

生物科学参考资料



3
0
2

内 容 简 介

本书为中子散射在生物科学中的应用专集,共收 13 篇文章。其中包括中子散射在开展分子生物学研究的现状和分析生物结构方面的优点,生物大分子亚细胞结构的中子散射研究;生物分子结构的中子晶体学;有关生物膜、视杆外段膜、大肠杆菌核糖体、核小体亚结构、染色质、触酶分子亚基和微管的中子散射研究;牛纤维原的小角散射研究,合成聚合物和生物聚合物的中子非弹性散射研究等内容。读者通过本专集可了解这个新兴领域的研究现状和最新进展,推动中子散射技术在我国生物科学研究中的应用。

本书可供细胞学、遗传学、分子生物学、生物物理、生物化学、物理学与化学方面的研究人员及有关大专院校教师、高年级学生和研究生参考。

生物科学参考资料

第二十集

责任编辑 刘 安

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

*

1986 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

1986 年 2 月第一次印刷 印张:9 5/8

印数:0001—2,000 字数:222,000

统一书号:13031·3087

本社书号:4077·13—10

定价:2.30 元

目 录

中子散射——展望分子生物学.....	I
中子散射在研究生物大分子和亚细胞器结构上的应用.....	5
中子衍射在分子生物学中的应用.....	29
用中子散射分析生物结构的优点.....	37
生物膜和膜组分的中子衍射研究.....	43
视杆外段膜的中子衍射研究.....	60
大肠杆菌核糖体的中子散射研究.....	67
核小体亚结构.....	86
染色质的中子散射研究.....	92
触酶分子、亚基和微管的中子散射研究	109
牛纤维原的中子小角散射研究.....	123
合成聚合物和生物聚合物的中子非弹性散射.....	134

中 子 散 射

——展望分子生物学

Jean. L. Marx

虽然生物化学家在测定生物结构方面已取得巨大的成就，但是在已积累起来的知识中仍存在着空隙，难以用常规的技术予以填补。然而，现今中子衍射的生物学应用工作的开展，正提供着前所未有的结构方面的资料。事实证明，该项技术对于探索核糖体（微小的细胞颗粒、蛋白质的合成场所）和染色质（高等生物细胞内的遗传物质和蛋白质的复合物）的三维结构有着特殊的价值。该项技术对于分析细胞膜结构也是大有前途的。中子散射的第三方面的研究是探索结晶物质包括蛋白质在内的原子排列。

美国在中子散射的生物学应用方面仍未组织太多的力量，部分原因是实验费用昂贵，需核反应堆产生中子束。目前，美国只有两个实验室配备了生物学研究用的中子束。这两个实验室是布鲁克海文（Brookhaven）国立实验室和国家标准局（NBS），布鲁克海文国立实验室是用十年前建造的高通量中子反应堆，国家标准局正在建立这方面的工作。Benno Schoenborn 首先在布鲁克海文国立实验室开创了生物学方面的研究，据他估计仅仅产生中子束，每年就得花费 250,000 美金。但是，Schoenborn 认为中子衍射是一项有效的技术，很值得花这笔钱；中子衍射能揭示 X 射线衍射或电子显微镜所不能揭示的结构与功能，而 X 射线衍射和电子显微镜是生物化学家赖以揭示大分子和分子聚合物结构的主要工具中的两项技术。然而，中子衍射、X 射线衍射和电子显微镜三项技术相互并不排斥，而是相辅相成的，可以揭示分子结构的各种不同侧面。

中子散射和 X 射线散射有许多共同之处。一束中子或 X 射线入射到一个物体上时，其中有些中子或 X 射线的入射行径弯曲，即发生衍射，形成由物体结构所决定的衍射图。然后再从图的数学分析推演出有关结构方面的资料。

中子和 X 射线之间的主要差别是，后者与电子相互作用，而前者与原子核相互作用。因此，X 射线不能察觉各自只有一个电子的氢原子，而中子却能检出。此外，氢和氘散射中子的能力大不一样；这两个同位素极易被区分开，因为氘的中子散射密度比氢的大得多。

生物化学家发现上述两种性能很有用。在蛋白质的中子结晶学研究中，研究人员第一次能明确地定出非氢原子的位置外，还能明确地定出氢原子的位置。氢原子在蛋白质结构中起着很重要的作用，因为它们能形成使蛋白质分子持有特征性的三维结构的键。而且，氢原子（通常为质子）参与许多酶的催化机制。Schoenborn 的早期研究中，他用中子结晶学方法识别肌红蛋白中的氢原子和氢键的位置。他认为该项技术对于确定参与催化机制的特殊的氢原子位置也应该是有效的，可是至今还没有付之于实践的打算。

就能结晶的分子也就是高度有序结构的分子而论,中子结晶学和X射线结晶学都可用于确定一个个原子的位置。对于比较复杂而又不能结晶的材料来说,例如细胞膜或核糖体,不可能进行高分辨率的分析,但是小角散射研究可以提供大量关于整体外形和不同组分排列方面的资料。小角研究只测量偏离入射行径5度内的衍射束。这种散射只与整个分子或颗粒有关,而对一个个单独的原子起不了什么作用。Schoenborn认为,就这种类型的研究而论,中子胜过X射线,因为生物分子的中子散射密度比类似的X射线的散射密度大得多。此外,对于能用氘来标记的材料来说,中子散射更显出其优越性。氘是生物分子的良好标记,因为氘不使生物分子的结构发生畸变,且被标记的分子仍保持其活性。

核糖体是理想的靶

耶鲁(Yale)大学的 Donald Engelman 和 Peter Moore 利用这种现象,采用 Schoenborn 在布鲁克海文施行的方法,研究核糖体结构。他们认为核糖体很适宜于用中子散射分析。核糖体用X射线衍射研究显得太大,用电子显微镜完全分辨其特性又显得太小。在信息从基因DNA传至蛋白质结构的过程中,核糖体起着中坚的作用,在核糖体表面上的氨基酸连结在一起,而形成蛋白质。

化学研究证明,核糖体由两个亚基组成。大肠杆菌中,大亚基含有34个蛋白质分子和2个RNA分子;小亚基含有21个蛋白质分子和1个RNA分子。Engelman, Moore 和 Schoenborn 致力于小亚基的研究。目前,他们正在建立全部21个蛋白质位置的三维图,现已确定了21个蛋白质中6个蛋白质的相对位置。

他们的方法是用中子散射测定一对对蛋白质的质心之间的距离。在测量成对蛋白质之间的相对距离的基础上,可用三角形剖分法确定蛋白质之间的相对位置。研究人员至少需测定74对蛋白质之间的距离,才能确定21个蛋白质的位置。

