

文章编号: 1000-1190(2007)02-0249-05

杜仲抗真菌蛋白(EAFP)晶体动态生长研究

汪 盛^{1,2*}, 向 焯¹, 李根培², 王大成^{2,3}

(1. 华中科技大学 先进生物材料研究中心, 武汉 430074; 2. 中国科学院 力学研究所国家微重力实验室, 北京 100080;
3. 中国科学院 生物物理研究所结构和分子生物学研究中心, 北京 100101)

摘 要: 杜仲抗真菌蛋白(*eucommia* antifungal protein, EAFP), 含有 41 个氨基酸残基, 其中有 10 个半胱氨酸, 半胱氨酸间形成的二硫桥键使分子构象很稳定. EAFP 的晶体属单斜晶系, 空间群为 $P2_1$, 晶胞参数为: $a = 1.9085 \text{ nm}$, $b = 2.3225 \text{ nm}$, $c = 3.0854 \text{ nm} \cdot 10^{-6}$, $\beta = 98.64^\circ$, 分子量为 4 158.9. EAFP 晶体生长速度快, 对 X 射线的衍射能力强, 很值得研究其生长的机理. 利用原子力显微镜(AFM)对 EAFP 晶体的{100}面进行动态的生长研究, 发现在中低过饱和度下主要以各向异性的单双链螺旋位错的生长模式进行生长, 详细研究了这种螺旋的形成机制, 并探讨了其结构基础.

关键词: 杜仲抗真菌蛋白; EAFP; 晶体生长; 单双链螺旋位错; 原子力显微镜

中图分类号: Q633

文献标识码: A

原子力显微镜(AFM)是近 20 年来发展起来的一种高精度的表面测试仪器, 由于 Binnig 等人成功地将它运用于溶液中的晶体生长研究, 使得近年来这一技术得到越来越广泛而深入的应用^[1-2]. 原子力显微镜能实时原位地对样品进行观察, 同时具有纳米甚至埃级的高分辨率, 因此能得到许多有关生物大分子晶体表面的微观参数, 为解释许多微观的现象提供了宝贵的资料^[3]. 目前, 研究晶体生长主要采用的手段有: 动态光散射法(Dynamic light scattering), 干涉仪法(interferometry), X 射线衍射(x-ray diffraction)和原子力显微镜法(AFM). 大多数研究集中在晶体的缺陷(包括点缺陷、线缺陷、面缺陷、堆积错误和螺旋位错)及生长面机理方面(二维成核、三维成核、法向生长等)^[4-7].

迄今为止, X 射线结晶学测试手段仍是进行生物大分子结构测定的主要方法, PDB 库中现存的大分子结构大部分是用这种方法所测得的. 获得大分子精确的结构信息, 对于研究它们的生物学功能, 进行更新的药物开发探索, 有着十分重要的意义. 但是, 这种方法有着自身的缺点, 即必须制得样品的单晶体, 且具有一定尺寸. 然而, 生物大分子往往不容易进行晶体生长, 这就成了结构测定工作的瓶颈, 阻碍着晶体学家的研究, 特别是现今处于后基因组时代, 更是需要测定大量的大分子结构才能

更充分阐明许多生理过程. 因此, 研究如何进行生物大分子晶体生长及其生长的机理显得很有必要.

EAFP 是取自杜仲树皮(*Eucommia ulmoides Oliv bark*)的一种抗真菌蛋白, 含有 41 个氨基酸残基, 分子量约为 4 100, 富含半胱氨酸^[8], 其精确的结构已被测定, 分辨率高达 0.08 nm ^[9]. 在前期的实验中发现 EAFP 晶体生长快速, 并对其快速生长的特性进行过初步研究^[10-11]. 为了阐明 EAFP 晶体生长机制及其生长动力学行为, 本文利用 AFM 对 EAFP 的晶体生长进行了详实的研究, 实验中选用数颗生长质量好的晶体作为研究对象, 进行原位实时的动态观察.

