

基因工程抗体（方堃）

孙兵

历年考题

2012 年

简述鼠源和人源抗体的主要区别，以及全人源抗体的几种制备方法及其优缺点。

2016 年

简述人源化抗体（人源改造抗体）的基本原理及其分类

知识点整理

免疫球蛋白的基本结构组成：四肽链结构，两条重链(H)、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。

免疫球蛋白根据重链分类，根据轻链分型：由重链分出 IgG(γ)，IgM(μ)，IgA(α)，IgD(δ)，IgE(ϵ)；由轻链分出 κ 和 λ 型。

木瓜蛋白酶可以将 IgG 水解成两个相同的 F_{ab} 段和一个 F_c 段，三者的分子量相同均为 50kD， F_{ab} 上的重轻链可变区负责结合和识别抗原， F_c 能够与免疫细胞表面的 F_c 受体结合。

多克隆与单克隆抗体的制备

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，纯化后既能得到多克隆抗体。

经过特定抗原处理的 B 淋巴细胞（每个效应 B 细胞表达一种抗体，对应一种抗原表位，一种抗原表面可能存在多个抗原表位）与小鼠骨髓瘤细胞经过细胞融合后得到杂交瘤细胞株，经过筛选去除未融合的细胞，并分离表达不同抗体的杂交瘤细胞，ELISA 检测其效价合格后，收集上清就能得到单克隆抗体。

免疫球蛋白的作用

- 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：免疫球蛋白重轻链恒定区的 C_{H2} 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 F_c 受体：当抗体的 F_{ab} 段识别并结合病毒感染细胞或肿瘤细胞表面的特定抗原， F_c 段与免疫细胞（如 NK 细胞、巨噬细胞等）表面的 F_c 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、免疫球蛋白能够通过胎盘，为不能产生抗体的胎儿提供免疫保护。

基因工程抗体的基本原理

实验：利用多种不同的抗原免疫 B 淋巴细胞，使之表达不同的抗体，并且克隆获得这些抗体的编码基因。对这些基因的重轻链可变区编码基因分析后发现，两段基因中都有三个片段突变率显著高于其他区域，其他区域相对保守。这些区域被称为 Complementarity-determining regions(CDR)区，直接决定了抗体与抗原结合的特异性。

人源改造抗体根据其人源化程度可分为三类：

- 1、嵌合抗体 (chimeric antibody, 人源化程度 60%-70%)，将鼠源抗体的 F_{ab} 段与人源抗体的 F_c 段重组在一起。
- 2、人源化抗体 (humanized antibody, 人源化程度 90%-95%)，将鼠源抗体的 CDR 片段重组到人源抗体中。/*我认为，这里的“人源化抗体”应该是狭义的概念，广义即是人源改造抗体*/
- 3、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 细胞永生技术制备完全人源抗体

抗体药物在应用中存在的问题：

- 1、质量：抗体中的鼠源结构能够引起过敏反应；鼠源抗体人源化后，其效价明显降低，导致临床疗效降低。
- 2、产量：抗体药物的临床需求量巨大，一般实验室用抗体的制备工艺远远不能满足临床需要。

基因工程抗体的基本原理：借助基因工程手段，将编码抗体重轻链可变区的基因重组到真核表达载体上并进行表达。（准确来说这是嵌合抗体的原理）

基因工程抗体的目的：

- 1、质量：减少鼠源成分，降低 HAMS 反应；保留抗体的抗原结合能力。
- 2、产量：易于大规模生产和应用于临床。

基因工程抗体的优点和缺点

优点：1、不受动物品系和抗体类型的限制。

2、鼠源抗体人源化后，潜在的抗原表位减少，抗体的异源性和免疫源性降低，疗效增加。

缺点：基因操作使抗体的亲和力减弱，与完整的抗体结构相比功能明显减弱。

基因工程抗体制备的主要方法 ☆

1、人鼠嵌合抗体(chimeric antibody)

基本原理：利用基因重组技术，将鼠抗体编码基因的重轻链可变区部分与人抗体的重轻链恒定区编码基因进行重组，减少鼠源结构、增加人源结构，并且保持抗体与原抗原的特异性结合。

基本流程：

- 1、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。
- 2、借助 RT-PCR 手段，克隆得到编码抗体重轻链可变区部分的基因。
- 3、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。
- 4、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。
- 5、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）。

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：（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、人源化抗体(humanized antibody)

人源化程度高于嵌合抗体，仅将鼠源抗体的 CDR 编码基因重组到人源抗体基因中。

3、完全人源单克隆抗体(full human monoclonal antibody)

①转基因小鼠(transgenic mice)

首先将小鼠编码免疫球蛋白重轻链的基因剔除(knockout)；

再制备表达人的免疫球蛋白重轻链的转基因小鼠；

两种小鼠交配，获得只表达人抗体重轻链基因的小鼠。经过特定抗原免疫之后，小鼠即可产生完全人源抗体

优点：由于抗体在体内产生，经历正常装配和成熟过程，因而具有较高的亲和力，抗体的功效较好，优于其他人源化抗体制备方法。

缺点：难度大，耗时长，费用高，尚无法商业化。

主要应用于肿瘤抗体药物的生产。

②噬菌体抗体库技术(phage antibody library technique)

基本原理：将人的 Ig 重轻链可变区呈递在 λ 噬菌体表面，组成抗体库。

优点：

通过噬菌体将抗体的基因型与表型偶联，已进行分子克隆和基因操作；

能够高通量筛选与抗原结合的抗体，并通过感染宿主菌进行扩增；

可以在体外直接制备特异性针对抗原的人源化抗体片段；

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。

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。

③用人的骨髓瘤细胞直接制备全人抗体

优点：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。

④B 细胞永生化的技术

利用 EB 病毒将人的淋巴细胞永生化的，可产生分泌抗体的 B 淋巴细胞克隆。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。

⑤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。

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）。

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

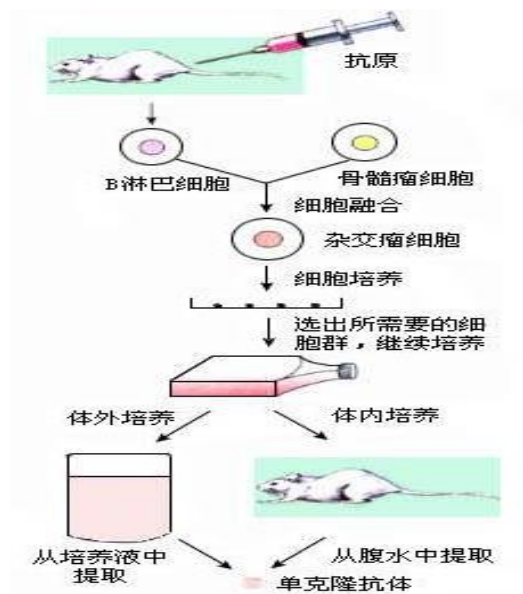
对于检测抗体阳性的杂交克隆应尽早进行克隆化，否则抗体分泌的细胞会被抗体非分泌的细胞所抑制。常用的克隆化方法有有限稀释法和 FACS（荧光激活分选仪）分离法。

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。



药理学实验技术（方堃）

1、简述药理学在生命科学研究中的地位和作用

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。

药理学是连接医学、药学、分子细胞生物学等生命科学的桥梁学科。

药理学在生命科学研究中的作用：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。

例如：药理学研究推动受体学说的提出和发展

吗啡镇痛与成瘾机制推动了阿片受体的探索。

青霉素的研究推动了细菌细胞壁结构的探索。

喜树碱抗肿瘤作用机制研究推动了对拓扑异构酶Ⅰ的探索。

长春碱类/紫杉醇抗癌作用机制研究推动了对微管聚合和解聚的研究。

与 RNA 干扰，基因敲除/过表达相似，以药物分子为工具，根据其产生的特定效应/作用，可以揭示新的生命现象和规律。

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即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。

量反应量效曲线能够说明药物作用的以下特性：

最小有效量(minimal effective dose)：最低有效浓度(minimal effective concentration, C_{min})，即能够引起效应的最小药量或最小药物浓度，亦称阈剂量或阈浓度

最大效应(maximal effect, E_{max})：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，也成效能(efficacy)。

半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect, EC_{50})：能够引起 50% 最大效应的浓度

效价强度(potency)：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。

质反应量效曲线能够说明药物作用的以下特性：

半数有效量(median effective dose, ED_{50})：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(median lethal dose, LD_{50}): 能够引起 50% 实验动物死亡时的药物剂量。

治疗指数(therapeutic index, TI): 药物的 LD_{50}/ED_{50} 的比值, 用以表示药物的安全性。

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(margin of safety): $ED_{95} \sim TD_5(LD_5)$ 间距

可靠安全系数(certain safety factor): $CSF = LD_1/ED_{99}$ 。

药物的时量关系(time-concentration relationship)是指体内药量随时间而变化的过程, 是药动力学研究的中心问题。药物的时效关系(time-response relationship)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能够说明药物作用的以下重要参数:

峰浓度(C_{max}): 一次给药后的最高浓度, 此时吸收与消除达到平衡。

曲线下面积(AUC): 单位 $ng \cdot h/mL$, 与吸收进入体循环的药量成正比, 反映进入体循环药物的相对量 (反映血浆暴露量)。

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, $T_{1/2}$ 是药物的特征性常数, 一般情况下不受药剂量的影响。一次给药后, 一般经 4~5 个半衰期药物基本从体内清除干净。

3、简述药物的一般作用机制

药物发挥作用或产生特定效应的前提是, 药物与机体或病原体中合适的靶点结合 (蛋白质、DNA、RNA 等), 形成药物-靶点复合物。若药物-靶点复合物位于目标细胞、组织、器官、系统中, 则产生治疗作用, 若位于非目标细胞、组织、器官、系统中时, 则引起不良反应。当药物与非靶标的生物分子相互结合形成复合物, 则在任何细胞、组织、器官、系统中都引起不良反应。

药物分子与靶分子、基团、残基, 甚至原子水平, 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分子水平的通用：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细胞水平的通用：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组织器官水平的通用：离体、切片、免疫组化、显微镜术
- ⑥整体水平的通用：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

多能干细胞与重编程（涂斌）

多能干细胞

干细胞：既可以自我更新，又能分化为其他种类的细胞

多能干细胞（Pluripotent Stem Cell, PSC）：具有无限的自我更新能力和分化成体内任何种类细胞，包括生殖细胞的潜能。常见的为胚胎干细胞和诱导多能干细胞。

为什么研究多能干细胞或其重要的意义？

1. 模拟体内发育过程，研究早期发育时间
2. 建立体外/动物疾病模型，探索疾病发生和治疗
3. 药物筛选，药物毒性实验
4. 疾病和组织损伤的细胞治疗

胚胎干细胞来源于受精卵发生第一次分化事件后形成的早期囊胚中的内细胞团（ICM）或者发生第二次分化事件后的细胞团（EPI）

历史：

1. Sir Martin Jhon Evans, 1981 年建立第一株小鼠胚胎干细胞，
2. James Thomson, 1998 年建立第一株人胚胎干细胞

小鼠胚胎干细胞的培养条件的发展历史（三种不同的方法）：

1. 含饲养层细胞（提供白血病抑制因子 LIF）和血清（提供骨形态发生蛋白 BMPs）
2. 无饲养层和血清—LIF&BMP：要加入 LIF 和 BMP。
3. 成纤维细胞生长因子抑制剂/细胞外信号相关激酶抑制剂 (Fgf/Erk1/2) 和糖原合成激酶 (GSK3 抑制剂)。

人胚胎干细胞的获取：通过免疫外科的手段的获取，将抗人血清抗体及补体和到囊胚混合，将外胚层去掉即可的得到人胚胎干细胞。

人胚胎干细胞的培养：

1. 饲养层细胞，产生 Activin A（激活素 A）
2. 碱性成纤维生长因子 bFgf 或 FgF2（激活素 A 与 bFgf，维持胚胎干细胞未分化状态）
3. 细胞培养需要成团进行，传代细胞（非单细胞）既可以使用酶消化，也可以使用机械分离，也可以两者联合
4. 加入 Rock 抑制剂可进行单细胞培养

胚胎干细胞（Embryonic stem cells, ES cells）的基本特征：

1. 核型正常
2. 具有体外无限增殖的能力
3. 能冻存能复苏

4. 能分化成各种各样的细胞

自我更新能力的检测方法：

1. 无限增殖（可传代 70 代）
2. 核型分析，核型正常, 未转化
3. 未分化的 ES 细胞的分子标记：未分化的 ES 细胞上存在多种分子标记物，如碱性磷酸酶、转录因子 Oct4、阶段特异性胚胎抗原（SSEA-1、SSEA-4）、Tra-1-60、Tra-1-81 等
4. 端粒酶活性：仍保持端粒酶活性
5. 克隆形成试验：能形成独立的克隆—具有复制能力

多能性更新能力的检测方法：

1. 体外内胚体的形成（EB 形成实验）
悬浮培养 ES 细胞，去掉自我更新的抑制因子，看其是否可以自发形成 EB，将其放到具有高吸附的培养皿中，检测其是否具有外、中、内胚层三个胚层的细胞。
2. 体内畸胎瘤的形成
将胚胎干细胞注射到肌肉或者体内，当其形成畸胎瘤后取出，做切片染色，看其是否形成了其他类型的细胞。
3. 能形成嵌合体后代
用黑鼠囊细胞团建立胚胎干细胞，将其注射到另外一个白色小鼠的囊胚中，将这样的囊胚放到假孕小鼠中，看其是否可以形成嵌合小鼠。如形成嵌合小鼠，将该鼠和纯白鼠杂交检测该胚胎干细胞是否具有形成生殖细胞的能力，若形成黑鼠则有。

ESC 分化的常用策略：

- 1、EB 形成
- 2、与其他类型细胞共培养
- 3、在特定培养基上单层培养

胚胎干细胞，ESCS 应用的挑战：

1. 功能供体细胞应该采用的分化策略
2. 缺少人源化的动物模型
3. 安全性
4. 免疫排斥

重编程

分化细胞回到多能干细胞的策略：

1. 核移植
2. 细胞融合
3. 转录因子诱导的重编程

诱导多能干细胞的转录因子发现过程：

1. Fbx15 Locus 只在未分化的胚胎干细胞中表达，在分化的细胞中表达则下降了。并且当该基因敲除后小鼠完全正常，细胞生存也不会受到影响；
2. 用 β geo 取代 Fbx15 基因，做成转基因的小鼠，然后制备该鼠的 MEF；
3. 选取 ES 细胞高表达的 24 中细胞因子，逐一转到上述 MEF 细胞中，
4. 用正确抗生素筛选存活的细胞组，该组转入的细胞因子则包含必须的诱导多能干细胞的转录因子，然后在逐一剔除多余的细胞因子，得到四个关键转录因子：Oct-4、Sox2、C-Myc、Klf4。

