

生物大分子晶体学基础

卢光莹 华子千 编著

北京大学出版社

生物大分子晶体学基础

卢光莹 华子千 编著

KG19/11



北京大学出版社
北京

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. —1994. 北京:北京大学出版社,1995. 1

ISBN 7-301-02729-X

I. 生… I. ①卢… ②华… II. 生物晶体学:分子晶体 N. 07

书 名: 生物大分子晶体学基础

著作责任者: 卢光莹 华子千

责任编辑: 李宝屏

标准书号: ISBN 7-301-02729-X/Q·064

出版者: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区中关村北京大学校内 100871

电 话: 出版部 2752015 发行部 2559712 编辑部 2752032

排 印 者: 北京大学印刷厂

发 行 者: 北京大学出版社

经 销 者: 新华书店

850×1168 毫米 16 开本 13.625 印张 360 千字

1995 年 12 月第一版 1995 年 12 月第一次印刷

定 价: 15.00 元

54.9057

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培养、生物大分子晶体结构的共同特征、生物大分子纤维图的一般特征以及利用 X 射线衍射测定晶体结构的基本概念和方法等。第二篇分别介绍了蛋白质、核酸、病毒、核小体以及多糖等重要生物大分子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。

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,都成为生物学上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。40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,并广泛涉及到生物学的各个学科。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。

生物大分子晶体学除了X射线晶体学以外,近10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地发展,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

目 录

第一篇 生物大分子 X 射线晶体结构测定的基本原理	(1)
第一章 生物大分子的晶体培养	(2)
1.1 影响蛋白质溶解性的因素	(3)
1.2 影响晶核形成和晶体生长的因素	(4)
1.3 结晶技术	(5)
第二章 晶体结构的共同特征	(9)
2.1 晶体的空间格子、晶胞和晶面指标	(9)
2.2 晶体的对称性、点群、晶系、空间群	(14)
第三章 晶体的 X 射线衍射花样	(25)
3.1 衍射线的分布	(25)
3.2 衍射线的强度	(35)
第四章 记录衍射花样的方法	(42)
4.1 X 射线的产生和一般性质	(42)
4.2 蛋白质晶体的挑选和安装	(43)
4.3 回摆照相法	(44)
4.4 旋进照相法	(45)
4.5 魏森堡照相法	(51)
4.6 四圆衍射仪的基本原理	(54)
4.7 生物纤维状物质的 X 射线衍射	(56)
第五章 晶胞中原子位置的测定	(62)
5.1 晶体的电子密度分布函数	(62)
5.2 电子密度图	(63)
5.3 电子密度图的解释与原子在晶胞中的位置	(65)
第六章 解决相角问题的方法	(69)
6.1 帕特逊(Patterson)函数法	(69)
6.2 同晶置换法	(71)
6.3 反常散射法	(75)
6.4 分子置换法	(77)
第二篇 生物大分子的立体结构	(85)
第七章 蛋白质的立体结构	(86)
7.1 氨基酸和多肽链的立体结构和构象角的定义	(86)
7.2 各种氨基酸对蛋白质三维结构的影响	(91)
7.3 纤维状蛋白质的立体结构	(93)
7.4 球状蛋白质的晶体结构	(97)
7.5 膜蛋白的晶体生长和晶体结构	(136)
第八章 核酸的立体结构	(146)

8.1 核酸的结构和构象	(146)
8.2 脱氧核糖核酸(DNA)的立体结构	(147)
8.3 核糖核酸(RNA)的晶体结构	(160)
第九章 病毒的立体结构	(166)
9.1 病毒的形态学和整体结构	(166)
9.2 病毒的结晶和样品制备的一般原理	(168)
9.3 病毒的 X 射线衍射分析研究简述	(170)
9.4 具有螺旋对称性的病毒	(170)
9.5 球形病毒	(178)
第十章 核小体和染色体的立体结构	(190)
10.1 核小体核心颗粒的结晶和单晶结构分析	(191)
10.2 核小体核心颗粒的立体结构	(193)
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	(196)
第十一章 多糖的立体结构	(199)
11.1 多糖的构象	(199)
11.2 多糖的 X 射线衍射分析方法	(201)
11.3 多糖的立体结构	(204)
参考文献	(209)