1 实验部分

1.1 蛋白样品及晶种培养

EAFP 粗品来自云南山区的杜仲树皮(*Eucommia ulmoides Oliv*), 结晶实验前用 AKTA 纯化仪对粗品进行进一步纯化. AFM 实验用的 EAFP 晶种用汽相扩散法进行生长, 悬滴体积为 $4 \mu\text{L}$, 由 10 g/L EAFP 和等体积的池液混合而成. 池液体积 $500 \mu\text{L}$ (由 1.5 mol/L NaAc 和 1 mol/L HAc 混合得到, $\text{pH} \sim 5.5$), 选择适宜于的晶体用于 AFM 实验. 经常规方法测定蛋白质在溶液中的平衡浓度 C_e , 过饱和度和 s 由实际浓度 C 与 C_e 表示: $s = \ln(C/C_e)$.

收稿日期: 2006-12-07.

基金项目: 中国科学院重要方向性创新资助项目(KSCX2-SW-322, KSCX2-SW-17).

* Email: wts crystal@sina.com.

1.2 实验设备及方法

本实验进行 EAFP 蛋白晶体的表面形貌的研究时所用的原子力显微镜是 AutoProbe CP Research (Park Scientific Instruments). 采用 Data Acquisition 软件 (1.6 beta 版) 进行仪器控制及 AFM 图像数据收集工作. 用 Image Processing and Data Analysis Ver. 2.1.1 (ThermoMicroscopes, Copyright 1998) 及 ThermoMicroscopes SPMLab NT Ver. 5.01 (Copyright 2000 ThermoMicroscopes Inc.) 进行图像的相关处理及分析.

为了得到高质量的晶体表面生长图片, 选用了尖的 AFM 探针 (Microlever C 或 D 针, 曲率半径小于 20 nm), 同时具有较小的弹性系数 (0.01 ~ 0.03 N/m), 以减少探针对晶体表面的损害. 在原位实时动态实验中, 所有图片均采用恒力模式 (contact mode) 或恒高模式 (tapping mode) 进行. 在恒力模式下, 压力大小在 0.1 ~ 0.3 nN 间, 并小心连续调节尽可能保证最小的作用力; 在恒高模式下, 控制振动频率在 8 ~ 19 kHz, 并调整振幅大小以减少噪音.

1.3 晶体方位取向确定

为了确定 AFM 观察的晶体取向与结晶学方位间的对应关系, 选择生长良好的 EAFP 晶体进行单晶衍射实验, 分别在间隔 90 度两个方位获得衍射图片 (在 Mar Research Area detector 上进行). 记下衍射时晶体的取向, 用 mosflm (version 6.20) 进行数据处理, 最终确定其晶胞取向和实际晶体间对应关系, 为讨论分子层面上生长机制提供依据.

2 结果与分析

2.1 单双链螺旋位错机制

由于 EAFP 晶体沿 a 轴方向为薄片状, 比较方便对其 {100} 晶面进行研究. 实验中对数颗 EAFP 晶体在中低过饱和度 ($s = 0.9 \sim 1.5$) 下进行原位实时动态观察. 在这种过饱和度下的 EAFP 晶体主要采取的是一种特别的左手螺旋的生长模式 (如图 1 所示). 从图上可以看出, 在扫描范围 $13.47 \times 13.47 \mu\text{m}^2$ 内仅有一个螺旋位错存在. 与别的蛋白质晶体生长相比, 这种密度是很低的, 有时甚至在整个晶面上也只有一个螺旋位错存在. 充分表明, 在较低的过饱和度下, EAFP 晶体主要受控于这种生长方式. 外形上看, 这个螺旋形状明显呈椭圆形, 即生长具有各向异性. 生长的台阶高度为 $2.0 \pm 0.2 \text{ nm}$, 正好与 a 轴方向单位长度相当^[9]. 同时, 发现这种形状与整个晶体外形几乎一致, 显然这个生长中心对整个晶体形状进行控制.