重编程常用细胞来源及特点：

1. 表皮成纤维细胞：细胞数量多，重编程技术成熟，难以采集。
2. 外周血单核细胞：便于采集（医院），不易污染。
3. 肾小管上皮细胞：便于采集（新鲜中段尿液中收集，对提供者不造成损伤）。

常用重编程技术及局限性：

1. 病毒转染：造成插入突变
2. 蛋白质诱导：低效，操作复杂
3. 小分子诱导：目前尚不适用于人体细胞
4. 附加体质粒转染：相对高效，易于操作，不整合外源基因，适用于多种体细胞（表皮成纤维细胞、外周血单核细胞、肾小管上皮细胞等）
5. Sendai 病毒

重编程细胞的应用

- 1、细胞替代治疗
 - a. 解决免疫排斥问题；
 - b. 避开 ESC 建系的伦理问题；
 - c. 针对疾病发生的个体特异性，实现治疗的个体化
- 2、建立疾病模型及研究其发病机制
以重大神经系统疾病：阿尔兹海默病、帕金森病和脊肌萎缩症为例。将有遗传突变的病人、没有遗传突变的病人和正常人来源的 iPS（前者与正常人对比如用于研究突变基因的致病机制，后者与正常人对比如用于发现疾病易感的机理），进行定向分化，即向乙酰胆碱能神经元、多巴胺能神经元和前角运动神经元定向分化（分别对应阿尔兹海默病、帕金森病和脊肌萎缩症）。然后在不同处理方式下（包括 Ab 处理、H₂O₂ 氧化应激、Glutamate 兴奋毒理和 MPTP for PD model 化学试剂处理），进行对比，主要包括细胞形态分析、细胞代谢分析及线粒体功能研究、细胞活性、神经肌肉连接中的突触传递分析、基因组学分析、小 RNA 组学分析、表观遗传组学分析和蛋白质组学分析。
- 3、建立基于疾病模型的药物评价和筛选体系
主要用于对现有药物的疗效及剂量的评估和对新药的大规模筛选。

考题：

1. 论述小鼠多能干细胞的分化潜能 14 年
2. 多能干细胞的定义，人和鼠的多能干细胞全能性检测方法 17 年

电生理技术

黄蕙修改后

1. 什么是电生理学？
2. 电生理的历史和基础
3. 电生理研究方法
4. 电生理展望

1.什么是电生理学？

电生理学（**electrophysiology**）是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。是电生理学研究的**主要技术**。

- 1.奔跑，飞翔，游泳，都取决于神经肌肉接头的电信号。
- 2.视觉，听觉，触觉，嗅觉，味觉，都取决于受体神经元把感观输入转换成电信号。
- 3.攻击行为，性行为，动物的生存依赖大量神经元的电活动。
- 4.残酷的自然选择中，动物进化的结果，是动物全部使用了快速而强大的电信号，来实现各种行为，包括智能行为，以及 **culture** 的雏形。
- 5.生物电信号可以被不断放大——不同的离子梯度会导致不同的电势梯度。所以电生理是最合适的工具，拥有最佳时空分辨率，来应对脑的电信号。

2.电信号的历史和基础（有兴趣可以看看，徐春老师 ppt 上的不全，这是历年 ppt 上的）

1786 年，伽伐尼蛙腓肠肌跳动实验发现生物电。

1922 年，厄尔兰格开始使用阴极射线示波器来记录生物电，标志着现代电生理技术的开始。早期的电生理技术只能记录大量细胞的同步的电活动，以后逐渐向微观和整体两个方面发展。

1928 年，Adrian 证实了神经细胞中电的存在。同时期神经元学说创立。

1949 年，凌宁等开始用微电极插入细胞内记录其电活动，使电生理技术达到细胞水平。

1952 年，电生理的黄金时期，Hodgkin 和 Huxley 记录了动作电位(Action Potential)。同年 Katz 发现了钙对于突触小泡释放的调节作用。

1976 年德国马普生物物理化学研究所 Neher 和 Sakmann 首次在青蛙肌细胞上用双电极钳制膜电位的同时，记录到 ACh 激活的单通道离子电流，从而产生了膜片钳技术。

1980 年 Sigworth 等在记录电极内施加 5-50 cmH₂O 的负压吸引，得到 10-100GΩ 的高阻封接（Giga-seal），大大降低了记录时的噪声实现了单根电极既钳制膜片电位又记录单通道电流的突破。

1981 年 Hamill 和 Neher 等对该技术进行了改进，引进了膜片游离技术和全细胞记录技术，从而使该技术更趋完善，具有 1pA 的电流灵敏度、1μm 的空间分辨率和 10μs 的时间分辨率。

1983 年 10 月，《Single-Channel Recording》一书问世，奠定了膜片钳技术的里程碑。Sakmann 和 Neher 也因其杰出的工作和突出贡献，荣获 1991 年诺贝尔医学和生理学奖。

突触传递的电/化学之争：

Henry Dale 和 Otto Loewi 于 1921 年前后发现神经传递间的化学信号，并发现了乙酰胆碱作为神经递质，后获得诺贝尔奖。Eccles 等人随后因在此方面的研究，亦获得诺奖。

张香桐先生作为树突研究的先驱之一，最先提出突触电位沿树突扩散传播。

冯德培先生作为神经可塑性研究的先驱之一，于 1941 年最早记录了接近神经可塑性的现象。

电生理基础（ppt 涉及的内容比较少，整理的有点乱也不详细，自己意会吧。）

Galvani's 实验证明了使用不同材料（金属和组织）的情况下可使肌肉收缩（A）神经切片表面接触肌肉时（B）坐骨神经切片表面接触大腿坐骨神经完整表面时电信号可以激发肌肉收缩

电信号可以激发触感

神经肌肉接头利用生物电完成运动

电信号是如何产生和传递的？（细胞受到刺激时在静息电位基础上产生可以传导的电位变化，电信号刺激是通过神经纤维传导的。神经传递的既有化学信号也有电信号，在神经元上传导的是电信号，在神经元末梢传递的大多是化学信号，也有电信号传导的）

如何记录细胞内电信号？（玻璃微管电极可用于细胞内电信号的测量）

生物电：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）

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_o + P_{Na}[Na^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_o}$$

Goldman Equation

$$V_m \cong \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$$

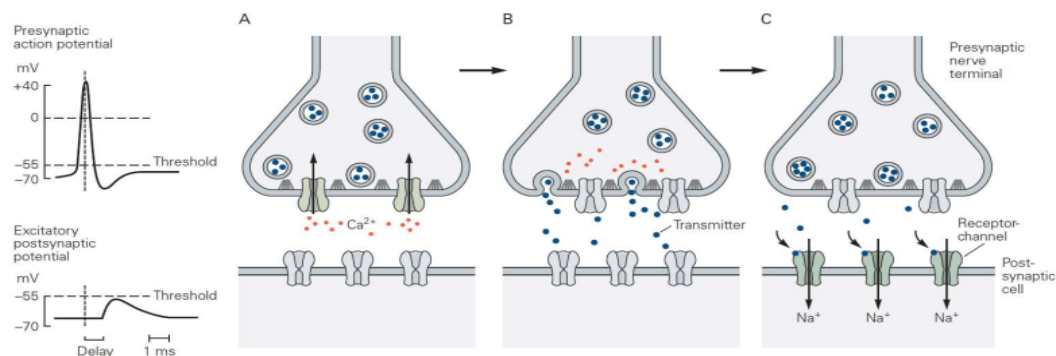
细胞膜的电学特性（ppt 中没有详细讲，应该跟细胞膜上的各种离子通道和离子泵有关）

电生理研究的技术基础：膜片钳、电压钳（后面会谈到）

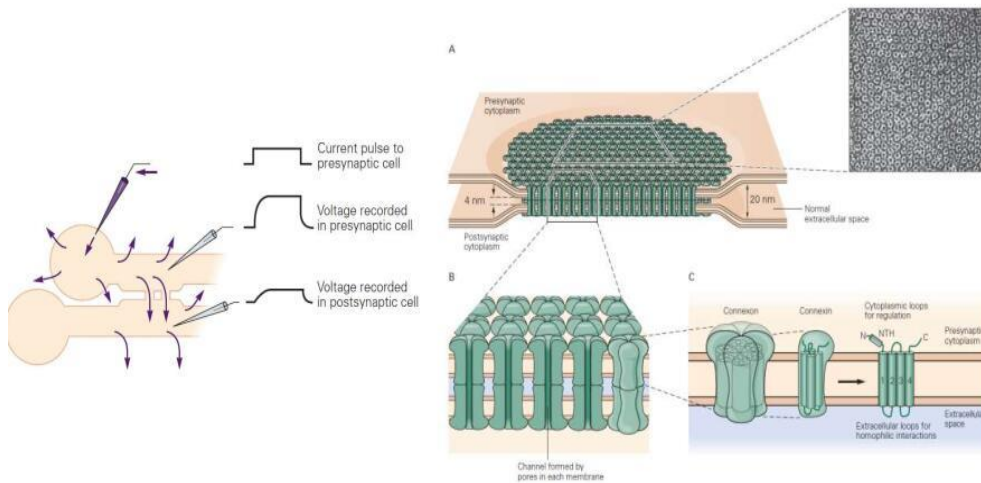
突触：突触是指一个神经元的冲动传到另一个神经元或传到另一细胞间的相互接触的结构。

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。

Synaptic transmission at chemical synapses

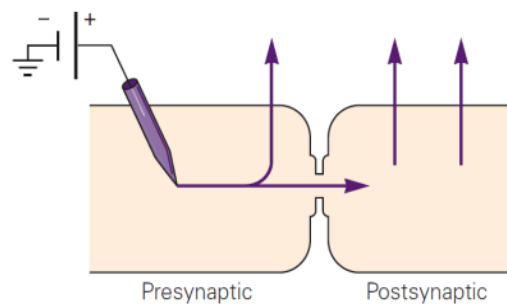


Electrical synaptic transmission

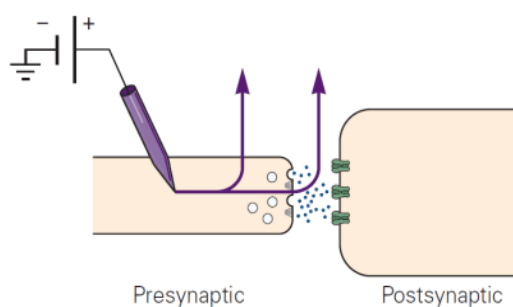


Neurons communicate through **Synapses**

A Current pathways at electrical synapses



B Current pathways at chemical synapses



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

电突触如何实现抑制？（通过抑制性的中间神经元）

3.电生理的研究方法

细胞外记录

- Metal electrode（金属电极）
- Glass micropipette（玻璃微管）

细胞外记录的大体介绍及具体操作

特殊的电极：尖端是碳纤（可放到膜的周围），1 个电极放在细胞上，另一个电极放在很远的地方（如皮下组织），作为一个参考电极。测出 2 个电极之间电压的差别，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，看看神经元会有一些怎样的反应。

细胞内记录

- Patch-clamp recording（膜片钳）
- Voltage clamp: excitatory post-synaptic current (EPSC)（电压钳：兴奋的突触后膜电流）
- Current clamp: excitatory post-synaptic potential(EPSP)（电流钳：兴奋的突触后膜电压）

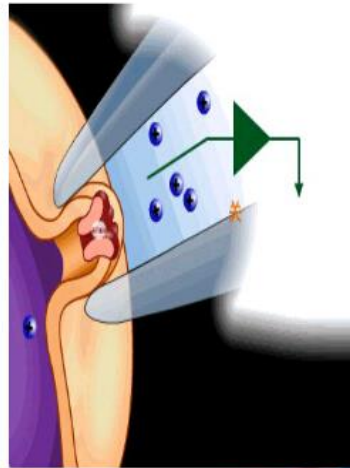
膜片钳

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。

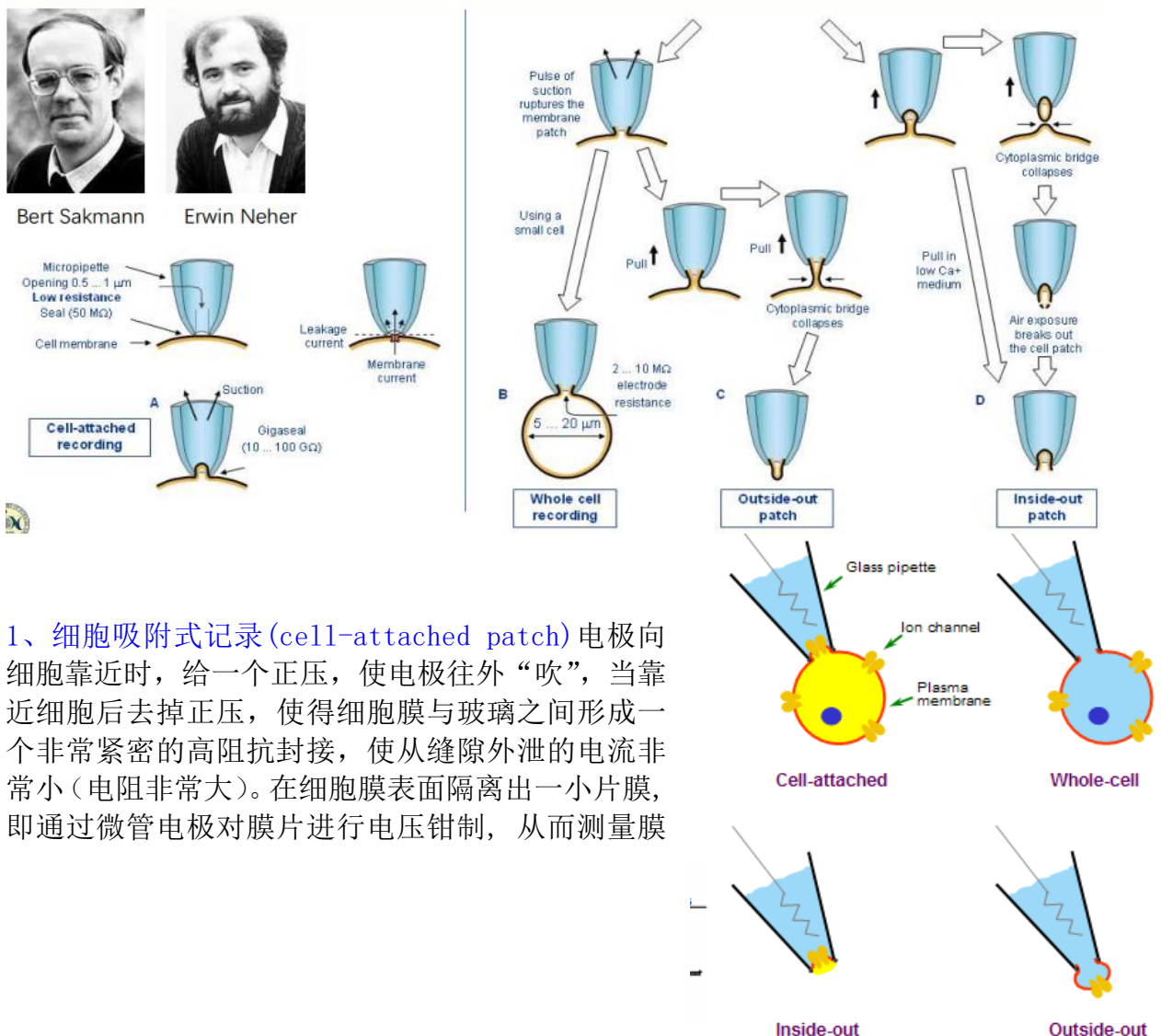
膜片钳原理：取一个玻璃的吸液管,上面有一个非常小的孔,让这个小孔非常的紧密接触神经元细胞膜的表面. 当它与膜非常紧密的连接时,没有离子能在它们之间穿过. 因此所有的离子都只有在神经元细胞膜上某一个离子通道打开的时候进入管子中.这样的话, 产生的微小电流就可以被连接在管上的超敏感的电子放大器检测到了.（通俗解释有助理解）

