

为复杂成份的聚焦层析,显示了柱的高容量和分辨率。

五、方法的局限

和等电聚焦相似,待分离的样品必须尽可

能少盐。等电点附近样品的溶解度下降是这一技术使用的主要困难。

文中图、表均引自 *Chromatofocusing* (Pharmacia Fine Chemicals 出版)

生物大分子晶体结构中分子间接触点的计算

毕汝昌 林政炯 高义贵

(中国科学院生物物理研究所)

近年来在用 X 射线衍射法测生物大分子晶体结构方面的一个进展是用分子置换法解与已知结构相类似的结构^[1]。应用这个方法,首先要确定分子在晶胞中的取向,即求旋转参数。然后确定分子在晶胞中的位置,即求平移参数。经验表明,这第二步往往困难较大,所以相继发展了多种方法,如平移函数 (translation function)^[2], 偏离函数 (disagreement function)^[3] 和堆积函数 (packing function)^[4] 等。

堆积函数根据的简单原理是组成晶体的分子不应当相互穿插。由此可推测出大分子在晶体中的可能堆积方式。此函数成功地用于解蚯蚓血红蛋白 (hemerythrin) 的结构。和这方法类似有人通过寻求与晶胞中分子间原子的最少接触点数相适应的分子排列,来确定分子的可能位置。与偏离函数法相配合,成功地用这个方法确定了火鸡蛋白溶菌酶分子在其晶体中位置^[5]。实践中,常同时使用这几种方法以相互补充,使结果更加可靠。

在尝试用分子置换法测定去 B 链羧端五肽胰岛素结构的过程中^[6],我们独立地建立了一个计算分子间接触点数的程序,并用它来估计去 B 链羧端五肽胰岛素分子在晶胞中的可能位置。这个程序不仅可用来求分子置换法所需要的平移参数,还可用于了解已知晶体结构中分子之间原子相互作用的性质。我们用这个程序对三方二锌猪胰岛素晶体结构进行了计算,获

得了一些二聚体之间相互作用的有用的信息。

程序设计要点

程序的基本运算是求晶体中指定分子与其周围相邻分子的原子间距离 S 。若已知指定分子原子的坐标为 X , 则

$$S = |[T'] [T] X_i - [T'] X_j|$$

式中 $[T]$ 为晶体学中对称性变换矩阵,可以进一步分解为

$$[T] X_i = [R] X_i + d.$$

d 为平移向量, $[R]$ 为非平移部分的对称变换矩阵, $[T]$ 矩阵应考虑到所有可能的相邻分子。

$[T']$ 为晶体学坐标系变换到笛卡儿坐标系 (以埃为单位) 的坐标变换矩阵。

若 t 为表征分子位置的平移向量, 则用 $X_i + t$ 代替 X_i , 计算接触点距离并统计短距离接触点数, 就可以找出与最少接触点对应的 t 来。

上述计算比较简单, 但计算量较大。因为生物大分子是由成千上万个原子组成的。还因为晶胞中某个指定分子与晶胞中其它分子以及周围 26 个晶胞中所有分子都有可能发生近距离的接触。因此原则上要计算指定分子与 $27 \times N - 1$ 个分子之间的原子距离 (N 为晶胞中分子个数)。为了简化计算, 我们在程序或计算方案中采取了以下几个措施:

一、先确定第一分子壳层，然后只计算指定分子与第一分子壳层分子间的原子距离。设分子的最短和最长线度分别为 d_1 和 d_2 ，则与一个指定分子可能接触的分子的中心必定落在以指定分子的中心为球心，以 d_1 和 d_2 为半径的球壳（称为第一分子壳层）中。为此，要事先估计出分子的大小，确定近似的分子中心以及 d_1 和 d_2 参数值。 d_1 和 d_2 值的选择甚为重要。如果 d_1 过小，或 d_2 过大，虽对计算结果没有影响，但会增加计算时间。另一方面，若 d_1 取值太大或 d_2 取值太小，则会使结果不可靠。

