

利用凝胶介质提高古菌 DNA 结合蛋白晶体的衍射分辨率*

王刚刚 杨海涛 饶子和**

(清华大学生物科学与技术系, 教育部蛋白质科学重点实验室, 北京 100084)

摘要 在凝胶介质中结晶了极端嗜酸热菌 *Sulfolobus shibatae* DNA 结合蛋白 Ssh10b, 与没有凝胶介质的条件下相比, 晶体的出晶速度减缓, 晶体的外形变得更规则, 晶胞的 C 轴变短, 晶体衍射分辨率从 0.65 nm 提高到了 0.35 nm.

关键词 *Sulfolobus shibatae*, DNA 结合蛋白, 凝胶介质, 分辨率

学科分类号 O641

得到高质量的晶体是进行结构解析的前提, 在实际工作中, 经常会遇到各种原因造成的晶体衍射分辨率低的情况, 已经有不少文献报道改进晶体质量, 提高衍射分辨率的方法^[1~4]. 其中, 在凝胶介质中结晶是行之有效的方法之一, 一般认为, 凝胶凝固后形成的网格结构限制了液滴中的分子流动, 使晶体外形更加规则, 而晶体的衍射质量明显提高^[5]. Chayen 等^[6]认为, 在凝胶介质中结晶可以用于高通量晶体生长, 将在结构基因组研究中发挥重要作用.

芝田硫化叶菌 (*Sulfolobus shibatae*) 属古菌域泉古菌 (Crenarchaeota) 界硫化叶菌属, 是硫化叶菌属中了解相对较多的一种极端嗜酸热菌^[7]. 它的最适生长温度为 80 °C, 一般可在 75~90 °C 范围内生长, 最适 pH 为 3.2 左右. Xue 等^[8]从 *S. shibatae* 中分离了 Ssh10b 蛋白, 这种 DNA 结合蛋白约占细胞蛋白质含量的 4%, 具有温度依赖性的固定 DNA 负超螺旋的能力, 可能在 *S. shibatae* 的染色体组织和热稳定性方面发挥重要作用. 我们结晶了重组的 Ssh10b, 最初在 0.5 mol/L Li₂SO₄, 15% PEG8000 的池液条件下得到了晶体, 晶体的最大衍射分辨率仅 0.65 nm, 通过调整沉淀剂浓度, 蛋白质浓度等方法优化结晶条件, 没有能提高 Ssh10b 晶体的衍射分辨率. 为了提高晶体的衍射分辨率, 采用了在凝胶介质中结晶的方法, 最终得到了衍射分辨率 0.35 nm 的晶体.

1 材料和方法

1.1 结晶

采用悬滴汽相扩散法进行晶体生长. 将纯化后的 Ssh10b 蛋白样品用浓缩管浓缩至 5 g/L, 过滤后

用于晶体生长. 配制 1% 的琼脂糖 10 ml, 80 °C 持续加热 2~3 h, 并低速搅拌 (转速低于 150 r/min), 然后将温度升高至 95 °C, 保温 30 min, 此时溶液完全澄清和透明, 然后在 80 °C 保温待用. 根据预实验的结晶结果, 准备了 4 组池液, 含 0.3 mol/L Li₂SO₄, PEG8000 的浓度分别为 6.75%、7.5%、8.25% 和 9%, 每一组池液有 4 种凝胶浓度, 分别为 0.025%、0.05%、0.075% 和 0.1%, 这样共有 16 个结晶条件, 将含有凝胶的池液在 40 °C 保温待用. 将 2 μl 含有琼脂糖的池液和 2 μl 蛋白质溶液在盖玻片上混合, 然后用真空脂密封在晶体生长板上, 18 °C 静置. 同时设置对照, 除池液中不加凝胶外, 其他条件同上述实验过程, 在同样条件下静置. 待晶体长出后, 进行 X 射线衍射分析.

1.2 X 射线衍射分析

晶体衍射数据采用 Mar Research 345 Image Plate System 收集, 光源为 Rigaku 的 Cu 靶阳极旋转 X 射线发生器, 电压 48 kV, 电流 98 mA, 波长 $\lambda = 0.15418$ nm. 为了得到高质量的衍射数据, 采取在低温冷冻条件下收集数据, 防冻液为含有 25% 甘油的池液, 将晶体用样品环捞出, 在防冻液中浸泡 5~10 s, 迅速移到 100 K 的氮气流中, 应用 Oxford Cryosystem 维持 100 K 的低温条件. 收集到的数据用 HKL 软件包的 DENZO 和 SCALEPACK 程序^[9]处理.