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,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 0.1nm 左右的电磁波,由于这一波长与晶体内原子间的距离具有同一数量级以及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,形成一个衍射花样。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。但是晶体的衍射花样与晶体内部的结构有一定的关系,即衍射花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,从原则上讲我们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,在实践中要经过一个较复杂、长期的过程,大体上可以分成彼此相互联系和影响的若干步骤:(1)培养大的、质量好的晶体,以及进行初步的 X 射线衍射分析;(2)重原子衍生物的制备;(3)衍射数据的测量和处理;(4)相位的计算;(5)电子密度图的计算和解释以及分子模型的修正。在上述几个方面,晶体学家已积累了许多成功的经验,并有专门的论著。

为了进一步理解 X 射线衍射法测定晶体结构的基本原理,本篇将首先讨论生物大分子的晶体培养和介绍与晶体产生衍射花样有关的、最基本的晶体结构特征;其次,讨论衍射花样中衍射点的分布与晶体内分子重复的方式和重复周期大小的关系,衍射强度与晶体内分子空间结构的关系;第三,讨论 X 射线的产生和性质以及记录衍射花样的一些方法和原理,以帮助读者进一步理解衍射花样的产生和晶体结构的关系,并对生物样品的纤维衍射图的特征,作简要的说明;第四,由衍射花样测定了晶体的晶胞大小、形状,以及测量了衍射强度,并引出结构振幅和解决相角问题以后,将应用电子密度函数计算晶体的电子密度图,最后通过解释电子密度图和不断修正分子模型,得到晶胞中每个原子的坐标。

第一章 生物大分子的晶体培养

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,否则无法得到具有结构本身特点的衍射花样;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,而反比于分子量的大小。一般讲分子量为 50000 左右的蛋白质分子,需要 0.3mm^3 或者更大的晶体,才有可能作高分辨率的结构分析。对于分子量更大的蛋白质分子,那就需要更大的晶体。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,而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,来讨论生物大分子晶体培养的一般规律和方法。

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,并保持一定的条件,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分子量很高,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培养工作相当困难。不过在蛋白质和核酸的晶体培养方面,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。长期以来很难培养出单晶的膜蛋白质,也已培养出了适合于 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态。但是从总的方面来说,生物大分子的晶体培养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分析的晶体而长期不能进行。晶体培养已成为当前阻碍提高晶体结构分析速度的关键性问题。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。

要培养蛋白质或核酸的晶体最重要的是分离、纯化,获得均一的样品,一般要求电泳纯。然后使溶液达到过饱和,在这个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是随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相反离子等等有关。

1.1 影响蛋白质溶解性的因素

蛋白质分子是具有一定几何外形的结构,它的带电的、极性的基团分布在分子的表面,它的溶解性质可以像任何其他类型的水溶性分子一样来考虑。在溶液中的水分子与蛋白质表面的带电基团和极性基团相互作用,从而在分子周围形成一个水层。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。

1.1.1 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时,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,表面的有序溶剂分子,以及蛋白质分子的固体状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达到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。一般讲磷酸钾、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)。

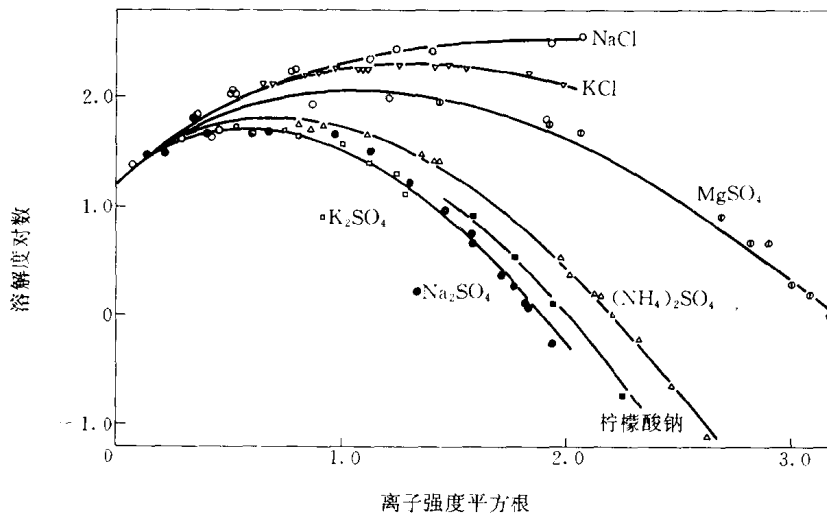


图 1.1 在不同电解质中一氧化碳血红蛋白的溶解性(25°C)

