

## 综述与专论

# 蛋白质的晶体生长及其进展

毕汝昌 桂璐璐 楼美珍

(中科院生物物理研究所,北京)

### 提 要

蛋白质晶体生长是用衍射法测定和研究蛋白质三维结构不可缺少的首要步骤,因而对于从分子水平了解生命过程和有效地开发蛋白质工程、理性药物设计等新的生物技术具有重要意义。这一结构测定步骤所处的落后状态,更使蛋白质晶体生长成为倍受重视的研究课题。蛋白质和核酸等生物大分子的结晶是一个受多个因素影响的过程。来自不同学科的研究人员从各个方面对蛋白质的晶体生长开展了研究,并取得了不同程度的进展。

**关键词** 蛋白质晶体学,蛋白质,晶体生长,结晶装置,微重力,生物结构

### 一、引 言

组成生物机体的蛋白质、核酸等生物大分子的功能取决于它们独特的三维结构,因而要弄清生物机体在分子水平是如何行使功能的,必须测定和研究这些由成千上万个原子构成的三维结构。另一方面,从研究蛋白质结构、功能和调节得到的知识能为控制各种生命过程提供机会,也能为研制各种功能分子提供依据和途径。这促成了蛋白质工程、理性药物设计、合成疫苗设计等新兴的生物技术的出现和发展。笼统地讲,这些有发展前途的生物技术是应用生物大分子结构与功能关系的知识,设计和制造改进型或新型分子,使蛋白质分子与其作用分子的相互作用更佳。蛋白质工程在于改造蛋白质分子,药物设计则是改造与靶蛋白质作用的药物分子,这些技术的实行都应该以蛋白质的三维结构为基础。

能为研究生物大分子结构做出贡献的方法

技术很多。然而,能够给出较完整和详尽的分子结构信息的研究手段并不多。在这一研究领域里,近年来发展起来的二维核磁共振技术显示了竞争能力,用它测定蛋白质的溶液构象,但结构测定的范围和精度受到了严重限制,目前仅能用于测定一百多个氨基酸以下的小蛋白质的三维结构。约有五十年发展历史的蛋白质晶体学方法,为分子生物学和生物化学奠定结构基础起了决定性作用,而且至少在目前及将来一段时间内,仍然是测定生物大分子三维结构的最重要的常规方法。

蛋白质晶体学是应用单晶衍射法研究生物大分子三维结构的一门分支学科。要进行这类研究,必须先将要研究的蛋白质培养成适于衍射分析的单晶体。然而,生长出质量较好的蛋白质单晶体并不是容易的事,常常由于难以培养出合用的单晶体而使研究延期,有的甚至因不能获得可用的晶体而不得不另辟新的研究课题。其它蛋白质晶体结构测定步骤的方法和技

术的不断进步,使这种由晶体生长卡脖子的研究状态显得更为突出。蛋白质晶体生长的重要意义及落后状态越来越引起有关学术单位和公司的注意,使越来越多的研究人员开始为解决这一问题做出较大的努力<sup>[1]</sup>。在总结过去大量蛋白质晶体生长经验的基础上,已写出了专门论著<sup>[2]</sup>和不少综述文章。不久前建成了生物大分子结晶数据库,其中包括由 600 多种生物大分子或复合物生长出的上千种晶体的晶体数据和结晶条件。为及时交流研究进展和明确努力方向,分别于 1985 年和 1987 年专门就蛋白质晶体生长召开了第一、二次国际会议<sup>[3,4]</sup>。这为来自于蛋白质晶体学、生物化学和物理化学等各学科的学者进行学术交流提供了良好机会。会上还议定第三次会议将于两年后在美国召开。这一切活动将有力推动蛋白质晶体生长研究,也预示着其光明的发展前景。下文将说明蛋白质晶体生长存在的问题,并着重根据上述两次会议的内容介绍一些新的研究方向及其进展。

