

第一章 绪论

●细胞生物学研究的内容和现状

- ◆ 细胞生物学是现代生命科学的重要基础学科
- ◆ 细胞生物学的主要研究内容
- ◆ 当前细胞生物学研究的总趋势与重点领域
- ◆ 细胞重大生命活动的相互关系

●细胞学与细胞生物学发展简史

- ◆ 细胞的发现
- ◆ 细胞学说的建立其意义
- ◆ 细胞学的经典时期
- ◆ 实验细胞学与细胞学的分支及其发展
- ◆ 细胞生物学学科的形成与发展
- ◆ 细胞生物学的主要学术组织、学术刊物与教科书

细胞生物学

- ◆ 生命体是多层次、非线性、多侧面的复杂结构体系，而细胞是生命体的结构与生命活动的基本单位，有了细胞才有完整生命活动。
- ◆ 细胞生物学是研究细胞基本生命活动规律的科学，它是在不同层次（显微、亚显微与分子水平）上以研究细胞结构与功能、细胞增殖、分化、衰老与凋亡、细胞信号传递、真核细胞基因表达与调控、细胞起源与进化等为主要内容。核心问题是将遗传与发育在细胞水平上结合起来。

主要内容

细胞结构与功能、细胞重要生命活动：

- ◆细胞核、染色体以及基因表达的研究
- ◆生物膜与细胞器的研究
- ◆细胞骨架体系的研究
- ◆细胞增殖及其调控
- ◆细胞分化及其调控
- ◆细胞的衰老与凋亡
- ◆细胞的起源与进化
- ◆细胞工程

总趋势

- 细胞生物学与分子生物学(包括分子遗传学与生物化学)相互渗透与交融是总的发展趋势。

重点领域

- ◆ 染色体DNA与蛋白质相互作用关系
 - 主要是非组蛋白对基因组的作用
 - ◆ 细胞增殖、分化、凋亡的相互关系及其调控
 - ◆ 细胞信号转导的研究
- ◆ 细胞结构体系的组装

美国科学情报研究所（ISI）1997年SCI（Science Citation Index）收录及引用论文检索，全世界自然科学研究中论文发表最集中的三个领域分别是：

- ◆ 细胞信号转导（signal transduction）；
- ◆ 细胞凋亡（cell apoptosis）；
- ◆ 基因组与后基因组学研究（genome and post-genomic analysis）。

美国国立卫生研究院（NIH）在1988年底发表的一份题为《什么是当今科研领域的热门话题？》（“What is popular in research today?”）的调查报告中指出，目前全球研究最热门的是

- ◆ 三种疾病：
 - ◆ 癌症（cancer）
 - ◆ 心血管病（cardiovascular diseases）
 - ◆ 爱滋病和肝炎等传染病
（infectious diseases: AIDS, hepatitis）
- ◆ 五大研究方向：
 - ◆ 细胞周期调控（cell cycle control）；
 - ◆ 细胞凋亡（cell apoptosis）；
 - ◆ 细胞衰老（cellular senescence）；
 - ◆ 信号转导（signal transduction）；
 - ◆ DNA的损伤与修复（DNA damage and repair）

“细胞学说”的基本内容

- ◆ 认为细胞是有机体，一切动植物都是由细胞发育而来，并由细胞和细胞产物所构成；
- ◆ 每个细胞作为一个相对独立的单位，既有它“自己的”生命，又对与其它细胞共同组成的整体的生命有所助益；
- ◆ 新的细胞可以通过老的细胞繁殖产生。

Alberts B *et al.* **Essential Cell Biology**. New York and London: Garland publishing, Inc. 1998

Alberts B *et al.* **Molecular Biology of the Cell, 3rd ed.** New York and London: Garland Publishing, Inc. 1994

Becker W.M. *et al.* **The World of the Cell**. Fourth Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company. 2000

Gerald Karp. **Cell and Molecular Biology: concepts and experiments**, 2nd Edition. Published by John Wiley & Sons, Inc. 1999

Lodish H. *et al.* **Molecular Cell Biology**. 4th Ed. Scientific American Books, Inc. 2000.

学习细胞生物学的注意点

- * 抽象思维与动态观点
- * 结构与功能统一的观点
- * 同一性(unity)和多样性(diversity)的问题
- * 细胞生物学的主要内容：
 - 基本概念与实验证据；细胞器的动态特征；
 - 化学能的产生与利用；细胞的活动及其调控等
- * 实验科学与实验技术——细胞真知源于实验室
——What we know//How we know.

第二章 细胞基本知识概要

- 细胞的基本概念

- 非细胞形态的生命体
——病毒及其与细胞的关系

- 原核细胞与真核细胞

第一节 细胞的基本概念

- 细胞是生命活动的基本单位
- 细胞概念的一些新思考
- 细胞的基本共性

第二节 非细胞形态的生命体 —病毒及其与细胞的关系

- 病毒的基本知识
- 病毒在细胞内增殖（复制）
- 病毒与细胞在起源与进化中的关系

第三节 原核细胞与真核细胞

- 原核细胞（Prokaryotic cell）
- 真核细胞（Eukaryotic cell）
- 古细菌（Archaeobacteria）

细胞是生命活动的基本单位

- 一切有机体都由细胞构成，细胞是构成有机体的基本单位
- 细胞具有独立的、有序的自控代谢体系，
细胞是代谢与功能的基本单位
- 细胞是有机体生长与发育的基础
- 细胞是遗传的基本单位，细胞具有遗传的全能性
- 没有细胞就没有完整的生命

细胞概念的一些新思考

- 细胞是多层次非线性的复杂结构体系
 - ◆细胞具有高度复杂性和组织性
- 细胞是物质（结构）、能量与信息过程精巧结合的综合体

- ◆细胞完成各种化学反应；
- ◆细胞需要和利用能量；
- ◆细胞参与大量机械活动；
- ◆细胞对刺激作出反应；
- 细胞是高度有序的，具有自组装能力与自组织体系。
 - ◆细胞能进行自我调控；
 - ◆繁殖和传留后代；

细胞的基本共性

- ◆所有的细胞表面均有由磷脂双分子层与镶嵌蛋白质构成的生物膜，即细胞膜。
- ◆所有的细胞都含有两种核酸：即DNA与RNA作为遗传信息复制与转录的载体。
- ◆作为蛋白质合成的机器—核糖体，毫无例外地存在于一切细胞内。
- ◆所有细胞的增殖都以一分为二的方式进行分裂。

病毒的基本知识

- 病毒（virus）——核酸分子（DNA或RNA）与蛋白质构成的核酸-蛋白质复合体；
根据病毒的核酸类型可以将其分为两大类：
 - ◆ DNA病毒与RNA病毒
 - ◆ 病毒的多样性）
- 类病毒（viroid）——仅由感染性的RNA构成；
- 朊病毒（prion）——仅由感染性的蛋白质亚基构成；

成

病毒在细胞内增殖（复制）

- 病毒侵入细胞，病毒核酸的侵染
- 病毒核酸的复制、转录与蛋白质的合成
- 病毒的装配、成熟与释放

病毒与细胞在起源与进化中的关系

病毒是非细胞形态的生命体，它的主要生命活动必须要在细胞内实现。病毒与细胞在起源上的关系，目前存在3种主要观点：

- ◆生物大分子→病毒→细胞
病毒
- ◆生物大分子

细胞

- ◆生物大分子→细胞→病毒

原核细胞

基本特点:

- ◆遗传的信息量小，遗传信息载体仅由一个环状DNA构成；细胞内没有分化为以膜为基础的具有专门结构与功能的细胞器和细胞核膜。

主要代表:

- ◆支原体（mycoplast）——目前发现的最小最简单的细胞；
 - ◆细菌
 - ◆蓝藻又称蓝细菌（Cyanobacteria）

真核细胞

- 真核细胞的基本结构体系
- 细胞的大小及其分析
- 原核细胞与真核细胞的比较

真核细胞的基本结构体系

- ◆以脂质及蛋白质成分为基础的生物膜结构系统；
- ◆以核酸（DNA或RNA）与蛋白质为主要成分的遗传信息表达系统
- ◆由特异蛋白分子装配构成的细胞骨架系统。

细胞的大小及其分析

各类细胞直径的比较

原核细胞与真核细胞的比较

- ◆原核细胞与真核细胞基本特征的比较
- ◆原核细胞与真核细胞的遗传结构装置和基因表达的比较

◆植物细胞与动物细胞的比较

植物细胞与动物细胞的比较

●细胞壁

●液泡

●叶绿体

古细菌

古细菌 (archaeobacteria) 与真核细胞曾在进化上有过共同历程

●主要证据

●进化系统树

主要证据

- (1) 细胞壁的成分与真核细胞一样，而非由含壁酸的肽聚糖构成，因此抑制壁酸合成的链霉素，抑制肽聚糖前体合成的环丝氨酸，抑制肽聚糖合成的青霉素与万古霉素等对真细菌类有强的抑制生长作用，而对古细菌与真核细胞却无作用。
- (2) DNA与基因结构：古细菌DNA中有重复序列的存在。此外，多数古核细胞的基因组中存在内含子。
- (3) 有类核小体结构：古细菌具有组蛋白，而且能与DNA构建成类似核小体结构。
- (4) 有类似真核细胞的核糖体：多数古细菌类的核糖体较真细菌有增大趋势，含有60种以上蛋白，介于真核细胞（70~84）与真细菌（55）之间。抗生素同样不能抑制古核细胞类的核糖体的蛋白质合成。
- (5) 5S rRNA：根据对5S rRNA的分子进化分析，认为古细菌与真核生物同属一类，而真细菌却与之差距甚远。5S rRNA二级结构的研究也说明很多古细菌与真核生物相似。

除上述各点外，根据DNA聚合酶分析，氨基酰tRNA合成酶的作用，起始氨基酰tRNA与肽链延长因子等分析，也提供了以

上类似依据，说明古细菌与真核生物在进化上的关系较真细菌类更为密切。因此近年来，真核细胞起源于古细菌的观点得到了加强。

第三章 细胞生物学研究方法

如何学习细胞生物学？

- * 抽象思维与动态观点
- * 结构与功能统一的观点
- * 同一性(unity)和多样性(diversity)的问题
- * 细胞生物学的主要内容：
 - 结构与功能（动态特征）；
 - 细胞的生命活动；
- * 实验科学与实验技术——细胞真知源于实验室
——**What we know//How we know.**

第三章 细胞生物学研究方法

- 细胞形态结构的观察方法
- 细胞组分的分析方法
- 细胞培养、细胞工程与显微操作技术

第一节 细胞形态结构的观察方法

- 光学显微镜技术（light microscopy）
- 电子显微镜技术（Electro microscopy）
- 扫描探针显微镜（Scanning Probe Microscope）
扫描隧道显微镜（scanning tunneling microscope）

第二节 细胞组分的分析方法

- 离心分离技术

- 细胞内核酸、蛋白质、酶、糖与脂类等的显示方法
- 特异蛋白抗原的定位与定性
- 细胞内特异核酸的定位与定性
- 放射自显影技术
- 定量细胞化学分析技术

第三节 细胞培养、细胞工程与显微操作技术

●细胞的培养

●细胞工程

一、光学显微镜技术 (light microscopy)

- 普通复式光学显微镜技术
- 荧光显微镜技术 (Fluorescence Microscopy)
- 激光共焦扫描显微镜技术 (Laser Confocal Microscopy)
- 相差显微镜 (phase-contrast microscope)
- 微分干涉显微镜
(differential interference contrast microscope, DIC)
- 录像增差显微镜技术 (video-enhance microscopy)

二、电子显微镜技术

- 电子显微镜的基本知识
 - ◆电镜与光镜的比较
 - ◆电镜与光镜光路图比较
 - ◆电子显微镜的基本构造
- 主要电镜制样技术
 - ◆负染色技术
 - ◆冰冻蚀刻技术
 - ◆超薄切片技术
 - ◆电镜三维重构技术
- 扫描电镜 (Scanning electron microscope, SEM)
SPM(Scanning probe microscope)

三、扫描隧道显微镜

◆Scanning Probe Microscope, SPM

(80年代发展起来的检测样品微观结构的仪器)

包括：STM、AFM、磁力显微镜、摩擦力显微镜等

原理：扫描探针与样品接触或达到很近距离时，即产生彼此间相互

作用力，如

量子力学中的隧道效应（隧道电流）、原子间作用力、磁力、摩擦力等，

并在计算机显示出来，从而反映出样品表面形貌信息、电特性或磁特性等。

- ◆装置：扫描的压电陶瓷，逼近装置，电子学反馈控制系统和数据采集、处理、显示系统。
- ◆特点：（1）可对晶体或非晶体成像，无需复杂计算，且分辨本领高。
（侧分辨率为0.1~0.2nm，纵分辨率可达0.01nm）；
（2）可实时得到样品表面三维图象，可测量厚度信息；
（3）可在真空、大气、液体等多种条件下工作；非破坏性测量。
（4）可连续成像，进行动态观察
- ◆用途：纳米生物学研究领域中的重要工具，在原子水平上揭示样本表面的结构。

普通复式光学显微镜技术

光镜样本制作

分辨率是指区分两个质点间的最小距离

荧光显微镜技术（Fluorescence Microscopy）

●原理与应用

- ◆直接荧光标记技术
- ◆间接免疫荧光标记技术
- ◆在光镜水平用于特异蛋白质等生物大分子的定性定位：
如绿色荧光蛋白(GFP)的应用

激光共焦扫描显微镜技术

(Laser Scanning Confocal Microscopy)

◆原理

◆应用：

排除焦平面以外光的干扰，增强
图像反差和提高分辨率(1.4—1.7)，
可重构样品的三维结构。

◆相差显微镜 (phase-contrast microscope)

将光程差或相位差转换成振幅差，可用于观察活细胞

◆微分干涉显微镜 (differential-interference microscope)

偏振光经合成后，使样品中厚度上的微小区别转化成
明暗区别，增加了样品反差且具有立体感。适于研究
活细胞中较大的细胞器

◆录像增差显微镜技术 (video-enhance microscopy)

计算机辅助的DIC显微镜可在高分辨率
下研究活

细胞中的颗粒及细胞器的运动

电镜与光镜的比较

主要电镜制样技术

● 超薄切片技术 用于电镜观察的样本制备示意图

● 负染色技术 (Negative staining) 与金属投影

染色背景，衬托出样品的精细结构

● 冰冻蚀刻技术 (Freeze etching) (技术示意图)

冰冻断裂与蚀刻复型：主要用来观察膜断裂面的蛋白质
颗粒

和膜表面结构。

快速冷冻深度蚀刻技术 (quick freeze deep etching)

● 电镜三维重构技术

电子显微术、电子衍射与计算机图象处理相结合而形成的
具有重要应用前景的一门新技术。

电镜三维重构技术与X-射线晶体衍射技术及核磁共振

分析技术相结合,是当前结构生物学(Structural Biology)——主要研究生物大分子空间结构及其相互关系的主要实验手段。

扫描电镜

- 原理与应用:
- 电子“探针”扫描,激发样品表面放出二次电子,探测器收集二次电子成象。
- CO₂临界点干燥法防止引起样品变形的表面张力问题

一、离心分离技术

- 用途: 于分离细胞器与生物大分子及其复合物
- 差速离心: 分离密度不同的细胞组分
- 密度梯度离心: 精细组分或生物大分子的分离

二、细胞内核酸、蛋白质、酶、糖与脂类等的显示方法

- 原理: 利用一些显色剂与所检测物质中一些特殊基团特异性结合的特征,通过显色剂在细胞中的定位及颜色的深浅来判断某种物质在细胞中的分布和含量。

Feulgen Staining

三、特异蛋白抗原的定位与定性

- ◆免疫酶标技术
- ◆免疫胶体金 ●免疫荧光技术:
快速、灵敏、有特异性,但其分辨率有限 (图)
- 蛋白电泳(SDS-PAGE)
与免疫印迹反应(Western-Blot)

●免疫电镜技术：

◆免疫铁蛋白技术
技术

应用：通过对分泌蛋白的定位，可以确定某种蛋白的分泌动态；
胞内酶的研究；膜蛋白的定位与骨架蛋白的定位等

四、细胞内特异核酸的定位与定性

◆光镜水平的原位杂交技术

（同位素标记或荧光素标记的探针）

◆电镜水平的原位杂交技术

（生物素标记的探针与抗生物素抗体相连的胶体金标记结合）

◆PCR技术

五、放射自显影技术

●原理及应用：

◆利用同位素的放射自显影，对细胞内生物大分子进行定性、定位与半定量研究；

◆实现对细胞内生物大分子进行动态和追踪研究。

●步骤：

◆前体物掺入细胞（标记：持续标记和脉冲标记）
——放射自显影

六、定量细胞化学分析技术

●细胞显微分光光度术（Microspectrophotometry）

◆利用细胞内某些物质对特异光谱的吸收，测定这些物质（如核酸与蛋白质等）在细胞内的含量。

包括：

紫外光显微分光光度测定法

可见光显微分光光度测定法

●流式细胞仪（Flow Cytometry）

◆主要应用：

用于定量测定细胞中的DNA、RNA或某一特异蛋白的含量；

测定细胞群体中不同时相细胞的数量；

从细胞群体中分离某些特异染色的细胞；

分离DNA含量不同的中期染色体。

一、细胞的培养

●动物细胞培养

- ◆ 类型：原代培养细胞 (primary culture cell)
继代培养细胞 (sub-culture cell)
 - ◆ 细胞株 (cell strain) 正常二倍体，接触抑制
 - ◆ 细胞系 (cell line) 亚二倍体，接触抑制丧失

●植物细胞

- ◆类型： 原生质体培养 (体细胞培养)
单倍体细胞培养 (花药培养)
- 非细胞体系 (cell-free system)

二、细胞工程

●细胞融合 (cell fusion) 与细胞杂交 (cell hybridization) 技术

●单克隆抗体 (monoclonal antibody) 技术 图

●细胞拆合与显微操作技术

- ◆物理法结合显微操作技术(图1、图2)
- ◆化学法结合离心技术
- ◆制备核体 (karyoplast) 和胞质体 (cytoplast)。

●其它技术

遗传分析 (mutant, knock out, knock in)

对细胞生命活动的研究成为当今生命科学发展的瓶颈

对细胞生命活动的研究成为当今生命科学发展的瓶颈

第四章 细胞质膜与细胞表面

●细胞质膜与细胞表面特化结构

●细胞连接

●细胞外被与细胞外基质

第一节 细胞质膜与细胞表面特化结构

细胞质膜(plasma membrane), 又称细胞膜(cell membrane)。

细胞内膜(intracellular membrane); 生物膜(biomembrane)

- 细胞质膜的结构模型
- 膜脂—生物膜的基本组成成分
- 膜蛋白
- 确定膜蛋白方向的实验程序
- 光脱色恢复技术
- 分子生物学技术在膜蛋白研究上的应用
- 生物膜结构特征
- 细胞质膜的功能
- 膜骨架与细胞表面的特化结构

第二节 细胞连接

- 细胞连接的功能分类
- 封闭连接
- 锚定连接
- 通讯连接
- 细胞表面的粘连分子

一、胞质膜的结构模型

- 研究简史
- 结构模型
- 生物膜结构

结构模型

- ◆ E. Gorter和F. Grendel (1925) :
“蛋白质-脂类-蛋白质”三夹板质膜结构模型
- ◆ J. D. Robertson (1959年) :
单位膜模型(unit membrane model)
- ◆ S. J. Singer和G. Nicolson (1972) :
生物膜的流动镶嵌模型(fluid mosaic model)
- ◆ K. Simons et al(1997): 脂筏模型(lipid rafts model)
Functional rafts in Cell membranes. Nature 387:569-572

生物膜结构

- ◆ 磷脂双分子层是组成生物膜的基本结构成分，尚未发现膜结构中起组织作用的蛋白；
- ◆ 蛋白分子以不同方式镶嵌在脂双层分子中或结合在其表面，膜蛋白是赋予生物膜功能的主要决定者；
- ◆ 生物膜是磷脂双分子层嵌有蛋白质的二维流体。

“Central dogma” of membrane biology

膜的流动性

◆ 磷脂的流动性

磷脂的流动性主要由脂分子本身的性质决定的，脂肪酸链越短，不饱和程度越高，膜的流动性越大。温度对膜脂的运动有明显的影
响。在细菌和动物细胞中常通过增加不饱和脂肪酸的含量来调节膜脂的相变温度以维持膜的流动性。在动物细胞中，胆固醇对膜的流动性起重要的双向调节作用。

◆ 膜蛋白的流动

荧光抗体免疫标记实验

成斑现象 (patching) 或成帽现象 (capping)

- ◆ 膜的流动性受多种因素影响；细胞骨架不但影响膜蛋白的运动，也影响其周围的膜脂的流动。膜蛋白与膜脂分子的相互作用也是影响膜流动性的重要因素

膜的不对称性

◆ 细胞质膜各部分的名称

◆ 膜脂与糖脂的不对称性

糖脂仅存在于质膜的ES面，是完成其生理功能的结构基础

◆ 膜蛋白与糖蛋白的不对称性

膜蛋白的不对称性是指每种膜蛋白分子在细胞膜上都具有明确的方向性；

糖蛋白糖残基均分布在质膜的ES面 ($GO+^3HBH_4$ labeling)；

膜蛋白的不对称性是生物膜完成复杂的在时间与空间上有序的各种生理功能的保证。

二、膜脂——生物膜的基本组成成分

- 成分：膜脂主要包括磷脂、糖脂和胆固醇三种类型。

- 膜脂的 4 种热运动方式

- 脂质体 (liposome)