1.1.2 pH 和相反离子

把蛋白质分子看成具有确定价的带电荷的物质,显然是过于简单,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,当纯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。pH 的改变对蛋白质溶解性的影响见图 1.2。

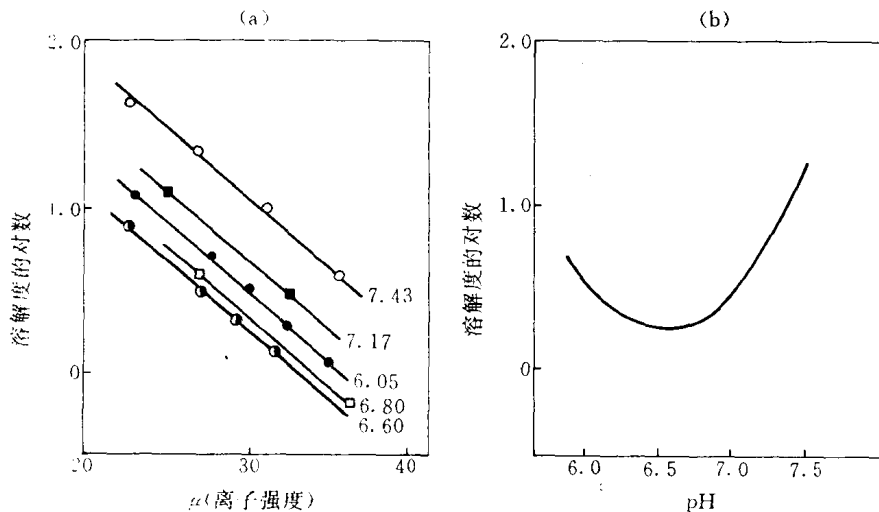


图 1.2 在不同 pH 的浓磷酸缓冲液条件下血红蛋白的溶解性

1.1.3 温度

温度对蛋白质溶解性的影响较复杂。一般讲,在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。

1.1.4 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对蛋白质分子表面的水分子,以及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,从而降低蛋白质的溶解性。在使用有机溶剂时,要尽可能在低温条件下操作,以免产生蛋白质变性。

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。

在生物大分子晶体培养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)最常用的平均分子量为 2000—6000,但是从 400 至 20000 大小的分子量都成功地用于蛋白质结晶。聚乙二醇分子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% 至 18% 范围以内。聚

乙二醇的作用主要是改变原来水的结构,而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。

由于蛋白质分子溶液达到饱和、过饱和状态的情况较复杂,在平衡过程中有离子和分子间的相互作用,因此对于如何产生晶核和长成大的晶体了解得还很不够。根据对小分子物质结晶的研究,晶体的形成取决于一个一定大小的晶核的形成,如果产生的晶核太小就可能溶解。一定大小的晶核可能包含 10 至 200 个分子,形成的时间随条件而变化,成核的速度明显地随过饱和度而变化,溶液达到某一过饱和度时,成核速度就迅速增加。为了减少成核的数量,从而控制晶体的数量,必须尽可能地使溶液慢慢地达到过饱和度,以及使过饱和度尽量地低。因此加沉淀剂时应该尽可能地慢,以免局部产生过饱和。

在溶液中某些外来的微粒可能作为成核中心,而使晶核更多,因此应该尽量避免有尘粒,或离心除去;在实验过程中要尽可能避免产生小的气泡。在使用有机溶剂作沉淀剂时要特别小心,因为稍有不慎很可能引起蛋白质变性,产生不必要的成核中心;通常蛋白质应该很纯,蛋白质溶液不要保存太久,以免蛋白质变性。因此在开始培养晶体前,应首先将准备结晶的蛋白质溶液高速度离心。

蛋白质的浓度对晶体的生长亦是一个重要的因素。大的晶体往往在高浓度、低过饱和度情况下产生,这是由于高浓度蛋白质溶液提供了足够量的分子,满足了晶体生长的需要。如果可能向结晶的溶液中引进一些晶种,有利于减少成核,生长出大的晶体。

1.3 结晶技术

要使生物大分子结晶和生长出大的晶体,最关键的是控制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。

1.3.1 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,因为蒸发的程度很难控制,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。

