

文章编号:1000-582X(2004)07-0036-04

# 原子力显微镜研究蛋白质晶体生长机理及进展\*

汪盛<sup>1,3</sup>, 蔡绍哲<sup>1</sup>, 王大成<sup>2</sup>

(1. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400030; 2. 中国科学院生物物理所, 北京 100101;

3. 中国科学院力学所国家微重力实验室, 北京 100080)

**摘要:**原子力显微镜(AFM)这种能进行微尺度测量的精密仪器是目前研究晶体生长机理最为有效的方法之一,在晶体生长机理研究中起到了重要的作用,尤其是对于蛋白质晶体生长的研究显得更为突出。分别简明地阐述了利用AFM进行蛋白质晶体生长研究的工作原理,以及在这方面已经取得的研究成果,包括二维台阶生长、螺旋位错生长、法向生长、三维成核生长、台阶发展的不对称性、及杜仲抗真菌蛋白(EAFP)和天花粉蛋白(TCS)晶体生长的新进展。论述了利用空间微重力环境进行蛋白质晶体生长及空间蛋白质晶体生长的科研和应用,指出今后进行蛋白质晶体生长研究的趋势和前景。

**关键词:**原子力显微镜;蛋白质晶体;生长机理;微重力环境

**中图分类号:** O781

**文献标识码:** A

对现代生物化学产生重大影响的是三个主要技术的发展。首先是DNA重组技术的产生和发展,其次,是X射线衍射仪器空前的进步和实验过程的简单化,最后,就是生物大分子晶体生长的方法的发展。在DNA重组和X射线结构分析之间,生物大分子晶体生长起着重要的桥梁作用<sup>[1]</sup>。随着人类基因组计划(HGP)的顺利实施以及后基因组(post-genome)及蛋白质组(proteomics)时代的到来,生物学家们将面临对大量的蛋白质分子三维精确结构需求<sup>[2]</sup>。但是迄今为止,生物大分子的晶体生长仍然是一个“瓶颈”,对当前进行高通量的结构基因组研究是一大阻碍因素。因此生物大分子晶体生长变得越来越重要的,研究生物大分子晶体生长机理并用来指导实践将具有十分重要的作用。

AFM是一种具有高精度、高分辨率的显微镜。自从1992年Durbin等人用AFM研究溶菌酶晶体生长以来,AFM就成为研究蛋白质晶体生长机理的又一重要的工具<sup>[3-4]</sup>。由于AFM能对处于溶液中的样品进行实时原位观察,为研究蛋白质晶体生长提供了有力

手段。在过去20年中,世界上分别有好几个实验室在用AFM主要从事有关晶体生长的实验工作,包括生物大分子晶体生长中杂质的影响、生长缺陷结构问题及控制晶体生长的机理的有关问题,并取得了很大的进展<sup>[5-10]</sup>。基于生物大分子晶体生长在现代生物科学领域中的重要地位,笔者拟就原子力显微镜研究的机理和最新研究进展做一个初步的概括和综述,为结构生物学家和晶体学家们进一步研究提供一些参考和启发。

## 1 AFM研究蛋白质晶体生长工作原理

原子力显微镜是利用探针表面原子与样品表面原子之间的相互作用力,在接触和非接触两种模式下进行工作从而获得样品表面信息的。原子力显微镜的很多特点使得它在研究蛋白质晶体生长方面有着突出表现,特别是由于它可以在母液存在下对正在生长的蛋白质晶体表面进行扫描而不会影响其生长,这就弥补了扫描隧道显微镜(STM)的不足,使得研究溶液中进行蛋白质晶体生长成为可能,甚至在有溶液的环境

\* 收稿日期:2004-03-08

基金项目:国家重点基础研究项目(G19990756);国家自然科学基金资助项目(30070162)

作者简介:汪盛(1972-),男,四川南充人,重庆大学博士研究生,从事蛋白质晶体生长研究。

中还可以得到晶体表面清晰的晶格分布情况,图 1 是进行蛋白质晶体生长研究时的 AFM 工作示意图。在用 AFM 对生物样品进行扫描时,要选取用弹性常数低(0.01 ~ 0.05 N/m)、曲率半径小(<10 nm)的探针进行工作,而且扫描时尽量采用比较慢的速度(0.5 ~ 1 行/s),这样才能得到较为清晰的蛋白质晶体表面形貌。

