

Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules

生物大分子小角散射 理论、计算与应用

[德] 德米特里·斯沃根 (Dmitri I. Svergun)

[比] 迈克尔·科赫 (Michel H. J. Koch)

[法] 彼得·蒂明斯 (Peter A. Timmins)

[法] 罗兰·梅 (Roland P. May)

著

李娜 刘广峰 吴洪金 李怡雯 张荣光 译

清华大学出版社

Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules

生物大分子小角散射 理论、计算与应用

[德] 德米特里·斯沃根 (Dmitri I. Svergun)

[比] 迈克尔·科赫 (Michel H. J. Koch)

[法] 彼得·蒂明斯 (Peter A. Timmins)

著

[法] 罗兰·梅 (Roland P. May)

李娜 刘广峰 吴洪金 李怡雯 张荣光 译



清华大学出版社

北京

内 容 简 介

生物大分子小角散射(包括 X 射线和中子小角散射)是一种迅速发展的生物学研究方法,该方法与传统生物学研究方法互补,可以获得较大尺度生物大分子的形貌信息。本书从小角散射的理论基础、仪器和实验、数据分析、生物应用等方面做了全面和翔实的介绍,从原理到应用贯通到底,也是生物大分子小角散射研究领域的经典著作。本书面向从事基础生物学、材料学、聚合物化学相关研究的读者,希望为该方法在我国的推广及广大科研工作者使用这一新型工具做出微薄贡献。

© D. I. Svergun, M. H. J. Koch, P. A. Timmins, and R. P. May, *Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules* was originally published in English in 2013. This translation is published by arrangement with Oxford University Press. Tsinghua University Press is solely responsible for this translation from the original work and Oxford University Press shall no liability for any errors, omissions or inaccuracies or ambiguities in such translation or for any losses caused by reliance thereon.

北京市版权局著作权合同登记号 图字:01-2017-4640

本书封面贴有清华大学出版社防伪标签,无标签者不得销售。
版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

生物大分子小角散射:理论、计算与应用/(德)德米特里·斯沃根等著;李娜等译. —北京:清华大学出版社,2019

书名原文:Small Angle X-Ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules

ISBN 978-7-302-51823-5

I. ①生… II. ①德… ②李… III. ①生物大分子—小角散射—研究 IV. ①Q71

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 283135 号

责任编辑:魏贺佳
封面设计:何凤霞
责任校对:赵丽敏
责任印制:李红英

出版发行:清华大学出版社

网 址: <http://www.tup.com.cn>, <http://www.wqbook.com>

地 址:北京清华大学学研大厦 A 座 邮 编:100084

社 总 机:010-62770175

邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质量反馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 装 者:三河市国英印务有限公司

经 销:全国新华书店

开 本:170mm×240mm

印 张:23.5

字 数:457千字

版 次:2019年6月第1版

印 次:2019年6月第1次印刷

定 价:98.00元

产品编号:070762-01

中文版序

Since the first publication of the book in 2013 there have been many new applications of SAS on biological macromolecules emphasizing the unique advantages of the method. Particularly important are the possibilities to study conformational heterogeneity and plasticity, especially in conjunction with other biophysical methods (e. g. Fuertes, 2017). The recent “resolution revolution” in cryo-electron microscopy (cryo-EM, Kühlbrandt, 2014) boosted the cryo-EM applications in biology but has also led to new approaches to combine the technique with SAXS (Kim et al. , 2017).

We expect that the studies of static overall (quaternary) structure and transitions with SAS will remain important thanks to the non-restrictive sample requirements, speed, simplicity of use and automation of modern instruments. The other priority directions are expected to utilize the unique capabilities of SAS in hybrid applications, like

- Combinatorial high throughput ligands/additives screening with synchrotron SAXS using robotic sample changers
- Analysis of equilibrium mixtures and membrane proteins using online size-exclusion chromatography and biophysical methods coupled with SAXS (Graewert et al. , 2015)
- Time-resolved studies of processes, from sub-ms ((un)folding) to hours (oligomerization, fibrillation)

Interesting developments have taken place in the field of coherent single particle X-ray scattering using free electron lasers (Donatelli et al. , 2017; Kurtal et al. , 2017) although it is still too early to say how much impact these techniques will have in future. Construction of the European Spallation Source (ESS) in Lund (Sweden) is presently underway and the instruments LOKI and SKADI are expected to provide access to advanced biological SANS applications after 2020.

Although SAS on biological macromolecules is a mature technique the few



examples above confirm that there is still quite a potential for development offering challenges to a new generation of researchers in the field.