膜脂成分

- ◆磷脂：膜脂的基本成分（50%以上）
 - ◆分为二类：甘油磷脂和鞘磷脂
 - ◆主要特征：①具有一个极性头和两个非极性的尾（脂肪酸链）（心磷脂除外）；②脂肪酸碳链碳原子为偶数，多数碳链由16, 18或20个组成；③饱和脂肪酸（如软脂酸）及不饱和脂肪酸（如油酸）；
- ◆糖脂：糖脂普遍存在于原核和真核细胞的质膜上（5%以下），神经细胞糖脂含量较高；
- ◆胆固醇：胆固醇存在于真核细胞膜上（30%以下），细菌质膜不含有胆固醇，但某些细菌的膜脂中含有甘油酯等中性脂类。

运动方式

- ◆沿膜平面的侧向运动（基本运动方式），其扩散系数为 10^{-8} cm²/s；
- ◆脂分子围绕轴心的自旋运动；
- ◆脂分子尾部的摆动；
- ◆双层脂分子之间的翻转运动，发生频率还不到脂分子侧向交换频率的 10^{-10} 。但在内质网膜上，新合成的磷脂分子翻转运动发生频率很高。

脂质体（liposome）

脂质体是根据磷脂分子可在水相中形成稳定的脂双层膜的趋势而制备的人工膜。

◆脂质体的类型。

◆脂质体的应用

脂质体的应用

- ◆研究膜脂与膜蛋白及其生物学性质；
- ◆脂质体中裹入DNA可用于基因转移；
- ◆在临床治疗中，脂质体作为药物或酶等载体

三、膜蛋白

●基本类型

●内在膜蛋白与膜脂结合的方式

●外在膜蛋白与膜脂结合的方式

●去垢剂(detergent)

◆外在(外周)膜蛋白

(extrinsic/peripheral membrane proteins);

◆水溶性蛋白, 靠离子键或其它弱键与膜内表面的蛋白质分子或脂分子极性头部非共价结合, 易分离。

◆内在(整合)膜蛋白

(intrinsic/ integral membrane proteins)。

◆水不溶性蛋白, 形成跨膜螺旋, 与膜结合紧密, 需用去垢剂使膜崩解后才可分离。

◆脂质锚定蛋白 (lipid-anchored proteins)

◆通过磷脂或脂肪酸锚定, 共价结合。

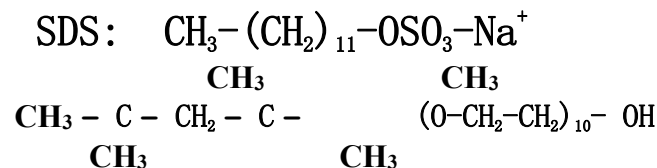
◆膜蛋白的跨膜结构域与脂双层分子的疏水核心的相互作用。

◆跨膜结构域两端携带正电荷的氨基酸残基与磷脂分子带负电的极性头形成离子键, 或带负电的氨基酸残基通过 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等阳离子与带负电的磷脂极性头相互作用。

◆某些膜蛋白在细胞质基质一侧的半胱氨酸残基上共价结合脂肪酸分子, 插入脂双层之间, 进一步加强膜蛋白与脂双层的结合力, 还有少数蛋白与糖脂共价结合。

◆去垢剂是一端亲水、另一端疏水的两性小分子, 是分离与研究膜蛋白的常用试剂。

◆离子型去垢剂(SDS)和非离子型去垢剂 (Triton X-100)



四、确定膜蛋白方向的实验程序

● 胰酶消化法

● 同位素标记法

五、光脱色恢复技术

(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)

● 研究膜蛋白或膜脂流动性的基本实验技术之一。

- 程序：
根据荧光恢复的速度可推算出
膜蛋白或膜脂扩散速度。

- ◆膜的流动性：生物膜的基本特征之一，
细胞进行生命活动的必要条件。

- ◆膜的不对称性

- ◆膜的分相现象。

七、细胞质膜的功能

- 为细胞的生命活动提供相对稳定的内环境；
- 选择性的物质运输, 包括代谢底物的输入与代谢产物的排除, 其中伴随着能量的传递；
- 提供细胞识别位点, 并完成细胞内外信息跨膜传递；
- 为多种酶提供结合位点, 使酶促反应高效而有序地进行；
- 介导细胞与细胞、细胞与基质之间的连接；
- 质膜参与形成具有不同功能的细胞表面特化结构。

八、膜骨架与细胞表面的特化结构

细胞质膜常常与膜下结构(主要是细胞骨架系统)相互联系, 协同作用, 并形成细胞表面的某些特化结构以完成特定的功能。

●膜骨架

- ◆膜骨架的概念

- ◆指细胞质膜下与膜蛋白相连的由纤维蛋白组成的网架结构, 它参与维持细胞质膜的形状并协助质膜完成多种生理功能。

●红细胞的生物学特性

- ◆膜骨架赋予红细胞质膜既有很好的弹性又具有较高强度。

●红细胞质膜蛋白及膜骨架

红细胞质膜蛋白及膜骨架

◆红细胞质膜蛋白的SDS-PAGE

◆红细胞膜骨架的结构

一、细胞连接的功能分类

- 封闭连接(occluding junctions)
 - ◆紧密连接(tight junction)
- 锚定连接(anchoring junctions)
- 通讯连接(communicating junctions)
 - ◆间隙连接(gap junction)；

- ◆神经细胞间的化学突触(chemical synapse);
- ◆植物细胞中的胞间连丝(plasmodesmata)。

锚定连接(anchoring junctions)

- ◆与中间纤维相关的锚定连接：
 - ◆桥粒(desmosome)
 - ◆半桥粒(hemidesmosome);
- ◆与肌动蛋白纤维相关的锚定连接：
 - ◆粘合带(adhesion belt);
 - ◆粘合斑(focal adhesion)

二、封闭连接

- 紧密连接是封闭连接的主要形式，存在于上皮细胞之间
- 紧密连接的结构
- 紧密连接的功能
 - ◆形成渗漏屏障，起重要的封闭作用；
 - ◆隔离作用，使游离端与基底面质膜上的膜蛋白行使各自不同的膜功能；
 - ◆支持功能
- 紧密连接嵴线中的两类蛋白：
 - ◆封闭蛋白(occludin)，跨膜四次的膜蛋白(60KD)；
 - ◆claudin蛋白家族(现已发现15种以上)

三、锚定连接

- 锚定连接在组织内分布很广泛，在上皮组织，心肌和子宫颈等组织中含量尤为丰富
- 锚定连接的类型、结构与功能
- 锚定连接的结构组成

锚定连接的类型、结构与功能

- ◆与中间纤维相连的锚定连接
 - ◆**桥粒**：铆接相邻细胞，提供细胞内中间纤维的锚定位点，形成整体网络，起支持和抵抗外界压力与张力的作用。
 - ◆**半桥粒**：半桥粒与桥粒形态类似，但功能和化学组成不同。它通过细胞质膜上的膜蛋白整合素将上皮细胞固着在基底膜上，在半桥粒中，中间纤维不是穿过而是终止于半桥粒的致密斑内。
- ◆与肌动蛋白纤维相连的锚定连接
 - ◆**粘 合 带**：
由桥粒蛋白家族成员组成，位于桥粒下方，与肌动蛋白纤维相连。其厚度约为20nm，由肌动蛋白纤维和整合素蛋白组成。整合素蛋白通过其胞外域与细胞外基质相连，通过其胞内域与肌动蛋白纤维相连。整合素蛋白的胞内域与肌动蛋白纤维相连的方式：
细胞通过肌动蛋白纤维和整合素蛋白与细胞外基质之间的连接方式。

锚定连接的结构组成

- 通过锚定连接将相邻细胞的骨架系统或将细胞与基质相连形

成一个坚挺、有序的细胞群体。锚定连接具有两种不同形式:

- ◆与中间纤维相连的锚定连接主要包括桥粒和半桥粒;
- ◆与肌动蛋白纤维相连的锚定连接主要包括粘合带与粘合斑。

●构成锚定连接的蛋白可分成两类:

- ◆细胞内附着蛋白(attachment proteins),将特定的细胞骨架成分(中间纤维或微丝)同连接复合体结合在一起 (desmoplakin)
- ◆跨膜连接的糖蛋白,其细胞内的部分与附着蛋白相连,细胞外的部分与相邻细胞的跨膜连接糖蛋白相互作用或与胞外基质相互作用。(desmoglein, desmocollin)

四、通讯连接

- 间隙连接: 分布广泛, 几乎所有的动物组织中都存在间隙连接。
- 神经细胞间的化学突触
 - ◆存在于可兴奋细胞之间的细胞连接方式, 它通过释放神经递质来传导神经冲动。
- 胞间连丝: 高等植物细胞之间通过胞间连丝相互连接,完成细胞间的通讯联络。
 - ◆胞间连丝结构
 - ◆胞间连丝的功能

间隙连接

- ◆间隙连接结构
- ◆间隙连接的蛋白成分
- ◆间隙连接的功能及其调节机制
- ◆间隙连接的通透性是可以调节的

间隙连接结构

- ◇ 间隙连接处相邻细胞质膜间的间隙为2~3nm 。
- ◇ 连接子(connexon) 是间隙连接的基本单位。
 - 每个连接子由6个connexin分子组成。
 - 连接子中心形成一个直径约1.5nm的孔道。
- ◇ 连接单位由两个连接子对接构成。

间隙连接的蛋白成分

- ◆已分离20余种构成连接子的蛋白,属同一蛋白家族,其分子量26—60KD不等;
- ◆连接子蛋白具有4个 α -螺旋的跨膜区,是该蛋白家族最保守的区域。
- ◆连接子蛋白的一级结构都比较保守,并有相似的抗原性。
- ◆不同类型细胞表达不同的连接子蛋白,间隙连接的孔径与调控机制有所不同。

间隙连接的功能及其调节机制

- ◆间隙连接在代谢偶联中的作用
 - 间隙连接允许小分子代谢物和信号分子通过,是细胞间代谢偶联的基础
 - 代谢偶联现象在体外培养细胞中的证实
 - 代谢偶联作用在协调细胞群体的生物学功能方面起重要作用。
- ◆间隙连接在神经冲动信息传递过程中的作用
 - 电突触(electronic junction)快速实现细胞间信号通讯
 - 间隙连接调节和修饰相互独立的神经元群的行为
- ◆间隙连接在早期胚胎发育和细胞分化过程中的作用
 - 胚胎发育中细胞间的偶联提供信号物质的通路,从而为某一特定细胞提供它的“位置信息”,并根据其位置影响其分化。
 - 肿瘤细胞之间间隙的连接明显减少或消失,间隙联接类似“肿瘤抑制因子”。

间隙连接的通透性是可以调节的

- ◆降低胞质中的pH值和提高自由 Ca^{2+} 的浓度都可以使其通透性降低
- ◆间隙连接的通透性受两侧电压梯度的调控及细胞外化学信号的调控

胞间连丝

- ◆胞间连丝结构
 - 相邻细胞质膜共同构成的直径20-40nm的管状结构
- ◆胞间连丝的功能
 - ◆实现细胞间由信号介导的物质有择性的转运;
 - ◆实现细胞间的电传导;
 - ◆在发育过程中,胞间连丝结构的改变可以调节植物细胞间的物质运输。

五、细胞表面的粘连分子

同种类型细胞间的彼此粘连是许多组织结构的基本特征。细胞与细胞间的粘连是由特定的细胞粘连分子所介导的。

- 粘连分子的特征与类型
 - ◆ 粘连分子均为整合膜蛋白，在胞内与细胞骨架成分相连；
 - ◆ 多数要依赖 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 才起作用。
 - ◆ 粘连分子类型及细胞间粘着方式
 - ◇ 类型
 - ◇ 粘着方式

类型

- 钙粘素 (Cadherins)
- 选择素 (Selectin)
- 免疫球蛋白超家族的CAM(Ig-Superfamily, IgSF)
- 整合素 (Integrins)
- 质膜整合蛋白聚糖也介导细胞间的粘着。

Cadherins:

属同亲性依赖 Ca^{2+} 的细胞粘连糖蛋白，介导依赖 Ca^{2+} 的细胞粘着和从ECM到细胞质传递信号。对胚胎发育中的细胞识别、迁移和组织分化以及成体组织器官构成具有主要作用。(30多个成员的糖蛋白家族)

E- Cadherins(epithelial),
N- Cadherins(neural) ,
P- Cadherins(placental),
桥粒钙粘素。

Selectin:

属异亲性依赖于 Ca^{2+} 的能与特异糖基识别并相结合的糖蛋白，其胞外部分具有凝集素样结构域(lectin-like domain)。

主要参与白细胞与脉管内皮细胞之间的识别与粘着。

P(Platelet)选择素、E(Endothelial)选择素和L(Leukocyte)选择素。

Ig-Superfamily, IgSF:

分子结构中具有与免疫球蛋白类似的结构域的CAM超家族。介导同亲性细胞粘着或介导异亲性细胞粘着,但其粘着作用不依赖 Ca^{2+} ，其中N-CAMs 在神经组织细胞间的粘着中起主要作用。

粘着方式

- 细胞中主要的粘连分子家族
- 与细胞锚定连接相关的粘连分子
- 非锚定连接（**nonjunctional adhesion**）的细胞粘连分子及其作用部位

与细胞锚定连接相关的粘连分子

第三节 细胞外被与细胞外基质

- 基本概念
- 胶原(collagen)
- 氨基聚糖和蛋白聚糖
- 层粘连蛋白和纤粘连蛋白
- 弹性蛋白(elastin)
- 植物细胞壁

一、基本概念

- 细胞外被(cell coat)又称糖萼(glycocalyx)
- 细胞外基质(extracellular matrix)

- 真核细胞的细胞外结构（extracellular structures）

二、胶原(collagen)

- 胶原是胞外基质最基本结构成份之一，动物体内含量最丰富的蛋白（总量的30%以上）。
- 常见的胶原类型及其在组织中的分布
- 胶原及其分子结构
- 胶原的合成与加工
- 胶原的功能

三、氨基聚糖和蛋白聚糖

- 氨基聚糖(glycosaminoglycan,GAGs)

- 蛋白聚糖(proteoglycan)

四、层粘连蛋白和纤粘连蛋白

- 层粘连蛋白(laminin)

- 纤粘连蛋白(fibronectin)

五、弹性蛋白(elastin)

- ◆弹性蛋白是弹性纤维的主要成分；主要存在于脉管壁及肺。
- ◆弹性纤维与胶原纤维共同存在,分别赋予组织以弹性及抗张性。
- ◆弹性蛋白是高度疏水的非糖基化蛋白，具有两个明显的特征：
 - ◇构象呈无规则卷曲状态；
 - ◇通过Lys残基相互交连成网状结构。

六、植物细胞壁

- 植物细胞壁的组成

●植物细胞壁的功能

- ◆增加细胞强度，提供支持功能；
- ◆信息储存库的功能：产生多种寡糖素作为信号物质，或抵抗病、虫害，或作为细胞生长和发育的信号物质。

细胞外基质(extracellular matrix)

- ◆结构组成：

指分布于细胞外空间，由细胞分泌的蛋白和多糖所构成的网络结构
- ◆主要功能：
 - ◆构成支持细胞的框架，负责组织的构建；
 - ◆胞外基质三维结构及成份的变化,改变细胞微环境从而对细胞形态、生长、分裂、分化和凋亡起重要的调控作用。
 - ◆胞外基质的信号功能

细胞外被(cell coat)又称糖萼(glycocalyx)

- ◆结构组成：

指细胞质膜外表面覆盖的一层粘多糖物质，实际指细胞表面与质膜中的蛋白或脂类分子共价结合的寡糖链。
- ◆功能：

不仅对膜蛋白起保护作用,而且在细胞识别中起重要作用。

真核细胞的细胞外结构 (extracellular structures)

常见的胶原类型及其在组织中的分布

- ◆胶原是细胞外基质中最主要的水不溶性纤维蛋白；
 - ◆ I ~III型胶原含量最丰富,形成类似的纤维结构；

但并非所有胶原都形成纤维；
 - ◆ I 型胶原纤维束, 主要分布于皮肤、肌腱、韧带及骨中,具有很强的抗张强度；
 - ◆ II型胶原主要存在于软骨中；
 - ◆ III型胶原形成微细的原纤维网,广泛分布于伸展性的组织,如疏松结缔组织；
 - ◆ IV型胶原形成二维网格样结构,是基膜的主要成分及支架。

胶原及其分子结构

- ◆胶原纤维的基本结构单位是原胶原；
- ◆原胶原是由三条肽链盘绕成的三股螺旋结构；
- ◆原胶原肽链具有Gly-x-y重复序列，对胶原纤

维的高级结构的形成是重要的；

- ◆在胶原纤维内部,原胶原蛋白分子呈1/4交替平行排列,形成周期性横纹。

胶原的合成与加工

- ◆前体 α 肽链在粗面内质网合成,并形成前原胶原 (preprocollagen);
 - ◇前原胶原(preprocollagen)是原胶原的前体和分泌形式,
 - ◇在粗面内质网合成、加工与组装,经高尔基体分泌;
- ◆前原胶原在细胞外由两种专一性不同的蛋白水解酶作用,分别切去N-末端前肽及C-末端前肽,成为原胶原 (procollagen) ;
- ◆原胶原进而聚合装配成胶原原纤维 (collagen fibril) 和胶原纤维 (collagen fiber) 。

胶原的功能

- ◆胶原在胞外基质中含量最高,刚性及抗张力强度最大,构成细胞外基质的骨架结构,细胞外基质中的其它组分通过与胶原结合形成结构与功能的复合体
- ◆在不同组织中,胶原组装成不同的纤维形式,以适应特定功能的需要;
- ◆胶原可被胶原酶特异降解,而参入胞外基质信号传递的调控网络中。

氨基聚糖

- ◆氨基聚糖是由重复的二糖单位构成的长链多糖
 - ◇二糖单位之一是氨基己糖
(氨基葡萄糖或氨基半乳糖)+ 糖醛酸;
 - ◇氨基聚糖: 透明质酸、4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素、肝素和硫酸角质素等。
- ◆透明质酸(hyaluronic acid)及其生物学功能
 - ◇透明质酸是增殖细胞和迁移细胞的胞外基质主要成分,也是蛋白聚糖的主要结构组分
 - ◇透明质酸在结缔组织中起强化、弹性和润滑作用
 - ◇透明质酸使细胞保持彼此分离,使细胞易于运动迁移和增殖并阻止细胞分化

蛋白聚糖

- ◆蛋白聚糖见于所有结缔组织和细胞外基质及许多细胞表面
- ◆蛋白聚糖由氨基聚糖与核心蛋白(core protein)的丝氨酸残

基共价连接形成的巨分子

- ◆若干蛋白聚糖单体借连接蛋白以非共价键与透明质酸结合形成多聚体
- ◆蛋白聚糖的特性与功能
 - ◇显著特点是多态性：不同的核心蛋白，不同的氨基聚糖；
 - ◇软骨中的蛋白聚糖是最大巨分子之一，赋予软骨以凝胶样特性和抗变形能力；
 - ◇蛋白聚糖可视为细胞外的激素富集与储存库，可与多种生长因子结合，完成信号的传导。

层粘连蛋白(laminin)

- ◆层粘连蛋白是高分子糖蛋白（820KD），动物胚胎及成体组织的基膜的主要结构组分之一；
- ◆层粘连蛋白的结构由一条重链和两条轻链构成
 - ◇细胞通过层粘连蛋白锚定于基膜上；
 - ◇层粘连蛋白中至少存在两个不同的受体结合部位：
 - 与IV型胶原的结合部位；
 - 与细胞质膜上的整合素结合的Arg-Gly-Asp(R-G-D)序列。
- ◆层粘连蛋白在胚胎发育及组织分化中具有重要作用；层粘连蛋白也与肿瘤细胞的转移有关。

纤粘连蛋白(fibronectin)

- ◆纤粘连蛋白是高分子量糖蛋白（220-250KD）
- ◆纤粘连蛋白分型：
- ◆纤粘连蛋白的主要功能：
 - ◇介导细胞粘着，进而调节细胞的形状和细胞骨架的组织,促进细胞铺展；
 - ◇在胚胎发生过程中,纤粘连蛋白对于许多类型细胞的迁移和分化是必须的；
 - ◇在创伤修复中,纤粘连蛋白促进巨噬细胞和其它免疫细胞迁移到受损部位；
 - ◇在血凝块形成中,纤粘连蛋白促进血小板附着于血管受损部位。

- ◇血浆纤粘连蛋白是二聚体,由两条相似的A链及链组成,整个分子呈V形。
- ◇细胞纤粘连蛋白是多聚体。
- ◇纤粘连蛋白不同的亚单位为同一基因的表达产

物，每个亚单位由数个结构域构成，RGD三肽序列是为细胞识别的最小结构单位

- ◆纤粘连蛋白的膜蛋白受体为整合素家族成员之一，在其细胞外功能区有与RGD高亲和性结合部位。

植物细胞壁的组成

- ◆纤维素分子→纤维素微原纤维（microfibril），
 - ◆为细胞壁提供了抗张强度
- ◆半纤维素（hemicellulose）：木糖、半乳糖和葡萄糖等组成的高度分支的多糖
 - ◆介导微原纤维连接彼此连接或介导微原纤维与其它基质成分（果胶质）连接
- ◆果胶质（pectin）：含有大量携带负电荷的糖，结合 Ca^{2+} 等阳离子，被高度水化形成凝胶
 - ◆果胶质与半纤维素横向连接，参与细胞壁复杂网架的形成。
- ◆伸展蛋白(extensin)：糖蛋白，在初生壁中含量可多达15%，糖的总量约占65%。
- ◆木质素(lignin)：由酚残基形成的水不溶性多聚体。
 - ◆参与次生壁形成，并以共价键与细胞壁多糖交联，大大增加了细胞壁的力度与抗降解