为了测定一对对蛋白质之间的距离,Engelman, Moore 和 Schoenborn 先在小亚基的蛋白质中换上两个氘化蛋白质。这是不难实现的,因为我们可把核糖体亚基拆成组分,然后再把组分重新装配成小亚基,仍不失其生物活性。如果标记的亚基悬浮在纯水之中,则中子束将检出含氘蛋白质和含氢蛋白质之间的反衬(contrast)。但是,同时也检出整个亚基与水之间反衬而引起的干扰信号。然而,所谓“反衬匹配”法可以消除干扰信号,最后使非氘化组分的散射消失。

反衬匹配之所以可能,原因是大多数非氘化的生物分子的中子散射密度,介于 H_2O 和 D_2O 的中子散射密度之间。 H_2O 和 D_2O 的混合比例适当时,可得与任何分子相同的散射密度的溶剂。就核糖体的小亚基而论,溶剂的散射密度等于亚基的非氘化部分的平均散射密度时,它们之间不存在反衬,只剩下氘化的蛋白质才可见到中子束。

两个标记蛋白质衍射入射的中子束。从最后形成的干涉图中可以推断颗粒之间的距离。中子衍射资料还可用于推断核糖体的蛋白质外形。Moore 指出,一般常规的方法不能得到类似的结构方面的资料。有些常规方法有助于确定各种不同蛋白质分子中的某些蛋白质的位置,但是有许多蛋白质很大,甚至贯穿整个核糖体亚基颗粒,它们的外形就不能用其它方面技术来推断了。

真核细胞的染色质是核酸和蛋白质的另外一种复合物,它的结构适宜于中子散射分

析。其中核酸是 DNA, 基因的载体; 蛋白质是组蛋白, 帮助调节基因的表达。研究人员希望了解 DNA 和组蛋白相对排列方面的更多的知识, 因为这些知识将有助于他们更好地认识基因开关的机制和 DNA 本身复制的方式。

E. Morton Bradburg 及其同事已经知道, 染色质由重复排列的称为核小体的念珠状单元组成。近年来, 他们在英国波茨莫思 (Portsmouth) 的多科性工艺学校, 用中子散射证明, 念珠状的核小体以组蛋白为核心, 外面围绕着 DNA, 易用合成 DNA 或 RNA 的酶加以识别。核小体呈扁平的圆柱形, 整个大小是 $11 \times 11 \times 5 \text{ nm}$ 。波茨莫思小组目前正在制备含氘标记的 DNA 或组蛋白所组成的核小体, 用耶鲁大学研究人员研究核糖体结构的类似方法, 确定核小体内组分的相对排列。

研究人员还利用氘标记的分子和反衬匹配法对细胞膜进行中子衍射分析。细胞膜是复合结构, 脂和蛋白质排列成层。非极性组分通常夹在两层极性 or 带电的组分之间。膜参与调节某些细胞功能, 例如细胞物质的渗透。神经和肌肉细胞需要适当功能性的膜, 如用以反应刺激。虽然膜的结构与功能的研究是现代生化和生理研究中的最活跃的领域之一, 但是由于难以确定各种组分的排列情况, 实验数据的解释往往受到牵制。中子散射的倡议者认为, 该项技术可以解决一些细胞膜结构的某些吃不准的问题。

宾夕法尼亚 (Pennsylvania) 大学的约翰逊基金会的 J. Kent Blasie, 布兰德斯 (Brandeis) 大学的 Donald Casper 以及 Schoenborn 等人已经证明, 用中子考察人工或天然的膜的结构是可行的方法。然而, 美国真有雄心研究细胞膜的是耶鲁大学的 Mark Yeager, 他研究完整的蛙视网膜上的杆状体。杆状体内含视色素——视紫素, 它是视网膜上的光检细胞。有关光照视紫素而诱发的化学变化方面的知识已知道得不少, 但是这化学变化怎样转换成神经脉冲, 却几乎一无所知。

每一杆状体内含有 1,500 个左右圆盘, 每一圆盘有两层膜, 视色素被认为是埋于两层膜之间。关于圆盘内视紫素的趋向问题存在着一些争论。但是, 现今 Yeager 宣称, 他的中子衍射研究表明, 视色素是位于圆盘的外表面, 从外表面延伸进圆盘之间的细胞质中。他认为, 通过明处样品和暗处样品的中子衍射图的比较, 应该可能观察到因照明而引起圆盘膜内所发生的结构变化。

低通量慢速度

有人要问, 什么是阻碍中子散射在生物学中应用的最大问题? 研究人员会异口同声地回答, 中子通量太低, 费用太贵。NBS 的 Alexander Wlodawer 说, 最强的中子通量比常用的 X 射线通量还低 6 个数量级。为了获得足以能够测量的衍射的中子量, 不得不采用大样品并进行长时间的中子照射。X 射线结晶学实验几天就能取得的资料, 中子结晶学得花好几个月。

然而, 中子和 X 射线不一样, 中子不损坏样品。一个蛋白质晶体重复用于中子结晶学研究而不损其特性。但是, 膜不如晶体那么稳定, 研究所需时间过长(小角散射实验需几小时), 这有碍于膜结构的研究。

布鲁克海文国立实验室和 NBS 的研究人员正着手努力改进数据收集的效率, 减少数据收集所需的时间。解决这一问题的方法是增加一次收集的衍射波的数目。在布鲁克

海文和 NBS 都已装置了直线性检测器,一次能同时测定同一平面内许多点的中子通量。此外,目前已有大面积检测器,可用于小角散射的研究。

另一个方法当然是努力增加中子通量。美国近年来用于所有生物实验方面的中子都是室温中子。这是相当慢的中子,大多数波长约 $1.5 \text{ \AA}$ 。这种波长的中子对结晶学工作是很好的,但是对大结构的分析就不太适宜了。冷却中子束将减慢中子的速度,从而增加长波长的数目,对于象核糖体和细胞膜那样的材料,用长波长进行小角散射研究是比较好的。使中子冷却的设备叫做致冷调节器,布鲁克海文和 NBS 正在装配这一设备,但是目前还不准备使用。

同时期,法国的 Grenoble 的 Max von Laue-Paul Langevin (劳厄-朗之万)研究所的核反应堆已配备了致冷调节器,并已在工作。实际上,大多数观察认为,这一反应堆是目前世界上用于生物学工作方面的最好的中子散射设施。一般说来,欧洲在这方面研究所配备的力量比较大,研究面也较广,包括核糖体、细胞膜、染色质和其它生物结构等多方面的研究。据国家科学院的报道,美国 1976 年参加生物系统中子散射研究人员的数目不超过 22 名,而欧洲至少拥有 80 名。