We are very grateful to Dr. Na Li for translating the book thereby making it accessible to a much wider audience. This was only made possible through her rare combination of linguistic skills and deep understanding of scattering methods.

Dmitri I. Svergun,
06/14/2018

References

- Fuertes, G. et al. (2017) Decoupling of size and shape fluctuations in heteropolymeric sequences reconciles discrepancies in SAXS vs. FRET measurements. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 114; E6342.
- Graewert M. A. , et al. (2015) Automated pipeline for purification, biophysical and X-ray analysis of biomacromolecular solutions. *Sci. Rep.* , 5: 10734.
- Kühlbrandt, W. (2014) The resolution revolution. *Science*, 343; 443.
- Kim, J. S. Afsari, B. and Chrirkjian, G. S. (2017) Cross-validation of data compatibility between small angle X-ray scattering and cryo-electron microscopy. *J. Comput. Biol.* , 24: 13.
- Donatelli, J. J. , Sethiana, J. A. and Zwart, P. H. (2017) Reconstruction from limited single-particle diffraction data via simultaneous determination of state, orientation, intensity, and phase. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 114; 7222.
- Kurta, R. P. ,et al. (2017) Correlations in scattered X-ray laser pulses reveal nanoscale structural features of viruses. *Phys. Rev. Lett.* , 119: 158102.

前言

小角散射(SAS)技术正被越来越广泛地运用于基础科学和工程学的各个领域,与之对应的应用也越来越专门化。写作本书的目的仅限于满足小角散射技术在生物大分子溶液(主要包括蛋白质、核酸以及它们的复合物)中应用的迫切需求。近些年来,在生物大分子领域,不仅X射线小角散射(SAXS)和中子小角散射(SANS)的相关仪器设备研究取得了重大进步,相关数据处理算法,如从散射数据建模低分辨(1~2 nm)三维分子模型等的进展同样令人振奋。本书力求详细反映该发展过程,包括SAXS和SANS基础理论、仪器设备、数据收集、分子建模算法以及与其他方法的互补应用。主要面向的群体为生物化学家、生物物理学家和相关结构生物学方法(如大分子晶体学、核磁共振技术、电子显微镜技术)研究人员。本书适用于有经验的小角散射科研人员,以及刚进入溶液散射领域或没有溶液散射经验的初学者。

本书共分三个部分。第一部分包括前3章,主要论述大分子溶液X射线小角散射、中子小角散射的主要理论概念。第1章为帮助读者理解小角散射技术基础。第2章将概览小角散射实验仪器、X射线同步辐射光源、反应堆中子源和散裂中子源。第3章讲述小角X射线散射和小角中子散射实验的具体特点、样品条件、测试流程和二维数据积分过程。

第二部分包括第4、5章,论述用散射数据获得生物大分子结构模型的方法。第4章讲述均一单分散稀溶液体系的散射数据分析,我们不仅可以从中得到样品整体参数信息,而且可以建模得到低分辨三维分子模型。主要介绍目前流行的从头计算(*ab initio*)建模方法和混合建模方法。第5章主要介绍小角散射在分散体系(如寡聚混合物、柔性大分子)和相互作用系统中的应用。另外,还将讲述小角散射在分散体系中的应用,其目的不是为了得到结构模型,而是定量地表征混合物的组分含量或者是溶液中粒子间的相互作用。

第三部分包括第6、7、8、9章,主要讲述X射线小角散射、中子小角散射在生物大分子溶液研究中的应用。按不同实验类型和实验方法分章节进行讨论。第6章讨论对静态的单一大分子或复合物的研究,以及它们之间的混合物在平衡状态下的组分研究。生物学过程的时间分辨动力学研究将在第7章中进行讨论。第8



章将针对相互作用系统,主要讲述如何使用小角散射技术确定影响粒子间相互作用的因素。最后,第9章将讲述小角散射与其他结构生物学、生物物理学和计算方法的结合使用,讲述现代生物学中多种方法交叉使用的优势以及生物小角散射的发展趋势。

为照顾很多没有相关知识背景的读者,对文中概念的解释尽量简洁易懂。对于想要了解严格数学推导过程的读者可以参考附录中所给出的相关数学内容,如傅里叶变换、球谐函数以及相互作用势计算。同时,附录中还包含很多实用的网站链接。

小角散射在生命科学中某些领域的应用在本书中并没有被涉及,如纤维、准晶、脂质体、胶体和凝胶等,这些结构常存在于活体系统、食品和制药工业中。此外,对于某些相关仪器如准直器、探测器等也只限于简要介绍,因为对于绝大多数读者来说,可以直接购买这些设备的商业成品,或者一些大型设施可提供这些设备的使用,用户并不需要过多关心其原理。