第五章 物质的跨膜运输与信号传递

● 物质的跨膜运输

● 细胞通讯与信号传递

第一节 物质的跨膜运输

● 被动运输（passive transport）

● 主动运输（active transport）

● 胞吞作用（endocytosis）与胞吐作用（exocytosis）

第二节 细胞通讯与信号传递

- 细胞通讯与细胞识别
- 细胞的信号分子与受体
- 通过细胞内受体介导的信号传递
- 通过细胞表面受体介导的信号跨膜传递

- 由细胞表面整合蛋白介导的信号传递
- 细胞信号传递的基本特征与蛋白激酶的网络整合信息

被动运输 (passive transport)

- ◆**特点**：运输方向、跨膜动力、能量消耗、膜转运蛋白
- ◆**类型**：简单扩散 (simple diffusion)、协助扩散 (facilitated diffusion)
- ◆膜转运蛋白：
 - ◇载体蛋白 (carrier proteins) ——通透酶 (permease) 性质；
介导被动运输与主动运输。
 - ◇通道蛋白 (channel proteins) ——具有离子选择性，转运速率高；
离子通道是门控的；只介导被动运输
 - 类型：
 - 电压门通道 (voltage-gated channel)
 - 配体门通道 (ligand-gated channel)
 - 压力激活通道 (stress-activated channel)

主动运输 (active transport)

- 特点**：运输方向、能量消耗、膜转运蛋白
被动与主动运输的比较
- 类型**：三种基本类型
 - ◆由ATP直接提供能量的主动运输—
 - ◇钠钾泵 (结构与机制)
 - ◇钙泵 (Ca²⁺-ATP酶)
 - ◇质子泵：P-型质子泵、V-型质子泵、H⁺-ATP酶
 - ◆协同运输 (cotransport)
由Na⁺-K⁺泵 (或H⁺-泵) 与载体蛋白协同作用，
靠间接消耗ATP所完成的主动运输方式
 - ◆物质的跨膜转运与膜电位

胞吞作用 (endocytosis)

与胞吐作用 (exocytosis)

作用：完成大分子与颗粒性物质的跨膜运输，又称膜泡运输或批量运输 (bulk transport)。属于主动运输。

- 胞吞作用
- 胞吐作用

胞吐作用

- 组成型的外排途径 (constitutive exocytosis pathway)
 - 所有真核细胞
 - 连续分泌过程
 - 用于质膜更新 (膜脂、膜蛋白、胞外基质组分、营养或信号分子)
 - default pathway**: 除某些有特殊标志的驻留蛋白和调节型分泌泡外，
其余蛋白的转运途径：粗面内质网→高尔基体→分泌泡→细胞表面
- 调节型外排途径 (regulated exocytosis pathway)
特化的分泌细胞

储存——刺激——释放

产生的分泌物（如激素、粘液或消化酶）具有共同的分选机制，

分选信号存在于蛋白本身，分选主要由高尔基体TGN上的受体类蛋白来决定

- **膜流**：动态过程对质膜更新和维持细胞的生存与生长是必要的
- **囊泡与靶膜的识别与融合**

细胞通讯与细胞识别

●细胞通讯 (cell communication)

●细胞识别 (cell recognition)

细胞通讯 (cell communication)

一个细胞发出的信息通过介质传递到另一个细胞产生相应的反应。细胞间的通讯对于多细胞生物体的发生和组织的构建，协调细胞的功能，控制细胞的生长、分裂、分化和凋亡是必须的。

●细胞通讯方式：

- ◆分泌化学信号进行通讯
 - ◇内分泌 (endocrine)
 - ◇旁分泌 (paracrine)
 - ◇自分泌 (autocrine)
 - ◇化学突触 (chemical synapse)
- ◆接触性依赖的通讯
 - 细胞间直接接触，信号分子与受体都是细胞的跨膜蛋白
- ◆间隙连接实现代谢偶联或电偶联

细胞识别 (cell recognition)

●概念：

细胞通过其表面的受体与胞外信号物质分子（配体）选择性地相互作用，进而导致胞内一系列生理生化变化，最终表现为细胞整体的生物学效应的过程。

●信号通路 (signaling pathway)

细胞识别是通过各种不同的信号通路实现的。

细胞接受外界信号，通过一整套特定的机制，将胞外信号转导为胞内信号，最终调节特定基因的表达，引起细胞的应答反应，这种反应系列称之为细胞信号通路。

细胞的信号分子与受体

●信号分子 (signal molecule)

- ◆亲脂性信号分子
- ◆亲水性信号分子
- ◆气体性信号分子 (NO)

●受体 (receptor) 多为糖蛋白

●第二信使 (second messenger)

- **分子开关** (molecular switches)

- ◆细胞内受体：为胞外亲脂性信号分子所激活
激素激活的基因调控蛋白（胞内受体超家族）
- ◆细胞表面受体：为胞外亲水性信号分子所激活
细胞表面受体分属三大家族：
 - ◇离子通道偶联的受体（ion-channel-linked receptor）
 - ◇G-蛋白偶联的受体（G-protein-linked receptor）
 - ◇酶偶联的受体（enzyme-linked receptor）

通过细胞内受体介导的信号传递

● 甾类激素介导的信号通路

两步反应阶段：

- ◆ 初级反应阶段：直接活化少数特殊基因转录的，发生迅速；
- ◆ 次级反应：初级反应产物再活化其它基因产生延迟的放大作用。

● 一氧化氮介导的信号通路

通过细胞表面受体介导的信号跨膜传递

● 离子通道偶联的受体介导的信号跨膜传递

● G-蛋白偶联的受体介导的信号跨膜传递

● 细胞表面其它与酶偶联的受体

离子通道偶联的受体介导的信号跨膜传递

◆ 信号途径

◆ 特点：

- ◇受体/离子通道复合体，四次/六次跨膜蛋白
- ◇跨膜信号转导无需中间步骤
- ◇主要存在于神经细胞或其他可兴奋细胞间的突触信号传递
- ◇有选择性：配体的特异性选择和运输离子的选择性

G-蛋白偶联的受体介导的信号跨膜传递

● cAMP信号通路

● 磷脂酰肌醇信号通路

受体酪氨酸激酶及RTK-Ras蛋白信号通路

细胞表面其它与酶偶联的受体

- ◆受体丝氨酸/苏氨酸激酶
- ◆受体酪氨酸磷酸酯酶
- ◆受体鸟苷酸环化酶（ANPs-signals）
- ◆酪氨酸蛋白激酶联系的受体

两大家族：

- ◆一是与Src蛋白家族相联系的受体；
- ◆二是与Janus激酶家族联系的受体。

信号转导子和转录激活子（**signal transducer and actvator of transcription, STAT**）与JAK-STAT途径。

cAMP信号通路

- ◆反应链：
激素→G-蛋白偶联受体→G-蛋白→腺苷酸环化酶→cAMP→
cAMP依赖的蛋白激酶A→基因调控蛋白→基因转录
- ◆组分及其分析
G-蛋白偶联受体
G-蛋白活化与调节
效应酶—腺苷酸环化酶
 - ◆GPLR的失敏（desensitization）与减量调节
- ◆细菌毒素对G蛋白的修饰作用

GPLR的失敏：

例：β肾上腺素受体被激活后，10-15秒cAMP骤增，然后在不到1min内反应速降，以至消失。

- ◆受体活性快速丧失（速发相）---失敏（desensitization）；
 - ◆机制：受体磷酸化 受体与Gs解偶联，cAMP反应停止并被PDE降解。
 - ◆两种Ser/Thr磷酸化激酶：
PKA 和β肾上腺素受体激酶（βARK），负责受体磷酸化；
 - ◆胞内协作因子β扑获蛋白（β arrestin）---结合磷酸化的受体，抑制其功能活性（β arrestin 已克隆、定位11q13）。
- ◆反应减弱（迟发相）---减量调节（down-regulation）
 - ◆机制：受体-配体复合物内吞，导致表面受体数量减少，发现β arrestin可直接与Clathrin结合，在内吞中起adeptors作用；
 - ◆受体减量调节与内吞后受体的分选有关。

磷脂酰肌醇信号通路

- ◆“双信使系统”反应链：胞外信号分子→G-蛋白偶联受体→G-蛋白→
磷脂酶C(PLC)→
→IP₃→胞内Ca²⁺浓度升高→Ca²⁺结合蛋白(CaM)→细胞反应
→DG→激活PKC→蛋白磷酸化或促Na⁺/H⁺交换使胞内pH↑

受体酪氨酸激酶及RTK-Ras蛋白信号通路

- ◆受体酪氨酸激酶（receptor tyrosine kinases, RTKs）
包括6个亚族
- ◆信号转导：配体→受体→受体二聚化→受体的自磷酸化→
激活RTK→胞内信号蛋白→启动信号传导
- ◆RTK-Ras信号通路：
配体→RTK→ adaptor ←GRF→Ras→Raf（MAPKKK）→MAPKK
→MAPK→进入细胞核→其它激酶或基因调控蛋白
（转录因子）的磷酸化修饰。
- ◆G蛋白偶联受体介导的MAPK的激活
- ◆RTKs的失敏（desensitization）

G蛋白偶联受体介导的MAPK的激活

- ◆MAPK（Mitogen-activated protein kinase）又称ERK（extracellular signal-regulated kinase）----真核细胞广泛存在的Ser/Thr蛋白激酶。
- ◆MAPK的底物：膜蛋白（受体、酶）、胞浆蛋白、核骨架蛋白、及多种核内或胞浆内的转录调控因子----在细胞增殖和分化中具有重要调控作用。
- ◆PTX敏感性G蛋白（Gi, Go）的 $\beta\gamma$ 亚基依赖于Ras激活MAPK，具体机制还有待深入研究；
- ◆PKC、PLC与G蛋白偶联受体介导的MAPK激活
PKC和PLC 参与G蛋白偶联受体激活MAPK：
 - ◆G蛋白偶联受体激活G蛋白； G蛋白 α 亚基或 $\beta\gamma$ 亚基激活PLC，促进膜磷脂代谢； 磷脂代谢产物（DAG + IP₃）激活PKC； PKC通过Ras或Raf激活MAPK；
 - ◆由于PKC对钙的依赖性不同，所以G蛋白偶联受体-MAPK途径对钙要求不同；
- ◆PKA对G蛋白偶联受体-MAPK途径的负调控
 - ◆迄今未发现和制备出MAPK组成型突变（dominant negative mutant），提示细胞难于忍受MAPK的持续激活（MAPK的去活是细胞维持正常生长代谢所必须）。主要机制：特异性的Tyr/Thr磷脂酶可选择性地使MAPK去磷酸化，关闭MAPK信号。
 - ◆cAMP ↑， MAPK ↓； cAMP直接激活cAMP依赖的PKA； PKA可能通过RTK或通过抑制Raf-Ras相互作用起负调控作用。

RTKs的失敏:

催化性受体的效应器位于受体本身，因此失敏即酶活性速发抑制。

- ◆机制：受体的磷酸化修饰。EGF受体Thr654的磷酸化导致RTK活性的抑制，如果该位点产生Ala突变，则阻止活性抑制，后又发现C端的Ser1046/7也是磷酸化位点。磷酸化位点所在的C端恰好是SH2蛋白的结合部位。

- ◇引起受体磷酸化的激酶：
 - PKC----作用于Thr654;
 - CaMK2 (Ca²⁺和CaM依赖的激酶2) ----作用于Ser1046/7
- ◇还发现：EGF受体是CDK的靶蛋白，提示和周期调控有关。
- ◇ RTK晶体结构研究表明， RTK激活后形成稳定的非抑制性构象；磷酸化修饰后，形成抑制性构象，引起失敏。
- ◇ RTK失敏对细胞正常功能所必须， RTK 的持续激活将导致细胞生长失控。

由细胞表面整合蛋白介导的信号传递

整合蛋白与粘着斑

整合蛋白导致粘着斑装配的信号通路有两条

粘着斑的功能：

- ◆一是机械结构功能；
- ◆二是信号传递功能

整合蛋白通过粘着斑由整合蛋白介导的信号传递通路：

- ◆由细胞表面到细胞核的信号通路
- ◆由细胞表面到细胞质核糖体的信号通路

细胞信号传递的基本特征 与蛋白激酶的网络整合信息

- 细胞信号传递的基本特征：
 - ◆具有收敛 (convergence) 或发散 (divergence) 的特点
 - ◆细胞的信号传导既具有专一性又有作用机制的相似性
 - ◆信号的放大作用和信号所启动的作用的终止并存
 - ◆细胞以不同的方式产生对信号的适应(失敏与减量调节)
- 蛋白激酶的网络整合信息与信号网络系统中的cross talk

第六章 细胞质基质与细胞内膜系统

第一节 细胞质基质

- 细胞质基质 (cytoplasmic matrix or cytomatrix)

- 细胞内膜系统 (endomembrane system)

第二节 内质网

- 内质网(endoplasmic reticulum,ER)

* 的形态结构

- ER的功能

- 内质网与基因表达的调控

 - 第三节 高尔基体

- 高尔基体的形态结构

 - 高尔基体的功能

- 高尔基体与细胞内的膜泡运输

 - 第四节 溶酶体与过氧化物酶体

 - 第五节 细胞内蛋白质的分选与细胞结构的组装

- 分泌蛋白合成的模型---信号假说

- 蛋白质分选与分选信号

- 膜泡运输

- 细胞结构体系的组装

 - 一、细胞质基质

 - (cytoplasmic matrix or cytomatrix)

细胞质基质是细胞的重要的结构成分，其体积约占细胞质的一半

- 基本概念：

用差速离心法分离细胞匀浆物组分，先后除去细胞核、线粒体、溶酶体、高尔基体和细胞质膜等细胞器或细胞结构后，存留在上清液中的主要是细胞质基质的成分。生物化学家多称之为胞质溶胶。

- 主要成分：中间代谢有关的数千种酶类、细胞质骨架结构。

- 主要特点：细胞质基质是一个高度有序的体系；
通过弱键而相互作用处于动态平衡的结构体系。

- 完成各种中间代谢过程

如糖酵解过程、磷酸戊糖途径、糖醛酸途径等

- 蛋白质的分选与运输

- 与细胞质骨架相关的功能
 - 维持细胞形态、细胞运动、胞内物质运输及能量传递等
- 蛋白质的修饰、蛋白质选择性的降解
 - ◆ 蛋白质的修饰
 - ◆ 控制蛋白质的寿命
 - ◆ 降解变性和错误折叠的蛋白质
 - ◆ 帮助变性或错误折叠的蛋白质重新折叠，形成正确的分子构象

二、细胞内膜系统 (endomembrane system)

- 细胞内膜系统概述
- 细胞内膜系统的研究方法

细胞内膜系统概述

- ◆ 细胞内膜系统是指细胞内在结构、功能及发生上相关的由膜包绕形成的细胞器或细胞结构。
- ◆ 真核细胞细胞内的区域化 (compartmentalization) :
 - ◆ 细胞骨架纤维为组织者的Cytomatrix形成有序的动态结构;
 - ◆ 细胞内的膜相结构----细胞器 (organelles) 。

细胞内膜系统的研究方法

De Duve, A.Claude and G.Palade,1974 Nobel Prize

- ◆ 放射自显影 (Autoradiography) ;
- ◆ 生化分析 (Biochemical analysis) ;
- ◆ 遗传突变分析 (Genetic mutants)

一、内质网的形态结构

内质网的两种基本类型

- 粗面内质网 (rough endoplasmic reticulum, rER)

- 光面内质网（smooth endoplasmic reticulum, sER）

- 微粒体（microsome）

二、ER的功能

ER是细胞内蛋白质与脂类合成的基地，几乎全部脂类和多种重要蛋白都是在内质网合成的。

rER的功能

- ◆ 蛋白质合成
- ◆ 蛋白质的修饰与加工
- ◆ 新生肽的折叠与组装
- ◆ 脂类的合成

sER的功能

- ◆ 类固醇激素的合成（生殖腺内分泌细胞和肾上腺皮质）
- ◆ 肝的解毒作用（Detoxification）
System of oxygenases---cytochrome p450 family;
 - ◆ 肝细胞葡萄糖的释放（G-6P→G）
 - ◆ 储存钙离子：肌质网膜上的Ca²⁺-ATP酶将细胞质基质中Ca²⁺ 泵入肌质网腔中

蛋白质合成

分泌蛋白；整合膜蛋白；内膜系统各种细胞器内的可溶性蛋白（需要隔离或修饰）。

其它的多肽是在细胞质基质中“游离”核糖体上合成的：

包括：细胞质基质中的驻留蛋白、质膜外周蛋白、核输入蛋白、转运到线粒体、叶绿体和过氧化物酶体的蛋白。

注意：细胞中蛋白质都是在核糖体上合成的，
并都是起始于细胞质基质中“游离”核糖体。

蛋白质的修饰与加工

修饰加工：糖基化、羟基化、酰基化、二硫键形成等

- ◆糖基化在glycosyltransferase作用下发生在ER腔面
 - N- linked glycosylation（Asn）
 - O- linked glycosylation（Ser/Thr or Hylys/Hypro）
- ◆酰基化发生在ER的细胞质基质侧：软脂酸→Cys

新生肽的折叠与组装

* 新生肽的折叠组装：

非还原性的内腔，易于二硫键形成；

- ◆ 正确折叠涉及驻留蛋白：具有KDEL or HDEL信号
蛋白二硫键异构酶（protein disulfide isomerase, PDI）
切断二硫键，帮助新合成的蛋白重新形成二硫键并处于正确折叠的状态
- ◆ 结合蛋白（Binding protein, Bip, chaperone）
识别错误折叠的蛋白或未装配好的蛋白亚单位，
并促进重新折叠与装配。

脂类的合成

- ◆ ER合成细胞所需绝大多数膜脂（包括磷脂和胆固醇）。
两种例外：鞘磷脂和糖脂（ER开始→Golgi complex完成）；
Mit/Chl某些单一脂类是在它们的膜上合成的。
- ◆ 各种不同的细胞器具有明显不同的脂类组成：
phosphatidylcholine（PC）：ER→GC→PM（高→低）
phosphatidylserine（PS）：PM→GC→ER（高→低）
- ◆ phospholipid translocator / flippase与膜质转运
 - ◆ 磷脂合成酶是ER膜整合蛋白，活性位点朝向cytosol；
 - ◆ 磷脂的转运：
transport by budding：ER→GC、Ly、PM
transport by phospholipid exchange proteins（PEP）：
ER→other organelles（including Mit and Chl）。

三、内质网与基因表达的调控

内质网蛋白质的合成、加工、折叠、组装、转运及向高尔基体转运的复杂过程显然是需要有一个精确调控的过程。

影响内质网→细胞核信号转导的三种因素：

- ◆ 内质网腔内未折叠蛋白的超量积累。
- ◆ 折叠好的膜蛋白的超量积累。
- ◆ 内质网膜上膜脂成份的变化——主要是固醇缺乏
不同的信号转导途径，最终调节细胞核内特异基因表达

一、高尔基体的形态结构

- ◆ 电镜下高尔基体结构是由扁平膜囊和大小不等的囊泡构成
- ◆ 高尔基体是有极性的细胞器：位置、方向、物质转运与生化极性
- ◆ 高尔基体各部膜囊的4种标志细胞化学反应：
- ◆ 高尔基体至少由互相联系的4个部分组成，每一部分又可能划分出更精细的间隔
- ◆ 高尔基体与细胞骨架关系密切，在非极性细胞中，高尔基体分布在MTOC（负端）
- ◆ 高尔基的膜囊上存在微管的马达蛋白（cytoplasmic dynein和kinesin）和微丝

的马达蛋白（myosin）。最近还发现特异的血影蛋白（spectrin）网架。它们在维持高尔基体动态的空间结构以及复杂的膜泡运输中起重要的作用。

◆扁囊弯曲成凸面

又称形成面（forming face）或顺面（cis face）

◆面向质膜的凹面（concave）

又称成熟面（mature face）或反面（trans face）

高尔基体各部膜囊的4种标志细胞化学反应

- ◆ 嗜钼反应的高尔基体cis面膜囊；
 - ◆ 焦磷酸硫胺素酶（TPP酶）细胞化学反应，显示trans面1~2层膜囊；
 - ◆ 胞嘧啶单核苷酸酶（CMP酶）细胞化学反应，显示靠近trans面膜囊状和管状结构
- GERL结构：**60年代初，Novikoff发现CMP和酸性磷酸酶存在于高尔基体的一侧，称这种结构为GERL，意为与高尔基体（G）密切相关，但它是内质网（ER）的一部分，参与溶酶体（L）的生成。
- ◆ 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸酶（NADP酶）的细胞化学反应，显示中间扁平囊

