

修补;免疫反应;遗传调控;记忆的全息储存等等。当然,生命过程的物理论述要上升到完整的定量阶段,不仅还需大量实验验证,而且还需要一个理论的发展过程,但仅就目前的许多结果看来,还是非常吸引人的。

不管生命科学的理论沿着什么方向前进,随着科学的发展,描述物质运动高级形态的生物学与描述物质基本运动形态的物理学之间的“未知领域”逐步缩小以至消失,这是必然的趋势。而激光生物学在这个进程中正在发挥着一种无可替代的推动作用。因此它可以称为一个前景广阔的新兴学科。

参 考 文 献

- [1] 程极济等:《生物物理学》,人民教育出版社,508—542,1981。
- [2] A. H. 奥拉夫斯基等:《激光科学与技术》,Vol. 6, No. 2, 87—94, 1983。
- [3] Блюменфельд, Л. А.: *Проблемы Биологической Физики*, М., Наука, 1979。
- [4] Angelov, D. A. et al.: *Conf. Lasers in Photobiology and Photomedicine*, Florence, 1979。
- [5] Long, D. A. 《拉曼光谱学》,科学出版社。
- [6] Johns Hopkins: *Light and Life*, Baltimore, 1971。
- [7] Harrington, D. C. et al: *Anal. Chem.*, 48, 344, 1976。
- [8] Richardson, J. H. et al., *Anal. Chem.*, 49, 955, 1977。
- [9] Bradley, A. B. et al: *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 620, 1976。

- [10] 惠令凯等:《国外激光》,198, 1, 1982。
- [11] 会议报道:《国外激光》,196, 5, 1982。
- [12] 孙炳荣:《生物化学与生物物理进展》,55, 73, 1984。
- [13] Murphy, D. U. et al.: *Opt. Letters*, 4(6), 167, 1979。
- [14] Adams, M. J. et al.: *Analyst*, 101, 553, 1976。
- [15] Fröhlich, H. (edit): *Coherent Excitation in Biology*, Springer, Berlin, 1983。
- [16] 栉田孝司:《国外激光》,177, 1, 1980。
- [17] Barnothy, M. F., (edit): *Biological Effects of Magnetic Fields*, Plenum Press, New York, 1964。
- [18] Presman, A. S.: *Electromagnetic Fields and Life*, Plenum Press, New York, 1970。
- [19] Persinger, M. (edit): *Electromagnetic Fields Effects*, Plenum Press, New York, 1974。
- [20] Popp, F. A. et al.: *Collective Phenomena*, 3, 187, 1981。
- [21] Sheppard, A. R. and M. Eisenbud: *Biological Effects of Electric and Magnetic Fields of Extremely Low Frequency*, N. Y. University Press, New York, 1977。
- [22] G. M. Barenboim, et al: *Luminescence of Biopolymers and Cells*, Plenum Press, New York, 1969。
- [23] 李克学:《激光》,61, 41, 1982。
- [24] Popp, F. A.:《国外激光》,216, 1, 1963。
- [25] Morgan, J. P. et al., *Photochemistry and Photobiology*, 31, 207, 1980。
- [26] Popp, F. A.: *Umschau*, 8, 235, 1979。
- [27] Ruth, B.: *Dissertation*, Marburg, 1977。
- [28] Popp, F. A. and B. Ruth: *Arzneimittelforsch. Drug Res.*, 27, 933, (1977)。
- [29] Popp, F. A. et al. (edits): *Electromagnetic Bio-Information*, Urban and Schwarzenberg, München-Baltimore, 1979。
- [30] Slawinski, J. et al.: *Bio-Photon-Physics*, 4, 1, 1980。

[本文于1984年4月6日收到]

蛋白质结构的晶体学修正

毕 汝 昌

(中国科学院生物物理研究所,北京)

近十多年来,蛋白质空间结构的精确化,取得了显著进展。用于测定蛋白质和核酸等生物大分子三维结构的X射线单晶衍射法,通常采用同晶置换等实验方法,来获得结构的初始模型。由于各种原因,初始模型的原子坐标误差平均达0.3到0.5埃。这样的精度远不能满足结构

