

主 编 李 丽 司军强 马克涛

钾离子 通道与疾病

JIALIZI TONGDAO YU JIBING



科学技术文献出版社
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

主 编 李 丽 司军强 马克涛

钾离子通道 与 疾病

编委会成员：

李 丽 石河子大学医学院生理学教研室
司军强 石河子大学医学院生理学教研室
马克涛 石河子大学医学院生理学教研室
赵 磊 石河子大学医学院生理学教研室
张忠双 石河子大学医学院生理学教研室
朱 贺 石河子大学医学院生理学教研室
石文艳 石河子大学医学院生理学教研室



科学技术文献出版社

SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

钾离子通道与疾病 / 李丽等主编. —北京: 科学技术文献出版社, 2014. 1
ISBN 978-7-5023-8522-4

I. ①钾… II. ①李… III. ①钾离子—离子通道—应用—疾病—诊疗—研究
IV. ①R4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 305810 号

钾离子通道与疾病

策划编辑: 孙江莉 责任编辑: 孙江莉 责任校对: 张叫咪 责任出版: 张志平

出 版 者 科学技术文献出版社
地 址 北京市复兴路15号 邮编 100038
编 务 部 (010) 58882938, 58882087 (传真)
发 行 部 (010) 58882868, 58882874 (传真)
邮 购 部 (010) 58882873
官 方 网 址 <http://www.stdp.com.cn>
发 行 者 科学技术文献出版社发行 全国各地新华书店经销
印 刷 者 中印集团数字印务有限公司
版 次 2014年1月第1版 2014年1月第1次印刷
开 本 710×1000 1/16
字 数 300千
印 张 15.25
书 号 ISBN 978-7-5023-8522-4
定 价 62.00元



版权所有 违法必究

购买本社图书, 凡字迹不清、缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换

前言

细胞膜是由两层脂质分子构成，使得细胞膜对带电离子的通透性较脂溶性物质的相对较低。因此，细胞膜（或质膜）表面的蛋白质对带电离子进出细胞或在细胞内不同细胞器之间的相互转移发挥着重要的调节作用，这些蛋白质包括我们熟知的离子通道、离子泵和转运蛋白等。本书讨论第一组细胞膜蛋白质-离子通道（Ion channels），尤其是钾离子通道。离子通道被认为是细胞膜上的门控性的孔道，其关闭和开放可能受一些固有的因素调控。如，通道与其相应的配体结合或细胞膜两侧的电位梯度发生改变等，均可调控通道的开闭。离子通道存在于所有动物、植物和细菌的细胞膜上，参与神经元和肌细胞兴奋、激素分泌、学习和记忆、细胞增殖、感觉换能、水盐平衡和血压调节等多种重要的生理过程。因此，离子通道结构和功能的缺陷对生理功能有着重要影响，需要对离子通道进行深入的探索和研究才能充分了解和解释其重要的生理功能。

离子通道疾病（通道疾病，Channelopathies）可通过多种不同的途径产生。首先，离子通道基因启动子区突变可以引起离子通道蛋白表达的下调或上调。其次，离子通道编码区突变可能引起通道功能的缺失或增强。无论是通道功能缺失还是功能增强，这两种情况任何一种发生都可以引发严重的有害结果。例如，突变使上皮 Na^+ 离子通道活动的增强引发利德尔综合征（Liddle's syndrome）。反之，突变使上皮 Na^+ 离子通道活动的降低引发 I 型假性醛固酮减少症（Pseudohypoaldosteronism type 1）。第三，一些疾病的发生是由于细胞内或细胞外配体或调节物对离子通道功能调节的缺陷，这些缺陷可以是调节分子自身在编码过程中发生了突变，也可以是合成这些物质的途径发生缺陷。例如，一些类型的糖尿病的发生。第四，机体产生离子通道蛋白的自身抗体，通过下调或增强离子通道的功能产生疾病。第五，离子通道可能作为一种致死因素发挥作用。比如，被细胞分泌并插入到靶细胞的细胞膜上组成大的非选择性的孔道，从而造成细胞溶解或死亡。金黄色葡萄球菌产生补体和溶血毒素导致溶血的过程就是这一作用的典型例子。最后，离子通道是大量的、多种毒素的靶点，这些毒素能通过增强或抑制通道的功能发挥调节作用。这些高亲和力、特异性的毒素可作为离子通道蛋白纯化的配体来使用，它们的这一作用在这本书中不做详细的讨论。离子通道活动有重要生理功能的另一有力的证据是，许多药物通过与离子通道蛋白的相互作用调节通道的功能，发挥治疗疾病的作用。