◆ 高尔基体顺面网状结构（cis-Golgi network, CGN）

又称cis膜囊

◆ 高尔基体中间膜囊（medial Golgi）

多数糖基修饰；

糖脂的形成；

与高尔基体有关的多糖的合成

◆ 高尔基体反面网状结构（trans Golgi network, TGN）

◆ 周围大小不等的囊泡

顺面膜囊称ERGIC/VTC——ERGIC53/58蛋白（结合Mn）

反面体积较大的分泌泡与分泌颗粒

高尔基体顺面网状结构

◆ RER（蛋白质和脂类）→（蛋白质KDEL或HDEL）CGN；

◆ 蛋白丝氨酸残基发生O-连接糖基化；

◆ 跨膜蛋白在细胞质基质一侧结构域的酰基化；

◆ 日冕病毒的装配

高尔基体反面网状结构

◆ TGN中的低pH值；标志酶CMP酶阳性

◆ TGN的主要功能：

◆参与蛋白质的分类与包装、运输；

◆某些“晚期”的蛋白质修饰

（如唾液酸化、蛋白质酪氨酸残基的硫酸化及蛋白原的水解加工）在蛋白质与脂类的转运过程中的“瓣膜”作用，保证单向转运

二、高尔基体的功能

◆ 高尔基体与细胞的分泌活动

◆ 蛋白质的糖基化及其修饰

◆ 蛋白酶的水解和其它加工过程

高尔基体与细胞的分泌活动

- ◆ 蛋白质的分选及其转运的信息仅存在于编码该蛋白质的基因本身
 - 流感病毒囊膜蛋白特异性地转运→ 上皮细胞游离端的质膜
 - 水泡性口炎病毒囊膜蛋白特异性地转运→ 上皮细胞基底面的质膜
 - 水泡性口炎病毒囊膜蛋白等膜蛋白在胞质基质侧的双酸分选信号（Asp-X-Gln或DXE）起重要的作用
- ◆ 溶酶体酶的分选：M6P→反面膜囊M6P受体
在肝细胞中溶酶体酶还存在不依赖于M6P的另一种分选途径。

蛋白质的糖基化及其修饰

- ◆ 蛋白质糖基化类型
- ◆ 蛋白质糖基化的特点及其生物学意义
- ◆ 蛋白聚糖在高尔基体中组装
 - ◆ 植物细胞中高尔基体合成和分泌多种多糖

蛋白质糖基化类型

蛋白质糖基化的特点及其生物学意义

- ◆ 糖蛋白寡糖链的合成与加工都没有模板，靠不同的酶在细胞不同间隔中经历复杂的加工过程才能完成。
- ◆ 糖基化的主要作用是蛋白质在成熟过程中折叠成正确构象和增加蛋白质的稳定性；多羟基糖侧链影响蛋白质的水溶性及蛋白质所带电荷的性质。对多数分选的蛋白质来说，糖基化并非作为蛋白质的分选信号。
- ◆ 进化上的意义：寡糖链具有一定的刚性，从而限制了其它大分子接近细胞表面的膜蛋白，这就可能使真核细胞的祖先具有一个保护性的外被，同时又不象细胞壁那样限制细胞的形状与运动。

蛋白聚糖在高尔基体中组装

一个或多个糖胺聚糖（通过木糖）结合到核心蛋白的Ser残基上

植物细胞高尔基体合成和分泌多种多糖

蛋白质在高尔基体中酶解加工的几种类型

- ◆ 无生物活性的蛋白原（proprotein）→高尔基体→切除N-端或两端的序列→成熟的多肽。如胰岛素、胰高血糖素及血清白蛋白等。
- ◆ 蛋白质前体→高尔基体→水解→同种有活性的多肽，如神经肽等。
- ◆ 含有不同信号序列的蛋白质前体→高尔基体→加工成不同的产物。
- ◆ 同一种蛋白质前体→不同细胞、以不同的方式加工→不同的多肽。
- ◆ 加工方式多样性的可能原因：
 - ◆ 确保小肽分子的有效合成；
 - ◆ 弥补缺少包装并转运到分泌泡中的必要信号；
 - ◆ 有效地防止这些活性物质在合成它的细胞内起作用。
- ◆ 在高尔基体中进行的肽链酪氨酸残基的硫酸化作用

三、高尔基体与细胞内的膜泡运输

高尔基体在细胞内膜泡蛋白运输中起重要的枢纽作用

一、溶酶体的结构类型

- ◆ 溶酶体膜的特征：
 - ◇ 嵌有质子泵，形成和维持溶酶体中酸性的内环境；
 - ◇ 具有多种载体蛋白用于水解的产物向外转运；
 - ◇ 膜蛋白高度糖基化，可能有利于防止自身膜蛋白的降解。
- ◆ 溶酶体的标志酶：酸性磷酸酶（acid phosphatase）
- ◆ 类型

类型

- ◆ 初级溶酶体（primary lysosome）
 - ◆ 次级溶酶体（secondary lysosome）
 - ◇ 自噬溶酶体（autophagolysosome）
 - ◇ 异噬溶酶体（phagolysosome）
 - ◆ 残余小体（residual body），又称后溶酶体。
- 溶酶体是以含有大量酸性水解酶为共同特征、不同形态大小，执行不同生理功能的一类异质性（heterogenous）的细胞器。

二、溶酶体的功能

phagocytosis → phagosome

endocytosis → early endosome → late endosome → lysosome

autophagy → autophagosome

- ◆ 清除无用的生物大分子、衰老的细胞器及衰老损伤和死亡的细胞
- ◆ 防御功能（病原体感染刺激单核细胞分化成巨噬细胞而吞噬、消化）
- ◆ 其它重要的生理功能
- ◆ 溶酶体与疾病

其它重要的生理功能

- ◆ 作为细胞内的消化“器官”为细胞提供营养；
- ◆ 分泌腺细胞中，溶酶体摄入分泌颗粒参与分泌过程的调节
- ◆ 参与清除增生组织或退行性变化的细胞；
- ◆ 受精过程中的精子的顶体（acrosome）反应。

溶酶体与疾病

- ◆ 溶酶体酶缺失或溶酶体酶的代谢环节故障，影响细胞代谢，引起疾病。

如台-萨氏 (Tay-Sachs) 等各种储积症
(隐性的遗传病)

- ◆某些病原体 (麻疯杆菌、利什曼原虫或病毒) 被细胞摄入, 进入吞噬泡但并未被杀死而繁殖 (抑制吞噬泡的酸化或利用胞内体中的酸性环境)

三、溶酶体的发生

发生途径

分选途径多样化

- ◆依赖于M6P的分选途径的效率不高, 部分溶酶体酶通过运输小泡直接分泌到细胞外; 在细胞质膜上也存在依赖于钙离子的M6P受体, 同样可与胞外的溶酶体酶结合, 通过受体介导的内吞作用, 将酶送至前溶酶体中, M6P受体返回细胞质膜, 反复使用。
- ◆还存在不依赖于M6P的分选途径 (如酸性磷酸酶、分泌溶酶体的perforin和granzyme)

四、溶酶体与过氧化物酶体

过氧化物酶体 (peroxisome) 又称微体 (microbody), 是由单层膜围绕的内含一种或几种氧化酶类的异质性细胞器。

◆ 过氧化物酶体与溶酶体的区别

◆ 过氧化物酶体的功能

◆ 过氧化物酶体的发生

过氧化物酶体与溶酶体的区别

- ◆ 动物细胞 (肝细胞或肾细胞) 中过氧化物酶体可氧化分解血液中的有毒成分, 起到解毒作用。

- ◆ 过氧化物酶体中常含有两种酶:

- ◆ 过氧化物酶体和溶酶体的差别

过氧化物酶体的功能

- ◆ 动物细胞 (肝细胞或肾细胞) 中过氧化物酶体可氧化分解血液中的有毒成分, 起到解毒作用。

过氧化物酶体中常含有两种酶:

依赖于黄素 (FAD) 的氧化酶, 其作用是将底物氧化形成 H_2O_2 ;

过氧化氢酶, 作用是将 H_2O_2 分解, 形成水和氧气。

- ◆ 过氧化物酶体分解脂肪酸等高能分子向细胞直接提供热能。

- ◆在植物细胞中过氧化物酶体的功能：
 - ◆ 在绿色植物叶肉细胞中，它催化CO₂固定反应副产物的氧化，即所谓光呼吸反应；
 - ◆ 乙醛酸循环的反应，在种子萌发过程中，过氧化物酶体降解储存的脂肪酸→乙酰辅酶A→琥珀酸→葡萄糖。

过氧化物酶体的发生

- ◆ 过氧化物酶体经分裂后形成子代的细胞器，子代的过氧化物酶体还需要进一步装配形成成熟的细胞器。
- ◆ 组成过氧化物酶体的蛋白均由核基因编码，主要在细胞质基质中合成，然后转运到过氧化物酶体中。
- ◆ 过氧化物酶体蛋白分选的信号序列（Peroxisomal-targeting signal, PTS）：
 - ◆ PTS1为Ser-lys-leu，多存在于基质蛋白的C端。
 - ◆ PTS2为Arg/Lys-Leu/Ile-5X-His/Gln-leu，存在于某些基质蛋白N-端。
 - ◆ 过氧化物酶体膜上存在几种可与信号序列相识别的可能的受体蛋白。
- ◆ 过氧化物酶体的膜脂可能在内质网上合成后转运而来。
 - ◆ 内质网也参与过氧化物酶体的发生

一、分泌蛋白合成的模型---信号假说

◆信号假说(Signal hypothesis)

G. Blobel et al: Signal hypothesis,1975

◆信号肽 (Signal peptide) 与共转移 (Cotranslocation)

◆导肽 (Leader peptide) 与后转移 (Post translocation)

信号假说

◆信号假说内容

◆指导因子：蛋白质N-端的信号肽 (signal peptide)

◆信号识别颗粒 (signal recognition particle, SRP)

◆信号识别颗粒的受体 (又称停泊蛋白docking protein, DP) 等

在非细胞系统中蛋白质的翻译过程与SRP、DP和微粒体的关系

信号肽与共转移

◆信号肽 (Signal peptides) 与 信号斑 (Signal patches)

- ◆ 起始转移序列和终止转移序列
- ◆ 起始转移序列和终止转移序列的数目决定多肽跨膜次数
- ◆ 跨膜蛋白的取向

导肽与后转移

◆基本的特征：

蛋白质在细胞质基质中合成以后再转移到这些细

胞器中，称后转移（post translocation）。

蛋白质跨膜转移过程需要ATP使多肽去折叠，还需要一些蛋白质的帮助（如热休克蛋白Hsp70）使其能够正确地折叠成有功能的蛋白。

二、蛋白质分选（protein sorting） 与分选信号（sorting signals）

- 分选途径
- 分选信号

分选途径（Road map）

- ◆门控运输（gated transport）；
- ◆跨膜运输（transmembrane transport）；
- ◆膜泡运输（vesicular transport）
- ◆拓扑学等价性（Topologically equivalent）的维持

三．膜泡运输

膜泡运输是蛋白运输的一种特有的方式，普遍存在于真核细胞中。在转运过程中不仅涉及蛋白本身的修饰、加工和组装，还涉及到多种不同膜泡定向运输及其复杂的调控过程。

- ◆三种不同类型的包被小泡具有不同的物质运输作用。
- ◆膜泡运输是特异性过程，涉及多种蛋白识别、组装、去组装的复杂调控

三种不同类型的包被小泡 具有不同的物质运输作用

- ◆网格蛋白包被小泡
- ◆ COPII包被小泡
- ◆ COPI包被小泡

网格蛋白包被小泡

- ◆负责蛋白质从高尔基体TGN→质膜、胞内体或溶酶体和植物液泡运输
- ◆在受体介导的细胞内吞途径也负责将物

质从质膜→内吞泡(细胞质)→胞内体→溶酶体运输

◆高尔基体TGN是网格蛋白包被小泡形成的发源地

COPII包被小泡

◆负责从内质网→高尔基体的物质运输；

◆ COPII包被蛋白由5种蛋白亚基组成；
包被蛋白的装配是受控的；

◆ COPII包被小泡具有对转运物质的选择性并使之浓缩。

COPI包被小泡

◆ COPI包被含有8种蛋白亚基，包被蛋白复合物的装配与去装配依赖于ARF(GTP-binding protein)；

◆负责回收、转运内质网逃逸蛋白(escaped proteins)↪ER。

◆细胞器中保留及回收蛋白质的两种机制：

◆转运泡将应被保留的驻留蛋白排斥在外，防止出芽转运；

◆通过识别驻留蛋白C-端的回收信号(lys-asp-glu-leu,KDEL)的特异性受体，以COPI-包被小泡的形式捕获逃逸蛋白。

◆ COPI-包被小泡在非选择性的批量运输(bulk flow)中行使功能，负责 rER→Golgi→SV→PM。

◆ COPI-包被小泡除行使Golgi→ER逆行转运外，也可行使顺行转运功能，从ER→ER-Golgi IC→Golgi。

膜泡运输是特异性过程，涉及多种蛋白识别、组装-去组装的复杂调控

◆膜泡融合是特异性的选择性融合，从而指导细胞内膜流的方向

◆选择性融合基于供体膜蛋白与受体膜蛋白的特异性相互作用

(如神经细胞质膜的syntaxin特异结合突触小泡膜上的VAMP—vesicle-associated membrane protein)

* 在细胞的膜泡运输中，粗面内质网相当于重要的物质供应站，而高尔基体是重要集散中心。由于内质网的驻留蛋白具有回收信号，即使有的蛋白发生逃逸，也会保留或回收回来，所以有人将内质网比喻成“开放的监狱”(open prison)。高尔基体在细胞的膜泡运输及其随之而形成的膜流中起枢纽作用，因此高尔基体聚集在微管组织中心(MTOC)附近并在高尔基体膜囊上结合有类似动力蛋白的蛋白质，从而使高尔基体维持其极性。同样，内质网、溶酶体、分泌泡和细胞质膜及胞内体也都具有各自特异的成分，这是行使复杂的膜泡运输功能的物质基础，但是在膜泡中又必须保证各细胞器和细胞间隔本身成分特别是膜成分的相对恒定。

四、细胞结构体系的组装

◆生物大分子的组装方式：

◆有些装配过程需ATP或GTP提供能量或其它成份的

- 介入或对装配亚基的修饰
- ◆自我装配的信息存在于装配亚基的自身，细胞提供的装配环境
- ◆装配具有重要的生物学意义：
- ◆分子“伴侣”（molecular chaperones）

生物大分子的组装方式

- ◆自我装配（self-assembly）
- ◆协助装配（aided-assembly）
- ◆直接装配（direct-assembly）
- ◆复合物与细胞结构体系的组装

装配具有重要的生物学意义

- ◆减少和校正蛋白质合成中出现的错误
- ◆减少所需的遗传物质信息量
- ◆通过装配与去装配更容易调节与控制多种生物学过程

分子“伴侣”（molecular chaperones）

细胞中的某些蛋白质分子可以识别正在合成的多肽或部分折叠的多肽并与多肽的某些部位相结合，从而帮助这些多肽转运、折叠或装配，这一类分子本身并不参与最终产物的形成，因此称为分子“伴侣”。

第七章 细胞的能量转换——线粒体和叶绿体

- 线粒体与氧化磷酸化
- 叶绿体与光合作用
- 线粒体和叶绿体是半自主性细胞器
- 线粒体和叶绿体的增殖与起源

第一节 线粒体与氧化磷酸化

- 线粒体的形态结构

●线粒体的化学组成及酶的定位

●氧化磷酸化

●线粒体与疾病

一、线粒体的形态结构

●线粒体的形态、大小、数量与分布

●线粒体的超微结构

- ◆外膜(outer membrane)：含孔蛋白(porin)，通透性较高。
- ◆内膜(inner membrane)：高度不通透性，向内折叠形成嵴(cristae)。含有与能量转换相关的蛋白
- ◆膜间隙(intermembrane space)：含许多可溶性酶、底物及辅助因子。
- ◆基质(matrix)：含三羧酸循环酶系、线粒体基因表达酶系等以及线粒体DNA, RNA, 核糖体。

·执行氧化反应的电子传递链

·ATP合成酶

·线粒体内膜转运蛋白

二、线粒体的化学组成及酶的定位

●线粒体组分分离方法

●线粒体的化学组成

●线粒体酶的定位

线粒体的化学组成

- ◆蛋白质(线粒体干重的65~70%)
- ◆脂类(线粒体干重的25~30%)：
 - 磷脂占3/4以上，外膜主要是卵磷脂，内膜主要是心磷脂。
 - 线粒体脂类和蛋白质的比值：

0.3:1 (内膜)；1:1 (外膜)

三、氧化磷酸化

线粒体主要功能是进行氧化磷酸化，合成ATP，为细

胞生命活动提供直接能量；与细胞中氧自由基的生成、细胞凋亡、细胞的信号转导、细胞内多种离子的跨膜转运及电解质稳态平衡的调控有关。

- 氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)的分子基础
- 氧化磷酸化的偶联机制—化学渗透假说
(Chemiosmotic Hypothesis, Mithchell,1961)
- 质子动力势的其他作用
- 线粒体能量转换过程略图

氧化磷酸化的分子基础

- ◆氧化磷酸化过程实际上是能量转换过程，即有机分子中储藏的能量→高能电子→质子动力势→ATP
- ◆氧化(电子传递、消耗氧，放能)与磷酸化(ADP+Pi，储能)同时进行，密切偶连，分别由两个不同的结构体系执行
- ◆电子传递链(electron-transport chain)的四种复合物，组成两种呼吸链：NADH呼吸链，FADH₂呼吸链
- ◆在电子传递过程中，有几点需要说明
- ◆ATP合成酶(ATP synthase)(磷酸化的分子基础)

电子传递链的四种复合物(哺乳类)

- ◆复合物 I：NADH-CoQ还原酶复合物(既是电子传递体又是质子移位体)
组成：含42个蛋白亚基，至少6个Fe-S中心和1个黄素蛋白。
作用：催化NADH氧化，从中获得2高能电子→辅酶Q；泵出4 H⁺
- ◆复合物 II：琥珀酸脱氢酶复合物(是电子传递体而非质子移位体)
组成：含FAD辅基，2Fe-S中心，
作用：催化2低能电子→FAD→Fe-S→辅酶Q(无H⁺泵出)
- ◆复合物 III：细胞色素bc₁复合物(既是电子传递体又是质子移位体)
组成：包括1cyt c₁、1cyt b、1Fe-S蛋白
作用：催化电子从UQH₂→cyt c；泵出4 H⁺(2个来自UQ，2个来自基质)
- ◆复合物 IV：细胞色素C氧化酶(既是电子传递体又是质子移位体)
组成：二聚体，每一单体含13个亚基，
三维构象，cyt a, cyt a₃, Cu, Fe
作用：催化电子从cyt c→分子O₂形成水，2 H⁺泵出，2 H⁺参与形成水

在电子传递过程中，有几点需要说明

- ◆四种类型电子载体：黄素蛋白、细胞色素(含血红素辅基)、Fe-S中心、辅酶Q。前三种与蛋白质结合，辅酶Q为脂溶性醌。
- ◆电子传递起始于NADH脱氢酶催化NADH氧化，形成高能电子(能量转化)，终止于O₂形成水。
- ◆电子传递方向按氧化还原电势递增的方向传递(NAD⁺/NAD最低，H₂O/O₂最高)
- ◆高能电子释放的能量驱动线粒体内膜三大复合物(H⁺-泵)将H⁺从基质侧泵到膜间隙，形成跨线粒体内膜H⁺梯度(能量转化)
- ◆电子传递链各组分在膜上不对称分布

ATP合成酶(磷酸化的分子基础)

- ◆分子结构
- ◆线粒体ATP合成系统的解离与重建实验证明电子传递与ATP合成是由两个不同的结构体系执行, F1颗粒具有ATP酶活性
- ◆工作特点: 可逆性复合酶, 即既能利用质子电化学梯度储存的能量合成ATP, 又能水解ATP将质子从基质泵到膜间隙
- ◆ATP合成机制—Banding Change Mechanism (Boyer 1979)
- ◆ γ 亚单位相对于 $\alpha\beta$ 亚单位旋转的直接实验证据

氧化磷酸化的偶联机制—化学渗透假说

- ◆化学渗透假说内容:

电子传递链各组分在线粒体内膜中不对称分布, 当高能电子沿其传递时, 所释放的能量将 H^+ 从基质泵到膜间隙, 形成 H^+ 电化学梯度。在这个梯度驱使下, H^+ 穿过ATP合成酶回到基质, 同时合成ATP, 电化学梯度中蕴藏的能量储存到ATP高能磷酸键。

- ◆质子动力势(proton motive force)
- ◆支持化学渗透假说的实验证据该实验表明:
 - 质子动力势乃ATP合成的动力
 - 膜应具有完整性
 - 电子传递与ATP合成是两件相关而又不同的事件

质子动力势的其他作用

- ◆物质转运

- ◆产热: 冬眠动物与新生儿的Brown Fat Cell
线粒体产生大量热量

第二节 叶绿体与光合作用

●叶绿体(Chloroplast)的形态结构

●叶绿体的功能—光合作用(photosynthesis)

一、叶绿体(Chloroplast)的形态结构

●叶绿体与线粒体形态结构比较

叶绿体内膜并不向内折叠成嵴; 内膜不含电子传递链; 除了膜间隙、基质外, 还有类囊体; 捕光系统、电子传递链和ATP合成酶都位于类囊体膜上。

●叶绿体超微结构

二、叶绿体的功能—光合作用 (photosynthesis)

Photosynthesis:(1)光合电子传递反应—光反应(Light Reaction)

(2)碳固定反应—暗反应(Dark Reaction)

●光反应

●暗反应(碳固定)

●光合作用与有氧呼吸的关系图

光反应

在类囊体膜上由光引起的光化学反应，通过叶绿素等光合色素分子吸收、传递光能，水光解，并将光能转换为电能（生成高能电子），进而通过电子传递与光合磷酸化将电能转换为活跃化学能，形成ATP和NADPH并放出O₂的过程。包括原初反应、电子传递和光合磷酸化。

