

上海光源在生命科学中的应用

张蔚哲 周欢 顾亦君 周晓洁 李娜 李怡雯 汪启胜 何建华

(中国科学院上海高等研究院 201204)

生命科学包含涉及生命和生物有机体科学研究的许多分支,研究对象包含微生物、植物和动物,包括人类。经过几个世纪的发展,生命科学已经从单纯的描述逐渐发展成了一门理论、计算、实验等多领域交叉学科。自DNA双螺旋结构模型的提出以来,生命科学迈进了崭新的层次——分子生物学的层次,迄今为止,生命科学已经发展成了一门包含众多分支学科的科学体系。生命科学和生物技术,包括基因工程、合成生物学、基因组学和蛋白质组学,已经给人类健康带来了显著的改善。生命科学的发展有助于提高生活质量和标准,并在卫生、农业、医学、制药和食品科学领域得到广泛应用。蛋白质科学是生命科学的一个重要分支,在人类对于自身健康问题广泛关注的今天,蛋白质科学对于理解疾病的分子机制以及新药的开发都产生了强烈的影响,蛋白质科学也为生命科学和生物技术的发展提供了基础支持。

蛋白质及其复合物是组成生命体并实现各种生命活动的载体。只有了解了蛋白质的三维结构,即蛋白质分子中各个原子的空间位置,才能了解蛋白质的功能,从而发现生命活动的规律,进而依此来进行有目的的改造及控制生命活动,比如研制药物、疫苗等。

同步辐射在生命科学中有着广泛的应用。同步辐射是指速度接近光速的带电粒子在磁场中沿着弧形轨道运动时释放的电磁波,由于最初是在同步加速器上被观察到的,因此被称为“同步辐射”。上海光源(Shanghai Synchrotron Radiation Facility,

SSRF)是中国大陆第一台第三代同步辐射光源,坐落于上海市浦东新区张江高科技园区。包括用户线站,上海光源目前共有15条光束线和19个实验站开放运行,其中生物大分子晶体学光束线站(BL17U1),以及蛋白质科学研究上海设施五线六站主要进行生命科学方面的研究。

1. 生物大分子晶体学

生物大分子晶体学是一门利用生物大分子晶体对X射线的衍射效应来测定其微观结构的学科。不同的蛋白质具有不同的三维结构,而不同的蛋白质结构则决定了蛋白质特定的功能。结构生物学采用许多方法对生物大分子的结构进行研究,其中生物大分子晶体学方法是当前在原子水平上确定生物大分子结构的最有效手段。该方法的一般过程是:首先确定目标蛋白质,然后通过基因表达将目标蛋白制备出来,将提纯的蛋白质进行结晶,得到目标蛋白的单晶,然后用X射线照射该晶体并且收集衍射图样,最后对衍射图样进行处理和计算就可以得到蛋白质的三维空间结构。随着晶体制备、衍射数据收集、计算与图像处理软件系统的不断完善和自动化能力的不断提高,X射线晶体衍射已成为蛋白质三维结构研究中的常规技术。因为同步辐射X射线的亮度是目前常规实验室转靶X光机产生的X光亮度的千万倍以上,同时同步辐射X射线的波长连续可调性及光束的高准直性也是普通X光源无法比拟的,所以同步辐射X射线一诞生,就成为当前推动蛋白质结构测定快速发展

的最重要因素。它对蛋白质晶体学产生的直接效果是:晶体衍射的分辨率和数据质量显著提高、对晶体尺寸的要求明显降低、数据收集速度明显加快、相位解析手段极大加强。

2009年5月6日,上海光源正式对全国用户开放,其中生物大分子晶体学光束线站(BL17U1)是国内第一条建设于先进三代光源的生物大分子晶体学光束线站。这条线站的建成,对国内的结构生物学发展起到的巨大的推动作用。2012年,蛋白质科学研究上海设施计划在上海光源再建造三个专门用于蛋白质晶体结构分析的线站,包括蛋白质复合物晶体结构线站(BL19U1)、蛋白质微晶体结构线站(BL18U1)以及高通量蛋白质晶体结构线站(BL17B1)以针对不同的实验样品需求。这几条线站已经于2015年3月正式开放运行。

蛋白质复合物的结构是阐释相互结合的蛋白质的功能的基础,蛋白质复合物的结构研究已成为结构生物学研究的重要前沿领域之一。蛋白质复合物晶体结构线站BL19U1的发展目标是要研究越来越复杂的蛋白质复合体系乃至具有系统功能的分子机器、细胞器,如病毒、核糖体复合物等。由于蛋白质复合物的结构复杂、分子量大,生长出的晶体往往都具有很大的晶胞尺寸,衍射能力弱。几乎所有的研究对象均需要利用高亮度同步辐射光源才可能获得具有原子分辨率尺度的三维结构信息。蛋白质复合物晶体结构线站是在保持高光通量的前提下实现光束的高准直性(即低发散度),其主要目标是能够测定晶胞尺寸超过1000 Å的超大分子复合物结构。

由于蛋白质晶体生长是一个非常复杂和困难的过程,对于很多蛋白质,尤其是膜蛋白,晶体生长十分困难,难以得到有序性好、尺寸较大的晶体。蛋白质微晶体结构线站BL18U1顺应当前国际上蛋白质晶体学线站发展的一个主要方向,是针对微小蛋白质晶体结构测定的蛋白质微晶体光束线站,采用低发射度第三代光源上的波荡器产生的同步辐射X射线束作为光源,具有很高的亮度和非常好的

光束准直性,能够有效测定尺寸小到5~10微米的蛋白质晶体结构。

高通量蛋白质晶体结构线站BL17B1主要是针对一般蛋白质晶体样品的结构筛选与结构测定,能够提供高效自动化的衍射数据采集。同时, BL17B1线站将研究领域向小分子单晶衍射领域拓展,在高分子材料学中也有很多应用。

2. 生物X射线小角散射

X射线小角散射(Small-angle X-ray Scattering, SAXS),顾名思义就是发生在入射光束附近小角度范围内的X射线散射现象。SAXS技术是检测物质微观结构的一项重要突破。对于研究生物体系聚合物、生物蛋白质等生物大分子溶液、纤维束、病毒聚集体、溶胶凝胶等两相体系时(溶剂和溶质两种体系),需要采用SAXS方法,通过对SAXS散射花样、强度分布的分析,给出散射体的形状、大小、分布等结构形貌信息。对于对称性好的体系(例如1 nm左右生物大分子溶液体系)还可以得到距离分布函数,进而构建较低分辨率(1 nm左右)的物质结构模型。SAXS作为唯一一种能够在单个图像中反映大分子完整热力学状态的技术,在物质结构表征,尤其是生物活性大分子的结构表征研究中的重要作用越来越受到广大科研工作者的重视和应用。

虽然SAXS技术的提出已有近百年的历史,然而先前针对SAXS实验技术的研究主要集中在材料科学、聚合物化学以及工业领域方面,关于SAXS在生物学领域内的应用研究相当匮乏。近年来,随着同步辐射光源的应用与发展、分子生物学研究的不断深入以及针对生物样本散射信号数据分析算法的不断进步,从SAXS图谱分析蛋白质等生物大分子结构的计算方法不再只局限于简单的一维结构参数量化,而是逐渐扩展到三维结构的数据模拟,使得SAXS检测技术成为其他微纳米级分辨率结构生物学检测技术的有效补充。蛋白质科学研究上海设施生物小角X射线散射线站BL19U2就是进行这方面的研究,作为国内首条专门用于生物样品的

X射线小角散射(Biological Small-angle X-ray Scattering, BioSAXS)研究的技术平台,在国内结构生物学领域具有相当重要的实际意义。

3. 同步辐射红外分析

随着同步辐射光源的发展,人们从20世纪70年代开始尝试使用同步辐射光源进行红外分析。红外光谱作为分子光谱的重要组成部分,是一种确定物质组成和分子结构的重要工具,已被广泛应用于化学、生物、材料等领域。蛋白质科学研究上海设施同步辐射时间分辨与谱学显微红外线站BL01B,能够充分结合高亮度的同步辐射红外光源和传统红外光谱技术的优点,满足生命科学、化学、药物科学、材料科学、地球科学和高压科学等领域的需求,提供给国内外用户进行高分辨的时间分辨与红外显微谱学研究。在生命科学领域,使用同步辐射红外技术针对蛋白质二级结构、细胞生物学和组织学疾病诊断等方面的研究也越来越广泛。生物样品内蛋白质、多肽、核酸、磷脂和糖类均是红外光谱重要的研究对象,几十年的发展使得红外光谱成为检测蛋白质二级结构、动力学、生物分子溶剂化作用等信息的有力手段。BL01B是上海光源第