然而,中子散射分析所碰到的技术困难总比财政问题更易解决。生物学家利用核反应堆做实验的经费的开支与物理学家的处境不一样。尤其当许多研究设施不得不削减以适应紧缩的经济预算时,做这些课题所需的费用就更显得昂贵了。布鲁克海文的生物学中子散射课题的预算尽管从未削减,但是通货膨胀时期也不增加。Schoenborn 说,他对这种情况十分担忧,因为他代替不了离职人员的工作。

无论主管布鲁克海文的能源部或主管 NBS 的商业部,都不优先关心生物方面的研究,这就使形势变得更加复杂。Woldawer 指出,核反应堆是物理学家建造和经办的;他们不肯让出一二个反应堆给生物学家使用,这是不足为奇的。

目前,国家科学基金会 (NSF) 正计划建造小角中子散射的新设施,形势可能会有好转。新设施将包括生物研究的设备。NSF 的 Lewis Nosanow 说,他估计把新设施建于何处的决议,最迟明年年初就能宣布。

[王顺德译自 *Science*, **98** (4316): 481—483 (1977); 谈家桢 校]

中子散射在研究生物大分子和 亚细胞器结构上的应用

李 宗 圻

1953年 Watson 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构的模型。这个具有丰富想象力但又极为严谨的构思奠定了分子遗传学的基础。他们的发现清楚地说明,对生物而言,在分子水平上的结构和功能是密切相关的。他们的模型主要建筑在 X 射线衍射的实验结果上。当时, X 射线衍射已经是研究小分子结晶学的一门成熟的技术。Bernal、Perutz 等首先把这门技术推广用于蛋白质结晶学的研究。在过去 20 多年中通过 X 射线衍射方法澄清了几十种蛋白质的结构,也在分子水平上阐明了一些酶反应的物理和化学基础,从而揭示生命现象的一些本质问题。今天,分子生物学的中心问题在于澄清一些较大的生命组分的结构。它们是大的酶分子、病毒、核糖体、细胞膜、染色体等等。只有充分了解这些重要组分的结构,才能在一个更高的水平上了解生命现象。这些组分的分子量一般超过几百万道尔顿,大都无法结晶,因而无法用传统的 X 射线衍射方法分析其结构。也无法用电镜准确地反映其结构,因为电镜制备样品时的脱水过程大大地破坏了这些组分的本来面目。

用中子衍射和散射方法研究生物细胞组分的结构只有十多年的历史。在短短十多年中,国外的一些实验室研究成功了一些新的分析方法,并在许多种样品的分析中取得非常可喜的成绩,获得了其它方法无法获得的结构信息。今天,这个方法已经有了非常严密的理论基础。在实际应用中也显示了非常独特的作用,引起分子生物学家的普遍重视。以下先介绍一下这种方法的理论基础,然后再谈一下其具体应用。

中子散射理论^[1]

用于结构研究的中子波长在 0.5—10 Å 之间。中子源就是原子反应堆。中子与物质有两种不同性质的相互作用,即中子与原子核的作用和中子与原子磁矩的作用。目前在生物科学研究中磁的相互作用还未被应用,因而本文只讨论与原子核的作用。

一般用平面波来描述中子流,其波长比原子核要大得多。这时原子核被看作为一点。首先考虑中子被一个固定的原子所散射。入射波为

$$\psi(z) = \exp(ik_0 z) \quad (1.1)$$

其中 k_0 是中子的波向量,与波长 λ 的关系如下

$$k_0 = 2\pi/\lambda$$

散射波呈球状

$$\phi(\mathbf{r}) = -\frac{b}{r} \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}) \quad (1.2)$$

b 称为散射长度。是衡量原子对中子散射能力的物理量。对所有的原子核而言, b 的数量级都是 10^{-12} 。一般情况下 b 是一个实数, 这意味着没有吸收或可以被忽略。

散射截面 σ 的物理意义是散射中子流与入射中子通量的比率, 与 b 的关系如下

$$\sigma = 4\pi b^2$$

现在考虑一个真实的样品由几个原子所构成。这些原子并不是刚性地结合在一起。这时就出现下述的一些情况:

1. 样品内不同原子核散射的中子波会产生干涉现象;

2. 只有部分的散射波会产生干涉。这意味着上述的 σ 可以分解成相干和不相干截面。不相干截面来源于中子磁矩与核磁矩的相互作用。对 ^{12}C 和 ^{16}O 等无核磁矩的原子核而言, 就没有不相干散射。但对氢而言, 这部分相当大。不相干散射是各向同性的, 是一种本底。与相干散射截面有关的散射长度为 b_{coh} :

$$\sigma_{\text{coh}} = 4\pi b_{\text{coh}}^2 \quad (1.3)$$

表 1 给出了不同原子核的相干与不相干截面, 同时也给出吸收的截面。

表 1 生物学有关原子的中子散射性质^[1]

原子	核	b_{coh} (10^{-12}cm)	σ_{inc} (10^{-24}cm^2)	σ_{cap} (10^{-24}cm^2)	$f_{\text{X光}}(\theta = 0^\circ)$ (10^{-12}cm)
氢	H	-0.3742	80	0.18	0.28
氘	$^2\text{H(D)}$	0.6671	2	0	0.28
碳	^{12}C	0.6651	0	0	1.69
氮	^{14}N	0.940	~ 0	0.99	1.97
氧	^{16}O	0.5804	0	0	2.25
磷	^{31}P	0.517	0.3	0.11	4.23
硫	^{32}S	0.2847	~ 0	0.07	4.5

表中 b_{coh} 为相干散射长度, σ_{inc} 为不相干散射截面, σ_{cap} 为吸收截面 (对应于 $1\text{\AA}$ 而言)。

与 X 射线不同之处是吸收一般很小。这说明在中子束照射下生物样品的热稳定性一般很好。原子散射 X 射线能力随原子量而递增, 这点与中子散射也截然不同。中子散射没有这种简单关系;