◆原初反应（primary reaction）

·光能的吸收、传递与转换，形成高能电子
(由光系统复合物完成，光合作用单位的概念)

◆电子传递与光合磷酸化

电子传递与光合磷酸化

·电子传递与光合磷酸化需说明以下几点：

- ①最初电子供体是H₂O，最终电子受体是NADP⁺。
- ②电子传递链中唯一的H⁺-pump是cytb₆f复合物。类囊体腔的质子浓度比叶绿体基质高，该浓度梯度产生的原因归于：
H₂O光解、cytb₆f的H⁺-pump、NADPH的形成。ATP、NADPH在叶绿体基质中形成。
- ③电子沿光合电子传递链传递时，分为非循环式光合磷酸化和循环式光合磷酸化两条通路。循环式传递的高能电子在PS I被光能激发后经cytb₆f复合物回到PS I。结果是不裂解H₂O、产生O₂，不形成NADPH，只产生H⁺跨膜梯度，合成ATP。

暗反应(碳固定)

利用光反应产生的ATP和NADPH，使CO₂还原为糖类有机物，即将活跃的化学能最后转换为稳定的化学能，积存于有机物中。这一过程不直接需要光(在叶绿体基质中进行)。

◆卡尔文循环（Calvin cycle）（C₃途径）

◆C₄途径或 Hatch-Slack循环

◆景天科酸代谢途径

第三节 线粒体和叶绿体是半自主性细胞器

●半自主性细胞器的概念：

自身含有遗传表达系统(自主性)；但编码的遗传信息十分有限，其RNA转录、蛋白质翻译、自身构建和功能发挥等必须依赖核基因组编码的

遗传信息(自主性有限)。

- 线粒体和叶绿体的DNA
- 线粒体和叶绿体的蛋白质合成
- 线粒体和叶绿体蛋白质的运送与组装

一、线粒体和叶绿体的DNA

- mtDNA /ctDNA形状、数量、大小
- mtDNA和ctDNA均以半保留方式进行自我复制
- mtDNA复制的时间主要在细胞周期的S期及G2期，DNA先复制，随后线粒体分裂。ctDNA复制的时间在G1期。复制仍受核控制

mtDNA /ctDNA形状、数量、大小

- ◆ 双链环状(除绿藻mtDNA，草履虫mtDNA)
- ◆ mtDNA大小在动物中变化不大，但在植物中变化较大高等植物，120kbp~200kbp;
- ◆ 人mtDNA：16,569bp，37个基因(编码12S,16S rRNA；22种tRNA；13种多肽：NADH脱氢酶7个亚基，cyt b-c1复合物中1个cytb，细胞色素C氧化酶3个亚基，ATP合成酶2个Fo亚基)

二、线粒体和叶绿体的蛋白质合成

- 线粒体和叶绿体合成蛋白质的种类十分有限
- 线粒体或叶绿体蛋白质合成体系对核基因组具有依赖性(7-4)
- 不同来源的线粒体基因，其表达产物既有共性，也存在差异
- 参加叶绿体组成的蛋白质来源有3种情况：
 - ◆ 由ctDNA编码，在叶绿体核糖体上合成；
 - ◆ 由核DNA编码，在细胞质核糖体上合成；
 - ◆ 由核DNA编码，在叶绿体核糖体上合成。

三、线粒体和叶绿体蛋白质的运送与组装

- 线粒体蛋白质的运送与组装
 - ◆ 定位于线粒体基质的蛋白质的运送
 - ◆ 定位于线粒体内膜或膜间隙的蛋白质运送
- 叶绿体蛋白质的运送及组装

第四节 线粒体和叶绿体的增殖与起源

●线粒体和叶绿体的增殖

●线粒体和叶绿体的起源

一、线粒体和叶绿体的增殖

●线粒体的增殖：由原来的线粒体分裂或出芽而来。

●叶绿体的发育和增殖

◆个体发育：由前质体（proplastid）分化而来。

◆增殖：分裂增殖

二、线粒体和叶绿体的起源

●内共生起源学说（endosymbiosis hypothesis）

●非共生起源学说

内共生起源学说

◆叶绿体起源于细胞内共生的蓝藻：

Mereschkowsky, 1905年

◆Margulis, 1970年：线粒体的祖先-原线粒体

是一种革兰氏阴性细菌：叶绿体的祖先是原核生物的蓝细菌（Cyanobacteria），即蓝藻。

◆内共生起源学说的主要论据：

◆不足之处

内共生起源学说的主要论据

◆基因组在大小、形态和结构方面与细菌相似。

◆有自己完整的蛋白质合成系统，能独立合成蛋白质，蛋白质合成机制有很多类似细菌而不同于真核生物。

◆两层被膜有不同的进化来源，外膜与细胞的内膜系统相似，内膜与细菌质膜相似。

◆以分裂的方式进行繁殖，与细菌的繁殖方式相同。

◆能在异源细胞内长期生存，说明线粒体和叶绿体具有的自主性与共生性的特征。

◆线粒体的祖先很可能来自反硝化副球菌或紫色非硫光合细菌。

◆发现介于胞内共生蓝藻与叶绿体之间的结构—蓝小体，其特征在很多方面可作为原始蓝藻向叶绿体演化的佐证。

不足之处

- ◆从进化角度，如何解释在代谢上明显占优势的共生体反而将大量的遗传信息转移到宿主细胞中？
- ◆不能解释细胞核是如何进化来的，即原核细胞如何演化为真核细胞？
- ◆线粒体和叶绿体的基因组中存在内含子，而真细菌原核生物基因组中不存在内含子，如果同意内共生起源学说的观点，那么线粒体和叶绿体基因组中的内含子从何发生？

非共生起源学说

- ◆主要内容：真核细胞的前身是一个进化上比较高等的好氧细菌。
- ◆成功之处：解释了真核细胞核被膜的形成与演化的渐进过程。
- ◆不足之处

不足之处

第八章 细胞核(nucleus)与 染色体(chromosome)

第一节 核被膜与核孔复合体

●核被膜

●核孔复合体 (nuclear pore complex,NPC)

核被膜

●结构组成

●核被膜的功能

●核被膜在细胞有丝分裂过程中有规律地解体与重建

结构组成

- ◆外核膜 (outer nuclear membrane)，附有核糖体颗粒
- ◆内核膜 (inner nuclear membrane)，有特有的蛋白

成份（如核纤层蛋白B受体）

- ◆核纤层（nuclear lamina）
- ◆核周间隙（perinuclear space）
- ◆核孔（nuclear pore）

核被膜的功能

- ◆构成核、质之间的天然选择性屏障
 - ◇避免生命活动的彼此干扰
 - ◇保护DNA不受细胞骨架运动所产生的机械力的损伤

- ◆核质之间的物质交换与信息交流

核被膜在细胞在有丝分裂中有规律地解体与重建

- ◆新核膜来自旧核膜
- ◆核被膜的去组装是非随机的，具有区域特异性（domain-specific）。
- ◆以非洲爪蟾卵提取物为基础的非细胞核装配体系提供了实验模型
- ◆核被膜的解体与重建的动态变化受细胞周期调控因子的调节，调节作用可能与核纤层蛋白、核孔复合体蛋白的磷酸化与去磷酸化修饰有关。

核孔复合体

（nuclear pore complex,NPC）

●结构模型

●核孔复合体成份的研究

●核孔复合体的功能：

结构模型

- ◆胞质环（cytoplasmic ring），外环
- ◆核质环（nuclear ring），内环
- ◆辐（spoke）
 - ◇柱状亚单位（column subunit）
 - ◇腔内亚单位(luminal subunit)
 - ◇环带亚单位（annular subunit）
- ◆中央栓（central plug）： transporter

核孔复合体成份的研究

核孔复合体主要由蛋白质构成，其总相对分子质量约为 125×10^6 ，推测可能含有100余种不同的多肽，共1 000多个蛋白质分子。

◆ gp210：结构性跨膜蛋白

◆ p62：功能性的核孔复合体蛋白，具有两个功能结构域

已知的脊椎动物核孔复合体的蛋白成份简表

gp210：结构性跨膜蛋白

◆介导核孔复合体与核被膜的连接，将核孔复合体锚定在“孔膜区”，从而为核孔复合体装配提供一个起始位点

◆在内、外核膜融合形成核孔中起重要作用

◆在核孔复合体的核质交换功能活动中起一定作用

p62：功能性的核孔复合体蛋白，具有两个功能结构域

◆疏水性N端区：可能在核孔复合体功能活动中直接参与核质交换

◆C端区：可能通过与其它核孔复合体蛋白相互作用，从而将p62分子稳定到核孔复合体上，为其N端进行核质交换活动提供支持。

核孔复合体的功能

◆核质交换的双向性亲水通道

核孔复合体物质运输功能示意图

爪蟾卵母细胞核质蛋白注射实验

◆通过核孔复合体的主动运输

◆亲核蛋白与核定位信号

◆亲核蛋白入核转运的步骤

◆转录产物RNA的核输出

通过核孔复合体的主动运输

生物大分子的核质分配主要是通过核孔复合体的主动运输完成的，具有高度的选择性，并且是双向的。

选择性表现在以下三个方面：

- ◆对运输颗粒大小的限制：有效功能直径可被调节约10~20nm，甚至可达26nm，
- ◆主动运输是一个信号识别与载体介导的过程，需要消耗能量，并表现出饱和动力学特征
- ◆主动运输具有双向性，即核输入与核输出

亲核蛋白与核定位信号

- ◆亲核蛋白（karyophilic protein）
在细胞质内合成后，需要或能够进入细胞核内发挥功能的一类蛋白质
- ◆核质蛋白（nucleoplasmin）的入核转运
- ◆核定位信号（nuclear localization signal, NLS）
 - NLS是存在于亲核蛋白内的一些短的氨基酸序列片段，富含碱性氨基酸残基，如Lys、Arg，此外还常含有Pro。
 - NLS的氨基酸残基片段可以是一段连续的序列（T抗原），也可以分成两段，两段之间间隔约10个氨基酸残基（核质蛋白）。
 - NLS序列可存在于亲核蛋白的不同部位，在指导完成核输入后并不被切除。
 - NLS只是亲核蛋白入核的一个必要条件而非充分条件

亲核蛋白入核转运的步骤

- ◆结合：需NLS识别并结合importin；
- ◆转运：需GTP水解提供能量

转录产物RNA的核输出

转录后的RNA通常需加工、修饰成为成熟的RNA分子后才能被转运出核。

- ◆RNA聚合酶I转录的rRNA分子：以RNP的形式离开细胞核，需要能量；
- ◆RNA聚合酶III转录的5s rRNA与 tRNA的核输出由蛋白质介导；
- ◆RNA聚合酶II转录的hn RNA，在核内进行5'端加帽和3'端附加多聚A序列以及剪接等加工过程，然后形成成熟的mRNA出核，5'端的m⁷GpppG“帽子”结构对mRNA的出核转运是必要的；
- ◆细胞核中既有正调控信号保证mRNA的出核转运，也有负调控信号防止mRNA的前体被错误地运输，后者与剪接体(spliceosome)有关。
- ◆mRNA的出核转运过程是有极性的，其5'端在前，3'端在后。
- ◆核输出信号（Nuclear Export Signal, NES）：RNA分子的出核转运需要蛋白分子的帮助，这些蛋白因子本身含有出核信号。
- ◆入核转运与出核转运之间有某种联系，它们可能需要某些共同的因子。

第二节 染色质

- 染色质的概念及化学组成
- 染色质的基本结构单位—核小体(nucleosome)
- 染色质包装的结构模型
- 常染色质和异染色质

一、染色质的概念及化学组成

- 染色质概念
- 染色体DNA
- 染色体蛋白质

染色质概念

- ◆染色质(chromatin):
指间期细胞核内由DNA、组蛋白、非组蛋白及少量RNA组成的线性复合结构,是间期细胞遗传物质存在的形式。
- ◆染色体(chromosome):
指细胞在有丝分裂或减数分裂过程中,由染色质聚缩而成的棒状结构。
 - ◇染色质与染色体是在细胞周期不同的功能阶段可以相互转变的的形态结构
 - ◇染色质与染色体具有基本相同的化学组成,但包装程度不同,构象不同。

染色体DNA

- ◆基因组(genome)
- ◆DNA分子一级结构具有多样性
- ◆DNA二级结构具有多形性(polymorphism)

基因组(genome)

- ◇概念
凡是具有细胞形态的所有生物其遗传物质都是DNA。
在真核细胞中,每条未复制的染色体包装一条DNA分子,一个生物贮存在单倍染色体组中的总遗传信息,称为该生

物的基因组。

- ◆基因组大小通常随物种的复杂性而增加
- ◆基因组中两类遗传信息
 - 编码序列
 - 调控序列

DNA分子一级结构具有多样性

- ◆非重复序列DNA
- ◆中度重复DNA序列
 - 短散在重复元件（short interspersed elements, SINEs）
 - 长散在重复元件（long interspersed elements, LINEs）
在物种进化过程中是基因组中可移动的遗传元件，并且影响基因表达。
- ◆高度重复DNA序列
 - 卫星DNA（satellite DNA），主要分布在染色体着丝粒部位；
 - 小卫星DNA（minisatellite DNA），又称数量可变的串联重复序列，常用于DNA指纹技术（DNA finger-printing）作个体鉴定；
 - 卫星DNA（microsatellite DNA）重复单位序列最短，具高度多态性，在遗传上高度保守，为重要的遗传标志。

DNA二级结构具有多形性(polymorphism)

- ◆三种构型DNA：
 - B型DNA（右手双螺旋DNA）；活性最高的DNA构象；
 - A型DNA，B型DNA的重要变构形式，仍有活性；
 - Z型DNA，Z型DNA是左手螺旋，B型DNA的另一种变构形式，活性明显降低

◆三种构型DNA的主要特征

◆DNA构型的生物学意义

DNA构型的生物学意义

- 沟（特别是大沟）的特征在遗传信息表达过程中起关键作用
- 沟的宽窄及深浅影响调控蛋白对DNA信息的识别
- 三种构型的DNA处于动态转变之中
- DNA二级结构的变化与高级结构的变化是相互关联的，这种变化在DNA复制与转录中具有重要的生物学意义。

染色体蛋白质

负责DNA分子遗传信息的组织、复制和阅读

◆组蛋白(histone):

◆非组蛋白(nonhistone):

◆非组蛋白的不同结构模式

组蛋白(histone)

◆核小体组蛋白(nucleosomal histone): H2B、H2A、H3和H4,帮助DNA卷曲形成核小体的稳定结构

◆H1组蛋白: 在构成核小体时H1起连接作用, 它赋予染色质以极性。

◆特点:

- 真核生物染色体的基本结构蛋白, 富含带正电荷的Arg和Lys等碱性氨基酸, 属碱性蛋白质, 可以和酸性的DNA紧密结合(非特异性结合);
- 没有种属及组织特异性, 在进化上十分保守。

非组蛋白

◆非组蛋白具多样性和异质性

◆对DNA具有识别特异性, 又称序列特异性DNA结合蛋白(sequence specific DNA binding proteins)

◆具有多种功能, 包括基因表达的调控和染色质高级结构的形成。

非组蛋白的不同结构模式

◆ α 螺旋-转角- α 螺旋模式(helix-turn-helix motif)

◆锌指模式(Zinc finger motif)

◆亮氨酸拉链模式(Leucine zipper motif, ZIP)

◆螺旋-环-螺旋结构模式(helix-loop-helix motif, HLH)

◆HMG-盒结构模式(HMG-box motif):

二、染色质的基本结构单位—核小体(nucleosome)

●主要实验证据

●核小体结构要点

主要实验证据

- ◆铺展染色质的电镜观察
 - ◇未经处理的染色质自然结构为30nm的纤丝，经盐溶液处理后解聚的染色质呈现10nm串珠状结构
- ◆用非特异性微球菌核酸酶消化染色质，部分酶解片段分析结果
- ◆应用X射线衍射、中子散射和电镜三维重建技术研究，发现核小体颗粒是直径为11nm、高6.0nm的扁圆柱体，具有二分对称性（dyad symmetry），核心组蛋白的构成是先形成（H3）₂·（H4）₂四聚体，然后再与两个H2A·H2B异二聚体结合形成八聚体
- ◆SV40微小染色体（minichromosome）分析与电镜观察

核小体结构要点

- ◆每个核小体单位包括200bp左右的DNA超螺旋和一个组蛋白八聚体及一个分子H1
- ◆组蛋白八聚体构成核小体的盘状核心结构
- ◆146bp的DNA分子超螺旋盘绕组蛋白八聚体1.75圈，组蛋白H1在核心颗粒外结合额外20bp DNA，锁住核小体DNA的进出端，起稳定核小体的作用。包括组蛋白H1和166bp DNA的核小体结构又称染色质小体。
- ◆两个相邻核小体之间以连接DNA 相连，典型长度60bp，不同物种变化值为0~80bp
- ◆组蛋白与DNA之间的相互作用主要是结构性的，基本不依赖于核苷酸的特异序列，实验表明，核小体具有自组装（self-assemble）的性质
- ◆核小体沿DNA的定位受不同因素的影响，进而通过核小体相位改变影响基因表达

三、染色质包装的结构模型

●染色质包装的多级螺旋模型 (multiple coiling model)

●染色体的骨架-放射环结构模型 (scaffold radial loop structure model)

●染色体包装的不同组织水平

染色质包装的多级螺旋模型

- ◆一级结构：核小体

- ◆二级结构：螺线管(solenoid)
- ◆三级结构：超螺线管(supersolenoid)
- ◆四级结构：染色单体(chromatid)

DNA $\xrightarrow{\text{压缩7倍}}$ 核小体 $\xrightarrow{\text{压缩6倍}}$ 螺线管 $\xrightarrow{\text{压缩40倍}}$ 超螺线管 $\xrightarrow{\text{压缩5倍}}$ 染色单体

染色体的骨架-放射环结构模型

- ◆非组蛋白构成的染色体骨架(chromosomal scaffold)和由骨架伸出的无数的DNA侧环)
- ◆30nm的染色线折叠成环，沿染色体纵轴，由中央向四周伸出,构成放射环。
- ◆由螺线管形成DNA复制环,每18个复制环呈放射状平面排列，结合在核基质上形成微带(miniband)。微带是染色体高级结构的单位,大约 10^6 个微带沿纵轴构建成子染色体。

四、常染色质和异染色质

●常染色质(euchromatin)

●异染色质(heterochromatin):

指间期细胞核中，折叠压缩程度高，处于聚缩状态的染色质组分。

常染色质(euchromatin)

- ◆概念：指间期核内染色质纤维折叠压缩程度低，处于伸展状态（典型包装率750倍），用碱性染料染色时着色浅的那些染色质。
- ◆DNA包装比约为1 000~2 000分之一
- ◆单一序列 DNA 和中度重复序列DNA(如组蛋白基因和tRNA基因)
- ◆并非所有基因都具有转录活性,常染色质状态只是基因转录的必要条件而非充分条件

异染色质(heterochromatin)

- ◆概念：碱性染料染色时着色较深的染色质组分

◆类型

◇结构异染色质（或组成型异染色质）
(constitutive heterochromatin)

◇兼性异染色质(facultative heterochromatin)

结构异染色质或组成型异染色质

- 除复制期以外，在整个细胞周期均处于聚缩状态，形成多个染色中心
- 结构异染色质的特征：
 - ①在中期染色体上多定位于着丝粒区、端粒、次缢痕及染色体臂的某些节段；
 - ②由相对简单、高度重复的DNA序列构成，如卫星DNA；
 - ③具有显著的遗传惰性，不转录也不编码蛋白质；
 - ④在复制行为上与常染色质相比表现为晚复制早聚缩；
 - ⑤在功能上参与染色质高级结构的形成，导致染色质区域性，作为核DNA的转座元件，引起遗传变异。

兼性异染色质

- 在某些细胞类型或一定的发育阶段，原来的常染色质聚缩，并丧失基因转录活性，变为异染色质，如X染色体随机失活
- 异染色质化可能是关闭基因活性的一种途径

第三节 染色体

- 中期染色体的形态结构
- 染色体DNA的三种功能元件 (functional elements)
- 核型与染色体显带
- 巨大染色体 (giant chromosome)

中期染色体的形态结构

- 中期染色体的典型形态
- 类型
- 染色体的主要结构

类型

- ◆ 中着丝粒染色体 (metacentric chromosome)
 - ◆ 亚中着丝粒染色体 (submetacentric chromosome)
 - ◆ 亚端着丝粒染色体 (subtelocentric chromosome)

◆端着丝粒染色体(telocentric chromosome)。

染色体的主要结构

◆着丝粒(centromere)与着丝点(动粒, kinetochore)

◆次缢痕(secondary constriction)

◆核仁组织区(nucleolar organizing region,NOR)

◆随体(satellite)

◆端粒(telomere)

着丝粒与着丝点(动粒)

◇着丝点结构域(kinetochore domain)

- 内板(inner plate)
- 中间间隙(middle space),innerzone
- 外板(outer plate)
- 纤维冠(fibrous corona)

◇中央结构域(central domain)

- CENP-B盒与动粒蛋白

◇配对结构域(pairing domain):

- 内部着丝粒蛋白INCENP(inner centromere protein)
 - 染色单体连接蛋白clips(chromatid linking proteins)

染色体DNA的三种功能元件 (functional elements)

●三种功能元件的实验证明

●自主复制DNA序列(autonomously replicating DNA sequence, ARS):

