

tory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract A tRNA-directed transcription antitermination mechanism is common in Gram-positive bacteria, regulating the expression of aminoacyl-tRNA synthetase and amino acid biosynthesis genes. When the level of an amino acid decreases, the cognate uncharged-tRNA accumulates. Uncharged-tRNA stimulates the conformation of mRNA leader region to change

from a terminator structure to an antiterminator structure by interaction of two sites: the anticodon and 3' acceptor end of tRNA interact with the specifier sequence and the T-box in mRNA leader, respectively. This procedure promotes the readthrough and the expression of the relative genes.

Key words transcription antitermination, aminoacyl-tRNA synthetase, amino acid biosynthesis, Gram-positive bacteria, gene regulation

蛋白质晶体的优化生长

舒占永 毕汝昌¹⁾

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 蛋白质晶体的优化生长是获得高质量蛋白质晶体, 进而得到高精度晶体结构的有效途径。针对不同的晶体生长方法, 已尝试了不同的优化手段, 这对改善某些蛋白质晶体的质量显示了明显的成效。然而, 鉴于蛋白质晶体生长的多样性与复杂性, 这些方面均未发展成为实用的技术。文章综述了这类研究进展, 分析了各手段的利弊, 并指出了应着重解决的问题。

关键词 蛋白质晶体, 优化生长, 汽相扩散, 温度控制

要获得高分辨率的蛋白质晶体结构, 首先必须生长出高质量的蛋白质晶体。对于常规使用的晶体生长方法, 在很多情况下, 蛋白质晶体的尺寸和衍射能力均难以有较大程度的提高。其中原因之一, 就是因为传统的晶体生长过程中, 一旦开始在某一条件下的晶体生长, 则在晶体生长的全过程中不再人为改变生长的条件, 因而导致的最终结果主要取决于开始设定的生长条件。然而, 不少实验已经证明, 如能在晶体生长的过程中, 根据蛋白质晶体生长的一般规律和具体特性, 适时调节生长条件, 有可能达到不同程度地改善晶体质量的目的, 这样的工作通常被称为晶体生长的优化。作为一种动态调节手段, 无论是在重力条

件下的实验室, 还是在微重力条件下的航天器上, 这类研究都有着广阔的应用前景。

蛋白质晶体生长是一个复杂的物理化学过程, 晶体的质量会受到多种因素的影响。不同的生长方法, 或同一生长方法中不同的生长条件都会直接影响到晶体的生长过程。晶体生长是按照它自身的规律进行的, 不同的生长方法或条件间的区别就在于造成蛋白质溶液过饱和和动力学的异同; 在生长过程中, 控制蛋白质溶液在空间上和时间上形成的过饱和状态是可以有效地改善晶体质量的。尽管晶体生长过程异常复杂, 这种控制是可以通过人为地调节生长

¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1996-07-16, 修回日期: 1996-11-27

过程中的具体参数来进行的。

自 80 年代以来, 人们就开始了蛋白质的晶体生长过程进行优化调控的尝试^[1]。这期间, 人们通过不同技术手段, 如控制汽相扩散过程中水的扩散速率, 或采用局部降温方法, 分别获得了质量明显提高的蛋白质晶体。从 90 年代以来, 我们重点从事了微重力下的蛋白质晶体生长实验^[2], 为了在我国系统地开展蛋白质晶体生长的优化研究工作, 全面地了解这方面的研究进展是必要的。

1 原理性研究

对于晶体生长的优化, 一般主要分为两个阶段, 其一为成核阶段, 其二为成核后的晶体生长阶段, 同时这两个阶段又是紧密关联的。

对于成核阶段, 人们所期望的主要是控制成核的数目, 因为较少的晶体数目意味着可以在体积和浓度有限的蛋白质溶液中获得相对大的蛋白质晶体。

蛋白质晶体生长状况取决于溶液过饱和和动力学。常用于产生过饱和的方法有温度梯度法和汽相扩散方法等。对于温度梯度方法, 饱和度的调节要靠溶液中不同部位的温度调节来实现; 对于汽相扩散的晶体生长, 饱和度的变化又取决于溶剂水的蒸发与扩散过程。