2 结果

在相同的池液条件下, 不加琼脂糖凝胶, 4~5

* 国家重点基础研究发展规划项目“973”(G1999075602).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62771493, E-mail: raozh@xtal.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2002-10-09, 接受日期: 2002-11-05

天就可以看到晶体 (图 1a), 晶体一个方向上的线度是另外两个方向上线度的 3~4 倍. X 射线衍射分析结果表明, 晶体属于六方晶系, 空间群为 $P6_122$ 或 $P6_522$, 晶胞参数为 $a = b = 8.37 \text{ nm}$, $c = 16.41 \text{ nm}$, $\gamma = 120^\circ$, 最高分辨率 0.65 nm . 按 Matthews 方法^[10]估算晶胞中一个不对称单位含有 3 个蛋白质分子时, 每单位分子质量蛋白质所占的体积为 $2.63 \times 10^{-3} \text{ nm}^3$, 溶剂含量为 53%.

在加入琼脂糖凝胶时, 两周后最先在高凝胶浓度条件下看到晶体, 晶体在各个方向上的线度近似相等, 随后, 在其他条件下也陆续出品, 16 种条件下得到的晶体具有相似的外形 (图 1b). X 射线衍射分析表明, 晶体衍射分辨率提高到了 0.35 nm , 空间群没有变化, 晶胞参数为 $a = b = 8.42 \text{ nm}$, $c = 16.01 \text{ nm}$, $\gamma = 120^\circ$, 溶剂含量为 52%. 表 1 给出了一套 0.35 nm 分辨率数据的统计结果.

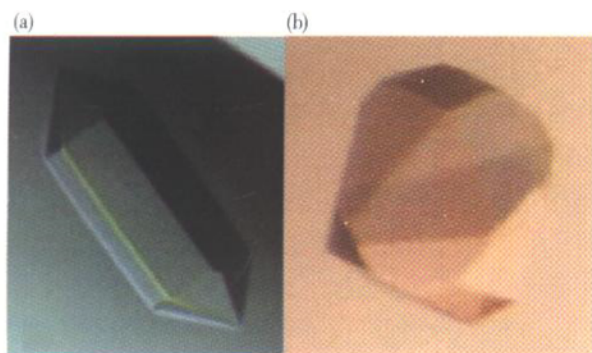


Fig. 1 Photograph of Ssh10b crystals

(a) Ssh10b crystal grown under condition without agarose gel; (b) Ssh10b crystal grown under the same condition as (a) with adding agarose gel.

Table 1 Data collection and statistics

Space group	$P6_122/P6_522$
Unit cell parameters/ nm	$a = b = 8.42, c = 16.01$
Resolution/ nm	$5.0 \sim 0.35 (0.363 \sim 0.350)$
Total observations	36 435
Unique reflections	4 571
Redundancy	7.97
Average $I/\sigma(I)$	7.9 (7.4)
$R_{\text{merge}}^{1)}/\%$	6.2 (31.3)
Completeness/ %	97.9 (99.1)

¹⁾ ($R_{\text{merge}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$). Numbers in parentheses correspond to the outer shell.

3 讨 论

晶体衍射分辨率低的原因各不相同, 在有些情

况下, 是因为晶体尺寸较小, 这时改进晶体生长条件, 得到尺寸足够大的晶体就可以解决问题. Walker 等^[1]通过在缓冲液中加入辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (β -OG), 使 TNF (tumour necrosis factor) 晶体尺寸从 $1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$ 增大到 $1.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$, 优化后的大晶体可以衍射到 0.29 nm , 完全可以进行结构分析.

