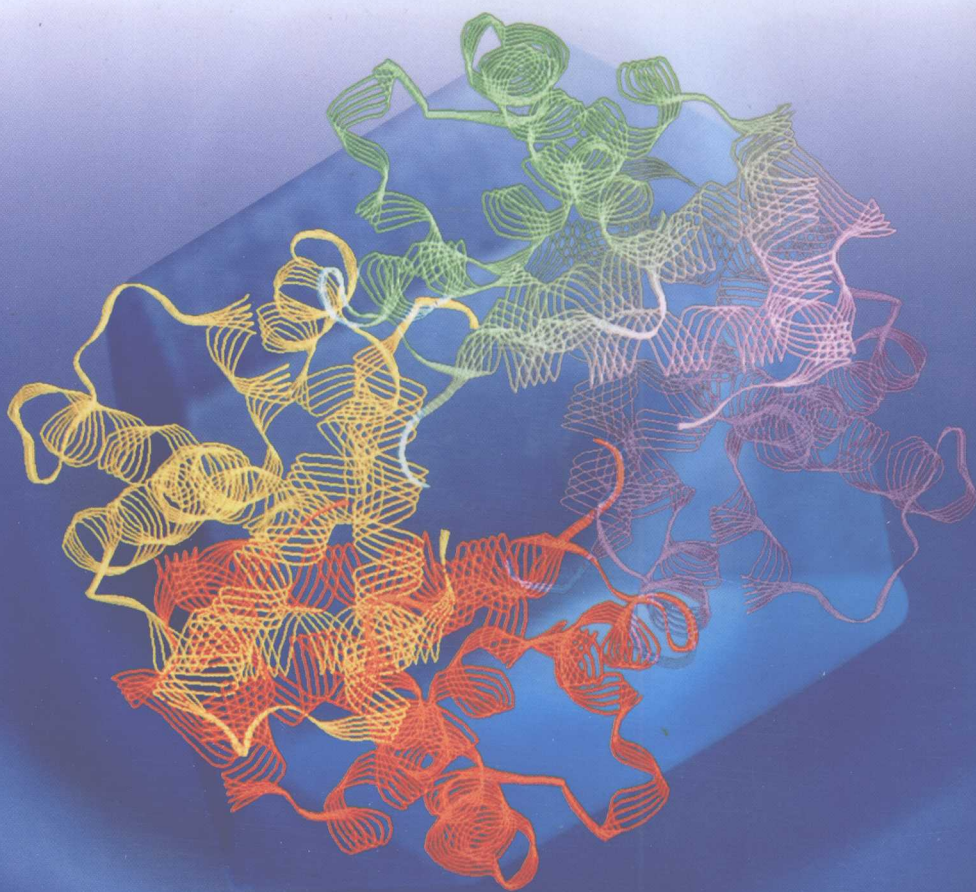


★高等院校生命科学系列教材

生物大分子晶体学基础

(第二版)

卢光莹 华子千 编著



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

内容简介

高等院校生命科学系列教材

本书是生物物理学中生物大分子晶体学及其原理第一编。全书共分三章。第一章介绍了生物大分子晶体的基本概念、晶体学的基本原理、X射线衍射的基本原理、生物大分子晶体的制备、生物大分子晶体的衍射实验、生物大分子晶体的结构测定、生物大分子晶体的应用。第二章介绍了生物大分子晶体的衍射实验、生物大分子晶体的结构测定、生物大分子晶体的应用。第三章介绍了生物大分子晶体的衍射实验、生物大分子晶体的结构测定、生物大分子晶体的应用。

生物大分子晶体学基础

(第二版)

卢光莹 华子千 编著

ISBN 7-301-02729-X

卢光莹 华子千 编著

ISBN 7-301-02729-X

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第082329号

ISBN 7-301-02729-X

作者：卢光莹 华子千
责任编辑：卢光莹 华子千
封面设计：卢光莹 华子千
ISBN 7-301-02729-X
出版发行：北京
地址：北京
网址：http://www.pup.com.cn
电话：010-62752024
印刷：北京
装订：北京
1895

定价：22.00元



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

电话：010-62752024

内 容 简 介

本书阐述了生物大分子 X 射线晶体学的一般原理及其在生物大分子晶体结构分析中所取得的成果。全书共分两篇。第一篇介绍了生物大分子晶体生长、生物大分子晶体结构的共同特征以及利用 X 射线衍射测定晶体结构的基本概念和方法等,并简要介绍时间分辨晶体学与生物纤维衍射的一般特征;第二篇分别介绍了蛋白质、核酸和多糖等重要生物大分子以及重要的蛋白质与核酸的复合体,即核小体、核糖体和病毒的晶体结构分析以及所取得的成就,重点描述了各类生物大分子的结构特点和规律。

本书可作为生物学、化学等有关专业大学生和研究生的教材或参考书,亦可供有关科学工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物大分子晶体学基础/卢光莹,华子千编著. —2 版.—北京:北京大学出版社,2006.8
ISBN 7-301-02729-X

I. 生… II. ①卢…②华… III. 生物大分子-晶体学 IV. Q71

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 085329 号

书 名: 生物大分子晶体学基础(第二版)

