

X射线衍射分析用的 蛋白质和核酸晶体的生长 及初步研究

〔美〕小 A. 麦克弗森 著

中国科学院生物物理研究所

晶体生长组 译

科学出版社

7

1974年11月

内 容 简 介

X射线结构分析早已成为蛋白质和核酸的常规分析手段,而其关键性的前提是获得足够合用的生物分子大单晶。本书在纵观大量文献和总结丰富的实践经验的基础上扼要综述了培养适于X射线衍射分析用的蛋白质和核酸晶体的知识和方法,内容包括各种结晶方法和条件、晶体性质与鉴定以及X射线衍射图象的解析等,并以近1/3篇幅列表介绍了约二百项曾经成功地培养出了用于X射线衍射分析的酶、其它蛋白质、核酸和病毒等生物大分子晶体的条件和方法,是这个领域不可多得的佳作。

A. McPherson, Jr.

THE GROWTH AND PRELIMINARY INVESTIGATION OF PROTEIN AND NUCLEIC ACID CRYSTALS FOR X-RAY DIFFRACTION ANALYSIS

In D. Glick (ed.), *METHODS OF BIOCHEMICAL
ANALYSIS*, VOL. 23, 249—345 (1976)

John Wiley & Sons

X 射线衍射分析用的 蛋白质和核酸晶体的生长 及初步研究

[美] 小 A. 麦克弗森 著

中国科学院生物物理研究所

晶体生长组 译

责任编辑 王丽云

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1983 年 1 月 第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1983 年 1 月 第一次印刷 印张: 3 5/8

印数: 0001—2,600 字数: 79,000

统一书号: 13031·2097

本社书号: 2861·13—10

定价: 0.80 元

目 录

第一章 引言	1
第二章 结晶	3
一、达到溶解度最小	5
二、达到过饱和状态的方法	7
A. 整批结晶	7
B. 分批静置	9
C. 整批透析	10
D. 微量透析	10
E. 分级提取	13
F. 自由界面扩散	14
G. 在平板或载玻片上进行汽相扩散	15
H. 悬滴中进行的汽相扩散	18
I. 液桥	18
J. 浓缩透析	19
K. pH 诱导结晶	20
L. 温度诱导结晶	21
M. 蒸发	22
N. 加入效应子	23
O. 对蒸馏水透析	24
三、沉淀剂	25
四、条件	29
A. 温度	30
B. 压力	31
C. 时间	31

D. 浓度	32
E. pH	33
F. 还原剂	33
G. 底物和辅酶	34
H. 大分子的制备和纯度	35
I. 市售蛋白质和自制蛋白质的比较	37
J. 限制性的蛋白质水解	38
K. 振动和声	39
L. 金属离子	40
M. 添加剂、反离子和抑制剂	68
N. 种族差异	68
O. 已结晶出的蛋白质	70
五、辅助手段	71
第三章 大分子晶体的鉴定	76
第四章 晶体的性质	78
一、点阵	81
二、大分子晶体	81
第五章 晶体的安装和调向	88
第六章 照片的分析	93
参考文献	102

第一章 引 言

用X射线衍射分析方法能够得到生物大分子的基本结构信息，并可进一步获得有关作用机理和调节原理的有力的信息。而其它技术，几乎没有能与之比美的。一个结构的测定，除去结构本身的价值外，还为设计各种生化实验提供坚实的基础。因此，科学家们极其希望在运用衍射方法进行活跃的研究的过程中能有自己特定的努力研究的对象，纵然远离了他直接感兴趣的领域。但是目前看来，从事大分子X射线工作的结晶学家以及从事更令人感兴趣的传统的小分子X射线工作的结晶学家都没有足够的合适的分析对象。出现这种不大合理的局面，是因为培养生物大分子的大单晶十分困难，它成了X射线结晶学的主要问题。

在过去一段时间里，生物化学家还没有充分注意到这一问题，而结晶学家，除个别人外，在发展这种专门技术方面也未获得成功。所以，现在我们来考察一番目前正在使用的各种技术，以及长期积累起来的有助于培养出适于衍射分析用的蛋白质和核酸晶体的知识，是很适当的。