3. 原子并不是刚性地结合的。由此产生两种后果: (1) 在质量中心系统中散射是刚

性的，但在实验室系统内可能会导致中子能量的变化。这个现象称为中子非弹性散射。通过研究可以获得样品内原子运动的信息。这种方法目前在生物学中的应用还刚刚开始；(2)实验室系统内的有效全散射截面与波长有关。对轻原子核而言，此效应产生的影响很大。对水而言在 20°C 时的截面为(以对数表示)

$$\ln \sigma = 4.45 + 0.46 \ln \lambda$$

σ 的单位是靶(10^{-24} cm^2)。由于生物大分子的分子量很大，其质子的有效截面与固定质子的截面基本上一致。

表 1 说明中子衍射具有下列的一些重要性质：

1. 由于原子核可视为一点，散射长度与散射角无关；
2. H 原子的 X 射线散射长度比 C、O 或 N 的相应长度都小得多，但这些原子的中子散射长度都差不多。这说明 H 的中子衍射图谱比 H 的 X 射线衍射图谱重要得多；
3. H 和 D 的散射长度具有非常大的差别。对氢而言，此长度是负的。这说明 H 和 D 所散射的中子波具有 180° 的相位差。而用 D 来取代氢将引起散射上很大的变化。这正是中子散射和衍射能应用于研究生物大分子结构的关键。

相干效应

样品内不同原子核弹性散射后的中子波产生干涉。Bacon^[2] 证实，不相干干涉最终导致各向同性的散射。相反，相干散射有一个空间分布，与样品内原子的空间分布有关。为简化概念，将微分相干截面定义为

$$\frac{d\sigma_{\text{coh}}}{d\Omega} = \frac{I_s(\mathbf{Q})}{I_0 N S} \quad (1.4)$$

其中 $N = \mathcal{N} \frac{d}{M} \epsilon$ ，是单位表面的原子数。 $\mathcal{N}$ 是阿佛伽德罗常数。 d 是样品密度， ϵ 是以厘米为单位的厚度， M 是分子量， s 是表面积。

$$\frac{d\sigma_{\text{coh}}}{d\Omega} = \sum_{i,j} b_i b_j \exp[i\mathbf{Q} \cdot (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)] \quad (1.5)$$

此求和号是对所有具有散射长度为 b_i 、 b_j 和位置 $\mathbf{r}_i$ 、 $\mathbf{r}_j$ 的原子而言的。 $\mathbf{Q}$ 称为散射向量，其定义在图 1。 $\mathbf{Q}$ 的绝对值是

$$|\mathbf{Q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$$

其中 2θ 是散射角

单晶

射线对单晶的结构分析而言，中子衍射只是 X 射线衍射的一种辅助方法。但由于中子衍射的特点，可以提供下列 X 射线衍射所无法得到的信息^[3]。

1. 质子的位置。这些包括溶剂的质子，维持蛋白质稳定性的质子(H键)和酶反应机制中所必

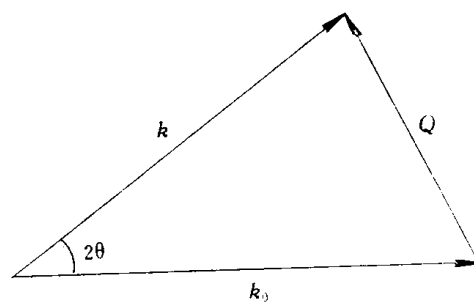


图 1 散射向量的定义，一般以 $\text{\AA}^{-1}$ 测量 $\mathbf{Q}$

其中 k_0 是入射中子的波向量， k 是散射中子的波向量。式(1.5)是应用中子测定结构的基础。

须的质子(溶菌酶、胰蛋白酶等);

2. 如果用 D_2O 取代 H_2O 作溶剂就可以很方便地观察到分子内的那些质子可以被取代。对蛋白质而言这是很重要的信息;

3. 区分大复合物结晶内的不同组分。如例, X 射线衍射无法区分番茄矮化病毒 (tomato bushy stunt virus) 结晶的蛋白质和核酸两种组分^[26]。但通过改变结晶内的 D_2O 量, 可以利用中子衍射方法得到核酸的一个低分辨率衍射图^[4]。其他方法无法得到同样的信息。因而这种方法可以推广用于研究其他可被结晶的亚细胞器, 例如核小体等。

无取向或部分取向样品

许多生物大分子及其复合物目前还无法结晶, 要获得其结构信息就必须研究溶液状态的样品。这时分子在溶液内无一定取向或仅有部分取向。在这两种情况下无法获得分子水平的结构信息。这时将分子看作一个连续介质并定义一个散射长度的局部密度如下:

$$\rho(r) = \frac{1}{v} \int_v b_i(r) d^3r \tag{1.6}$$

积分是对体积 v 而言的。而与 v 相应的线度比原子间的距离大得多, 但比数据的分辨率要小。所谓衍射实验的分辨率定义如下:

$$\text{分辨率} = 2\pi/Q_{\max}$$

$Q_{\max}$ 是用于收集数据时的 $|Q|$ 的极大值。对无取向系统而言, 典型的分辨率是 $20 \text{ \AA}$

表 2

(a) 水

Σb

$\bar{b}(10^{-12}\text{cm} \text{ \AA}^{-3})$

H_2O

-0.168

-0.00562

D_2O

1.915

+0.06404

其中 $\bar{b} = (-0.00562 + 0.0697X)$, X 是水中 D_2O 的百分比。在 8% D_2O 时, $\bar{b} = 0$ 。

(b) 氨基酸

氨基酸残基

化学组成

H (可交换)

$b_{tot}(H_2O)$
(10^{-12}cm)

$b_{tot}(D_2O)$
(10^{-12}cm)

b_{tot} (氘化)
(10^{-12}cm)

$V(\text{\AA}^3)$

甘氨酸

C_2NOH_3

1

1.728

2.769

4.85

66.4

白氨酸

C_6NOH_{11}

1

1.396

2.437

12.850

167.9

氨基酸残基

化学组成

H (可交换)

$b_{tot}(H_2O)$
(10^{-12}cm)

$b_{tot}(D_2O)$
(10^{-12}cm)

b_{tot} (氘化)
(10^{-12}cm)

$V(\text{\AA}^3)$

酪氨酸

$C_9NO_2H_9$

2

4.719

6.802

14.09

203.6

天冬氨酸

$C_4N_2O_2H_6$

3

3.456

6.580

9.704

135.2

精氨酸

$C_6N_4OH_{13}$

6

3.466

9.714

17.00

180.8

蛋白质的平均散射长度是其氨基酸组成、氘化程度和比容的函数。图 2 给出典型例子。(C)核苷酸和核酸

碱基

化学组成

H (可交换)

$b_{tot}(H_2O)$
(10^{-12}cm)