一条,也是目前为止唯一一条红外线站。BL01B共设计和建设两个实验站,分别为红外显微谱学与成像实验站和时间分辨红外谱学实验站。红外显微谱学与成像实验站主要利用同步辐射红外光高亮度的特性来进行微小样品的显微与成像研究,时间分辨红外谱学实验站主要目标是利用同步辐射光可调的光子性能,用于高分辨的时间分辨傅里叶变换红外谱学研究。

4. 上海光源在生命科学中的应用实例

流行病毒研究

自2010年以来,中国科学院微生物研究所高福院士研究组利用上海光源在流行病毒研究方面取得了一系列重要研究成果,发表论文33篇,其中有5篇论文发表在《自然》、《科学》、《细胞》三大国际期刊上,这凸显了上海光源先进实验平台对开展国际前沿领域研究的强大支撑作用。

高福研究组揭示了2009甲型H1N1流感病毒囊膜蛋白结构^{①②}、高致病性H5N1禽流感病毒种间传播机制^③,2013年H7N9流感病毒感染人传播机

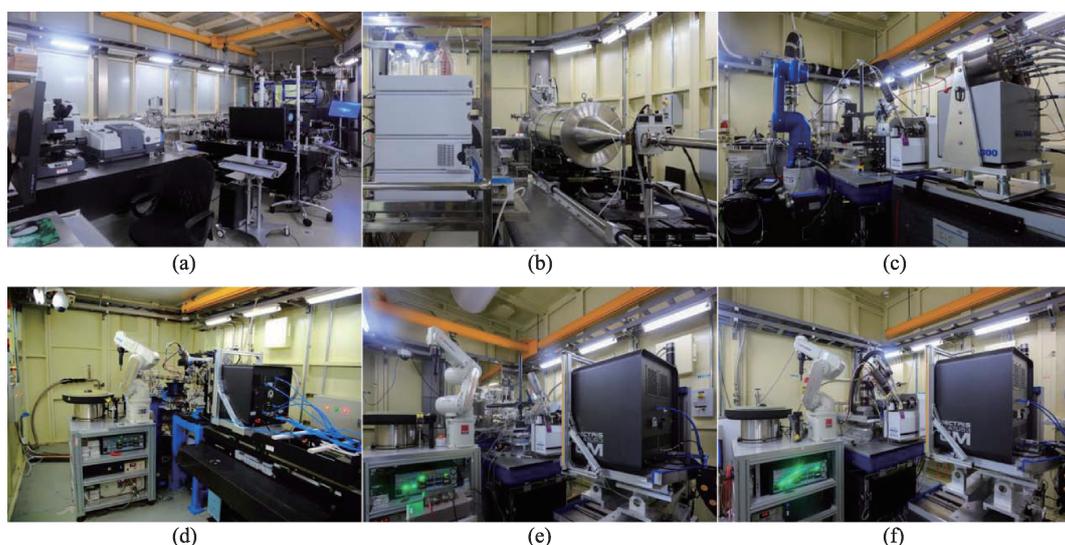


图1 线站实验站图片 (a) 同步辐射时间分辨与谱学显微红外线站 BL01B线站;(b) 生物小角X射线散射线站BL19U2;(c) 高通量蛋白质晶体结构线站BL17B1;(d) 生物大分子晶体学光束线站BL17U1;(e) 蛋白质微晶体结构线站BL18U1;(f) 蛋白质复合物晶体结构线站BL19U1

制、中东呼吸系统综合症冠状病毒侵入宿主细胞机制⁴,2016年揭示了埃博拉病毒糖蛋白结合内吞受体的分子机制⁵,2019年破解了基孔肯亚病毒入侵细胞的机制⁶。这些研究不仅凸显了上海光源以及蛋白质设施先进实验平台对开展国际前沿领域研究的强大支撑作用,更为我国重大疾病防控和公共卫生事业做出了积极贡献。

(1)2009 甲型 H1N1 流感病毒两类囊膜蛋白——血凝素和神经氨酸酶的研究

血凝素负责识别宿主细胞表面的唾液酸受体,协助病毒囊膜与宿主细胞膜的融合。神经氨酸苷酶则参与了新生病毒粒子的释放和迁移,防止病毒聚集。研究这两类蛋白对于揭示特定病毒株的致病性、疫苗与药物研发等具有重要意义。高福课题组在国际上首次解析了2009甲型H1N1流感病毒血凝素和神经氨酸酶的晶体结构。

(2)新型冠状病毒侵入宿主细胞机制研究

新型冠状病毒,又称中东呼吸系统综合症冠状病毒(Middle East Respiratory Syndrome coronavirus, MERS-CoV),是继SARS-CoV之后出现的又一个高致病性冠状病毒。与SARS相似,MERS-CoV感染患者可出现发烧,咳嗽和急性呼吸窘迫综合征,有时伴有肾衰竭,病死率非常高。高福院士研究团队解析了MERS-RBD单体以及配体/受体复合物的分子结构。MERS-RBD由核心区 and 外部受体识别区

组成,核心区结构与SARS-CoV的刺突分子同源,而外部受体识别区呈现为由 β -折叠片构成的独特的结构单元,识别CD26分子“ β -螺旋桨”样结构中的IV,V桨页片。CD26属于II型跨膜蛋白,以二聚体形式存在于细胞膜上,MERS-RBD结合在CD26的远膜端,形成类似U型的分子结构。在病毒配体识别受体的过程中,侧链基团形成的氢键与盐桥等亲水相互作用至关重要。这些分子层面上的互动细节,为设计靶向病毒侵入的小分子药物提供了重要的参考。

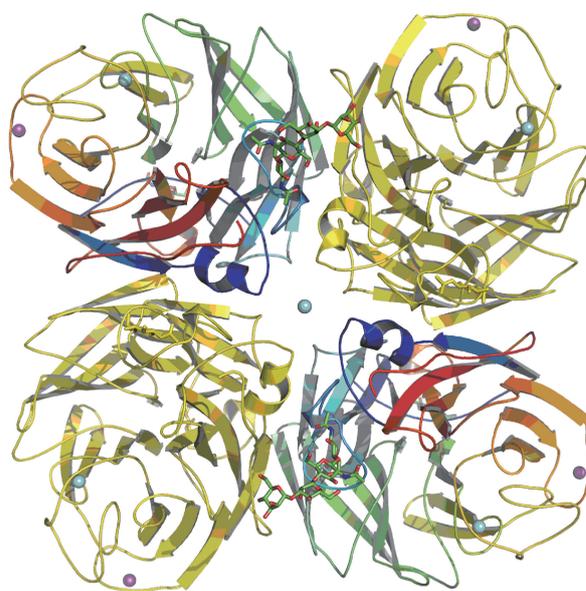


图2 2009甲型H1N1流感病毒血凝素和神经氨酸酶的晶体结构

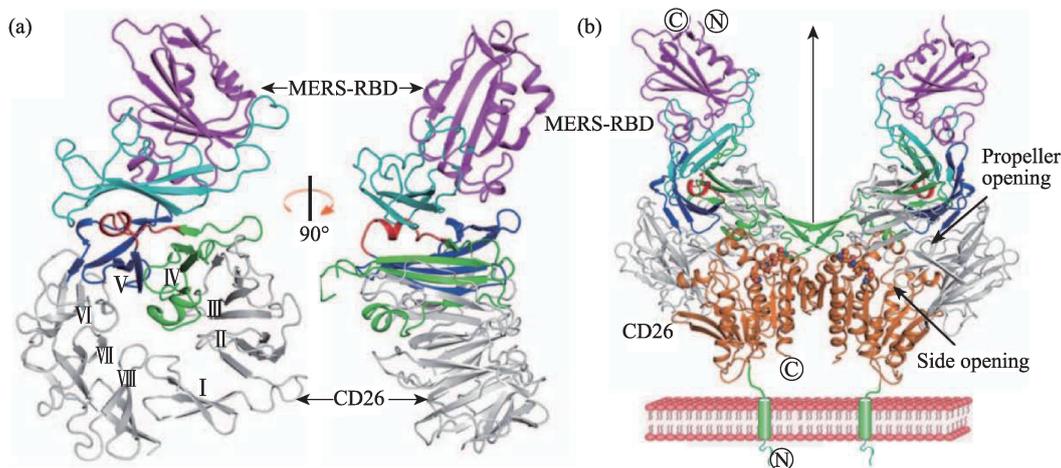


图3 MERS-RBD单体以及配体/受体复合物的分子结构⁴

(3)埃博拉病毒糖蛋白结合内吞体受体 NPC1 的分子机制

埃博拉病毒是引起人和灵长类动物发病且致死率很高的生物安全四级(Biosafety Level 4)烈性病毒。据世界卫生组织统计,自1976年首次被发现至今,埃博拉病毒已经在非洲肆虐了近40年;从2014年3月开始,一场以几内亚、利比里亚和塞拉利昂为中心的扎伊尔型埃博拉病毒疫情迅速在整个西非蔓延开来,共导致了28000多人感染,死亡人数接近11000人。