针对悬滴法晶体生长, Mikol 等^[3]考察了内外液中的沉淀剂浓度比、生长温度、悬滴的形状和悬滴与外液表面的距离等对水扩散过程的影响。结果表明, 决定水扩散动力学的主要因素是温度、沉淀剂性质及在内外液中的浓度比, 以及液滴的初始表面积与体积, 而悬滴与外液间的距离对水扩散无明显影响。

舒占永等^[4]首次通过适时重量监测法, 研究了汽相扩散方法中生长条件对水扩散的影响, 得到了一些新的结果。除肯定了内外液沉淀剂浓度差、初始液滴表面积及形状、蛋白质浓度对水扩散的影响外, 还观察到了外液表面积对水扩散的明显影响, 特别是当外液表面积减小到小于液滴的初始表面积后, 这一影响就更为明显。

Lober 等^[5]研究了压力对蛋白质的成核及生长的影响, 发现当压力从 0.101 MPa 升到 250 MPa 后, 蛋白质的溶解度明显增加, 晶体的尺寸和数目减少。较高压力下生长的晶体能提高对 X 射线的衍射分辨率, 而且与常压下生长的晶体相比, 具有相同的空间群和晶胞参数。Yoshihisa 等^[6]也通过在位观测获得了溶菌酶溶解度的压力依赖关系。

Otalora 等^[7]详细研究了晶体的质量 (X 射线衍射能力) 与生长速度之间的关系。他们首先在毛细管中生长出横向充满整个毛细管的溶菌酶晶体 (1.4 mm 长, 0.5 mm 直径), 然后将这一充满蛋白质溶液和晶体的毛细管垂直插在沉淀剂溶液中, 继续进行生长, 结果导致上端的生长速率比下端的小一个量级左右。晶体生长后, 使用同步辐射 X 射线衍射分析测量的结果表明, 对应于较快生长速率的下端的分辨率在 0.18~ 0.20 nm 范围, 而晶体的中间和上端的分辨率约为 0.12 nm。这说明, 在相同条件下, 较慢的生长速率有利于提高晶体的质量。

2 已尝试的实验技术

2.1 温控方法

蛋白质晶体的晶核是在蛋白质浓度达到临界过饱和条件下, 在分子有序聚合达到一临界尺寸后形成的^[8,9], 而且成核所需的过饱和度要比随后的晶体生长所需的过饱和度高很多^[10]。成核过程优化的重点是减少成核的数目。

DeMattei 和 Feigelson^[11]通过控温手段实现了在蛋白质溶液中的一个小区域首先降温而促成少量晶核的形成。他们通过区域降温法, 在 1 cm³ 的蛋白质溶液中首先使约 0.4 mm³ 的区域出现晶核, 然后再通过调控温度实现晶体生长。

Rosenberger 等^[12]设计了一个精巧的温控晶体生长装置, 如图 1 所示。实验装置集中在一个保温容器内, 蛋白质溶液密封在毛细管中, 一精巧的电热控温头与毛细管的某一部位接

触,以便通过降温使该区域(冷点附近)的溶液首先形成晶核.冷点温度的调控范围为 $(8 \pm 0.1) \sim (50 \pm 0.1)^\circ\text{C}$.比如,开始生长后冷点的温度设置在 7°C (保温容器内温度为 32°C),在观察到第一个微晶出现以后,马上升高冷点温度至 19°C ,以使晶体发育长大.Rosenberger 等还针对成核的数目进行了分析.在冷点温度偏低时,晶核的数目就会较多,因而冷点的温度不宜过低,以控制成核数目在1~3个之内.

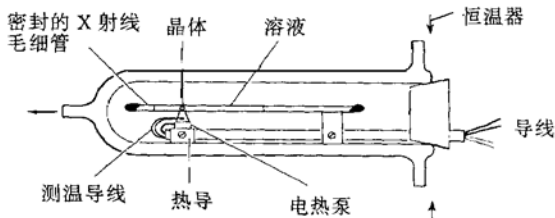


图1 在毛细管内,进行温控蛋白质晶体生长的装置的截面示意图

理论上,生核后冷点区域的温度应马上升高以降低溶液的过饱和度,避免晶体的过快生长并形成缺陷;同时,冷点外的蛋白质溶液的温度下调也应配合进行.很显然,温度的调节状况取决于具体的生长条件,如溶液的总容积、容器的形状和冷点所在的位置等.