膜片钳 (Patch Clamp) 的基本原理:

利用尖端直径0.5-1 μ m的玻璃电极吸附到细胞膜表面, 通过负压吸引使电极尖端和细胞膜形成紧密封接, 使与电极尖开口处相接的细胞膜小片区域 (patch) 与其周围在电学上绝缘, 在此基础上固定膜电位(clamp), 然后对电极尖端下面积仅为几平方微米的细胞膜片上一个或几个离子通道的电流进行记录。从而将电生理学技术提高到记录和研究单个蛋白质的分子水平



The revolutionary breakthrough – patch clamp technique



1、细胞吸附式记录 (cell-attached patch) 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。（维基百科上的，仅供参考）

2、膜内面向外模式（Inside-out patch）

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，就是所谓的 inside-out patch。

由于细胞膜的內面朝向外溶液，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。

3、膜外面向内模式（Outside-out patch）

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。

4、常规全细胞模式（Whole-cell patch）

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）

5、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。

6、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。

各种电生理记录的优缺点：

1、细胞外记录

- ◆记录群体或单细胞的电活动。
- ◆容易得到信号，机械稳定性要求低。
- ◆电极粗大，对组织损伤大。

2、细胞内记录

- ◆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。
- ◆电极尖端很小，大分子无法进入细胞，对细胞内过程影响小。
- ◆只能记录细胞胞体，机械稳定性要求高。

3、全细胞记录

- ◆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。
- ◆机械稳定性要求低。
- ◆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）。

电压钳记录（百度的，ppt 上没有介绍，应该看看就行）

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。

电压钳的缺点：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。

电流钳

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测量电流。

- Dendritic recording（树突记录）
 - Axon recording（轴突记录）
 - Capacitance recording（电容记录）
 - Cut-open oocyte recording（卵母细胞破开记录）
 - Two-electrode recording（双电极记录，如双电极电压钳系统是一套用于巨大细胞和细胞结构（乌贼轴突、爪蟾卵母细胞等）的双电极全细胞电压钳记录设备，主要用于受体和离子通道的研究。）
- 这几个应该不会考，ppt 里面没有详细介绍，只是放了几张图，历年资料里面也没有涉及。

4.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

(附) 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 Sadmam 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物开辟了道路”。

(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、微量技术相结合,产生了自动化膜片钳等一些新技术。

代谢工程和合成生物学（何思钰）

一、 代谢工程发展的基础

代谢控制发酵得以出现和发展、基因工程理论和技术的成熟、代谢流量分析技术的发展、生化工程在线检测和建模方法的发展。

二、 代谢工程的理论基础

1、概念：把量化代谢流及其控制的**工程分析方法**与根据分析结果制定的遗传修饰方案付之实施的**分子生物学技术**结合起来，以反复分析、校验和修正的方式进行实际操作，**改善微生物的产物形成的能力和微生物的细胞性能**，从而满足人类对生物的特定制度的生物工程的分支。（通过某种特定生化反应的修饰来定向改善细胞的特性或运用重组 DNA 技术来创造新的化合物）

2、应用方向：

- (1) 提高细胞现存代谢途径中天然产物的产量
- (2) 改造细胞的现存代谢途径，使其合成新产物
- (3) 对不同的细胞代谢途径进行拟合，构建全新的代谢通路，产生细胞自身不能合成的新产物
- (4) 优化细胞的生物学特性

3、研究思路：解析反应体系，找到能反应细胞生理状态的**主要参数**；利用这些信息**组建一个代谢网络**的控制设计并确定合理靶点以修饰构建特定的物种；正确评估基因或酶的真实修饰效果，以实施新一轮的代谢网络修饰直到确立最佳状态，从而取代普通的定向靶点筛选程序。

代谢工程关注的是代谢途径的组合，必须考察完整的生化反应网络，重视代谢网络和目标产物的热力学可行性，代谢流及其控制。

代谢工程最为突出的特征是强调生化反应途径与代谢流及其体内条件的控制相关联。

三、 代谢工程里的重要概念

1、**生化反应途径**：一系列按序进行的生化反应；若这条途径在活细胞里运行，则为**代谢途径**。

2、**生化反应网络**：生化反应途径按生物化学规律汇成；代谢途径与跨膜输送系统按代谢规律汇成**代谢网络**。（各种代谢都不是孤立进行的，而是相互作用，相互转化，相互制约的一套完整、统一、灵敏的调节系统）

“联网”：用化学或生物学的方法把指定的化合物连接到代谢网络上，从而使它与微生物的代谢建立联系。

3、**代谢流**：代谢物在代谢网络中流动形成；广义的还包含能量流和信息流。在代谢分析和代谢工程中，代谢流首先指碳架物质流。

4、**代谢主流**：在一定的培养条件下，代谢物在代谢网络中流动，**流量相对集中的代谢流就叫做该培养条件下代谢主流**。具有变动性和选择性。（微生物代谢主流的方向、流量甚至所流经的途径都可能发生变化，基于遗传物质和环境的变化）

5、**载流途径**：有代谢物流通过的代谢途径；

载流路径：碳架物质从原料到目的产物流经的各段代谢途径，按**流经的先后次序首尾衔接**。

代谢工程没有必要研究所有的载流途径，但必须研究载流路径上的代谢流，也就是生产阶段的代谢主流。

- 6、**理想载流路径**：带有**主观导向性**的虚拟的载流途径；为了提高产物对原料的转化率，就要求代谢主流（根据代谢分析的结果）经设定的载流路径流到目的产物。
- 7、**微生物生物工程的难题**：解决理想载流途径的设计问题和对代谢主流的合理导向问题。（因微生物的代谢主流对网络中的途径有自主的选择性，而工业发酵的目标又是要微生物的代谢主流经理想载流途径流到目的产物）
- 8、**代谢五段式**：胞外营养物质（一般要经胞外酶降解后）从培养介质跨膜进入细胞，一般要经过“向心途径”、“中心途径”和“离心途径”等三段连续的代谢途径的代谢，才能在胞内生成目的产物，最后，目的产物跨过细胞质膜排出细胞回到培养介质。

“五字策略”：

- ① 进，促进细胞对**碳源营养物质**的吸收；
- ② 通，使来自上游和各个注入分支的碳架物质能**畅通地流向目的产物**；
- ③ 节，阻塞与目的产物的形成无关或关系不大的代谢支流，使碳架物质相对集中地流向目的产物
- ④ 堵，消除或削弱目的产物进一步代谢的途径；
- ⑤ 出，促进目的产物向胞外空间分泌。

9、代谢网络的节点和刚性：

微生物代谢网络中的途径的交叉点（代谢流的集散处）叫做**节点（node）**，**微生物自动抵制节点处代谢物流量分配比率的改变的特性叫做节点的刚性**。节点的刚性取决于微生物代谢的自动调节机制。因此在应用“五字策略”制订育种方案时必须认真考虑节点刚性问题，尽量采用解除调节的育种。

柔性节点：是指由节点流向各分支的代谢流量分割率随代谢要求发生相应的变化，去除产物的反馈抑制后，该分支的代谢流量分割率大大增加。

强刚性节点：是指由节点流向某一分支或某些分支的代谢流量分割率是难以改变的，这是由产物的反馈抑制及对另一分支酶的反式激活的相互作用所致。

弱刚性节点：是指介于前两者之间，由该节点流向各分支的代谢流中有一个是占主导地位的，其酶活较高或对节点代谢的亲合力较大，且无反馈抑制，通过削弱主导分支的酶量或酶活可增加产物的产率。

柔性及弱刚性节点是代谢设计的主要对象

如果代谢网络中各节点同等重要，即对产物的产量具有相近的影响，则这类代谢网络称为**依赖型代谢网络**。依赖型代谢网络的存在会给代谢工程的实施带来很大的困难。

如果代谢网络的主节点不集中，则可以通过对代谢的修饰影响目的产物的产量，这类网络为**独立型网络**。

一般认为，只有少数分支点处的通量分配比实际影响着产品得率。

10、弹性系数和流量控制系数是代谢控制分析研究的两个主要指标

弹性系数揭示代谢物浓度变化对反应速率的影响程度。

流量控制系数则为单位酶变化量引起的某分支稳态代谢流量的变化，用来衡量某一步酶反应对整个反应体系的控制程度。

这两个系数相互关联，可直接或间接测定。

四、 代谢工程要解决的问题：改变代谢途径中的**物质流向**，或改变物质流在不同途径中

的流量分布。

研究对象：代谢网络

目标：修饰代谢过程——将代谢物质流导入目的代谢产物的载流途径，以获得产物的最大转化率。

依据：对代谢节点的判断

五、 代谢工程的实质

对物质代谢的方向、流量及控制进行定量分析，并在此基础上进行代谢过程改造，最大限度的提高目的代谢产物的产率。与传统的诱变育种技术不同，它是一种有目的、有理性的改造，涉及生理学、分子生物学、生物化学等多门学科。

六、 代谢工程的研究技术

- 1、检测技术：如同位素示踪（确定代谢物物料平衡）、酶动力学分析方法（表征酶反应进程）、光谱学（确定同位素富集和关键代谢物相对分子质量）
- 2、分析技术：化学计量学、分子反应动力学、化学工程学，结合计算机技术（阐明代谢途径和代谢网络的动态特征与控制机制，确定关键靶点。）
- 3、操作技术：几乎所有分子生物学和分子遗传学专门试验技术（如基因和基因簇的克隆、表达、调控；DNA 的杂交检测与序列分析等）

七、 代谢工程研究工具

- 1、分子生物学工具：几乎所有基因工程工具和技术都是代谢工程所必需的；
- 2、分析化学和测量工具：经典研究代谢途径的技术，如质量平衡、阻断突变株分析等是必需的，无损伤即时分析（核磁共振）、流式细胞计量等越来越重要；
- 3、数学和计算机工具：现有的数学和计算机工具大部分都与代谢工程的信息控制和系统分析有关，代谢工程需要微生物遗传和生理信息，DNA 数据库和计算机分析程序现已可获得。

八、 代谢工程研究策略

- 1、现存途径中提高目标产物的代谢流
 - ① 增加代谢途径中限速步骤酶编码基因的拷贝数；
 - ② 改造以启动子为主的关键基因的表达系统，强化其表达；
 - ③ 提高目标途径激活因子的合成速率；
 - ④ 灭活目标途径抑制因子的编码基因；
 - ⑤ 阻断与目标途径相竞争的代谢途径。
- 2、在现存途径中改变物质流的性质
 - ① 利用某些代谢途径中酶对底物的相对专一性，投入 非理想型初始底物（如结构类似物）参与代谢转化反应，进而合成细胞内原本不存在的化合物；
 - ②在酶对底物专一性较强的情况下，通过蛋白质工程技术修饰酶分子的结构域或功能域，以扩大酶对底物的识别和催化范围。
- 3、利用已有途径构建新的代谢旁路
 - ① 修补完善细胞内部分途径，以利用新的底物或合成新的产物。
 - ② 转移多步途径以构建杂和代谢网络。将编码某一完整生物合成途径的基因转移到受体细胞中，可以构建具有何大经济价值的生产菌株。

九、 代谢工程的重要应用和发展前景

1、 主要应用领域

- ① 提高细胞已有的化学物质产量；
- ② 产生宿主细胞本身不能合成的新物质；
- ③ 扩展细胞的底物使用范围；
- ④ 形成降解毒性物质的新催化活性；

十、 逆代谢工程

- 1、 定义：从限制生物活性的主要因素入手，在相关生物种类中**鉴别所希望得到的表型，并确定该表型的决定基因**，然后利用基因重组技术将该基因克隆到宿主菌中，并使之表达，使宿主菌得到所希望的表型的技术。
- 2、 逆代谢工程研究的关键和难点：确定负责相关表型的基因，特别是依赖多基因的表型相关决定基因的确定。

十一、 合成生物学（自下而上的策略）

- 1、 定义：采用从自然界中分割出来的**标准生物学部件**（可被修饰、重组、乃至创造），进行**理性（设计）的重组**（乃至从头合成）以获得新的生命（生物体）的可验证技术，及相关的专有理论架构（学科）。

