

蛋白质晶体培养方法的新进展

华 子 千

(北京大学生物系)

提 要

本文总结了最近以来国外在蛋白质晶体培养方面应用薄层凝胶等电聚焦电泳消除蛋白质样品的微观不均一性,改善晶体质量;在培养蛋白质晶体的溶液中加入适量的洗涤剂, β -辛基葡萄糖苷改善和改变水溶性蛋白质晶体生长的特性;采用聚乙二醇/洗涤剂,或者硫酸铵/洗涤剂体系培养膜蛋白晶体等新方法。

随着分子生物学的迅速发展,结构研究的不同领域都取得了新的进展,但是蛋白质结晶学仍然是在原子水平上测定空间结构的唯一方法。众所皆知,结晶学要求得到适合于X射线结构分析的晶体。因此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方法,并取得了很大进展,今天在某些课题已经可能按照生物学的需要,通过各种方法培养出适合于X射线分析的蛋白质晶体,正在不断地改变那种有什么晶体就分析什么晶体的状态。但是随着分子生物学的不断发展,日益增多的、重大的结晶学问题需要结晶学家去解决。而这些问题的解决,必须依赖于特定蛋白质的高分辨率的晶体结构分析,然而往往由于培养不出适合于X射线分析的晶体而使工作受阻,甚至无法进行。为解决这方面的问题,结晶学家一方面根据影响晶体生长的诸因素(pH、温度、离子强度、有机溶剂、蛋白质浓度等)以及晶体培养成功的经验发展系统的方法,另一方面针对培养蛋白质晶体实验中提出的问题,不断探索新的方法。

沿着第一方面 Mcpherson 等^[1,2]总结 1976 年以前培养蛋白质晶体成功的经验,发展了培养晶体的各种方法。以后 Mcpherson^[3]又通过系统实验证明了聚乙二醇 (Polyethylene glycol

简称 PEG) 在培养蛋白质晶体中用作沉淀剂的优点。1979 年 Carter 等^[4]为解决那些时间紧和样品少的晶体结构分析问题,采用优选法选择最佳条件,进行晶体培养实验。1978 年 Kam 等^[5]为研究生物大分子结晶过程,从而影响和控制晶体的生长,应用光散射方法观察和预示蛋白质分子将聚合成晶体,还是聚合成无定形沉淀等等。

沿着第二方面,本文根据最近的一些文献归纳成三个主要方面。

1. 利用薄层凝胶等电聚焦电泳、消除蛋白质样品的微观不均一性 (Microheterogeneity), 增加同质性, 提高晶体质量

蛋白质结晶是依赖于特殊的弱的分子间的相互吸引作用,使成千上万的分子排列成三维的有序结构。而这种作用只有当蛋白质分子的表面相互保持特殊的接触时才能产生,一旦异质在相互作用的表面或附近出现,晶体就会在那里停止生长,或者引起一系列晶体格子的破坏。这种异质一方面来源于异种大分子的污染,所以消除这种污染是蛋白质结晶成功的重要因素,已为人们普遍所注意。另一方面来源于微观不均一性,所谓微观不均一性是指多肽链序列本身的变化和不完整性,或者是不规则的水解,以及蛋白质转译后修饰不完全,例如糖类的

共价结合、磷酸化、甲基化,以及配基的成分亦可能不均一。这些微观不均一性在蛋白质分离过程中,仅仅通过生物化学活性的监测通常是不能发现的,就是使用凝胶过滤和SDS(Sodium dodecyl sulfate)凝胶电泳亦是很难检测出来,而等电聚焦电泳是最敏感而又无破坏性的分离技术之一,它能分辨同一种蛋白质的不同变异体在等电点上的微小差异($pI0.01-0.0025pH$ 单位)。