和功能研究的需要。蛋白质反应的分析指出,原子位置0.1埃数量级的变化,可以产生相当不同的蛋白质行为。酶的特异作用来源于活性部位的独特原子配置以及同底物结合中或以后的构象变化,这种变化有时小到用一般方法难以确定。为了测定这类原子水平的结构细节和微

小变化,也为研究蛋白质立体化学规律和进行理论计算,需要提高蛋白质结构测定的精度。另外,仅用实验方法几乎不能得到蛋白质的水结构和热运动或其他有关结构柔性的信息。对这些信息的定性和定量分析,也只能通过初始模型精确化的途径进行。

晶体学修正就是将结构模型精确化的晶体学方法,即用数学手段,修正结构模型的原子参数,使衍射数据的观测值与其计算值之间的差别趋于极小。修正方法有两大类,一类是在正空间——电子密度空间里进行的,例如傅立叶法;另一类是在倒易空间——衍射空间里进行,例如相对衍射数据进行的最小二乘法。在小分子晶体结构分析中,这些方法的应用早已成为结构测定的常规步骤。

由众多原子组成的蛋白质分子具有相当大的构象柔性。用蛋白质长成的晶体,具有小分子晶体所没有的特点,如蛋白质晶体含有二分之一左右的溶剂。这些特点,给蛋白质结构的晶体学修正带来了一些新问题。一个突出问题是计算费用大,这取决于数据量和要修正的原子数。但是最根本的困难在于衍射数据贫乏,可观测的衍射数据,比小分子晶体的数据质量上差得多,分辨率也要低得多。一般蛋白质的衍射分辨率,通常难以达到2埃以上。这严重地限制了最小二乘所需要的超定性。

为解决上述问题,蛋白质晶体学家发展了经典的晶体学修正方法,编写了各具特色的计算机程序。本文将介绍蛋白质结构修正方法及其应用,并略谈蛋白质结构修正中存在的问题。

修正方法

蛋白质晶体学已采用了实空间最小二乘法、差值傅立叶法和倒易空间最小二乘法等几种结构修正方法。Diamond首先提出了使蛋白质初始结构模型精确化的方法——实空间最小二乘法^[1]。该方法引用了使键长和绝大部分键角标准化的限定性几何,通过改变围绕单键的扭角,来使初始结构模型与实验电子密度图达到最佳拟合。Levitt发展了能量修正方法,并

将此法同实空间最小二乘联合应用。Deisenhofer等人利用改善的模型为傅立叶综合图提供位相信息,提高了实空间最小二乘法的效力。

在蛋白质结构测定中,第一个真正的晶体学修正,是Watenpaugh等人对红素氧还蛋白的修正^[2]。他们先用差值傅立叶法,初步修正蛋白质原子参数,而后使用经典的倒易空间最小二乘法,对原子参数做无约束修正。这是一次成功的尝试,首次证明可以将小分子的修正方法运用于生物大分子。可是,对于较大的蛋白质,这种方法的计算量之大,使得一般实验室难以承受,而且由于衍射数据的质和量难以达到红素氧还蛋白那样的水平,这样的经典方法很难行得通。

倒易空间最小二乘修正技术的发展,是近些年来在蛋白质晶体学领域取得的重要成就之一。本文将着重介绍这一类方法的不同变种。最小二乘的数学原则在于:最佳的一套模型参数,是使数据的观测值同其计算值间差值的加权平方和极小化的那一套参数。在经典的晶体学修正情形中,被极小化的函数,是X射线结构振幅的观测值同其计算值间差值的加权平方和,是结构模型参数的函数。可以推得,对参数的修正量是一正规方程组的解。为修正蛋白质结构,已经发展起来的倒易空间最小二乘修正技术有下列几种:

1. 快速傅立叶变换最小二乘法^[3] 在这种方法中,极小化函数同经典的最小二乘晶体学修正里的一样,但大部分计算采用了快速傅立叶变换算法,使计算速度大大加快,这对于大的数据量和较大的结构更为有利。由于没有采用克服低超定性的措施,该法只适用于较高分辨率数据,而且时常需要对结构的立体化学进行规则化,这可同晶体学修正交替进行,虽然这样做会延缓修正过程的收敛速度,但便于发现模型的错误,并使结构细节不易受立体化学制约的影响。

