如: 大鼠没有胆囊, 不能做胆囊功能的研究, 适合胆总管插管, 收集胆汁, 进行消化功能研究。

豚鼠自身不能合成维生素 C, 可进行维生素 C 缺乏症研究。豚鼠血管含补体丰富而且稳定, 用于免疫学试验。

(2) 排除各种客观因素影响:

a. 性别因素及年龄体重的影响

Eg. 大鼠麻醉量---雌性敏感性为雄性 2.5~3.8 倍;

小鼠食盐急性毒性试验---雌性较雄性敏感;

小鼠食盐慢性毒性试验---雄性较雌性敏感;

对动物性别没有特殊要求的实验应选用雌雄各半。

尽量保持年龄体重一致

b. 环境差异: 保持环境温度、湿度、光照、声音等一致, 尽量避免干扰

(3) 确保实验的可行性及可重复性, 同时确保单一变量

(4) 3R 原则: 替代 (Replacement), 减少 (Reduction), 优化 (Refinement)

6、如何在动物实验中避免和剔除假象？请举 2 个例子加以说明。

为了避免假象，应

- (1) 尽量将实验条件标准化，严格按照 protocol 设置实验参数
- (2) 同时要考虑实际实验环境，对实验条件作适当修改，做好修改记录以便日后查证。
- (3) 勤观察，及时发现异常实验动物的异常状况并采取相应措施

当实验结果出现矛盾或异常，要善于剔除明显的假象数据。对于非人为所致的可疑数据可通过统计软件分析决定取舍。

例如由于饲养笼安放位置不同，靠近窗口的动物受光照、温度的影响，可能跟其他组动物产生可观差异，干扰主观判断

又如做 Morris 水迷宫实验时，周围人的走动所引起的光线和声音变化可能影响实验鼠对方向的判断，使其寻找平台的策略路线发生改变,从而产生异常实验数据

7、你认为哪些动物实验的基本技能将会对实验结果有重要的影响？为什么？请举两个例子来具体说明。

很多基本动物实验技能难度不高，但是如果做得不好，将对结果产生深远影响。如腹腔注射，为了检测某些药物的药效，我们经常会用到腹腔给药。如果该技术掌握不牢，可能把药物打入皮下或者顺着入针孔回流到外面，影响药物吸收，难以得到期待的药效。甚至有可能刺破脏器，引起动物受伤或死亡。这样整个实验将难以得到较好结果或者无法继续进行。

又如做 2VO 或者 4VO 实验时，血管结扎不牢或错误，都会使模型构建失败，导致后续实验无法进行。

9 周兆才 蛋白质结构

By 生化所

Part 1 知识点整理

什么是结构生物学

1. 生物大分子的结构是如何形成的
 2. 生物大分子行使功能的结构机制
 3. 生物大分子的结构改变如何影响其功能
- (结构生物学的目的并不只是为了“解结构”!)

结构生物学的重要性

1. 蛋白质参与行使几乎所有的细胞功能
2. 蛋白质只有折叠成特定结构才能行使其功能
3. 蛋白质结构可帮助对其功能机制的深入理解
4. 蛋白质结构可帮助进行药物筛选及设计优化

蛋白质功能与结构的主要类别

- ① 结合: PDB 是第一个被人类解析的蛋白质晶体结构; ② 催化 ③ 分子开关; ④ 骨架

蛋白质结构的稳定性

蛋白质需具有一定的结构稳定性才能行使其生物学功能

蛋白质稳定性可以定义为净自由能减少, 一般为 21-42 kJ/mol

三级结构由非共价和共价两类相互作用稳定, 其中非共价相互作用为主

稳定蛋白质三级结构的共价相互作用

1. 二硫键 (对环境敏感)
1. 金属配位键 (Kd 从 mM 到 nM, 体外实验需特别考虑弱结合情况)
1. 辅因子共价结合 (某些蛋白需要小分子、DNA 或者其他蛋白质稳定其结构)
1. 翻译后修饰可改变蛋白质三级结构及其稳定性

蛋白质四级结构

1. 蛋白质四级结构指的是相同或不同多肽链进一步相互作用形成同源或异源寡聚
1. 分子间互补性对于四级结构的维持具有关键作用
1. 有时单个亚基必须在形成复合物状态时才能正确折叠
1. 不同亚基分子界面上的相互作用类型与稳定蛋白三级结构的相互作用类型相似
1. 在分子间相互作用界面上可能会有被捕获的水分子