$b_{tot}(D_2O)$
(10^{-12}cm)

b (氘化)
(10^{-12}cm)

腺嘌呤

{RNA

$PN_5C_{10}O_5H_{11}$

3

11.23

14.35

22.68

{DNA

$PN_5C_{10}O_5H_{11}$

2

10.65

12.73

22.10

鸟嘌呤

{RNA

$PN_5C_{10}O_7H_{11}$

4

11.81

15.98

23.26

{DNA

$PN_5C_{10}O_6H_{11}$

3

11.23

14.35

22.68

胞嘧啶

{RNA

$PN_3C_9O_7H_{11}$

3

9.26

12.39

20.72

{DNA

$PN_3C_9O_6H_{11}$

2

8.68

10.79

20.14

尿嘧啶

RNA

$PN_2C_8O_6H_{10}$

2

9.28

11.36

19.69

胸腺嘧啶

DNA

$PN_2C_{10}O_7H_{12}$

1

8.61

9.65

21.11

或更大。对部分取向系统而言,最佳值是 $10 \text{ \AA}$ 。总之,上述密度就是散射长度在几个原子范围内的平均值。表 2 给出了多种生物分子的 Σb 和 $\bar{b}$ 的数值及其计算方法。 Σb 是该分子的散射长度,而 $\bar{b}$ 则是该分子的散射密度,其定义见(1.6)式。如果用重水取代水,通过取代作用,生物大分子的某些 H 被 D 取代,但是,与硫结合的质子是不能交换的,而与氮和氧结合的质子可以被交换。表中也列出了每一种分子的可交换质子数。此数值与 pH 有关,表中数值是对 pH 7 而言的。

从表 2 和比容可获得: RNA 的 $\bar{b} = 0.035 + 0.10X$ 。在水中含 68% D_2O 时, RNA 的 $\bar{b}$ 与这种溶剂的 $\bar{b}$ 一样。在散射时无反差。DNA 的 $\bar{b} = 0.034 + 0.007X$ 。在 68% D_2O 时无反差,见图 2。

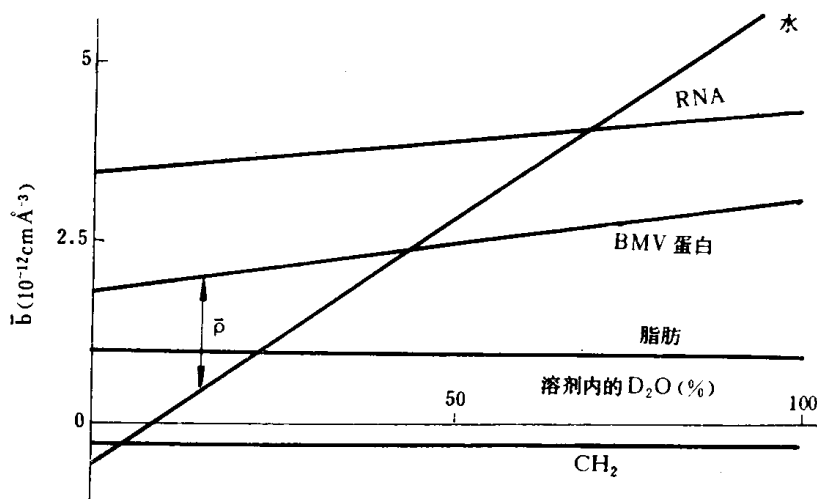


图 2 一些最常见生物分子的散射密度随 D_2O 百分比的变化。引自文献[1]

图 2 是一些最常见生物大分子的平均散射密度。随着 D_2O 百分比的增加,有的平均散射密度也增加。水与它们的截点称为“匹配点”(matching point)。密度之间的差异就形成反差,通常以 ρ 表示。在匹配点反差为零。水的变化范围包括了所有生物大分子的变化范围,因而可以选择不同百分比的 D_2O 以便与某一种大分子匹配,以此突出其它的大分子。

溶液内大分子的散射理论

中子散射在生物学研究中的特殊作用主要是建筑在 H 和 D 的散射长度的差别上。目前有两种方法可以利用这个差别。第一种方法称为反差变化法 (contrast variation method)。通过调整溶液内 H_2O/D_2O 的比例以得到不同的反差,从而得到不同组元的结构信息。第二种方法称为选择性氘化法 (selective deuteration method)。人们通过化学或生化方法氘化生物样品的特定部分,然后利用中子散射以了解这些部分的结构。

反差变化法^[5,6]

假定有一种稀溶液,其中含有某一种样品(大分子或大分子复合体如病毒、核蛋白体等等)的粒子。这些粒子在溶液内的取向并不相互干扰。其次,两个样品粒子之间的散射

波并不干扰,衍射图案是由同一个粒子内不同原子散射波的干涉而形成的。因而,我们所考虑的只是单个粒子的散射。其结果是对不同取向粒子的散射强度求和。在公式表达中,是对一个粒子的平均值而言的,入射中子通量作为每平方厘米一个中子(1 中子/厘米²)。这种情况下我们不用散射截面,改用散射强度。其量纲是长度平方的倒数。在真空中每一个粒子的散射强度是

$$I(Q) = \langle |A(Q)|^2 \rangle = \left\langle \left| \int_V \rho(\mathbf{r}) \exp(i\mathbf{Q} \cdot \mathbf{r}) d^3\mathbf{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.1)$$

此式是式(1.5)的另一种形式。式中采用了局部散射密度 $\rho(\mathbf{r})$ 。 $A(Q)$ 称为结构因子。上述积分是对整个体积 V 而言的。 $I(Q)$ 只是 Q 的函数;散射是对称地绕着入射中子束出现的。 $I(Q)$ 就是散射实验中所测定的结果。一般情况下粒子并不在真空内,是在水溶液内。此溶液含有一个平均散射密度 ρ_s 。这时散射强度应写成

$$I(Q) = \left\langle \left| \int_V (\rho(\mathbf{r}) - \rho_s) \exp(i\mathbf{Q} \cdot \mathbf{r}) d^3\mathbf{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.2)$$

V 是粒子占据的体积,溶剂无法进入。粒子和溶液之间的反差可以表达成

$$\bar{\rho} = \frac{1}{V} \int_V \rho(\mathbf{r}) d^3\mathbf{r} - \rho_s \quad (2.3)$$