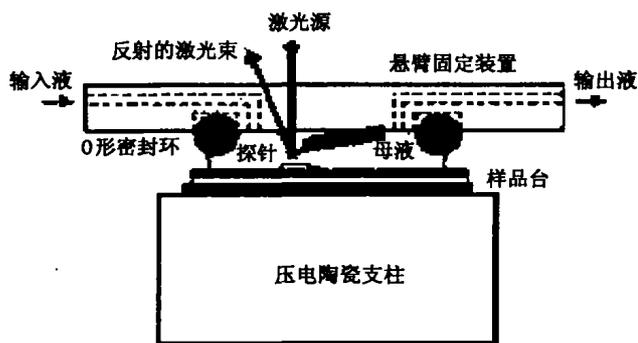


图 1 原子力显微镜研究蛋白质晶体生长工作示意图

## 2 AFM 研究的大分子晶体生长机理

生物大分子(包括蛋白质及其复合物,病毒和核酸等),由于其自身所具有的特点及其在生长实际中所处的环境与小分子不一样,因而常常在其晶体生长过程中表现出不同于小分子的特点,它们的分子量大,表面结构复杂,甚至还带有复杂的电荷以及在溶液中的传质速度慢等特点,都会影响它们在结晶过程中的行为。晶体生长是一个从单分子到分子聚集体再到晶体的过程,当溶液中一旦有“临界核”形成后,大分子晶体就会以一定的形式进行生长,从而得到一定尺寸的晶体。但是在晶体生长过程中,由于蛋白质种类的不同以及生长时的环境如温度、浓度、沉淀剂种类和 pH 值等因素影响,分别会采取如下所述不同的生长机理。

### 2.1 二维台阶生长

对于大多数大分子晶体,如溶菌酶(lysozyme),淀粉酶(amylase),甜味蛋白(thaumatin),脂肪酶(lipase)和过氧化氢酶(catalase)等,主要的生长机理为晶体表面的二维成核生长并进行横向扩展<sup>[11]</sup>。在 lysozyme, thaumatin, lipase 及 catalase 的晶体表面上,在几乎全部的过饱和度范围内,二维成核明显在这几种晶体生长过程中起了主要的控制生长机理的作用,有的甚至在接近平衡浓度时仍然是这样的。对于小分子晶体的溶液生长来说,二维成核倾向于在高过饱和度

的情况下发生,而通常在低过饱和度下会发生位错生长机理。

### 2.2 螺旋位错生长

对于斜方晶系的刀豆球蛋白(canavalin)和 tRNA 晶体生长而言,其主要的生长源是螺旋位错生长模式:单螺旋,双螺旋,左手和右手螺旋以及多重相互作用的螺旋<sup>[6,11-12]</sup>。这些螺旋生长方式在低浓度的 lysozyme, 木聚糖酶(xylanase), lipase 和偶尔在 thaumatin 晶体表面发生,与小分子晶体生长位错一致,并由螺旋位错产生新的生长台阶进行横向生长。然而与小分子的模型不同的是,大分子晶体表面通常是多个螺旋位错同时产生生长台阶,而并没有哪一个螺旋位错在晶体生长过程中占主要地位。其位错密度对于斜方的 canavalin 来说有相当的密度,大约在  $10^5 \sim 10^6 \text{ cm}^{-2}$ 。

### 2.3 法向生长

这种机理在立方的去铁铁蛋白(apoferritin)晶体表面上可以观察到,在某些条件下,对于四方的 lysozyme 和三方的 catalase 晶体,其晶面发展相当粗糙并且是通过随机的密集成核来进行的。这样的过程也就是所谓的法向生长。这对于小分子晶体来说是少见的,尤其是对于从溶液或从气相中生长出来的晶体更是如此<sup>[13]</sup>。

### 2.4 三维成核生长

对于 STMV (Satellite Tobacco Mosaic Virus) 的结晶,在很大的过饱和度范围内,其晶体表面生长的情况与其他晶体有略微的不同<sup>[11]</sup>。在很高的过饱和度情况下,与其他晶体呈现出相同的特性。在低过饱和度情况下,二维成核情况与其他晶体仍然有着类似的生长方式。但是当过饱和度在相当低的时候,三维成核便成为晶面生长的主要方式,三维核连续沉积并吸附到晶体表面,从而进行大层面的晶体生长,且没有发现任何螺旋位错的生长情况。这样在小分子里最常见的机理就不适用于这个大分子晶体的生长情况。

### 2.5 生长台阶发展的不对称性

AFM 观察结果表明,在大分子结晶过程中,一个有趣的事实是,二维成核生长和螺旋位错生长中出现的不对称性<sup>[14]</sup>。在晶体内部,一个分子与另一个分子有着完全一样的化学和物理环境,但是在晶体表面的分子,甚至对称相关的分子却并非如此。基于其所占的不对称单元的位置的不同,分子可能形成不同的分子间的相互作用,并露出一部分的分子表面朝向溶