蛋白质结构的柔性

蛋白质结构柔性对于其配体结合和催化是必需的

蛋白质三级结构的柔性使其能够对配体进行调适

不同蛋白质根据其功能具有不同程度的结构柔性

蛋白质晶体结构是时间和空间的平均, 是静态的, 而生理条件下蛋白质结构一个巨大的构象集合

蛋白质功能的不同层次

生化: 酶催、信号、转运

遗传和细胞: 表型、通路

生理和发育: 综合多方面

分子识别和催化均依赖于互补性

分子识别依赖于蛋白质三级结构形成的特定微环境,而催化反应则依赖于结合位点的特定微环境。

蛋白质的“结合”功能是最基本的

蛋白质的结合/活性位点

蛋白质结合生物大分子的位点位于蛋白表面上,形状可为凹,凸或平

蛋白质结合小分子的位点通常是裂缝,口袋或洞

催化位点通常位于结构域或者亚基界面上

配基结合位点通常具有更多的疏水残基暴露在分子表面

小分子结合位点通常是凹陷的并具有部分疏水性

以疏水补丁为主介导的弱相互结合使得蛋白可以交换伙伴(信号转导)

决定结合力的结构元素通常是不具有方向性的疏水相互作用

决定结合特异性的结构元素通常是具有方向性的,如氢键等

配体的结合与活性位点调控

静电作用和力矩可以引导配体进入结合位点

盐键等相互作用可以关闭结合口袋从而使得结合位点被屏蔽,配体需打破这些盐键作用才能靠近结合位点,这就是所谓“门控”结合

蛋白质与配体之间的盐桥和氢键对于它们的结合强度,特异性,以及配体在结合位点上的方位等具有关键作用

催化机制

有些活性位点主要是促进临近效应

有些活性位点主要是促进基态的去稳定化

有些活性位点主要是稳定中间态

许多活性位点必须保护底物远离水环境,但有必须能为底物所接近

许多活性位点使用辅酶因子来协助催化

有些活性位点使用多步反应机制

蛋白质功能调控

蛋白可被定位到细胞位点或者招募到特定复合物中

蛋白活性可被效应子结合或共价修饰(磷酸化最重要)所调控

蛋白活性可被其本身的数量和生命周期所调控

蛋白活性可被其所处微环境所调控:氧化态和 pH 都能够剧烈改变蛋白质的结构和功能。

效应配体对配体结合位点或活性位点的竞争性结合可以调控蛋白质功能

效应配体的协同性结合可以放大其调控效应

效应分子可在远端位点引起构象变化

核苷酸结合与水解驱动的构象变化是蛋白质行使分子开关和生物马达功能的结构基础

(ATPase 和 GTPase 的共同特征: P-loop, Switch-I, Switch-II)