埃博拉病毒是一类囊膜病毒,其对宿主的入侵可以分成两个重要步骤,首先是病毒粘附到宿主细胞膜表面,然后是病毒通过细胞内吞进入细胞内部,形成内吞体,在内吞体内,病毒发生膜融合过程,释放自身遗传物质。NPC1分子是负责胆固醇转运的多次跨膜蛋白,具有三个大的腔内结构域(A、C和I)。埃博拉病毒囊膜表面糖蛋白在内吞体里经过宿主蛋白酶Cathepsin的酶切处理,变成激活态糖蛋白,暴露出受体结合位点来与NPC1分子的腔内结构域C发生相互作用,从而启动后续的病毒膜融合过程,实现病毒的感染生活史。高福院士团队率先解析了NPC1分子的腔内结构域C的三维结构,发现其具有一个由 α 螺旋和 β 折叠组成的球状核心结构域和两个突出来的环状结构。随后,研究人

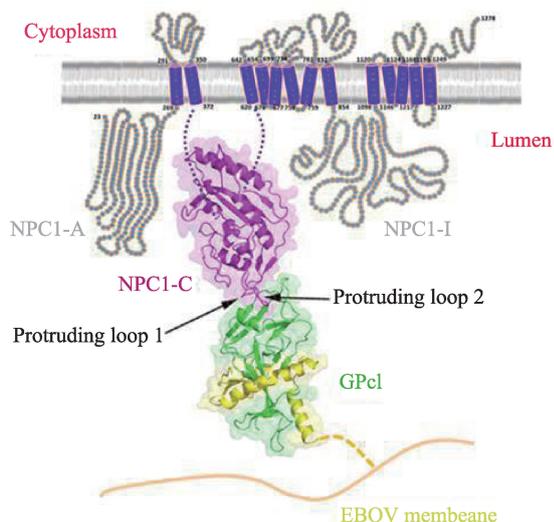


图4 埃博拉病毒与受体相互作用细节图^⑤

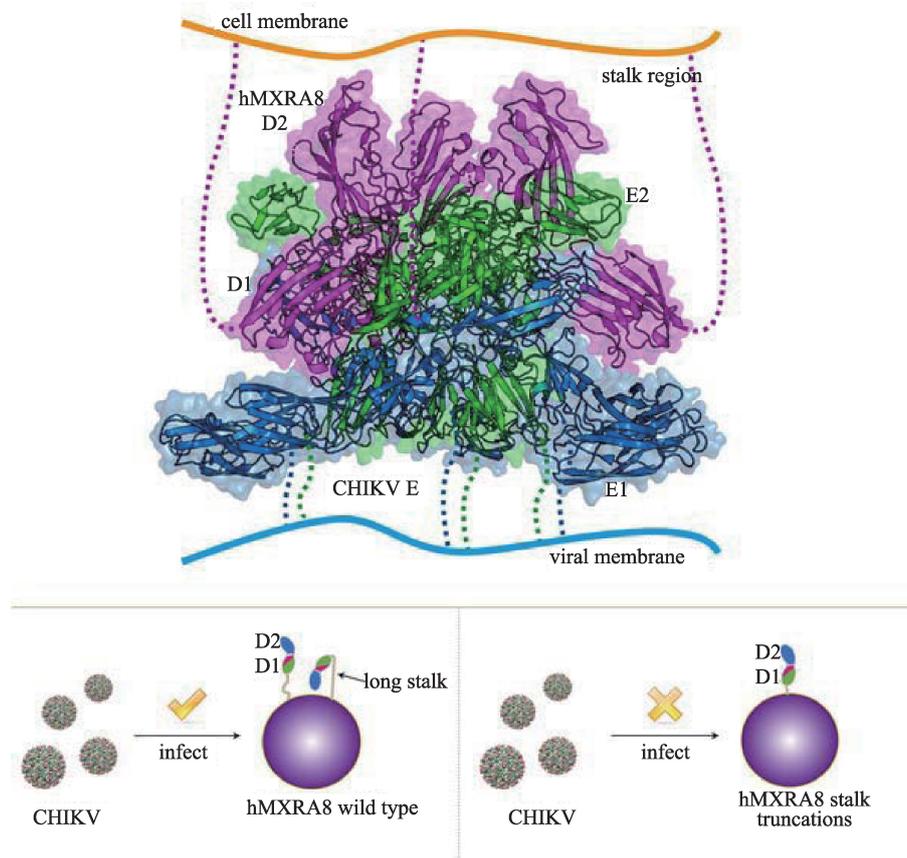
员又解析出激活态糖蛋白与腔内结构域C的复合物三维结构,发现结构域C主要利用两个突出来的环状结构插入激活态糖蛋白头部的疏水凹槽里,从而发生相互作用。这一重大发现预示着人们能够活态糖蛋白头部的疏水凹槽设计小分子或多肽抑制剂,来阻断埃博拉病毒的入侵过程。该研究入选了中国2016年度“十大医学科技新闻”。

(4)基孔肯雅病毒入侵机制

基孔肯雅病毒(Chikungunya virus, CHIKV)是一类可引起发热、皮疹和关节疼痛的虫媒传播病毒,过去主要集中在非洲和亚洲的热带及亚热带一些地区流行。随着全球变暖和现代交通工具等因素,近年来该病毒疫情呈不断暴发和蔓延的趋势。2005年以来相继在东南亚和南亚的一些地区暴发,2007年疫情传播至欧洲,2013年开始持续至今的疫情爆发中加勒比海地区、美国以及南美洲的100多万人感染该病毒。病毒感染后可致急性和慢性的外周关节痛、关节炎,严重时会导致人死亡。高福院士研究团队为了阐明CHIKV病毒囊膜表面刺突E蛋白与受体MXRA8相互作用机制,解析了人MXRA8(hMXRA8)与CHIKV E复合物的晶体结构。研究结果显示MXRA8与CHIKV E采用一种独特的3:3的结合模式,MXRA8结合到病毒表面三聚体刺突蛋白两个E蛋白单体间的“峡谷”中,形成非常紧密的结合。其中E1和E2均参与结合,MXRA8的两个结构域及铰链区均与E1和E2蛋白发生相互作用。随后研究人员利用冷冻电镜技术解析了人MXRA8与CHIKV病毒样颗粒的复合物结构,证明了MXRA8在病毒表面的结合模式跟晶体结构所观察到的结合模式一致,并通过点突变及表面等离子共振(SPR)方法对结合关键氨基酸进行了验证。通过该研究首次“看清”了基孔肯雅病毒和受体相互作用的分子模式,并纠正了过去对去对基孔肯雅病毒和受体相互作用的一些错去认识,发现了一种新型的病毒-受体结合模式。

CRISPR-CAS系统的结构生物学研究

CRISPR-Cas系统是细菌编码的用来保护细菌

图5 CHIKV利用MXRA8入侵细胞的分子机制模型[®]

免受噬菌体感染的适应性免疫系统,该系统通过crRNA引导的Cas核酸酶剪切入侵病毒的DNA或者RNA从而防御病毒感染。由于CRISPR-Cas系统与sgRNA组合具备高效、便捷“编辑”目的DNA的能力,CRISPR II-A亚型系统之一的链球菌Cas9(SpyCas9)系统已被风暴般地应用于全世界范围内的生物医学研究以及基因治疗领域,进行细胞、组织或个体内DNA的敲除、激活、修饰、突变等,而且该系统已经成为目前最重要的,也是最广泛使用的基因编辑工具。