在此,对我们的很多同行、前辈和同事表示感谢,因为从他们那里学到了我们所理解的小角散射,感谢 M. Agamalian, C. Baldock, P. Bernado, W. Bouwman, W. Bras, O. Byron, M. Capel, J. Carrascosa, P. Chacon, C. Dewhurst, D. Durand, S. Egelhaaf, O. Glatter, I. Grillo, P. Høghøj, T. Irving, S. King, J. Kuriyan, P. Lindner, L. Makowski, P. Meersman, P. Panine, J. S. Pedersen, J. Pérez, S. Perkins, A. Round, T. Narayanan, D. Niessing, V. Ramakrishnan, J. Tainer, N. Terrill, J. Trehella, P. Vachette, B. Vestergaard, M. Wilmanns 以及 G. Zaccai,他们审阅了本书的部分章节,并给我们提供了相关信息和插图。Dmitri Svergun 感谢汉堡的 EMBL 生物小角散射组和莫斯科晶体学研究所 X 射线小角散射组对发展方法学的宝贵投入。同时,感谢 D. Petoukhova 为编写本书所提供的技术上的帮助。

本书中必然存在错误和不妥之处,非常感谢读者能够批评指正。

目 录

绪论	1
参考文献	8

第一部分 理论和实验

第 1 章 小角散射基础	13
1.1 X 射线、中子弹性散射	13
1.2 生物大分子的散射	17
1.3 分辨率与衬度	19
1.4 X 射线吸收和反常散射	23
参考文献	24
第 2 章 X 射线和中子散射仪器	26
2.1 源的特点	26
2.2 X 射线源	28
2.3 中子源	36
2.4 SAXS 仪器	42
2.5 中子小角散射仪器	49
2.6 特殊仪器	54
参考文献	58
第 3 章 实验过程和数据处理	63
3.1 SAXS 和 SANS 的样品要求	63
3.2 实验方案和仪器校正	66
3.3 SAXS 的特点: 辐射损伤	69
3.4 SANS 的特点: 使用 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 混合物	71
3.5 随机和系统误差	76
3.6 基本结构信息和数据质量	78
3.7 校准到绝对标度和分子质量	81
参考文献	83



第二部分 数据分析方法

第4章 单分散体系	89
4.1 粒子的总体参数	89
4.2 SAS强度的多极表示	102
4.3 香农采样	104
4.4 <i>ab initio</i> 形貌分析	106
4.5 由原子模型计算散射曲线	118
4.6 混合方法	121
4.7 标记和三角测量	126
参考文献	136
第5章 多分散与相互作用体系	147
5.1 尺寸、形状及构象多分散性	147
5.2 尺寸分布函数	148
5.3 形状多分散性和低聚混合物	150
5.4 构象多分散性和柔性系统	153
5.5 相互作用系统和结构因子	157
参考文献	160

第三部分 溶液小角散射的生物应用

第6章 静态结构的研究	165
6.1 <i>ab initio</i> 结构拟合程序的应用	165
6.2 蛋白质及复合物的四级结构分析	178
6.3 平衡混合体系和多聚组分体系	190
6.4 膜蛋白与脂蛋白	197
6.5 柔性体系	204
参考文献	213
第7章 动态反应过程及扰动研究	224
7.1 动力学与动理学	225
7.2 扰动方法	227
7.3 温度扫描与温度跳变	235
7.4 高压实验	238
7.5 停流以及连续流混合	242



7.6 光触发方法	252
参考文献	254
第8章 粒子间的相互作用	268
8.1 物理化学相互作用基础	268
8.2 使用小角散射实验研究蛋白质之间的相互作用	273
8.3 蛋白质结构因子计算	274
8.4 核酸的相互作用	286
参考文献	287
第9章 跨学科研究中的 SAS	295
9.1 自动化和高通量 SAS	295
9.2 与高分辨方法联合使用	299
9.3 SAS 和低分辨晶体学	306
9.4 结合生物物理学方法	311
9.5 生物信息学和模型验证	316
参考文献	320
总结与展望	329
附录	331
附录1 波动现象的基本物理数学理论	331
附录2 球谐函数及其在小角散射中的应用	347
附录3 球形分子之间的相互作用	351
附录4 网络资源	357
参考文献	359
缩写词表	361
部分符号与变量表	363
程序列表	364