本书讨论的多种疾病都是由钾离子通道基因突变引发的，这些自然突变的产生为我们进一步了解钾离子通道的功能提供了新的认识，对确定钾离子通道蛋白重要区域的功能也很有价值。还有许多疾病基因分析导致克隆出新的离子通道的实例。例如，第一例被鉴定的是 K^+ 通道，它来自于暴露在乙醚中发生抖动 (Shaker) 的果蝇 (*Drosophila*) 的基因克隆，反相表达蛋白有同样的作用。例如，电压门控性 Na^+ 通道的结构和功能与多血症关系的研究，使我们更加了解了什么样的蛋白质突变产生他们相对应的临床表型。许多离子通道疾病有遗传上的非均一性，相同的临床表型可能是不同基因突变产生的。例如，一种罕见的心脏病，在青少年时期发生室性心律失常引发猝死，这种疾病可以是三种不同的基因突变引起。相反，同一基因的不同突变也可以引发多种不同临床表型的疾病。如，运动共济失调 2 型 (Episodic ataxia type 2)、遗传的偏瘫性偏头痛 (Familial hemiplegic migraine) 和脊髓小脑运动失调 6 型 (Spinocerebellar ataxia type 6) 都是因为电压门控性 Ca^{2+} 通道 (CACNL1A4) 突变引起的。值得注意的是，所有单基因病尽管作为一个例子，其发生的频率在众多基因病群落中是很低的。然而，对于我们认识离子通道结构和功能之间的相互关系，认识不同离子通道的生理作用却是无价的。

本书有八章，前五章主要介绍了离子通道研究的学科基础、基因如何转录翻译成离子通道蛋白质、离子通道如何活动和离子通道的研究方法。后三章分别介绍了电压依赖性钾离子通道与疾病、钙激活钾离子通道与疾病和内向整流钾离子通道与疾病。

本书可作为医学院校临床、预防、基础、检验和药学等专业的本科生参考书，也可作为硕士研究生和博士研究生的参考用书。

在《钾离子通道与疾病》的编写过程中，得到了各参编单位领导的亲切关怀，科学技术文献出版社负责人的热情帮助和指导，石河子大学医学院生理教研室的大力合作，顾问专家教授的耐心斧正，全体参编人员的辛勤劳动。在此一并致谢。

《钾离子通道与疾病》的编写是一项探索性的工作，所跨学科较广。由于我们的经验和水平有限，加之时间紧迫，书中难免存在缺点和错误，诚恳希望使用本书的广大读者提出宝贵意见和建议，以便今后修改。

编者

目 录 Contents

第一章

绪 言

第一节 离子通道的研究历程 / 1

- 一、生物膜离子通道早期研究时期 / 1
- 二、生物膜离子通道的经典研究时期 / 1
- 三、生物膜离子通道飞跃发展时期 / 2

第二节 离子通道本质特征与分类 / 2

第三节 离子通道的实验研究方法 / 2

- 一、电生理学研究方法 / 2
- 二、分子生物学研究方法 / 4
- 三、蛋白质结晶与 X 射线衍射技术 / 4
- 四、核磁共振技术 / 5

第四节 离子通道的理论研究方法 / 6

- 一、分子模拟方法 / 6
- 二、离子通道门控机制的理论研究方法 / 6
- 三、离子通道通透性的理论研究方法 / 7
- 四、密度泛函理论应用 / 8

第二章

离子通道研究的学科基础

第一节 分子生物学 / 9

- 一、分子生物学的研究内容 / 9
- 二、分子生物学的发展阶段 / 10
- 三、分子生物学发展的理论指导意义 / 15
- 四、分子生物学发展的实践应用意义 / 16