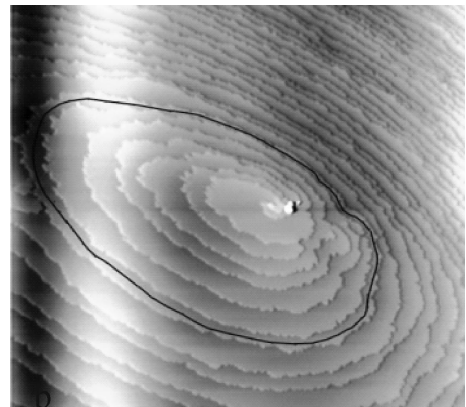


图 1 EAFP 晶体表面螺旋位错

Fig. 1 A spiral dislocation on a surface of EAFP crystal

在生长中心处在一个小的聚集体沉积. 黑色椭圆表示生长台阶. (扫描尺寸: $13.47 \mu\text{m} \times 13.47 \mu\text{m}$)

从图 1 还可看出, 生长开始时错层的螺旋位错经过 8 到 9 层的生长层后完全融合成一个完整的单层 (用黑色椭圆表示). 经长时间观察发现, 这种现象总是存在. 这样, 第 8 或 9 层成为临界生长层, 在其上为左手螺旋, 下面为完整的单层侧向生长. 尽管存在螺旋位错, 但由于这种现象存在, 使得在 EAFP 晶体表面生长缺陷较少, 晶体质量自然也就较高了. 为何 EAFP 晶体表面出现这种特别现象; 是受什么因素控制的, 均有待于进一步研究证实.

2.2 单双链螺旋位错生长源

在大范围的 AFM 扫描中, 只能得到晶体表面粗略的形貌. 为了更详细地了解生长中心的情况, 扫描范围慢慢缩小, 最后集中在生长中心附近. 结果发现如图 2 所示的有趣的螺旋生长图. 仔细分析这些连续扫描的 AFM 图片后不难看出, 在螺旋位错的中心, 有两个生长源头按左手规则进行螺旋生长, 其中一个较大另一个则较小. 特别有意思的是, 其中的一个生长头在拐角处一分为二, 形成两个连在一起的生长台阶 (图 2C). 这样就形成了一种特别的单双链螺旋位错的生长中心, 这在别的晶体生长中很少有这种情况存在. 这个生长中心相对稳定, 在长时间观察中不消失. 溶液中的分子或聚集体通过扩散或吸附作用, 沉积到这个中心处, 作为新的生长源形成新的生长头, 进而侧向生长.

在图 2 A-D 显示出双螺旋头在 EAFP 晶体表面从小到大的连续的生长过程, 且生长头的形状也是椭圆状的 (图 2B 中用椭圆圈表示). 可以看出螺旋生长头一开始就与整个螺旋的形状保持高度一致. 当生长头长到一定的尺寸后, 另一个单头就开始生长

于双头之上图 2C 中的箭头 2 表示. 这样轮流进行, 一直保持着生长中心的活性并控制着整个晶面的生长, 包括法向和侧向的生长. 新的生长头也总是在比较固定的位置出现, 如图 2C 的箭头 2 和图 2D 中的箭头处, 以小芽苞状的生长点开始生长. 这样新的

芽苞与老的之间沿 b 轴与结晶学相关联, 据推测这可能是受结晶学对称控制的生长, 也是其生长驱动力所在. 由于最后螺旋位错层会融合在一起, 因此, 如图 2C 箭头 3 所示的右手小螺旋起着重要的作用, 直到生长层合并后, 右手螺旋也就消失了.