此外,Heinrichs 等^[13]尝试了温控蛋白质晶体生长的新方法,在这一实验中,蛋白质溶液源与晶体生长位置是分开的,自动控制使溶液循环进入生长室,并用温度变化建立起周期性变化的溶解度梯度,进而实现温控晶体生长;通过周期性地将结晶与溶解两个过程结合起来,发育长大的晶体表面被反复地清洁处理.

2.2 汽相扩散方法

2.2.1 调节外液的盐(沉淀剂)浓度:

a. 双结晶室法: Przybylska^[14]介绍了加拿大的研究机构已经使用了几年的实验方法.他们使用连通的双结晶室控制蛋白质晶体的成核及生长,其中一结晶室用来放置悬滴或坐滴蛋白质样品并实现汽相扩散,外液相连通的另一

结晶室则用来适时改变外液的盐浓度.这种实验完全是在手动操作下进行的.很显然,该方法需要操作者具有一定的经验,对于成核后的调节,只是将外液稀释到一较低的盐浓度,并没有进行连续的调节,因而外液浓度是阶梯变化的.

b. 多孔玻璃法: Gernert 等^[3]为了控制蛋白质晶体的成核及生长,设计了一种带多孔玻璃的简单结晶室.该装置的设计意图是通过极其缓慢地调节吸附于多孔玻璃中的外液的盐浓度(开始时与蛋白质液滴的盐浓度相同),在较长的时间内缓慢地造成液滴和外液间的盐浓度差,从而控制悬滴溶液达扩散平衡态的时间.多孔玻璃中外液盐浓度的变化曲线如图2所示.与常用的 Linbro 盒结晶室(平衡时间为30~46 h)相比,悬滴达平衡的时间延长到96~144 h,相对应的平均成核数目可从约200~300个减少为几个或十几个,得到的晶体的尺寸则从平均的0.2~0.3 mm 增加到平均的0.5~0.9 mm.

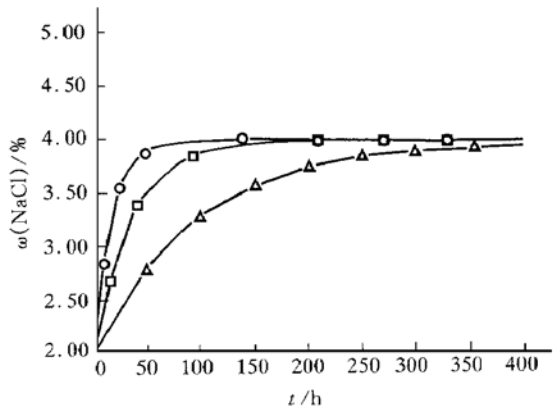


图2 多孔玻璃中外液盐浓度变化的时间曲线
○—○: 6 ml/h; □—□: 3 ml/h; △—△: 1 ml/h.

Gernert 优化方法的一大特征体现在外液盐浓度从与内液的盐浓度相同开始,以极其缓慢的速度增加(约50~400 h达最大值),从而使得内外液间的盐浓度差从0开始逐渐缓慢增加,而不是像通常做晶体生长实验时,外液自始至终保持一个盐浓度,且该盐浓度就是

Gernert 实验中的最大盐浓度。

c. 蠕动泵式程序调控盐浓度：为了随时获得所需要的外液盐浓度，Smith 和 Delucas^[15] 设计了一种可程序控制的外液调节系统，主体为可调节外液盐浓度的电压控制蠕动泵。该系统能够按事先设计的盐浓度时间曲线进行控制，并且结果得到的实际盐浓度时间曲线与设计的曲线吻合较好。