第二节 电生理学 / 16

- 一、电生理学的发展历史 / 17
- 二、电生理学的基本研究方法 / 23
- 三、膜片钳技术的应用 / 25

第三章

从基因到蛋白质

第一节 DNA 转录到 RNA / 28

- 一、基因和基因组的定义 / 28
- 二、基因的结构 / 28
- 三、DNA 转录成 RNA / 29
- 四、mRNA 的加工 / 31

第二节 蛋白质的翻译 / 34

- 一、遗传密码 / 34
- 二、mRNA 翻译成蛋白质 / 35

第三节 蛋白质结构 / 36

- 一、一级结构 / 36
- 二、二级结构 / 38

第四节 蛋白质合成后的分泌及加工修饰 / 39

- 一、细菌中蛋白质的越膜 / 40
- 二、真核生物蛋白质的分泌 / 40
- 三、蛋白质翻译后加工修饰 / 41

第五节 遗传基础 / 44

- 一、染色体结构 / 45
- 二、染色体修饰 / 47

第六节 基因病 / 51

- 一、单基因病 / 51
- 二、多基因病 / 51
- 三、离子通道突变发生功能缺陷 / 52

第四章

离子通道的工作机理

第一节 单通道电流的特性 / 56

- 一、单通道电流 / 56
- 二、渗透作用 / 58
- 三、经典离子在细胞内外的浓度 / 60
- 四、电流 - 电压关系 / 61
- 五、不能通透离子对通道的阻断作用 / 62
- 六、通透性和选择性 / 62

第二节 门控作用 / 63

- 一、配体门控离子通道 / 64
- 二、电压门控离子通道 / 65
- 三、离子通道功能的调节 / 67

第三节 单通道电流的动力学分析 / 68

第四节 从单通道到宏膜电流 / 69

- 一、宏膜电流 / 69
- 二、细胞的膜电流 / 72

第五节 从全细胞电流到膜电位变化 / 72

- 一、细胞膜的被动反应 / 72
- 二、动作电位 / 73
- 三、突触电位 / 75

第五章

离子通道的研究方法

第一节 离子通道功能的研究 / 78

- 一、膜电压（位）测量 / 78
- 二、电压钳 / 80
- 三、膜片钳 / 82
- 四、噪声分析 / 87
- 五、细胞内离子通道的研究方法 / 88

第二节 离子通道蛋白主要序列的获得 / 89

- 一、聚合酶链反应 (PCR) / 89
- 二、离子通道的克隆 / 90
- 三、功能性表达克隆离子通道 / 92
- 四、组织分布 / 93

第三节 离子通道结构的研究 / 93

- 一、拓扑 / 93
- 二、基因突变分析 / 94

第四节 离子通道和疾病遗传分析 / 96

- 一、染色体定位 / 96
- 二、基因克隆 / 98
- 三、定位克隆 / 100
- 四、定位候选克隆 / 102
- 五、基因连锁 / 106
- 六、多态性标记 / 109
- 七、转基因动物 / 110
- 八、Cre/loxP 重组酶系统 / 112

第六章

电压依赖性钾离子通道与疾病

第一节 电压门控钾离子通道 / 115

- 一、Kv 通道的分类 / 115
- 二、Kv 通道的结构 / 116
- 三、Kv 通道的多样性 / 116
- 四、Kv 通道的亚基构成 / 117
- 五、Kv 通道的辅助亚基 / 118