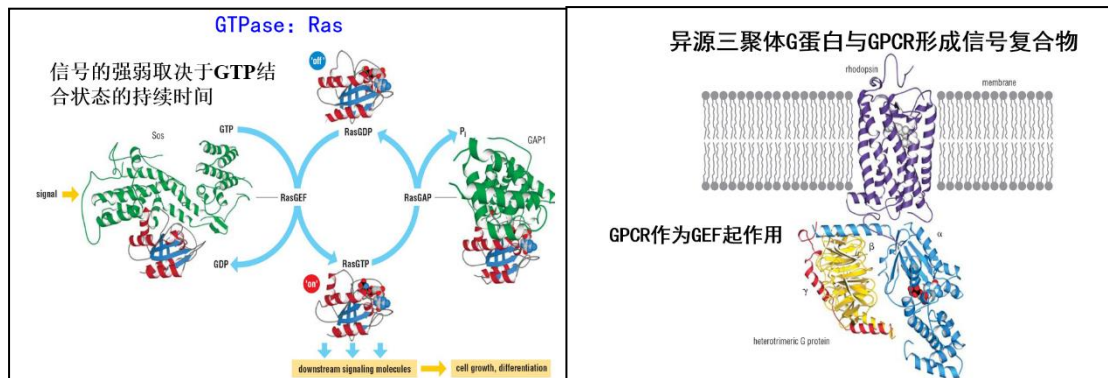
蛋白质功能可由数量有限的结构模块组合形成

细胞内信息流可被一系列能够识别特异性配体的蛋白结构域进行组合调控和集成。这些相互作用结构域(识别模块)的类型是有限的。

例如: GTPase

G 蛋白的核苷酸水解与交换开关循环是由其他蛋白的结合调控的

GTPase 分为小的单体蛋白和大的异源三聚体两类



激酶

人体中 50-90%蛋白被翻译后共价修饰

大多数翻译后共价修饰可以改变蛋白质定位、活性，以及与其他生物大分子的结合

真核细胞中已经发现超过 40 种翻译后共价修饰，而可逆磷酸化是最普遍的翻译后共价修饰

人类基因组编码的蛋白中约有 2%(超过 500 个)蛋白激酶

蛋白质激酶本身可被磷酸化修饰所调控

激酶的关键结构原件：A-loop, α C-Helix, Catalytic loop

从序列到结构和功能

序列对比:发现结构域、结构花样、功能花样

如果不同蛋白之间序列同源性超过 40%且重要氨基酸(如活性位点)保守，则可推断其具有共同的生化功能(但这并不意味着它们一定具有类似的细胞学及更高层次的生物学功能)

局部序列比对往往可以发现结构和功能花样，例如 Helix-turn-Helix motif, zinc finger motif 以及 Walker motif。

进化问题

进化产生了数量相对有限的蛋白质折叠种类和催化机制

趋异进化：序列和结构相似的蛋白质具有不同的活性位点、催化机制和生化功能

趋同进化：不同序列和结构的蛋白质具有相似的活性位点、催化机制和生化功能

具有不同序列但相似整体结构和活性位点的蛋白之间可能是同源的

鉴定蛋白质结合位点的策略

蛋白质结合位点有时候可通过对其三维结构的计算分析得到(GRID/MCSS)

实验方法测定蛋白质结合位点比计算分析准确

定点突变可以鉴定与结合或催化相关的氨基酸

DOCK 可以模拟蛋白质与配体之间的结合

蛋白质结构与功能的关系

蛋白质是由单个或多个结构域组成的

结构域/折叠花样的总数是有限的

蛋白结构的模块化本质允许一级序列存在插入或删除

一般来说，结构域与功能一一对应（如 Kinase），但并不总是如此（如 TIM 桶）

类似的结构可具有不同的功能,不同的结构可具有相似的功能

蛋白质结构技术的选择

取决于多方面因素：分子量、可溶性、结晶难易程度，分辨率决定了一个结构的信息含量(高于 1.5 埃为原子分辨率)，数据质量决定结构质量。

单晶衍射，核磁共振，冷冻电镜，小角散射，电子自旋共振，多角度光散射，各类光谱学。步骤：

蛋白质样品制备——结构测定与模建——结构分析与假说——功能分析与验证——机制确

立与应用

以下内容适当看看，上课讲的特别快!!

1. 蛋白质样品制备:

片段选取: 二级结构预测结合生化功能实验

表达体系: 原核、真核、无细胞

融合标签: HIS、GST、MBP、SUMO、STRAP、FLAG

层析纯化: 亲和、离子、分子筛、反相

蛋白质复合物: 可单独纯化后进行体外组装, 也可直接共表达共纯化

最终样品质量: 纯度、浓度和分子均一性

2. 蛋白质样品测活

1. 分子筛或动态光散射测聚集态

1. 如果是酶, 测定酶活

1. 如果形成复合物, 测定结合能力

1. 其他生化或细胞分析

3. 单晶培养

蛋白质溶液缓慢饱和: 高通量筛选+分步优化

影响晶体生长的因素: 样品质量、盐、沉淀剂、pH、温度、添加剂、配体、金属离子等等

培养方法: 最常用气相扩散法(坐滴、悬滴)

晶体质量: 单晶性、衍射能力

4. 单晶初步检测

是否为蛋白质晶体(偏光染色, 电泳, 荧光), 衍射能力如何(分辨率, 容积含量, 晶胞大小), 单晶性(不同衍射角度, 不同晶体部位), 对称性高低。

5. 单晶优化

样品质量控制(动态光散射检查, 必要时重结晶), 梯度微调前述影响晶体生长的各个因子, 改变培养方法, 调整蛋白浓度, 种晶(宏观种晶、微观种晶), 脱水(直接和间接), 选用合适的冷冻液和冷冻方法。