我们从不寻常的前提开始，即大分子的结晶并不是一门艺术，它不受宗教信仰的影响，也不靠什么神道和秘术。我们假设大分子结晶过程大部分确是属于科学的范畴，但同时它又属于运用半经验技术的系统研究。Crick 和 Kendrew 指出^[58]：“与其说解析一个结构，不如说更像是狩猎。它需要一定的技巧，需要关于猎取对象的习性的知识，还需要在某种程度上略施小技。”本章的大部分篇幅主要就是讨论这个“略施

小技”。

这里，我们就不准备叙述有关 X 衍射分析方法的理论和实际问题了。有关技术细节，除非为理解某些讨论要点所必需，也一概略去。现在见到的出版物有几篇综述^[58,63,76,82,146,180,191]、一些简要的说明和简明教程^[86,106,167]以及一些易读的教科书（大学毕业水平），这些材料相当详细地讲述了常规的结构测定过程中的各个阶段^[31,34,148,229]。读者如对该课题还不太熟悉，建议查阅这些文献。

为使初学者得以进行初步的结晶学研究，我们对所用方法的描述必须力求简洁，同时在细节上需参考其它各种书籍。另外，若有可能，初次的分析工作应该在有经验的衍射工作者的指导下进行。作者很想鼓励生物化学家和那些缺乏专门技能的人自己动手来尝试进行初步研究，我们还要强调指出一点，即完成这样的研究工作所必需的技术是不难获得的。而分析你自己培养的晶体，远比分析别人提供给你的晶体更为愉快。

第二章 结 晶

晶体的显著特点是有序,所以人们很可能问,为什么不称物质的一种体系,会有选择地使自己这样精确地排列起来而使熵明显地减小呢?分子从溶液中(或从汽态和熔融态中)结晶是一种平衡现象,其特定的动力学参数和热力学参数决定于溶剂和溶质的化学性质和物理性质.在某些情况下,如过饱和,体系被驱向一种溶质在液相和固相之间分配的平衡状态.

因而,迫使分子结晶的动力是和一切热力学体系一样的,即自由能减到最小.用数学和几何学的论证可以令人信服地证明,只有当分子按照对称的、周期性地重复的方式排列成固态时,自由能才能减到最小.

对于比较简单的体系,包括离子固体和通常的小分子量化合物,溶液中的自由能、固态中可能形成的键数目及其键能以及其它因素,相对来说已经知道得较为清楚.因此其晶体生长问题可以同任何物理过程一样进行处理,进行理论计算、控制和预测.对于大分子体系,以及那些虽然不大但更复杂的一般化合物的体系,其相互作用要复杂得多,了解得还不清楚,描述也比较困难.因此,我们必须主要地依赖于经验规律和经验,而不是精确的理论处理.本章的内容无疑地也只是反映这种初始的理解水平.

大分子体系遵从和一般分子相同的基本原理^[75],特别是通过自由能减至最小而趋向于建立相平衡状态的过程.这是在当吸引作用——电的、空间的、疏水的、亲水的作用达到最

大，而分散的或排斥的相互作用减至最小时发生的。关于其中所涉及的各种力的种类、它们的有效距离、相对强度及其来源等问题的讨论，请参看文献[75, 219, 241, 254]。

对于主要存在于液态环境的生物大分子，通常是当它们完全溶剂化时，才达到自由能最小。在很浓的溶液中，没有足够的水维持其溶剂化作用，或者说使大分子相互之间完全隔开，因此分子可能聚集成非晶态沉淀，也可能结晶出来。非晶态沉淀相当于局部能量最低，当聚集作用进行得太快时，常常发生这种现象。此时如果能量足够低，分子就停留在那个状态，但偶而，若能障不高，并有充分的时间，也有可能从非晶态沉淀中长出晶体来。一般来说，应使达到不完全溶剂化的过程非常缓慢，从而可使分子有足够的机会把自己排列到晶格中去。所以，如果可能的话，就应该避免形成非晶态沉淀。非晶态沉淀的出现通常表示饱和过程已经进行得太广泛了或者太快了。