第二节 Kv 通道结构和功能的相互关系 / 119

- 一、Kv 通道的离子孔道 / 119
- 二、K⁺ 通道孔道的晶体结构 / 121
- 三、K⁺ 通过通道的机制 / 123
- 四、Kv 通道的激活 / 123
- 五、Kv 通道的失活 / 124

六、Kv 通道的调节 / 125

第三节 Kv 通道与周期性共济失调 1 型 / 125

第四节 KCNQ 通道与 LQTS / 127

一、KCNQ 通道的结构 / 127

二、KCNQ 通道的组织分布 / 129

三、KCNQ 通道与长 QT 综合征 / 129

四、KCNQ1 和 minK 突变可延长心脏的动作电位 / 134

五、KCNQ1 和 minK 突变可能导致耳聋 / 135

第五节 良性家族性新生儿癫痫 / 136

一、良性家族性新生儿癫痫基因突变 / 136

二、KCNQ 基因突变如何导致癫痫 / 136

第六节 KCNQ 通道与其他疾病 / 137

一、短 QT 综合征 (SQTS) / 137

二、孤立性房颤 (FAF) / 137

三、Andersen 综合征 / 138

四、和 KCNQ 通道有关的多基因的离子通道病 / 138

第七节 Eag 相似基因钾离子通道 / 139

一、HERG 的结构和功能特性 / 139

二、HERG 是组成心肌 IKr 通道的一部分 / 141

第八节 Eag 相似基因 K⁺ 通道与心脏病 / 141

一、HERG 与 LQT2 / 141

二、KCNQ1 或 HERG 基因突变与尖端扭转型室性心动过速 / 142

三、IKr 和 IKs 参与获得性 LQT 综合征 / 142

第九节 Eag1 相似基因与肿瘤发生 / 143

一、Eag1 钾通道简介 / 143

二、Eag1 钾通道的活性及其与细胞周期和增殖的关系 / 144

三、Eag1 的致癌性及其致癌机制 / 145

第七章

钙激活钾通道与疾病

第一节 钙激活钾离子通道的特性和分型 / 147

第二节 大电导的 KCa (BK_{Ca}) 通道 / 148

- 一、 BK_{Ca} 通道的功能特性 / 148
- 二、 BK_{Ca} 通道的分子结构、克隆和分布 / 150
- 三、 BK_{Ca} 通道的调节 / 151

第三节 小电导的 K_{Ca} 通道 / 153

- 一、 SK_{Ca} 通道的基本特性 / 153
- 二、 SK_{Ca} 通道的结构 / 153
- 三、 SK_{Ca} 通道的基本生理特性 / 155
- 四、 SK_{Ca} 通道的基本生理功能 / 156
- 五、 SK_{Ca} 通道的调控 / 156
- 六、 SK_{Ca} 通道的克隆和表达 / 159
- 七、 SK_{Ca} 通道与强制性肌营养不良症 / 160
- 八、 SK_{Ca} 通道与心房颤动 / 161

第四节 中电导的 K_{Ca} 通道 / 162

- 一、 IK_{Ca} 的分子结构 / 162
- 二、 IK_{Ca} 的生物学功能及调控机制 / 162
- 三、 IK_{Ca} 的克隆和组织分布 / 163
- 四、 IK_{Ca} 与镰状红细胞病 / 163
- 五、 IK_{Ca} 在肿瘤发病中的作用 / 163

第八章

内向整流钾通道与疾病

第一节 内向整流钾通道的整流作用及分类 / 166

- 一、内向整流钾通道的整流作用 / 166
- 二、内向整流钾通道的分类 / 167
- 三、 Mg^{2+} 和精氨对 K_{ir} 通道内向整流的调节 / 168

第二节 内向整流钾通道功能的调节 / 170

- 一、质子对内向整流钾通道的调制 / 170
- 二、磷酸化对内向整流钾通道的调节 / 170
- 三、GTP 对内向整流钾通道的调节 / 171
- 四、腺嘌呤核苷酸对内向整流钾通道的调节 / 173
- 五、内向整流钾通道的染色体定位 / 174

