

杜仲抗真菌蛋白晶体生长的 原子力显微成像研究 ——快速生长与晶面生长速率*

汪 盛^{1, 2, 3)} 向 烨¹⁾ 李根培^{1, 2)} 王大成^{1, 2)}**

(¹⁾ 中国科学院生物物理研究所分子生物学研究中心, 北京 100101;

(²⁾ 中国科学院力学研究所国家微重力实验室, 北京 100080;

(³⁾ 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

摘要 杜仲抗真菌蛋白 (*Eucommia antifungal protein*, EAFP) 的单晶体具有在几小时内就可长大的快速生长特性. 用原子力显微成像 (atomic force microscope, AFM) 技术, 原位实时观测了 EAFP 单斜晶体生长过程中的 {100} 表面形貌动态变化, 并分别在不同的过饱和度下测量了其生长速率. 结果表明, EAFP 晶体生长的速率与蛋白质溶液的过饱和度相关, 在过饱和度高时 ($\sigma = 1.78$) 晶面生长极快; 在中等过饱和度 ($\sigma = 1.5$) 下, 其晶面台阶的生长速率沿 b , c 方向分别为 12 nm/s 和 24.2 nm/s, 比溶菌酶生长速率 (6~7 nm/s) 快很多; 在蛋白质浓度很低的情况下, 其生长速率仍与其他蛋白质相当. EAFP 晶体快速生长可能与该分子尺寸较小, 内部结构紧凑, 分子骨架呈刚性和分子表面性质等其固有特性密切相关. 沉淀剂浓度对 EAFP 晶体生长也有影响. 过饱和度很低时, 提高沉淀剂浓度会干扰晶体生长.

关键词 杜仲抗真菌蛋白 (EAFP), 原子力显微镜, 原位实时动态观察, 生长速率

学科分类号 Q793

最新版蛋白质数据库 (PDB, www.rcsb.org/pdb/holdings.html) 已存放 2 万多套结构模型, 其中绝大多数是由 X 射线晶体衍射方法测定和提供的. 可见, X 射线晶体衍射方法仍将是测定生物大分子结构的主要手段和途径. 然而, 该方法的成功很大程度上取决于所用的晶体样品. 迄今为止, 结构测定用的生物大分子晶体几乎都是用尝试法, 或凭经验和技巧获得, 有不少偶然性. 生物大分子 (包括蛋白质、核酸、病毒及大分子复合体) 本身组成和结构复杂, 它们的分子外形很不规则, 分子柔软性较大, 具有特定的物理化学性质, 只有在合适的 pH、温度等苛刻条件下才能保持其活性, 所以其结晶过程不同于常规的小分子. 它们一般在多组分的复杂溶液体系中, 而且只有在过饱和度很高的条件下生长. 生物大分子结晶溶液体系对外界的变化特别敏感, 影响因素也多. 在这种溶液体系中的生物大分子溶质传输远比小分子的慢, 它们的结晶过程也相当慢.

另一方面, 生物大分子晶体一般含有较高的溶剂, 其范围在 30%~90%, 通常情况下为 50% 左右^[1,2]. 晶体离不开母液, 且受外力影响易碎. 大分子晶体所具有的这些特点和大分子在结晶溶液中

行为的复杂性, 使得晶体生长研究受到很大的制约.

尽管生物大分子晶体生长的技术和方法近来有不少新的进展, 但仍没有建立能有效地指导实践的原理和理论. 如今, X 射线晶体衍射的实验技术和结构测定方法日趋完善和成熟, 已成为常规化的手段, 因此能否制备适合于 X 射线衍射的大单晶已成为结构测定能否成功的关键.

鉴于生物大分子晶体生长领域的现状难以满足结构生物学的快速发展, 特别是结构基因组和蛋白质组研究的需求^[3], 全方位、多层次地了解生物大分子晶体生长过程, 揭示其生长规律, 最终建立指导实际晶体生长实践的原理和理论, 是尤其迫切和亟待解决的课题.

原子力显微成像技术 (atomic force microscope, AFM)^[4,5] 能够在接近于晶体生长或相

* 中国科学院知识创新工程资助项目, 国家重点基础研究资助项目 (G19990756) 和国家自然科学基金资助项目 (30070162).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888547, Fax: 010-64888563

E-mail: dewang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2003-03-10, 接受日期: 2003-04-30

同的环境条件下, 进行实时原位观测晶体样品表面形貌的变化, 同时又能提供纳米量级的高分辨率微观图像, 已成为研究晶体生长和表面形貌动态变化过程的有效工具^[5]. 近十多年, 该技术在生物大分子晶体生长研究领域得到广泛的应用^[6~11], 并取得了不少进展.