2. 约束(restrained)参数最小二乘法^[4] 该法的最小二乘,同时应用于衍射数据和结构模型的立体化学。在极小化函数里,除了结构振

幅项外,还有约束参数变化的立体化学制约项,其中的附加观测值为各种可利用的已知立体化学知识或结构规律(包括键长、键角、平面性、手性、范德华距离、扭角、非晶体学对称性和热参数的相关性等)。这样做有利于克服低超定性,使观测数据量与被修参数量的比值大大提高。因此,该修正方法能用于较低分辨率数据。由于采用了类似弹簧能量项的参数约束,而不是将结构组件做为立体化学标准化了的刚体,使得修正结果能够反映真实结构对约束值的偏离。在这种约束最小二乘计算中,宜于采用共轭梯度法对正规方程组求解。但是,该程序的原文本里没有采用快速傅立叶变换算法,所以计算速度较慢。

3. 能量约束最小二乘法^[5] 该方法在使晶体学项极小化的同时,通过将结构模型的势能函数极小化来约束蛋白质结构的立体化学,因而也能用于较低分辨率数据。这个程序也采用了快速傅立叶变换算法,因而计算速度快。所用能量项的种类与约束参数最小二乘法中的某些制约条件相似,但其物理意义明确。

4. 限定和约束(Constrained-restrained)最小二乘法^[6] 此修正方法将结构看作是由一系列几何被限定了的原子集团组成。每个集团具有平移和旋转自由度以及任何数量的内部扭角或键角的变化。这些集团内的各种键长严格地取各自的限定值,集团间的立体化学由专一的距离约束。根据数据的分辨率,被限定集团可以取结构域、螺旋、单个氨基酸、辅基,甚至单个原子。要修正的参数主要是集团的参数,因而参数量大大减少,宜于进行有限分辨率的结构修正。经验表明,该程序特别适用于调整较大结构组件方位的低分辨率修正。这种修正方法的明显缺点在于:集团的刚性化容易导致误差的局部积累,并丢失偏离标准立体化学的结构信息。另外,由于计算繁杂,该修正程序的计算时间较长,在较高分辨率的修正情形中计算速度相当慢。

引用类似的受约束的刚性集团, Nordman 等人编写的修正程序^[7],应用了 Gauss-Seidel 最

小二乘方法,加快了计算速度。

应用概况

近几年,结构修正已逐渐成为用衍射法测定蛋白质空间结构的常规步骤。许多实验室对过去没有修正过的蛋白质结构,重新收集了较高分辨率的数据,做了结构修正,获得了更多和更精确的结构资料。到目前为止,已完成的许多蛋白质结构修正中,1.5 埃以上的高分辨率修正有十多个,虽然这都是些较小的蛋白质。对少数高精度的结构修正,估算的原子坐标误差降到了 0.1 埃左右。

从结构修正的实践,可以总结出一些经验。数据是结构修正的基础,好的修正效果需要好的数据。在进行高精度的修正时,特别是在修正的最后阶段,应尽量使较多的数据参加,即使高分辨率壳层数据较弱;蛋白质修正没有固定的处方,具体的做法取决于所要研究的对象,计算程序的选择还决定于所用的计算机系统;目前所有的修正方法都没有能实现自动化,较大的模型误差必须通过检查傅立叶综合图和人工调整才能矫正,这使得应用诸如图象显示系统的计算机辅助工具,对提高修正速度有极大的益处。修正的效果通常用晶体学 R 因子的值和立体化学的合理性来表达。另外的判据是用结构振幅的观测值和计算值算得的差值傅立叶综合图的干净程度,以及在一些情形里同一蛋白质的不同结构测定结果的吻合程度。有时从观察制约放松时的效应,也能定性地评价结果的精度。

通过分析修正过的蛋白质结构,已积累了不少重要的结构资料。水对水溶性蛋白质结构的形成和稳定及功能的发挥都是至关重要的。高精度的结构修正,提供了与蛋白质相关的水结构的精确信息。在大多数情形中,蛋白质的结构修正能较快地收敛到 R 值为 0.25 左右,随后的修正进展,在很大程度上取决于对溶剂分子的辨认,以及对水分子的位置、占有率和热参数——温度因子的修正。虽然对蛋白质中水结构的详细研究刚起步不久,但已获得了一些