CRISPR-Cas系统划分为两大类,第一大类CRISPR-Cas系统由多亚基组成的效应复合物发挥功能;第二大类是由单个效应蛋白(如Cas9, Cpf1, C2c1等)来发挥功能。其中,Cas9, Cpf1, C2c1均具有RNA介导的DNA核酸内切酶活性。目前,Cas9和Cpf1蛋白作为基因组编辑工具被广泛应用,克服了传统基因编辑技术步骤繁琐、耗时长、效率低等

缺点,以其较少的成分、便捷的操作以及较高的效率满足了大多数领域的基因编辑需求,并有着潜在且巨大的临床应用价值。

中国科学院生物物理研究所和哈尔滨工业大学相关研究组在上海光源和蛋白质设施晶体学线站的大力支持与配合下,在该领域研究取得了重要进展。

(1)CRISPR-Cpf1细菌免疫系统研究

哈尔滨工业大学黄志伟教授团队通过结构生物学和生化研究手段揭示了CRISPR-Cpf1识别CRISPR RNA(crRNA)以及Cpf1剪切pre-crRNA成熟的分子机制^⑦,这对认识细菌如何通过CRISPR系统抵抗病毒入侵的分子机理具有十分重要的科学意义,而且为成功改造Cpf1系统,使之成为特异的、高效的全新基因编辑系统提供了结构基础,让人们可以更加高效地对目的基因进行“关闭”、“恢复”和“切换”等精准“手术”,使战胜癌症和艾滋病等疾病成为可能。

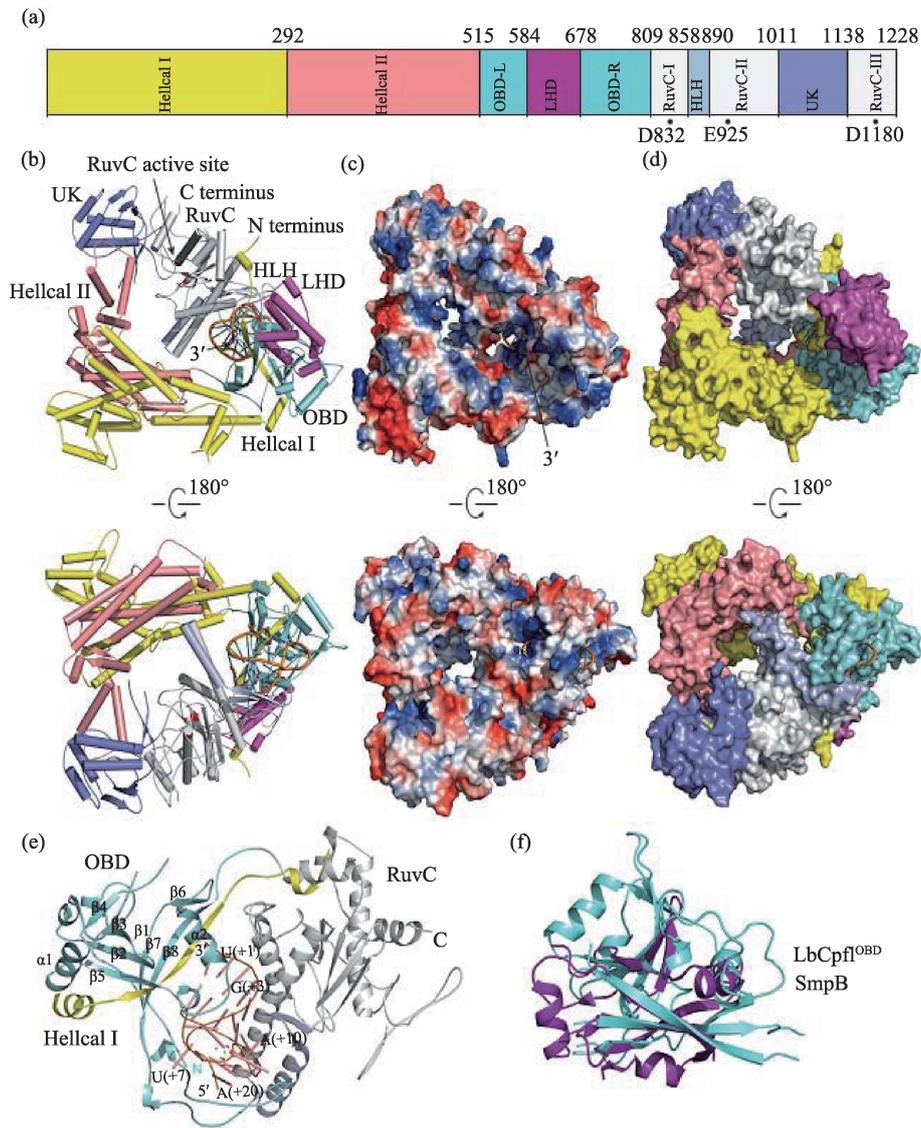


图6 CRISPR-Cpf1 结合 crRNA 的复合物晶体结构^⑦

(2) VI 型 CRISPR-Cas 系统 C2c2-RNA 复合物结构

2015年,一种全新的第二类CRISPR-Cas系统-VI型系统被发现,该系统中的效应蛋白被命名为C2c2。而后的研究进一步发现,VI型CRISPR-Cas系统是一种新型靶向RNA的CRISPR系统,而C2c2是一种以RNA为导向靶向和降解RNA的核酸内切酶,有望被开发作为RNA研究的工具,扩展CRISPR系统在基因编辑方面的运用。中国科学院生物物理研究所王艳丽课题组解析了VI型CRISPR-Cas系统的效应蛋白C2c2与crRNA的二元复合物的晶体结构

以及C2c2蛋白的晶体结构^⑧。该研究表明crRNA的结合会引起C2c2蛋白的构象变化,这种变化很可能会稳定crRNA的结合,进而对识别靶标RNA起着重要作用。该研究通过结构和生化研究揭示了C2c2剪切pre-crRNA以及切割靶标RNA的分子机制,对认识细菌抵抗RNA病毒入侵的分子基础具有十分重要的意义。同时也为改造CRISPR-C2c2系统,为其在基因编辑领域的运用提供了强有力的结构基础,有助于加速对病毒感染引发的疾病的理解、治疗和预防。