绪 论

小角散射(SAS)包括 X 射线小角散射(SAXS)和中子小角散射(SANS),是分析溶液状态生物大分子结构及其变化的强有力工具。自 20 世纪 30 年代开始,在物理学、材料科学、生命科学领域,从非晶体状态样本的小角散射图样中获取结构信息的相关方法学取得了长足进步(Guinier and Fournet, 1955; Glatter and Kratky, 1982; Feigin and Svergun, 1987)。从 20 世纪 70 年代开始,先进 X 射线源、中子源以及小角散射相关仪器科学、计算方法学都取得了重大发展,这也直接促进了小角散射在结构生物学中应用的发展。一方面,这些应用开始初现成果,另一方面,许多来自不同领域的学者又迫切地需要有一种能表征他们的蛋白质参数的方法。在这样的情形下,生物化学领域内对小角散射方法学及其系统应用研究的兴趣也被重新点燃。

像 X 射线晶体学、核磁共振(NMR)等结构生物学方法一样,小角散射需要毫克量级的高度纯化的样品,最理想的是单分散溶液。除了溶液样品并不需要结晶之外这三种方法对样品的要求是类似的,但是小角散射的一个独特的优势是数据收集和处理非常之快。在现代的中子源或同步辐射光源,小角散射数据的收集、处理和分析可以在数分钟甚至数十秒内完成,并且几乎可以立即得到样品结构的整体参数信息和低分辨率模型。小角散射允许在不同的溶剂或者添加剂条件下快速地扫描样品以确定分子间的相互作用,例如,确定或者优化结晶条件。

散射是由介质的非均匀性引起的入射光束或粒子束偏离初始方向的现象。如图 1 所示,散射实验在概念上非常简单,它只需要一个光源或粒子源、样品和探测器。同时,溶液散射也不需要像结晶、低温冷冻等特殊的样品准备过程。中子散射中可能用到同位素标记,但通常也不是必须的。散射实验的样品通常是生物大分子的水溶液,散射实验所感兴趣的是由溶质所引起的溶液中的密度非均匀性。无论是 X 射线散射还是中子散射,射线都会与样品溶液受辐照区域内的所有原子发生相互作用,使该区域内的所有原子成为散射源。所不同的是 X 射线会与电子发生相互作用,而中子会与原子核和自旋发生相互作用。很多实例表明,将散射物质处理为连续的散射物体密度分布(X 射线散射为电子密度、中子散射为原子核/自旋密度),比将其视为空间离散的原子分布更为方便。