二、只挑选部分原子进行计算。如只考虑分子表面的原子，略去分子内部的原子。又如为了得到初步结果，只计算 α -碳原子，而忽略其他原子等。

三、先用一个简化的分子模型粗略地找出分子位置的允许区，然后再局限在这些允许区

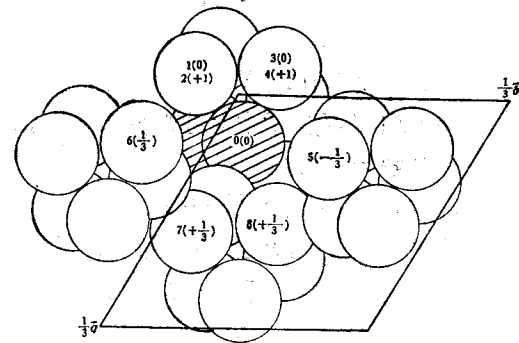


图1 三方二锌猪胰岛素中二聚体简化模型
用两个球代表一个二聚体，带斜线的是中心二聚体。
给出了周围二聚体的编号，括号内数字表示高度。

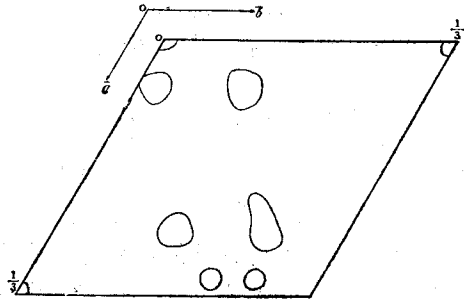


图2 三方二锌猪胰岛素晶体结构中分子间
接触点数随表征分子位置的向量 r 的变化图
(简化二聚体模型)

图中示出接触点数小于4的区域

内用真实结构模型确定分子在晶胞里最可能的位置。我们曾设计了三方二锌猪胰岛素晶体中二聚体的简化模型，用两个球代表一个二聚体，如图1所示。这样只用了很少的计算时间便求出了与最少接触点数目相应的简化二聚体模型在晶胞中的可能位置，如图2所示。由图2可见小于4个接触点数的允许区面积只占原图的很小一部分。而且显然包括了正确的位置(原点)。

对已知胰岛素晶体结构的应用

我们用经差值傅立叶法初步修正过的坐标对 R3 猪胰岛素晶体结构中的分子间接触点进行了计算。结果表明，与指定二聚体有紧密接触的周围二聚体只有8个。编号由1至8(图1)。考虑到对称性分布，其中独立的相互作用只有4个，即编号为1, 2, 5与6。全部小于4 Å 的接触点数共计180个(表1)。而其中有160个属于六聚体内部；这说明确实存在一个比较致密的六聚体单位。

表1 三方二锌猪胰岛素晶体中分子的短距离接触数目

发生作用的 二聚体 原子间距 离 d	0—1	0—2	0—5	0—6	合计
$d \leq 2.0 \text{ \AA}$	0	0	0	0	0
$2.0 \text{ \AA} < d \leq 2.5 \text{ \AA}$	2	1	0	0	3
$2.5 \text{ \AA} < d \leq 3.0 \text{ \AA}$	5	1	1	0	7
$3.0 \text{ \AA} < d \leq 3.5 \text{ \AA}$	38	8	6	0	52
$3.5 \text{ \AA} < d \leq 4.0 \text{ \AA}$	88	17	12	1	118
合 计	133	27	19	1	180

注：二聚体编号同图1

这180个接触点中大部分属于范德瓦耳作用。可能属于氢键或盐键的约有20个左右。其中包括典型的 A_{14} 酪氨酸羟基与另一分子的同一基团间的氢键， B_1 苯丙氨酸氨基与另一分子的 A_{17} 谷氨酸羧基的盐键等。从所得结果还可以看出最重要的紧密接触区域是B链N端附近，包括 B_1 苯丙氨酸， B_2 缬氨酸， A_{14} 酪氨酸和相邻分子的 A_{17} 谷氨酸等。在总共160个属于六聚体内部的接触点数中，这个区域约占一半。