## 二、蛋白质的晶体生长及存在问题

按照溶质从溶液里结晶的一般规律,蛋白质结晶通常应遵循这样的原则:使尽可能多的蛋白质制剂溶解,然后使溶液缓慢地达到低度的过饱和状态,以便产生少量晶核,并长大成晶体。能影响蛋白质溶解度的因素很多,其中有蛋白质浓度、缓冲液及其 pH 值、温度、离子强度、溶剂、沉淀剂和添加物的种类和浓度等。目前采用的各种蛋白质结晶方法,就是用尝试办法调节这些因素,以期获得能长出质量好的晶体的“最佳”结晶条件。通常应用的蛋白质结晶技术是使用微量样品的汽相扩散法、透析法和液面扩散法等方法<sup>[2]</sup>。以最常用的悬滴汽相扩散法为例,其结晶实验是这样的:将少至微升级的含蛋白质的液滴,置于硅化盖玻片上,之后倒盖在盛有沉淀剂(常用沉淀剂如硫酸铵、聚乙二醇、二甲基-2,4-戊二醇等)溶液的孔穴上。在这样密封的系统里,如果蛋白质悬滴里的沉淀剂浓度略低于孔穴溶液中沉淀剂的浓度,通

过汽相扩散两部分溶液将会慢慢地平衡,随着悬滴里的溶液逐渐达到过饱和而可能使蛋白质晶体生长出来。

目前,蛋白质晶体生长作为专门技术所处的状态,是技艺多于科学,经验优于理论。由于对蛋白质晶体生长的机理了解甚少,难以按照正确规律调节影响晶体生长的各种因素,甚至还存在着一些对生长晶体、特别是生长好晶体起重要作用的未知因素。因此,无论采用那种晶体生长技术,培养出足够大、衍射能力足够强的单晶体是不容易的,常常见到的是下列几种实验结果:无定形沉淀,众多小晶体,孪晶或多个晶体的融合体,或有缺陷的单晶体。晶体内部结构引起的问题则更是难于预测。我们的一些实验结果也展示了解决这些问题的艰难性。在我们的实验室里,对一种从蛇毒分离的细胞毒素作了大量结晶实验,迄今找到两种能重复的结晶条件,生长出了较大的外形规则的单晶体,但晶体的衍射能力却低得难以进行初步晶体学研究<sup>[5]</sup>。另一个说明结晶复杂性的例子是从一种腹蛇毒分离出来的中性磷脂酶 A<sub>2</sub> 的结晶。多晶型是蛋白质结晶中常见的现象,甚至同样的结晶条件也会产生晶胞相异的晶体。然而,这种中性磷脂酶 A<sub>2</sub> 的结晶却是另一种情形,我们仅用约 20 mg 的蛋白质制剂就获得了适于 X 射线衍射实验的单晶体,但其晶体学不对称单位含有四个分子<sup>[6]</sup>(以后的研究表明,在一个严格的不对称单位里可以有多达八个分子)。为了降低结构的复杂性,我们长时间、大范围地探索结晶条件的变化,用不同结晶条件获得了外形差异很大的单晶体。可是,衍射实验表明这些晶体具有相同或相类似的内部分子堆积方式,试图改变晶型的尝试迄今未获得成功。

许多蛋白质结晶实验指出,影响蛋白质结晶的一个重要因素是样品的纯度。如果结晶不能重复或只能产生不合用的晶体,那么最可能的原因是样品的纯化没有达到足够的纯度。显然,对于一些蛋白质,做到完全同源性分子或杂质分离是困难的,因而用这样的蛋白质制剂结

晶往往会遇到麻烦。兔肌酸激酶的结晶是一个很好的例子。我们曾用该酶的一种制剂做过大量的结晶条件探索,但只能获得孪晶或薄片状的单晶体,后来的样品电泳分析显示出含量较少的可能为同功酶的条带。几乎在我们进行该工作的同时,国外另一家实验则由于采用改进纯化的新步骤而获得了能用于X射线衍射分析的单晶体。另一种纯度问题体现在分子结构的均一性上。由于蛋白质分子的稳定性是有限的,在一些条件下分子结构可能发生不同程度的变化。这包括一些生化方法难以检测但影响结晶的结构变化,例如脱酰胺有时就可导致样品具有不同的结晶行为。一般来讲,成功的蛋白质结晶需要比一般生化研究较高的样品纯度,这就对样品的制备,包括所用生化或遗传方法及其各步骤,提出了更高的要求。