第三节 经典内向整流钾通道 (Kir 通道) / 175

- 一、Kir 通道的超家族 / 175
- 二、Kir 通道的主要结构 / 175
- 三、Kir 通道亚家族成员之间的杂合作用 / 178

第四节 KATP 通道 / 179

- 一、功能性 KATP 通道 / 179
- 二、Kir6.2 基因编码的 KATP 通道 / 180
- 三、SUR2A 基因编码的磺脲受体 / 181
- 四、K_{ATP} 通道的电流记录及特点 / 182

第五节 G 蛋白偶联内向整流钾通道 / 183

- 一、GIRK 的基因和蛋白结构 / 183
- 二、GIRK 的组织分布 / 184
- 三、GIRK 的调控 / 184
- 四、GIRK 的病理生理意义 / 185

第六节 Kir 通道有关的疾病 / 187

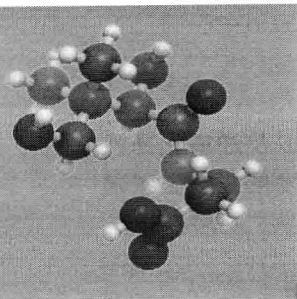
- 一、Bartter's 综合征 (Kir1.1) / 187
- 二、Weaver 小鼠 (Kir3.2) / 189
- 三、Kir 通道功能异常与心脏疾病 / 191

第七节 K_{ATP} 通道与胰岛素分泌障碍性疾病 / 193

- 一、家族性婴儿期高胰岛素低血糖症 (PHHI) / 194
- 二、K_{ATP} 与糖尿病 / 196

参考文献 / 198

中英文对照词表 / 217



第一章

绪言

第一节 离子通道的研究历程

一、生物膜离子通道早期研究时期

离子通道的早期研究主要来源于电生理学研究。早在 1890 年，德国的物理化学家 Wilhelm Ostwald (1909 年诺贝尔化学奖获得者)，基于人工合成的胶质膜实验，提出活细胞产生的电信号可使离子在细胞中穿梭理论。到了 1900 年，他的这种电化学思想才被认可，后来研究表明，膜电位本质上是电化学。

上世纪初期 (1902-1912 年) 伯恩斯坦 (J. Betnstein, 1902) 最先提出“膜学说”，并用此解释生物电的产生。他认为静息时细胞膜只对钾离子有通透性，由于细胞内外钾离子浓度不同，因此两侧出现内负外正的电位差。当细胞受到刺激而兴奋时，细胞膜暂时失去对离子的选择性，所有离子都能通过，因此，膜两侧的电位差暂时消失。

1925 年，Michaelis 提出细胞膜上可能存在狭窄离子通道。在早期膜生物物理研究阶段，兴奋膜离子理论从未经试验验证的假说发展成为公认的理论，这一时期的主要贡献在于确定生物电活动与离子通透性的关系，但尚未明确建立离子通道的概念。

二、生物膜离子通道的经典研究时期

1950-1960 年期间，两位英国科学家 Hodgkin 和 Huxley，基于乌贼大轴突为材料做的生理实验，使用电压钳位技术，证实跨膜电位决定于细胞膜的离子通透性，从而对钾、钠离子通透性变化作了详细的分析，并提出著名的“ Na^+ 、 K^+ 双通道模型”和离子学说。Hodgkin 和 Huxley 的离子学说解释了生物电的起源。他们也因此共同获得 1963 年的诺贝尔生理学或医学奖。

1965-1975 年，Hille 基于药理学的方法，研究钠、钾离子通道结构以及选择性通透机制，同时 Armstrong 基于有关肌肉兴奋收缩偶联的实验，研究门控与膜电压之间的关系。俩人皆因对离子通道选择通透性及门控机制的突出贡献共同获 1999 年拉斯克医学奖。