杜仲抗真菌蛋白 (EAFP) ($M_r = 4158.9$) 是从昆明山区的杜仲皮 (*Eucommia ulmoides* Oliv bark) 中提取出来的新型抗真菌蛋白, 含有 5 对二硫键^[12]. 在 EAFP 的结晶实验中, 发现该晶体在较宽的 pH 和沉淀剂浓度范围内均能生长, 而且其生长速度很快, 几乎数小时就可以长出足够大的晶体. X 射线衍射实验表明, EAFP 单晶具有很强的衍射能力, 极高的衍射分辨率 (0.08 nm). 该晶体属单斜晶系, 空间群为 $P2_1$, 晶胞参数为 $a = 1.9085$, $b = 2.3225$, $c = 3.0854$ nm, $\beta = 98.64^\circ$, 其原子分辨率的晶体结构已被确定^[13]. 基于上述特性, EAFP 晶体成为适合于蛋白质晶体生长研究的较为理想模型. 为此, 用原子力显微成像技术观测了在其生长过程中, 沉淀剂浓度变化对 EAFP 晶体 {100} 晶面形貌的影响, 并测定了在正常生长条件下晶体生长速率.

1 材料与方法

1.1 仪器和材料

观测 EAFP 蛋白晶体的表面形貌变化, 主要用 AutoProbe CP Research Scanning Probe Microscope (Park Scientific Instruments) 原子力显微镜. 该 AFM 系统具有多任务扫描头, 手动的 XY 移动平台, 电动的 Z 平台和 100 μm 压电陶瓷扫描器 (另带 5 μm 的扫描器作选用). 同时还配有高倍 CP 光学显微镜及监视器, 便于对待测样品和激光点进行定位和调节.

显微成像数据收集和控制系用 Data Acquisition 软件 (1.6 beta 版) 进行. 图像的相关处理及分析用 Image Processing and Data Analysis Ver. 2. 1. 15 (ThermoMicroscopes, Copyright © 1998) 和 ThermoMicroscopes SPMLab NT Ver. 5. 01 (Copyright 2000 ThermoMicroscopes Inc.) 软件包进行. 所用的探针为 coated-sharpened Microlever C 型针 (0.01 N/m, Park Scientific Instruments).

结晶实验之前, 将 EAFP 蛋白样品用 AKTA 层析仪做进一步提纯. 所用的化学试剂均为分析纯, 未做进一步提纯, 但所配制的溶液用直径为

0.22 μm 微量过滤器进行过滤.

蛋白质样品浓度是用 UV-120-02 型紫外分光仪 (Shimadzu Corp. Kyoto Japan) 紫外吸收法 (UV, 波长 280 nm 处吸收峰) 测定. EAFP 晶体外形与晶体学坐标系的相关关系, 即晶面指标化, 是在日本筑波高能研究所 (KEK) 同步辐射 BL-18B 工作站进行表征确定.

1.2 EAFP 晶体样品制备和 AFM 图像收集

EAFP 晶种是通过悬滴气相扩散法得到. 该晶体可在较宽的蛋白质浓度和 pH 范围得到, 本工作所用的晶体样品在 pH 为 5.5 条件下, 用如下操作制备: a. 用 2 mol/L NaAc 450 μl 和 1 mol/L HAc 50 μl 混合作为池液, 并取 2 μl 池液和等量的 20 g/L EAFP 蛋白溶液混合均匀做成悬滴; b. 将 1.5 mol/L NaAc 450 μl 和 1 mol/L HAc 50 μl 混合作为池液, 取 2 μl 池液和等量的 20 g/L EAFP 蛋白溶液均匀混合为悬滴. 在 20℃ 恒温箱中恒温, 大约 5~6 h 后即可看到扁平或长条状晶体出现. 前者晶体数量多、晶体尺寸较小, 而后者则晶体数量少, 尺寸较大. 等到有足够大小的能用于 AFM 观察的晶种后, 小心地将长在玻片上的晶体转移到一个密封的液池 (Park Scientific Instruments), 并快速注入 50 μl 按一定比例配好的溶液. 整个操作过程避免晶体暴露于空气, 或受外力影响而损坏. 待系统稳定后进行 AFM 原位实时扫描, 在进行扫描成像时参照晶体外形 (由 X 射线表征可知, 该晶体的扁平面则是 {100} 面), 尽量使扫描方向与晶体学轴保持一致. EAFP 蛋白晶体表面生长形貌变化的观察分别采用 contact 和 tapping 两种模式. 考虑到蛋白质晶体松软易碎和对外界敏感的特点, 在整个成像操作过程中, 在图像不失真的前提下尽量采用小的力参数 (或振幅值), 并不断地小心调节系统的反馈值, 保证使探针在稳定的条件下进行扫描, 同时减少系统的噪音使图像清晰.