(3)CRISPR-Cas 系统切割RNA 的研究

Cas13a 是第二大类 VI 型系统中的效应蛋白,

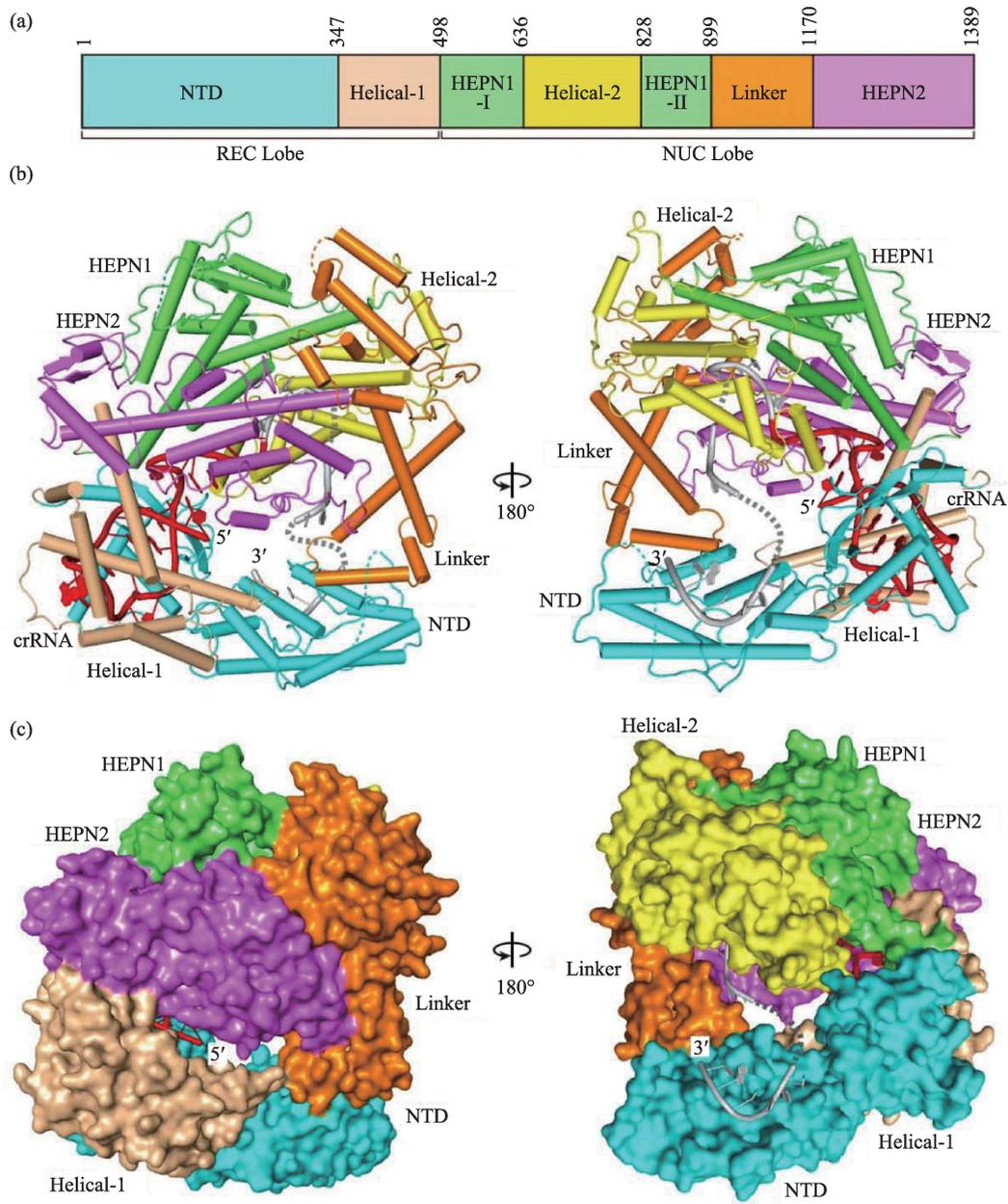


图7 LshC2c2-crRNA 的二元复合物的晶体结构 (a) LshC2c2 蛋白各结构域的分布; (b)(c) 结合有 crRNA 的 C2c2 晶体结构的正交视图, (b) 图为卡通结构, (c) 图为表面结构[®]

具有 RNA 介导的 RNA 酶切活性,是目前第二大类 CRISPR-Cas 系统发现的唯一能够降解 RNA 的蛋白。中国科学院生物物理研究所王艳丽课题组和章新政课题组成功解析了 LbuCas13a-crRNA-target RNA 的三元复合物结构(3.08Å),并通过冷冻电镜技术,获得了 3.2Å LbuCas13a-crRNA 的二元复合物结构[®]。该研究证实 target RNA 的结合导致 Lbu-Cas13a 的两个 HEPN(发挥 RNA 干扰功能的结构

域)结构域发生构象变化,从而激发 LbuCas13a 非特异性地切割任意单链 RNA 的酶切活性,该成果为研究 Cas13a 发挥 RNA 酶活性的分子机制提供了重要的结构生物学基础。该研究发现为 CRISPR-Cas13a 系统的进一步开发提供了可靠的结构基础,对深入理解细菌抵御病毒入侵的分子机制提供了强有力的证据,并将对病毒引起的疾病的预防、检测、控制与治疗产生重大意义,特别是基于 Cas13a

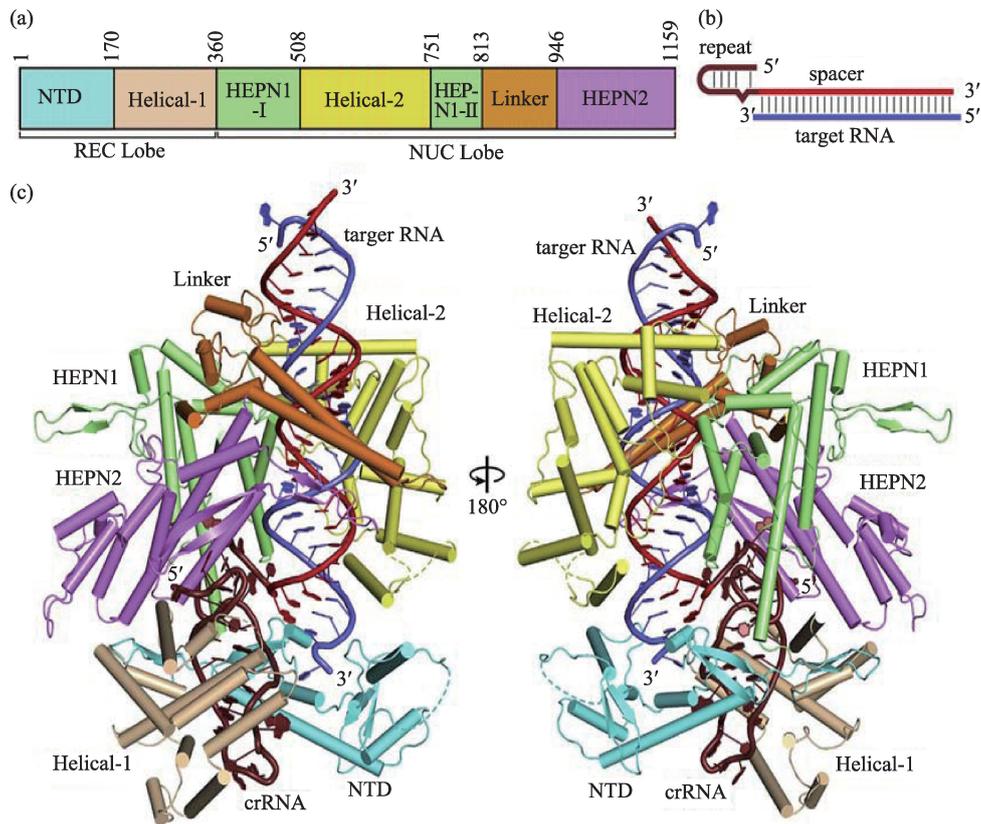


图8 LbuCas13a-crRNA-target RNA 的三元复合物结构[®]

高效的 RNA 酶切活性,对其应用于各类重大疾病的快速检测具有十分广阔的前景。

(4)Anti-CRISPR 蛋白抑制 SpyCas9 活性的分子机制

由于 CRISPR-Cas 系统与 sgRNA 组合具备高效、便捷“编辑”目的 DNA 的能力,CRISPR II-A 亚型系统之一的链球菌 Cas9(SpyCas9)系统已被风暴般地应用于全世界范围内的生物医学研究以及基因治疗领域,进行细胞、组织或个体内 DNA 的敲除、激活、修饰、突变等,而且该系统已经成为目前最重要的,也是最广泛使用的基因编辑工具。

但是,如何减少 SpyCas9 过度激活或者长时间活性带来的基因编辑脱靶效应,以及如何对 Spy-Cas9 的活性进行时间、空间或条件性的精确控制,是当下 SpyCas9 系统用于细胞或组织基因编辑、基因治疗等亟需解决的重要并具挑战性的科学问题。早先的研究发现一类来自于 *Listeria monocytogenes* 前噬菌体的 Anti-CRISPR 基因 AcrIIA4 等在

细胞内能够抑制 SpyCas9 的基因编辑活性,然而这些 Anti-CRISPR 基因抑制 SpyCas9 活性的分子机制并不清楚。哈尔滨工业大学黄志伟课题组解析了 SpyCas9-sgRNA-AcrIIA4 复合物的晶体结构,揭示了 anti-CRISPR 蛋白 AcrIIA4 抑制 SpyCas9 活性的分子机制[®],不仅对揭示细菌免疫系统(CRISPR-Cas9)与噬菌体防御系统(anti-CRISPR)“军备竞赛”的共进化分子机制具有重要科学意义;而且为设计时间、空间特异性地,以及条件性地精确控制 Spy-Cas9 基因编辑活性的工具提供了结构基础。

(5)揭示 III 型 CRISPR-Cas 系统免疫机制

在此之前,科学家们已经系统研究过 I 型、II 型、V 型和 VI 型 CRISPR-Cas 系统。而对最古老、最复杂的 III 型 CRISPR-Cas 系统,人类的了解还相对欠缺。因而,这项新成果是 CRISPR-Cas 系统抗病毒机理的又一重大突破。