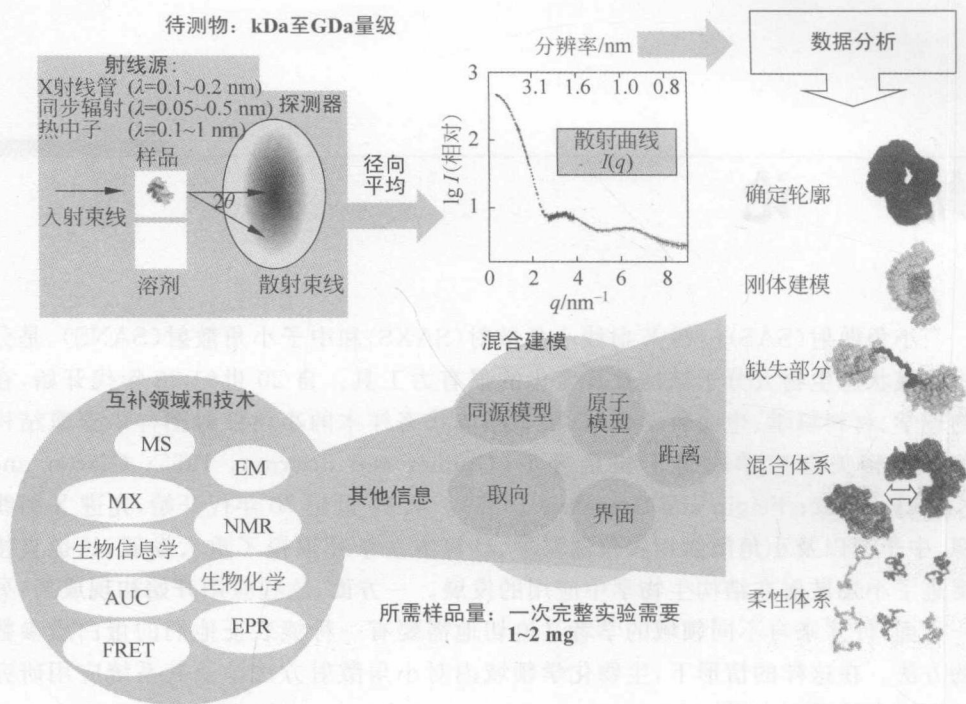


图1 小角散射实验通用概览图：解决生物大分子结构问题的技术以及这些技术的协同使用。从小角散射数据可以得到的理论上的分辨率为 $d=2\pi/q$ 。(MS：质谱；MX：大分子晶体学；AUC：分析型超速离心；FRET：荧光共振能量转移；EM：电子显微镜，简称电镜；NMR：核磁共振；EPR：电子顺磁共振。)授权修改自 Svergun(2010) © De Gruyter。

我们只需处理弹性散射,在这种情况下入射波长和散射波长(λ)是相等的。经背景扣除、仪器修正和归一化之后得到的散射图样 $I_{\text{total}}(q)$,实质上是各个散射波的干涉图样。生物大分子水溶液的散射图样是各向同性的,因此散射强度仅依赖于散射矢量 $q=(4\pi\sin\theta)/\lambda$,其中 2θ 是散射方向与入射粒子束方向之间的夹角。

生物大分子溶液的散射,总是伴随着溶剂的散射,因此最终的样品散射是从溶液散射中扣除溶剂散射和设备背景散射得到的。散射信号的强度与被辐照区域的样品分子数有关(即依赖于溶液中的溶质浓度),同时依赖于过量散射密度(也称为衬度、对比度),即溶质的散射密度与溶剂的散射密度之差。显然,浓度越高、散射衬度越大,散射信号就越强。在绝大多数情况下,为了避免样品发生聚集现象,溶液中溶质的浓度会被稀释到1%以下,又由于生物大分子在水溶液中的衬度通常很小,因此有用散射信号通常很弱(尤其是X射线散射)。出于以上原因,小角散射实验需要仔细的优化,以确保将背景降到最低。

低背景仪器对小角散射的重要性很早就被认识到,这个问题在20世纪30年



代得到解决：吉尼尔(André Guinier)在攻读博士学位期间被要求去搭建一个对单色光具有最小寄生散射的相机系统，他着眼于布拉格反射之间的散射。这个系统在今天被称作 Guinier 相机。他写道：

“在那个年代，通常使用的相机系统在小角区域有很大的寄生散射，致使小角区域内的数据无法使用。而我的相机系统并没有这个问题，这也是为什么我专门研究小角散射。我发现在样品是均一的情况下，在小角区域并没有散射信号，然而当样品包含细小颗粒(10~100 nm)的时候，小角区域内的散射信号变得很强。接下来，我得到了从散射曲线计算颗粒尺寸的方法。这是 X 射线小角散射的开端，几年之后，这被应用到中子小角散射领域。”(Guinier, 1999)

大设施(高通量的反应堆、散裂中子源和同步辐射 X 射线源)的建成对小角散射来说是一个巨大的进步，因为新型的光源大幅提高了信噪比。这使软物质科学与材料科学对小角散射越来越感兴趣，尤其是对非晶体生物学样品，小角散射变得越来越有吸引力。伴随着这些发展和新的计算模拟方法的出现，对生物大分子溶液的研究取得了尤为突出的成果。同时考虑到用户群体的巨大变化——快速增长的生物化学用户正在取代生物物理学家和物理化学家的位置，这时撰写一本生物学小角散射的专著是合时宜的。在本节，我们将给出小角散射技术的一些基本概念和在生命科学中的主要应用。考虑到不同小角用户的专业背景不一样，我们在附录 1 中详细地描述了散射过程，对一些用户来说，在阅读第 1 章之前，回顾一下关于波动的数学和物理学基础知识是很有帮助的。

在一定的假设下，扣除溶剂背景散射的净样品散射数据可以表示为两项的乘积 $I_{\text{total}}(q) = I(q) \times S(q)$ 。其中 $I(q)$ 称为形状因子，与溶液中单个溶质粒子的散射有关，它包含溶质粒子的结构信息。 $S(q)$ 称为结构因子，与溶质粒子散射波之间的干涉有关，包含粒子间相互作用的信息(如溶液的结构)。为了抑制样品分子间相互作用，使其接近理想的无相互作用体系，一般将单分散的生物大分子溶液浓度稀释至微摩尔每升到毫摩尔每升之间，同时为了能够分析 $I(q)$ ，一般假设 $S(q) = 1$ 。当然，小角散射也经常被用来研究溶液中分子间的相互作用，主要是基于对结构因子 $S(q)$ 的分析。