2 结果与讨论

在不同过饱和度条件下, EAFP 单斜晶体 {100} 晶面生长 AFM 原位实时观测表明, 该晶体生长并非单一模式. 正如图 1, 2 和 3 所示, 随着结晶溶液过饱和度的变化, 晶体采取不同的生长模式, 即: 过饱和度高时, 以活泼的, 多重的二维岛型核为主; 而过饱和度底时, 则取不对称螺旋位错所产生的台阶模式. 在观测中发现, EAFP 晶体生长过程中晶面的微观形貌变化多样, 而且变化速度

很快.

2.1 EAFP 晶体生长速率

生物大分子晶体的生长速度比常规的小分子晶体生长慢得多, 一般来说, 即使在合适的生长条件下, 要获得 0.3 mm 尺寸的晶体需要数天至数月, 甚至一年. 人们极为关注生物大分子晶体生长速度. 关于生物大分子晶体的生长速率, McPherson 等^[14]曾指出, 应该考虑在结晶溶液中分子向晶核或晶体表面的扩散以及分子在晶体表面附着和正确趋向的频率. 由于生物大分子尺寸比较大, 分子形状不规则和柔软, 且表面性质复杂, 粘性也较大, 它们在结晶溶液体系中迁移, 扩散速度必然要慢. 另一方面, 生物大分子在晶体堆积中主要靠氢键、范德华力和静电力等弱力, 分子接近晶体表面, 并取正确趋向与晶体表面对接组装成有规则、有周期的相互连接过程, 也必然要比常规小分子慢. EAFP 结构分析结果表明^[13], 该分子外形大小为 1.9 nm × 2.3 nm × 1.6 nm, 分子结构相当紧凑, 其骨架为刚性. 说明 EAFP 分子在结晶溶液中运动相对容易, 其迁移扩散要比别的大分子容易而快. 从晶体堆积中可知, 暴露在外的分子表面极性残基 Tyr, Ser, Arg, Asn 等和 N 端肽段 1 ~ 8 的 C=O 和 NH, 在结晶条件下直接参与分子之间的相互作用, 形成强而稳定的氢键. EAFP 分子所固有的这

些结构特性是其快速生长的内在基础.

估算的 EAFP 晶体生长的基本热力学和动态参数值显示出该晶体生长与其他大分子晶体生长不同的特性. EAFP 晶体在过饱和度 $\sigma = 1.5$ 时, 晶体生长的界面自由能 α 值为 $6.86 \times 10^{-6} \text{ J/cm}^2$, 比目前已知的其他大分子晶体生长的相应值大 3 个数量级, 相当于小分子晶体生长的相应值, 而动态系数 β 值为 $6.9 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$, 接近其他已知的大分子晶体生长的 β 值^[14]. 说明 EAFP 晶体生长可能具有“双重”性, 即其基本热力学参数表现为小分子, 而动态系数为大分子晶体生长.

尽管晶体生长过程本身是一个非线性过程, 在不同时间阶段, 晶体不同区域的速率不尽相同, 但在确定的生长条件下的晶体生长速率, 在一定程度上反映晶体之间可比性的动态特性. 在前面已提到, 影响这些动态特性和生长速度的参数较多, 其中过饱和度是一个能产生直接影响的重要参数, 而且容易控制. 为此, 着重考察过饱和度对晶面台阶前进的速率影响. 此处的过饱和度用无量纲值 $\sigma = \ln(C/C_e)$ 表示, 其中 C 为实际结晶溶液中的蛋白质浓度, C_e 为晶体不再生长并与溶液平衡时的蛋白质浓度 (即溶解度).

图 1 是在蛋白质过饱和度 σ 为 1.5 时, EAFP 晶体 {100} 表面生长的连续的 AFM 显微成像图

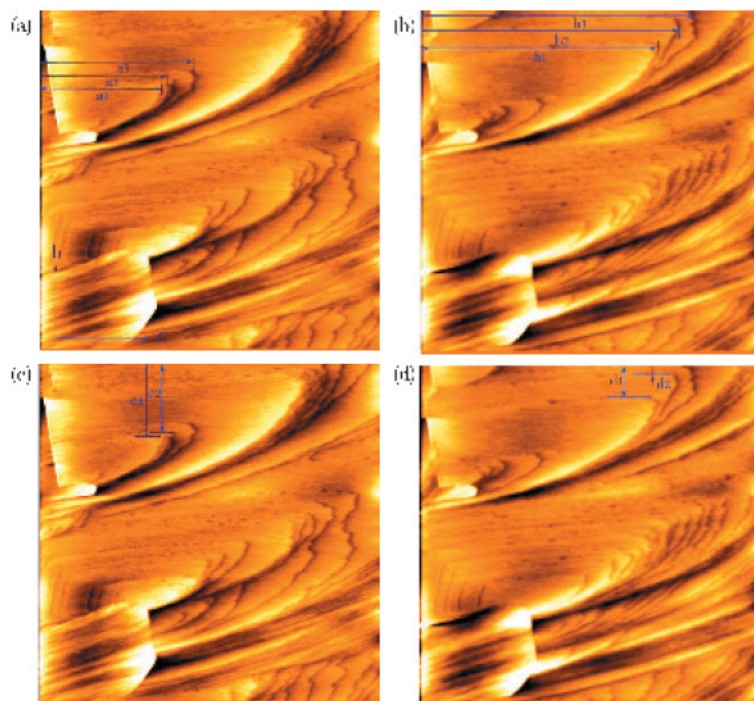


Fig. 1 Series of AFM images taken at 17 min intervals, showing the multi staked 2D islands and expansion of the stack on the {100} surface of EAFP monoclinic crystal at higher supersaturation $\sigma = 1.5$, Scan area = $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, Scan rate = 11 ps.