1982年Bott^[6]利用薄层凝胶等电聚焦电泳,来减少或者消除已观察到的三种不同蛋白质的异质性,极大地改善了每种晶体的大小和质量,明显地提高了衍射数据的质量。三聚体蚯蚓血红蛋白(trimer hemerythrin),一个无脊椎动物的氧运输蛋白,由于晶核太多,很容易生成簇状而培养不出适合于X射线分析的单晶。通过等电聚焦电泳纯化,在同样条件下培养出了 $0.1 \times 0.2 \times 0.5mm$ 大小的晶体,并由该晶体解出 $5.5 \text{ \AA}$ 分辨率的晶体结构。羧基蛋白水解酶(Carboxyl Proteinase)在市售商品中已知有两种同工酶。没有纯化前可培养出边长为 $0.6mm$ 的立方晶体,但是在超过 $2 \text{ \AA}$ 分辨率时,强度太弱,以及在X射线照射下寿命太短,限制了高分辨率的结构分析。通过等电聚焦电泳,分离出两个组分,由一个组分获得了晶体,晶体明显增大,最长方向超过 $1mm$,X射线照射寿命明显增长,强度数据由 $2.0 \text{ \AA}$ 提高到 $1.8 \text{ \AA}$ 。J539的Fab片段,一个耗子骨髓瘤免疫球蛋白,偶尔可得到足够大的晶体。可收集到 $2.5 \text{ \AA}$ 分辨率的衍射数据,但是由于很难重复,实际上不可能收集到 $2.5 \text{ \AA}$ 分辨率的强度数据。通过纯化,得到四个组分的晶体,其中之一是相当好的。

实验表明,薄层凝胶等电聚焦对于减少蛋白质的微观不均一性从而改善晶体质量是一个方便和广泛适用的方法,但是亦存在一定限制,实验必须在低离子强度($<100mmol/L$)下进行,以及不适用于具有极端等电点($pI < 3.0$, $pI > 9.5$)的蛋白质。

2. 用中性洗涤剂减少蛋白质分子间的非特

殊的相互作用,改善或改变蛋白质晶体的特性

用中性洗涤剂减少蛋白质分子间的非特殊的增水相互作用,促进静电相互作用而达到改善或改变晶体质量是蛋白质晶体培养方法的新尝试。Mcpherson^[7]根据培养蛋白质晶体所需时间一般在几个星期甚至几个月,以及蛋白质浓度很高(一般 $10-50mg/ml$),在这样条件下,蛋白质分子一方面可能产生晶态聚合,而另一方面可能产生非晶态的聚合,形成蛋白质的微观不均一性,阻碍某些蛋白质晶体的生长。在某些情况下,适当提高蛋白质溶液的离子强度,增强蛋白质分子间的排斥作用,减少不同状态的聚合作用,能够限制微观不均一性的形成,但是在大多数情况下不可能限制微观不均一性的形成。从而提出一个设想:对于多数蛋白质分子的聚合是由微小的分子间的憎水接触来调节的。如果是这样,那末减少这种分子间的非特殊的,没有严格的几何张力的憎水相互作用,离子和静电的相互作用就可能占主导地位,或者至少得到增强。离子和静电间的相互作用的加强就要求蛋白质分子间的电荷在空间有一个非常特定的排列,在分子间形成一个互补的相交面。当蛋白质结晶时这种互补关系必定出现,因此设法减少非特殊的憎水相互作用,促进静电的相互作用,无疑会促进某些蛋白质的结晶,改善或者改变蛋白质晶体的特性。

上面所提出的设想,有些类似于某些膜蛋白的结晶,详见下文。

1985年Mcpherson等人用21种水溶性蛋白质,5种转移RNA以及3种蛋白质核酸复合物进行对比的结晶试验,观察中性洗涤剂对水溶性蛋白质结晶的影响。每个样品都采用微量蒸发扩散方法培养晶体,在悬滴中洗涤剂(β -辛基葡萄糖苷)的浓度分别为0,0.125%,0.50%和0.75%,与储液平衡后的洗涤剂浓度分别为0,0.25%,1.00%和1.50%。每个微滴为20微升,其中包括蛋白质溶液(浓度从 $6mg/ml$ 到 $50mg/ml$) $5\mu l$,洗涤剂溶液 $5\mu l$ 以及沉淀剂 $10\mu l$,沉淀剂浓度分别为5%,9%,14%和20%的PEG 4000,或者用40%,45%,