1.3.1.1 悬滴法

这种方法最适用于微量的筛选结晶条件。每个蛋白质溶液样品只需 $5\mu\text{l}$ 或者 $10\mu\text{l}$,平衡液只需 1ml 。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汽,必须在盖玻片与池边缘间加少量凡士林密封。

1.3.1.2 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 μ l 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,导致损坏晶体。

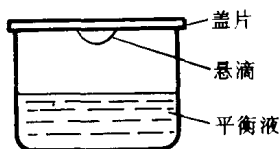


图 1.3 示意悬滴法装置

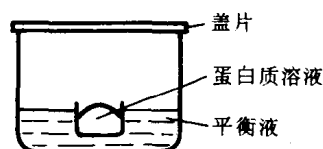


图 1.4 示意坐滴法

1.3.2 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 值,使蛋白质溶液慢慢地接近过饱和度。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方法结晶,它既适用于大批量的结晶,亦可应用于微量的结晶。

1.3.2.1 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—3mm,高 4—5mm。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)。

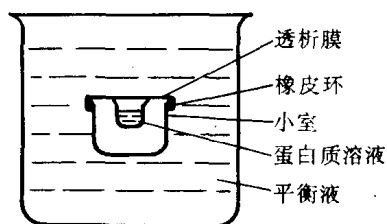


图 1.5 示意透析法装置

1.3.2.2 梯度透析法

为更慢地控制扩散速度,减少成核的数量可用具有双层透析膜的梯度透析装置,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。

1.3.3 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产生较好的晶体,例如首先配小量的(300 μ 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 μ l)放在一个试管内,再向上述母液中加入 1/10 量(30 μ l)的溶剂至 300 μ l。这样蛋白质浓度就降低了 1/10 量。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 μ 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。

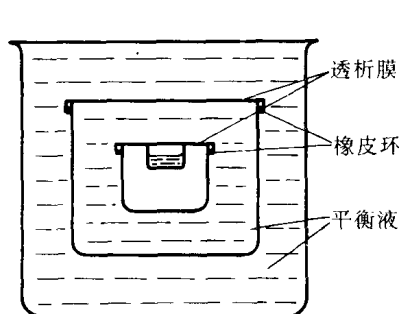


图 1.6 示意梯度透析法装置

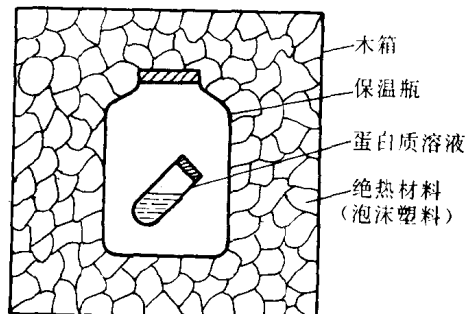


图 1.7 示意温度梯度法装置

1.3.4 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。

1.3.5 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培养晶体。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培养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 ($0.01-0.1\text{mm}$)，或者由其他方法得到的更小的微晶。(2)由簇生的针状的或片状的晶体，经精心分离、切断、挑选的单晶片段。晶体的选择，最好在偏光显微镜下进行，这样容易选取外形规整、无裂纹、又不是孪生的小晶体或晶体片段为晶种。

晶种的转移：选好的晶种，在接种前需在一定浓度的沉淀剂缓冲溶液中清洗，去掉晶种表面附着的晶体碎片和变性蛋白，并使晶体表面新鲜。沉淀剂浓度一般略高于原晶种生长时的浓度，以免在清洗过程中溶解。经多次清洗后的晶种，借助玻璃毛细吸管 (图 1.8) 或者用一端剪成铲状的动物毛发，小心地转移到新配制的晶体生长母液中。在转移过程中一定要保证晶种的完整，同时要注意尽可能地减少把清洗晶种的溶液带入新鲜母液，以防改变母液浓度。母液中蛋白质和沉淀剂浓度应根据原晶体生长时的条件，经试验决定。一般为蛋白质浓度略低于原晶种生长时的浓度，而沉淀剂浓度略高于原晶种生长时的浓度。这样既能保证晶种移入后不溶解，又有利于晶种的生长。