著作责任者: 卢光莹 华子千 编著

责任编辑: 黄 炜

标准书号: ISBN 7-301-02729-X/Q·064

出版发行: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区成府路 205 号 100871

网 址: <http://www.pup.cn> 电子信箱: zpup@pup.pku.edu.cn

电 话: 邮购部 62752015 发行部 62750672 编辑部 62752038 出版部 62754962

印 刷 者: 北京大学印刷厂

经 销 者: 新华书店

787 毫米×1092 毫米 16 开本 16.5 印张 400 千字

1995 年 12 月第 1 版 2006 年 8 月第 2 版

2006 年 8 月第 2 版第 1 次印刷

定 价: 25.00 元

未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容

版权所有,侵权必究

举报电话: (010)62752024 电子信箱: fd@pup.pku.edu.cn

前 言

50年代初,X射线晶体学成功地应用于生物大分子立体结构的测定。一些杰出的工作,如蛋白质的 α 螺旋等二级结构模型的建立、肌红蛋白、血红蛋白等晶体结构的测定以及DNA双螺旋模型的提出等,都成为生物学发展中具有划时代意义的伟大成就,并显示了X射线衍射方法是在原子水平上了解生物大分子的立体结构与功能的关系,揭示生命奥秘的最强有力的手段之一。

正是这些自然界存在着的像精美的艺术品般的形象化了的有趣的结构吸引和鼓舞着我们于60年代初步入了这一领域的大门。四十多年来,X射线晶体学发展极为迅速,尤其是生物大分子结构的测定已成为其中最活跃的研究领域,并广泛涉及生物学的各个学科。我们感到现在已有必要并有可能将生物大分子晶体学编写成教科书,将自己学习的心得传授给学生,使他们了解和掌握X射线晶体学的基本原理,并对其在生物学中的应用和成就以及各类生物大分子的结构特点和规律有一个较全面的了解,扩大知识面,用立体结构的观点去思考生物学中的问题,更重要的是了解有关学科发展的历史并从中获得科学研究的新思路。

生物大分子晶体学除了X射线晶体学以外,近十多年来还发展了电子晶体学和中子衍射方法等。由于篇幅有限,本书只涉及X射线晶体学。不过,其基本原理同样可用于电子晶体学和中子衍射等。此外,本书只偏重于介绍生物大分子结构分析的基本原理和方法以及已经揭示出的结构特点和规律,不详细讨论结构与功能的关系。

本书共分两个部分。第一篇为X射线晶体学的基本原理,由华子千编写;第二篇为各类重要生物大分子的晶体结构分析,由卢光莹编写。由于我们的水平有限,而且X射线晶体学还在不断发展,恳请读者指出书中的错误和缺点。并借此机会,对教诲过我们的老师、帮助过我们的同事和学生以及北京大学出版社的工作人员表示衷心的感谢。

作 者

1994年5月于北京大学燕园

再版前言

本书自从 1995 年第一次出版到现在整整过去了 10 年。在此期间,生命科学飞速发展,特别是人类基因组序列的完全测定,推动了结构基因组学、功能基因组学以及蛋白质组学等的发展,并使得生物大分子晶体学具有更重要的意义和地位。同时,在此期间,由于 X 射线光源的改进、实验技术的改进以及计算技术的开发等,生物大分子晶体学也飞速发展,并取得了很多突破性的理论和应用的成果。为了反映当代生物大分子晶体学的成就,便于读者了解和学习有关知识,有必要对本书的第一版进行修改和补充。本次修订在晶体生长方面补充了晶体生长实验和衍射前的晶体准备;在 X 射线晶体结构测定方面增补了旋转阳极靶 X 射线光源、同步辐射 X 射线光源和 X 衍射线的检测,模型建立和修正中的修正方法的一般原则和模型质量检验,多波长散射在解决相角问题中的应用以及时间分辨晶体学原理概要等内容;在生物大分子的三维结构内容中介绍了近年来研究中所取得的成就,增补了重要的膜蛋白、RNA、核小体和核糖体等三维结构的最新进展。

值得一提的是,在第一版书中所引用的他人的插图和表格,除少数外都已在文中标明了出处,这次再版时又做了一些增补,但仍有部分遗漏,在此特对原作者深表歉意并致以诚挚的谢意。

在修订本书过程中邝宝、梁宇和老师及学生,还有北京大学出版社的黄炜和郑月娥编辑等给予我们很多的帮助,在此表示衷心的感谢!

作 者

2004 年 5 月于北京大学

目 录

第一篇 生物大分子 X 射线晶体结构测定的基本原理	
第一章 晶体生长与衍射前的晶体准备	(2)
1.1 蛋白质分子的晶体生长	(3)
1.1.1 影响蛋白质溶解性的因素	(3)
1.1.2 影响晶核形成和晶体生长的因素	(5)
1.1.3 结晶技术	(5)
1.1.4 晶体生长实验	(8)
1.2 衍射前的晶体准备	(10)
1.2.1 晶体的挑选和安装	(10)
1.2.2 低温冷冻晶体	(10)
第二章 晶体结构的共同特征	(12)
2.1 晶体的空间格子、晶胞和晶面指标.....	(12)
2.1.1 晶体的空间格子	(12)
2.1.2 晶体的晶胞	(15)
2.1.3 晶面指标	(17)
2.2 晶体的对称性、点群、晶系和空间群	(18)
2.2.1 晶体的对称性	(18)
2.2.2 点群	(23)
2.2.3 7 个晶系	(24)
2.2.4 空间群	(24)
第三章 晶体的 X 射线衍射图样	(28)
3.1 衍射线的分布	(29)
3.1.1 一个原子的散射	(29)
3.1.2 无限原子列的衍射方向	(29)
3.1.3 无限原子列的衍射线的分布	(30)
3.1.4 晶体的衍射方向	(31)
3.1.5 布拉格方程	(32)
3.1.6 衍射线的分布与倒易晶格	(34)
3.1.7 晶体的衍射方向与反射球	(37)
3.2 衍射线的强度	(38)
3.2.1 一个原子的散射强度	(38)