中国科学院生物物理研究所王艳丽课题组和章新政课题组解析了嗜热链球菌(*Streptococcus*

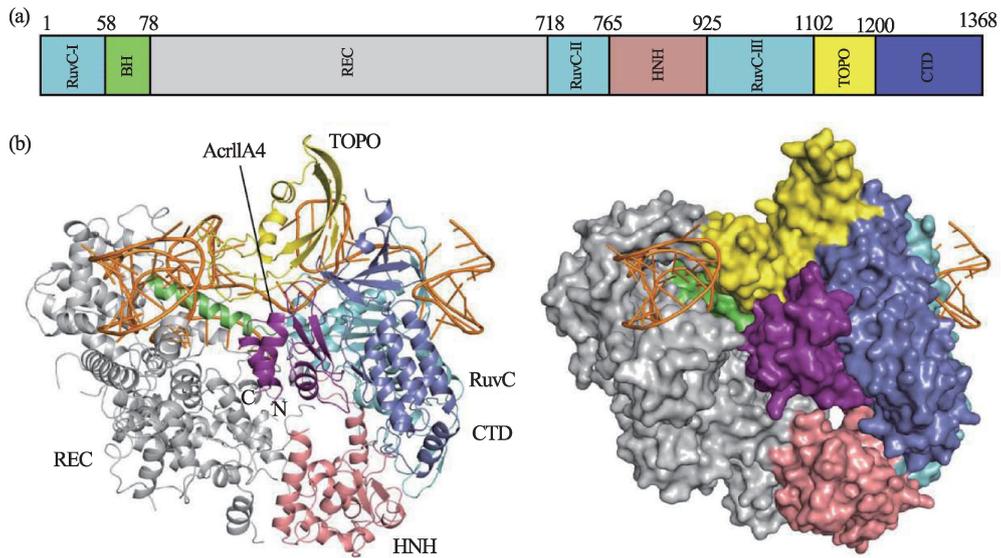


图9 SpyCas9-sgRNA-AcrIIA4复合物的晶体结构⁹

thermophilus)III-A型效应复合物Csm的高分辨率晶体结构,以及Csm与不同类型的目的RNA及ATP的七种不同底物结合状态的、近原子分辨率的冷冻电镜结构,系统地阐述了III型CRISPR-Cas系统抵御外源核酸的分子机制¹⁰。该研究是CRISPR-Cas系统抗病毒机理的又一重大突破,进一步阐明多蛋白组成的效应复合物识别和切割外源核酸的分子机制,并为开发III型CRISPR系统作为应用工具打下重要的理论基础。

BioSAXS技术与其他技术联用的应用实例

(1)免标记顺磁核磁新方法的BioSAXS验证

“生命在于运动”是法国著名思想家伏尔泰提出的运动哲学格言。蛋白质作为生命组成的基本单元,其本身也是处于不断运动的动态过程中。作为生命活动的执行者,蛋白质只有通过运动才能执行特定的生物学功能。为了更好的了解蛋白质结构的动态变化过程,中国科学院武汉物理与数学研究所唐淳研究员率领其科研团队发展了一种免标

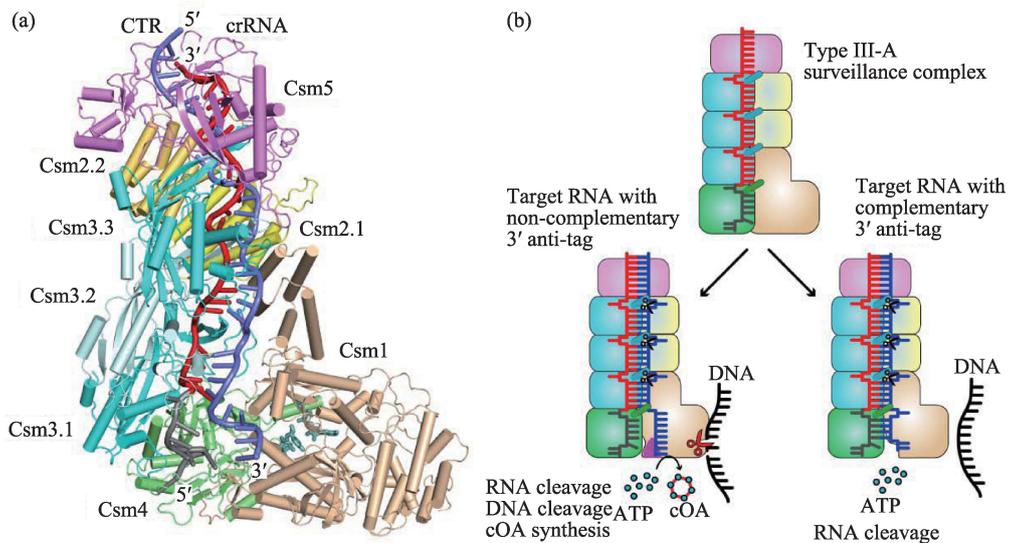


图10 III-A型CRISPR-Cas系统中Csm复合物的结构生物学研究(a)Csm同源靶RNA与AMPPNP复合物的电镜结构;(b)III-A型CRISPR-Cas系统抵御外源核酸入侵的模式图¹⁰

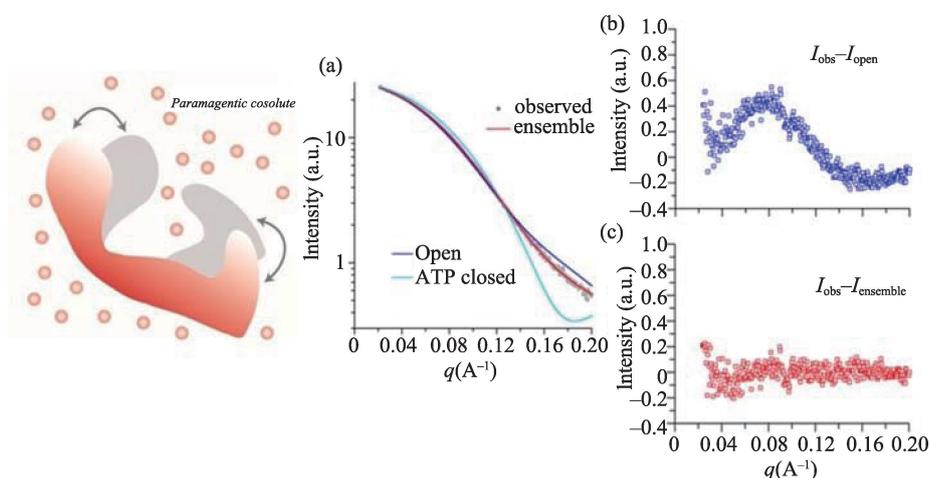


图11 SAXS技术与溶液顺磁弛豫增强技术研究蛋白质动态结构应用实例[®]

记的顺磁核磁技术,不仅能够接近生理环境的溶液状态下对蛋白质的动态结构进行解析,还避免了传统的顺磁核磁技术需要对蛋白质本身进行修饰标记的限制[®]。2016年12月19日,唐淳课题组的研究人员用这种新方法准确捕获了不同大小、不同运动特性的蛋白质体系在溶液中的动态系综结构,并借助国家蛋白质科学研究上海设施的BioSAXS线站(BL19U2)对数据进行了验证。相关研究成果发表在《德国应用化学杂志》。该研究通过SAXS技术完美验证了课题组开发的顺磁核磁共振技术对蛋白质系综结构分布的标记,也进一步说明了SAXS与核磁共振两者的整合研究也将在其他领域发挥越来越重要的作用。

(2) 荧光分子探针构建与应用的BioSAXS验证

英国皇家化学会的《化学科学》(*Chemical Science*)刊物以封面形式报道了国家蛋白质科学研究上海设施BioSAXS线站(BL19U2)用户在荧光分子探针构建与应用方面的研究进展。该工作由中科院药物研究所李佳研究员、藏奕研究院课题组与华东理工大学贺小鹏副研究员课题组合作,共同开发了一支可用于同时检测超分子交联蛋白质的新型糖基折叠型探针[®]。这种探针采用两种常用的荧光染料,促使探针在水相中行程一类“自折叠”的染料折叠体,进而在荧光探针部分引入可被花生凝集素(PNA)与脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPr)识别的半乳

糖,通过SAXS技术证实了这一折叠体可通过与PNA的相互作用解折叠,进而通过苾分子间堆叠作用形成探针/凝集素超分子交联体。这一发现可用于检测并协同调控生物大分子的结构,对于流行性病毒的快速检测具有重要意义。