这一时期是离子通道的经典研究时期，离子通道模型的建立以及通道选择性和通透性机制的研究都有了很大突破，为离子通道的进一步飞跃发展研究做了很好的铺垫。

三、生物膜离子通道飞跃发展时期

1981年，德国科学家 Neher 和 Sakrmann 发明了膜片钳技术，使用这项技术可以直接记录离子单通道电流从而证实细胞膜上离子通道的存在，阐释单个离子通道的功能。膜片钳技术为从分子水平上研究离子通道提供直接手段。两位科学家也因为发明膜片钳技术获得 1991 年诺贝尔生理学或医学奖。

1990年，美国科学家 P. Agre 通过细胞对比实验发现并描述了第一个水通道蛋白质。1998年，美国科学家 Mackinnon (2003年诺贝尔化学奖获得者)从链霉菌中获得了第一个离子通道的高精度结构 (KcsA)，首次在原子水平上解释了离子通道功能结构及机制。

这一时期是生物膜离子通道的飞跃发展时期，随着膜片钳技术的使用以及生化技术的进步，人们已经分离纯化出许多不同的通道蛋白，开始直接研究离子通道的结构与功能关系，使离子通道的研究有了飞跃发展。

(李丽 马克涛)

第二节 离子通道本质特征与分类

所谓离子通道，其实质就是细胞膜上的一种蛋白结构，其结构类似细胞内外之间的门和通道，故称离子通道。其功能是选择性让一些离子进出细胞。离子通道的主要特性有：①选择性；②开关性（可控性）；③饱和性。即不同的离子通道对不同离子的通透性有明显差别，运输速度和细胞膜上离子通道密度有关。

离子通道是一种对离子具有选择性和门控机制的孔道结构。因此根据门控机制的不同，可以把离子通道分为：①电压门控离子通道；②配体门控离子通道；③环核苷酸门控离子通道；④机械力敏感的离子通道。根据不同离子通道对离子的选择性不同，可以把离子通道分为：①钠离子通道；②钙离子通道；③钾离子通道；④ TRP 通道；⑤水通道等。详细内容见后续章节。

(李丽 张忠双)

第三节 离子通道的实验研究方法

一、电生理学研究方法

(一) 电压固定技术

1949-1952年，Hodgkin 和 Huxley 发明了“电压固定技术”。电压固定

(Voltage-clamp) 技术的原理是用负反馈的电子线路将膜电位固定在实验所希望的一定值上, 同时测量膜电流的变化, 以电压与电流之比求出膜电导的变化。这项技术发明为离子通道的通透性研究提供了技术条件。同时成为可兴奋细胞膜电生理研究的基本手段与分析方法。Hodgkin 和 Huxley 也因用此技术在乌贼神经轴突上测得了离子流, 获得 1963 年诺贝尔生理学或医学奖。

(二) 膜片钳技术

1976 年德国细胞生理学家 Neher 和 Sakmann 独创了“膜片钳技术”。膜片钳 (Patch clamp) 技术的原理是利用负反馈电子线路, 通过微电极与细胞之间形成紧密接触的方法, 将微电极尖端所吸附的一个至几个平方微米的细胞膜的电位固定在一定水平上, 对通过离子通道的微小离子电流作动态或静态观察, 从而研究其功能。这项技术的发明为研究离子单通道的门控动力学特征及通透性、选择性膜信息提供了最直接的手段。膜片钳技术的创立取代了电压钳技术, 是细胞电生理研究的一个飞跃, 使得离子通道的研究, 从宏观深入到微观。Neher 和 Sakmann 也因膜片钳技术的发明获得了 1991 年度诺贝尔生理学或医学奖。膜片钳技术是目前应用最广泛的研究离子通道的有效实验方法。近年来, 膜片钳技术与现代分子生物学实验技术结合起来研究单个的生物细胞已取得了新的进展。