一是设计和构建新的生物零件、组件和系统；二是对现有的、天然存在的生物系统进行设计和改造；来解决能源、材料、健康和环保等问题。

合成生物学的目的是**工程应用**，核心观念是认为所有零件都能由**化学方法来合成**制造，进而通过工程化方式组装成实用的生命。

- 2、 合成生物学的单元：

基因元件：是具有某种特定的生物学功能的 **DNA 或 RNA**，是设计和合成生物的基本单位。

-特性：信号接受和输入功能，信号发送和产物输出功能，调节信息流、代谢和生物合成的功能，和其他元件相互作用，具有特定的工作环境；

-可以是功能元件：编码 1 个/组生化反应酶功能基因/基因簇；

-也可以是界面调控元件：包括功能基因转录、蛋白质翻译与修饰、功能酶反应等的调控基因，如复制子、启动子、阻遏子、诱导子、转录因子、核糖体结合位点、转录终止子、翻译终止密码、酶切位点、选择标记等。

生物部件：由一个或多个基因元件组成，最简单的能行使催化功能的生物部件是完整的编码酶基因表达盒。

生物砖：是**标准化的基因元件**，是具有可连接性末端（前后缀）的基因元件

-前后缀分别是两个核酸限制性酶切位点，该末端只能用于元件之间的连接

-前缀之后依次是测序引物、启动子、核糖体结合位点、功能基因、翻译终止密码、转录终止子

生物模块：一组**细胞内区域化的生物器件**（biological device），它们由内在功能联系在一起，执行特定的复杂功能；

-细胞内模块往往是具有特定功能的途径，如代谢途径、信号转导途径、调控途径等

-模块可以由生物砖通过某种逻辑关系构建而成，但功能必须完全清楚

基因电路：与电子科学中的电路类似，在合成生物学中，不同功能的生物砖联接后，能像电路一样运行，形象地称为**基因电路**

- 代谢途径模块可由代谢电路来执行，调控途径可由调控电路来完成
- 基因电路可清楚地图示生物模块的物理结构和生物功能
- 基因电路特点是：具有**定量特性**，有确定的应答阈值及明确的反应边界，生物砖容易被除去、替换、更改；还可实现非自然的功能

3、合成生物的设计和优化

- 标准化：从系统生物学的角度，对基因组序列进行分门别类
- 解耦连：把复杂系统解分成具有独立功能的简单组分
- 抽提：建立可识别界面的元器件库（一个反应对应一个酶，一个酶对应一个基因，即一个生物砖）

生物砖构建基因电路的困难是，把相同功能的不同来源的生物砖集成基因电路后，不一定具有功能。优化方法可以是基于数学模拟的理性设计，也可以是生物元件的直接进化。

4、合成生物学：**工程化的生物学**，其目的在于建立人工生物系统，让它们像电路一样运行，**从头设计，标准化**。

研究主要朝两个方向发展：

- 一是**设计、建造具有生物功能的元件**如生物分子或反应系统、生物装置和基因网络、多元件组成的功能单位及其更高级复杂系统的组装。
- 二是**开发建立生物制造所需要的技术**，包括大分子基因组合成技术、生物功能元件的分析与测试技术、生物体信息的捕获与处理技术、系统模拟与控制技术。

5、人工生命系统所涉及的研究领域：

(1) 代谢途径工程：各种生物器件的装配与合成；高级版本的基因工程（应用于天然产物药物的开发；先进生物燃料的制造；新型生物基化学品的生产；新型生物传感器的开发）

(2) 原生细胞：由膜或膜样的结构包围非生物有机分子的集合体，能表现出一些与生命相关的属性。

(3) 人工合成染色体：自下而上，对染色体进行大规模删减；从头合成

(4) 异源生物学：设计和建造不同的生物化学或遗传密码的生命系统，设计与自然生物正交的系统。

6、合成生物学与临床应用

- 感染的预防与治疗
- 肿瘤治疗
- 疫苗开发
- 微生物组工程

7、合成生物技术可以解决天然产物研发中的难题（如何获得结构和功能更多样化的天然产物；如何经济快速、大量地获得特定的目标产物）

通过跨越物种生物器件的挖掘设计和装配：挖掘更广泛的天然产物资源；获得更高效的筛选模型；获得非天然的新化合物；在异源系统中更高效的合成与制造，实现天然产物资源的可持续开发。

十二、代谢工程到合成生物学的联系和不同

联系：合成生物学是代谢工程的延伸，代谢工程可以为合成生物学提供一些技术平台，如：代谢流量的分析方法，系统监测平台，计算机辅助设计的平台；

不同点：

代谢工程：

面向对象的，有很多分析方法，通过分析代谢途径，在代谢分析的方法上增强某些限速酶的表达，减除反馈，敲除某些酶基因，去除副产物（面向生产菌，如何进行胞内改造）

合成生物学：

面向过程的，是对生物体更大规模的改造，甚至从头合成；

合成生物学的工程学特色很明显，对元件的描述和鉴定标准非常精确，需要建立标准的元件库；从底物到产物的过程中所涉及的任何元素（宿主、启动子、酶等）都是可以去改造的（如：优选宿主并做适当改造；优选酶基因，优化密码子；优选启动子，核糖体结合位点等调控元件），通过改造和优化这些元素而达到最终目的（如，从头合成等）

十三、基因工程和代谢工程的区别

- a) 代谢工程有**对代谢节点的判断**，基因工程没有
- b) 代谢工程在思想上特别注重代谢流的量化描述（虽然现在很难做到），讲究基因的协调表达和表达量的准确控制，基因工程没有
- c) 基因工程通常只涉及少量基因的改造，但是代谢工程会涉及大幅度的基因改变。

十四、基因工程与合成生物学的区别

基因工程：

- a) 将外源基因转移到细胞中表达特定的蛋白
- b) 较少使用数学工具
- c) 只转移个别外源基因，一般较少或不进行细胞网络分析

合成生物学：

- a) 从头设计和构建自然界不存在的人工生物体系
- b) 广泛使用各种数学工具
- c) 通常操作多个基因，涉及基因组的操作，因而要在更大规模，更多层次上涉及到细胞网络，如代谢网络等

补充例题：

什么是合成生物学？简要论述其发展历程、标志性研究进展和主要的应用领域。

定义：以系统生物学思想为指导，利用综合化学(生物化学)技术、物理(生物物理)技术和信息(生物信息)技术，利用基因和基因组的基本要素(Building block)及其组合，进行**理性的设计、改造、重建或制造新的生物分子**（如蛋白质）、生物体部件（蛋白质复合物）、生物反应系统（光反应系统）、代谢途径与过程（抗生素的生产过程）、具生命活动能力的细胞和生物个体的学科就叫做合成生物学；

发展历程：

- a. 生物技术革命，1928 年，弗莱明发现青霉素
- b. 1973 年，科恩和波伊尔，体外 DNA 重组技术（第一次重组 DNA 实验）
- c. 1982 年，重组人胰岛素（大肠杆菌产生人胰岛素）
- d. 生物技术 1.0 研究 workflow：传统基因工程技术

- e. 生物技术 2.0 研究 workflow: **基于计算机辅助设计**, DNA 合成等技术大幅提升
- f. 生物技术 3.0 研究 workflow: 对生命系统和过程进行**重新设计和工程化构建与应用**, 重新合成 DNA, 组装生物体系等 (自下而上的重新装配, 组合过程)。

标志性研究进展:

1960s Jacob 和 Monod 假设的分子网络调控 (lac operon)

1970s-1980s 分子克隆技术发展

1990s 酵母、大肠杆菌全基因组测序完成

2003s 在大肠杆菌中实现青蒿素前体途径的工程化;

2005 年 JCVI 的研究小组 (venter) 将人工组装合成 (修饰) 的基因组植入一个不含 DNA 的细菌, 从而构建出了一个全新的能够自主复制的蕈状支原体。(合成生物学中相对比较典型的一个例子)

2009 venter 等对 DNA 组装的研究

2012 年. 利用动态的代谢流控制生物柴油的生产;

2013 年. Amyris 公司利用酵母菌株商业化生产青霉素;

主要的应用领域:

- 生物医药领域: 改造细胞, 生产新型药物; 重新设计更有效、更安全的生物治疗方法
- 生物能源与新材料领域: 重新设计生物质路线图, 获取太阳能、清洁燃料和新能源, 可降解塑料、碳纳米管等材料
- 环境领域: 设计和合成新功能微生物, 用于清除水污染、清除垃圾、处理核废料等
- 智能计算机与生物传感领域: 生物机体的实时检测, 细胞机器人在动脉中检测并清除导致血栓的动脉粥样硬化物质, 探测化学和生物危险物和爆炸物的生物警报器

代谢流量分析 (仅供参考)

①**代谢流量模型的意义**: 通过建立相关的**化学计量学模型**, 通过对稳态的分析来分析中心代谢途径的流量, 从而帮助预测基因改造对宿主细胞的生长和产物形成的影响, 但目前仍没有软件可以预测需要改造什么元件、以及如何改造才能够到想要的代谢流量分布。

②代谢流量分析的方法

基于同位素的代谢流量分析

大致过程:

- a. 将 ^{13}C 标记的底物 (位置标记的或全标记的) 加入培养集中, 用该培养进行细胞培养;
- b. 经过一段时间的培养后, 收集细胞, 分离胞内的代谢物如, 氨基酸、甘油, 葡萄糖;
- c. 数据收集:
 - 通过质谱和核磁共振分析这些中间代谢物的 ^{13}C 标记状态, 进而得到各中间代谢物的含量分布;
 - 同时在胞外测量一些速率: 底物消耗速率、产物生成速率、细胞生长速率
- d. 进行分析: 分析基于两大类平衡方程 ①代谢物的平衡; ②同位体的平衡

③**举例**: 一位碳标记的葡萄糖, 糖酵解途径得到三位标记的丙酮酸, 走...途径则得到一位标记的丙酮酸, 如果走磷酸戊糖途径, 则没有被标记过的丙酮酸, 通过检测三位碳, 一位碳和二碳的标记状态, 即测得 labeling-pattern 就可以知道各个途径的活性。

蛋白质结构技术

周琳琳基于前人总结

一. 蛋白质结构的分析基础

1.为什么要了解蛋白质的结构？

已知某蛋白质部分功能，可从结构深入寻求其精确作用机制

已知某蛋白质部分或全部结构，可用于指导其功能研究

已知某蛋白质的结构、功能与机制，可指导药物筛选与设计

2.结构生物学研究的主要科学问题？

生物大分子的结构是如何形成的

生物大分子行使功能的结构机制

生物大分子的结构改变如何影响其功能

3.结构生物学的特点？眼见为实

蛋白质参与行使几乎所有的细胞功能

蛋白质只有折叠成特定结构才能行使其功能

蛋白质结构可帮助对其功能机制的深入理解

蛋白质结构可帮助进行药物筛选及设计优化

4.蛋白质的结构层次：

a:一级结构：氨基酸序列

组成蛋白质的 20 中氨基酸性质不同：

疏水氨基酸：Ala、Val、Phe、Pro、Leu、Ile

亲水氨基酸：Arg、Asp、Glu、Ser、Thr、Cys、Asn、Gln、His

两性氨基酸：Lys、Tyr、Met、Trp

根据各个氨基酸的性质，在突变时要加以考虑，不能盲目突变。

多肽链可折叠成“特定”三维结构---一级结构决定三级结构（可在体外完成），一级结构中蕴含着三级结构的信息。

b:二级结构： α 螺旋、 β 折叠----

二级结构是蛋白质的基本结构单元。

c:三级结构：二级结构的组装

d:四级结构：多个肽链组成聚合物，多亚基之间

三、四级结构是蛋白质行使功能的物理基础

二. 蛋白质功能与结构

1. 蛋白质功能与结构的主要类别：

结合：血红蛋白结合氧分子、TATA 结合蛋白结合 TATA box

催化：DNA 聚合酶（催化 DNA 合成）、

HIV 蛋白酶（催化目标蛋白在特异位点的断裂，是 drug 靶标）

ODCase 催化嘌呤的生物合成

分子开关：Ras 的开关状态（响应环境 pH 或配体结合当与 GTP 和 GDP 结合时产生不同的构象，介导不同的下游信号通路，Ras 是一个 small GTPase,与许多癌症的产生密切相关）

骨架：微丝和微管

2.蛋白质结构的稳定性是其发挥生物功能必需

稳定蛋白质结构的化学相互作用——

共价键、二硫键、盐桥，氢键，长程静电作用，范德华作用

稳定蛋白质三级结构的**共价**相互作用：

a:二硫键（对氧化还原环境敏感）

b:金属配位键（ K_d 从 mM 到 nM，体外实验需特别考虑弱结合情况）

c: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）

d:翻译后修饰可改变蛋白质三级结构及其稳定性

（生命活动过程中蛋白质的功能往往可以通过以上方面进行调控）

3. 蛋白质四级结构与功能

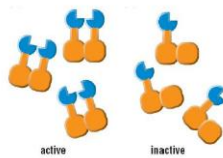
a:蛋白质四级结构特点：

- 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
- 分子间互补性对于四级结构的维持具有关键作用
- 有时单个亚基必须在形成复合物状态时才能正确折叠
- 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（不同亚基之间也可以形成二级结构以稳定蛋白质四级结构）
- 在分子间相互作用界面上可能会有被捕获的水分子
- 由相同或类似亚基组装而成的蛋白质四级结构通常具有对称性或赝对称性

b.四级结构变异影响蛋白质功能：

例 1：血红蛋白--镰刀细胞病（三级结构未变而四级结构发生改变引起）

例 2：显性负突变：一对等位基因中因其中一个突变或丢失所致的另一个正常等位基因的功能丧失，都称为显性负突变。换言之，显性负突变即杂合的突变产生了纯基因的导蛋白使 WT 功



丧失了，都称为显性负突变。换言之，显性负突变即杂合的突变产生了纯基因的导蛋白使 WT 功

4. 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，是动态性的。

例 1:HIV 蛋白酶具有高度柔性；

不同的 drug 都可以紧密结合到 HIV 的 protease 活性位点上，诱导闭合构象，抑制其活性。

例 2：腺苷酸激酶（ADK）；

ATP 结合则导致整体构象重排，活性位点关闭（ $2ADP \rightleftharpoons ATP+AMP$ ）。

5.蛋白质功能的不同层次：

（基因是遗传信息的载体，而蛋白质及其复合物是生命活动的执行者）

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

-----结合、互补性、活性位点

分子识别和催化均依赖于结构互补性

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

6.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

7.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

8.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,但又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

9.蛋白质功能调控:

细胞中的蛋白质功能受到严格调控,表现在蛋白质产生的时间,空间,种类和数量上

- 蛋白可被定位到细胞位点或者被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(磷酸化等)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;