导致大分子结晶所用的方法，是使体系非常缓慢地趋向于溶解度最小，从而达到有限的过饱和度，与此同时，体系内的各种组分，必须在一开始就配好，或者逐步调节，以保证大分子有机会与其相邻分子有最大量的有利的相互作用。另外，由于参与结晶作用的基本对象是绝对均一的，所以一个十分重要的因素是使大分子稳定成刚性个体的均一体，如果可能，还应该是致密的均一体。通过与沉淀剂的平衡，改变溶剂的性质，或改变某些其他的物理性质，例如，改变温度，可达到第一个目的。但达到第二个目的则要困难得多，通常是加入能够稳定大分子或与大分子相互作用的小分子，以引起分子之间的相互接触；或改变大分子自身的物理性质和化学性质。所以，可考虑把二种有效手段结合起来，即建立平衡的方法和平衡时的外界条件二者相结合，来解决促进晶体生长的问题。

一、达到溶解度最小

大分子因其形状、多价特性和一般物理性质在溶液中的行为是很复杂的,并且由于电解质的性质和浓度、大分子的浓度、pH、温度以及各种其它因素的影响,往往表现有多个溶解度最小值^[60,75,103]。最明显的例子是许多蛋白质和核酸都具有广泛的多晶型性质,如图 1, 2, 3 所示。现已发现,溶菌酶、血红蛋白,核糖核酸酶 (ribonuclease)、酵母苯丙氨酸转移核糖核酸 (yeast phenylalanine-*t*-RNA) 以及其他许多大分子,由于母液性质的微小变化,可生长出十几种不同晶型的晶体。大多数晶态蛋白质都能被培养出至少几种不同的晶胞,因此,在运用

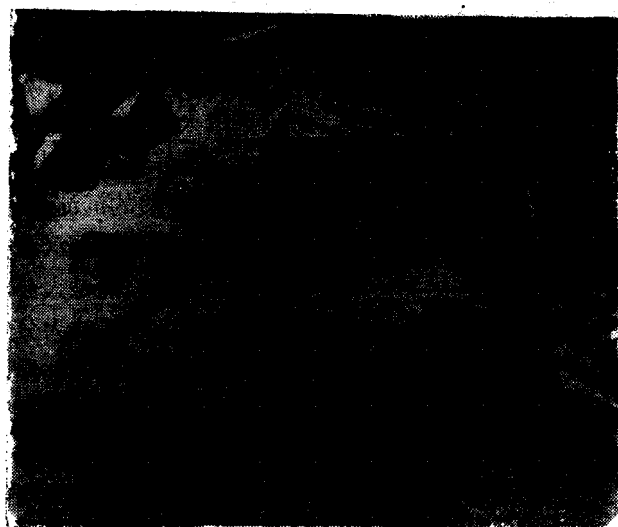


图 1 转移核糖核酸(*t*-RNA)的多晶型。在一个样品母液中,同时存在六面体晶体和立方晶体,最后,六面体小棒消失而转变为立方晶体。



图2 逐渐降低刀豆 (jack bean) 球蛋白的缓冲盐溶液的 pH, 从碱性降低到中性, 形成的三方晶体。

下面将要叙述的各种方法时, 必须采取大量的不同条件的组合, 以期找到产生晶体的最小溶解度. 最好在一系列不同的 pH, 就一个给定的沉淀剂, 测定蛋白质和核酸的沉淀点, 并在不同的温度下作同样的重复测定, 这样来考察不同沉淀剂的效应. 在实际配制结晶母液之前, 能尽可能摸清楚大分子的沉淀性质, 是十分有益的. 我们可以从制备和提纯大分子的经验中, 或通过一系列简单的初步实验去获得这种性质. 还可以研究诸如沉淀剂等各种因素对大分子沉淀性质的影响, 例如, 在凹形载玻片的小穴内放一小滴母液, 在低倍光学显微镜下观察向母液缓慢地加入微升量的沉淀剂所产生的结果, 这种方法可以节约贵重的样品, 并缩小可能的初始条件的范围. 下面我们将要介绍几种可用于筛选大量的结晶条件的微量技术.