蛋白质结晶的难度是与蛋白质的结构性质及其所形成的特殊晶态密切相关的。在许多方面,蛋白质晶体不同于大部分其他物质的晶体。一个重要差别是蛋白质晶体的溶剂含量特别高,一般占晶体体积的30%到70%,晶体中蛋白质分子间只有少数接触。显然,分子的有序排列主要是靠这类少数非键作用和溶剂作用来稳定的。因此不难理解,为什么少数氨基酸侧链的变化会影响蛋白质的结晶行为,很可能这些原子基团涉及分子形成有序排列所需要的稳定作用。结构柔性较大的蛋白质分子具有一个形状奇特的表面结构,各种极性、非极性原子基团分布复杂。这些基团的荷电情况和成次级键作用的能力在很大程度上取决于受溶液组分和性质影响的环境因素。所以,要使某种蛋白质结晶,在调节其溶解度同时,还必须优化分子间的作用,以足够稳定某种规则的排列。晶体里那些分子间相接触的部位应该在空间和性质上互补。在很多情形里,理应能通过改变溶液的pH、离子强度和溶液组分等条件达到这种分子间作用的优化。这样,不难得出如下结论:蛋白质结晶的复杂性在于它是一个多参数的问题。

### 三、新的研究方向及进展

#### 1. 晶体生长物理学的研究

为了能以理论指导生物大分子的晶体生长,以便能生长出质量优良的单晶体,必须弄清这类复杂物质的结晶机理。近几年已经有越来越多的不同学科的研究人员投入了这一研究。Feigelson从研究小分子和生物大分子物质性质及晶体生长行为的异同,通过寻找共性的东西发展理论和实践。Feher等人用较系统的方法研究蛋白质结晶机理,建立了简单的用于指导和解释实验的理论<sup>[7]</sup>。Carter发展了数学模型<sup>[8]</sup>,近期又应用统计方法设计蛋白质晶体生长实验。蛋白质晶体生长是一个复杂过程,至少由成核、生长和停止几个阶段组成。对这些不同阶段,开始应用能做动态分析的实验手段进行研究。通常选用易结晶的蛋白质做为研究模型系统,对溶菌酶的晶体生长探索最多,其中包括溶解度、生长动力学、生长速率与某些因素的依赖关系等方面的系统观测和分析。另外的研究则集中在探讨溶剂添加物、异质晶态物等因素对结晶的影响,Mc Pherson的研究表明,至少在一种情形里蛋白质晶体在矿物或无机物晶体表面上的成核和生长很可能是外延性的。

研究晶体内分子的配置及直接的或通过溶剂的分子间的作用方式,是了解晶体稳定性和晶体生长的一条途径。已积累的相当多的高精度结构测定结果为这类研究提供了广泛可能性。最近,几个实验室对溶菌酶、细胞色素C、tRNA和DNA寡聚核苷酸等少数生物分子的晶体进行了分子堆积分析。结果发现,致使点阵形成的主要因素是生物大分子构象的柔性和结构溶剂分子参与分子间作用<sup>[9]</sup>。晶体里分子间的少数接触大都涉及温度因子较大的结构片段,有序溶剂分子进一步稳定了分子堆积。此外,研究结果还初步表明,晶体的形态与其晶体结构相关,晶体内分子连接链的存在可能与晶核形成和宏观晶体行为的发展有关系。

## 2. 结晶装置和观测仪器的研制

无论对于研究蛋白质晶体生长机理,还是对于提高结晶的效率,新型装置和仪器的研制是十分重要的。要了解晶体生长过程,必须能够监控生长过程的动态变化。初步研制成功的动态监控系统已被应用于监控晶核的形成<sup>[10]</sup>。光散射可服务于这类监控系统,Rosenberger将一种简易光散射装置用于由温度控制的晶核形成的早期探测。McPherson已借助彩色录像机对几种蛋白质晶体生长实现了按时间推移的显微照像。