(间隔约为 17 min). 图 1 显示, 该晶体生长时, 多个二维岛的台阶生长源以不对称的方式传播多堆台阶. 这些连续的显微成像 (图 1a, b, c, d) 表明, 沿晶体学轴 c 方向的前进速度明显大于沿 b 轴方向的速度, 从而台阶形状不对称. 在图 1a 和 1b 中, 图 1a 是由下而上扫描, 图 1b 则是从上往下扫描.

为了估算台阶的传播速率, 从中选取一组多层台阶组为起始参照, 并连续跟踪, 观察其在另一张相邻图上的变化. 在图 1 中所选的三层同时向前推进. 为客观地反映每个 (层) 台阶的传播速率, 对其分别进行测量之后取计算平均值. 由于原位实

时观察, 在晶体表面选定一个参照点来进行比较台阶前沿的传播, 在系统允许的漂移范围, 认为可行. 图 1 中用蓝线箭头所表示的, 以图的左侧垂直边为参照, 沿着晶体学轴 c 方向 (图 1a, b), 或 b 轴向 (图 1c, d) 分别划定几条平行线, 指向各自的台阶前沿, 再划出与之相垂直的线, 根据扫描方向和参照点的相对位置 (分别标为 a1, a2, a3, b1, b2, b3) 分别测出其距离差 (ΔD) 和时间总和 (t), 由此可以估算晶体台阶在这段时间的传播 (生长) 速率. 对 b 方向, 以同样的方法进行操作. 数据的分析处理系用 AFM 的图像分析软件 (IP2.1) 进行. 所得结果列于表 1 中.

Table 1 Growth rates of EAFP monoclinic crystal measured from AFM images ($\sigma = 1.5$)

	$D/\mu\text{m}$	t/s	$\Delta D/\mu\text{m}$	$t/\text{s}(\text{in total})$	Growth rate $/(\text{nm} \cdot \text{s}^{-1})$
a1	3.652	118	3.340	177	18.9
b1	6.992	59			
a2	3.926	118			
b2	7.539	22	3.613	140	25.8
a3	4.648	101	3.438	123	27.9
b3	8.086	22			
c1	2.188	112			
d1	0.996	51	1.192	163	7.3
c2	2.012	103	1.856	111	16.7
d2	0.156	8			

图 2 表示过饱和度降低 ($\sigma = 1.15$) 时, EAFP 晶体的表面微观形貌变化. 从图 2 中连续的两张图所得的数据表明, 此时 EAFP 晶体生长的速率值比图 1 所得的相应速率值要小. 用上述的处理方法,

即沿结晶学 c 或 b 轴向划线处测量对应数据 (图 2 中分别标记为 a00, a01, b00, b01), 并平均, 用图像分析软件 (IP2.1) 进行距离差和时间总和的测量. 结果列于表 2 中.

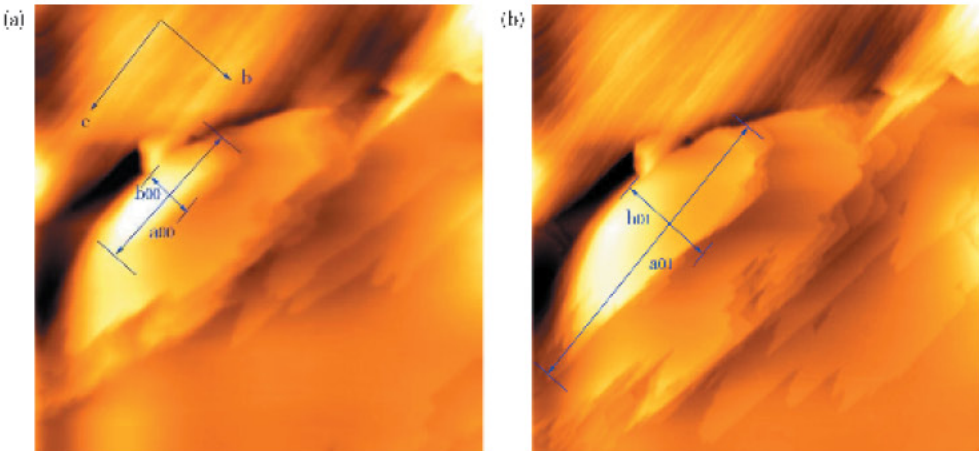


Fig. 2 Measurement of the growth rate for EAFP crystal at the lower supersaturation
Scan area: $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, Time interval is 9 min, and scan rate = 21 ps.