2.2.2 直接控制水的扩散速率：

在汽相扩散晶体生长方法中，直接影响成核数目及生长过程的主要是蛋白质溶液中溶剂水的扩散过程，因而只要能够使水的扩散过程得到相应的控制，不使用外液是可以的。

氮气携带法：Wilson 和 Suddath^[16] 采用了一种全新的方法来控制蛋白质溶液中溶剂水的扩散。该方法的特点是不使用外液，而是使氮气缓慢地从蛋白质液滴的表面区域通过，因而能够将蒸发出来的水汽携带走。至于携带的快慢则通过氮气流量的自动控制来实现。水的扩散速率是通过一热导仪对流出的气流进行检测分析得到的，同时也使用一传导单元测量液滴的溶质浓度继而计算得到扩散速率，两种监测方法可以相互对比。另外，装置还采用湿度计测量结晶室内的湿度状况。通过热导仪获得的水扩散信息用来实现对氮气流流量的闭环控制。

Wilson 等的方法实现了对水扩散速率的闭环控制，因而属于在计算机监控下运行的自动化装置。实验考察了以不同的扩散时间曲线向平衡态接近时，对晶体的成核和生长的影响情况。如图 3 所示，在线性的蒸发曲线条件下获得了较好的优化效果，晶体的数目由通常 Linbro 盒生长法时的 4~ 5 个减少为 1 个，晶体表面积则增大了近 50%。Wilson 等^[10] 又考察了在线性扩散时间曲线条件下，不同的扩散速率对结晶的影响。在选定的条件下，通常的 Linbro 盒生长方法的平均水扩散速率为 0.20 $\mu\text{l/h}$ ，而优化结晶装置的平均水扩散速率被控制在 0.1、0.025 和 0.0125 $\mu\text{l/h}$ 几个条件下，实验结果表明，扩散速率越小，晶体的数

目越少，晶体的表面积越大。

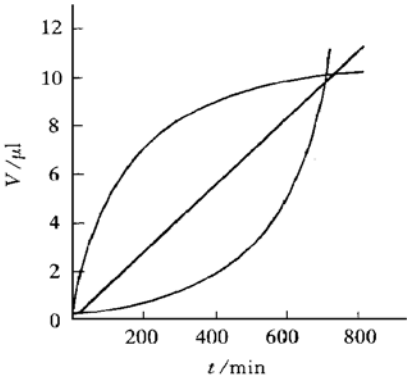


图 3 由热导仪测量得到的三条水扩散时间曲线

开始条件：0.05 mol/L NaCl；液滴体积为 20 μl 。纵坐标为通过探测器的水汽的体积。

2.3 凝胶技术

人们在温控和汽相扩散两种晶体生长方法中，都尝试采用了凝胶生长技术。

凝胶生长法可视为溶液生长方法中的特殊情况，许多常用的蛋白质晶体生长技术都可以在凝胶介质中实现。Robert 和 Lefaucheur^[17] 首先系统研究了这一方法，并激起了人们对它的兴趣。使用凝胶技术，蛋白质溶液被束缚在多孔的网络中，对流被消除且不产生沉淀。

Robert 等^[18] 对比研究了凝胶束缚溶液和自由溶液的温控成核行为，结果表明，使用凝胶介质可以防止蛋白质溶液形成沉淀。不过对于琼脂糖这样的物理凝胶和硅胶这样的化学凝胶，对成核的影响有很大不同，前者增大成核速度，后者则减慢成核速度。与微重力条件下的自由溶液相似，凝胶生长的沉淀效应将大大减小，结晶物质更加均匀和各向同性。此外，Bernard 等^[19] 使用了一种循环操作技术，进行了悬滴法的凝胶晶体生长实验。

3 问题与展望

前面介绍的晶体生长优化方法主要是建立在温度梯度和汽相扩散方法基础之上，应用的

具体优化手段各有特色,不同的方法所得到的效果也有很大差异.

在温度梯度方法中,局部区域首先降温可以有效控制成核的数目和空间位置,这一点显然是汽相扩散方法难以实现的;该方法直接调控蛋白质溶液不同区域的温度,改变其过饱和度,也可以达到较高的控制精度,但实验者需对具体蛋白质溶解度的温度依赖关系有较清楚的了解,并且需初步估算出溶液中不同位置或界面层的温度,才能按优化路线适时地进行调控,因而相对难以实现自动化控制.