3.2.2	晶胞的散射强度	(38)
3.2.3	晶体的衍射强度	(39)
3.2.4	衍射图样中强度分布的中心对称定律	(40)
3.2.5	晶胞中原子的数量和分布对强度的影响	(40)
3.2.6	空间格子、对称元素对衍射强度的影响	(42)
第四章 衍射图样的记录		(46)
4.1	X射线的发生和一般性质	(46)
4.1.1	封闭式X射线管	(46)
4.1.2	旋转阳极(靶)X射线光源	(47)
4.1.3	同步辐射X射线光源	(47)
4.2	X衍射线的检测	(48)
4.2.1	胶片法	(48)
4.2.2	潜像板法	(48)
4.2.3	电子平面探测器法	(48)
4.3	记录衍射图样的方法	(49)
4.3.1	旋转和回摆照相法	(49)
4.3.2	旋进照相法	(52)
4.3.3	魏森堡照相法	(57)
4.3.4	四圆衍射仪的基本原理	(59)
第五章 晶胞中原子位置的测定		(63)
5.1	晶体的电子密度分布函数	(63)
5.2	电子密度图	(64)
5.3	电子密度图的解释与结构模型的建立	(66)
5.4	结构模型的修正	(69)
5.4.1	修正的一般原则	(69)
5.4.2	修正的监控指标	(70)
5.4.3	修正的一般方法	(70)
5.5	模型质量的检验	(72)
5.5.1	晶体学和自由偏差因子(R_c 和 R_i)	(73)
5.5.2	立体化学标准	(73)
5.5.3	主键骨架双面角的分布特征图	(73)
第六章 解决相角问题的方法		(75)
6.1	帕特森函数法	(75)
6.2	同晶置换法	(77)
6.2.1	同晶置换法测定相角的原理	(78)
6.2.2	重原子位置的测定	(79)
6.2.3	蛋白质母体的相角测定	(79)
6.3	反常散射法	(81)
6.3.1	单波长反常散射的应用	(83)

6.3.2	多波长反常散射方法	(83)
6.4	分子置换法	(84)
6.4.1	分子置换法在晶体结构测定中的主要应用	(85)
6.4.2	分子置换法的基本原理	(85)
第七章	劳厄衍射与生物纤维图	(89)
7.1	劳厄衍射实验原理	(89)
7.2	生物纤维状物质的 X 射线衍射	(91)
7.2.1	纤维衍射图	(91)
7.2.2	螺旋结构的纤维衍射图	(93)
7.2.3	纤维状物质的结构分析	(94)
第二篇 生物大分子的三维结构		
第八章	蛋白质的三维结构	(98)
8.1	氨基酸和多肽链的三维结构和构象角的定义	(98)
8.2	各种氨基酸对蛋白质三维结构的影响	(103)
8.3	纤维状蛋白质的三维结构	(105)
8.3.1	实验方法	(105)
8.3.2	α 角蛋白类	(107)
8.3.3	β 角蛋白类	(108)
8.3.4	胶原类	(110)
8.4	球状蛋白质的晶体结构	(110)
8.4.1	实验方法	(110)
8.4.2	球状蛋白质的二级结构单元	(113)
8.4.3	球状蛋白质的三级结构	(131)
8.4.4	球状蛋白质的四级结构	(139)
8.5	膜蛋白的晶体生长和晶体结构	(147)
8.5.1	膜蛋白的晶体生长	(148)
8.5.2	膜蛋白晶体的 X 射线衍射分析方法	(153)
8.5.3	膜蛋白的晶体结构	(154)
第九章	核酸的三维结构	(160)
9.1	核酸的结构和构象	(160)
9.1.1	糖-磷酸主链和糖苷键的构象角	(160)
9.1.2	核糖和脱氧核糖的 4 种折叠构象形式	(160)
9.1.3	碱基堆积的两种构象	(161)
9.2	脱氧核糖核酸(DNA)的三维结构	(161)
9.2.1	天然 DNA 纤维的制备和 X 射线纤维衍射图样	(163)
9.2.2	DNA 右手双螺旋结构模型	(164)

9.2.3	人工合成寡核苷酸的晶体生长和单晶 X 射线衍射结构分析	(168)
9.2.4	Z-DNA 左手双螺旋结构	(171)
9.2.5	DNA 双螺旋结构的构象变化	(172)
9.3	核糖核酸(RNA)的晶体结构	(174)
9.3.1	tRNA 的晶体生长和晶体结构分析	(176)
9.3.2	tRNA 的晶体结构	(176)
第十章 核小体和染色体的三维结构		(180)
10.1	核小体核心颗粒的晶体生长和单晶结构分析	(181)
10.2	核小体核心颗粒的三维结构	(184)
10.2.1	核小体核心颗粒的整体结构	(185)
10.2.2	组蛋白折叠对	(187)
10.2.3	组蛋白折叠与 DNA 的相互作用	(187)
10.2.4	组蛋白折叠的延伸部分和尾巴	(188)
10.2.5	DNA 超螺旋	(188)
10.2.6	有序的水分子和其他离子	(189)
10.3	染色质的 X 射线纤维衍射分析和染色质超级结构的螺线管模型	(189)
10.3.1	染色质胶纤维样品的制备和 X 射线衍射方法	(189)
10.3.2	染色质的螺线管模型	(189)
第十一章 核糖体的三维结构		(191)
11.1	核糖体的晶体生长和重原子衍生物	(194)
11.1.1	完整核糖体的晶体生长	(194)
11.1.2	核糖体小亚基的晶体生长	(195)
11.1.3	核糖体大亚基的晶体生长	(196)
11.2	核糖体的晶体结构	(197)
11.2.1	完整核糖体的晶体结构	(197)
11.2.2	T30S 小亚基的晶体结构	(200)
11.2.3	H50S 大亚基的晶体结构	(205)
第十二章 病毒的三维结构		(214)
12.1	病毒的形态学和整体结构	(214)
12.2	病毒的样品制备和晶体生长的一般原理	(216)
12.3	病毒的 X 射线衍射分析研究简述	(217)
12.4	具有螺旋对称性的病毒	(218)
12.4.1	螺旋对称性病毒完整颗粒的样品制备和 X 射线纤维衍射分析方法	(218)
12.4.2	外壳蛋白质的样品制备、晶体生长和结构分析	(219)
12.4.3	棒状植物病毒 TMV 的三维结构	(220)
12.4.4	丝状的噬菌体 Pf1 的三维结构	(224)
12.5	球形病毒	(225)
12.5.1	二十面体的几何学	(225)
12.5.2	球形病毒的二十面体对称性	(225)