剂界面。因此,分子能以不同的速率进入到晶格中去,便形成了生长台阶发展的不对称性。

## 2.6 晶体快速生长机理

由于大部分蛋白质晶体的生长速度都很慢,通常需要数天或数周,有的甚至需要数月,因此,如何进行快速而有效的晶体生长并能得到高质量的晶体一直是晶体学家们所关注的问题。最近,在对杜仲抗真菌蛋白(*eucommina* antifungal protein, EAFP)进行的 AFM 研究中发现,这种晶体生长极为快速,可以在几个小时内就长成足够大的晶体,而且对 X 射线的衍射能力极强。在实验室里对这种蛋白质的快速生长机理进行了研究,发现 EAFP 在生长过程中表现出与别的晶体不同的特性:在短时间内快速形成多层小晶核,然后进行横向扩展:台阶分裂与合并,这就使得单位时间内在晶体表面横向和纵向的生长速率提高很多,从而表现出整个晶体生长快速,笔者采用原子力显微镜对其生长速度进行了定量的研究,并讨论了影响其生长速率的原因<sup>[15-16]</sup>。另外笔者还对一种我国所特有天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)的晶体生长进行了研究,发现其在生长过程中表现出与别的晶体不一样的特性,存在由对称性控制的非线性三维成核过程(尚未发表的结论)。

## 3 空间蛋白质晶体生长及前景展望

蛋白质晶体生长过程是一种非平衡态过程,涉及传热、传质和固-液界面物质交换,其动量和质量的输运是通过宏观对流和微观扩散实现的。因此,重力是影响这一过程的重要因素。部分空间实验证明,微重力是改善蛋白质晶体生长的重要环境。但迄今对空间蛋白晶体生长的过程和机理都不清楚,实验结果处于随机状态。

20 世纪 80 年代初期,欧美及日本等国家相继开展了空间蛋白质晶体生长的研究<sup>[14,17-19]</sup>,我国在这方面的研究工作也开展了约 10 年时间,分别利用返回式卫星、航天飞机、和平号空间站等空间飞行器,进行了上百次空间蛋白质结晶实验。2002 年 3 月 25 日发射的神舟“三号”飞船,经过 7 天的飞行试验,进行了蛋白质和其他大分子的空间晶体生长实验,飞船上装载有我国自行研制的第二代空间蛋白质结晶装置,大部分蛋白均是从中国特有资源中提取出来的。经过飞行实验,研究人员在空间微重力环境中获得了结构完整

的蛋白质晶体样品。从目前来看,在空间生长的蛋白质晶体有 60% 的晶体优于地面生长的同类蛋白质晶体,甚至有在地面不能长出的晶体在空间进行了很好的生长。通过微重力条件下的蛋白质晶体生长发展了一些空间结晶技术,生长出一些质量较高的蛋白质晶体,同时使我们对其生长机理加深了认识,也为研究蛋白质结构与其特殊功能的关系提供了条件。相信今后空间蛋白质晶体生长将对结构生物学、生物制药及蛋白质组学研究产生重大影响,随着空间技术的发展及空间蛋白质晶体生长工作的进一步开展,一些地面难以生长而又十分重要的蛋白质晶体将有可能通过空间技术得到,这项很有希望的空间生物技术,将会呈现出更加巨大的科研和应用前景。

## 4 结 语

尽管人类基因组计划(HGP)取得了划时代的成功,但得到的仍只是如天书般的“序列”,而真正在生物体内对生命活动起着重要作用的是蛋白质,现在生物学专家们都将注意力转到后基因组时代所面临的蛋白质组学研究上来,其主要的任务是要研究成千上万的蛋白质是如何在生物体内进行复杂的生命活动的。而这又要基于所有这些蛋白质分子自身的三维结构及各个分子间相互不同的特殊的功能结构,然而目前 PDB 库中已知的蛋白质三维结构仅约 1 万个,且主要是靠用 X 单晶衍射得到的<sup>[20]</sup>,这么少的三维结构信息远远不能满足后基因组时代的需要。因此只有尽可能地得到这些蛋白质分子的精确的三维结构,从而才能以其结构为基础来深入讨论研究它们在生物体中所发生的相关的生命活动与其结构之间的关系,解开生命之谜。通过研究蛋白质优良单晶体生长的规律,包括从分子到聚集体到完整的单晶体这一全过程,用以指导地面和空间的蛋白质晶体生长,建立高效优质培养蛋白质晶体的新方法,使蛋白质晶体生长从经验走向科学,这将是生物大分子晶体学家们所关注的问题,这也使得研究蛋白质晶体生长显得尤为重要。

