

表 3 24h 稳定性试验¹⁾

电极编号	1	2	3	4	5	6	7
原始峰高 ($\text{nA} \cdot \text{s}^{-1/2}$)	13.5	14.0	18.5	13.7	18.2	15.5	16.0
24h 后峰高 ($\text{nA} \cdot \text{s}^{-1/2}$)	14.5	16.5	21.5	14.0	16.0	15.0	17.5
峰高变化率 (%)	+7	+17	+16	+2	-4	-3	+9

1) DA: $1 \times 10^{-6} \text{mol/L}$

2.7 碳纤维活化机理探讨

电极经恒电位处理后,灵敏度增加,分辨率改善,与碳纤维表面性质有密切关系。为了研究电位处理的本质,对处理前后的电极分别进行了扫描电镜 (SEM) 观察和 X 射线光电子能谱 (XPS) 及循环伏安法 (CV) 实验。放大 10000 倍的 SEM 照片显示,普通碳纤维表面条纹细而密,而处理后的表面条纹变宽,阴影加深,表明电极表面经处理后变得粗糙而疏松,由此引起的表面积增加和表面净化^[6]都有利于电极灵敏度提高。XPS 的结果显示,碳纤维表面碳氧比值从未处理前的 0.047 急剧增加到处理后的 0.13,表明电极表面在处理过程中生成了大量含氧基团。在纯底液中的 CV 图表明,处理后的电极在 $+0.35 \sim +0.50 \text{V}$ 之间出现了对明显的氧化还原峰,进一步证明该类含氧基团的存在,根据峰电位可以推断这类基团极可能是碳表面氧化过程中生成的类醌基团^[7]。

Oenas 等的研究表明,AA 在电极上的氧化是受类醌基团催化所致,并且具有极大的催化速度^[8]。由此,我们认为还原态类醌基团对 AA 的催化氧化,大大加速了 AA 在电极上的反应速度,使峰电位负向移动,导致了 AA 与 DA 的分辨。

参 考 文 献

- 1 Gonon F, Buda M J, Cespuoglio R *et al. Nature*, 1980; 286: 902
- 2 邓家祺,葛振方,盛玲玲等. 见: 1987 年电分析化学学术会议论文集,广州: 中国化学会,1987: B33
- 3 吴持平,陈洪渊,方惠群. 分析化学,1988;16: 566
- 4 傅业伟,郑建斌,傅紫霞. 分析化学,1990;18: 485
- 5 Gonon F, Fombarlet C M, Buda M J *et al. Anal Chem.* 1981; 53: 1386
- 6 Wang J, Peng T, Vince V. *J Electroanal Chem*, 1987; 234: 119
- 7 Engstrom R C, Strasser V A. *Anal Chem*, 1984; 56: 136
- 8 Oenas N, Rozgaite J, Pocius A *et al. J Electroanal Chem*, 1983; 154: 12

一种简便灵活的蛋白质结晶的接种技术

戴伟文 熊建平 郝治平 夏宗茅

(中国科学院上海有机化学研究所,上海 200032)

提 要

介绍一种简便灵活的蛋白质结晶的微量接种技术,描述了接种容器的特点、接种方法、实验技巧及其在蛋白质单晶培养中的应用。

关键词 蛋白质,晶体生长,接种技术

蛋白质晶体结构的研究是近三十余年发展起来的一门新兴学科,现已成为生命科学中的一个重要领域。作为研究工作的第一步是得到

可用于 X-射线衍射的单晶,而由于蛋白质的 X

射线衍射强度比小分子化合物低得多,为得到精确的衍射数据,晶体必须长得足够大。长期以来蛋白质结晶学家为培养蛋白质晶体不断地探索新的微量方法,并已取得很大进展,但得到的单晶有时还不够大,甚至只能得到微晶、薄片状及细针状晶体,或由许多薄片形成的迭晶及由许多细针形成的簇状晶体,而从这些晶体得到外形理想的大单晶,行之有效的方法是接种^[1]。接种可进行一次,也可反复进行多次。常用的方法有将晶种引入悬滴中的蒸汽扩散法^[2],引入透析管内的平衡透析法或引入适当浓度的蛋白与沉淀剂混合溶液中的“直接接种法”^[3]等,其中以“直接接种法”最为常用。这种方法需使用带穴的玻璃板作为接种的容器(图 1)使用前需将整块板清洗和硅化,有时为保