12.5.3 球形病毒的晶体生长和结构分析·····	(230)
12.5.4 球形病毒 TBSV 的三维结构 ·····	(231)
12.5.5 球形病毒外壳蛋白质肽链的折叠特点 ·····	(233)
第十三章 多糖的三维结构·····	(236)
13.1 多糖的构象·····	(236)
13.1.1 吡喃糖的折叠构象 ·····	(236)
13.1.2 多糖链的构象角 ·····	(237)
13.2 多糖的 X 射线衍射分析方法 ·····	(238)
13.2.1 纤维素的 X 射线衍射分析方法 ·····	(238)
13.2.2 淀粉的样品制备和 X 射线衍射分析方法 ·····	(239)
13.3 多糖的三维结构·····	(241)
13.3.1 纤维素的三维结构 ·····	(241)
13.3.2 淀粉的三维结构 ·····	(242)
附录 65 个非对映空间群的衍射群和系统消光判据 ·····	(245)
参考文献·····	(248)

第一篇 生物大分子 X 射线晶体 结构测定的基本原理

生物大分子 X 射线晶体学是应用 X 射线衍射方法研究生物大分子的晶体,揭示分子的立体结构与功能关系的科学。因此,为了掌握生物大分子 X 射线晶体学的基本原理,必须首先对 X 射线衍射法有一个基本的了解。

X 射线是一种电磁波,能直线传播,能使胶片感光 and 气体电离,这是大家共知的性质。在晶体结构分析中应用的 X 射线是波长在 0.1 nm 左右的电磁波,由于这一波长与晶体内构成分子的原子间的距离具有同一数量级以及由于晶体结构内分子排列的规则性,当 X 射线入射到晶体上时,晶体中的每一个原子都发射出次生的 X 射线,并相互干涉,形成一个衍射图样。如果将这个过程与光学显微镜成像相比较,两者有相似之处。在显微镜下,一束平行的可见光入射到一个物体上,物体散射入射光,物镜会聚散射光而成像。对于 X 射线来说,由于还没有一种材料可作为聚焦镜,因此不可能直接会聚散射光而形成物像,看到晶体内部的结构。但是晶体的衍射图样与晶体内部的结构有一定的关系,即衍射图样内衍射点的排列方式、点间距离的大小与晶体内生物大分子的排列方式和重复周期大小有关,而衍射点的强度分布与生物大分子结构本身的特点有关。因此,从原则上讲可以通过分析衍射点的排列方式和测量点间距离的大小来推算分子在晶体结构中的排列方式和重复周期的大小,以及通过测量衍射点的强度,应用一系列数学方法,借助电子计算机可测定分子内每个原子在空间的坐标,从而测定整个分子的结构和晶体结构。

生物大分子 X 射线晶体结构的测定工作,在实践中,大体上可以分成彼此相互联系和影响的若干步骤:(1) 生长适合于 X 射线分析的晶体;(2) 收集晶体的衍射数据(记录衍射图样的强度和分布);(3) 设法解决每个衍射点的相角问题;(4) 电子密度图的计算、解释和结构模型的构建;(5) 结构模型的修正和质量检验。在上述几个方面,晶体学家已积累了许多成功的经验,并有大量文献和专著,可供读者进一步深入学习和探讨。

为了便于大家理解 X 射线衍射法测定晶体结构的基本原理,本篇特作以下安排:①介绍生物大分子晶体生长和晶体结构的共同特征(第一、二章);②讨论晶体衍射图样的产生,以及衍射图样中衍射点的分布与晶体内分子排列方式、重复周期大小的关系,衍射强度与分子立体结构的关系(第三章);③讨论 X 射线的发生,以及衍射图样的检测和记录方法的基本原理(第四章);④讨论电子密度图的计算、解释和结构模型的建立与修正以及质量检验(第五章);⑤介绍解决相角问题的一些方法(第六章);⑥简要介绍时间分辨晶体学——劳厄衍射的基本特点,并对生物样品纤维图的特征作简要说明(第七章)。

第一章 晶体生长与衍射前的晶体准备

要进行 X 射线晶体结构分析,首先要得到适合于结构分析的晶体。这里所谓“适合于”包括两层意思:第一,晶体内部结构要具有有序性,是单晶,不是孪晶,否则由于孪晶的两个晶体的衍射图样间的干涉和重叠而无法得到具有结构本身特点的衍射图样;第二,晶体要有一定的大小和形状。因为晶体衍射线的强度大体上正比于晶体的体积,而反比于相对分子质量的大小。一般讲相对分子质量为 50 000 左右的蛋白质分子,需要 0.3 mm^3 或者更大的晶体,才有可能作高分辨率的结构分析。对于相对分子质量更大的蛋白质分子,那就需要更大的晶体。晶体太薄、太长不利于收集高质量的衍射数据。为了满足上述要求,首先要使生物大分子结晶,然后设法长大。