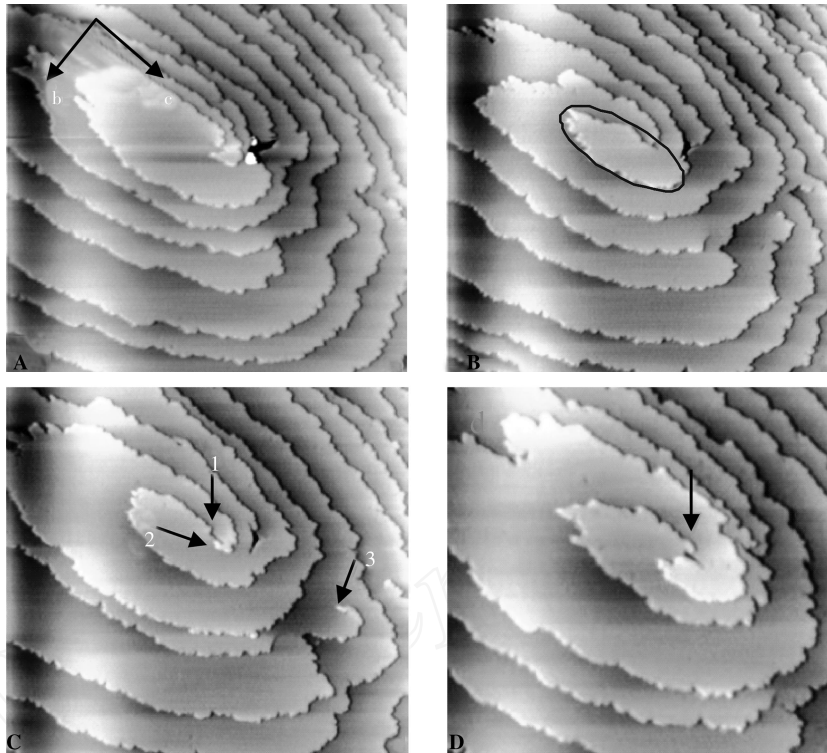


图 2 一系列连续扫描得到的 AFM 图, 显示出了明显的单双链螺旋生长特征

Fig. 2 Sequences of AFM images indicating the single-double spiral dislocations on the surfaces of EAEP crystals
生长中心符合左手螺旋规则且表现出沿 b 轴的 2_1 螺旋轴对称性控制生长. (扫描尺寸: $8 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$)

为了弄清 EAEP 晶体表面出现的这种生长现象, 在长时间对多颗晶体进行连续原位实时动态的 AFM 观察中, 成功捕获到单双链螺旋位错生长中心的形成过程, 如图 3 所示. 从这些图上可以看出刚开始时两个台阶分开的, 随着生长继续, 它们之

间形成了一个长 $0.19 \mu\text{m}$, 宽 $0.15 \mu\text{m}$ 的分子链桥(图 3A 中的右侧箭头). 从图 3B 显示的是另一个长为 $0.921 \mu\text{m}$, 宽为 $0.285 \mu\text{m}$ 的桥连, 还可看到尚未长完全的空洞存在. 这样两个分开的台阶共享一个生长头, 继续侧向生长, 而生长头则沿左手螺旋

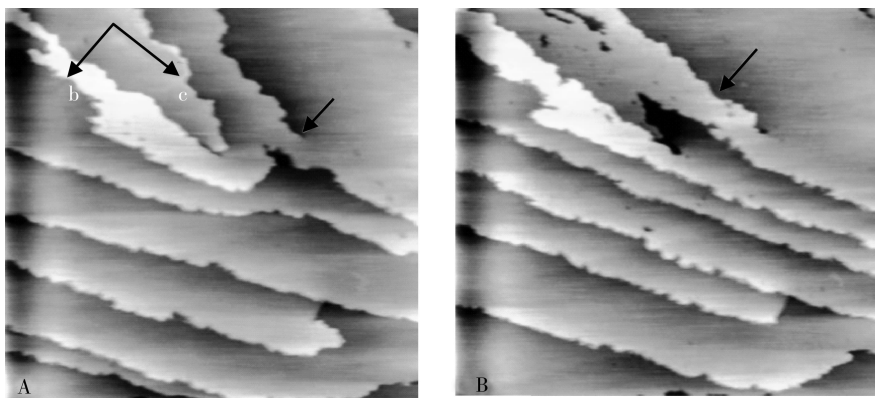


图 3 EAEP 的 {100} 晶面上单双链螺旋位错形成机制

Fig. 3 The formation mechanism of single-double spiral dislocation on {100} faces
图中用箭头表示连接两个台阶间的分子链桥, 使得分开的两个生长台阶合并起来(扫描尺寸: $3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$).