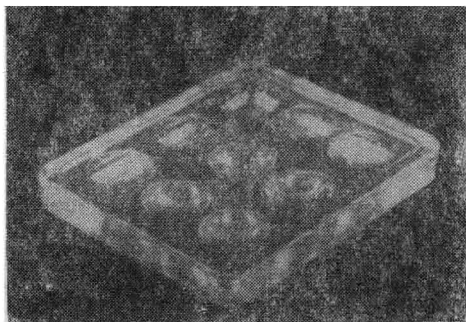


图 1 一种普通使用的玻璃板接种容器

一个穴中的晶体,整块板不能清洗,因此,需要大量的板。本文在此基础上进行了改进,以国内市场上出售的 24 孔 U 型医用血凝滴定板作为底座,并配以玻璃小槽(图 2)代替固定的玻璃板。此法只要配备少量血凝滴定板,而玻璃小槽可经清洗硅化反复使用,不影响该板上其他小槽内晶体的保存,适用于国内普通实验室使用,非常简便灵活。下面介绍用此法得到的高质量单晶的两个实例。

1 方法介绍

1.1 接种容器

用有机玻璃制成的 24 孔 U 型医用血凝滴定板(图 2a)作底板。选择大小合适的试管,截取其底部制成高度合适的玻璃小槽(图 2b)经

清洗硅化后置于底板的 U 型孔中。玻璃小槽略高于孔的深度,便于从孔中取出(图 2a)。

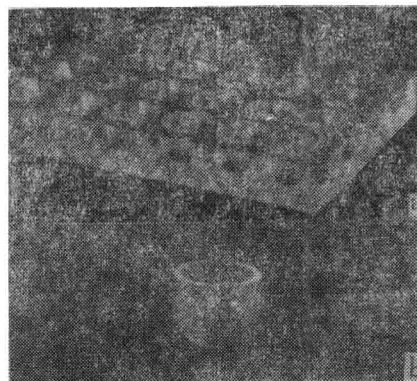


图 2 改进后的接种容器

a 接种底板(右下角穴中配有玻璃小槽) b 玻璃小槽

1.2 玻璃槽的硅化方法

用体积百分比为 3% 的二甲基二氯硅烷的甲苯溶液为硅化液,置于密闭容器(如不放干燥剂的干燥器)的底部,将洗净、烘干的玻璃槽置于硅化液的上方,密封容器约 8h,硅化完毕后将槽用乙醇漂洗,待其自行干燥后备用。硅化液可反复使用 2—3 次,但硅化时间需相应增加。

1.3 接种的实验操作

配制不含蛋白的清洗液,其中沉淀剂浓度等于或略低于接种液,其他组成均与接种液相同。先将晶种用清洗液清洗数次,清除粘附在晶种上的结晶碎片和变性蛋白,每次用清洗液约 200 μ l,每次清洗十几分钟。先在已硅化并置于底板的 U 形小孔内的玻璃小槽中加入足够的液状石蜡,再将适量的接种液用微量移液器注入槽底,使其成圆滴状静置于液状石蜡下。用 10 μ l 的微量移液器小心地从清洗液中吸取晶种,连同少量清洗液注入玻璃小槽内的液状石蜡下,在接种液滴旁边形成一个小液滴,在显微镜下见晶种后,再将含晶种的小液滴轻轻推入接种液滴,操作过程中带入的清洗液应尽量少。晶种的质量是接种成败的关键之一,应尽量挑选新鲜且外形完好的晶种,大小以 0.05—0.15mm 为最佳。晶种太小难以辨别其质量好坏,太大则对接种条件太敏感,不易长得均匀完