如果粒子的化学组分是溶剂的函数(例如有机分子的某些原子在 $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ 混合物内可以交换),这时 $\rho(\mathbf{r})$ 也随着溶剂而变化。根据 Stuhrmann 和 Kirste^[7],可以将 $\rho(\mathbf{r})$ 分成

$$\rho(\mathbf{r}) = \bar{\rho}_V + \rho_F(\mathbf{r}) \quad (2.4)$$

其中 $\rho_F(\mathbf{r})$ 满足

$$\int_V \rho_F(\mathbf{r}) d^3\mathbf{r} = 0 \quad (2.5)$$

这种分法的物理意义是把散射密度分成平均值部分 $\bar{\rho}_V$ 和绕平均值的涨落部分 $\rho_F(\mathbf{r})$ 。图 3 说明这两部分的关系。反差是

$$\bar{\rho} = \bar{\rho}_V - \rho_s \quad (2.6)$$

首先假定由于 D 取代 H 并不引起 $\rho_F(\mathbf{r})$ 的变化。这时将式(2.2)重新写作

$$\begin{aligned} I(Q) &= \left\langle \left| \bar{\rho} \int_V \exp(i\mathbf{Q} \cdot \mathbf{r}) d^3\mathbf{r} + \int_V \rho_F(\mathbf{r}) \exp(i\mathbf{Q} \cdot \mathbf{r}) d^3\mathbf{r} \right|^2 \right\rangle \\ I(Q) &= \bar{\rho}^2 I_V(Q) + \bar{\rho} I_{VF}(Q) + I_F(Q) \end{aligned} \quad (2.7)$$