理想的结晶系统应能自动监控动态变化和自动调节影响晶体生长的各种参数和因素。沿着这一方向的装置研制已有了良好开端。Suddth等人已发展了一种能对结晶液滴的蒸发速率进行动态控制的汽相扩散系统。Littke试制了一种实验装置,用它可以检验和优化各种结晶条件和参数。自动化学开始较广泛地用于晶体生长实验。启用受控于计算机的机械手完成各种结晶操作,以便快速和精确地设置大量实验,有的自动化装置还可以自动进行检查。近年来Ward、Jones、Weber Hol等人 and 各自的同事分别发展了不同的自动化蛋白质结晶系统<sup>[11]</sup>,已使用自动化的悬滴结晶法成功地培养出供X射线衍射研究的单晶体<sup>[12]</sup>。还专门为微重力下的蛋白质晶体生长设计了一些实验装置,这将在下面介绍。

## 3. 膜蛋白和复杂生物结构的结晶

膜蛋白具有不同于水溶性蛋白质的性质,这类蛋白质的结晶成功可称为蛋白质结晶史上的一个重大突破。从视紫菌分离出来的光合作用反应中心是第一个被测定了三维结构的膜蛋白。因此而荣获了1988年诺贝尔化学奖,其获奖者之一为开创膜蛋白结晶做出了重要贡献。到目前为止,至少报道了十多个膜蛋白的结晶。膜蛋白之所以能够被结晶,主要在于向蛋白质溶液加入合适的去垢剂<sup>[13]</sup>。这类去垢剂分子以其疏水部分与膜蛋白在膜内的疏水表面相互作用,因而允许分子间的极性相互作用成为晶体中的稳定力。有时,为了改善这类晶体的质量,

需要再向蛋白质溶液加入小的两性分子,可能以此调节和优化分子间相互作用。实际上,加入的去垢剂分子起着防止蛋白质在水溶液里聚积和沉淀的作用。根据这一思想,McPherson将中性去垢剂 $\beta$ -辛基糖苷用于水溶性蛋白质的结晶实验,确实有利于一些蛋白质的晶体生长<sup>[14]</sup>。

任何一种稳定的结构均一的生物结构都应能被结晶,只要能够找到使其溶解又能优化其间相互作用的条件。至今已获得几十种包括病毒在内的蛋白质与核酸复合物的晶体。晶体学研究中的一个难题是核糖体的晶体结构分析,其最关键的一步是培养出合用的单晶体。尽管这种相当大的生物颗粒的内部结构极不对称,且柔性较大,通过结晶条件的深入摸索和结晶实验技术的革新,也已取得明显进展。Yonath等人用50s核糖体亚基培养出了能收集衍射数据的单晶体。值得提起的是,由于这种生物结构大到足够能用电镜观察,因而第一次有机会直接观察晶核形成的状况。

## 4. 微重力下晶体生长的研究

微重力条件下的蛋白质晶体生长是有前途的一个研究方向,有不少理由说明具有微重力环境的空间对于生长生物大分子晶体是有利的。在重力作用下,蛋白质比溶剂较大的密度使长出的晶体常常沉淀到生长容器的底部。这常使小晶体聚集在一起而难以获得较好的单晶体,而且靠容器壁的非均一生长条件能够导致晶体生长缺陷。重力场内的另一显著现象是由温度和密度梯度引起的对流。随着生长着的晶体摄取周围的蛋白质,其生长表面附近形成的较低密度的溶质层在浮力驱使下会上升。围绕生长着的溶菌酶四方晶体的溶质对流已被用一种流层光学系统观察到。这种溶质对流能够影响晶体生长和晶体性质,已用蔗糖做为模型系统初步观察了溶质对流对晶体形态的影响,发现晶体形态与该晶体相对于对流方向的取向有关系。