关于水结构的知识。与蛋白质作用密切的、在电子密度图中呈现为单个密度峰的有序水，通常围绕着带电侧键和极性基团，或分布在蛋白质分子表面的凹陷里。然而，也已发现有少数孤立的水分子被圈在蛋白质内部，以弥补原子堆积的空位，并尽可能与蛋白质原子形成氢键。与蛋白质结合紧密的水，应该看成是蛋白质结构的有机组成部分。它们的结合部位相当确定，主要由蛋白质的性质所决定。有序水可以分为两种。一种是位于第一配位层的有序水分子，它们直接与蛋白质连结，形成一个或多个氢键。另一种有序水产生在第二配位层，通过其他水分子与蛋白质成氢键联系。这些有序水分子，结合部位不像前一种那样一定，占有率也较低，其温度因子随到蛋白质距离的增长而迅速增大。还有一种水，对稳定蛋白质的天然构象有着重要意义。这种水在电子密度图上，表现为围绕着蛋白质分子的、没有多少特征的低的连续密度，这是无序的成块的水。在一些结构修正中，虽然对这种水的处理做了一些尝试，但还有待于进一步探讨。

结构修正是得到蛋白质原子热参数的途径。通常，当修正扩展到较高分辨率，且R值下降到一定值——比如0.30左右时，可以开始修正原子的各向同性温度因子。为了使修正能正常进行，有时需要对这些热参数加以制约。如果计算程序不能对热参数做约束，如快速傅立叶最小二乘法那样，修正过程中对它们有时需要做人工制约。当高分辨率修正进行到最后阶段，足够多的数据和较高精度的原子参数，允许对各向异性温度因子做约束修正。实践表明，修正中热参数的反常表现，往往指示出结构模型误差所在。修正的正常结束，能够给出一套完整的合理的热参数。这样的参数较直观地勾画出蛋白质分子热运动的状况以及结构的无序化程度。温度因子是构象柔性的量度，深入分析这些热参数，则可获得有关蛋白质结构动力学的信息。从现有的蛋白质修正结果，已获得了一些关于蛋白质构象的柔性或动力学的资料^[6]。

结构修正是研究蛋白质的结构细节及其与功能关系的强有力工具。在Huber的实验室里，运用能量约束最小二乘法，对牛胰蛋白酶及其酶原的十多种晶体，完成了结构修正^[9]。所用衍射数据的分辨率都在1.9埃以上，最后得到的R值均在0.16到0.21之间。借助这样一系列较高精度的修正，发现该酶活性部位的构象，在不同的功能状态里是相当保守的。对肽基团的分析表明，肽基团能够明显地呈非平面性的。这说明，尽管对立体化学进行了约束，但结构修正还是能给出偏离约束值的结构细节，进而可以用于测定蛋白质结构的精细立体化学。

约束参数最小二乘法是应用较广泛的一个修正程序。James研究小组使用该程序，修正了一种丝氨酸蛋白水解酶及其与底物或抑制剂的复合物^[10]。天然酶的数据分辨率是1.5埃，其他三个复合物的是1.8埃。每个独立修正都找到了200多个水分子，修正后的R值都降到0.12左右。修正后结构里的键长，与其标准值的均方根偏离为0.02埃。通过这些修正，较有把握地确定了酶活性部位的准确结构，并较具体地知道了该酶同底物或抑制剂间的作用，以及它们结合时所发生的微小构象变化和构象柔性变化。在活性部位里，有的修正前认为存在的氢键，修正后因距离增长和非线性加大而难以成键。与此相反，有的修正后结构中确定的氢键，修正前并不认为成键。用修正方法得到的这类改进的结构细节，无疑为正确理解酶的作用机理，提供了较可靠的物质基础。

胰岛素空间结构的测定精度，已达到目前蛋白质晶体学的高水平。Dodson研究小组应用快速傅立叶变换最小二乘程序，对来源不同的胰岛素或其类似物进行了结构修正。其中二锌猪胰岛素和去B链N端五肽牛胰岛素的修正，所用数据的分辨率为1.5埃，最后的R值都降到了0.18以下^[11,12]。去五肽牛胰岛素的结构，是基于已知二锌猪胰岛素结构用分子置换法解得的。虽然没有引用任何实验位相信息，而且该结构的某些局部构象与二锌猪胰岛素差异很大，但还是能借助修正方法得到了高精度的结