图3 刀豆球蛋白也可从生理盐水逐渐从酸性升高pH至中性而长成正交晶体。

二、达到过饱和状态的方法

A. 整批结晶

在结晶一个已经提纯的蛋白质或核酸时，为了不费太多的时间和精力，可以直接向样品中加入固体盐或饱和盐溶液，直到溶液出现隐约可见的乳白色，然后放置几天或几周，其间可不时取出一小滴溶液在显微镜下检查有否晶体存在。在最早被结晶的动物蛋白中，卵白蛋白^[109]和马血清白蛋白^[159]就是用这种方法结晶的。Northrop 等人^[183]对这种类型的结晶作用，提出了一些一般性的规律，其中大部分对所有的方法都适用。他们认为，只有那些不损伤大分子和不使大分子变性的条件才能用于结晶。此外，蛋白质的浓度必须很高，在 10—

100毫克/毫升的范围。他们还指出，溶液必须过滤，彻底清除所有非晶态的物质或碎片，包括糖元，淀粉，DNA 以及其他大分子污染物。

上述原理的有意义的应用实例之一是牛肝过氧化氢酶的制备和结晶，Sumner 和 Somers^[234] 曾建议加入“唾液”来解决因存在糖元所引起的困难。他们还认识到溶液过饱和度太高是不利于结晶的。所以，如果出现强烈的 Schlieren 效应，一般来说就表明沉淀剂已经加得过量了。正如他们所指出的，一种对非晶态沉淀是饱和的溶液，对于晶体来说就是好几倍地过饱和了，我们自己也发现确是这种情况，因此，采用了同时用盐和有机溶剂进行结晶的方法。在室温下，慢慢地加入沉淀剂，直到刚能勉强看到微弱的乳白色。然后用一支 Pasteur 滴管；一边搅拌一边滴加入蒸馏水，到 Schlieren 效应刚刚消失为止，把这溶液放在冷室内静置几天。注意，这里溶液是从温室转到冷室，因为我们的目的就是要降低过饱和度*（这与下面将要介绍的 Jacoby 的逐级提取方法的目的是不同的）。如果溶液已明显呈乳白色，则放置以后，通常会产生非晶态沉淀，不过也不尽如此。卵白蛋白^[109, 223] 就是一个例外。Northrop 等^[183] 及 Sumner 和 Somers^[233, 234] 介绍了许多用整批结晶法获得晶态蛋白质的出色的例子，这些例子已成为整批结晶法的主要类型。后来 Bailey 在 1944 年^[13] 写的题为“蛋白质大单晶的生长”一文中对该方法作了改进，用于培养几种特殊蛋白质的晶体。Sumner 和 Somers 在 1943 年^[234] 和 Northrop 等在 1948 年^[183] 分别做了一个到那时为止已被结晶的 22 种酶和 39 种酶的表，这些酶几乎全部是用整批结晶法获得的。自那以后，其中的许多酶都经衍射技术检查证明是适于分析

* 指具有负温度系数的物质。——译者注

的。还有几种仍需继续研究。

B. 分批静置

当结晶条件已经缩小到适当的范围，但还不清楚此范围是否合理，则促使其结晶的传统的方法通常是在一系列小玻璃瓶或玻璃管内注入 0.5—1.0ml 待结晶的蛋白质溶液，蛋白质浓度通常为 5—30mg/ml，此溶液已预先加入盐(或其它沉淀剂)，使其略略低于该大分子发生沉淀所需的饱和度。玻璃瓶用有螺纹的盖子或橡皮塞盖紧静置，然后用微量滴管，如 Eppendorf 公司的制品，向样品加入不同量的饱和沉淀剂溶液，以产生一个浓度梯度系列的样品。这样可以研究沉淀剂的浓度范围。更精确的可以用微量注射器来加样，如 Hamilton 或 Unimetrics 的产品。

举一个例子，过去发现鲨鱼的乳酸脱氢酶 (M_4) 在蛋白质浓度为 10mg/ml，25°C，pH 7.6，43% 饱和度的硫酸铵的条件下，会慢慢形成非晶态沉淀。现在用一系列小瓶分别装上硫酸铵饱和度为 40—45% 不等的蛋白质溶液，放在室温下静置 10—40 天。到最后一天发现 40% 饱和度的那几瓶溶液仍是清的，41% 饱和度的瓶内长出了大单晶，42% 饱和度的瓶内则含有无数的微晶，43% 和更高饱和度的只有非晶态沉淀。这就很好地说明了出现非晶态沉淀、微晶和大单晶之间的差别，仅仅是由于盐的饱和百分比不同而造成的。不过有些蛋白质，如醛缩酶^[22]，肌红蛋白^[36]以及一些肌肉的蛋白^[37]，对于沉淀剂的浓度相对来说是不太敏感的。乳酸脱氢酶的情况比较典型，当你找到了一些可以获得某种晶型的条件时，必须十分仔细地以很小的增量来改善这些条件并使达到最佳。Zeppenauer 等^[24]指出，在许多情况下，此方法同样也可很好地用于溶液的 pH 调节。