50%, 60% 和 70% 的饱和硫酸铵。每个试验在 7 个月内用解剖镜观察晶体生长的结果。

实验结果表明, 在培养晶体的蛋白质溶液中加入一定量的洗涤剂(β -辛基葡萄糖苷)不会抑制蛋白质晶体的生长。在全部试验中, 以前曾经用 PEG 作沉淀剂培养出晶体的样品, 在加入洗涤剂后都重复培养出了晶体。实验还进一步表明, 蛋白质在加入洗涤剂的溶液中结晶不会导致明显的无序性。而且结晶的成功率和重复性提高, 晶体生长更大。例如 20 个胰 α -淀粉酶的平衡实验中, 加 β -辛基葡萄糖苷的样品中有 18 个长出晶体, 其中 14 个样品的晶体大于 0.2 mm, 而没有加洗涤剂的样品中仅有 8 个样品长出晶体, 其中 5 个样品晶体大于 0.2mm。两者结晶成功率之比是 70% 对 25%。另外在加入洗涤剂的样品中, 晶体生长成簇或者生长成大量小晶体的现象明显减少, 例如 30 个伴刀豆球蛋白 (Concanavalin B) 的平衡实验中, 加入 β -辛基葡萄糖苷的样品中有 8 个样品晶体生长成簇, 或者出现大量小晶体, 而不加洗涤剂的样品中有 22 个出现生长成簇或者出现大量小晶体, 两者成功率之比是 73% 对 27%。在培养晶体成功的样品中晶体的平均大小亦是加洗涤剂的大于不加洗涤剂的, 加洗涤剂的是 0.45mm, 而不加的是 0.22mm。更重要的是在结晶样品中加入适当浓度的 β -辛基葡萄糖苷能改善较差晶体的特性, 而获得新的晶形, 以及使得以前不能结晶的样品有可能结晶。在实验中有四个样品, 基因 5DNA 解链蛋白、核糖核酸酶 A 和 B, 枯草杆菌 α -淀粉酶获得了新的晶形, 其中基因 5DNA 解链蛋白和枯草杆菌 α -淀粉酶的新晶形有更重要的意义。因为枯草杆菌 α -淀粉酶由于总是生长成针状的晶体而从未得到过适合于 X 射线分析的晶体, 而现在重复获得了适合于 X 射线分析的晶体, 基因 5DNA 解链蛋白的新晶形具有更高的水合物。可能在晶体内与脱氧低聚核苷酸形成复合物, 克服了以前单斜晶形密度太高在晶体内不可能形成复合物的困难。

实验结果虽然不能确切地证明晶体生长特性的改善和改变是由于加入 β -辛基葡萄糖苷

消除或者减少了微聚合状态, 但是实验结果是与开始提出的推论相一致的。

3. 膜蛋白的结晶

膜蛋白的结晶, 经过长期的努力, 现在已培养出了适合于 X 射线高分辨率结构分析的晶体。

大多数生物膜是由不导电的脂类双分子层和嵌在双分子层内的膜蛋白组成。嵌合膜蛋白在与层内脂类的烷烃链相接触的表面具有高度的憎水性, 而暴露在膜两边水溶液内的表面具有亲水性。由于膜蛋白分子具有很大的憎水和亲水的表面而使它不溶于缓冲水溶液中, 从而纯化和结晶相当困难, 因此膜蛋白的结晶长期以来都没有成功。有时只能采用蛋白水解酶把膜蛋白的憎水部分和亲水部分分开, 然后培养晶体。这样对于大多数嵌合膜蛋白来说, 一方面破坏了整个结构的完整性, 另一方面要水解成水溶性和水不溶性的两部分是不可能的。因而长期以来由于缺乏高分辨率的晶体结构分析资料, 就不可能深入了解有关生物膜的重要生物功能与结构之间的关系。

1980 年 Michel 等^[8]采用硫酸铵加洗涤剂体系, Garavito 等^[9]采用 PEG 4000 加洗涤剂体系成功地获得了两种膜蛋白的晶体, 细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin)和 Porin 晶体, 1982 年 Michel^[10]又采用硫酸铵加洗涤剂, N,N-十二烷二甲基胺 N-氧化物 (N, N-dodecyl dimethylamine N-oxide) 和 1, 2, 3-庚三醇 (heptane 1, 2, 3-triol) 亲水脂分子体系成功地获得了 2.5 Å 以上分辨率的光合反应中心的晶体。这种膜蛋白是从光合细菌 Rhodospseudomonas Viridis 分离纯化得来的。晶体培养采用微量蒸发扩散方法, 蛋白质浓度 5mg/ml, 沉淀剂为 2—3mol/L 硫酸铵, 洗涤剂为 0.1% N,N-十二烷二甲基胺 N-氧化物, 分子大小和极性类似于 β -辛基葡萄糖苷, 以及 3%(W/V) 1, 2, 3-庚三醇。该膜蛋白的结晶只有在培养晶体的体系中加入像 1, 2, 3-庚三醇那样的小分子才能获得成功。