构。Sakabe 等人在较低的温度下收集了 1.1 埃分辨率数据;用快速傅立叶变换最小二乘法,完成了对二锌猪胰岛素的修正,最后的 R 值为 0.155^[43]。我国的梁栋材研究小组,用质量好的二锌猪胰岛素晶体,精心地测量了 1.2 埃分辨率数据。该小组运用约束最小二乘法对胰岛素的修正工作已完成。所有这些胰岛素的修正结果,给出了包括水结构和某些氢原子位置在内的胰岛素精细结构,为理解胰岛素和蛋白质的结构性质,特别是结构的柔性和动力学,丰富了我们的知识,并为研究胰岛素的结构与功能关系揭示了重要线索。此外,这些修正工作是在三个不同的实验室里独立完成的,将这些结果加以比较,不但有利于确定结构细节,而且便于检验不同方法及结构修正本身的效果。

结 束 语

为满足结构和功能研究的需要,必须对用实验方法解得的蛋白质空间结构模型进行晶体学修正。为此,针对蛋白质晶体学的特点,发展了几种结构修正方法。这些方法的应用提高了结构模型的精度,并提供了很多新的结构信息,从而显示了结构修正的威力。

然而,对于生物大分子这样复杂的研究对象,晶体学修正还存在不少问题,尚需改进和完善,这在 1980 年在英国举行的关于蛋白质结构修正的讨论会上得到了充分反映。首先,为克服衍射数据的局限性所加的立体化学制约,应该既能包括较多便于描述结构的制约项,又要使这些制约尽可能符合实际。这样,在使最小二乘法正常进行的同时,才能较少丢失有用的结构信息。在现有的修正方法中,势能项的模式在很多方面偏离了实际情形。其次,由于引入能量约束项,带来了 X 射线项与能量项的相对权重问题。目前还没有预测权重参数值的成熟经验。然而,只有在修正进行的最后阶段使用正确的权重,修正结果才可能得到较有意义的解释。与增加制约项相联系的另一个问题,是对原子参数误差的估算。原则上讲,最小二乘法能够提供这类估算值。但是,在约束修正情

形里,特殊的困难将来自于对相对权重的处理和某些立体化学观测值的相关性。

如前所述,蛋白质晶体学修正的最大障碍,来自于蛋白质较大的热运动及其构象的可变性。这些较大的原子移动导致衍射强度随分辨率升高而迅速下降,进而极大地限制了观测数据的质量和范围。用这样有限的衍射数据,接近于不可能确定表征这些复杂位移的众多参数。目前,在修正中采用了较简单的热运动模型,并对热参数加以制约。这样做在一定程度上是试图解释对观测数据的不适应性,也是因为找不到一个能与动态密度相符合的模型。修正中的无序结构部分,一般通过选择适当的占有率或温度因子来体现。这样的处理显然不能满足需要,因为用单个的参数很难描述这种复杂的现象。

另一方面,最小二乘的计算方法也尚需发展。现有的蛋白质修正程序中,正规方程组通常近似地用正规矩阵的对角线项或块对角线项来求解,以节省计算费用。若同时考虑非对角线项的贡献,则有利于修正过程的收敛,而且在衍射数据足够多的情况下,还可能减弱对几何制约的需求。为了加快计算速度,应在计算中尽可能采用诸如快速傅立叶变换的快速算法。引入新的超快速傅立叶变换算法,将能进一步降低计算费用。

蛋白质晶体学修正技术的改进,将使 X 射线单晶衍射法,在探测生物大分子奥秘方面发挥更大的作用。用该法获得的高精度的结构,不仅为结构和功能的研究提供直接的证据,而且也为理论研究提供足够精度的结构基础。可以预期,随着数据收集手段的革新和电子密度图分析工具的进步,结构修正的进展将会给蛋白质晶体学的发展以有力的推动。

参 考 文 献

- [1] Diamond, R.: *Acta Cryst.*, A27, 436, 1971.
- [2] Watenpugh, K. D et al.: *Acta Cryst.*, B29, 943, 1973.
- [3] Agarwal, R. C.: *Acta Cryst.*, A34, 791, 1978.
- [4] Hendrickson, W. A. and Konnert, J. H.: *Biomolecular Structure, Function, Conformation and*

Evolution (Srinivasan, R. ed.), Vol 1, P. 43, Pergamon, Oxford, 1980.