具有一段11-14bp的同源性很高的富含AT的共有序列及其上下游各200bp左右的区域是维持ARS功能所必需的。

●着丝粒DNA序列(centromere DNA sequence,CEN) :

两个相邻的核心区: 80-90bp的AT区; 11bp的保守区。

●端粒DNA序列(telomere DNA sequence,TEL) :

◆端粒序列的复制

- ◆端粒酶, 在生殖细胞和部分干细胞中有端粒酶活性, 端粒重复序列的长度与细胞分裂次数和细胞衰老有关。

●“人造微小染色体”(artificial minichromosome)。

核型与染色体显带

●核型(karyotype)

是指染色体组在有丝分裂中期的表型, 包括染色体数目、大小、形态特征的总和。

●核型模式图(idiogram)

将一个染色体组的全部染色体逐个按其特征绘制下来，再按长短、形态等特征排列起来的图象称为核型模式图，它代表一个物种的核型模式。

●染色体显带技术

巨大染色体

●多线染色体 (polytene chromosome)

●灯刷染色体 (lampbrush chromosome)

多线染色体

- ◆存在于双翅目昆虫的幼虫组织细胞、某些植物细胞
- ◆多线染色体的来源：核内有丝分裂(endomitosis)
- ◆多线染色体的带及间带：
 - 带和间带都含有基因，可能“管家”基因(housekeeping gene) 位于间带，“奢侈”基因(luxury gene) 位于带上。
- ◆多线染色体与基因活性：胀泡是基因活跃转录的形态学标志

灯刷染色体

●灯刷染色体 (lampbrush chromosome)

- ◆灯刷染色体普遍存在于动物界的卵母细胞，两栖类卵母细胞的灯刷染色体最典型
- ◆灯刷染色体的来源：卵母细胞进行减数第一次分裂时停留在双线期的染色体。
- ◆灯刷染色体的超微结构
- ◆灯刷染色体的转录功能

第四节 核仁(nucleolus)

●核仁的超微结构

●核仁的功能

●核仁周期

一、核仁的超微结构

●超微结构

- 三种基本核仁组分和rRNA的转录
与加工形成RNP的不同事件有关

超微结构

- ◆纤维中心(fibrillar centers,FC)
- ◆致密纤维组分(dense fibrillar component,DFC)
- ◆颗粒组分(granular component,GC)
- ◆核仁相随染色质(nucleolar associated chromatin)
与核仁基质 ((nucleolar matrix)

三种基本核仁组分和rRNA的转录
与加工形成RNP的不同事件有关

- ◆FCs是rRNA基因的储存位点；
- ◆转录主要发生在FC与 DFC的交界处，
并加工初始转录本；
- ◆颗粒组分区（GC）负责装配核糖体亚
单位，是核糖体亚单位成熟和储存的位点。

二、核仁的功能

核糖体的生物发生(ribosome biogenesis)是一个向量过程(vetorical process)：从核仁纤维组分开始，再向颗粒组分延续。

这一过程包括rRNA的合成、加工和核糖体亚单位的装配。

- rRNA基因转录的形态及组织特征
- rRNA前体的加工
- 核糖体亚单位的组装

rRNA基因转录的形态及组织特征

- ◆组织特征
位于NORs的rDNA是rRNA的信息来源。
- ◆形态特征：“圣诞树”样结构。

- ◆rRNA基因的转录采取受控的级联放大机制。

rRNA前体的加工

- ◆加工过程
- ◆修饰与加工
- ◆小分子核仁RNA(snoRNAs)、小分子核仁核糖核蛋白 (snoRNPs)
- ◆引导RNA (guide RNA)

核糖体亚单位的组装

- ◆加工下来的蛋白质和小的RNA存留在核仁中,可能起着催化核糖体构建的作用;
- ◆核糖体的成熟作用只发生在转移到细胞质以后,从而阻止有功能的核糖体与核内加工不完全的hnRNA分子接近;
- ◆核仁的另一个功能涉及mRNA的输出与降解。

三、核仁周期

- 核仁的动态变化
- 核仁结构的动态变化依赖于rDNA转录活性和细胞周期的运行

第五节 染色质结构和基因转录

- 活性染色质及其主要特征

- 染色质结构与基因转录

活性染色质及其主要特征

- 活性染色质(active chromatin)与非活性染色质(inactive chromatin)

- 活性染色质主要特征

活性染色质(active chromatin)与

非活性染色质(inactive chromatin)

- ◆活性染色质是具有转录活性的染色质
- ◆活性染色质的核小体发生构象改变，具有疏松的染色质结构，从而便于转录调控因子与顺式调控元件结合和RNA聚合酶在转录模板上滑动。
- ◆非活性染色质是没有转录活性的染色质

活性染色质主要特征

- ◆活性染色质具有DNase I超敏感位点
(DNase I hypersensitive site, DHS)：染色质上无核小体的DNA片段，通常位于5'-启动子区，长度几百bp。
- ◆染色质活性基因DNase I敏感性的检测
- ◆活性染色质在生化上具有特殊性
 - ◆活性染色质很少有组蛋白H1与其结合；
 - ◆活性染色质的组蛋白乙酰化程度高；
 - ◆活性染色质的核小体组蛋白H2B很少被磷酸化；
 - ◆活性染色质中核小体组蛋白H2A在许多物种很少有变异形式；
 - ◆HMG14和HMG17只存在于活性染色质中。

染色质结构与基因转录

- 疏松染色质结构的形成
- 染色质的区间性
- 染色质模板的转录

疏松染色质结构的形成

- ◆DNA局部结构的改变与核小体相位的影响
 - ◆当调控蛋白与染色质DNA的特定位点结合时，染色质易被引发二级结构的改变；进而引起其它的一些结合位点与调控蛋白的结合。
 - ◆核小体通常定位在DNA特殊位点而利于转录
- ◆DNA甲基化：A/C甲基化/去甲基化（特别是5-mC）
- ◆组蛋白的修饰
 - ◆组蛋白的修饰改变染色质的结构，直接或间接

影响转录活性（磷酸化、甲基化、乙酰化，泛素化（uH2A） // Arg, His, Lys, Ser, Thr)

- ◆组蛋白赖氨酸残基乙酰化（acetylation），影响转录
- ◆HMG结构域蛋白等染色质变构因子的影响
 - ◆HMG结构域可识别某些异型的DNA结构，与DNA弯折和DNA-蛋白质复合体高级结构的形成有关

染色质的区间性

- ◆基因座控制区（locus control region,LCR）
 - ◆染色体DNA上一种顺式作用元件，具有稳定染色质疏松结构的功能；
 - ◆与多种反式因子的结合序列可保证DNA复制时与启动子结合的因子仍保持在原位。。
- ◆隔离子（insulator）
 - ◆防止处于阻遏状态与活化状态的染色质结构域之间的结构特点向两侧扩展的染色质DNA序列，称为隔离子。
 - ◆作用：作为异染色质定向形成的起始位点；提供拓扑隔离区

染色质模板的转录

- ◆基因转录的模板不是裸露的DNA，染色质是否处于活化状态是决定转录功能的关键
- ◆转录的“核小体犁”（nucleosome plow）假说

第六节 核基质与核体

●核基质(nuclear matrix)

●核体（nuclear bodies, NBs）

核基质(nuclear matrix)

- 核基质或核骨架(nuclear skeleton)的概念
 - ◆狭义概念仅指核基质，即细胞核内除了核被膜、核纤层、染色质与核仁以外的网架结构体系。
 - ◆广义概念应包括核基质、核纤层(或核纤层-核孔复合体结构体系),以及染色体骨架。
- 目前对核骨架的研究结论
 - ◆核骨架是存在于真核细胞核内真实的结构体系；

- ◆核骨架与核纤层、中间纤维相互连接形成贯穿于核与质的一个独立结构系统。
- ◆核骨架的主要成分是由非组蛋白的纤维蛋白构成的，含有多种蛋白成分及少量RNA；
- ◆核骨架与DNA复制、基因表达及染色体的包装与构建有密切关系。

核体 (nuclear bodies, NBs)

●核体概念

●螺旋体 (coiled bodies, CBs)

●早幼粒细胞白血病蛋白体

(promyelocytic leukaemia protein bodies, PML bodies)

核体概念

- ◆间期核内除染色质与核仁结构外，在染色质之间的空间还含许多形态上不同的亚核结构域 (subnuclear domain)，统称为核体。如螺旋体和早幼粒细胞白血病蛋白体。
- ◆在细胞的各种事件中，核体可能代表不同核组分的储存或查封位点或称之为分子货仓 (molecular warehouse)。

螺旋体 (coiled bodies, CBs)

- ◆小核糖核蛋白质 (sn RNPs)、细胞周期控制蛋白和几种基本转录因子，如p80 coilin
- ◆螺旋体的功能
 - ◇与snRNP的生物发生 (biogenesis) 有关；
 - ◇CBs在基因表达协调反馈调节中有作用。

早幼粒细胞白血病蛋白体

- ◆PML体的功能
 - ◇转录调节
 - ◇病毒感染的靶结构
 - ◇PML体组成的改变与某些疾病表型的发生有关
 - ◇PML蛋白的功能可能是作为负生

- 长调节子和肿瘤抑制子而发挥作用
- ◆PML可能介导程序性细胞死亡，PML体在细胞周期调控中起作用

第九章 核糖体(ribosome)

●核糖体的类型与结构

●多聚核糖体与蛋白质的合成

第一节 核糖体的类型与结构

核糖体是合成蛋白质的细胞器，其唯一的功能是按照mRNA的指令由氨基酸高效且精确地合成多肽链。

●核糖体的基本类型与成分

●核糖体的结构

●核糖体蛋白质与rRNA的功能分析

一、核糖体的基本类型与成分

●核糖核蛋白体,简称核糖体(ribosome)

◆基本类型

- ◆附着核糖体
- ◆游离核糖体
- ◆70S的核糖体
- ◆80S的核糖体

◆主要成分

- ◆r蛋白质：40%，核糖体表面
- ◆rRNA:60%，核糖体内部

二、核糖体的结构

●结构与功能的分析方法

- 蛋白质合成过程中很多重要步骤与50S核糖体大亚单位相关

结构与功能的分析方法

- ◆离子交换树脂可分离纯化各种r蛋白；
- ◆纯化的r蛋白与纯化的rRNA进行核糖体的重组装，
显示核糖体中r蛋白与rRNA的结构关系
- ◆双向电泳技术可显示出*E.coli*核糖体在装配各阶段中，
与rRNA结合的蛋白质的类型
- ◆双功能的交联剂和双向电泳分离可用于研究r蛋白在
结构上的相互关系
- ◆电镜负染色与免疫标记技术结合，研究r蛋白在核糖
体的亚单位上的定位。
- ◆对rRNA，特别是对16S rRNA结构的研究
- ◆70S核糖体的小亚单位中rRNA与全部的r蛋白关系
的空间模型

- ◇同一生物中不同种类的r蛋白的一级结构
均不相同，在免疫学上几乎没有同源性。

- ◇不同生物同一种类r蛋白之间具有很高的
的同源性，并在进化上非常保守。

- ◇蛋白质结合到rRNA上具有先后层次性。

- ◇核糖体的重组装是自我装配过程

- ◇16SrRNA的一级结构是非常保守的

- ◇16SrRNA的二级结构具有更高的保守性：
臂环结构(stem-loop structure)

- ◇rRNA臂环结构的三级结构模型
蛋白质合成过程中很多重
要步骤与50S核糖体大亚单位相关
- ◆涉及的多数因子为G蛋白(具有GTPase活性)，核糖体上

与之相关位点称为GTPase相关位点。

- ◆最近人们成功地制备L11-rRNA复合物的晶体，获得了其空间结构高分辨率的三维图象。
- ◆这一结果证实了前人用各种实验技术所获得的种种结论
- ◆提出直观、可靠且比人们的预料更为精巧复杂和可能的作用机制，从而为揭开核糖体这一具有30多亿年历史的古老的高度复杂的分子机器的运转奥秘迈出了极重要的一步。

三、核糖体蛋白质与rRNA的功能分析

- 核糖体上具有一系列与蛋白质合成有关的结合位点与催化位点

- 在蛋白质合成中肽酰转移酶的活性研究

核糖体上具有一系列与蛋白质合成有关的结合位点与催化位点

- ◆与mRNA的结合位点
- ◆与新掺入的氨酰-tRNA的结合位点—氨酰基位点，又称A位点
- ◆与延伸中的肽酰-tRNA的结合位点—肽酰基位点，又称P位点
- ◆肽酰转移后与即将释放的tRNA的结合位点—E位点(exit site)
- ◆与肽酰tRNA从A位点转移到P位点有关的转移酶(即延伸因子EF-G)的结合位点
- ◆肽酰转移酶的催化位点
- ◆与蛋白质合成有关的其它起始因子、延伸因子和终止因子的结合位点

在蛋白质合成中肽酰转移酶的活性研究

- ◆核糖体蛋白

- ◆在核糖体中rRNA是起主要作用的结构成分

- ◆r蛋白质的主要功能

核糖体蛋白

- ◆很难确定哪一种蛋白具有催化功能：
在*E.coli*中核糖体蛋白突变甚至缺失对蛋白质合成并没有表现出“全”或“无”的影响。
- ◆多数抗蛋白质合成抑制剂的突变株，并非由于r蛋白的基因突变而往往是 rRNA基因突变。

- ◆在整个进化过程中rRNA的结构比核糖体蛋白的结构具有更高的保守性。

在核糖体中rRNA是起主要作用的结构成分

- ◆具有肽酰转移酶的活性；
- ◆为tRNA提供结合位点(A位点、P位点和E位点)；
- ◆为多种蛋白质合成因子提供结合位点；
- ◆在蛋白质合成起始时参与同mRNA选择性地结合以及在肽链的延伸中与mRNA结合；
- ◆核糖体大小亚单位的结合、校正阅读(proofreading)、无意义链或框架漂移的校正、以及抗菌素的作用等都与rRNA有关。

r蛋白质的主要功能

- ◆对rRNA 折叠成有功能的三维结构是十分重要的；
- ◆在蛋白质合成中，某些r蛋白可能对核糖体的构象起“微调”作用；
- ◆在核糖体的结合位点上甚至可能在催化作用中，核糖体蛋白与rRNA共同行使功能。

第二节 聚核糖体与蛋白质的合成

●多聚核糖体(polyribosome或polysome)

●蛋白质的合成

●RNA在生命起源中的地位及其演化过程

一、多聚核糖体 (polyribosome或polysome)

◆概念

核糖体在细胞内并不是单个独立地执行功能，而是由多个甚至几十个核糖体串连在一条mRNA分子上高效地进行肽链的合成，这种具有特殊功能与形态结构的核糖体与mRNA的聚合体称为多聚核糖体。

◆多聚核糖体的生物学意义

- ◆细胞内各种多肽的合成，不论其分子量的大小或是mRNA的长短如何，单位时间内所合成的多肽分子数目都大体相等。

- ◆以多聚核糖体的形式进行多肽合成，对mRNA的利用及对其浓度的调控更为经济和有效。

三、RNA在生命起源中的地位及其演化过程

- ◆生命是自我复制的体系
- ◆DNA代替了RNA的遗传信息功能
- ◆蛋白质取代了绝大部分RNA酶的功能

生命是自我复制的体系

- ◆三种生物大分子，只有RNA既具有信息载体功能又具有酶的催化功能。因此，推测RNA可能是生命起源中最早的生物大分子。
- ◆核酶(ribosome)：具有催化作用的RNA。

- ◆由RNA催化产生了蛋白质

DNA代替了RNA的遗传信息功能

- ◆DNA双链比RNA单链稳定；
- ◆DNA链中胸腺嘧啶代替了RNA链中的尿嘧啶，使之易于修复。
- ◆蛋白质取代了绝大部分RNA酶的功能
- ◆蛋白质化学结构的多样性与构象的多变性；

- ◆与RNA相比，蛋白质能更为有效地催化多种生化反应，并提供更为复杂的细胞结构成分，逐渐演化成今天的细胞。

第十章 细胞骨架(Cytoskeleton)

第一节 细胞质骨架

- 微丝(microfilament, MF)

●微管 (microtubules)

●中间纤维 (intermediate filament,IF)

●细胞骨架结构与功能总结

第二节 细胞核骨架

●核基质(Nuclear Matrix)

●染色体骨架

●核纤层(Nuclear Lamina)

一、微丝(microfilament, MF)

又称肌动蛋白纤维(actin filament)，是指真核细胞中由肌动蛋白(actin)组成、直径为7nm的骨架纤维。

- 成分
- 装配
- 微丝特异性药物
- 微丝结合蛋白
- 微丝功能
- 肌肉收缩(muscle contraction)

成 分

- 肌动蛋白(actin)是微丝的结构成分,外观呈哑铃状,这种actin又叫G-actin,将G-actin形成的微丝又称为F-actin。

装 配

- ◆MF是由G-actin单体形成的多聚体,肌动蛋白单体具有极性,装配时呈头尾相接,故微丝具有极性,既正极与负极之别。
- ◆体外实验表明, MF正极与负极都能生长,生长快的一端为正极,慢的一端为负极;去装配时,负极比正极快。由于G-actin在正极端装配,负极去装配,从而表现为踏车行为。
- ◆体内装配时, MF呈现出动态不稳定性,主要取决于F-actin结合的ATP水解速度与游离的G-actin单体浓度之间的关系。
- ◆ MF动态变化与细胞生理功能变化相适应。在体内,有些微丝是永久性的结构,有些微丝是暂时性的结构。

微丝特异性药物

- ◆细胞松弛素(cytochalasins): 可以切断微丝,并结合在微丝正极抑制肌动蛋白聚合,因而导致微丝解聚。
- ◆鬼笔环肽(phalloidin): 与微丝侧面结合,防止MF解聚。
- ◆影响微丝装配动态性的药物对细胞都有毒害,说明微丝功能的发挥依赖于微丝与肌动蛋白单体库间的动态平衡。这种动态平衡受actin单体浓度和微丝结合蛋白的影响。

微丝结合蛋白

整个骨架系统结构和功能在很大程度上受到不同的细胞骨架结合蛋白的调节。

- ◆ actin单体结合蛋白
这些小分子蛋白与actin单体结合,阻止其添加到微丝末端,当细胞需要单体时才释放,主要用于actin装配的调节,如profilin等。
- ◆微丝结合蛋白
- ◆微丝结合蛋白将微丝组织成以下三种主要形式:

- Parallel bundle: MF同向平行排列,主要发
毛与丝状伪足。 现于微绒
- Contractile bundle: MF反向平行排列,主要
发现于应力纤维和有丝分裂收缩环。
- Gel-like network: 细胞皮层(cell cortex)中微丝
排列形式, MF相互交错排列。

微丝功能

- ◆维持细胞形态, 赋予质膜机械强度
- ◆细胞运动
- ◆微绒毛(microvillus)
- ◆应力纤维(stress fiber)
- ◆参与胞质分裂
- ◆肌肉收缩(muscle contraction)

微丝遍及胞质各处,集中分布于质膜下,和其结合蛋白形成网络结构,维持细胞形状和赋予质膜机械强度,如哺乳动物红细胞膜骨架的作用。

成纤维细胞爬行与微丝装配和解聚相关

是肠上皮细胞的指状突起，用以增加肠上皮细胞表面积，以利于营养的快速吸收。

应力纤维 (stress fiber) :广泛存在于真核细胞。

成分：肌动蛋白、肌球蛋白、原肌球蛋白和 α -辅肌动蛋白。介导细胞间或细胞与基质表面的粘着。

(细胞贴壁与粘着斑的形成相关，在形成粘斑的质膜下，微丝紧密平行排列成束，形成应力纤维, 具有收缩功能。)

收缩环由大量反向平行排列的微丝组成，其收缩机制是肌动蛋白和肌球蛋白相对滑动。

肌肉收缩(muscle contraction)

肌肉可看作一种特别富含细胞骨架的效力非常高的能量转换器，它直接将化学能转变为机械能。

- ◆肌肉的细微结构(以骨骼肌为例)
- ◆肌小节的组成
 - ◆肌肉收缩系统中的有关蛋白
- ◆肌肉收缩的滑动模型
- ◆由神经冲动诱发的肌肉收缩基本过程

肌肉收缩系统中的有关蛋白

- ①肌球蛋白(myosin)–所有actin-dependent motor proteins都属于该家族，其头部具ATP酶活力，沿微丝从负极到正极进行运动。
 - Myosin II
 - 主要分布于肌细胞，有两个球形头部结构域(具有ATPase活性)和尾部链, 多个Myosin尾部相互缠绕，形成myosin filament, 即粗肌丝。
- ②原肌球蛋白(tropomyosin, Tm)由两条平行的多肽链形成 α -螺旋构型, 位于肌动蛋白螺旋沟内, 结合于细丝, 调节肌动蛋白与肌球蛋白头部的结合。
- ③肌钙蛋白(Troponin, Tn)为复合物, 包括三个亚基: TnC(Ca^{2+} 敏感性蛋白)能特异与 Ca^{2+} 结合; TnT(与原肌球蛋白结合); TnI(抑制肌球蛋白ATPase活性)

由神经冲动诱发的肌肉收缩基本过程

- 动作电位的产生
- Ca^{2+} 的释放

- 原肌球蛋白位移
- 肌动蛋白丝与肌球蛋白丝的相对滑动
- Ca²⁺的回收

二. 微管 (Microtubules)