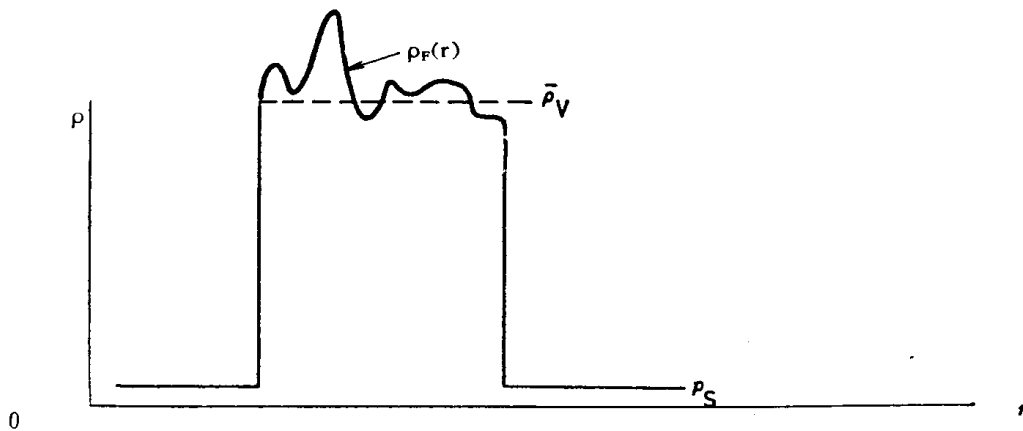


图 3 散射密度分成平均值 $\bar{\rho}_V$ 和涨落部分 $\rho_F(\mathbf{r})$ 。

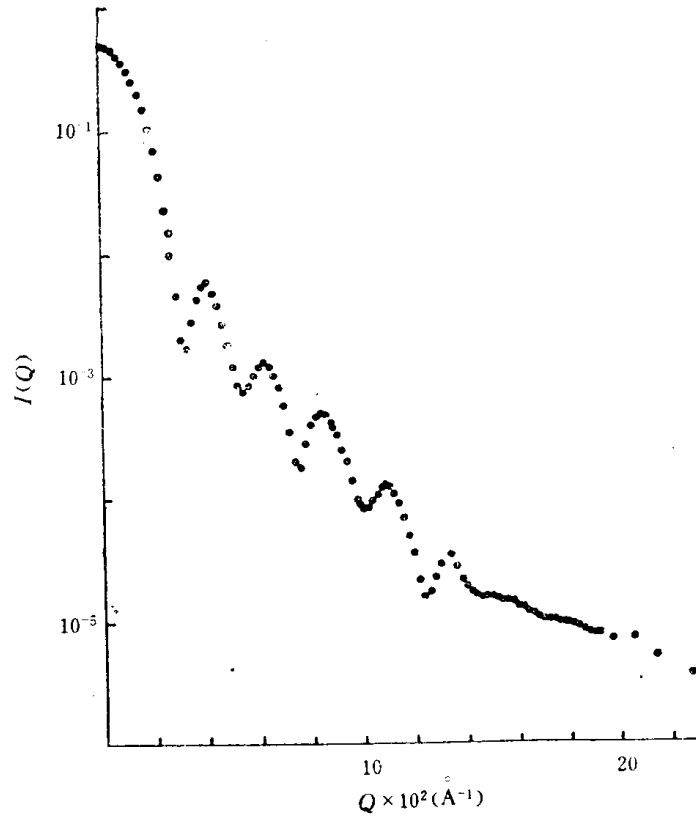


图4 南方菜豆花叶病毒 (Southern bean mottle virus) 的中子衍射图。此病毒是准球状粒子,故散射曲线表现出一系列的最大值^[11]。

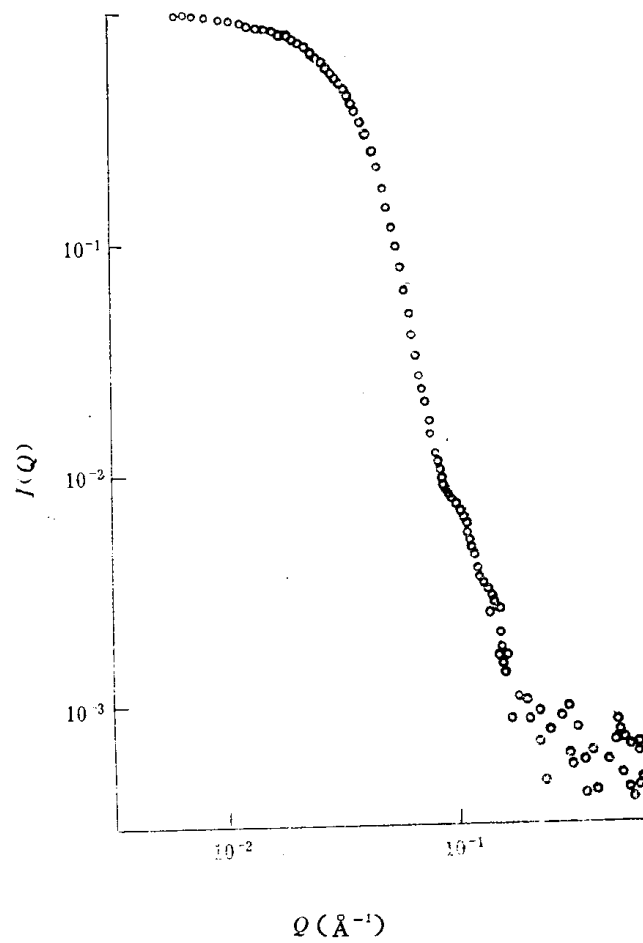


图5 50s核蛋白体亚基的散射强度图^[8]。

通过改变溶剂中重水的比例可以改变反差,实验上可以将强度分成三项: I_V 与粒子的形状有关; I_F 是散射密度平均值涨落的函数,此项与粒子的内部结构有关。还有中间的一项是相交项。式(2.7)是 $I(Q)$ 的一般形式。此形式说明 $I(Q)$ 是粒子的形状和内部结构的函数。现在需说明在某些情况下,可以将这两项分开。图 4 和图 5 是实验上得到的 $I(Q)$ 曲线。图 4 是一个具有球状对称的球形病毒的衍射曲线。图 5 是一个核蛋白体 50 s 亚基的衍射曲线。此粒子的形状非常复杂。现在我们将分析如何通过这些曲线以得到结构信息。首先是对小 Q 范围而言。

小 Q 值范围

对很小的 Q 值可将(2.2)写成下式:

$$I(Q) = \left\langle \left| \int_V (\rho(\mathbf{r}) - \rho_s) \left(1 + i\mathbf{Q} \cdot \mathbf{r} - \frac{1}{2} (\mathbf{Q} \cdot \mathbf{r})^2 + \dots \right) d^3\mathbf{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.8)$$

这里我们把该体积重心就看作向量 $\mathbf{r}$ 的原点。我们区分下列两种情况:

1. $\rho(\mathbf{r})$ 重心与该体积重心重合: 这时 $\mathbf{r}$ 项消失。我们得到一级近似是

$$I(Q) = (\bar{\rho}V)^2 \left(1 - \frac{1}{3} \frac{Q^2}{\bar{\rho}V} \int_V r^2 (\rho(\mathbf{r}) - \rho_s) d^3\mathbf{r} \right) \quad (2.9)$$

上述公式中出现了散射密度分布的二次矩。按 Guinier^[9] 此二次矩可以用迴旋半径 R_g 来表示:

$$R_g^2 = \frac{1}{\bar{\rho}V} \int_V r^2 (\rho(\mathbf{r}) - \rho_s) d^3\mathbf{r} \quad (2.10)$$

利用式(2.4)还可写成

$$R_g^2 = R_{gV}^2 + \frac{1}{\bar{\rho}V} \int_V \rho_F(\mathbf{r}) r^2 d^3\mathbf{r} \quad (2.11)$$

$$R_{gV}^2 = \frac{1}{V} \int_V r^2 d^3\mathbf{r} \quad (2.12)$$

R_{gV}^2 就是一个与散射粒子具有同样形状粒子的机械迴旋半径,但其散射密度是均匀的。现将式(2.9)重新写成

$$I(Q) = I(0) \exp \left(- \frac{R_g^2 Q^2}{3} \right) \quad (2.13)$$

式(2.13)称为 Guinier 定律。以 $\ln I(Q)$ 和 Q^2 作图,可得到一条直线。其截距为 $\ln I(0)$,斜率为 $-(1/3) R_g^2$,而

$$I(0) = (\bar{\rho}V)^2 \quad (2.14)$$

根据反差的定义 $\bar{\rho} = \bar{\rho}_r - \bar{\rho}_s$ 和 $\bar{\rho}_V = \sum b/V$,式(2.14)可以写成

$$\sqrt{I(0)} = \sum b - \rho_s V \quad (2.15)$$

ρ_s 是 X 的线性函数,因而 $\sqrt{I(0)}$ 随 X 变化呈直线变化。在匹配点 $\sqrt{I(0)} = 0$, 这时 $\sum b = \rho_s V$ 。假定 $\sum b$ 已知,从直线可以决定 V 。假定所测定结果是绝对值,同时 H 和 D 的交换又可忽略,则两者可同时测定;

其次,考虑 R_g^2 随反差的变化。根据式(2.11),反差变化可以分成两项,其中来自粒子

的形状,与 $R_g^2 V$ 有关。另一方面来自粒子内部密度的涨落。当然, H-D 交换的存在使问题复杂化。

以 R_g^2 为纵坐标, $1/\bar{\rho}$ 为横坐标画出一条直线。其斜率为 $\alpha = \frac{1}{V} \int_V \rho_F(\mathbf{r}) r^2 d^3\mathbf{r}$, 截距为 R_{gv}^2 。根据式(2.5), $\int_V \rho_F(\mathbf{r}) d^3\mathbf{r} = 0$, 故 $\rho_F(\mathbf{r})$ 一定有正值与负值。因而正的 α 表示在较大的 r 时具有较高的密度。相反则 α 为负。例如对两种组分(核酸-蛋白质)组成的粒子而言, 负 α 说明是蛋白质在外边, 正 α 表示核酸在外边, 这是因为核酸的散射能力高于蛋白质。

将上面的讨论综述如下: 从粒子的小角散射可以得到三条直线, 它们都是反差的函数。

(1) $\ln I(Q)$ 与 Q^2 的直线。根据此直线可以得到 R_g^2 和 $I(0)$ 。 R_g^2 的定义为 $R_g^2 = \frac{\sum m_i r_i^2}{\sum m_i}$ 。 r_i 是 m_i 部分的质量与质量中心的距离。从定义不难看出 R_g 与粒子的形状以及其中的质量分布有关。 $I(0)$ 是散射角为零的散射强度。根据这个量的大小可以计算出该种粒子的质量;

(2) $\sqrt{I(0)}$ 与 X 的直线。根据此直线可以 Σb 或 V 。 Σb 是该种粒子的总散射长度, V 是比容;

(3) R_g^2 与 $1/\bar{\rho}$ 的直线。由此直线可以得到该种粒子的内部密度涨落。对几种组分构成的粒子而言, R_g^2 随 $1/\bar{\rho}$ 的变化情况提供了这些组分的相对结构。图 6 是糖蛋白皮质激素传递蛋白的中子散射实验结果^[10]。 R_g^2 随 $1/\bar{\rho}$ 有明显变化。在粒子内部如果散射密度是均匀分布的话, R_g^2 不随 $1/\bar{\rho}$ 变化。这个结果说明散射密度不是均匀的。 α 正值意味着外部的散射密度低于内部。根据这个结果可以计算出此糖蛋白是一个近似球状的椭圆球体。其中蛋白构成约 $24.5 \text{ \AA}$ 为半径的核心。糖均匀分布在此核心外部, 形成半径为 $18 \text{ \AA}$ 的天线状结构。