蛋白质结构可由数量有限的模块组合形成

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。

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)。

例 1: 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

Ras 是一种小 GTPase, 能够结合 GTP 和 GDP 从而形成开放和失活状态, 信号分子的结合时间决定了信号或者功能的持续时间。

例 2: 延长因子 EF-Tu 呈递氨酰 tRNA 到核糖体

EF-Tu 在蛋白质合成过程中具有关键作用。结合 GTP 的 EF-tu 运送氨酰 tRNA 到核糖体, 在那里协助 codon 与 anticodon 之间的配对, 并检测其匹配性。正确匹配引起核糖体构象变化, 稳定 tRNA 结合, 触发 EF-tu 结合的 GTP 水解, 产生构象变化, 从而导致 EF-tu 与 tRNA 解离, 离开核糖体, tRNA 递送氨基酸使肽链得以延长。反过来, 错误匹配时, codon 与 anticodon 之间相互作用弱, 从而允许 EF-tu-氨酰 tRNA 复合物在 GTP 水解和 tRNA 释放之前与核糖体解离。这一过程提高了正确率。

例 3: 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, 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)

在所有激酶中, 有几个关键的结构原件: A-loop, alphaC-Helix, Catalytic loop。A-loop 和 alphaC-Helix 构象变化对催化作用的调控可以说起到中心作用。不同蛋白激酶的催化功能区通过折叠形成相似的二叶状结构: 其中 N 端包含 ATP 锚定所必需的 P 环(p-loop), C 端含有调节激酶活性的活化环(activation loop), 而催化蛋白质磷酸化的催化环(catalytic loop)位于两叶相连的铰链区。在非活化的状态下, 激酶子域对齐, 使 ATP 不能到达激酶的催化中心。当 A-loop 的磷酸化导致其构象变化, 调控其活性, 则激酶处于活化状态。当 A-loop 中的关键位点 T 突变为谷氨酸 E/天冬氨酸 D 时, 相当于模拟磷酸化, 则激酶处于一直打开状态。Active 状态的 A-loop 构象基本一样为伸展状态, inactive 状态的 A-loop 构象却有很多种。Src 的 SH2 结构域能特异性识别磷酸化酪氨酸残基以及磷酸化残基的羧基氨基酸序列与其相互作用。没有激活信号时, SH2 和 SH3 将激酶构象 hold 在 inactive 状态。激活信号可以解除 SH2 以及 SH3 对 Kinase 结构域的抑制性结合, 从而使其构象重排, 成为 active 状态。CDK 是驱动 cell cycle 的一类酶。A, inactive 状态, T-loop 上的一段小螺旋使得 alphaChelix 发生错位。B, cyclin 的结合使得 T-loop 上的小螺旋溶解变成 beta 片, alphaChelix 复位, A-loop 外翻。C, A-loop 磷酸化使其处于激活构象, 并进一步增强与 cyclin 相互作用, 加强底物结合。

10.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 (结构域和结构花样是有限的, 以此推测功能)
- 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结构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。

a:序列相似性与结构和功能相似性的关系:

橘色区 (同源性 $\geq 40\%$): 折叠和功能可以从序列比较中得到可靠预测。

黄色区 (同源性在 20%~40%): 折叠预测可靠, 但功能预测不准确。

蓝色区 (同源性 $\leq 20\%$): 折叠和功能预测都不再可靠。40%是一个分水岭。

b:序列发散性与结构发散性的关系

序列发散与结构发散的速度并不相同。小的序列差异对结构没有影响，但随着序列发散度增加，结构发散呈指数增加。（同源性越小，结构不同的可能性越大）

11.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

12.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/MCSSL)
- 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

13.蛋白质结构与功能的关系总结

- 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
- 蛋白结构的模块化之间本质允许一级序列存在插入或删除（结构域本身是保守的）
- 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

二. 蛋白质结构的测定方法（了解即可，老师说不会考）

三. 蛋白质结构技术运用与实例分析

实例 1：从结构角度建立蛋白质发挥活性与功能的调控机制

研究背景：Hippo 信号通路。保守的 Hippo 通路最早是在果蝇中发现的，由于这个基因缺失，使得果蝇的眼睛长得很大，看起来像河马，因此而得名。

Hippo 通路主要由 Hippo 激酶也就是 MST 激酶级联反应，磷酸化 YAP 这个原癌蛋白，使之留在细胞质里，进而被降解。Hippo 通路若被关闭，则 YAP 逐渐去磷酸化，就会进入细胞核，与转录因子 TEAD 结合，启动靶基因转录，促进生长，抑制凋亡。研究表明，在许多肿瘤里 YAP 处于过度激活状态。另外有研究表明 Hippo 通路是调控器官大小的主导性信号通路，因此，它对组织稳态和肿瘤发生非常关键。

实例 2：通过结构解析深入揭示功能机制并帮助进行靶向设计

- 1.YAP 与癌症有密切的关联；
- 2.发现 YAP 的天然拮抗剂 VGLL4。VGLL4 在细胞核内与 YAP 竞争 TEAD，从而拮抗 YAP 活性，是 YAP 驱动细胞增殖的一种新的天然制衡机制，与已知的核外磷酸化调控形成“双保险”，揭示了 Hippo 通路的“核内”调控机制；
- 3.发现 VGLL4-YAP 分子平衡保护机制在胃癌中被打破(YAP/VGLL4 分子比率随肿瘤进展不断攀升，与病人不良预后高度相关)；
- 4.研究发现，VGLL4 通过 TDU domain 来竞争性抑制 YAP 与 TEADs 的结合，从而抑制 YAP-TEADs 信号通路；
- 5.晶体结构研究表明 VGLL4 的串联 TDU 区域与 TEAD4 的 YBD domain 相结合，并通过突变研究 VGLL4-TEAD4 复合体间的结合部位的关键氨基酸残基；
- 6.根据以上研究，阐明 VGLL4 拮抗 YAP 的关键机制，发展靶向 YAP 的多肽抑制剂（从原子水平阐明 VGLL4 拮抗 YAP 的机制，模拟 VGLL4 功能，设计靶向 YAP 的多肽抑制

剂)；将 VGLL4 和 YAP 的关键结构域通过 linker 结合起来开发了 super-TDU

7.动物实验研究表明，靶向 YAP 的多肽抑制剂能有效杀伤胃癌（人源化小鼠胃癌造模和幽门螺旋杆菌感染小鼠胃癌造模均表明，模拟 VGLL4 功能的多肽抑制剂可有效杀伤肿瘤；该多肽抑制剂靶向特异性高（针对 YAP/VGLL4 比率升高的肿瘤），毒性低（体重、肝损、血常规））

科学意义：发现人体天然抗癌防御机制 VGLL4-YAP 分子平衡，揭示 YAP 驱动的肿瘤致病机理。

8.进一步解析转录因子 TEAD 和 DNA 结构，解析其特异性识别结合 DNA 的分子机制，发现 TEAD 与 TCF 形成复合物调控靶基因转录，从而发现了 Hippo 与 Wnt 通路的核内互作。由于超过 90% 结肠癌伴随 wnt 通路突变，因此在结肠癌中发现，VGLL4 靶向 TEAD-TCF 复合物共抑制 Hippo 和 Wnt 通路靶基因表达（VGLL4 在结肠癌中是下调的）

实例 3：利用已知结构信息促进功能机制的深入研究与理解

发现 MST 激酶调控炎症免疫应答的功能机制——MST4 靶向 TRAF6 动态调节炎症

MST4 能够在炎症性刺激时高度响应。MST4 直接磷酸化关键炎症信号分子 TRAF6 的活性调控机制：由于 TRAF6 的结构已知，发现 MST4 磷酸化 TRAF6 位点在 TRAF6 同源三聚体的界面上，由于电性相斥导致无法形成三聚体而功能丧失。

MST4-TRAF6 调控炎症和肿瘤：

MST4 敲低显著加剧 LPS 诱导的炎症损伤

MST4 缺失导致自发性肠道炎症反应

MST4 敲低显著抑制胃癌细胞小鼠成瘤

老师接下来讲的是 STRIPAK 复合物相关，ppt 没有相关内容，而且很多未发表数据估计不太会考。

以下部分是往年师兄师姐整理的，我们 ppt 上面有相关内容但是老师没有讲。

实例 4：通过结构解析验证功能机制

发现 RNA 识别分子 RIG-I 的激活与降解之间多类型泛素化关联调控机制

——揭示 p97-Npl4 复合物关联调控 RIG-I 蛋白质稳态与信号活性的精确分子机制

p97-Npl4 复合物动态调控 RIG-I 蛋白质稳态与信号活性：p97-Npl4 招募泛素连接酶到 RIG-I 并促进泛素化降解（p97-Npl4 招募泛素连接酶促进 RIG-I 上 K48 的泛素化，从而导致 RIG-I 的降解），p97-Npl4 功能反过来受 RIG-I 激活时 K63 泛素化调控（K63Ub 是 RIG-I 激活的标志）。

p97-Npl4 复合物可作为抗病毒与抗肿瘤的双重靶标：高通量筛选获得靶向 p97-Npl4 复合物组装的小分子化合物，证实靶向 p97-Npl4 复合物组装具有抗病毒抗肿瘤（胃癌）双重效果。

实例 5：从结构出发思考生物学问题

SUN domain 单体包括 α 螺旋和 β 折叠，构成一个类似三叶草结构的同三聚体。KASH 与 SUN 的结合会引起 SUN domain AA' -loop 的构象变化。当去除 α 螺旋时，既无法形成同三聚体也无法结合 KASH。

LPS 模拟细菌感染刺激后发现巨噬细胞核变小（仅 M1，M2 中未发现），并且核的内外膜间距变大，核硬度减小。分析这一过程发现 SUN 明显变少（也仅存在与 M1 细胞中），敲除 SUN 后，核通透性变大，染色质构象发生改变，从中推测会引起表观遗传的变化。

这些过程引起转录变化，与炎症相关的反应富集。综上推断，SUN-KO 可模拟炎症刺激，M1 被激活，M2 被抑制，细胞进行重编程（M0 到 M1）

历年考题：

一. 2004

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。

参考答案：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。

二. 2005

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

参考答案：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 $F_{HKL}=F_{\bar{H}\bar{K}\bar{L}}$ 。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 $F_{HKL}\neq F_{\bar{H}\bar{K}\bar{L}}$ 。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。

三 2006

A.举例说明几种结晶蛋白质的方法

参考答案：

1 分批结晶(Batch Crystallization) 这是最老的最简单的结晶方法，其原理是同步地在蛋白质溶液中加入沉淀剂，立即使溶液达到一个高过饱和状态。

2 液-液扩散(Liquid-Liquid Diffusion) 这种方法中，蛋白质溶液和含有沉淀剂的溶液是彼此分层在一个有小孔的毛细管中，一个测熔点用的毛细管一般即可。下层是密度大的溶液，例如浓硫酸铵或 PEG 溶液。如果有机溶剂如 MPD 被用作沉淀剂，它会在上层。以 1:1 混合，沉淀剂的浓度应该是所期最终浓度的二倍。两种溶液（各自约 5 μ l）通过注射器针头导入毛细管，先导入下层的。通过一个简易的摇摆式离心机去除气泡。再加入上层，进而

两层之间形成一个明显的界面，它们会逐渐彼此扩散。

3 蒸气扩散 (Vapor Diffusion)

3.1 悬滴法 (The Hanging Drop Method) 这种方法中，在一个硅化的显微镜盖玻片上通过混合 3–10 μl 蛋白质溶液和等量的沉淀剂溶液来制备液滴。盖玻片置于一个盘子的凹槽之上，凹槽的一部分填有所需的沉淀剂溶液约 1ml。在盖玻片放好之前，小室的凹槽周围用油或油脂密封。

3.2 沉滴法 (The Sitting Drop Method) 在悬滴法中，如果蛋白质溶液表面张力很小就会在盖玻片表面展开。此时，沉滴法更有利。

4 透析法 (Dialysis) 除了上述使得蛋白质结晶的方法，还有许多透析技术。透析的优点是沉淀溶液容易改变，对于适量的蛋白质溶液（多于 0.1ml），可用透析管完成。透析膜通过橡皮圈连在管子上，但在使用前要用水大量漂洗或最好在水中煮约 10min。对微升量的蛋白质溶液而言，可以使用覆有透析膜的厚壁微毛细管 (Zempezauser method) 或者树脂玻璃纽扣。纽扣的缺点是纽扣中的蛋白质晶体不能通过极化显微镜观察到。另一中微透析方法，将 5 μl 蛋白质溶液注射到一个毛细管中，毛细管覆有透析膜，膜可用塑料管套紧。对蛋白质溶液进行简单离心，然后用铸模粘土将毛细管封闭，接着将毛细管放入含有透析液的 Eppendorf 管中。

B. 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

参考答案：**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，而且技术的分辨率高，**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 射线衍射的体，有相位问题。

2. 溶液多维核磁共振 (NMR) 技术

该技术不需要预先制备晶体。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<40kDa 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，无相位问题。缺点是限于较小的蛋白质分子。

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。优点是不需要预先制备较大的晶体，无相位问题。但分子量小的不行进行试验。

四. 2013

A. 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

参考答案：

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

蛋白质结构技术应用概况：

①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

②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

③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

④结构的可视化特征帮助进行药物筛选与理性设计和优化

实例如：

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。

五. 2015

蛋白质结构技术在当今生命科学及医药研发等领域具有不可或缺的作用，请结合实例简述其应用概况及要点。

参考答案：

（PS：可根据第四题答案，也可根据老师上课所举实例）

实验动物学

周琳琳修改后

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：经过人工饲养，对其携带的微生物实行控制，遗传背景明确或者来源清楚，用于科学研究、教学、生产、鉴定以及其他科学实验的动物

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。

常见实验动物：实验大鼠、小鼠；实验兔；实验豚鼠；实验地鼠；实验犬；实验猪、实验用非人灵长类动物。

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（生产管理是第一，质量检测必不可少）

实验动物的质量监测包括：

- 遗传质量监测：通过遗传质量监测保持实验动物特定的遗传结构，从而减少或避免遗传因素对实验结果的干扰，至少一年一次，淘汰突变的。
- 微生物质量监测：这里的微生物检测中包含寄生虫检测，清洁级，SPF 级等，需要经常测。
- 营养质量监测：不同的实验动物以及在不同的发育阶段对营养的需求不同；通过动物看其营养状况。
- 环境质量监测：即实验动物设施：温度，相对湿度，光照，噪音，通风换气等。
- 生物学特性质量检测：某些实验动物有固有的适于实验的特性，需要检测此特性是否存在。