分批静置法的主要缺点是所需样品量较大，并且溶液装好瓶后，再要改变条件就较困难。另外，如果结晶不成功，要在很大范围内筛选条件，此法也是不适合的，现在已用微量技术进行分批结晶。这里仅举一例，至少植物花青素^[66]已经可以用微升量的材料进行分批结晶，对此已有详细报道。看来此种微量分批法的用途将会越来越大，它已经为许许多多结构研究工作提供了晶体。例如，酵母磷酸甘油酸激酶^[250]，血红蛋白^[27,177]、组氨醇脱氢酶^[259]、噬菌体 T₂ 溶菌酶^[157]、 α -乳白蛋白^[7]以及 β -淀粉酶^[52]，其中，有些对方法作了清楚的介绍，有些则在方法上作了很有意义的改进。

C. 整批透析

大分子通过对一定浓度的某种盐溶液或有机溶剂透析，可以缓慢地达到它的沉淀点。此法虽然也需要相当大量的材料，但其优点是，当膜内外浓度差减小时，平衡的速度也随之减慢。并且通过改变透析袋外面的条件，可以真正做到连续研究沉淀剂浓度和 pH 的变化，如果盐浓度太高而不能长出晶体只能形成非晶态沉淀时，只要简单地调节外透液，样品便可以重新溶解，并建立新的条件。此法似乎特别适用于产生微晶，然后收集起来再用第二种方法重结晶。无论如何，它已非常成功地长出了 X 射线衍射分析用的大单晶。仅举几例如下：过氧化氢酶^[165]，免疫球蛋白及有关碎片^[11,74,110,187,193]，六角腺病毒^[53,190]，伴刀豆球蛋白 A^[91,115,232]，伴刀豆球蛋白 B^[166,232]，己糖激酶 B^[225]，亮氨酸-t-RNA 合成酶^[44]，原肌球蛋白^[105]以及天门冬氨酸转氨甲酰酶^[27]。

D. 微量透析

Zeppenauer 等^[262,264]介绍了微量透析法，此法首先被用于

醇脱氢酶的结晶^[265]，以后在许多实验室内也都获得了成功。样品溶液的条件一般与上节所述相似，只是仅用 10—50 μ l 蛋白质或核酸溶液即够。把样品溶液注入短玻璃毛细管或玻璃管。毛细管之一端通过一个聚氯乙烯管或外科手术用橡皮管的环固定一片半透膜(环的一端被修剪成支撑脚形状，以便支撑毛细管)。毛细管的另一端用填齿料或蜂蜡密封，或就简单地用一片 Parafilm (一种密封用薄膜)密封。然后把这全部装置浸在一个含有沉淀剂溶液的试管或其他容器内，这样平衡作用便通过膜缓慢地进行着，通常会发生结晶作用。图 4(a) 为该装置的示意图。

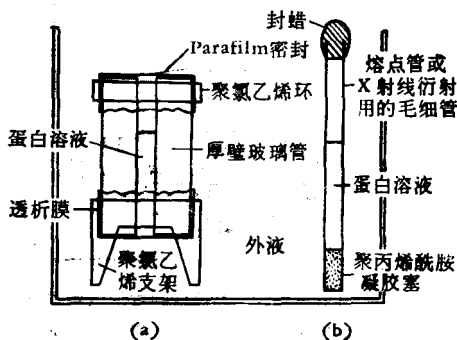


图 4 (a) Zeppenauer^[263] 设计的微量透析池，用于母液与外透液的逐渐平衡；(b) 用聚丙烯酰胺胶塞代替透析膜用于更少量样品的透析装置。

当样品体积极其少时，毛细管必须非常细，则用聚丙烯酰胺胶塞(聚合在管中适当位置)代替透析膜[见图 4(b)]。它还有这样的优点，即可通过调节聚丙烯酰胺的浓度，来控制大分子的扩散速度和排除极限。但是当所用外透液的盐或有机沉淀剂的含量很高时，也产生了一些困难。为使用高浓度的有机溶剂可采用聚四氟乙烯棒做的微量透析池^[263]。另外还必须注意避免在透析膜两侧或凝胶柱两侧形成气泡，透析池必须