善。外形不理想的薄片和细针状晶体以及迭晶和簇状晶体可切碎,取碎片单晶作为晶种。用微晶作晶种时则不要清洗,取含晶种的溶液直接种入接种液即可。

2 应用实例

我们已成功地将此技术用于从 *Methylophilus methylotrophus* 和 W3A1 两种细菌中提取的甲醇脱氢酶的单晶培养实验中,得到了适合于结构分析用的大单晶,具体做法介绍如下:

2.1 细菌 *Methylophilus methylotrophus* 的甲醇脱氢酶 该蛋白质晶体生长条件已经报道^[4],本文报道的条件略有修改。将含 5mmol/L KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 10mmol/L MeOH 的 10mg/ml 的蛋白溶液 5 μl 与同体积的在 50mmol/L Tris·HCl 缓冲液 (pH 8.25) 中含 16% PEG8000 的沉淀剂溶液混合后,对 1ml 沉淀剂溶液进行悬滴蒸汽扩散法实验,几天后可得到大量约 0.01mm 的微小单晶。从悬滴中取几微升含此种微晶的溶液,不经清洗直接注入含 5mg/ml 蛋白, 14% PEG8000 的 50mmol/L Tris·HCl (pH 8.25) 的接种液中进行第一次接种,2—3 天后可得到尺寸约为 0.1mm 左右的小晶体。再取此晶体作为晶种,用不含蛋白的 13% 和 13.5% PEG8000 的缓冲液先后清洗数次后,小心地转入接种液进行第二次接种,此接种液除 PEG8000 为 13.5% 以外,其余组分与第一次接种液相同。每个玻璃槽中注入 30 μl 接种液,种入 1 至 2 个晶种,2—3 个星期后即能得到最大边长为 0.4—0.9mm 的棱柱状晶体。所得晶体用面探测器收集衍射数据,并进行了结构解析(另文发表)。

2.2 细菌 W3A1 的甲醇脱氢酶^[5] 用于生长晶体的蛋白溶液为含 10mg/ml 蛋白, 10mmol/L 甲醇的 pH 6.8 的 5mmol/L 磷酸盐缓冲液。该溶液与沉淀剂直接混合,混合液最终含 2.5mg/ml 蛋白、13% PEG8000、50mmol/L Tris·HCl (pH 8.25), 1—2 天后即可得到最大约 0.05—0.1mm 的小晶体。此晶体用不含蛋白的 12% PEG8000 的 50mmol/L Tris·HCl (pH 8.25) 溶液清洗数次后,取 1—2 个晶种种入约 50 μl 接种液中,接种液含 2.5mg/ml 蛋白,其余组分同清洗液,几星期后即可得到 0.3mm × 0.2mm × 0.2mm 或 0.4mm × 0.4mm × 0.1mm 的晶体。

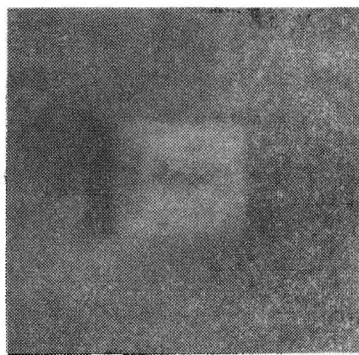


图 3 从细菌 W3A1 提取的甲醇脱氢酶的晶体

参 考 文 献

- 1 Thaller C, Eichele L H, Wilson W E *et al. Methods in Enzymology*, Orlando Florida: Academic Press Inc. 1985; 114: 132—135
- 2 Zeng J, Fenna R E. *J Mol Biol*, 1989; 210(3): 681
- 3 Shaanan B, Shoham M, Yonath A *et al. J Mol Biol*. 1984; 174(4): 723
- 4 Lim L W, Xia Z X, Mathews F S. *J Mol Biol*, 1986; 191: 141
- 5 Xia Z X, Hao Z P, Mathews F S *et al. FEBS Letters*, 1989; 258(1): 175