应用 X 射线衍射法研究生物大分子的晶体结构,当前最主要是蛋白质分子和核酸分子以及它们的复合物,蛋白质和核酸分子两者在表面电荷、外形等方面虽有所不同,在结晶条件上亦有差异,但是基本规律、方法还是一致的。所以,在此主要以蛋白质分子为例,讨论生物大分子晶体生长的一般规律和方法。

蛋白质结晶过程像其他小分子物质一样,是一个有序化过程,即在溶液中处于随机运动状态的分子转变成有规则排列状态的固体。一般认为要使这种有序化过程开始,必须要形成一定大小的晶核,并使分子不断地结合到形成的晶核上。而一个蛋白质溶液能开始形成晶核,就必须使溶液达到过饱和。保持一定的条件,使溶液中的分子失去自由运动的能量(平移、旋转等)而结合到晶核上,形成新的稳定的化学键(次级键),使整个体系能量降低而形成晶体。

蛋白质、核酸等生物大分子的结晶比一般小分子化合物的结晶要困难得多,这是由于这些大分子的相对分子质量很高,几何形状较复杂,表面带多种电荷,因此分子间相互作用或相互结合的点很多,而可能形成有序排列的关键结合点和几何匹配位置又很少,在外界条件(如 pH、温度、不同溶剂等)的影响下,分子构象容易产生某些变化;同时,在大分子结晶时,又必须保持在水合状态,或者在生理 pH 和温度条件下。因此,一般小分子结晶的方法,都不适合应用于大分子的晶体生长,从而使得生物大分子的晶体生长工作相当困难。不过在蛋白质和核酸的晶体生长方面,经过长期的努力已积累了许多成功的经验,对蛋白质的溶解、结晶和生长等方面也进行了许多理论和实验研究。长期以来很难生长出单晶的膜蛋白质,也已生长出了适合于 X 射线衍射分析的晶体。因此,在某些方面已有可能根据生物学意义来选择蛋白质和核酸的 X 射线晶体结构分析的课题,改变了以往只能有什么晶体就分析什么晶体的状况。但是从总的方面来说,生物大分子的晶体生长仍然是摸索性和经验性的,在某种程度上还是靠机遇。因而许多重大的生物学课题由于得不到适合于 X 射线分析的晶体而长期不能进行。晶体生长仍是当前阻碍晶体结构分析工作的关键性问题,为此人们正在作进一步的努力。在物理学方面,正在研究生物大分子的结晶、生长的复杂机理;在自动化方面,已设计和使用了由计算机控制的蛋白质结晶系统;在微重力条件下的晶体生长研究也已引起了不少科学家的兴趣和重视,并已取得实际成果,特别是由于 DNA 重组技术、基因工程的发展,较易得到足够量的样品,因而可能通过大批量的晶体生长实验,克服不易生长晶体的问题。

要生长蛋白质或核酸的晶体最重要的是分离、纯化,获得一定量的、均一的样品,一般要求电泳纯。然后使溶液达到过饱和,在过饱和状态下蛋白质才可能开始结晶。蛋白质溶液的饱和度和溶解性的变化而变化,而溶解性是与蛋白质的浓度、离子强度、温度、pH、加入的有机溶剂以及与蛋白质结合的反离子等因素有关。

1.1 蛋白质分子的晶体生长

1.1.1 影响蛋白质溶解性的因素

蛋白质分子结构具有一定的几何外形,它的带电的、极性的基团分布在分子的表面,其溶解性质可以像任何其他类型的水溶性分子一样来考虑。在溶液中,水分子与蛋白质表面的带电基团和极性基团相互作用,在分子周围形成一个水化层。由于水的高介电常数,使得带电的分子不能相互结合而沉淀,从而使蛋白质分子溶解于水溶液之中。但是溶解性随许多因素的影响而改变。下面讨论一些最主要的影响因素。

1. 离子强度

蛋白质分子可简单地看成是一个大的多价离子,它的溶解性依赖于溶液的离子强度。而离子强度 $\mu = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$, C_i 为离子浓度, Z_i 为离子价。当把中性盐加入到蛋白质溶液中,在低浓度时离子与蛋白质分子表面电荷相互作用形成离子层,这种离子层更好地与水作用而增加了蛋白质的溶解性。这种现象称为盐溶。而当盐浓度增加到一定数量时,离子之间,蛋白质与离子间相互争夺水分子,结果导致了蛋白质分子周围的水化层的破坏而降低了蛋白质的溶解性。此现象称为盐析。

蛋白质分子比一般离子大得多,它的表面极性基团、带电基团相当复杂并有一定的几何分布,表面的有序溶剂分子,以及蛋白质分子的固体状态(晶态或非晶态)等都会影响蛋白的溶解性。但是根据盐溶、盐析现象,可以改变蛋白质的溶解性以控制蛋白质溶液的饱和度,引导蛋白质结晶。

不同离子对蛋白质的溶解性的影响是不同的。小的高电荷离子比大的低电荷的离子在盐析方面影响大,如氯化钾对蛋白质的盐析影响较小。一般的,磷酸钾、硫酸钠、硫酸铵、柠檬酸钠、硫酸镁对蛋白质溶解性的影响按顺序减小。总之,盐对蛋白质溶解性的影响正比于离子所带的电荷和浓度(图 1.1)^[10]。但是这亦不是绝对的,如