(三) 全自动膜片钳技术

传统膜片钳技术每次只能记录一个细胞 (或一对细胞), 这对于药物开发初期和中期的大量化合物筛选来说是一项耗时耗力的工作, 同时它也不适合需要记录大量细胞的基础实验研究。因此科研人员进行研究创新后发展了全新的应用于药物筛选的全自动膜片钳技术。这种全自动膜片钳技术通量高, 一次能记录几个甚至几十个细胞, 而且从找细胞、形成封接、破膜等整个实验操作实现了自动化, 免除了这些操作的复杂与困难, 工作效率大大提高。目前全自动膜片钳技术已经广泛的用于药物筛选。

(四) 穿孔膜片钳技术

膜片钳技术有着众多优势, 但在实验中仍然会有不可避免的缺陷, 那么如何减少对细胞的损伤, 克服机械稳定性差, 从而更准确的记录离子通道电流? 1988 年 Horn 等对传统全细胞记录进行了改进, 建立了穿孔膜片钳技术 (Perforated patch clamp technique)。这种新技术是利用某些抗生素具有在生物膜上形成通透性孔道的性质, 将这类抗生素充灌在电极液中, 在高阻封接形成之后自发性形成的全细胞模式。穿孔膜片钳技术可以更有效真实的反应通道电流的电生理特性, 因此在对离子通道电流的研究中应用越来越广泛。但这种技术也有它自身的缺陷, 它对离子选择性的分子基础目前尚不清楚, 在记录全细胞电流的过程中可能出现再封口, 从而影响实验结果。

二、分子生物学研究方法

(一) 聚合酶链式反应

聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction), 简称 PCR, 是一种分子生物学技术, 由美国珀金-埃尔默公司的 Dr. Mullis 于 1983 年发明, PCR 技术利用 DNA 双链复制的原理, 将一条 DNA 序列不断加以复制, 使其数量以几何级数方式增加, 就可用来做定性的分析及各式各样的应用。并利用 DNA 聚合酶对特定基因做体外或试管内的大量合成。目前常用的技术, 可以将一段基因复制为原来的一百亿至一千亿倍。PCR 技术的发明有着跨时代的意义, 是生物医学领域中的一项革命性创举和里程碑。目前这项技术在生物科学研究和临床诊疗中得以广泛应用, 成为分子生物学研究的最重要技术。Mullis 也因此获得了 1993 年诺贝尔化学奖。

(二) 转基因技术

转基因技术是将人工分离和修饰过的基因导入到生物体基因组中, 由于导入基因的表达, 引起生物体性状的可遗传的修饰, 这一技术称之为转基因技术 (Transgene technology)。人们常说的“遗传工程”、“基因工程”、“遗传转化”均为转基因的同义词。经转基因技术修饰的生物体在媒体上常被称为“遗传修饰过的生物体” (Genetically modified organism, 简称 GMO)。

1974 年, 波兰遗传学家斯吉巴爾斯基 (Waclaw Szybalski) 称基因重组技术为合成生物学概念, 1978 年, 诺贝尔生理学或医学奖颁给发现 DNA 限制酶的纳森斯 (Daniel Nathans)、亚伯 (Werner Arber) 与史密斯 (Hamilton Smith) 时, 斯吉巴爾斯基在《基因》期刊中写道: 限制酶将带领我们进入合成生物学的新时代。转基因技术, 包括外源基因的克隆、表达载体、受体细胞, 以及转基因途径等, 外源基因的人工合成技术、基因调控网络的人工设计发展, 导致了 21 世纪的转基因技术将走向转基因系统生物技术 2000 年国际上重新提出合成生物学概念, 并定义为基于系统生物学原理的基因工程与转基因技术。