彻底清洗等。这些在 Zeppenauer 的文章中都有介绍^[263, 264]。还有一种设计不同的塑料微量透析池亦已用于生长赖氨酸-*t*-RNA 连接酶*的大单晶^[140]，如图 5 所示。其主要优点看来是操作和鉴定都很方便。

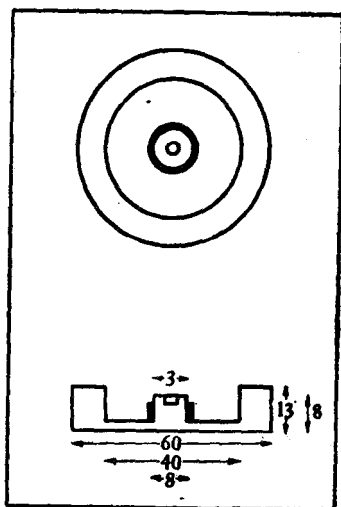


图 5 Lagerkvist 等设计的盆形微量透析池，用于赖氨酸-*t*-RNA 连接酶的晶体生长。透析池设计为扁平状，可使鉴定和贮存更方便。此池还自备贮液槽。

Weber 和 Goodkin^[251] 在用大量样品筛选可能的结晶条件时，改进了早期所用的微量透析池，以利于外透液条件的改变。他们并对扩散速度作为体系各种参数的函数进行了广泛的分析，为设计装置提供了一些数学基础，他们还报道了用此法可获得的四种不同蛋白质的结晶。

用微量透析法或其某种改进方法，已有许多成功的例子，

* 本文为合成酶 (synthetase)，但原文献为连接酶 (ligase)。——译者注

其中已生长出供 X 衍射分析用的大单晶的有：梭菌黄素氧化还原蛋白 (clostridial flavodoxin)^[151]，二氢硫辛酸转琥珀酰酶^[62]， α -溶血蛋白水解酶^[118]，醛缩酶^[240]，木瓜蛋白酶^[68]以及 D-木糖异构酶^[17]。Zeppenzauer^[263] 和 Zeppenzauer 等^[264]把用此方法结晶的另一些蛋白质列了一表。我自己也用微量透析法很顺利地培养了 t-RNA 的晶体。

E. 分级提取

Jacoby^[116,117] 指出，蛋白质在硫酸铵溶液中的溶解度随温度升高而降低。利用此现象他建立了一种新的结晶方法，即在逐渐减少沉淀剂的同时改变温度，来分级提取固体蛋白质。

这种方法是用固体盐或饱和盐溶液使蛋白质先完全沉淀，然后离心收集非晶态沉淀，去上清液，将小量 (Jacoby 建议用 1 ml) 沉淀剂溶液加到试管内，温度始终保持在 4°C 或 4°C 以下，用玻璃棒使蛋白质完全重新悬浮，离心、收集上清液，重复此全过程，只是每次所用沉淀剂浓度逐渐降低，直到沉淀完全溶解。每一步得到的上清液都必须保持在 4°C 或更低的温度，这一点很重要。然后把这一系列上清液分别倒入小试管，转移到室温下放置一天或更长时间。由于在这些条件下蛋白质溶解度的温度依赖性，就在那些适当盐浓度的溶液中生出了晶体。

这里，也可以用有机溶剂作沉淀剂，此法由于样品用量很少，仅 4—10 mg，故可小规模进行。Eppendorf 微量离心机因其离心速度高、聚乙烯离心管小 (1.5 或 3.0 ml)，用于此法特别方便。

虽然用此法尚未获得大单晶，Jacoby^[117] 曾报道在他的实验室里用此法获得微晶完全成功。由于分级提取法能告诉我们应该在什么范围内集中努力去结晶，看来还是一个特别好