Table 2 The growth rates of EAFP monoclinic crystal measured under the supersaturation $\sigma = 1.15$

	$D/\mu\text{m}$	t/s	$\Delta D/\mu\text{m}$	t/s (in total)	Growth rate / ($\text{nm} \cdot \text{s}^{-1}$)
a00	3.680	138	2.927	330.5	8.8
a01	6.607	192.5			
b00	1.133	118.5	1.032	250	4.1
b01	2.165	131.5			

再降低过饱和度, 此时 EAFP 晶体表面主要以螺旋位错模式进行生长. 图 3 表示在蛋白质浓度较低 (过饱和度 σ 为 0.35) 时, EAFP 晶体的表面生长微观形貌. 从图 3 中可以看出, 晶体表面呈现出左旋的位错生长中心, 并由此中心不断产生新的台阶并沿切线方向进行横向台阶扩展. 由于过饱和度

较低, 其生长较为缓慢, 螺旋台阶仍不对称. 同样的方法测量台阶传播速率, 所得的结果为: 在过饱和度 σ 为 0.35 时, EAFP 晶体 {100} 面上沿晶体学 c 轴方向的速率约为 7.1 nm/s, 而沿晶体学 b 轴方向为 3.2 nm/s.

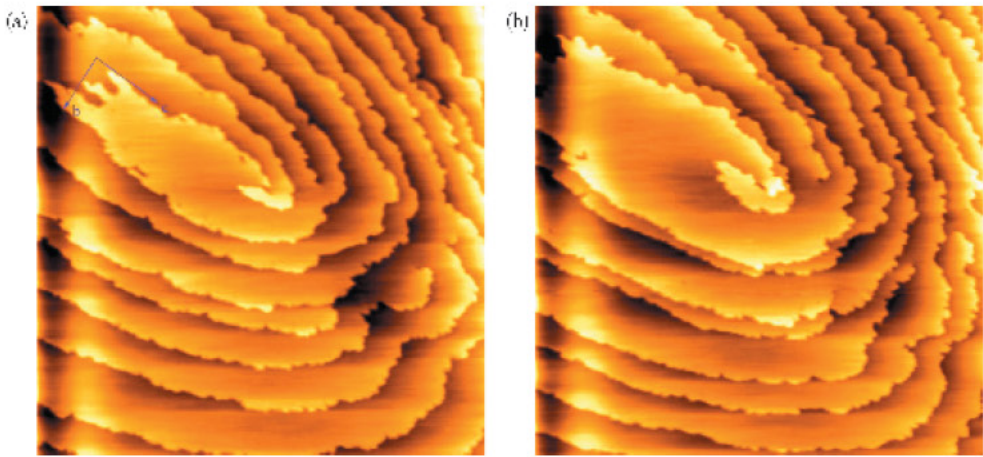


Fig. 3 Sequential images ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) taken at time interval of 17 min, showing the mode of spiral growth at lower supersaturating condition
Scan rate = 11 ps

从图 1, 图 2 和图 3 中可以看出, EAFP 晶体表面的生长情况, 在两个晶体学轴向的生长台阶形状和速率明显不同.

当过饱和度 σ 大于 1.78 时, EAFP 晶体的 {100} 面上生长速率很快, 难以用现行的 AFM 系统跟踪测量和表征. 当过饱和度 σ 降至 1.5 时 (图 1 和表 1 所示数据), 可以跟踪晶面形貌变化, 而且从台阶边沿不同的传播方向图样变化中, 可以估算 EAFP 晶体的 {100} 面上的台阶传播生长速率. c 方向台阶速率为: $v_1 = 18.8\ \text{nm/s}$, $v_2 = 25.8\ \text{nm/s}$, $v_3 = 27.9\ \text{nm/s}$, 平均值为 $24.2\ \text{nm/s}$. b 方向台阶速率为: $v_1 = 7.3\ \text{nm/s}$, $v_2 = 16.7\ \text{nm/s}$, 其平均值为 $12\ \text{nm/s}$. 当过饱和度 σ 为 1.15 时 (图 2 和表 2 所示数据), 其台阶传播速