[5] Jack, A. and Levitt, M.: *Acta Cryst.*, A34, 931, 1978.

[6] Sussman, J. L. et al.: *Acta Cryst.*, A33, 800, 1977.

[7] Hoard, L. G. and Nordman, C. E.: *Acta Cryst.*, A35, 1010, 1979.

[8] 毕汝昌: 《生物化学与生物物理进展》, 第2期, 2, 1984.

[9] Markus Marquart et al.: *Acta Cryst.*, B39, 480,

1983.

[10] Sielecki, A. R. and James, M. N. G.: *Proc. Symp. Refinement of Protein Structures*, P. 78, Daresbury Lab., Science and Engineering Research Council, U. K., 1981.

[11] Cutfield, J. F. et al.: *Structural Studies on Molecules of Biological Interest* (eds. Dodson, G. et al.) P. 527, Clarendon Press, Oxford, 1981.

[12] Bi Ru-chang et al.: *Biopolymers*, 23, 391, 1984.

[13] Sakabe, N. et al.: *See Ref. [11]*, P. 509, 1981.

[本文于1984年7月19日收到]

血卟啉光敏治癌的分子机理

纪 极 英

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

本世纪初, 科学家们就发现了血卟啉对人和哺乳动物癌瘤的光敏治疗作用^[1]。近年来, 随着激光技术的发展, 利用血卟啉加激光诊治癌瘤, 在世界各国得到了广泛的应用。

通常用血卟啉的诊断方法是: 给患者静脉注射血卟啉, 二天后用蓝色激光照射可能的患癌部位, 渗入到癌组织中的血卟啉在蓝光的激发下, 可发出红色的荧光, 以此来诊断癌瘤的位置。治疗方法与诊断方法大体相同, 只须把照射光源改为红色激光即可。光照后, 癌瘤逐渐发黑、结痂, 然后脱落痊愈。

八十年代以来, 学者们认为, 血卟啉光敏诊治癌瘤具有安全, 简便, 诊断准确率高, 治疗效果良好, 对正常组织损伤少等优点, 是一种很有前途的诊治癌瘤方法。我国也组织了攻关组来协调国内各单位的此项研究。目前血卟啉光敏治癌仍存在一些问题, 例如, 经光照治疗的癌瘤有一定的转移或复发率, 对内脏及深部癌瘤尚不能完全奏效等等^[2]。

为了进一步提高疗效, 推动临床研究向前发展, 近年来, 各国学者对血卟啉光敏治癌的分子机理, 作了大量深入细致的研究, 发表的论文达数百篇之多。本文仅就这方面的动向, 作一简介和评述。

有效成分

血卟啉是一种颇为复杂的混合物。确切地说, 这种生物制剂, 是具有众多组分的血卟啉衍生物(HPD)。为了弄清它的组分, 各国学者已经做了大量的工作。但是, 由于样品来源、实验

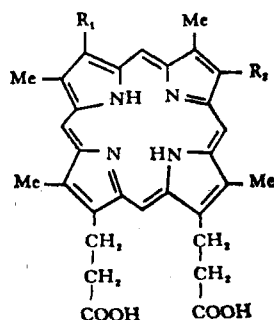


图1 九种血卟啉衍生物(HPD)的结构^[3]

1. $R_1=R_2=CH(OH)Me$ (HP)
2. $R_1=CH(OH)Me$ $R_2=CH=CH_2$ (HVD)
3. $R_1=CH=CH_2$ $R_2=CH(OH)Me$ (HVD)
4. $R_1=R_2=CH=CH_2$ (PP)
5. $R_1=CH(OAc)Me$ $R_2=CH(OAc)Me$
6. $R_1=CH(OH)Me$ $R_2=CH(OAc)Me$
7. $R_1=CH=CH_2$ $R_2=CH(OAc)Me$
8. $R_1=CH(OAc)Me$ $R_2=CH=CH_2$
9. $R_1=R_2=CH(OAc)Me$

Me—甲基; Ac—醋酸根; HP—血卟啉(此处HP系指HPD的一种组分;有时在文献中,HP也可泛指HPD); HVD—羟乙基乙烯基卟啉; PP—原卟啉; (2)和(3)、(5)和(6)、(7)和(8)分别为同分异构体