在微重力条件下,可使上述沉淀、对流、器壁等效应消除或减弱,因而具有微重力环境的

空间是研究蛋白质晶体生长机理和培养好晶体的理想地方。这种优越性首次被 Littke 初步证实,他利用空间飞行器 Spacelab 生长的溶菌酶和  $\beta$  半乳糖苷酶的晶体分别比地面上同样条件生长的晶体增大 1000 和 27 倍<sup>[15]</sup>。随后,不少国家的科学家也相继对这类研究发生了兴趣。美国宇航局对这一领域的研究给以极大的支持,与 Alabama 研究组一起组织各学科的人才展开广泛研究。他们将航天实验与大量的地面研究相结合,并将基础理论与装置和仪器的研制相结合。在 1985 和 1986 两年中, Bugg 及其同事先后四次在航天飞机上完成了蛋白质晶体生长实验,使用手控的但无温控的、基于注射器原理制成的汽相扩散装置,生长出了多种良好蛋白质晶体,并证实一些情形里微重力条件对晶体的形态有显著的效应<sup>[16]</sup>。根据实验结果改进的实验装置能在温控条件下允许同时完成 60 个蛋白质晶体生长实验,并在 1988 年的航天飞机航行中得到检验。对几种蛋白质应用这种改进型装置已生长出比地面生长的最好晶体具有更均一形态和更高衍射能力的单晶体。这一研究的长期目标,是为生长蛋白质晶体发展系统和可靠的技术和硬件。在其他一些实验室里,也为发展适于微重力下生长蛋白质晶体的方法和装置做出了努力。Littke 设计了无接触壁的悬滴结晶方法。Sieker 研制了微量透析室结晶装置,使其能用于长时间的无人空间飞行。

西德 INTOSPACE 公司研制了一种灵活性较大的用于微重力下有机物质结晶的装置<sup>[17]</sup>。这种系统的结晶容器由上百个小管组成。应用汽相扩散方法生长晶体时,每个两端密封的管子,由一半含有蛋白质溶液的聚乙烯管和另一半充满沉淀剂溶液的玻璃管对接而成。进入微重力环境前,这两种溶液被夹子隔离,到达微重力环境后夹子自动打开,进而启动汽相扩散法生长晶体。该系统将晶体生长置于较严格的温控之下。于 1988 年 8 月,该系统搭载我国的返地式卫星进行了初次试验,在空间运行近 190 个小时,并取得了初步成功。将回

收的结晶装置运回实验室后,马上对每一个晶体生长管进行了检验,并与地面上用同样条件所做的晶体生长对照实验做了对比。参加这次试验的共有 101 个蛋白质或生物结构的结晶实验。如果将结果按含较大晶体、小晶体、无晶体分为三类,它们所占比例分别为 29%、27% 和 44%。这次试验结果说明能够用这类晶体生长系统搭载返地式卫星进行蛋白质晶体生长实验。与地面上的对照结晶实验相比较,在空间生长的大部分晶体要比地面上生长的晶体明显增大,其中有少数蛋白质晶体生长显示了微重力对晶体形态的有利影响。我们参加了这次试验,第一次尝试在空间进行天花粉蛋白的晶体生长,其结果属于上述第一类情况,这与我们坚持使用较大的蛋白质溶液体积有关系,这次试验的一个重要教训是使用这样的装置结晶时不应该把蛋白质溶液体积控制得太小。

## 参 考 文 献

- 1 DeLucas L J, Bugg C E. *Tibtech*, 1987; 5: 188
- 2 McPherson A. *Preparation and Analysis of Protein Crystal*, New York: John Wiley & Sons, 1982
- 3 Proceedings of the First Intern Conference on Protein Crystal Growth. *J Crystal Growth*, 1986; 76(3)
- 4 Proceedings of the Second Intern Conference on Protein Crystal Growth. *J Crystal Growth*, 1988; 90(1,2)
- 5 林政炯,桂璐璐等,动物学研究,1981;2(4): 139.
- 6 桂璐璐,毕汝昌,林政炯等,科学通报,1987;(10): 776
- 7 Feher G F, Kam Z. *Methods in Enzymology*, 1985; 114: 77
- 8 Carter C W Jr, Carter C W. *J Biol Chem*, 1979; 254: 12219
- 9 Salemm F R et al. *J Crystal Growth*, 1988; 90: 273
- 10 Baldwin E T et al. *Biophys J*, 1986; 49: 47
- 11 Ward K B et al. *J Crystal Growth*, 1988; 90: 325
- 12 Kelders A et al. *Mol Biol*, 1989; 205: 615
- 13 Garavito R M et al. *J Crystal Growth*; 1986; 76: 701
- 14 McPherson A et al. *J Biol Chem*, 1986; 261: 1969
- 15 Littke W, John C. *Science*, 1984; 225: 203
- 16 DeLucas L J et al. *J Crystal Growth*, 1986; 76: 681
- 17 Plaas-Link A, Cornier J. *Appl Microgravity Tech.*, 1988; 1(3): 123

[本文于 1989 年 7 月 11 日收到]