### 参考文献:

- [1] MCPHERSON A. Crystallization of Biological Macromolecules[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- [2] 王大成. 后基因组时代中的结构生物学[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(4): 340-344.
- [3] DURBIN S D, CARLSON W E. Lysozyme crystal growth stud-

- ied by atomic force microscopy[J]. *J Cryst Growth*,1992,122:71-79.
- [4] DURBIN S D, CARLSON W E, SAROS M T. In situ studies of protein crystallization by atomic force microscopy[J]. *J Phys D: Appl Phys*, 1993, 26:128-132.
- [5] NAKADA T, SAZAKI GEN, MIYSHITA M, et al. Direct AFM observations of impurity effects on a lysozyme crystal[J]. *J Cryst Growth*, 1999,196:503-510.
- [6] LAND T A, YOREO J J DE. The evolution of growth modes and activity of growth sources on canavalin investigated by in situ atomic force microscopy[J]. *J Cryst Growth*, 2000, 208:623-637.
- [7] YAU S T, THOMAS B R, VEKILOV P G. Molecular mechanisms of crystallization and defect formation[J]. *Physical Review Letters*,2000, 85:353-356.
- [8] LI H Y, PEROZZO M A, KONNERT J H, et al. Determining the molecular-packing arrangements on protein crystal faces by atomic force microscopy[J]. *Acta Cryst*, 1999, D 55:1 023-1 035.
- [9] LI M R, NADARAJAH A, PUSEY M L. Determining the molecular growth mechanisms of protein crystal faces by atomic force microscopy[J]. *Acta Cryst*,1999, D55:1 036-1 045.
- [10] KUZNETSOV YU G, KONNERT J, MALKIN A J, et al. The advancement and structure of growth steps on thaumatin crystals visualized by atomic force microscopy at molecular resolution[J]. *Surface Science*,1999,440:69-80.
- [11] MALKIN A J, KUZNETSOV Y, LAND T A, et al. Mechanisms of growth for protein and virus crystals[J]. *Nat Struct Biol*,1995,2(11):956-959.
- [12] NG J D, KUZNETSOV Y G, MALKIN A J, et al. Visualization of RNA crystal growth by atomic force microscopy[J]. *Nucleic Acids Res*,1997,25(13):2 582-2 588.
- [13] CHEMOV A A. Roughening and melting of crystalline surfaces[J]. *Prog Cryst Growth*,1993,26:195.
- [14] DELUCAS L J, SMITH C D, SMITH H W, et al. Protein crystal growth in microgravity[J]. *Science*, 1989, 246:651-654.
- [15] 汪盛,向焯,李根培,等. 杜仲抗真菌蛋白(EAFP)晶体生长的AFM研究:快速生长与晶面生长速率[J]. *生物化学与生物物理进展*,2003,30(5):784-791.
- [16] 汪盛,向焯,蔡绍哲,等. 用AFM研究杜仲抗真菌蛋白的晶体生长[J]. *重庆大学学报(自然科学版)*,2004,27(3):100-103.
- [17] DELUCAS L J. Preliminary Investigation of Protein Crystal Growth Using the Space Shuttle[J]. *J Crystal Growth*, 1986,76:681-693.
- [18] DELUCAS L J. Micro gravity Protein Crystal Growth Results and Hardware[A]. Eighth American Conference on Crystal Growth, Vail[C]. Colorado: *J Crystal Growth*, 1991.109:12.
- [19] MCPHERSON A, DAY J. Macro molecular Crystal Growth Experiments on International Microgravity Laboratory 1[J]. *Protein Science*, 1992,1:1 254-1 268.
- [20] ANDRZEJ M K, PIOTR Z. Models of protein crystal growth[J]. *Biophysical J*, 2001,91:1-20.

## Mechanism and Progress About Protein Crystal Growth by Atomic Force Microscopy

WANG Sheng<sup>1,3</sup>, CAI Shao-xi<sup>1</sup>, WANG Da-cheng<sup>2</sup>

(1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China;

2. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

3. National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** Atomic Force Microscopy (AFM) plays a very important role in researching crystal growth mechanism, especially protein crystals. The principle of AFM for protein crystal examination is briefly described as well as the importance of research on protein crystal growth, known growth mechanisms including 2-D steps nucleation, spiral dislocation, normal growth, 3-D nucleation and anisotropic development, and latest progress about *eucommia* antifungal protein (EAFP) and Trichosanthin (TCS) protein crystal growth mechanism, respectively. Finally, protein growth under microgravity environment is also expounded here and their development tendency and practical prospect.

**Key words:** Atomic Force Microscopy; protein crystals; growth mechanism; microgravity environment

(编辑 李胜春)