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

- 行为学模型的建立和改进应有明确的目的。
- 行为学实验一定要**建立量化指标**，才能进行比较研究。
- 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。
- 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。）

例. 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（直接看表型）
- 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（速度可以达到 2 gene/week，筛选后选择基因来研究功能）
- 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：

- 考察日常代谢能力的摄食量和摄水量（一笼一只动物）
- 考察 Locomotion（移动）和 rearing（直立）的旷场行为（监测运动）
- 考察疼痛阈值的甩尾试验（避免握太紧导致的应激反应）
- 考察认知能力和环境适应性记忆的洞板试验
- 考察记忆能力的步下法实验(环境恐惧记忆的考察)和步入法实验

总结初筛基因结果，这些基因功能的筛选结果显示：有近 50% 的基因在不同行为学模型中的实验结果与对照组存在着显著性差异，预示这些基因有着很好的深入研究前景。

分述如下：

例. 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**（辨别相熟与不相熟同伴实验方案）和**社交记忆**（适应性和非适应性实验方案）。

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：

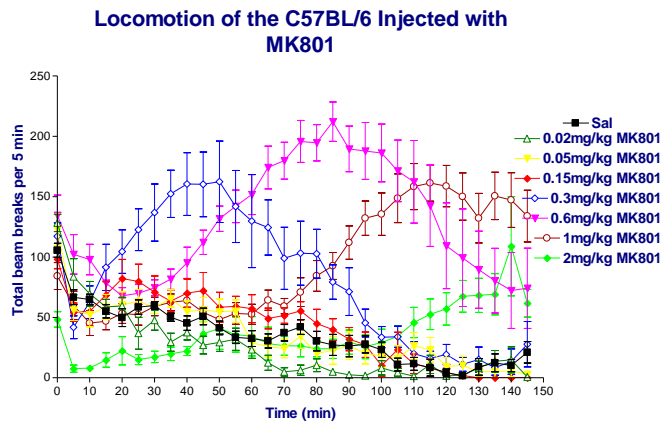
- 自发性模型动物：
- 诱导性模型动物
- 动物实验模型

生命科学研究离不开动物模型的培育，使用和研究

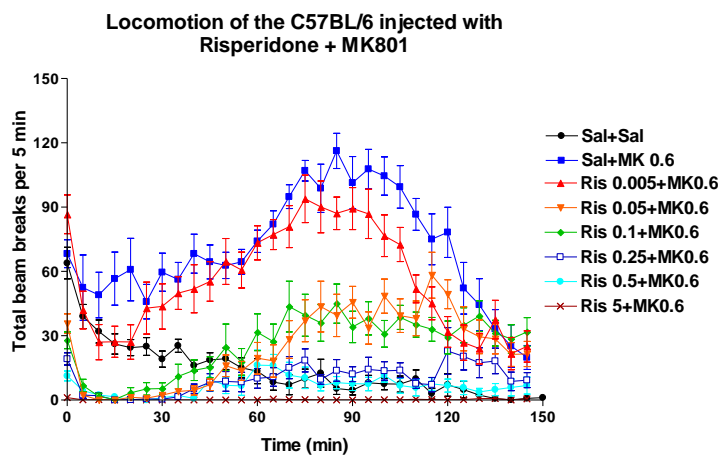
例. 精神分裂症的小鼠模型

- 急性模型

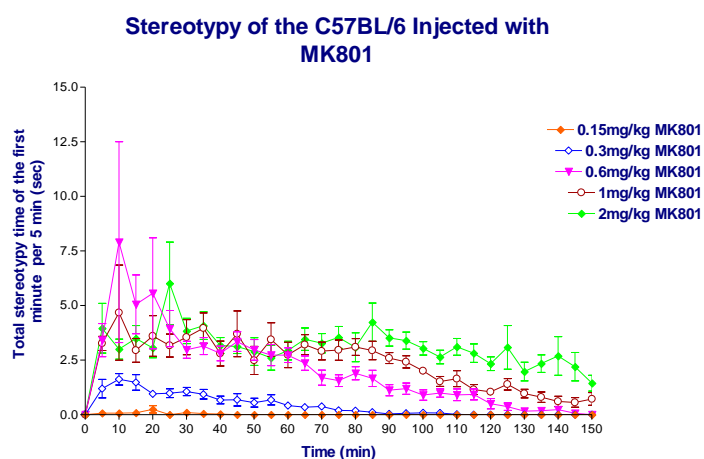
用 MK-801 诱导实验小鼠建立的精神分裂症动物模型可以用来研究该病的**发病机理**，**相关基因**以及**治疗药物的筛选**。



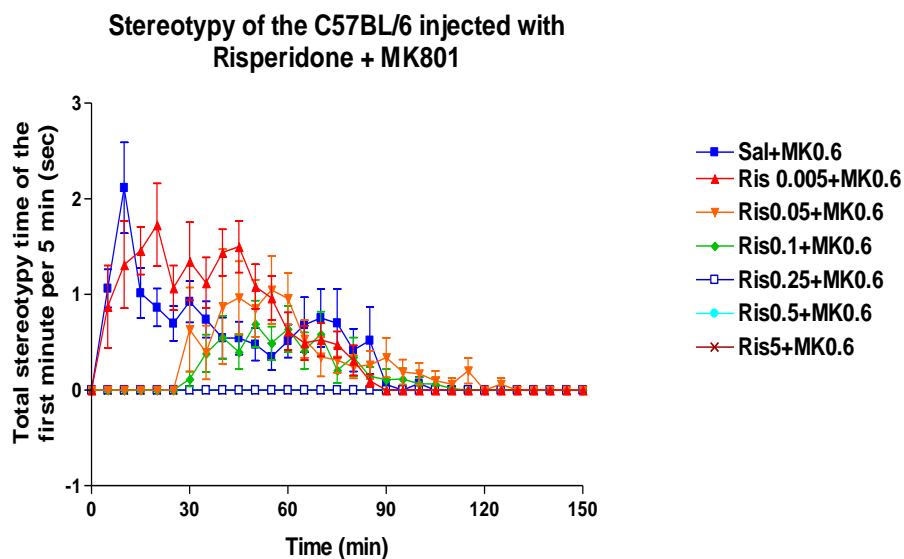
纵坐标为红外阻断，前期 C57BL/6 的快速跑动随 MK801 剂量增加而增加，0.6 mg/kg 的剂量下 80 min 左右出现最高峰，剂量再增加，出现精神分裂症的典型症状如不断摇头等，因此跑动减少。



Risperidone 为治疗人精神分裂症的药物,对 MK801 诱发的快速跑动有抑制效果,同时说明快速跑动是精神分裂的症状



MK801 诱发刻板运动



随着 Risperidone 剂量增加，刻板运动降低直至消失
Risperidone 可以对精分的两种症状产生治疗效果，说明这种造模方式的成立的

● 亚慢性动物模型

亚慢性组在强度、持续时间和起效时间上，hyperlocomotion 的效应都强于急性组

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
- 代谢模型等

2.4 实验动物在药物研究和新药开发方面的应用

• 人类疾病动物模型的建立

• 新药筛选

• 相关功能基因筛选

• 毒理研究

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

● 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。

- 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。

- 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（多 1-2 只防意外死亡）。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。

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

- 了解动物的特性：如小鼠的昼夜节律，性别差异等。（比如要固定做实验的时间；除生殖相关实验外，都用雄性小鼠做实验）

- 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；动物换生活环境后适应 72 小时以上。

- 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

- 代谢的观察

摄食量，摄水量，粪蛋白含量等的测定

- 行为的观察

运动，痛觉，认知，记忆等行为的观察

- 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

- 生物统计学基础

- 选择合适的统计学软件

- 作图的规范化

- 从纷繁的数据中得出科学的结论

3.5 假象的避免和剔除(要举实例)

- 避免由于实验动物种类和品系不同引起的差异

- 避免由于实验动物性别和日龄不同引起的差异

- 避免由于试剂的生产商和批量不同引起的差异

- 避免由于参加实验的动物个数不够引起的差异

- 剔除实验动物中异常个体的实验结果

- 使用合格的实验动物和试剂

- 查找实验失败的原因时采用逐个排除法（控制变量）

4 动物实验技术、实验动物法规和伦理

4.1 动物的抓取，保定，麻醉，采血，注射等

小鼠的抓取保定：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。

动物的麻醉：选择合适麻药，掌握好麻醉药的药量是麻醉成功的关键；雄性动物，豚鼠等对麻醉药更敏感。同时注意要注射的位置

采血：眼眶采血、尾静脉采血和心脏采血

注射：腹腔注射、皮下注射、侧脑室注射和脊髓注射

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：

- 尽可能保持与实验动物原有生存环境类似的环境
- 根据实验设计的需要，分笼饲养实验动物
- 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

选择实验动物：小鼠，兔等

免疫注射方法：腹腔注射，皮下注射等

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，共免疫 3—4 次。

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

- 实验设计要符合实验动物的活动规律（如固定时间）
- 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

4.6 伦理

- “3R” 研究概念的传入
倡导 3R：替代（Replacement）
减少（Reduction）
优化（Refinement）

复习思考题（来自往年总结）

1、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)

2、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

3、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。

于翔 梁昱 杨黄恬 老师的请参考往年资料

酶工程

✓ 定义

酶：有催化活力的蛋白质

工程：超越常规实践技巧运用数学或系统性知识设计有实用价值的复杂体系

酶工程：运用酶学知识设计有催化活性的蛋白质制剂及其应用条件

一、酶的基本概念及酶工程发展概况

1、酶是有催化活力的蛋白质

蛋白质：一般不稳定，反应条件温和

催化能力：高效性,专一性（化学选择性，区域选择性，立体选择性）

机理：稳定过渡态，降低能垒；变通反应途径；降低底物基态稳定性

降低了反应活化能 ΔG^\ddagger ，从而加速了反应

2、酶学相关定义

✓ U 酶活力单位

1 分钟内转化 1 微摩尔底物所需酶量

✓ V_{max} 最大反应速度

酶分子所有的活性部位都被底物占据时的反应速度

✓ K_m 米氏常数

反应速度达到 V_{max} 一半时的底物浓度

✓ K_{cat} 酶转换数

给定酶浓度下 单个催化中心转化底物分子数的最大值

✓ 米氏方程

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

3、国际酶学委员会酶编号规则 Enzyme Commission (EC)

第一位	第二位-亚类	第三位-亚亚类	EC.number
氧化还原酶	氧化反应的供体是 H^+ 还是 e^-	受体类型	第四位取决于具体的反应过程在亚亚类中的排序
转移酶	发生转移的基团种类	发生转移的基团细分	
水解酶	水解的化学键种类	天然底物类型	
裂合酶	断裂的化学键种类	脱去的基团种类	
异构酶	同分异构体的种类	底物类型	
连接酶	形成的化学键种类	-	

酶知识复习小结

酶是有催化活力的蛋白质

酶通过降低活化能加速反应

酶分为 6 大类，酶的命名可以在 BRENDA 数据库上查询

二、酶的生产

1、酶的历史、酶工程的历史

2、酶的应用

食品饮料、洗涤、生物燃料、饲料、其他（药用、生物催化、诊断、生物技术研究用酶）
市场规模 40 亿

3、微生物酶生产率提高的手段

- ✓ 菌种选育 —— 诱变育种
- ✓ 发酵工艺优化 —— 发酵工程
- ✓ 重组表达 —— 基因工程

4、分子生物学知识复习

A、理论

- (1) 中心法则
- (2) 操纵子理论
- (3) 分子伴侣

B、工具

- 1) PCR
- 2) 限制性内切酶/连接酶
- 3) GIBSON 组装

5、表达系统选择

1) 重组表达系统、大肠杆菌 (T7, tac/trc, T5, ara ...)、芽胞杆菌、巴斯德毕赤酵母 (aox1, gap)、黑曲霉、昆虫细胞、中国仓鼠卵巢细胞、体外翻译系统……

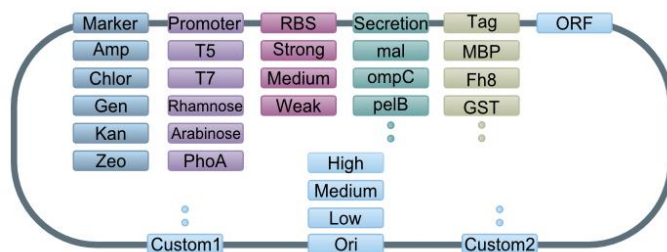
2) 考虑因素：①蛋白质产量 ②翻译后修饰加工、折叠 (二硫键)和糖基化

③蛋白质纯化 ④经济性 ⑤可用设备

3) 大肠杆菌——首选重组蛋白质表达系统

生长最快、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

载体构建：



首选 pET 系统, pET24/BL21(DE3)

T7 表达系统工作原理: IPTG 可诱导乳糖操纵子控制的 T7RNA 聚合酶的表达, T7RNA 聚合酶可激活 T7 启动子, 从而启动与 T7RNA 启动子串联的目的基因的表达。

pET 表达流程

选择载体 (一般 ppET24or28), 经重组操作, 筛选验证后, 在表达宿主 (DE3) 中诱导表达

pET24 C 端加 His tag, 28 是 N 端加

6、新生肽链的折叠与聚集

新生肽链需经正确折叠才有活性

外源蛋白过量表达不能很好的识别折叠会形成包涵体, 由此可利用增溶标签进行蛋白重组表达和纯化, 且经实验统计 MBP 作为增容标签有无争议的优越性

大肠杆菌表达实验策略 (学术版)

- ✓ 首选 pET24 或 pET28 (如果需要 N 端加纯化标签) 与 BL21(DE3)
- ✓ TB 培养基 37° 生长到 1-1.5OD, 18 °C 生长 1 小时到 3OD, 0.5mM IPTG 诱导 19 小时至 OD 达 10
- ✓ 高表达低可溶的解救措施
 1. 降温低至 15°C
 2. 换培养基为 2xYT 或 ZYP5052(自诱导), 换表达宿主
 3. 截短 N 端和/或 C 端 2-10 个氨基酸残基
 4. 与 MBP 等高可溶性蛋白融合表达
 5. 化学诱导分子伴侣、共表达分子伴侣/作用蛋白或提供配体