率为如下. c 方向台阶速率为: $v_2 = 8.8\ \text{nm/s}$; b 方向台阶速率为: $v_1 = 4.1\ \text{nm/s}$. 当过饱和度 σ 为 0.32 时, EAFP 表面呈现为螺旋生长, 生长速率较为缓慢. c 方向台阶速率为: $v_2 = 5.2\ \text{nm/s}$; b 方向台阶速率为: $v_1 = 2.5\ \text{nm/s}$. 相比之下, 人们对溶菌酶的生物化学、物理化学特性, 以及其立体结构与功能等研究和了解得最多, 溶菌酶晶体生长也研究得较多, 为此常把溶菌酶作为标准蛋白进行比较. 在此将 EAFP 晶体生长速率与溶菌酶晶体做比较. Rong 等^[15]报道, 溶菌酶晶体生长的台阶平均速率为 $6 \sim 7\ \text{nm/s}$. 显然在相同过饱和度条件下, EAFP 的晶体生长速率远大于溶菌酶的晶体生长速率. 在较高过饱和度, EAFP 晶体生长的台阶速率沿 c 方向比溶菌酶大约 4 倍, 沿 b 方向大 2

倍;即使在较低的过饱和度下所测得的生长速率也与溶菌酶晶体相当. 这可能是 EAFP 分子的尺寸比溶菌酶分子小, 而且分子结构远比溶菌酶分子来得紧凑, 内部骨架刚性等固有特性和内在因素与晶体生长的影响相关.

如果 EAFP 晶体生长时生长单元看作平均大小为 $2 \sim 2.5$ nm 球形单分子, 那么过饱和度 σ 由 1.78 降到 1.5 时, 生长台阶速率相当于台阶沿 c 方向每秒钟有 10 个 EAFP 分子附着, 而沿 b 方向则有 5 个分子附着. 即使在中等过饱和度时, EAFP 晶体生长中每个台阶速率比类似过饱和度下的其他蛋白质晶体生长明显大. 在较小的过饱和度下, 该晶体生长速率仍与普通的蛋白质晶体生长速率相当. EAFP 蛋白质晶体生长所显示的这种快速生长, 在生物大分子晶体生长中并不多见.

2.2 沉淀剂浓度对晶体生长的影响

在蛋白质结晶过程中, 为了改变体系的蛋白质溶解度, 经常改变某一个或一些参数, 如添加剂或改变所用的沉淀剂浓度和种类, 从而改变溶液的过饱和度. 当过饱和度 σ 大于 1.78 时, 情况与上述观察类似, EAFP 蛋白质晶体的生长速率很快, 在

AFM 显微成像图上表现为台阶密度很高, 图样变化很快, 以至于难以进行确切的跟踪、测量和表征. 另一方面, 不同的沉淀剂浓度不仅会影响 EAFP 晶体生长的过饱和度, 也会影响 EAFP 晶体 $\{100\}$ 面的生长速率. 沉淀剂浓度增大, 会使得生长的速度变快. 在降低过饱和度, 分别测定两个不同沉淀剂浓度 (即 NaAc 的浓度差为 0.5 mol/L) 的 C_e , 发现在沉淀剂浓度高的 C_e 值比浓度低时要小约 $1/3$. 这说明提高沉淀剂浓度, 实际效果将过饱和度变大, 从而加速了晶体生长速率. 另一方面, 沉淀剂浓度的增大, 也会阻止晶体生长. 图 4 所示的两张显微成像, 则是在过饱和度低, 沉淀剂浓度高的条件下, 用 34 min 间隔采集的原位实时 AFM 显微图像. 比较两者, 图像的整体特征看不出什么明显差异, 说明此时即使提高沉淀剂浓度, 晶体也没有明显的生长. 但两个显微图像之间有细微差别 (图 4b 的箭头所指处), 随着时间的推进图像中间部位处出现小孔, 还有在图 4a 中原本清晰的台阶边沿, 在图 4b 中却变得粗糙, 表明在过饱和度低时, 增加沉淀剂浓度, 晶体反而缓慢溶解.

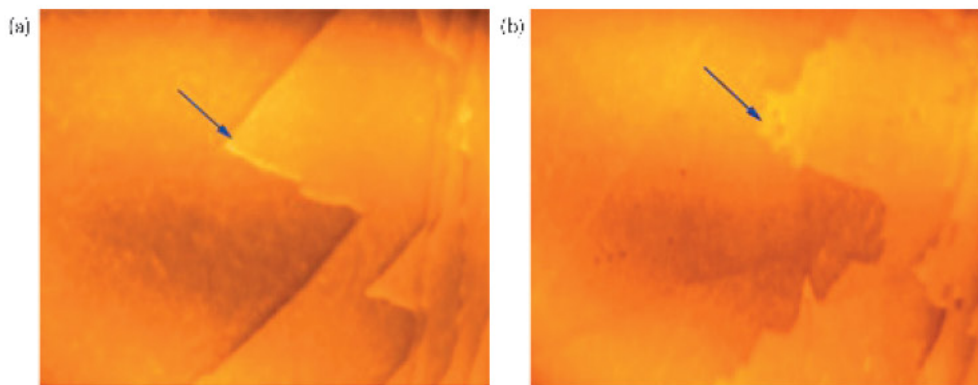


Fig. 4 Sequential images ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) separated by 34 min interval, showing the influence of the increasing concentration of the precipitant on the surface morphology

The change of the step edge is indicated by an arrow.