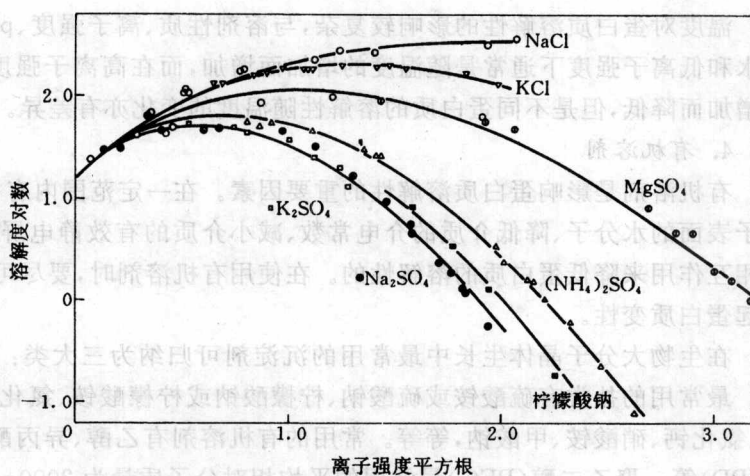


图 1.1 在不同电解质中一氧化碳血红蛋白的溶解性(25°C)

镁离子较铵离子小,但硫酸铵的盐析作用,在某一离子强度下,较硫酸镁强,而且由于硫酸铵的溶解度很高,对蛋白质的作用又较温和,因此硫酸铵被广泛应用,是效果较好的沉淀剂。

2. pH 和相反离子

把蛋白质分子看成具有固定价的带电荷的物质,显然过于简单,是不合适的,因为可以通过改变 pH 或加入特定的结合离子(相反离子)到蛋白质的极性基团上,从而改变蛋白质分子的带电性。一般来说,蛋白质分子带的电荷越高,它的溶解性越大,当净电荷为零时它的溶解性最小。因此可以通过改变 pH 或加入相反离子来改变蛋白质的溶解性而使溶液达到饱和。pH 的改变对蛋白质溶解性的影响见图 1.2^[10],图(a)表明在不同 pH 条件下,由于分子净电荷的改变,虽然蛋白的盐析线的斜率相同,但是,蛋白的溶解度不同。图(b)表明溶解度随 pH 的改变而改变,在某一 pH 时蛋白的溶解度最小。

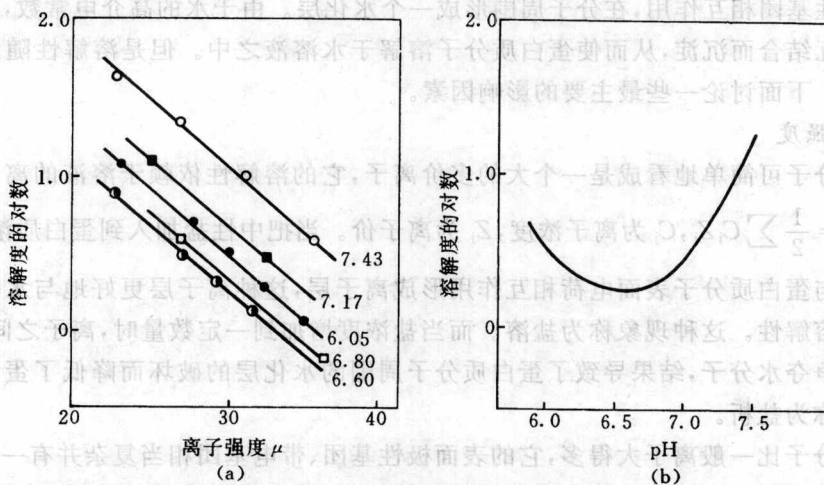


图 1.2 在不同 pH 的浓磷酸缓冲液条件下血红蛋白的溶解性

3. 温度

温度对蛋白质溶解性的影响较复杂,与溶剂性质、离子强度、pH 等因素有关。一般讲,在纯水和低离子强度下通常是随温度的增加而增加,而在高离子强度下蛋白质的溶解性随温度的增加而降低,但是不同蛋白质的溶解性随温度的变化亦有差异。

4. 有机溶剂

有机溶剂是影响蛋白质溶解性的重要因素。在一定范围内有机溶剂亦是通过争夺蛋白质分子表面的水分子、降低介质的介电常数、减小介质的有效静电屏蔽,增加蛋白质分子间的静电相互作用来降低蛋白质的溶解性的。在使用有机溶剂时,要尽可能在低温条件下操作,以免引起蛋白质变性。

在生物大分子晶体生长中最常用的沉淀剂可归纳为三大类:盐类、有机溶剂及聚乙二醇类。最常用的盐类有硫酸铵或硫酸钠、柠檬酸钠或柠檬酸铵、氯化钠或氯化钾和氯化铵、硫酸镁、氯化钙、硝酸铵、甲酸钠,等等。常用的有机溶剂有乙醇、异丙醇、丙酮、二甲基-2,4-戊二醇(MPD)等。聚乙二醇(PEG)最常用的平均相对分子质量为 2000~6000,但是相对分子质量在 400~20 000 范围的 PEG 都曾成功地用于蛋白质结晶。聚乙二醇的相对分子质量的大小对促使蛋白质结晶有些影响,但是,尚未发现有明显的、确定的关系。用于结晶的聚乙二醇的浓度,

一般在4%~18%范围以内。聚乙二醇的作用主要是改变原来水的结构,与水形成复杂的网状结构,从而促使溶剂排斥蛋白质分子而减少溶解性,最后使蛋白质结晶。聚乙二醇是目前较为广泛使用的沉淀剂之一。