- 微管结构与组成
- 装配
- 微管特异性药物
- 微管组织中心(MTOC)
- 微管结合蛋白(MAP)
- 微管功能

微管结构与组成

微管可装配成单管,二联管(纤毛和鞭毛中),三联管(中心粒和基体中)。

装 配

- ◆装配方式
- ◆所有的微管都有确定的极性
- ◆微管装配是一个动态不稳定过程

α -微管蛋白和 β -微管蛋白形成 $\alpha\beta$ 二聚体, $\alpha\beta$ 二聚体先形成环状核心(ring),经过侧面增加二聚体而扩展为螺旋带, $\alpha\beta$ 二聚体平行于长轴重复排列形成原纤维(protofilament)。当螺旋带加宽至13根原纤维时,即合拢形成一段微管。

- 微管装配的动力学不稳定性是指微管装配生长与快速去装配的一个交替变换的现象
- 动力学不稳定性产生的原因:
微管两端具GTP帽(取决于微管蛋白浓度),微管将继续组装,反之,无GDP帽则解聚。

微管特异性药物

- ◆秋水仙素(colchicine) 阻断微管蛋白组装成微管，可破坏纺锤体结构。
- ◆紫杉酚(taxol)能促进微管的装配，并使已形成的微管稳定。
- ◆为行使正常的微管功能，微管动力学不稳定性是其功能正常发挥的基础。

微管组织中心(MTOC)

- ◆概念：
- ◆常见微管组织中心
- ◆中心体(centrosome)
- ◆基体(basal body)

微管在生理状态或实验处理解聚后重新装配的发生处称为微管组织中心(microtubule organizing center, MTOC)。

常见微管组织中心

- ◆间期细胞MTOC：→ 中心体(动态微管)
- ◆分裂细胞MTOC：→有丝分裂纺锤体极(动态微管)
- ◆鞭毛纤毛细胞MTOC：→基体(永久性结构)

中心体(centrosome)

- 中心体(centrosome)结构
- 中心体复制周期
- γ 管蛋白：位于中心体周围的基质中，环形结构，结构稳定，为 $\alpha\beta$ 微管蛋白二聚体提供起始装配位点，所以又叫成核位点

基体(basal body)

- 位于鞭毛和纤毛根部的类似结构称为基体 (basal body)
- 中心粒和基体均具有自我复制性质

微管功能

- ◆维持细胞形态
- ◆细胞内物质的运输
- ◆细胞器的定位
- ◆鞭毛(flagella)运动和纤毛(cilia)运动
- ◆纺锤体与染色体运动

维持细胞形态

用秋水仙素处理细胞破坏微管,导致细胞变圆,说明微管对维持细胞的不对称形状是重要的。对于细胞突起部分,如纤毛、鞭毛、轴突的形成和维持,微管亦起关键作用。

细胞内物质的运输

真核细胞内部是高度区域化的体系,细胞中合成的物质、一些细胞器等必须经过细胞内运输过程。这种运输过程与细胞骨架体系中的微管及其Motor protein有关。

·Motor proteins

- 神经元轴突运输的类型及运输模式
- 色素颗粒的运输

Motor proteins

目前已鉴定的Motor proteins多达数十种。根据其结合的骨架纤维以及运动方向和携带的转运物不同而分为不同类型。胞质中微管motor protein分为两大类:

- 驱动蛋白(kinesin):通常朝微管的正极方向运动
- 动力蛋白(cytoplasmic dynein):朝微管的负极运动

Kinesin与Dynein的分子结构

Kinesin与Dynein的运输方式

鞭毛(flagella)运动和纤毛(cilia)运动

·纤毛和鞭毛的运动形式

·纤毛与鞭毛的结构

·纤毛运动机制

三、中间纤维 (intermediate filament,IF)

10nm纤维,因其直径介于肌粗丝和细丝之间,故被命名为中间纤维。IF几乎分布于所有动物细胞,往往形成一个网络结构,特别是在需要承受机械压力的细胞中含量相当丰富。如上皮细胞中。除了胞质中,在内核膜下的核纤层也属于IF。

- 中间纤维的装配
- 中间纤维的成分与分布
- 中间纤维结合蛋白 (IFAP) 及其判定标准
- 中间纤维的功能

中间纤维的装配

◆ 中间纤维装配过程

◆ IF装配与MF, MT装配相比, 有以下几个特点:

- IF装配的单体是纤维状蛋白 (MF, MT的单体呈球形);
- 反向平行的四聚体导致IF不具有极性;
 - IF在体外装配时不需要核苷酸或结合蛋白的辅助,
 - 在体内装配后, 细胞中几乎不存在IF单体(但IF的存在形式也可以受到细胞调节, 如核纤层的装配与解聚)。

中间纤维的成分与分布

IF成分比MF, MT复杂, 具有组织特异性。

IF在形态上相似, 而化学组成有明显的差别。

◆ 中间纤维类型与分布

◆ 中间纤维蛋白的表达具有严格的组织特异性

中间纤维的功能

- ◆ 增强细胞抗机械压力的能力
- ◆ 角蛋白纤维参与桥粒的形成和维持

- ◆ 结蛋白纤维是肌肉Z盘的重要结构组分，
对于维持肌肉细胞的收缩装置起重要作用
- ◆ 神经元纤维在神经细胞轴突运输中起作用
- ◆ 参与传递细胞内机械的或分子的信息
- ◆ 中间纤维与mRNA的运输有关

第二节 细胞核骨架

- 核基质(Nuclear Matrix)
- 染色体骨架
- 核纤层(Nuclear Lamina)

核基质(Nuclear Matrix)

- 形态结构
- 成分
- 核骨架结合序列
- 功能

形态结构

- ◆ 研究核骨架的分级抽提方法

非离子去垢剂溶解膜结构系统,胞质中可溶性成分随之流失;再用Tween40和脱氧胆酸钠处理,胞质中的微管、微丝与一些蛋白结构被溶去,胞质中只有中间纤维网能完好存留;然后用核酸酶与0.25mol/L硫酸铵处理,染色质中DNA、RNA和组蛋白被抽提,最终核内呈现一个精细发达的核骨架网络,结合非树脂包埋-去包埋剂电镜制样方法,可清晰地显示核骨架-核纤层-中间纤维结构体系。

成分

核骨架不象胞质骨架那样由非常专一的蛋白成分组成,核骨架的成分比较复杂,主要成分是核骨架蛋白及核骨架结合蛋白,并含有少量RNA。

- ◆ 核骨架蛋白
- ◆ 骨架结合蛋白
- ◆ 其它

核骨架结合序列

- ◆ DNA序列中的核骨架结合序列(matrix associated region, MAR)
这部分DNA与核骨架蛋白的结合不为高盐溶液抽提所破坏,在基因表达调控中有作用
- ◆核骨架结合序列的基本特征
- ◆ MAR的功能
 - 通过与核骨架蛋白的结合,将DNA放射环锚定在核骨架上;
 - 作为许多功能性基因调控蛋白的结合位点。

核骨架结合序列的基本特征

- 富含AT
- 富含DNA解旋元件(DNA unwinding elements)
- 富含反向重复序列(Inverted Repeats)
- 含有转录因子结合位点。

功 能

- ◆核骨架与DNA复制
- ◆核骨架与基因表达
大量研究工作表明真核细胞中RNA的转录和加工均与核骨架有关。具有转录活性的基因是结合在核骨架上的;RNA聚合酶在核骨架上具有结合位点。
- ◆核骨架与病毒复制
- ◆核骨架与染色体构建

二、染色体骨架

- 染色体骨架/放射环模型
- 染色体骨架的真实性
 - ◆银染法能选择性地显示染色体轴结构
 - ◆DNA酶和RNA酶处理或用0.4mol/L H₂SO₄处理去除组蛋白,对染色体轴没有影响,用胰蛋白酶消化则染色体轴破坏,说明染色体轴是非组蛋白性的。
 - ◆染色体骨架/放射环模型在分子水平上得到两个直接证据
- 染色体骨架与染色体高级结构

三、核纤层(Nuclear Lamina)

- 核纤层分布与形态结构
- 成分—核纤层蛋白(Lamin)
- 核纤层蛋白的分子结构及其与中间纤维蛋白的关系
- 核纤层蛋白在细胞分化中的表达
- 核纤层在细胞周期中的变化
- 功能

成分—核纤层蛋白(Lamin)

- ◆哺乳动物和鸟类细胞中有
 - 核纤层蛋白A
 - 核纤层蛋白B
 - 核纤层蛋白C

核纤层蛋白的分子结构及其与中间纤维蛋白的关系

- ◆核纤层与中间纤维之间的共同点
 - 两者均形成10nm纤维；
 - 两者均能抵抗高盐和非离子去垢剂的抽提；
 - 某些抗中间纤维蛋白的抗体能与核纤层发生交叉反应
 - LaminA和LaminC的cDNA克隆推导出核纤层蛋白的氨基酸顺序与中间纤维蛋白高度保守的 α -螺旋区有很强的同源性，说明核纤层蛋白是中间纤维蛋白。

核纤层在细胞周期中的变化

- ◆A型核纤层蛋白在组装核纤层时通过蛋白水解失去C端(异戊二烯化, isoprenylation)。核膜崩解, 核纤层解聚时, A型核纤层蛋白以可溶性单体形式弥散到胞质中。
- ◆B型核纤层蛋白则永久法尼基化(farnesylated), 与核膜小泡保持结合状态, 当核膜重现时, 在染色体周围重装配, 形成子细胞的核纤层。

功 能

- ◆为核膜及染色质提供了结构支架

第十一章 细胞增殖及其调控

细胞增殖(cell proliferation)的意义

- ◆细胞增殖(cell proliferation)是细胞生命活动的重要特征之一, 是生物繁育的基础。
- ◆单细胞生物细胞增殖导致生物个体数量的增加。
- ◆多细胞生物由一个单细胞(受精卵)分裂发育而来, 细胞增殖是多细胞生物繁殖基础。
- ◆成体生物仍然需要细胞增殖, 主要取代衰老死亡的细胞, 维持个体细胞数量的相对平衡和机体的正常功能。
- ◆机体创伤愈合、组织再生、病理组织修复等, 都要依赖细胞增殖。

第一节 细胞周期与细胞分裂

●细胞周期(cell cycle)概述

●有丝分裂(mitosis)

●胞质分裂(Cytokinesis)

●减数分裂(Meiosis)

第二节 细胞周期的调控(Cell-Cycle Control)

●细胞周期调控系统的主要作用

●细胞周期检验点(Cell Cycle Checkpoint)

●MPF

●Cyclin-Cdk复合物的多样性及细胞周期运转

●细胞周期运转的阻遏(细胞周期运转的负调控)

一、细胞周期(cell cycle)概述

●细胞周期

●细胞周期中各个不同时相及其主要事件

●细胞周期长短测定

●细胞周期同步化

●特异的细胞周期

二、有丝分裂(mitosis)

●前期(prophase)

●前中期(prometaphase)

●中期(metaphase)

●后期(anaphase)

●末期(telophase)

三、胞质分裂(Cytokinesis)

●动物细胞胞质分裂

●植物细胞胞质分裂

四、减数分裂(Meiosis)

●减数分裂概念与过程：

●减数分裂的意义

●减数分裂特点

●脊椎动物配子发生过程

细胞周期

◆概念：

细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的一个有序过程。其间细胞遗传物质和其他内含物分配给子细胞。

◆细胞周期时相组成

◆细胞周期时间

◆根据增殖状况，细胞分类三类

细胞周期时相组成

·间期(interphase): G1 phase, S phase, G2 phase

·M phase: 有丝分裂期(Mitosis), 胞质分裂期(Cytokinesis)

细胞沿着G1→S→G2→M→G1周期性运转,在间期细胞体积增大(生长),在M期细胞 先是核分裂,接着胞质分裂,完成一个细胞周期。

细胞周期时间

·不同细胞的细胞周期时间差异很大

·S+G2+M 的时间变化教小,细胞周期时间长短主要差别在G1期

·有些分裂增殖的细胞缺乏G1、G2期

根据增殖状况，细胞分类三类

·连续分裂细胞(cycling cell)

·休眠细胞(G₀细胞)

·终末分化细胞

G₀期细胞和终末分化细胞的界限有时难以划分，有的细胞过去认为属于终末分化细胞，目前可能被认为是G₀期细胞。

细胞周期中不同时相及其主要事件

◆ G₁期

◆ S 期

◆ G₂期

◆ M 期

G₁期

·与DNA合成启动相关，开始合成细胞生长所需要的多种蛋白质、RNA、碳水化合物、脂等，同时染色质去凝集。

G₂期

·DNA复制完成，在G₂期合成一定数量的蛋白质和RNA分子

M 期

·M期即细胞分裂期，真核细胞的细胞分裂主要包括两种方式，即有丝分裂(mitosis)和减数分裂(meiosis)。遗传物质和细胞内其他物质分配给子细胞。

S期

·DNA复制与组蛋白合成同步，组成核小体串珠结构

·S期DNA合成不同步

细胞周期长短测定

- ◆脉冲标记DNA复制和细胞分裂指数观察测定法
- ◆流式细胞仪测定法(Flow Cytometry)
- ◆缩时摄像技术，
可以得到准确的细胞周期时间及分裂间期和分裂期的准确时间。

细胞周期同步化

- ◆自然同步化，如有一种粘菌的变形体plasmodia，
某些受精卵早期卵裂
- ◆人工选择同步化
- ◆药物诱导法
- ◆条件依赖性突变株在细胞周期同步化中的应用：
将与细胞周期调控有关的条件依赖性突变株转移到限定条件下培养，所有细胞便被同步化在细胞周期中某一特定时期。

人工选择同步化

- 有丝分裂选择法：用于单层贴壁生长细胞。优点是细胞未经任何药物处理，细胞同步化效率高。缺点是分离的细胞数量少。
- 密度梯度离心法：根据不同时期的细胞在体积和重量上存在差别进行分离。优点是方法简单省时，效率高，成本低。缺点是对大多数种类的细胞并不适用。

药物诱导法

- DNA合成阻断法 — G1/S-TdR双阻断法：最终将细胞群阻断于G1/S交界处。优点是同步化效率高，

几乎适合于所有体外培养的细胞体系。缺点是诱导过程可造成细胞非均衡生长

- 分裂中期阻断法：通过抑制微管聚合来抑制细胞分裂器的形成，将细胞阻断在细胞分裂中期。优点是操作简便，效率高。缺点是这些药物的毒性相对较大

特异的细胞周期

特异的细胞周期是指那些特殊的细胞所具有的与标准的细胞周期相比有着鲜明特点的细胞周期。

- ◆ 爪蟾早期胚胎细胞的细胞周期
- ◆ 酵母细胞的细胞周期
- ◆ 植物细胞的细胞周期
- ◆ 细菌的细胞周期

爪蟾早期胚胎细胞的细胞周期

- 细胞分裂快, 无G1期, G2期非常短, S期也短(所有复制子都激活), 以至认为仅含有S期和M期
- 无需临时合成其它物质
- 子细胞在G1、G2期并不生长, 越分裂体积越小
- 细胞周期调控因子和调节机制与一般体细胞标准的细胞周期基本是一致的

酵母细胞的细胞周期

· 酵母细胞的细胞周期与标准的细胞周期在时相和调控方面相似

· 酵母细胞周期明显特点:

- 酵母细胞周期持续时间较短;
- 封闭式细胞分裂, 即细胞分裂时核膜不解聚;
- 纺锤体位于细胞核内;
- 在一定环境下, 也进行有性繁殖

植物细胞的细胞周期

- 植物细胞的细胞周期与动物细胞的标准细胞周期非常相似，含有G1期、S期、G2期和M期四个时期。
- 植物细胞不含中心体，但在细胞分裂时可以正常组装纺锤体。
- 植物细胞以形成中板的形式进行胞质分裂

细菌的细胞周期

- 慢生长细菌细胞周期过程与真核细胞周期过程有一定相似之处。其DNA复制之前的准备时间与G1期类似。分裂之前的准备时间与G2期类似。再加上S期和M期，细菌的细胞周期也基本具备四个时期
- 细菌在快速生长情况下，如何协调快速分裂和最基本的DNA复制速度之间的矛盾

前期 (prophase)

- ◆标志前期开始的第一个特征是染色质开始浓缩 (condensation) 形成有丝分裂染色体 (mitotic chromosome)
- ◆第二个特征细胞骨架解聚，有丝分裂纺锤体 (mitotic spindle) 开始装配
- ◆Golgi体、ER等细胞器解体，形成小的膜泡

间期动物细胞含一个MTOC，即中心体，在S期末，两个中心粒在各自垂直的方向复制出一个中心粒，形成两个中心体。当前期开始时，2个中心体移向细胞两极，并同时组织微管生长，由两极形成的微管通过微管结合蛋白在正极末端相连，最后形成有丝分裂纺锤体。

前中期 (prometaphase)

- ◆核膜破裂成小的膜泡，这一过程是由核纤层蛋白中特异的Ser残基磷酸化导致核纤层解体
- ◆纺锤体微管与染色体的动粒结合，捕捉住染色体

每个已复制的染色体有两个动粒，朝相反方向，保证与两极的微管结合；纺锤体微管捕捉住染色体后，形成三种类型的微管

- ◆不断运动的染色体开始移向赤道板。细胞周期也由前中期逐渐向中期运转。

中期 (metaphase)

- ◆所有染色体排列到赤道板 (Metaphase Plate) 上，标志着细胞分裂已进入中期
- ◆是什么机制确保染色体正确排列在赤道板上？
 - 着丝粒微管动态平衡形成的张力

后期 (anaphase)

- ◆排列在赤道面上的染色体的姐妹染色单体分离产生向极运动
- ◆后期 (anaphase) 大致可以划分为连续的两个阶段，即后期A和后期B
 - 后期A，动粒微管去装配变短，染色体产生两极运动
 - 后期B，极间微管长度增加，两极之间的距离逐渐拉长，介导染色体向极运动

末期 (telophase)

- ◆染色单体到达两极，即进入了末期 (telophase)，到达两极的染色单体开始去浓缩
- ◆核膜开始重新组装
- ◆ Golgi体和ER重新形成并生长
- ◆核仁也开始重新组装，RNA合成功能逐渐恢复，有丝分裂结束

动物细胞胞质分裂

- ◆胞质分裂 (cytokinesis) 开始于细胞分裂后期，在赤道板周围细胞表面下陷，形成环形缢缩，称为分裂沟 (furrow)。分裂沟的位置与纺锤体极性微管和钙离子浓度升高的变化有关

- ◆胞质分裂开始时，大量肌动蛋白和肌球蛋白在中体处组装成微丝并相互组成微丝束，环绕细胞，称为收缩环（contractile ring）。收缩环收缩、收缩环处细胞膜融合并形成两个子细胞

植物细胞胞质分裂

- ◆与动物细胞胞质分裂不同的是，植物细胞胞质分裂是因为在细胞内形成新的细胞膜和细胞壁而将细胞分开

减数分裂概念与过程

- ◆概念：减数分裂是细胞仅进行一次DNA复制，随后进行两次分裂，染色体数目减半的一种特殊的有丝分裂

- ◆减数分裂过程

减数分裂的意义

- ◆确保世代间遗传的稳定性；
- ◆增加变异机会，确保生物的多样性，增强生物适应环境变化的能力。
- ◆减数分裂是生物有性生殖的基础，是生物遗传、生物进化和生物多样性的基础保证。

减数分裂特点

- ◆遗传物质只复制一次，细胞连续分裂两次，导致染色体数目减半
- ◆S期持续时间较长
- ◆同源染色体在减数分裂期I(MeiosisI)配对联会、基因重组
- ◆减数分裂同源染色体配对排列在中期板上，第一次分列时，同源染色体分开

·前期I分为细线期，偶线期，粗线期，双线期，终变期等五个阶段

·形成联会复合体(Synaptonemal Complex, SC)

·同源染色体间遗传物质重组, 产生新的基因组合

一、细胞周期调控系统的主要作用

- ◆在适当时候激活细胞周期各个时相的相关酶和蛋白, 然后自身失活(正调控)
- ◆确保每一时相事件的全部完成(负调控)
- ◆对外界环境因子起反应(如多细胞生物对增殖信号的反应)

二、细胞周期检验点(checkpoint)

- ◆细胞周期检验点是细胞周期调控的一种机制, 主要是确保周期每一时相事件的有序、全部完成并与外界环境因素相联系
- ◆细胞周期检验点及其作用

G1期检验点：酵母——Start；动物细胞——Restriction Point

三、MPF

(Maturation-promoting factor, Mitosis-promoting factor)

- MPF(Maturation-promoting factor, Mitosis-promoting factor)的发现及其生化实质
- Mitotic Cyclin-Cdk复合物的活化与功能

MPF的发现及其生化实质

- ◆细胞融合与PCC(Premature chromosomal condense)
- ◆爪蟾卵子成熟过程
- ◆MPF的发现

- ◆MPF是一种使多种底物蛋白磷酸化的蛋白激酶；
由M期Cyclin-Cdk(Cyclin-dependent protein kinase)
形成的复合物。MPF=CDK1=p34^{cdc2}+cyclinB

Mitotic Cyclin-Cdk复合物的活化与功能

- ◆活化

- 随Cyclin浓度变化而变化
- 激酶与磷酸酶的调节，
活化的MPF可使更多的MPF活化

- ◆功能：启动细胞从G2期进入M期的相关事件

四、Cyclin-Cdk复合物的多样性及细胞周期运转

- ◆Cyclin-Cdk复合物的多样性

Cyclin-Cdk---调控细胞周期的引擎：不同的周期蛋白与不同的CDK结合，构成不同的Cyclin-Cdk；
不同的Cyclin-Cdk在不同的时相表现活性，影响不同的下游事件。