在更多的情况下, 人们认为, 晶体中分子的堆积以及分子间的关系决定了晶体的衍射质量和分辨率. 如果晶胞内分子的堆积比较松散, 加上大量无序的溶剂分子, 往往导致晶体衍射质量差^[4], 另外, 分子表面的柔性残基往往导致分子间的松散堆积^[11]. Delucas 等^[2]认为, 在微重力条件下, 蛋白质分子因重力发生的垂直流动几乎消失, 同时沉降效应也几乎消失. 所以, 微重力条件下的结晶, 晶体外形更加规则, 分子在晶胞中的堆积更加有序, 衍射分辨率也更高. Petock 等^[3]发现, 将晶体在更高浓度的沉淀剂中浸泡, 可以提高晶体的衍射分辨率和衍射质量. Esnouf 等^[4]在 HIV 逆转录酶的结晶实验中发现, 通过体系脱水可以使晶体的衍射分辨率从 0.37 nm 提高到 0.22 nm .

从出晶速度来看, 加入凝胶后, Ssh10b 晶体的出晶速度减缓, 说明溶液达到过饱和的速度降低了. 从晶体生长的情况看, 加入凝胶后, 晶胞的 C 轴缩短了 0.4 nm , 说明分子沿晶胞 C 方向的堆积更为紧密了, 溶剂含量也降低了 1%. 这可能是因为加入凝胶后, 增加了溶液的稠性, 分子对流减弱, 同时凝胶的网格结构也为晶体生长提供了一个均一的环境, 这些因素都有利于蛋白质分子在晶体中的有序堆积, 从而提高了 Ssh10b 晶体的衍射分辨率.

凝胶介质来源方便, 在凝胶介质中结晶简单易行, 是一种值得推广的提高晶体衍射分辨率的好方法.

参 考 文 献

- 1 Walker N, Marchinowski S, Hillen H, *et al.* Crystallization of human tumour necrosis factor. *J Cryst Growth*, 1990, **100**: 168~170
- 2 Delucas L J, Smith C D, Smith H W, *et al.* Protein growth in microgravity. *Science*, 1989, **246**: 651~653
- 3 Petock J M, Wang Y F, Dubois G C, *et al.* Effects of different post-crystallization soaking conditions on the diffraction of Mtcp1 crystal. *Acta Cryst*, 2001, **D57**: 763~765
- 4 Esnouf R M, Ren J S, Garman E F, *et al.* Continuous and discontinuous change in the unit cell of HIV-1 reverse transcriptase crystal in dehydration. *Acta Cryst*, 1998, **D54**: 938~953

- 5 Zhu D W, Lorber B, Sauter C, *et al.* Growth kinetics, diffraction properties and effect of agarose on the stability of novel crystal form of *Thermus thermophilus* aspartyl-tRNA synthetase 1. *Acta Cryst*, 2001, **D57**: 552~ 558
- 6 Chayen N E, Saridakis E. Protein crystallization for genomics: towards high-throughout optimization techniques. *Acta Cryst*, 2002, **D58**: 921~ 927
- 7 Brock T D, Brock K M, Belly R T, *et al.* *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch Mikrobiol*, 1972, **84**: 54~ 68
- 8 Xue H, Guo R, Wen Y F, *et al.* An abundant DNA binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* affects DNA supercoiling in a temperature-dependent fashion. *J Bacteriol*, 2000, **182** (14): 3929~ 3933
- 9 Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*, 1997, **276**: 307 ~ 326
- 10 Matthews B W. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 1968, **33** (2): 491~ 497
- 11 Elsch C, Longhi S, Cambillau C. Packing forces in nine crystal forms of cutinase. *Proteins*, 1998, **31** (3): 320~ 333

Improvement on Diffraction Resolution of an Archaeon DNA Binding Protein by Gel Medium^{*}

WANG Gang-Gang, YANG Hai-Tao, RAO Zhi-He^{**}

(Ministry of Education Laboratory of Protein Science & Laboratory of Structural Biology,
Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract A small DNA-binding protein (Ssh10b) from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* was crystallized. The crystals could only diffract to 0.65 nm. And gel medium was used to improve the diffraction resolution. Gel adding led to slower speed of crystallization, change of crystal morphology and shortening of C axis of unit cell. The crystals grown in gel medium could diffract to 0.35 nm, and a set of data was collected.

Key words *Sulfolobus shibatae*, DNA binding protein, gel medium, resolution

^{*} This work was supported by The Special Funds for Major State Basic Research of China (G1999075602).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-62771493, E-mail: raozh@xtal.tsinghua.edu.cn

Received: October 9, 2002 Accepted: November 5, 2002