三、酶的改造

1、获得新酶的途径

自然界中获取、有理设计新酶、随机方法筛选

2、酶的设计方法

有理设计（根据已知信息如结构、催化机理设计改造）、无理设计（随机突变，筛）、天然设计（基因组探矿—搜索同源基因同等条件下看表达活性，选最好的，是用于不要求酶蛋白来源的实验）

3、酶的发现

- ✓ 基于功能--生物多样性与新酶的发现

嗜热菌 (Thermophiles)、嗜冷菌 (Psychrophiles)、嗜酸菌 (Acidophiles)
嗜盐菌 (Halophiles)、嗜碱菌 (Alkaliphiles)、嗜压菌 (Barophiles)

极端微生物的特殊生长环境及代谢产物，使酶在“恶劣”环境下能够发挥高效催化作用。

- ✓ 基于序列-- 目前已经有无数的基因组被测序（同源搜索）

4、合成生物技术助力酶工程

基因组探矿 酶基因序列信息 基因合成
基因组测序价格、基因合成价格逐年下降

5、天然酶

- ✓ 自然进化中，天然酶的结构功能对应于其活细胞的生理功能而进化
- ✓ 天然酶往往不适用于生物技术（环境不同，要求不同）

- 化学 - 转化天然底物
- 物理 - 耐受差
- 生物 - 代谢调控和高转换数

- ✓ 生物催化剂应用依赖于天然酶改造或重新设计

改造目的

- 高专一性——只催化所需反应 减少甚至没有副产物
- 高活性——高生产率 不易受抑制
- 高稳定性——存放时间长 操作稳定性高

6、酶的改造

①化学修饰（如，PEG 修饰提高稳定性）

②固定化

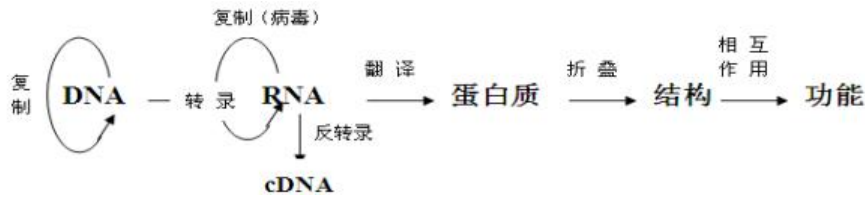
③蛋白质工程——理性设计(基因工程，结构生物学和生物信息学)

通过蛋白质化学、蛋白质晶体学和动力学的研究获取关于蛋白质物理、化学等方面的信息，在此基础上对编码该蛋白的基因进行有目的的设计改造，并通过基因工程等手段将其进行表达和分离纯化，最终将其投入实际应用。

④诱变筛选——无理设计

7、分子生物学知识复习

✓ 中心法则



(c)DNA 序列→蛋白质序列→立体结构→功能

蛋白质功能=f(蛋白质序列) →改变序列影响蛋白质功能

✓ 蛋白质序列空间

n 个氨基酸残基组成的线性长链的序列空间为 20^n

小至 100 个氨基酸残基组成的酶的序列空间也大至 20^{100}

序列空间→蛋白质特性

序列空间距离近→蛋白质性质接近

✓ PAM250 氨基酸相对突变率矩阵和基本氨基酸性质关系 venn 图

8、有理设计

A、有理设计需根据详尽的结构功能关系知识

✓ 结构

- 一级结构 氨基酸顺序
- 二级结构 α -螺旋, β -折叠, 转角, 无规卷曲
- 三级结构 3D 折叠 (结晶, NMR)

✓ 功能

- 活性位点 氨基酸残基和辅因子
- 催化 机理, 特异性和动力学
- 调节 竞争性抑制和变构控制

如何获取以上信息

经典途径

- 纯化目标酶, 分析氨基酸序列
- 分离基因并重组表达
- 结晶目标酶, X 射线分析

BRENDA 数据库 可获得结构以外的所有信息

B、序列与结构分析

(1) 多重联配 →序列保守性信息

ClustalW, ClustalW2 (蛋白质和 DNA 多重序列比对软件)

(2) 结晶/同源模建→获得立体结构

蛋白质结构预测: SWISS-MODEL、I-TASSA

(3) 三维结构分析→分子图像分析

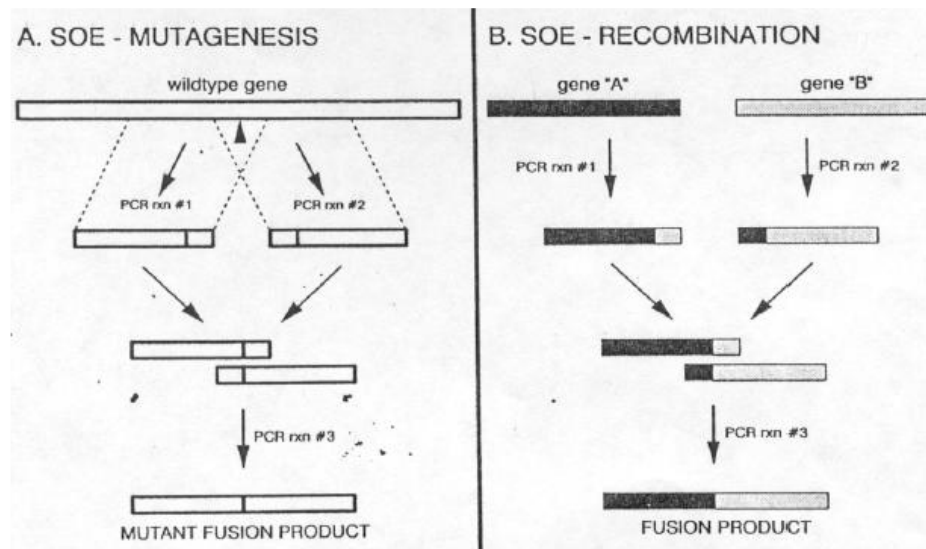
PyMOL (It can produce high quality 3D images of small molecules and biological macromolecules)

蛋白质与配体分子对接分析 (PPT 有个例子流程)

C、定向突变

(1) PCR

- ✓ 原理
- ✓ 定向突变 (SOE-Mutagenesis & SOE-Recombination)



有理设计小结

✓ 工具 (蛋白质分析工具)

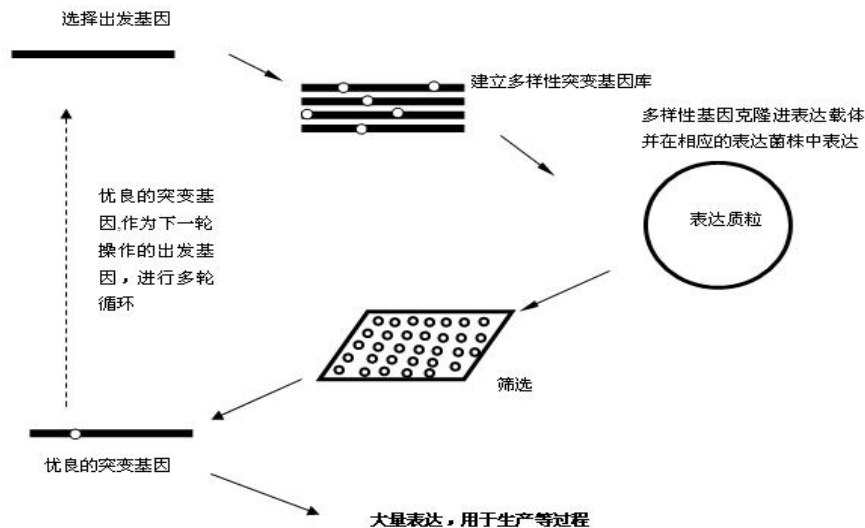
- ①酶数据库 Brenda
- ②序列联配 ClustalW
- ③同源模建 Swissmodel

- ④分子图像 PyMOL
- ⑤定点突变, 序列重组 PCR

✓ 目标

- 热稳定性, pH 曲线 表面氨基酸替换
- 催化效率 需了解催化机理
- 底物特异 需了解催化机理

9、酶的无理设计--定向进化



A、高频随机突变导入方法（去除校正及错配修复功能）

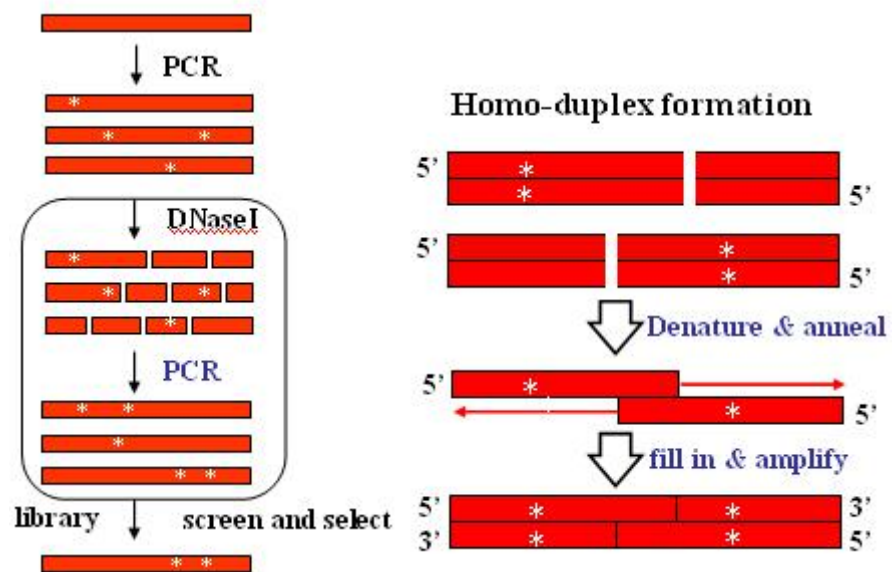
- ✓ 易错 PCR error-prone PCR (= PCR with many errors/mutations)
 - 无校对 DNA 聚合酶 e.g. Taq, Mutazyme
 - 非优化条件 e.g. Mn^{2+} 代替 Mg^{2+} ，调整 4 种 dNTP 相对浓度
- ✓ Random Mutagenesis kit (突变率 0.1—1.6% /PCR，相当于 1—7 个碱基突变/基因)
 - 用 kit 突变比较均匀
- ✓ 突变影响大肠杆菌 DNA 复制保真性的主要通路（可实现体内连续突变）
 - ① 用专门宿主：以大肠杆菌 XL1-Red （有 mutD5 mutS mutT，是 DNA 修复缺陷宿主菌）作为基因复制宿主，培养到平台期 平均 2Kb 发生 1 个碱基突变
 - ② 辅助突变质粒：比 XL1-Red 更好

B、逐点饱和突变技术：对每个 AA 依次做饱和突变

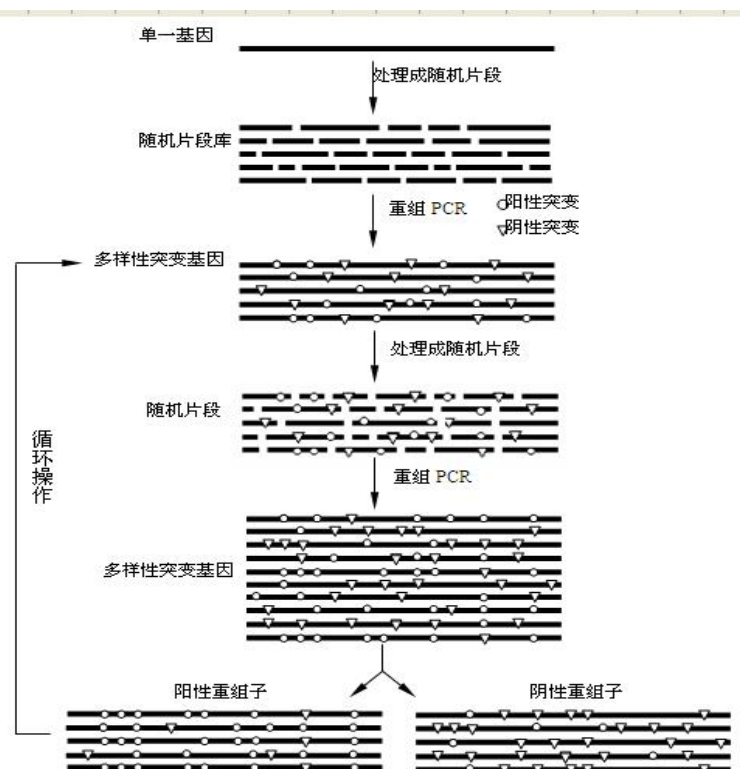
C、

进化（逐步过程）	加速进化（快速改变）	革命（极快改变）
自然进化 <ul style="list-style-type: none"> 自发突变 重组 自然选择 	农业进化 <ul style="list-style-type: none"> 自发突变 育种 筛选 	实验室进化（一个 <u>gene 连续突变 or 同源基因重组</u> ） <ul style="list-style-type: none"> 加快突变速度 分子育种 筛选
<u>达尔文进化理论</u> 生命的复杂性是突变，重组和自然选择算法的结果	人类的作物，花卉和家禽家畜育种实践有几千年历史	实验室进化不同于自然进化在于其明确的进化目标。在此意义上它是“定向”并且更像育种。此外，它非常快。