2. $\rho(\mathbf{r})$ 重心与该体积重心不重合。
除了回旋半径之外, 上述的全部推导均适用。但这时 (2.8) 式中 r 的一次项不为零。新形式如下:

$$R_g^2 = R_{gv}^2 + \frac{1}{\bar{\rho}V} \int_V \rho_F(\mathbf{r}) r^2 d^3\mathbf{r} - \frac{1}{(\bar{\rho}V)^2} \left(\int_V \mathbf{r} \rho_F(\mathbf{r}) d^3\mathbf{r} \right)^2。$$

为简化可以将二次和一次矩的系数写成 α 和 β 。这时 $R_g^2 = R_{gv}^2 + \frac{\alpha}{\bar{\rho}} - \frac{\beta}{\bar{\rho}^2}$ 。

$$\frac{\beta}{\bar{\rho}^2}。$$

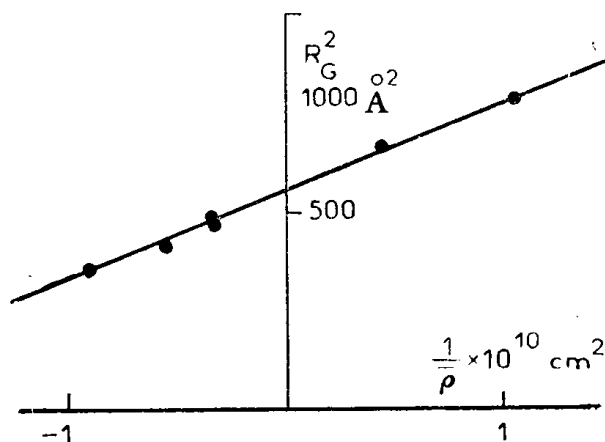


图 6 R_g^2 随 $1/\bar{\rho}$ 的变化情况。反差定义为溶质与溶剂散射密度的差。直线说明糖的重心与蛋白重心重合^[10]。

上式的第二项给出了质量中心与散射中心的偏差。在实验上要测定此项的数值是有些困难的, 对单一组分分子而言(例如蛋白质分子)只有在 $\bar{\rho}$ 数值很小时才能准确地测定

出来。假定某一系统由两种分子或两种组分组成,它们的散射密度不相同,通过测定这一项的大小可以得出这两部分质量中心的距离。图7是共脂肪酶-胶束的 R_g^2 随反差的变化情况^[11]。这是一条抛物线,是 β 不为零的一个例子。经过计算知其质量中心与散射中心之间的距离是 29—45 Å。

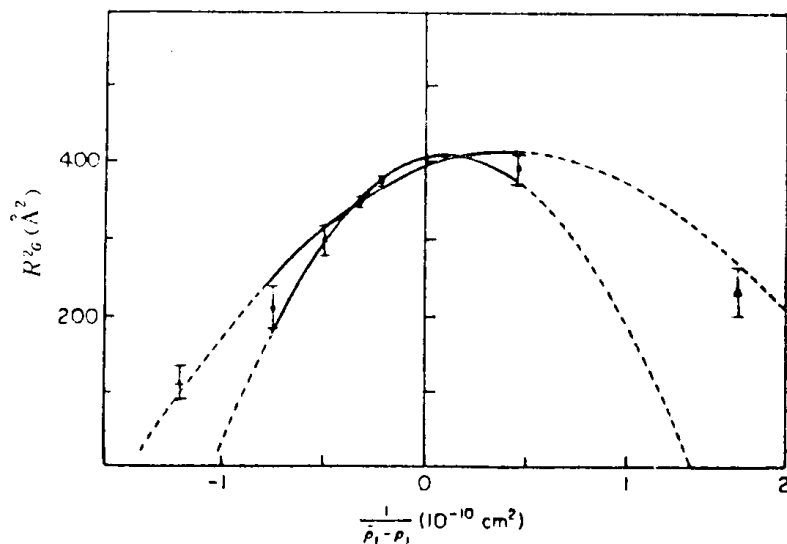


图7 共脂肪酶-胶囊 (colipase-micelle) 的 R_g^2 随反差变化的情况^[11]。

根据 $R_g^2 = R_{gv}^2 + \frac{\alpha}{\bar{\rho}} - \frac{\beta}{\rho^2}$, 不同的 α 与 β 可以有四种不同的组合, 图8^[4]给出了在两种组元的情况下可能出现的四种结构。上面介绍的皮质素传递蛋白是属于左上角的结构 ($\alpha > 0, \beta = 0$), 而共脂肪酶-胶囊则属于左下角的结构 ($\alpha > 0, \beta \neq 0$)。以后我们还

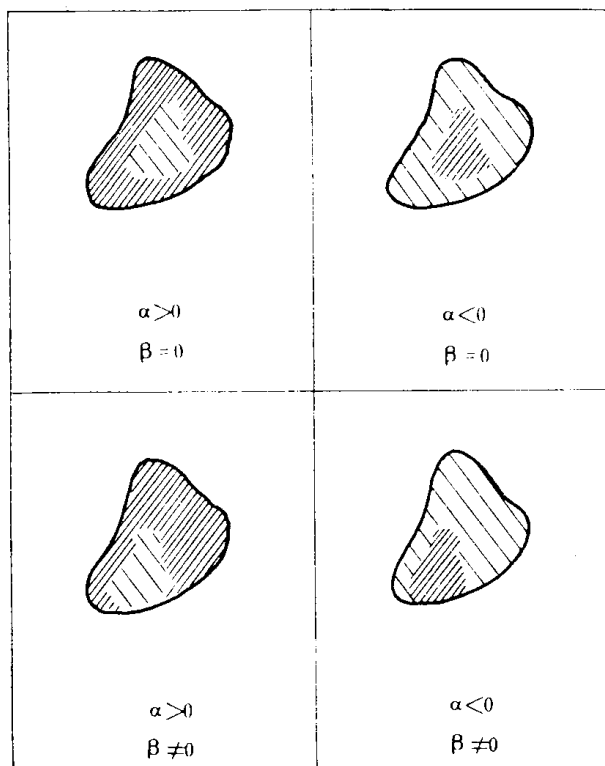


图8 由于 α 和 β 取不同值而出现的四种可能的结构。