在汽相扩散方法中,使用诸如外液沉淀剂浓度调节或氮气携带等手段来实现优化调控,归根结底,都是为了调节蛋白质液滴中水的扩散过程,进而达到控制成核数目和晶体质量的目的. Wilson 等^[16]的研究结果表明,在不同水的扩散时间曲线中,采用直线型的扩散曲线进行生长可以获得较理想的优化效果,而且,在均一的水扩散条件下,较小的扩散速率对应于较好的晶体质量. 另外, Wilson 等未将生核过程与晶体生长过程分开来加以调控,而是自始至终以扩散时间曲线为对象进行调节的. 与温度梯度方法相比,汽相扩散在确定晶核生成的空间位置上缺少灵活性.

由于蛋白质的种类较多,不同蛋白质晶体的生长条件相差较大,因而对于具体某一种蛋白质,最佳的水扩散曲线有待于从理论和实验两方面进行分析才能获得. 另一方面,为避免蛋白质的失活,以及考虑应用于有严格时间限制的航天研究,不宜过于延长晶体的生长时间,因而选择合适的水扩散速率是十分必要的.

综上所述,蛋白质晶体优化生长所面临的主要问题大致为: a. 各种蛋白质溶液的溶解度相图信息不足; b. 成核过程监测困难,控制晶核的数目仍是重点; c. 由于用于结晶的蛋白质溶液的体积小,准确定量分析和精确控制平衡速率难度较大; d. 由于蛋白质的种类较多,相应的优化生长方法及途径具有多样性. 这些问题都亟待解决.

目前,我们实验室已经系统地开始了蛋白质晶体生长的优化研究工作,并通过高精度重量监测方法与特殊设计的结晶室相结合,实现了对液滴平衡过程的准确监测;通过外液调控进行了系列优化生长实验,均获得了较理想的优化效果(待发表).

为获得理想的优化效果,优化调控系统应尽可能实现自动控制. 相比之下,汽相扩散法中的优化过程比较容易实现自动化控制. 所以在开发新一代的晶体生长优化装置时,应侧重于这一类方法. 对于具体的硬件配置,也应着重考虑研究和应用推广相结合的原则.

参 考 文 献

- 1 Gernert K M, Smith R, Carter D C. A simple apparatus for controlling nucleation and size in protein crystal growth. *Analytical Biochemistry*, 1988, **168**: 141~ 147
- 2 毕汝昌. 用国产装置进行的空间蛋白质结晶实验. *空间科学学报*, 1996, **16** (3): 208~ 215
- 3 Mikol V, Rodeau J L, Giege R. Experimental Determination of water equilibration rates in the hanging drop method of protein crystallization. *Analytical Biochemistry*, 1990, **186**: 332~ 339
- 4 舒占永, 王耀萍, 毕汝昌. 汽相扩散蛋白质晶体生长的优化研究. *生物物理学报*, 1997, **13** (2): 161~ 166
- 5 Lober B, Jenner G, Giege R. Effect of high hydrostatic pressure on nucleation and growth of protein crystals. In Tamaichi A eds. *The six international conference on crystallization of biological macromolecules Japan: Hiroshima*, 1995. 84
- 6 Yoshihisa Suzuki. Pressure dependence of the solubility of hen egg white lysozyme measured by *in situ* observation. *Japan: Hiroshima*, 1995. 55
- 7 Otalora F, Moreno A, Garcia-Ruiz J M. Crystal quality of lysozyme single crystals as a function of the growth rate. In: Tamaichi A eds. *The six international conference on crystallization of biological macromolecules Japan: Hiroshima*, 1995. 123
- 8 Feher G. Mechanisms of nucleation and growth of protein crystals. *J Cryst Growth*, 1986, **76**: 545~ 546
- 9 Rosenberger F. Inorganic and protein crystal growth - similarities and differences. *J Cryst Growth*, 1986, **76**: 618 ~ 636
- 10 Wilson L J, Suddath F L. Control of solvent evaporation in hen egg white lysozyme crystallization. *J Cryst Growth*, 1992, **116**: 414~ 420
- 11 DeMattei R C, Feigelson R S. Controlling nucleation in protein solutions. *J Cryst Growth*, 1992, **122**: 21~ 30
- 12 Rosenberger F, Howard S B, Sowers J W *et al.* Temperature dependence of protein solubility-determination and application to crystallization in X-ray capillaries. *J Cryst Growth*,