蛋白质晶体培养中所用的沉淀剂, 一般最常用的是小分子无机盐 (当然也有有机小分子), 它们在溶液中直接与蛋白质分子及其水壳层间以多种方式作用, 并影响蛋白质的溶解度. 在体系中的盐浓度增大或减小, 对蛋白质溶解度的变化类似于盐溶 (盐浓度低时其溶解度增大) 或盐析 (盐浓度高时其溶解度减小) 效应. 在 EAFP 单斜晶体生长体系的沉淀剂为 NaAc + HAc, 即强碱弱酸性盐和弱酸.

在这样体系中的弱酸根 Ac⁻ 与水的 H⁺ 形成不易电离的弱酸分子, 溶液的 H⁺ 不断束缚 (等于移走), 而 [OH⁻] 浓度增加. 这会导致 EAFP 水化分子表面行为的变化, 影响分子之间专一性的相互作用和静电相互作用. 另一方面, NaAc 浓度的增加 (此时体系中的离子强度也增大), 意味着共同离子多, 其电离度降低, 溶液体系中的 HAc 会使晶体溶解 (此时的离子积小于溶度积) 或助溶.

3 结 论

用原位实时原子力显微成像技术,观测了一种新型抗真菌蛋白 EAFP 晶体在其生长条件下 {100} 晶面生长动态特性。该蛋白质晶体在现行的实验条件下,生长速度很快,通常只需要数小时就可生长到较大的尺寸,比普通的蛋白质晶体生长快几倍到数十倍。通过 AFM 的观测,其基本动态特性与其他生物大分子晶体生长相似。当蛋白质溶液的过饱和度很高时,主要以不对称的二维岛型核和由此发出的多堆生长台阶横向传播发展的模式生长;在蛋白质溶液的过饱和度低时,主要以不对称的螺旋位错和由它发出的生长台阶传播发展模式生长。晶体生长的速率与蛋白质溶液的过饱和度相关,蛋白质溶液过饱和度很高时 (σ 大于 1.78), EAFP 晶体表面微观形貌变化和生长极快,以至于用目前的 AFM 连续扫描技术很难跟踪和捕捉台阶的进程,从而无法测定准确的生长速率。当过饱和度 σ 为 1.45 时, EAFP 晶体 {100} 面台阶的生长速率沿晶体学轴 b 方向平均值为 12 nm/s, 沿 c 轴方向平均值为 24.2 nm/s, 比已报道的溶菌酶晶体生长速率 (6~7 nm) 快很多^[12]。即使在蛋白质浓度比较低的情况下,其生长速率仍与已报道的其他蛋白质晶体生长速率相当。这可能不仅与 EAFP 固有特性有关,还与晶体的快速生长特性密切相关。

当 EAFP 溶液过饱和度很低时,提高沉淀剂浓度,使 EAFP 晶体停止生长,甚至使晶体缓慢溶解。这可能由于过量盐的小分子不再调节蛋白质水化状态,而是干扰 EAFP 分子表面性质,同时多余的 HAc 起助溶作用。

致谢 衷心感谢中国科学院力学研究所国家微重力实验室胡文瑞院士对我们工作的大力支持和帮助。

参 考 文 献

- Matthews B W. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 1968, **33** (2): 491~497
- McPherson A. Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem*, 1990, **189** (1): 1~23
- 王大成. 后基因组时代中的结构生物学. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (4): 340~344
- Wang D C. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (4): 340~344
- Binnig G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, **56** (9): 930~933
- Hillner P E, Mannes S, Gerber C. Atomic force microscopy: a new tool for imaging crystal growth processes. *Faraday Discussions*, 1993, **95**: 191~197
- Durbin S D, Carlson W E. Lysozyme crystal growth studied by atomic force microscopy. *J Cryst Growth*, 1992, **122** (1~4): 71~79
- Malkin A J, Kuznetsov Y G, McPherson A. Incorporation of microcrystals by growing protein and virus crystals. *Proteins: structure, function, and genetics*, 1996, **24** (2): 247~252
- Malkin A J, Kuznetsov Y G, McPherson A. Defect structure of macromolecular crystals. *J Struct Biol*, 1996, **117** (2): 124~137
- Plomp M, McPherson A, Larson S B, *et al.* Growth mechanisms and kinetics of trypsin crystallization. *J Phys Chem B*, 2001, **105** (2): 542~551
- Kuznetsov Y G, Malkin A J, McPherson A. AFM studies of the nucleation and growth mechanisms of macromolecular crystals. *J Cryst Growth*, 1999, **196** (2~4): 489~502
- Malkin A J, Kuznetsov Y G, Land T A, *et al.* Mechanism of growth for protein and virus crystals. *Nature Structure Biology*, 1995, **2** (11): 956~959
- Huang R H, Xiang Y, Liu X Z, *et al.* Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliver. *FEBS Letters*, 2002, **521** (1~3): 87~90
- Xiang Y, Huang R H, Liu W, *et al.* Crystallization and preliminary crystallographic studies of a novel antifungal protein with five disulfide bridges from *Eucommia ulmoides* Oliver. *Acta Cryst*, 2002, D58 (pt10No2): 1838~1840
- McPherson A. *Crystallization of Biological Macromolecules*, 1999. New York: GSHL Press, 395
- Rong L, Yamane T, Niimura N. Measurement and control of the crystal growth rate of tetragonal hen egg-white lysozyme imaged with an atomic force microscope. *J Cryst Growth*, 2000, **217** (1~2): 161~169