晶种的生长：已转移到母液中的晶种，可采用前面已介绍的任何一种微量晶体培养法促使

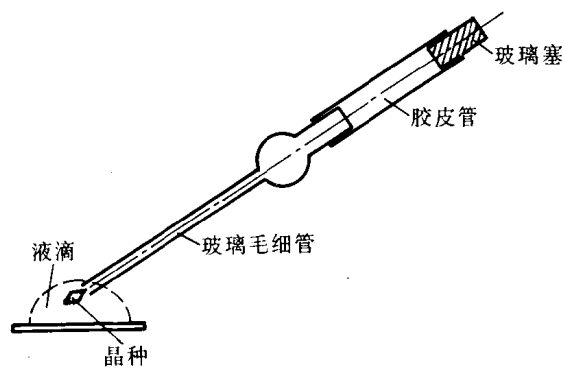


图 1.8 晶种的转移

晶种继续生长、增大。如果经一次接种后，尚不能达到足够大，可将该晶体再作为晶种，并按上述步骤再清洗、转移、生长。如还不能满足要求，可再重复接种，直至获得符合要求的单晶为止^{[10][15]}。

第二章 晶体结构的共同特征

生物大分子如蛋白质、核酸,分子量很高,结构复杂,而且具有多种多样的生物功能,与一般的无机、有机分子有本质的差别。但是,当这些物质在一定条件下形成晶体时,它们都遵循着最普遍、最共同的规律,即整个晶体结构保持能量最低状态。由此,晶体结构内部分子(原子或离子)的排列必然具有规则性和最密堆积性。这种排列上的规则性和密堆积性集中反映在晶体结构都具有周期性和对称性这样的共同特征上。正是这些共同特征决定了晶体能作为光栅而使 X 射线产生衍射,以及晶体具有一定的熔点和各向异性等物理、化学特性。在这里主要讨论与 X 射线衍射法有关的共同特征。

2.1 晶体的空间格子、晶胞和晶面指标

2.1.1 晶体的空间格子

晶体是在自然界或实验室条件下,生成多面体形状的固体。虽然在某些生长条件下晶体的多面体外形可能不明显,但是天然的多面体外形是晶体外部最明显的共同特征。例如日常在实验室看到的氯化钠、硫酸铵等晶体,以及胰蛋白酶、胰岛素等生物大分子晶体,虽然化学组成和性质各不相同,但都具有规则的多面体外形。这一外部的共同特征反映了各种物质的晶体具有内部结构上的共同特征。

2.1.1.1 晶体结构的周期性

晶体结构内部最重要的共同特征是分子(原子、离子)在空间排列上的周期性,例如氯化钠(NaCl)晶体, Na^+ 和 Cl^- 离子按一定周期在空间排列,形成三维的周期性结构。图 2.1(a)示出了这种周期性排列的一个平面和立体结构,其中 Cl^- 和 Na^+ 都按 OA 周期重复排列。同样亦可以把 Cl^- 和 Na^+ 看成是重复的基本单位,称为结构基元,重复的周期亦为 OA 。又如 NH_4Cl 晶体, NH_4^+ 和 Cl^- 离子亦按一定周期在空间排列,形成三维的周期性结构,图 2.2(a)示出了一个平面和立体结构,其中 Cl^- 和 NH_4^+ 都按 OB 周期重复排列。 NH_4^+ 和 Cl^- 为结构基元,重复周期亦为 OB 。当然 NaCl 和 NH_4Cl 晶体结构的周期大小不可能相等,但是原子排列的周期性是它们的共同特征。对于生物大分子来说,分子的结构虽然很复杂,但在晶体结构中,分子仍然按一定周期排列,即它们作为一个结构基元按一定周期排列。不过,由于生物大分子的分子量很高,体积很大,因而重复的周期要比一般小分子大得多。

在实际晶体里,这种重复的周期可以近似地看成是无限的,因为在一般小分子晶体中重复周期为 1nm 左右,而对边长为 1mm 的晶体来说,周期数可达 10^6 左右;蛋白质晶体的重复周期较大,假如为 10nm 左右,那末边长为 1mm 的晶体,周期数亦可达到 10^5 左右。

2.1.1.2 晶体的周期性与空间格子

在晶体学中为了充分反映晶体结构的周期性特征,从实际晶体中抽象出了空间格子的概念。按照晶体结构的周期性,在一定的地方用一个点代表晶体结构的基本重复单位,就可抽象出在三维空间分布的一组点。例如在 NaCl 晶体中,用一个点代表基本重复单位(Na^+ 和 Cl^-),