Error-prone PCR—DNA shuffling

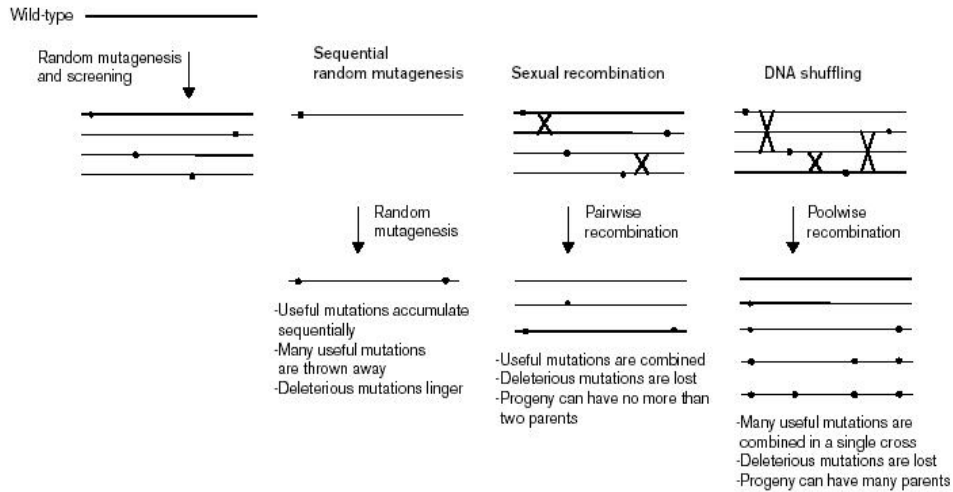


单基因 or 多个同源基因在不保真 DNA 聚合酶、亚优化条件下 PCR，使基因产生随机突变，DNase 非特异性内切，变性退火，重新排列组合，建库筛选



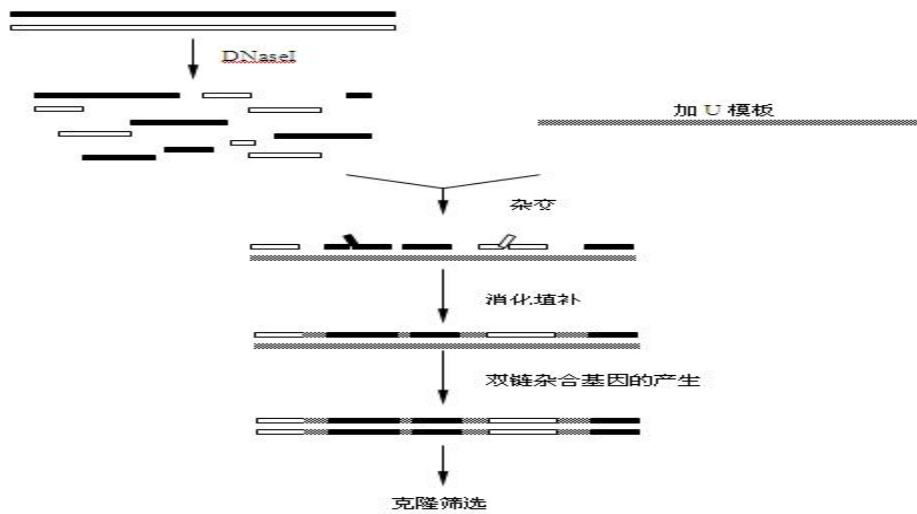
有个 DNA shuffling - β -lactamase case 的例子（几轮 shuffling 产生的突变体有极高的耐药性）

D、定向进化方法比较



✓ Accumulation of mutations by sequential mutagenesis, pairwise recombination and poolwise recombination (依次增多)

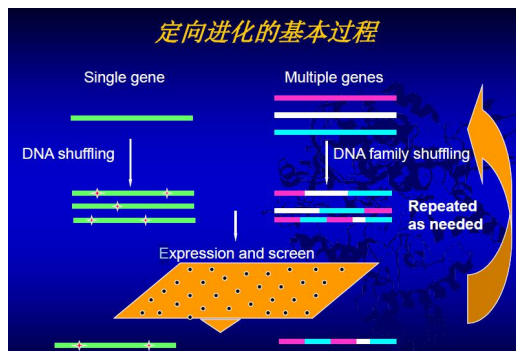
✓ DNA Shuffling { 单基因 Shuffling
多基因 Shuffling, 要求具有一定同源性
基因家族 Shuffling



同源 gene 做可获得分布更广的突变体

✓ Eg 同源的 4 个耐药基因，单个分开做，耐药倍数提高 8 倍；混在一起做提高几百倍

E、定向进化的基本过程



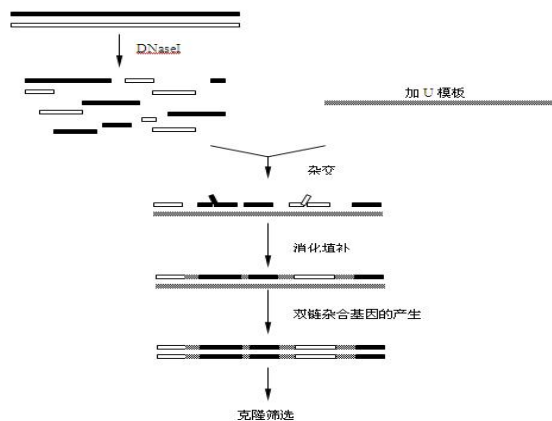
F、怎样产生 crossover 的方法

✓ Staggered Extension Process(StEP)

两个有一定同源性的分子，PCR 时控制时间使得扩增不完整变性退火，使得 A 分子退火到 B 分子上继续扩增，再变性退火，可能又回到 A 上继续扩增由此形成 crossover

✓ RACHITT (random chimeragenesis on transient templates, 瞬时模板随机嵌合)

1. 两种野生型基因 A 和 B 双链 DNA 处理成单链 DNA。
2. DNaseI 处理单链 DNA，形成许多的随机大小的片段。
3. 随机片段与单链模板杂交。
4. 通过两端引物的 PCR 扩增反应得到具有目的片段大小的杂合基因。



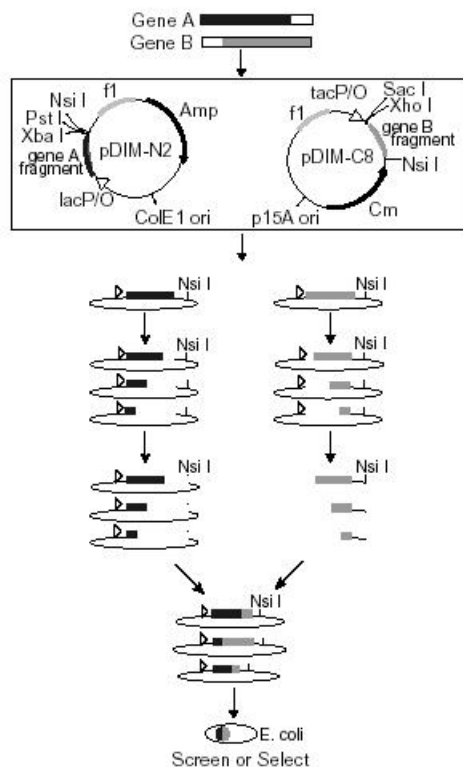
该方法能尽量除去 WT，产生更多 crossover

✓ DNA shuffling - efficiency depends on homology

✓ Incremental Truncation for the Creation of HYbrid enzymes (ITCHY)

对随机挑选的混组酶进行测序证明 ITCHY 比普通混组方法在两个基因的非同源区发生了更多的交叉。而且通过 ITCHY 发现的嵌合酶比普通 DNA 混组方法获得杂合酶的活性相同或更高（不依赖于同源性，crossover 多样，但每次只产一个）

方法：克隆获得基因 A、B，一个在 5' 端切开，一个在 3' 端切开，随后用核酸外切酶消化成大小不同的片段，Nsi 酶将其中一个切下，进行连接。（因为两个基因都有平末端所以可以相连）



✓ Sequence Homology-Independent Protein Recombination (SHIPREC)

应用于膜结合人细胞色素 P450 和可溶性细菌 P450 亚铁血红素结构域的混组, 将混组基因库和氯霉素乙酰基转移酶基因融合, 筛选到 2 个在细菌中可溶性比人 P450 高的 P450 杂合酶。

方法:

基因 A、B 首尾相连, 核酸外切酶从两端随机消化至 1kb, 再首尾相连环化, 利用最初连接序列处的特异性酶切位点将环状基因线性化, 并去除连接序列, 从而获得了一个杂合基因库。

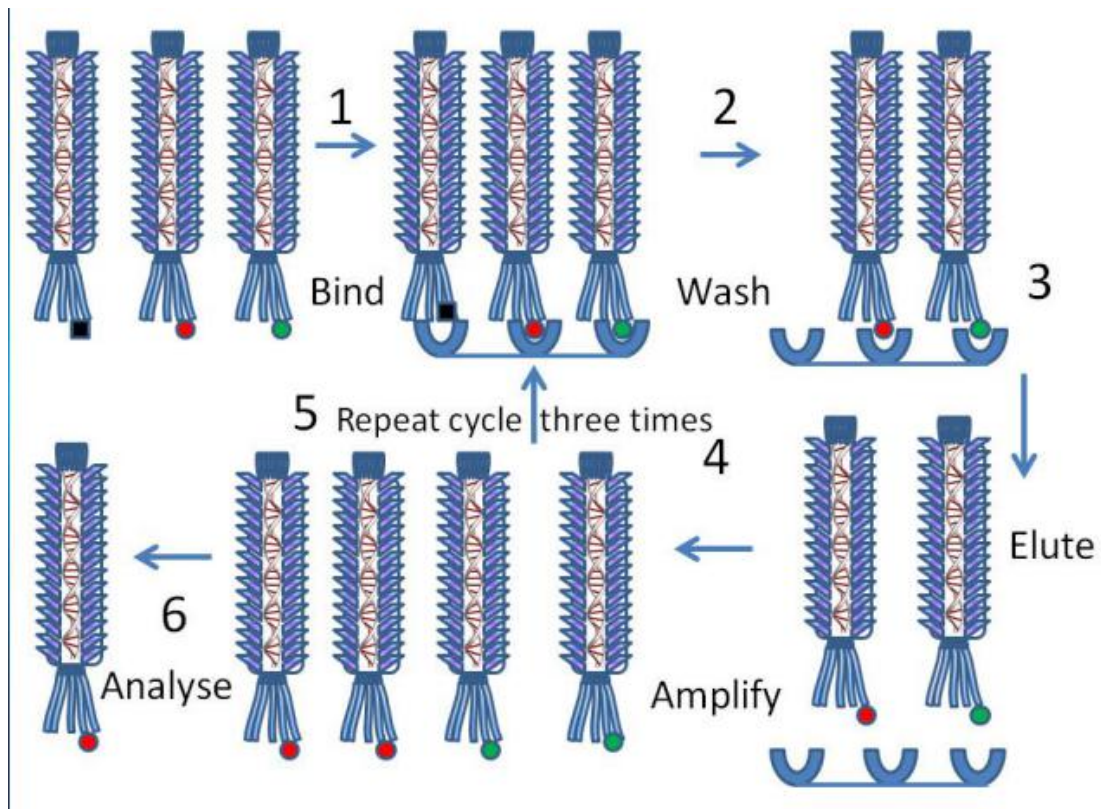
G、实验室进化 - 进化方法比较

- 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)

H、高通量筛选——无理设计的有理部分

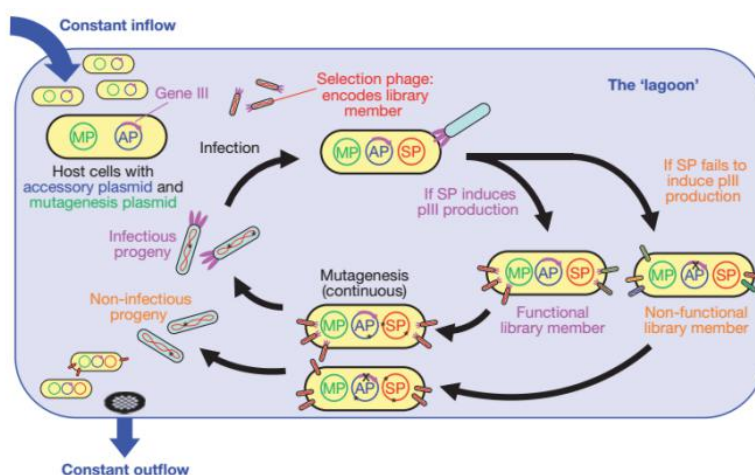
Selection&screening

✓ 噬菌体展示技术



✓ 噬菌体辅助的连续进化（Phage Assisted Continuous Evolution）

PACE 系统



AP 编码 geneIII（对噬菌体成熟重要），将噬菌体中 geneIIIKO，导入蛋白库且蛋白库与 geneIII 表达关联，只有突变才能让 AP 表达进入噬菌体下一轮侵染周期。MP 能帮助 SP 高频突变，若产生的 mut 能让 geneIII 高表达，噬菌体就更具侵染性，最终能活下来的噬菌体就是能让 geneIII 高表达的突变，测序（但是突变与

geneIII的关联要自己建立筛选方法关联起来)

✓ PACE 装置 (自动化)

I、超越基因组变异速率门槛的基因连续进化方法

两种 DNA 聚合酶, 一种作用于宿主基因组, 另一种酶 (orthorep) 针对线性质粒 (含外源基因), 96 孔板不同筛选条件进行批量筛选

此方法可避免做易错 PCR 会影响宿主基因组的保真性

J、定向进化的应用

Biocatalysts、Protein Drug、Evolved Vector、Vaccine、Gene Therapy
Small Molecule Pharmaceuticals, Antibody, Strain Evolution

K、定向进化的局限性

筛选包含所有可能突变体的库不现实: 含 100 氨基酸的酶: 有 20^{100} 种可能组合

- 找到减少所需库容量的方法: 选择亲本基因
- 发展高效快速的筛选方法: 发展智能测定

定向进化小结

定向进化是更有效的蛋白质改造方法

突变/重组方法成熟

筛选能力是成败关键

有理设计与定向进化的有机结合将是解决复杂酶设计问题的有效途径

小结 蛋白质工程实验策略

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

详述重组表达某个蛋白的技术路线 (这题过往是讲过的, 相当于原题, 但今年没有具体讲)

1、序列获取

(1) 已知序列

从文库中亚克隆

(RT)PCR 直接扩增

化学合成

(2) 未知序列

① 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

② 纯化酶, 测定部分氨基酸序列, 设计简并引物扩增基因

③设计 DNA 探针进行 southern 杂交和/或菌落杂交，筛选文库

④建立表达文库

利用能表达酶活性的宿主菌的表型不同进行筛选

纯化酶，制备抗体，用免疫印迹的方法筛选阳性克隆

⑤基因组测序

2、表达系统选择

优先根据文献条件，选 E.coli pET 系统、酵母系统…简述优缺点及选择标准

3、表达优化

(1) 高表达低可溶

IPTG 浓度(1uM, 10uM, 100uM)，降温低至 18℃，LB 换成 TB 培养基

弱启动子 (pBAD) /生长缓慢宿主菌(DH5a)（主要让蛋白质有充分时间折叠）

与 MBP 等高可溶性蛋白融合表达

共表达分子伴侣/作用蛋白

蛋白质工程改造

(2) 低表达高可溶

换 Rosetta 宿主、进行密码子优化

(3) 低表达低可溶

先提高可溶性（融合表达，弱启动子，分子伴侣，蛋白质工程等） 随后密码子优化提高表达量