红外方法在生命科学中的应用实例

(1) 间充质干细胞早期分化研究

脂肪细胞分化是脂肪组织发展中的一个关键过程,脂肪发育异常有可能导致新陈代谢疾病,比如肥胖症、II型糖尿病和异常血脂症。间充质干细胞是一种用来研究人类脂肪生成的理想体外模型。由于针对其早起分化过程研究不够充分,导致人们难以深入理解脂肪形成过程的机理。同步辐射红外光谱技术(SR-FTIR)能够检测细胞内的生物大分子及其变化信息。上海应用物理研究所吕军鸿课题组借助BL01B线站,使用SR-FTIR技术在此方面进行了研究[®]。SR-FTIR可以对间充质干细胞中主要生物大分子进行高分辨的无损红外检测。如下图所示,通过对SR-FTIR结果分析,可以在单细胞水平上,根据间充质干细胞的光谱特征,判定它们在脂肪生成过程中所处的不同阶段。研究表明,在间充质干细胞决定阶段,脂质影响很大;SR-FTIR光谱中特征峰可以作为判断细胞早期分化阶段细胞状态的一个潜在的标志物。此研究再次证明,SR-FTIR是一种研究亚细胞标本的高灵敏方

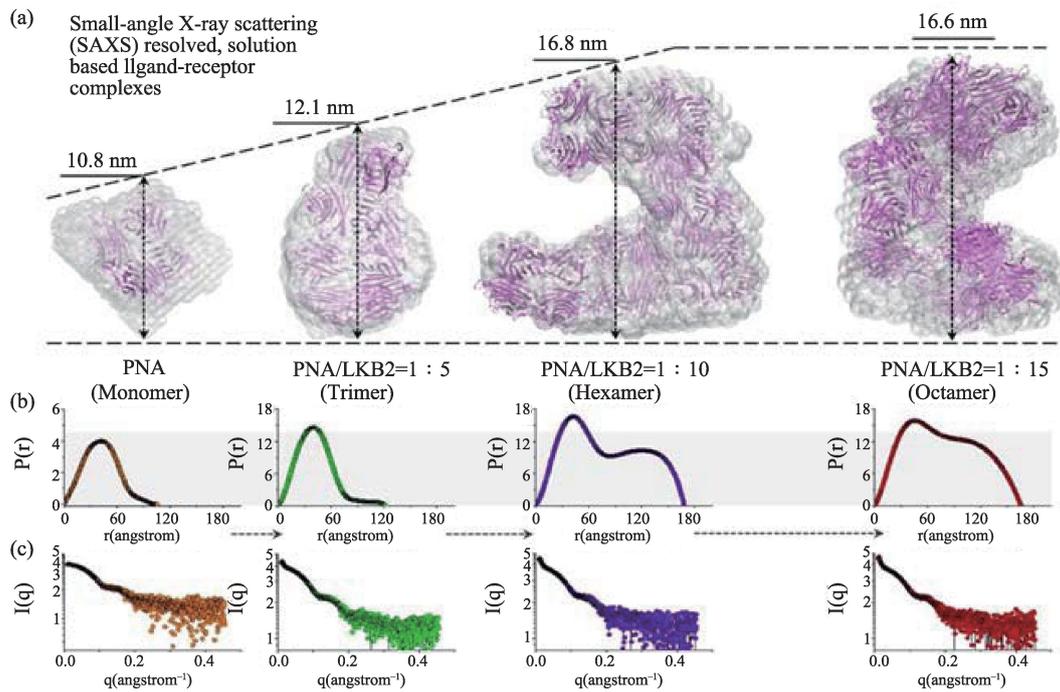


图 12 糖基折叠探针的结构、与蛋白质作用模式的SAXS研究^③

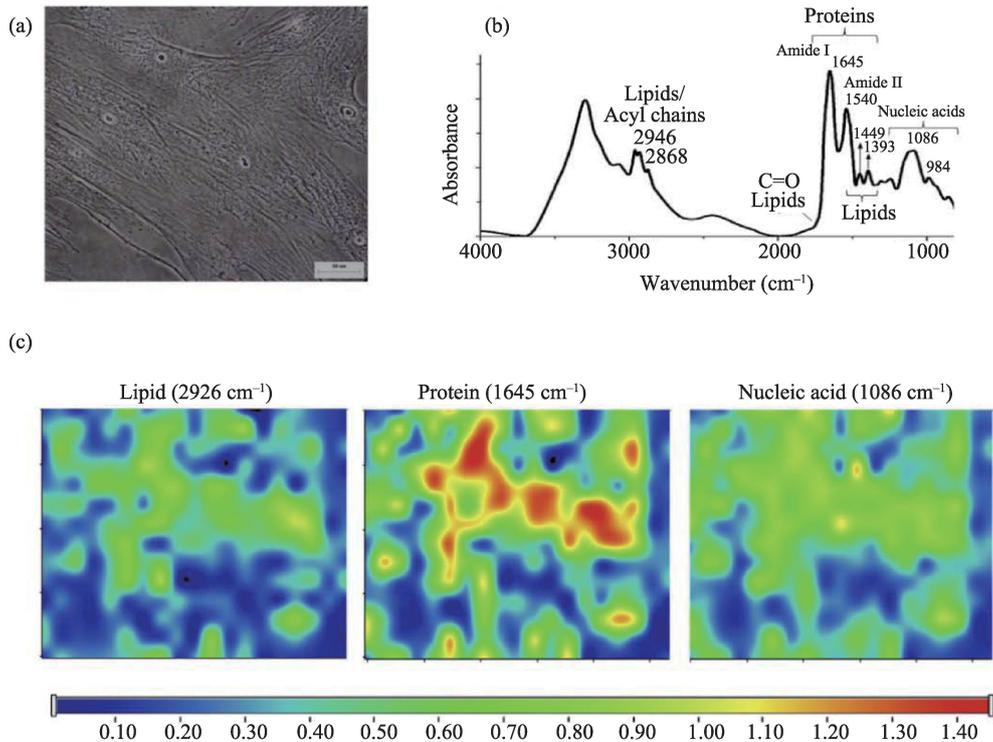


图 13 SR-FTIR 研究间充质干细胞 (a)细胞的光学图像;(b)红外光谱,标记出了生物大分子的吸收;(c)细胞中脂质、蛋白质和DNA的分布^④

法,可用于研究细胞结构中的微小变化,也是研究干细胞命运决定和分化的有力手段。

(2)红外方法揭示髓鞘在中红外至太赫兹光谱

范围传播信号的新机制

髓鞘是在许多脊椎动物神经系统中包裹神经细胞轴突的多层结构,最近有研究发现髓鞘的作用

不只是作为神经的绝缘层,髓鞘对于认知和学习等过程都有重要作用。此外,髓鞘损伤还会导致各种疾病,如硬化症、瘫痪和认知障碍等。最重要的是,

有髓鞘的神经中动作电位传播速度要远快于无髓鞘的神经,这种现象被称为跳跃式传导“saltatory conduction”,这种现象的机理仍不清楚。国防科技

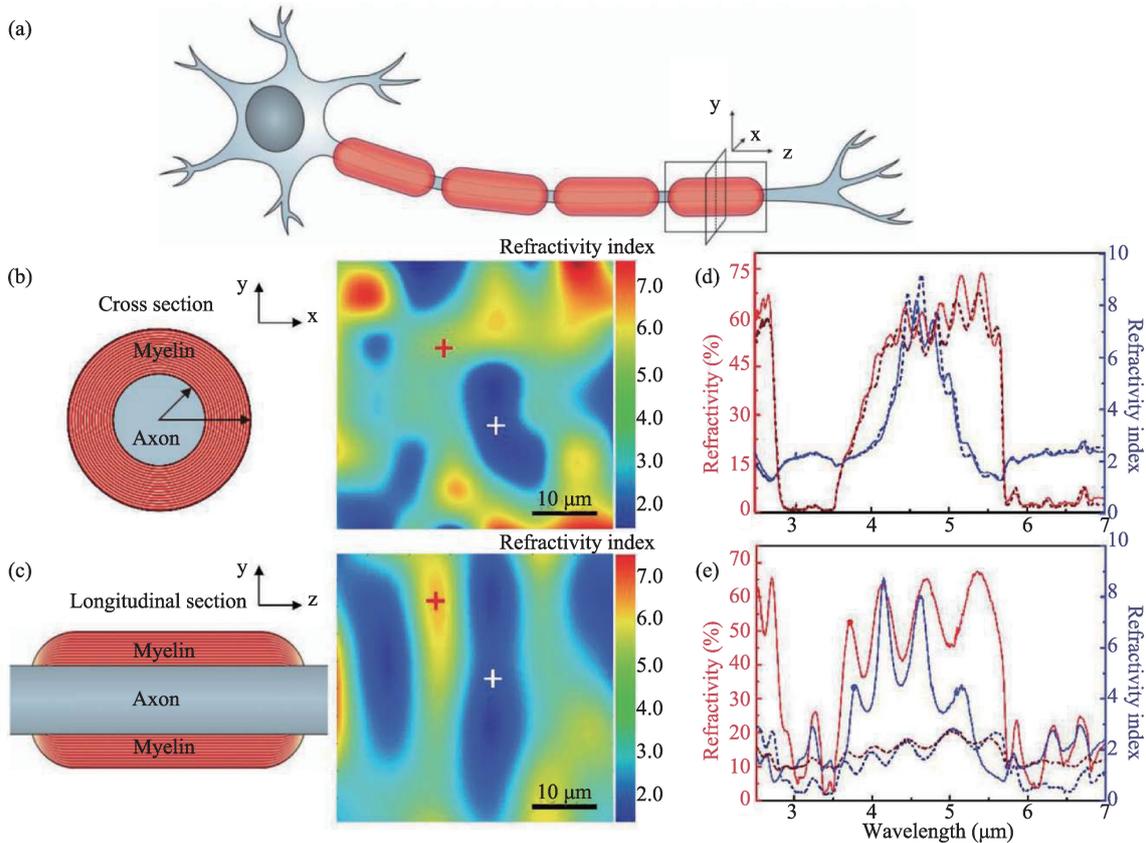


图14 SR-FTIR研究髓鞘和轴突结构的红外折射性质⁵⁵

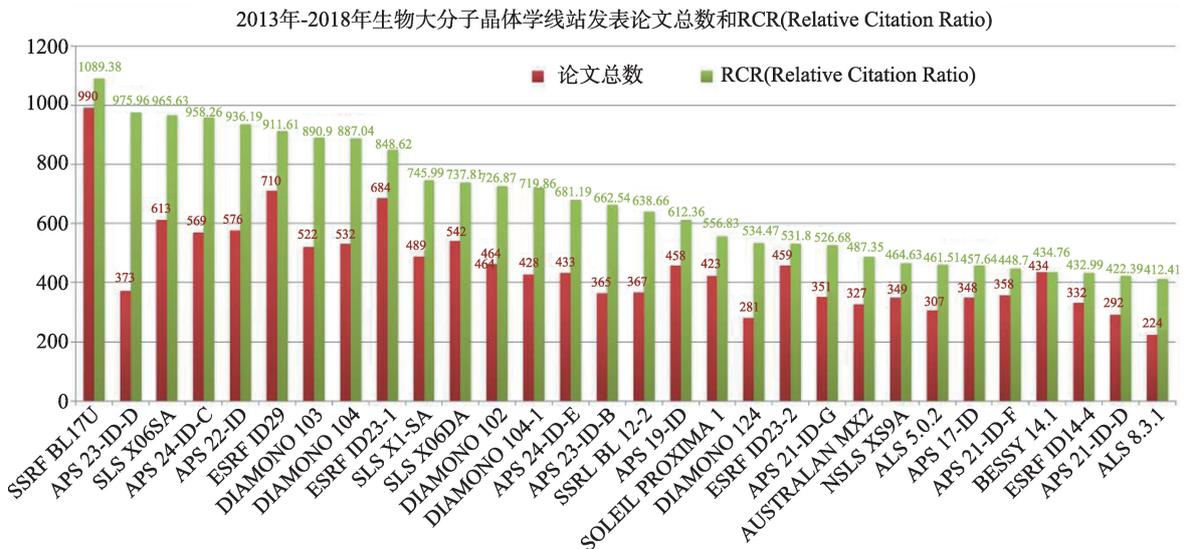


图15 2013年-2018年上海光源生物大分子晶体学线站BL17U1发表论文总数和RCR与国际同类线站对比
(论文数据来源: <http://biosync.skb.org>; RCR数据来源: <https://icite.od.nih.gov>。RCR: Relative Citation Ratio, a new metric that uses citation rates to measure influence at the article level)

创新研究院常超教授课题组采用SR-FTIR技术,对有髓神经的神经结构进行了实验和理论研究^⑤。研究表明,在中红外到太赫兹光谱范围内,髓鞘的折射率比细胞外基质或轴突内高约2倍,这一结果证明髓鞘可以作为红外介质波导。通过计算髓鞘的材料特性与髓鞘神经中自由基能量分布的相关性,证明了具有正常厚度(约2 μm)和介电常数的髓鞘鞘层可以约束鞘层内的红外场能,使红外信号在鞘层中传播,且没有大的能量损失。信号能量的传播在通过朗飞结时被周期性的“继电器效应”中继并放大。这些结果为解释红外和太赫兹通过神经髓鞘传递的机制提供了首个模型,同时可能促进生物组织无标记检测、基于生物材料的传感器、神经信息和无创脑机接口的发展。

在上海光源运行开放前的十几年间,国内同步装置解析的蛋白质晶体结构只有99个,上海光源运行开放十年后,解析的蛋白质晶体结构数达到了3775个。全国结构生物学研究组从不足50个增到200多个。上海光源推动了我国结构生物学的跨越式发展。

参考文献

- ① Li, Q., et al., *The 2009 pandemic H1N1 neuraminidase N1 lacks the 150-cavity in its active site*. Nature Structural & Molecular Biology, 2010. 17: p. 1266.
- ② Zhang, W., et al., *Crystal structure of the swine-origin A (H1N1)-2009 influenza A virus hemagglutinin (HA) reveals similar antigenicity to that of the 1918 pandemic virus*. Protein & Cell, 2010. 1 (5): p. 459-467.