1.1.2 影响晶核形成和晶体生长的因素

通过改变离子强度、pH、相反离子类型、温度和有机溶剂浓度等因素可以减少蛋白质的溶解度,最后使溶液达到过饱和。而过饱和是一种不稳定的状态,在这种状态下可能产生晶核,其中一些晶核生长成大的晶体。但是,不稳定状态向稳定状态的转化是受外界因素影响,并可以加以控制,从而达到产生较少的晶核以及生长出大的晶体。

影响分子成核和晶体生长的因素很多,如杂质、试剂纯度、振动、重力和容器形状等,但最关键的是蛋白质的纯度,因为杂质有碍分子的有序排列。许多晶体生长实验证明,通过等电聚焦电泳、高效液相层析等方法进一步纯化样品以后,原来不能成核和长出晶体或原来晶体质量不好的样品,长出了晶体或改善了晶体质量,最终获得了适合于X射线分析的晶体。但是也不能机械地看待样品的纯度问题,有时纯化过程中除去了某些结晶所必需的因子,将长不出晶体,例如,胰岛素去掉了锌,在pH 6的条件下长不出晶体;而在某些蛋白的晶体生长母液中加入少量二氧六环、甲酰胺、MPD或其他有机溶剂,则能起到促进蛋白成核和晶体生长,或改善晶体质量的作用。

控制溶液的过饱和度也是非常重要的,尽可能慢地趋近过饱和点,可有效地减少晶核的数量,长出大的晶体。这是因为成核的速度明显地随饱和度而变化,当结晶溶液达到某一过饱和度时,成核就迅速增加。为了减少成核的数量,在加沉淀剂时,应该尽量缓慢,并且轻轻地搅拌,以免产生局部过饱和。特别在加有机溶剂如丙酮时,要更加小心。

另外,在溶液中某些外来微粒可能成为成核中心,而使晶核增多,因此在实验过程中要尽可能地避免尘粒和小气泡的产生,而且在进行晶体生长实验前,应首先将准备结晶的蛋白母液高速离心,除去可能存在的异质颗粒。在使用有机溶剂作沉淀剂时,要特别注意不要引起蛋白变性;蛋白溶液不要保存太久,以免变性或产生碎片等。

蛋白质在结晶母液中的浓度,对晶体生长亦是一个重要因素,大的晶体往往在低离子强度、高浓度、低过饱和度情况下产生。这是由于高浓度蛋白溶液提供了足够量的分子,满足了晶体生长的需要。蛋白质溶液的饱和,可在不同的条件下形成,如在靠近等电点或远离等电点处。一般在远离等电点、蛋白浓度较高的条件下,易获得大的晶体。

在过饱和状态下分子如何形成晶核和生长成晶体,是一个复杂的热力学过程,到目前为止,尚不十分清楚。根据以往对小分子晶体生长和近期对大分子晶体生长的研究,晶体的形成首先取决于一定大小晶核的出现。晶核太小,分子聚合到核上的自由能太高,核趋于溶解;而具有一定大小,一般认为200个分子左右的晶核的形成,溶液中溶质分子与晶核相互作用的结合能高于晶核与溶剂分子相互作用的能量,有利于分子的继续聚合。一旦关键大小晶核形成,在保持溶液过饱和的条件下,晶核就逐步长成晶体。假如晶体生长是不断地在晶体平面上形成新的分子层的过程,在新的一层形成前,必须首先要形成一个聚合点,但聚合点的形成需要克服较高的自由能,不易产生,所以一般认为晶面的增长是螺旋式地生长,当一个晶面尚未生长完,新的层面又开始形成,而在未生长完全的晶面内,由于相邻分子的作用,溶质分子就易于结合。这样通过螺旋式地生长,从不断的不完整到最后长出完美的晶体。

1.1.3 结晶技术

要使生物大分子结晶并生长出大的晶体,首先要使蛋白质溶液达到过饱和,同时控制达到

过饱和度的量和速度,过饱和度要低,而速度要尽可能地慢。为达到上述目的,下面介绍一些在实践中应用较成功的培养晶体的技术。

1. 微量蒸汽扩散法

小分子结晶一般用蒸发溶剂使溶液浓度增加的办法来结晶,但是这种方法不适合于蛋白质的结晶,因为蒸发的过程很难控制,而往往使蛋白质溶液内的盐首先结晶,或者使整个蛋白质水合体系失水而使蛋白质变性。为克服这一缺点,根据蒸发扩散的原理,设计了悬滴法和坐滴法。这些方法最关键的地方就是使某种蛋白质结晶所需盐的浓度与略低于这种盐浓度的蛋白质溶液在一个封闭体系内蒸发扩散,最后达到平衡而使蛋白质溶液内盐浓度增加,蛋白质溶解性降低,达到过饱和而结晶。

(1) 悬滴法

这种方法最适于微量的筛选结晶条件。每个蛋白质溶液的样品只需 3~5 μL 或者 10 μL,平衡液只需 1 mL。因此每次实验可根据需要设计,例如,可先配制一系列不同浓度的沉淀剂溶液作为平衡液,然后转移到各个封闭小室内,与含有低于平衡液 50% 的沉淀剂的蛋白质悬滴液扩散平衡(图 1.3)。最后根据实验结果筛选出一种沉淀剂浓度作为最佳结晶条件。具体实验可采用 16 孔的塑料组织培养盒进行,每个孔内加入一定量的平衡液。每一个蛋白质母液悬滴加在预先硅化好的盖玻片上,然后把盖玻片倒盖在小池上。为防止蒸发扩散时漏气,必须在盖玻片与池边缘间加少量凡士林密封。