三个重要的研究方向在小角散射中尤为突出：(i) 单分散体系，即样品分子单一；(ii) 多分散体系，这种情况下样品有相同的化学组成，但是形状和尺寸不同；(iii) 混合物，这种体系下，样品分子的形状、尺寸和化学组成都不同。对于单分散溶液，净散射强度 $I(q)$ 正比于单粒子在各个方向的散射平均值。这个平均过程使小角散射无法像晶体学一样得到三维的散射密度。因此，小角散射只能得到粒子内部距离(r)分布函数 $p(r)$ 在各个方向的平均，很明显它是一个一维函数。

小角散射可以确定样品的摩尔质量 M 和整体几何参数，例如表示延展度的回转半径 R_g 、最大粒径(D_{max})、水合体积(V_p)。另外，先进算法的出现使我们不仅可



以得到这些简单的参数,还可以从散射数据得到可靠的三维结构。这在很多应用中被证实,这些三维结构被用来和晶体结构做比较(如 Schmidt et al., 1995 和 Riboldi-Tunnicliffe et al., 2001, 或者 Armbruster et al., 2004 和 Drory et al., 2004)。另外一种应用是可以通过从头计算(*ab initio*)方法或者通过优化高分辨结构和同源结构得到低分辨(1~2 nm)模型。上述第一种方法可以得到样品分子的外形轮廓,对分子有一个直观的认识。第二种方法是小角散射与其他互补方法的结合使用,是复合物建模强有力的工具,尤其是当研究体系涉及由 pH 变化或辅因子和离子结合而引起的构象变化时(详见 King et al., 2005)。除了建模之外,小角散射也常用于验证其他结构学方法得到的模型,定量分析低聚物的状态,估计混合物或多分散体系中不同组分的体积分数。

对于由 K 种相互作用粒子组成的多分散体系或混合体系来说,其总散射强度可以表示为 K 种组分的散射强度($i_k(q)$)的线性组合,其中 $\nu_k > 0$, 溶质体积分数

$$I(q) = \sum_{k=1}^K \nu_k i_k(q) \quad (1)$$

在这种情况下,总体参数反映的是各种组分总体参数的平均值。当然单从混合体系的散射数据是无法得到每一种组分的结构模型的。如果已知单独每一种组分的散射强度,那么从式(1)可以得到混合体系中每一种组分的体积分数。典型的应用是标定多种寡聚物混合溶液的平衡状态,当然也适用于分析更复杂的体系。值得注意的是,小角散射可以用于分析柔性体系包括有柔性连接区的多结构域蛋白和固有无序化蛋白(IDP)。

尽管中子和 X 射线小角散射的基本物理过程有本质区别,但是两者的数据处理方法和理论却非常相似。主要的区别是, X 射线的吸收和散射敏感地依赖于电子密度,尤其是电子数目较多的重原子。中子散射主要与原子核(有时也包括自旋)散射密度有关,并不简单地依赖于原子序数。对于那些对 X 射线有很强吸收的样品(如高盐浓度样品)就适合于中子散射,而且大分子样品通常不会发生辐射损伤。中子散射非常敏感地依赖于含有同位素的样品,尤其重要的是氘和氢的散射属性很不一样。两者都包含一个电子,如果忽略同位素电子云的不同,在 X 射线散射下的图样是一样的(Henderson, 1999)。通过 H/D 交换的方法进行衬度调节,如使用水和重水的混合物或者使用部分或全部氘化的样品,可以精确地得到大分子复合物的其他信息。目前为止没有针对实验室的小型中子源可使用。中子散射有两个缺点,一是与 X 射线散射相比它需要更多的样品,二是由所谓的非相干散射效应引起的背景散射很强。根据经验,如果通过溶液的氢氘交换(H/D 交换)可以得到更多关于样品的信息,则我们建议使用中子散射,例如核酸蛋白复合物和膜蛋白,或者是有多个亚基组成的复合物,并且不同的亚基可以通过氘标记加以区别。

正如图 1 所描述的,小角散射可以解决很多不同的结构生物学问题。它可以作为一种独立的方法得到样品的整体参数和低分辨模型,同时它还可以结合其他的结构学方法、流体力学方法、计算方法和生物化学方法发挥更大的用处。小角散射对很大尺寸范围内的大分子都适用,从小尺寸蛋白质甚至是多肽到大分子机器和亚细胞聚集体都可以用小角散射表征。更重要的是小角散射不仅适用于静态体系建模,而且对于分析由实验条件(pH 值、温度、压力、离子浓度、配体结合等)改变等引起的快速变化过程一样适用。此外,小角散射还可以用于研究不同时间尺度下的动力学过程,如折叠和去折叠,组装和解离等,但是这种实验往往需要消耗大量的样品。