1993, **129**: 1~ 32

13 Heinrichs W, Heinrichs M, Schonert H. Growth of protein single crystals in a periodically changing solubility gradient. *J Cryst Growth*, 1992, **122**: 186~ 193

14 Przybylska M. A double cell for controlling nucleation and growth of protein crystals. *J Appl Cryst*, 1989, **22**: 115~ 118

15 Smith H W, Delucas L J. A method for programmable control of reservoir concentrations for protein crystal growth. *J Cryst Growth*, 1991, **110**: 137~ 141

16 Wilson L J, Bray T L, Suddath F L. Crystallization of proteins by dynamic control of evaporation. *J Cryst Growth*, 1991, **110**: 142~ 147

17 Robert M C, Lefaucheux F. Crystal growth gels: principle and applications. *J Cryst Growth*, 1988, **90**: 358~ 367

18 Robert M C, Bernard Y, Lefaucheux F. Study of nucleation-related phenomena in lysozyme solutions, Application to gel growth. *Acta Cryst*, 1994, **D50**: 496~ 503

19 Bernard Y, Degoy S, Lefaucheux F *et al*. A gel-mediated feeding technique for protein crystal growth from hanging drops. *Acta Cryst*, 1994, **D50**: 504~ 507

Optimizing Protein Crystallization. SHU Zhanyong, BI Ruchang (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Optimization of protein crystallization is going to be an important method to obtain protein crystals in high quality. Regarding different crystallization methods, some optimization techniques were attempted and found effective to some extent. However, due to the variety and complexity of protein crystallization, these techniques have not been used in practice. These attempts are introduced and some problems are discussed.

Key words protein crystallization, optimized growth, vapor diffusion, temperature control

谷胱甘肽硫转移酶基因表达的调控*

庞战军 陈 瑗 周 玫

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

摘要 催化内源性或外源性亲电子化合物与谷胱甘肽 (GSH) 结合的谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 超基因家族是一族解毒功能蛋白. 其基因的表达通过不同的机制受多种物质的调控. 根据最近文献资料, 对调控谷胱甘肽硫转移酶基因表达的基因结构、调控机制及氧化应激对谷胱甘肽硫转移酶基因表达的调控作用等作一简要综述.

关键词 谷胱甘肽硫转移酶, 基因调控, 氧化应激, 活性氧

自然界中的各种生物, 为避免受到内源性或外源性化学物质, 尤其是毒性物质的损害, 在进化过程中形成了一套代谢此类物质的解毒酶系统^[1]. 谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione S-transferase) 同工酶族是该酶系统的重要组成部分, 主要催化各种化学物质及其代谢产物与谷胱甘肽 (GSH) 巯基的共价结合. 此类化学物质包括药物、化疗剂、已知的多种致癌物, 以及氧化应激引起脂质过氧化损伤产生的各种毒性代谢产物 (如羟烯醛等)^[2,3]. GST 的催化反应特性, 决定了其在防止脂质过氧化损伤扩大、抵御及修复 DNA 损伤以降低肿瘤发生

机会^[4], 以及癌细胞对抗癌药物耐药性形成^[2]等方面的重要作用. 本文将对近年来在 GST 基因表达调控方面的研究进展进行综述.

从成功构建与编码 Ya 和 Yc 亚基的 mRNA 互补的 cDNA 被克隆以来, 随着分子生物学技术的应用, 已清楚地认识到 GST 多基因家族的复杂性^[3], GST 同工酶族是一个超基因家族. 综合考虑各种 GST 同工酶的底物特异性、免疫学反应特性及蛋白质和 DNA 的

* 国家自然科学基金资助项目 (39670197).
收稿日期: 1996-07-15, 修回日期: 1996-10-27