6. 衍射

7. 数据采集策略

1. 一般母体数据可选取 1.0 埃的 X 光波长采集(家用机在 1.54 埃, 同步辐射在 1.0 埃光质量较好)

1. 根据对称性、冗余度和信噪比确定所需扫描角度

1. 根据衍射强度、饱和情况确定所需曝光时间及探测器距离

1. 根据单晶性适当调整晶体角度和位置

1. 超过分辨率(高于 1.3 埃)数据往往需要高低区分开采集

1. 根据分子大小确定每张衍射画面所需扫描角度(一般 1 度)

8. 反常散射数据采集注意事项

1. 反常散射(含衍生物)数据的采集, 需根据其具体反常散射峰值来确定波长(理论值 vs 荧光扫描, 各有优缺点)

1. 根据晶体耐受辐射程度的实际情况, 确定采集多个波长数据的优先级, 以及各个波长数据冗余度(信噪比)

9. 数据处理

衍射数据质量: 取决于晶体质量和所用光源

衍射数据处理主要是对数据进行指标化(H, K, L):

1. 确定点群、空间群（结合系统消光情况）（略去对称问题）
2. 对每张衍射画面上的衍射点积分
3. Scale and merge 不同画面

主要指标：分辨率、信噪比、单晶性、数据完整度、R 因子
（直观：衍射点趋于几何点，衍射角度高且花样整齐）

10. 相位问题

电子密度可从结构因子进行傅立叶变换得到，结构因子是包含振幅和相位的矢量。**求解相位的方法：**分子置换（同源结构），反常散射（硒代），同晶置换（重原子），直接法。

11. 建模

子模型可从电子密度通过自动或手动建模获得：

1. 先主链，后侧链
2. 结合重原子、一级序列以及其他生化信息确定肽链起点和走向
3. 利用同源 motif 提高建模速度
4. 通过多数据来源提高建模准确性

12. 修正

模型修正就是对原子模型或坐标进行逐步修改，使其对应的与衍射数据相吻合。

1. 模型与数据的吻合程度通过 R 因子反应
2. 自由 R 因子（R_{free}）可以防止过度修正
3. 需要注意几何参数不同与标准偏差太多
4. 温度因子（Bfactor）在一定程度上反应了结构柔性大小

13. 结构分析

活性位点，分子表面电荷与形状，与配体相互作用界面，构象变化。

14. 功能验证

基于结构分析的突变与野生型对比——生化分析：活性及相互作用，细胞学分析：活性及相互作用对定位及细胞表型影响，遗传学分析：果蝇或小鼠表型变化及相关信号通路。——机制修正与完善