小角散射建模经历了长时间的发展,多个研究组使用不同的技术对小角散射建模方法的发展做出了贡献(关于早期相关文献的论述请参见 Koch et al., 2003)。在建模中引入球谐函数是一个重大的突破(Stuhrmann, 1970),但是在一开始却并没有受到很多人的关注。使用中子衬度调节得到的 50S 核糖体的模型(Stuhrmann et al., 1977)遭受了大量的质疑,很多质疑甚至来自小角散射领域内部。

另外一个早期建模的例子是 Svergun 在轴对称近似下使用小角散射数据构建噬菌体 T7 的电子密度图(Svergun et al., 1982),结果不仅很好地显示了病毒的整体外形,而且得到了更多有意思的结构特征,如一个内部的核及一个圆柱形的突出部分(图 2(A))。这些结果在当时不能被进一步验证,所以也几乎不被注意到。直到 25 年之后,这些结果被电镜实验所证实(Agirrezabala et al., 2005),如图 2(B)所描述的。

在接下来的几年中,小角散射领域涌现出许多令人振奋的结果,如微管蛋白聚集体的四级结构(Bordas et al., 1983)、免疫系统的成分(Perkins, 1985)和染色质的高阶结构(参见综述,Koch, 1989)。这些结果充分说明了小角散射是一项非常有效的补充技术,有时甚至会挑战电镜的结果,同时小角散射也提供了时间分辨实验的可能性。

此外,若干刚体建模结果也向大分子晶体学家证实了小角散射在晶体学中的实用性,一个典型的例子就是基于已有的晶体结构对天冬氨酸氨甲酰基转移异构酶(ATCase)进行刚体建模。事实上,这些结果显示了分子结构在晶体状态下和溶液状态下的不同,对于像松弛状态下的 ATCase 这样大的聚集体,这种不同尤为明显(Svergun et al., 1997)。

与此同时,逐渐被普遍接受的观点是:晶体学只能提供一种固定状态下的分子结构,很多时候为了了解分子的功能,往往需要详细知道分子的构象变化过程(尽管有些时候这些变化太细微,小角散射也无法探测到)。结构生物学研究的重点已经转移向具有更高生物相关性的更大体系,结构研究也不是仅限于一种单一

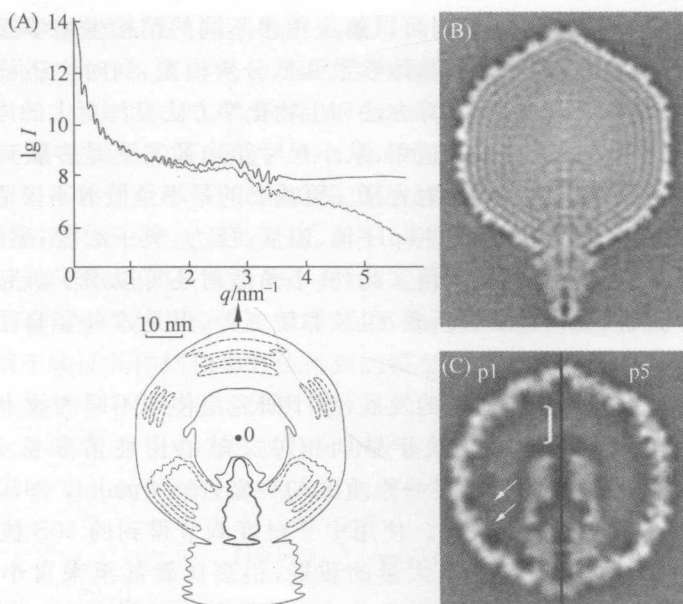


图2 噬菌体 T7 的结构模型。(A) 使用 *ab initio* 算法从 SAXS 数据得到的结构模型(Svergun et al., 1982)。实验得到的散射曲线如左上角实线所示,从模型计算得到的散射曲线为虚线所示。左下角为包含旋转对称轴的电子密度图横截面。授权自 Svergun et al. 1982 © International Union of Crystallography。(B)和(C) 分别为成熟噬菌体 T7 和去 DNA 的噬菌体前头部的投影密度图。授权修改自 Agirrezabala et al. (2005) © Macmillan Publishers Ltd., 2005。