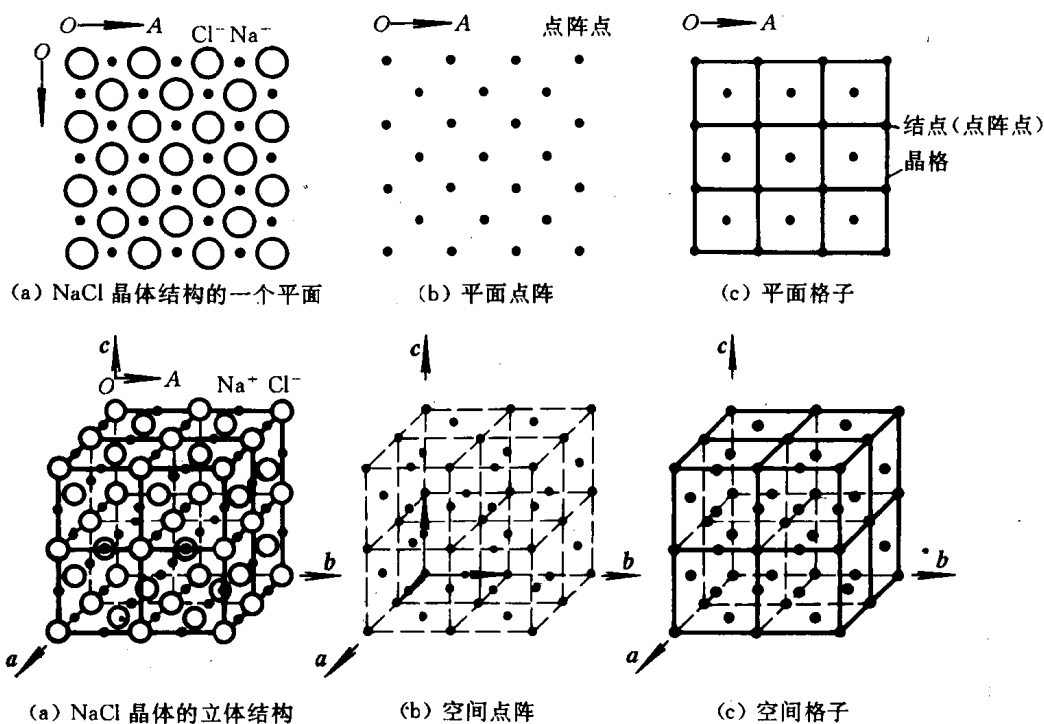


图 2.1 示意 NaCl 晶体结构与点阵和空间格子间的关系

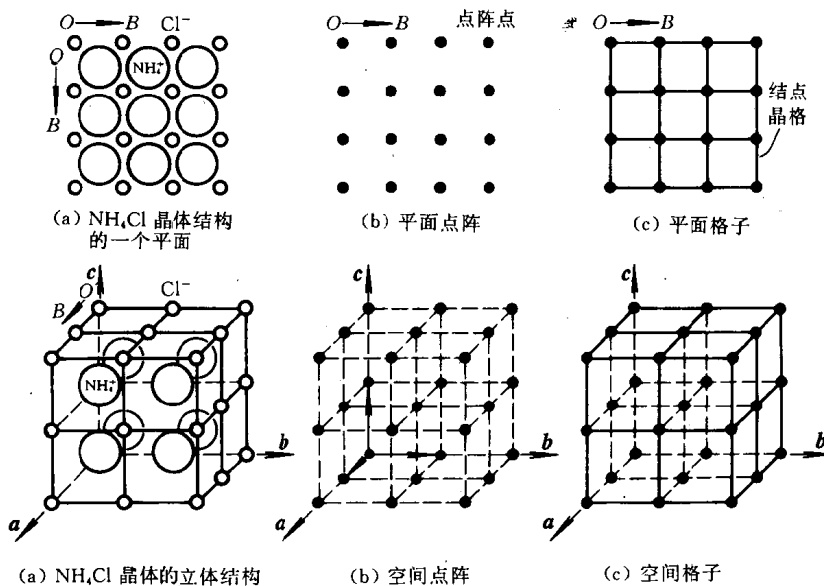


图 2.2 示意 NH_4Cl 晶体结构与点阵和空间格子间的关系

就可抽象出上述的一组点。图 2.1(b) 为点在一个平面和三维空间中的分布。由于晶体结构的周期性是无限的，因此这样抽象出来的点在空间分布也是无限的，每个点的周围环境、相对的