- ③ Zhang, W., et al., *An airborne transmissible avian influenza H5 hemagglutinin seen at the atomic level*. Science, 2013. 340(6139): p. 1463-1467.
- ④ Lu, G., et al., *Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26*. Nature, 2013. 500: p. 227.
- ⑤ Wang, H., et al., *Ebola Viral Glycoprotein Bound to Its Endosomal Receptor Niemann-Pick C1*. Cell, 2016. 164(1-2): p. 258-268.
- ⑥ Song, H., et al., *Molecular Basis of Arthritogenic Alphavirus Receptor MXRA8 Binding to Chikungunya Virus Envelope Protein*. Cell,

2019. 177(7): p. 1714-1724 e12.

- ⑦ Dong, D., et al., *The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA*. Nature, 2016. 532(7600): p. 522-526.
- ⑧ Liu, L., et al., *Two Distant Catalytic Sites Are Responsible for C2c2 RNase Activities*. Cell, 2017. 168(1-2): p. 121-134 e12.
- ⑨ Liu, L., et al., *The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a*. Cell, 2017. 170(4): p. 714-726 e10.
- ⑩ Dong, et al., *Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein*. Nature, 2017. 546(7658): p. 436-439.
- ⑪ You, L., et al., *Structure Studies of the CRISPR-Csm Complex Reveal Mechanism of Co-transcriptional Interference*. Cell, 2019. 176 (1-2): p. 239-253 e16.
- ⑫ Gong, Z., et al., *Protein Structural Ensembles Visualized by Solvent Paramagnetic Relaxation Enhancement*. Angewandte Chemie International Edition, 2017. 56(4): p. 1002-1006.
- ⑬ Li, K.-B., et al., *Foldable glycoprobes capable of fluorogenic cross-linking of biomacromolecules*. Chemical Science, 2016. 7(10): p. 6325-6329.
- ⑭ Liu, Z., et al., *Synchrotron FTIR microspectroscopy reveals early adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells at single-cell level*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016. 478(3): p. 1286-1291.
- ⑮ Liu, G., et al., *Myelin Sheath as a Dielectric Waveguide for Signal Propagation in the Mid-Infrared to Terahertz Spectral Range*. Advanced Functional Materials, 2019. 29(7): p. 1807862.