- ◆G1 Cyclin-Cdk复合物对Rb蛋白磷酸化而调控G1检验点

- ◆Mitotic Cyclin-Cdk复合物激活

Anaphase Promoting Complex (APC),
调控纺锤体装配检验点

- ◆周期细胞M-Cyclin的调控

- ◆细胞周期调控模型总结

·APC介导选择性降解的靶蛋白与Ubiquitin结合
(通过泛素依赖性途径降解)

·APC主要介导两类蛋白降解：Anaphase Inhibitors
和Mitotic Cyclin. 前者维持姐妹染色单体粘连，抑制后期启动；后者的降解意味着有丝分裂即将结束，即染色体开始去凝集，核膜重建。

· Cdc20 和Mad2蛋白位于动粒上，在染色体结合有丝分裂纺锤体前将不能从动粒上释放，由于Mad2与Cdc20结合而抑制APC的活性。所以只有所有染色体都与纺锤体结合后，APC才有活性，才启动细胞向后期转换。

五、细胞周期运转的阻遏 (细胞周期运转的负调控)

- ◆细胞至少可通过两种不同机制阻遏细胞周期的运转：
Cdk抑制蛋白(CDI)阻止Cyclin-Cdk复合物的装配或活性；周期调控系统组分停止合成。
- ◆CDI包括CIP/KIP家族和INK4家族，其作用是抑制Cyclin-Cdk复合物的装配或活性，而将细胞阻止在不同的检验点。如DNA受损后，细胞将停留于G1 Checkpoint 让DNA修复或者凋亡
- ◆周期调控系统组分停止合成，如G0细胞，大部分Cyclin和Cdk都消失，这在多细胞生物尤其明显。

第十二章 细胞分化与基因表达调控

- ◆细胞分化(cell differentiation): 在个体发育中，由一种相同的细胞类型经细胞分裂后逐渐在形态、结构和功能上形成稳定性差异，产生各不相同的细胞类群的过程。
- ◆细胞分化是多细胞生物发育的基础与核心；
细胞分化的关键在于特异性蛋白质合成；
合成特异性蛋白质实质在于组织特异性基因在时间和空间上的差异性表达；
差异性表达的机制是由于基因表达的组合调控。
- ◆细胞癌变是正常细胞分化机制失控的表现

- 细胞分化(Cell differentiation)
- 癌细胞(Cancer cell)
- 真核细胞基因表达的调控

第一节 细胞分化(Cell differentiation)

●细胞分化的基本概念

●影响细胞分化的因素

●细胞分化与胚胎发育—Hox genes

同源异型基因

(homeotic selector gene, Hox gene)

●果蝇体节发育中起关键作用的基因群。

含有高度保守的180bp组成的DNA序列，称同源框。编码60个氨基酸，形成 α 螺旋-转角- α 螺旋结构，与DNA序列大沟相互作用，启动基因表达。

●同源异型基因在染色体上的排列与胚胎发育在时、空序列上是一致的。

一、细胞分化的基本概念

- 细胞分化是基因选择性表达的结果
- 组织特异性基因与管家基因
- 组合调控引发组织特异性基因的表达
- 单细胞有机体的细胞分化
- 转分化与再生

转分化与再生

- 一种类型分化的细胞转变成另一种类型的分化细胞现象称转分化（transdifferentiation）。
- 转分化经历去分化（dedifferentiation）和再分化的过程。
- 生物界普遍存在再生现象（regeneration），再生是指生物体缺失部分后重建过程，广义的再生可包括分子水平、细胞水平、组织与器官水平及整体水平的再生。
- 不同的细胞有机体，其再生能力有明显的差异。

单细胞有机体的细胞分化

- 与多细胞有机体细胞分化的不同之处：
前者多为适应不同的生活环境，而后者则通过细胞分化构建执行不同功能的组织与器官。
- 多细胞有机体在其分化程序与调节机制方面显得更为复杂。

组合调控引发组织特异性基因的表达

- 组合调控（combinational control）概念：
有限的少量调控蛋白启动为数众多的特异细胞类型的分化的调控机制。
即每种类型的细胞分化是由多种调控蛋白共同调节完成的。
- 生物学作用：
借助于组合调控，一旦某种关键性基因调控蛋白与其它调控蛋白形成适当的调控蛋白组合，不仅可以一种类型的细胞转化成另一种类型的细胞，而且遵循类似的机制，甚至可以诱发整个器官的形成（如眼的发育）。
- 分化启动机制：

靠一种关键性调节蛋白通过对其他调节蛋白的级联启动。

组织特异性基因与当家基因

- ◆当家基因(house-keeping genes): 是指所有细胞中均要表达的一类基因, 其产物是对维持细胞基本生命活动所必需的;
- ◆组织特异性基因(tissue-specific genes), 或称奢侈基因(luxury genes): 是指不同的细胞类型进行特异性表达的基因, 其产物赋予各种类型细胞特异的形态结构特征与特异的功能;
- ◆调节基因产物用于调节组织特异性基因的表达, 起激活或者起阻遏作用。

二、影响细胞分化的因素

●细胞的全能性(totipotency)

●影响细胞分化的因素

细胞的全能性(totipotency)

- ◆概念: 细胞全能性是指细胞经分裂和分化后仍具有产生完整有机体的潜能或特性。
- ◆植物细胞具有全能性, 在适宜的条件下可培育成正常的植株
- ◆动物细胞核移植(Nuclear transfer)实验证明细胞核具有发育全能性
 - ◆干细胞(Stem cell)与细胞发育潜能

影响细胞分化的因素

- ◆胞外信号分子对细胞分化的影响, 如眼的发生
- ◆细胞记忆与决定
 - 果蝇成虫盘(imaginal disc)
- ◆受精卵细胞质的不均一性对细胞分化的影响
- ◆细胞间的相互作用与位置效应
- ◆环境对性别决定的影响
- ◆染色质变化与基因重排对细胞分化的影响

·如蛙红细胞核移植后发育成蝌蚪

·Dolly羊的诞生说明高度分化的哺乳动物体细胞核也具有发育全能性

·干细胞分化模式

·胚胎干细胞(embryo stem cell)：具有分化成多种细胞类型及构建组织的潜能

·造血干细胞

·单能干细胞 (monopotential cell)

第二节 癌细胞(Cancer cell)

●癌细胞的基本特征

●致癌因素

●癌症产生是基因突变积累和自然选择的结果

●癌症能治疗吗？

一. 癌细胞的基本特征

癌症是一种严重威胁人类生命安全的疾病。动物体内细胞分裂调节失控而无限增殖的细胞称为肿瘤细胞(tumor cell)。具有转移能力的肿瘤称为恶性肿瘤 (malignancy)。上皮组织的恶性肿瘤称癌。

●基本生物学特征

●体外培养的恶性转化细胞的特征

基本生物学特征

◆细胞生长与分裂失去控制，具有无限增殖能力，成为“永生”细胞。

◆具有扩散性

·癌细胞的细胞间粘着性下降，具有浸润性和扩散性，这是癌细胞的基本特征。

·在分化程度上癌细胞低于良性肿瘤细胞，且失去了许多原组织细胞的结构和功能

◆细胞间相互作用改变（识别改变；表达水解酶类；产生新的表面抗原）

◆蛋白表达谱系或蛋白活性改变（胚胎细胞蛋白、端粒酶活性升高）

◆ mRNA转录谱系的改变（少数基因表达不同；突变位点不同，表型多变）

◆染色体非整倍性

体外培养的恶性转化细胞的特征

- ◆恶性转化细胞同癌细胞一样具有无限增殖的潜能
- ◆在体外培养时贴壁性下降
- ◆失去接触抑制
- ◆培养时对血清依赖性降低
- ◆当将恶性转化细胞注入易感动物体内，往往会形成肿瘤

二、致癌因素

●多种理化因子致癌

● DNA肿瘤病毒与RNA肿瘤病毒致癌

三、癌症产生是基因突变积累和自然选择的结果

癌症主要是体细胞突变产生的遗传病，涉及到两大类与细胞增殖相关的基因的突变。

- 促进细胞增殖相关基因突变：原癌基因(proto-oncogene)突变成癌基因(oncogene)
 - 抑制细胞增殖相关基因突变：肿瘤抑制基因(tumor-suppressor gene)
 - 细胞癌变是基因突变积累和自然选择的结果，所以患者多为年长者。
 - 原癌基因与肿瘤抑制基因产物协调作用，避免细胞癌变
- ◆原癌基因存在于细胞基因组中(c-onc)，是控制细胞生长和分裂的基因。
编码多种类型的蛋白质---细胞生长和分裂的调控因子。
癌基因是控制细胞生长和分裂的原癌基因的一种突变形式。
 - ◆这类基因功能获得性突变(显性突变)，
其产物量增加或活性升高，促进细胞癌变。
 - ◆抑癌基因是正常细胞增殖过程中的负调控因子。抑癌基因编码的蛋白抑制细胞增殖，使细胞停留于检验点上阻止周期进程。

- ◆抑癌基因发生功能丧失性突变(隐性突变)，则导致细胞周期失控而过度增殖。
- ◆Rb基因突变导致视网膜母细胞瘤形成。
pRb对细胞周期运转作用
- ◆P53基因突变将导致细胞癌变或凋亡

四、癌症能治疗吗

- 传统思路是手术、放疗、化疗
- 癌症治疗新方案
 - ◆免疫治疗(Immunotherapy)
 - ◆基因治疗(Gene therapy)
 - ◆抑制癌症促进蛋白的活性
 - ◆抑制肿瘤血管形成

第三节 真核细胞基因表达的调控

- ◆真核细胞基因表达的调控是多级调控系统，主要发生在三个彼此相对独立的水平上

- 转录水平的调控
- 加工水平的调控
- 翻译水平的调控

一. 转录水平的调控

- 真核生物的转录激活
- 基因表达阻遏

真核生物的转录激活

- ◆基因转录水平的控制错综复杂，受多种因素影响
- ◆TATA盒、CAAT盒和GC盒，TATA盒决定转录起始的位点，CAAT盒和GC盒决定RNA聚合酶转录基因的效率。这三种普遍的启动子元件的位置见图第1行。

- ◆ 缺失作图法 (deletion mapping) 与DNA足纹技术 (DNA footprinting) 鉴定启动子区域特殊位点的功能
- ◆ 转录因子结构
- ◆ 转录因子与DNA序列相互作用最常见的几种结构模式

基因表达阻遏

- ◆ DNA甲基化 (DNA methylation) 与基因表达阻遏有关
- ◆ 基因组印记 (genomic imprinting) 是说明甲基化作用在基因表达中具有重要意义的最好例证，也是哺乳动物所特有的现象

二. 加工水平的调控

- 选择性拼接是一种广泛存在的RNA加工机制，通过这种方式，一个基因能编码两个或多个相关的蛋白质
 - ◆ 组成型拼接 (constitutive splicing)，一个基因只产生一种成熟的mRNA，一般也只产生一种蛋白质产物
 - ◆ 可调控的选择性拼接产生不同的成熟mRNA，翻译产生不同的蛋白质，如纤粘蛋白 (fibronectin) 的合成
 - ◆ 某一特定的外显子是否被包括在成熟mRNA内，主要取决于它的3'和5'端拼接位点是否被拼接机器选择为切割位点

三. 翻译水平的调控

- mRNA的细胞质定位
- mRNA翻译的调控
- mRNA稳定性的调控

mRNA的细胞质定位

- ◆ 启动一个动物受精卵形成胚胎所需要的信息预存在卵子发生期的卵母细胞里

- ◆微管和微丝对细胞中特定部位的mRNA的聚集有一定关系

mRNA翻译的调控

- ◆“隐蔽”mRNA (masked mRNA) 的激活
- ◆调节编码铁蛋白 (ferritin) 的 mRNA 翻译速率的机制

mRNA稳定性的调控

- ◆mRNA的寿命与它的多聚(A)尾巴长度有关
- ◆哺乳动物细胞内mRNA的降解途径说明一旦多聚(A)尾巴减少到一定长度，mRNA会迅速降解
- ◆3'UTR的核苷酸顺序的不同似乎在多聚(A)尾巴变短时扮演一个与降解速率有关的角色

第十三章 细胞衰老与凋亡

第一节 细胞衰老

(cellular aging或cell senescence)

● Hayflick界限(Hayflick Limitation)

● 细胞在体内条件下的衰老

● 衰老细胞结构的变化

● 细胞衰老的分子机理

一、Hayflick界限(Hayflick Limitation)

- 概念：关于细胞增殖能力和寿命是有限的观点。

细胞，至少是培养的二倍体细胞，不是不死的，而是有一定的寿命；它们的增殖能力不是无限的，而是有一定的界限，这就是 Hayflick界限
- ◆ 癌细胞或培养的细胞系是不正常细胞，其染色体数目或形态已经不同于原先的细胞
- ◆ 细胞的增殖能力与供体年龄有关
- ◆ 物种寿命与培养细胞寿命之间存在着一定的关系
- 二倍体细胞的衰老是由细胞本身决定的
 - ◆决定细胞衰老的因素在细胞内部，而不是外部的环境

- ◆是细胞核而不是细胞质决定了细胞衰老

二、细胞在体内条件下的衰老

- 在机体内，细胞的衰老和死亡是常见的现象，甚至在个体发育的早期也会发生；
- 正常情况下终生保持分裂的细胞，其分裂能力是否随着有机体年龄的增高而下降？它们会不会衰老？
 - ◆衰老动物体内，细胞分裂速度显著减慢，其原因主要是G₁期明显延长；
 - ◆衰老个体内的环境因素影响了细胞的增殖和衰老；
 - ◆骨髓干细胞移植实验说明随着年龄的增加，干细胞增殖速度也趋缓慢。

三、衰老细胞结构的变化

- 细胞核的变化
- 内质网的变化：衰老动物内质网成分弥散性地分散于核周胞质中，粗面内质网的总量似乎是减少了
- 线粒体的变化：通常，细胞中线粒体的数量随龄减少，而其体积则随龄增大
- 致密体的生成
- 膜系统的变化

细胞核的变化

- ◆体外培养的二倍体细胞，细胞核随着细胞分裂次数的增加不断增大
- ◆细胞核的核膜内折（invagination）、染色质固缩化

膜系统的变化

- ◆衰老的细胞，其膜流动性降低、韧性减小
- ◆衰老细胞间间隙连接↓；
细胞膜内（P面）颗粒的分布也发生变化↓

四、细胞衰老的分子机理

- 氧化性损伤学说：代谢过程中产生的活性氧基团或分子（ROS---O₂⁻，OH[·]，H₂O₂），引发的氧化性损伤的积累，最终导致衰老。
- 端粒与衰老：发现端粒长度确实与衰老有着密切的关系，提出细胞衰老的

“有丝分裂钟”学说 (Harley,1990)

- **rDNA与衰老**: 酵母染色体外rDNA 环 (ERC) 的积累, 导致细胞衰老。
- **沉默信息调节蛋白复合物 (Sir complex) 与衰老**: Sir complex 存在于异染色质区, 其作用在于阻断所在位点DNA转录。
- **SGS1基因和WRN基因与衰老**: SGS1基因和WRN基因同源, 编码解旋酶;
酵母sgs1突变体寿命明显短于野生型 (平均9.5代:24.5代); wrn突变引发早老症。
- **发育程序与衰老**:
- **线粒体DNA与衰老**: Sen-DNA (80年代); mtDNA突变积累与细胞衰老有关。

第二节 细胞凋亡(Apoptosis)

- **细胞凋亡的概念及其生物学意义**
- **细胞凋亡的形态学和生物化学特征**
- **细胞凋亡的分子调控机理**

一、细胞凋亡的概念及其生物学意义

- **概念**: 细胞凋亡是一个主动的由基因决定的自动结束生命的过程, 所以也常常被称为细胞编程死亡 (programmed cell death, PCD)。凋亡细胞将被吞噬细胞吞噬。
- **生物学意义**: 细胞凋亡对于多细胞生物个体发育的正常进行, 自稳平衡的保持以及抵御外界各种因素的干扰方面都起着非常关键的作用:
蝌蚪尾的消失, 骨髓和肠的细胞凋亡,
脊椎动物的神经系统的发育,
发育过程中手和足的成形过程。

二、细胞凋亡的形态学和生物化学特征

- **细胞凋亡与坏死(necrosis)**
- **细胞凋亡的形态学特征**
- **细胞凋亡的生化特征**
- **诱导细胞凋亡的因子**
- **细胞凋亡的检测**

细胞凋亡与坏死(necrosis)

- 二者的主要区别是, 细胞凋亡过程中, 细胞质膜反折, 包裹断裂的染色质片段或细胞器, 然后逐渐分离, 形成众多的凋亡小体 (apoptotic bodies), 凋亡小体则为邻近的细胞所吞噬。整个过程中, 细胞质膜的整合性保持良好, 死亡细胞的内容物不会逸散到胞外环境中去, 因而不引发炎症反应。相反, 在细胞坏死时, 细胞质膜发生渗漏, 细胞内容物, 包括膨大和破碎的细胞器以及染色质片段, 释放到胞外, 导致炎症反应

细胞凋亡的形态学特征

- ◆ 凋亡的起始: 细胞表面的特化结构如微绒毛消失, 细胞间接触消失, 但细胞膜依然完整;

线粒体大体完整，但核糖体逐渐从内质网上脱离，内质网囊腔膨胀，并逐渐与质膜融合；染色质固缩，形成新月形帽状结构等形态，沿着核膜分布

- ◆凋亡小体的形成：核染色质断裂为大小不等的片段，与某些细胞器如线粒体一起聚集，为反折的细胞质膜所包围。细胞表面产生了许多泡状或芽状突起，逐渐形成单个的凋亡小体
- ◆凋亡小体逐渐为邻近的细胞吞噬并消化

细胞凋亡的生化特征

- ◆细胞凋亡的主要特征是形成大小为180~200bp特征性的DNA ladders
- ◆凋亡细胞组织转谷氨酰胺酶tTG (tissue Transglutaminase) 积累并达到较高水平

诱导细胞凋亡的因子

- ◆物理性因子，包括射线（紫外线， γ 射线等），较温和的温度刺激（如热激，冷激）等
- ◆化学及生物因子：包括活性氧基团和分子，DNA和蛋白质合成的抑制剂，激素，细胞生长因子，肿瘤坏死因子 α (TNF α)，抗Fas/Apo-1/CD95抗体等

细胞凋亡的检测

- ◆形态学观测：染色法、透射和扫描电镜观察
- ◆DNA电泳：DNA片段就呈现出梯状条带
- ◆TUNEL测定法，即DNA断裂的原位末端标记法
- ◆彗星电泳法 (comet assay)
- ◆流式细胞分析
根据凋亡细胞DNA断裂和丢失，采用碘化丙啶使DNA产生激发荧光，用流式细胞仪检出凋亡的亚二倍体细胞，同时又能观察细胞的周期状态。

三、细胞凋亡的分子调控机理

- 线虫(C.elegans)凋亡研究发现ced3,ced4基因促进细胞凋亡，ced9基因阻止ced3/ced4的激活，抑制细胞凋亡。Ced3哺乳类同源物是ICE(Interleukin-1-converting enzyme)，即Caspase1
- Caspase家族与凋亡
- Bcl-2家族、线粒体与细胞凋亡

●细胞凋亡的分子机理

Caspase家族与凋亡

◆Caspase家族

·Caspase活性位点是半胱氨酸(Cysteine)，裂解靶蛋白位点是天冬氨酸残基后的肽键，因此称为Cysteine aspartic acid specific protease，即Caspase

◆Caspase活化

◆胞外信号分子诱导的细胞凋亡途径

Caspase活化

Caspase自身以非活化的Procaspase存在，其激活依赖于其他的Caspase在它的天冬氨酸位点裂解活化或自身活化

胞外信号分子诱导的细胞凋亡途径

·凋亡信号通路

当细胞接受凋亡信号分子(Fas, TNF等)后，凋亡细胞表面信号分子受体相互聚集并与细胞内的衔接蛋白(Adaptor protein)结合，这些衔接蛋白又募集Procaspases聚集在受体部位，Procaspase相互活化并产生级联反应，使细胞凋亡

·下游Caspases活化后，作用底物：

裂解核纤层蛋白，导致细胞核形成凋亡小体；

裂解DNase结合蛋白，使DNase释放，降解DNA形成DNA Ladder；

裂解参与细胞连接或附着的骨架和其他蛋白，使凋亡细胞皱缩、脱落，便于细胞吞噬；

导致膜脂PS重排，便于吞噬细胞识别并吞噬。

Bcl-2家族、线粒体与细胞凋亡

◆Bcl-2是一种原癌基因，是ced-9在哺乳类中的同源物，能抑制细胞凋亡；与线粒体及内质网膜相结合；Bcl-2蛋白的羧基末端有一穿膜的结构域；Bcl-2家族成员的基因中，常常含有三个保守的Bcl-2同源区，即BH1，BH2和BH3

◆Bcl-2、线粒体与细胞凋亡

◆哺乳动物细胞中发现的Apaf2即是CytC

Bcl-2、线粒体与细胞凋亡

◆当Caspase8活化后，它一方面作用于Procaspase3，另一方面使Bid裂解成2个片段，其中含BH3结构域的C-端片段被运送到线粒体，与Bcl-2/Bax的BH3结构域形成复合物，导致细胞色素C释放。CytC与胞质中Ced4同源物Apaf-1(凋亡蛋白酶活化因子apoptosis protease

activating factor) 结合并活化Apaf-1，活化的Apaf-1再活化Procaspase9，最后引起细胞凋亡