Fast Growth Rates of *Eucommia* Antifungal Protein (EAFP) Crystals Observed by Atomic Force Microscope *

WANG Sheng^{1,2,3)}, XIANG Ye¹⁾, LI Gen-Pei^{1, 2)}, WANG Da-Cheng^{1,2)} **

⁽¹⁾ Center for Molecular Biology, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

⁽³⁾ School of Biomedical Engineering of Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract *Eucommia* antifungal protein (EAFP) crystals can be easily grown into big crystals in several hours. By *in situ* atomic force microscopy (AFM) the dynamic topographic changes were observed on the surfaces of several EAFP crystals and growth rates were measured at different supersaturations of the protein solution. The results of AFM experiments indicated that growth rates of EAFP crystals were strongly and directly related to the supersaturations, in addition to the inherent structural rigidity and the interior stability of the molecule. At higher

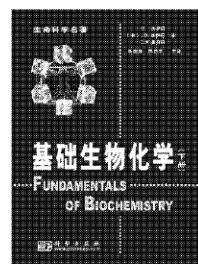
supersaturation ($\sigma = 1.78$) the EAFP crystals grew very fast; at moderate supersaturation ($\sigma = 1.5$) the growth rates were 12 nm/s and 24.2 nm/s along the crystallographic axes b , c of the $\{100\}$ surface respectively, which were faster than that of lysozyme (6~7 nm/s). Even at lower supersaturation the EAFP crystals grew almost as fast as other protein crystals did. The effects of the concentration of precipitator on crystal growth observed on the crystal growth of AFM at lower supersaturation were also presented.

Key words *Eucommia* antifungal protein (EAFP), atomic force microscopy, *in situ* AFM observation, growth rates

* This work was supported by grants from The Knowledge Innovation Program, The National Basic Research Programs of China (G19990756) and The National Natural Sciences Foundation of China (30070162).

** Corresponding author. Tel: 86-10-64888547, Fax: 86-10-64888563, E-mail: dcwang@sun5.ibp.ac.cn

Received: March 10, 2003 Accepted: April 30, 2003



基础生物化学（上、下册）

Fundamentals of Biochemistry

D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt 著

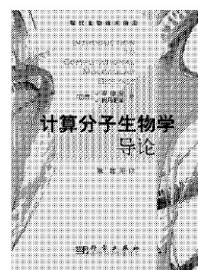
2003 年 8 月出版

朱德煦 郑昌学 主译

定价（上、下册）：120 元

本书是著名的生物化学优秀教材 Fundamentals of Biochemistry 的中译版，由南京大学和清华大学具丰富教学经验的教授主译。全书以适合教学的方式来组织内容，包括生物大分子、酶、代谢、基因表达等，重点介绍了生物大分子结构、化学机制、进化关系等，对生物化学历史的发展也作了适当阐述，以提高学习兴趣，启发学生的创造性思维。每章后面附有本章总结、参考文献、关键词、学习思考题、练习题，有利于学生复习和巩固所学内容。文字简明扼要，插图精美，主线明确，富有启发性。

本书适合高等院校生物专业的本科生、研究生、教师、研究所的科研人员阅读。



计算分子生物学导论

Introduction to Computational Molecular Biology, 1st ed.

João Setubal, João Meidanis 著

朱浩 译

定价：36.00 元

本书内容全面、行文严谨、取材经典，是一本值得介绍的好书。主要介绍了分子生物学中具有代表性的计算问题以及某些求解这些问题的有效算法。具体包括：分子生物学的基本概念；两个重要的数学对象，即串和图，和算法的基本概念等；序列比较和经典的动态程序设计算法；DNA 片段组装技术；DNA 的物理作图问题和一种物理作图的近似算法及启发式；与钟系发生树构造有关的一些数学问题和某些用于 RNA 结构预测的动态程序设计法以及蛋白质匹配方法；最后还介绍了 DNA 计算。

本书适合研究基因组学与分子生物学的生物学、数学、计算机科学等专业的科研人员、教师、研究生参考。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）。邮购地址：100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学分社

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

欢迎访问生命科学图书网站 <http://www.lifescience.com.cn>