15. 应用

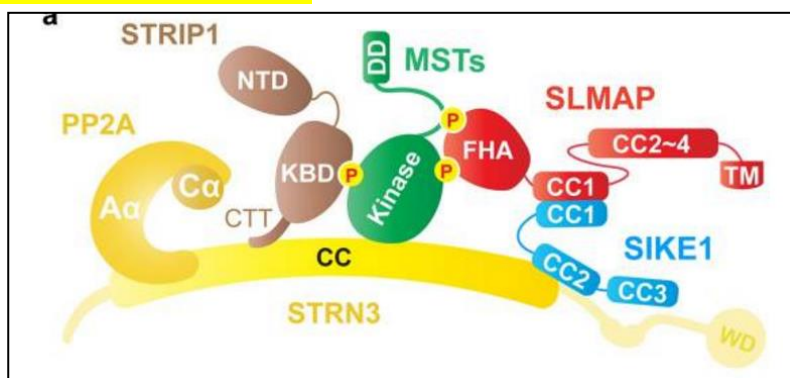
靶点分析及小分子药物筛选与优化

背景：Striatin-interacting phosphatases and kinases (STRIPAKs)是进化上保守的超分子复合物，由 striatin (STRN) 介导组装，其中包含蛋白磷酸酶 PP2A 和生发中心激酶（GCK）家族 1-3 的成员，与 Hippo 信号通路有关。Hippo 控制组织器官大小，YAP 是 Hippo 主要效应因子。在 STRIPAK 复合物的激酶成分中，MST1/2 最著名的是哺乳动物 Hippo 信号通路的上游激酶，一旦 MST1/2 激酶失活，未磷酸化的 YAP/TAZ 进入细胞核，它们与转录因子 TEAD1-4 形成复合物，从而调节通常促进细胞增殖并同时抑制细胞凋亡的大量基因的表达。在许多类型的癌症中，已经观察到 YAP/TAZ 的表达上调。PP2A α /c 结合的 STRN3 直接与 Hippo 激酶 MST2 接触，并通过磷酸化依赖性方式控制 MST2 的装载。MST2 的敲低显著降低了其底物 MOB1 (T35) 的磷酸化，导致 YAP 活性增强。

猜想：通过小分子药物 block STRN3 与 PP2A α 亚基的结合，而又不影响其各自正常功能的行使，破坏复杂的装配而 block STRIPAK 对 Hippo 信号的调节作用。

方法：MBP pulldown 显示了 STRN3 的 coiled-coil 结构域直接与 PP2A 的调节性 A 亚基（PP2A α ）相互作用其催化的 C 亚基（PP2A γ ），PP2A α /c 核心亚基通过 PP2A α 与 STRN3 结合形成全酶。PP2A α /c 结合的 STRN3 作为 STRIPAK 复合体的中心支架，不仅直接接触 MST2，还直接接触 STRIP1 和 SIK1，而 MST2 直接与 STRN3，STRIP1 和 SLMAP 结合。
方法仅是选取周老师文章中的一部分，并不完整，假如考到，还请自己补充。注意从结构-

生化-分子-细胞层次来解释!!!!



Part 2 历年考题

1. Please describe the differences and similarities of the two basic initial phase determination methods, MAD (multi-wavelength anomolous dispersion) and MIR (multiple isomorphous replacement) in 1-2 pages. (2005)

MAD (多波长反常散射): 晶体衍射中有一条弗里德耳定律, 就是说不论晶体中是否存在对称中心, 在晶体衍射中总存在着对称中心, 也即有 $F_{HKL} = F_{HKL}$ 。但是当使用的 X 射线波长与待测样品中某一元素的吸收边靠近时, 就不遵从上述定律, 也即 $F_{HKL} \neq F_{HKL}$ 。这是由电子的反常散射造成的, 利用这一现象可以解决待测物的相角问题。一般, 这一方法常与重原子同晶置换法结合使用。在收得同晶置换物的衍射数据后, 改变入射线波长至靠近重原子的吸收边处, 再次收集数据, 这套数据是存在反常散射的, 可利用这两套数据来求位相。有如多同晶置换法, 如采用几个不同波长的 X 射线, 对所含不同元素收集几套反常散射数据, 则可得更正确、更完整的相位信息, 是为多波长反常衍射法(MAD)。

MIR (多同晶置换): 把对 X 射线散射能力大的重金属原子作为标识原子。这种置换入重原子的大分子应与无重原子时的原晶体有相同的晶胞参数和空间群, 且绝大多数原子的位置相同, 故称同晶置换。从这些含重原子晶体的衍射数据, 利用基于派特逊法的方法可解出重原子的位置, 据此算出其结构因子和相角, 进而利用相角关系计算出没有重原子的原晶体的相角, 解出结构。经常使用不只一种重原子进行置换, 以得几种同晶置换衍生物, 称多对同晶置换法。

两者的相同点: 都是利用重原子的特性来解决相角问题。

两者的差别: MAD 是基于 MIR 的基础之上的, 采用多种波长完备所需的信息。

2. 运用蛋白质结晶学解析蛋白质结构时遇到的最大难题是什么? 列举两种常用的解决此问题的实验方法, 并简单说明其方法的基本原理. 2004

在大分子结晶学中, 相角问题, 也就是相角的确定是最困难的难题之一。在进行 X 射线晶体结构分析时, 数据收集只能纪录各个衍射线的强度, 而与振幅相对应的 X 射线散射的相位不能被直接测定, 因此衍射线的相角信息必须通过其他方法来进行测定, 这就是相角问题。一般采用多重同晶置换 (MIR)、多波长反常散射 (MAD) 等技术确定初始相位。

3. 举例说明几种结晶蛋白质的方法 (2006)