这个事实与胰岛素 B 链 N 端经化学修饰后的结晶行为与三维结构的变化^[7]相一致。

上述结果显然是合理的。这有力的证实了本程序的核心部分——接触点的计算的正确性。

此项研究得到梁栋材同志的关心与支持,王大成,常文端和戴金璧同志提供了初步用差值傅立叶法修正得到的三方二锌猪胰岛素的原子坐标数据(中间结果),特此致谢。

参 考 文 献

[1] Rossmann, M. G.: *The Molecular Replacement*

Method, 1972, Gordon and Breach, New York.

[2] Crowther, R. A. & Blow, D. M.: *Acta Cryst.*, 23, 544, 1967.

[3] Vand, V. & Pepinsky, R.: *Z. Kristallogr.*, 108, 1, 1956.

[4] Wayne, A. Hendrickson & Keith, B. Ward: *Acta Cryst.*, A32, 778, 1976.

[5] Bott, R. & Sarma, R.: *J. Mol. Biol.*, 106, 1037, 1976.

[6] 毕汝昌、林政炯、高义贵:《生物化学与生物物理学报》, 1980年, 12卷, 2期, 165页。

[7] 毕汝昌等 待发表。

[本文于1981年7月22日收到]

人类迟复制 X 染色体的识别与复制过程

陈采琴 樊 蓉

(中国科学院生物物理研究所)

1963年 Schmidt 用 ³H TdR 放射自显影的方法,观察中期染色体的 DNA 复制情况,发现在正常女性的两条 X 染色体中,一条有活性;另一条活性低。活性低的 X 染色体 DNA 复制较迟,而被大量标记,在间期核中呈异固缩状态形成 X 小体。正常男性细胞中仅有一条 X 染色体,它没有这种迟复制的现象。此后,医学遗传学中应用这一方法研究迟复制的中期 X 染色体,但由于放射自显影方法复杂,且需防护设备,不易推广应用。

近年来,由于人类染色体显带技术与姐妹染色单体分化染色技术的发展以及二者结合使用^[1,2],对 X 染色体的各种异常有了精确的鉴定方法,进一步加深了对 DNA 复制过程与带型之间相互关系的认识。我们参考 Kim 与 Goto 等人的方法^[3,4],采用 BUdR-Hoechst-Giemsa 技术对健康女性淋巴细胞中迟复制 X 染色体复制过程进行初步研究,为今后研究细胞周期中 DNA 复制过程奠定基础,此外还有助于临床确诊性染色体异常的疾病。

材 料 与 方 法

1. 细胞培养与制片

从健康成年女性静脉采血,肝素抗凝,每瓶培养基含有 4 毫升 Eagle 培养液,1 毫升小牛血清,0.2 毫升 PHA,接种全血 0.3 毫升,培养 62 小时后加入 BUdR,最终浓度为 15 μ g/ml,避光继续培养不同时间(4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 小时)。终止培养前 4 小时加入秋水仙素,最终浓度为 0.08 μ g/ml。按常规空气干燥法制片。

2. 迟复制 X 染色体的分色

标本在室温下存放 3—7 天后,依次浸入 0.14M 氯化钠,0.004M 氯化钾和 0.01M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中各 5 分钟,置 5 μ g/ml 的 33258-Hoechst 荧光染料中染 20 分钟,取出后用磷酸盐缓冲液冲洗,并用该缓冲液封片。在室温下将标本平放在纸板上,同时用 2 支并列的 15 瓦黑光灯(两灯相距 1 厘米,灯管离纸板约 5 厘米)照射 30 分钟,用蒸馏水冲洗标本,使盖玻片与玻片脱离,再用蒸馏水充分冲洗。然