(2) 坐滴法

原理与悬滴法相同,不同之处仅为液滴体积增大,如 50 μL 或更大(图 1.4)。这种方法较易生长出大的晶体,重复性较好,但是蛋白质用量较大,适合于已大体知道结晶条件,或者有足够量的样品可供使用。其缺点是晶体有时贴在容器底部而不易取出,导致晶体损坏。

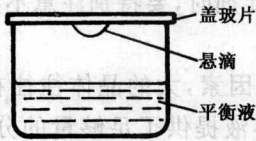


图 1.3 示意悬滴法装置

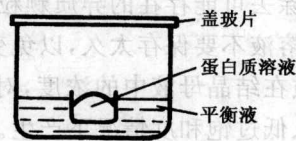


图 1.4 示意坐滴法装置

2. 平衡透析法

利用半透膜允许小分子透过而不允许大分子透过的性质,来调节蛋白质溶液的离子强度或 pH,使蛋白质溶液慢慢地接近过饱和。这种方法的优点是:通过有控制的扩散,改变结晶的条件,从而慢慢地到达晶核形成点。晶体的生长亦可不断地调整,已经产生的沉淀或者微晶可通过外部条件的改变重新溶解。这种方法可以在低离子强度条件下应用传统的盐析法结晶,它既适用于大批量的结晶,亦可应用于微量的结晶。

(1) 微量扩散小室法

较普遍使用的微量扩散小室是用有机玻璃加工而成的,小室直径 2~3 mm,高 4~5 mm。蛋白质母液加在小室内,上端封一半透膜,然后把小室放到相应的平衡透析液内。蛋白质母液内的条件通过半透膜与外部溶液平衡透析而改变(图 1.5)。

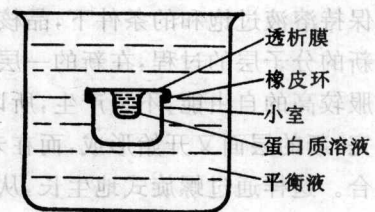


图 1.5 示意透析法装置

3. (2) 梯度透析法

为控制更慢的扩散速度以减少成核的数量,可用梯度透析装置,如图 1.6 所示。第一级透析装置可以用微量扩散小室,而第二级透析装置用体积较大的容器。透析液的体积和浓度根据实验设计要求逐级增大和提高,第一级溶液的浓度低于第二级溶液的浓度。

3. 一批结晶法

这种方法的要点是控制所加沉淀剂的量而使蛋白质溶液逐步地达到低过饱和度。当溶液远离饱和状态时所加沉淀剂量的多少对达到低过饱和状态影响不大,但到临界于过饱和状态时,这个量的控制就较困难。因为完全可能在略为过量时,就使溶液达到过饱和而大量形成晶核。为了克服这种困难以及筛选某一种合适的条件,可采取配制一系列蛋白质浓度递减和沉淀剂浓度递增的溶液,观察在哪一种条件下可产生较好的晶体,例如首先配小量的($300\ \mu\text{L}$)低离子强度的高浓度蛋白质母液,然后从上述母液中取出 $1/10$ 量($30\ \mu\text{L}$)放在一个试管内,再向上述母液中加入 $1/10$ 量($30\ \mu\text{L}$)的溶剂至 $300\ \mu\text{L}$,这样蛋白质浓度就降低了 $1/10$ 。重复上述步骤,最后配得了一系列浓度递减的蛋白质溶液。然后对每一个 $30\ \mu\text{L}$ 溶液按下述方法配制成含有递增的沉淀剂浓度的溶液:从 $30\ \mu\text{L}$ 溶液中取出 $3\ \mu\text{L}$,放在一个小管内,然后再向溶液加入 $3\ \mu\text{L}$ 沉淀剂至 $30\ \mu\text{L}$,然后再取出 $3\ \mu\text{L}$ 溶液,再加入 $3\ \mu\text{L}$ 沉淀剂。以此重复到所需的浓度条件为止。

经过一段时间的放置和观察,根据样品溶液产生沉淀或晶体的情况,就可得到有关样品溶解性与晶体形成之间关系的结果。

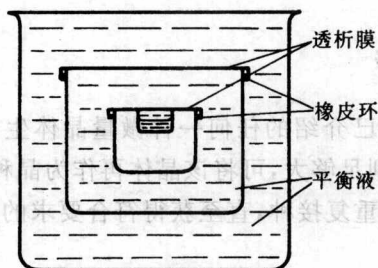


图 1.6 示意梯度透析法装置



图 1.7 示意温度梯度法装置

4. 利用溶解性的温度梯度结晶法

某些蛋白质在较高温度下,其溶解性高于室温下的溶解性,因此可以在较高温度下配制远离过饱和度的溶液,然后有控制地降低温度,使之慢慢地接近于过饱和度。例如在较高的温度下(40°C)配制低离子强度的蛋白质溶液,放置在保温瓶内,然后再放置在隔热的箱子内,让箱子慢慢地降低温度(图 1.7)。随着温度的降低,溶液达到过饱和度而结晶。

5. 晶种接种或重复接种法

当某种蛋白质在应用各种微量结晶法试验后,仅能得到小晶体而得不到足够大的适合于分析用的晶体时,就可试验用接种或重复接种方法来生长晶体。这种方法是把已得到的小晶体经选择、清洗后接入到新配制的结晶母液中,作晶体生长的晶核,然后采用上面介绍的任何一种晶体生长方法继续设法使晶种长大成适合于分析用的大晶体。

晶种的来源: ① 由微量法得到的小晶体($0.01\sim 0.1\ \text{mm}$),或者由其他方法得到的更小的