预测: 研究蛋白质 3D 结构的重要性。

测定生物大分子三维结构所使用的三种主要实验技术方法

1. 晶体 X 射线衍射 (X-ray diffraction) 技术

所能测定的生物大分子的**分子量范围是很宽**的, 可以从 1kDa 以下到 400kDa 甚至更大, 而且技术的**成熟度比较高、应用成本比较低廉**。**缺点**是必须预先制备出适合于 X 射线衍射的单晶体。

2. 溶液多维核磁共振 (NMR) 技术

该技术不需要预先制备晶体。该方法技术正在酝酿着革命性的突破, NMR 技术的应用**成本远高于**晶体 X 射线衍射技术。适用于**分子量<30kDa 的可溶性蛋白**, **须同位素标记**; **优点**是动态的溶液结构, 更接近于生理状态。

节速环节: 数据收集和处理 (几个星期), 12 NMR 数据/年 (600MHz 仪器)。

3. 低温电子显微镜三维电子衍射图象重构技术

非常适合测定**分子量非常巨大的生物大分子的复合体**, 例如病毒、膜蛋白的复合体等等。**但分辨率低, 方法还有待发展**。

试论述蛋白质结构定性相关的主要化学相互作用 (共价与非共价), 从四个方面简述蛋白质结构技术应用实例

共价相互作用: 二硫键 (对环境敏感)

金属配位键 (Kd 从 mM 到 nM, 体外实验需特别考虑弱结合情况)

辅因子共价结合 (某些蛋白需要小分子、DNA 或者其他蛋白质稳定其结构)

翻译后修饰可改变蛋白质三级结构及其稳定性

非共价相互作用: 氢键: 在稳定蛋白质的结构中起着极其重要的作用

范德华力: 包括定向效应、诱导效应、分散效应, 其中最主要为分散效应

疏水作用: 蛋白折叠是总是倾向于把疏水基团埋藏在分子内部

盐键 (离子键): 正电荷与负电荷之间的一种静电引力

蛋白质结构与技术应用实例:

1、结构从精确相互作用角度帮助建立蛋白质发挥活性与功能的调控机制

如血红蛋白(hemoglobin, 简写 Hb)。Hb 分子由四个亚基构成, 每一亚基结合一分子血红素。正常成人 Hb 分子的四个亚基为两条 α 链, 两条 β 链。 α 链由 141 个氨基酸残基组成, β 链由 146 个氨基酸残基组成, 它们的一级结构均已确定。每一亚基都具有独立的三级结构, Hb 是通过其辅基血红素的 Fe^{++} 与氧发生可逆结合的, 血红素的铁原子共有 6 个配位键, 其中 4 个与血红素的吡咯环的 N 结合, 一个与珠蛋白亚基 F 螺旋区的第 8 位组氨酸(F8)残基的咪唑基的 N 相连接, 空着的一个配位键可与 O_2 可逆地结合, 结合物称氧合血红蛋白。Hb 在体内的主要功能为运输氧气, 而 Hb 的别位效应, 极有利于它在肺部与 O_2 结合及在周围组织释放 O_2 。

2、结构从原子水平上揭示关键蛋白质特定氨基酸突变如何导致人类疾病

在蛋白质的一级结构中, 参与功能活性部位的残基或处于特定构象关键部位的残基, 即使在整个分子中发生一个残基的异常, 那么该蛋白质的功能也会受到明显的影响。被称之为“分子病”的镰刀状红细胞性贫血仅仅是 574 个氨基酸残基中, 一个氨基酸残基即 β 亚基 N 端的第 6 号氨基酸残基发生了变异所造成的, 这种变异来源于基因上遗传信息的突变

3、结构的可视化特征帮助进行药物筛选与理性设计和优化:

如 GPCR, 已知结构, 构建模型和计算机算法, 导入小分子化合物库搜索与口袋特异性结合的活性分子, 再对其进行计算机模拟基因团优化, 进一步实验合成该小分子化合物

4、结构从构象变化角度帮助建立生物学现象与过程的微观机制: 裂解 LINC 复合物导致细胞失去机械强度和故障。

10 梁旻 基因治疗

By 巴斯德所

11 王勇 代谢工程与合成生物学

By 植生所

12 丁秋蓉 干细胞

By 营养健康所

13 杨黄恬 干细胞的诱导与分化

By 药物所