的方法,而往往是基于多种不同的方法尝试去得到一个一致的混合模型。在本书中,小角散射更多的是与其他的结构学方法、生物物理方法和生物化学方法结合使用,更重要的是 SAXS 和 SANS 经常被一起互补地使用。

一个例子是分析由枯草芽孢杆菌组氨酸激酶 KinA 和 DNA 损伤检验点抑制剂 Sda 组成的复合物(Whitten et al., 2007)。复合物使用完全氘化的 Sda 准备,以便使用中子散射区别两种蛋白。基于这两种蛋白的高分辨结构使用刚体建模得到复合物模型,再用模型去拟合在不同重水浓度下测得的 SANS 数据和 SAXS 数据(图 3(A))。在这个试验中,揭示了这个复合物是通过以 KinA 的二聚物为基连接两个 Sda 分子形成的(图 3(B))。协同使用互补方法的混合方法已经成为研究大分子溶液的强有力的、可靠的工具。得益于各种数据分析方法的出现,使用小角散射研究生物大分子的论文发表数量在迅速增多,如图 4 所示。

在接下来的章节中,我们将陆续给出使用小角散射研究生物大分子溶液的例子,让读者对小角散射的适用范围有一个大致的了解。同时我们还给出了一个被不同研究组采用多种方法结合使用的例子。在进入第二、三部分讨论上述这些问

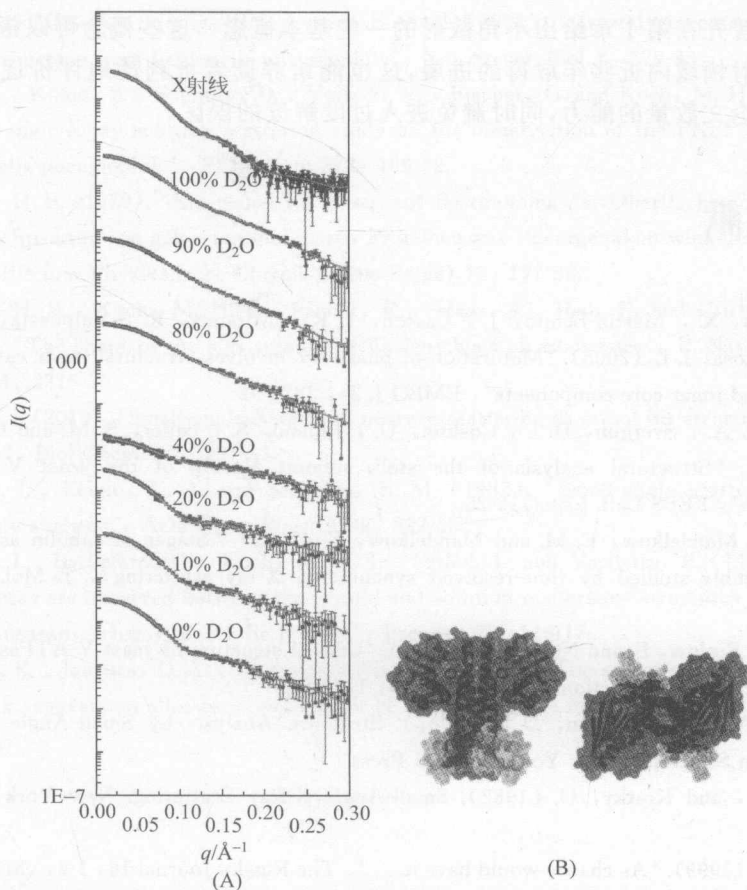


图3 KinA-Sda复合物的结构模型。(A) SAXS、SANS数据(带误差)和从高分辨结构建模得到的最好的拟合曲线。(B) 刚体建模得到的最优拟合二聚KinA(深灰色外壳和骨架)和两个Sda分子(浅灰色外壳和骨架)复合物结构。右边分子模型为左边沿水平轴逆时针旋转 90° 得到。授权自 Whitten et al. (2007) © Elsevier, 2007。

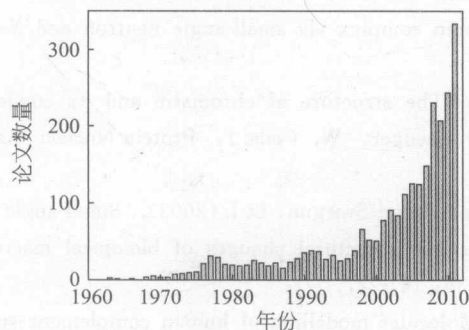


图4 PubMed数据库中搜索到的最近50年间发表的报道了生物大分子小角散射结果的论文数量变化趋势图。