1984 年 Garavito 等^[11]在总结以往经验的

基础上,又采用 PEG 加 NaCl 和洗涤剂体系成功地获得外膜蛋白 Lam B 的晶体。Lam B 是用洗涤剂从 *E. coli* wll0 外膜中提取和纯化,储存在 0.1mol/L NaCl,20mmol/L 磷酸钠,3mmol/L NaN_3 , 1mmol/L 二硫苏糖醇 (dithiothreitol) 和 1% C_8 -POE (octyl polyoxyethylene), pH7, 蛋白质浓度为 20mg/ml 溶液中。晶体培养采用蒸发扩散方法,蛋白质浓度为 5mg/ml,沉淀剂为 3.6% (W/V) PEG4000,洗涤剂为 0.25% (W/V) C_8 -POE 和 0.25% (W/V) β -辛基葡萄糖苷,储液为 25.2% (W/V) PEG 4000, 0.7 mol/L NaCl, 0.14mol/L 磷酸钠以及 3mmol/L NaN_3 ,首先得到 8 Å 分辨率的晶体,随后用聚乙烯吡咯烷酮 (Polyvinylpyrrolidone) 10,000 代取 PEG 4000,得到分辨率为 4 Å 的晶体。

虽然膜蛋白的晶体培养工作仍然存在着困难,但是已经从成功的晶体培养工作中总结出一些规律^[12]。从已发表的膜蛋白的晶体培养程序同水溶性蛋白质的晶体培养程序相比较,两者无显著差别,不论采取哪一种体系,硫酸铵加洗涤剂或者 PEG 加洗涤剂,成功的关键在于选择合适的洗涤剂,一般采用非离子的,单分散性的洗涤剂,以及控制临界的胶粒浓度大小。洗涤剂是像脂类那样的亲脂水分子,在某一浓度下可形成一定大小的胶粒,与膜蛋白分子的憎水表面相互补偿,而使蛋白质分子间的极性相互作用加强,最后形成稳定的三维空间排列的晶体。

适合于 X 射线分析的某些膜蛋白晶体的培

养成功,使得详细地分析膜蛋白的结构成为可能,无疑将促进整个膜蛋白的晶体分析工作,从而不断地提供新的结构资料和进一步提高人们对球蛋白结构与功能关系的认识。

结束语

影响蛋白质晶体生长的因素很多,要通过每一因素的实验来寻找培养晶体的条件是相当困难的,及时总结国外在培养蛋白质晶体方面的新进展,提高我国培养蛋白质晶体的水平,无疑是相当重要的。随着我国蛋白质结晶学的迅速发展,晶体培养技术必将会有一个新的提高。

参 考 文 献

- [1] Mcpherson, A. Jr.: *Methods Biochem. Anal.*, 1976, **23**, 249.
- [2] Blundell, T. L.: *Protein Crystallography*, Academic Press, London, 1976, 59.
- [3] Mcpherson, A. Jr.: *J. Biol. Chem.*, 1976, **251**, 6300.
- [4] Carter, C. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 12219.
- [5] Kam, Z. et al.: *J. Mol. Biol.* 1978, **123**, 539.
- [6] Bot, R. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**(17), 9883.
- [7] Mcpherson, A. Jr. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**(4), 1969.
- [8] Michel, H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 1283.
- [9] Garavito, M. et al.: *J. cell Biol.*, 1980, **86**, 327.
- [10] Michel, H.: *J. Mol. Biol.* 1982, **158**, 567.
- [11] Garavito, R. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1984, **259** (7), 4254.
- [12] Michel, H.: *TIBS*, February, 1983, 56.
- [13] Doyle, M. J. et al.: *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 2355.
- [14] Eggers, H. M. et al.: *Clin. Chem.*, 1982, **28**, 1848.
- [15] Wehmeyer, K. R. et al.: *Clin. Chem.*, 1982, **28**, 1968.
- [16] Weber, S. G. and Purdy, W. C.: *Anal. Lett.*, 1979, **12**, 1.
- [17] Heineman, W. R. et al.: *Science*, 1979, **204**, 865.
- [18] 胡荫华、李庆满:《西北大学学报(自然科学版)》, 1986, **16**(1), 38.
- [19] Doyle, M. J. et al.: *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 2318.
- [20] Heineman, W. R. et al.: *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 1321A.

【本文于 1987 年 6 月 10 日收到】

【本文于 1987 年 7 月 4 日收到】