三、蛋白质结晶与 X 射线衍射技术

生物大分子单晶体的 X 射线衍射技术是 20 世纪 50 年代以后建立的, 首先从蛋白质的晶体结构研究中发展起来的, 并于 20 世纪 70 年代形成一门晶体学的分支学科。X 射线衍射技术能够精确测定原子在晶体中的空间位置, 是迄今研究生物大分子结构的主要技术。获得具有高分辨率的蛋白质晶体是目前蛋白质结构测定的主要瓶颈。蛋白质结晶受很多因素影响, 可以说, 蛋白质的内在特性在某种程度上决定了其能否结晶以及所得晶体分辨率的高低。近年来分子生物学尤其是蛋白质工程的应用有效地提高蛋白质的溶解度、均一性及可结晶性等内在特性, 促进蛋白质的结晶, 成为提高蛋白质结晶能力和蛋白质晶体分辨率的有效途径。

四、核磁共振技术

核磁共振 (Nuclear magnetic resonance, NMR) 是继 CT 后医学影像学的又一重大进步。自 20 世纪 80 年代应用以来, 它以极快的速度得到发展。磁矩是由许多原子核所具有的内部角动量或自旋引起的, 自 1940 年以来研究磁矩的技术已得到了发展。物理学家正在从事的核理论的基础研究为这一工作奠定了基础。1933 年, G·O·斯特恩 (Stern) 和 I·埃斯特曼 (Estermann) 对核粒子的磁矩进行了第一次粗略测定。美国哥伦比亚的 I·I·拉比 (Rabi 生于 1898 年) 的实验室在这个领域的研究中获得了进展。这些研究对核理论的发展起了很大的作用。

当受到强磁场加速的原子束加以一个已知频率的弱振荡磁场时原子核就要吸收某些频率的能量, 同时跃迁到较高的磁场亚层中。通过测定原子束在频率逐渐变化的磁场中的强度, 就可测定原子核吸收频率的大小。这种技术起初被用于气体物质, 后来通过斯坦福的 F·布洛赫 (Bloch 生于 1905 年) 和哈佛大学的 E·M·珀塞尔 (Puccell 生于 1912 年) 的工作扩大应用到液体和固体。布洛赫小组第一次测定了水中质子的共振吸收, 而珀塞尔小组第一次测定了固态链烷烃中质子的共振吸收。自从 1946 年进行这些研究以来, 这个领域已经迅速得到了发展。物理学家利用这门技术研究原子核的性质, 同时化学家利用它进行化学反应过程中的鉴定和分析工作, 以及研究络合物、受阻转动和固体缺陷等方面。1949 年, W·D·奈特证实, 在外加磁场中某个原子核的共振频率有时由该原子的化学形式决定。比如, 可看到乙醇中的质子显示三个独立的峰, 分别对应于 CH_3 、 CH_2 和 OH 键中的几个质子。这种所谓化学位移是与价电子对外加磁场所起的屏蔽效应有关。

特别是天然产物结构的阐明中起着极为重要的作用。目前, 利用化学位移、裂分常数、 H-H Cosy 谱等来获得有机物的结构信息已成为常规测试手段。近 20 年来核磁共振技术在谱仪性能和测量方法上有了巨大的进步。在谱仪硬件方面, 由于超导技术的发展, 磁体的磁场强度平均每 5 年提高 1.5 倍, 到 20 世纪 80 年代末 600 兆周的谱仪已开始实用, 由于各种先进而复杂的射频技术的发展, 核磁共振的激励和检测技术有了很大的提高。

此外, 随着计算机技术的发展, 不仅能对激发核共振的脉冲序列和数据采集作严格而精细的控制, 而且能对得到的大量的数据作各种复杂的变换和处理。在谱仪的软件方面最突出的技术进步就是二维核磁共振 (2D-NMR) 方法的发展。它从根本上改变了 NMR 技术用于解决复杂结构问题的方式, 大大提高了 NMR 技术所提供的关于分子结构信息的质和量, 使 NMR 技术成为解决复杂结构问题的最重要的物理方法。

(李丽 司军强)