方向垂直于晶面向上进行生长。

2.3 不对称螺旋位错生长结构基础

EAFP 晶体 {100} 面上不对称的生长位错中心呈椭圆状,即台阶生长具有各向异性,这种宏观的表现与其内部结构是相对应的.图 4 表示 EAFP 分子在晶体的相互作用关系,这是从 EAFP 分子间相互作用分析所得结果,这就为 AFM 结果分析提供了分子基础,甚至是整个晶体^[9].螺旋位错生

长中心形似椭圆状,其长轴与结晶学 c 轴对应,短轴与结晶学 b 轴对应.在图 4A-B 显示了不同方位的 space filling 模型图,分别沿结晶学 a 和 b 轴投影,图 4A 表明沿 c 轴,3 个 EAFP 分子有紧密的接触,几乎没有空洞存在,而沿着结晶学 b 轴,则明显存在着空余的空间,即沿这个方向的作用相对较弱,而沿 c 轴方向则明显强于 a 轴方向.

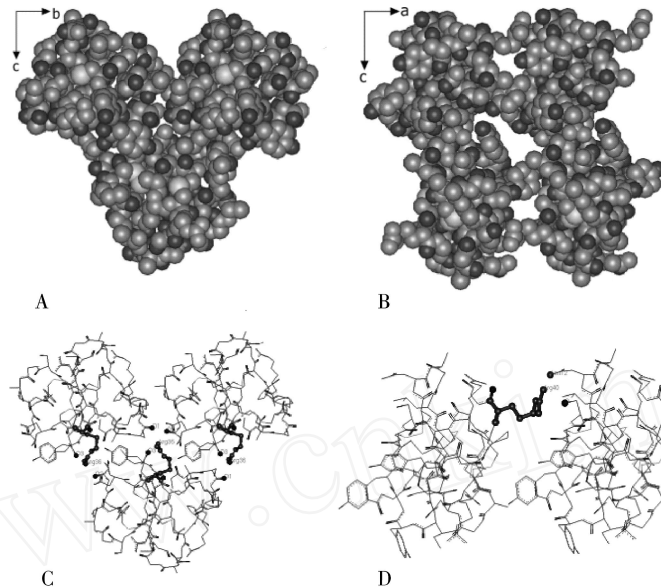


图 4 EAFP 晶格内分子间相互作用图

Fig. 4 The intermolecular interaction in the EAFP crystals

上排为 space filling 结构模型,分别沿着结晶学 a 轴和 b 轴投影;

下排为上图对应的线型结构图,其中相邻分子间强作用的残基用球棍模型表示.

图 4C-D 显示的是线型结构图,其中有直接作用的残基用球棍模型表示.通过仔细分析图中所列的残基作用发现:图 4C 中沿 c 轴方向,有 3 个 Arg36 残基与来自另一个分子残基上的 O 原子相互作用,或还有 11 个通过水分子介导的相互作用,这就使得沿这个方向上的接触更紧密,作用更强;而沿 b 轴方向仅在 Arg40 和 Cys11 间存在着的盐桥,使得这个方向上有较强的作用,但从图 4D 中可以看出 EAFP 分子间仅存在有限的作用^[10].而实验中发现,沿 c 轴向的台阶生长速率为沿 b 向两倍,也与 EAFP 的结构基础是相一致的^[9].

3 结论

利用 AFM 研究了 EAFP 动态生长特性,结果表明在中低过饱和度 ($s = 0.9 \sim 1.5$) 下, EAFP 晶体 {100} 面上主要生长模式为特别的单双链螺旋位错生长,生长源的密度较低.生长中心呈现出明显

各向异性,并与整个晶体外形相对应.生长中心同时也对整个晶体形状进行控制.通过 AFM 研究,获得了 EAFP 晶体表面的单双链螺旋位错形成的详细过程,并讨论了单双链螺旋位错形成机理:在晶体生长过程中双台阶的最初是分开的,然后在它们之间形成一个分子链桥连接着.整个生长中心一直主要受控于左旋生长方式.当台阶生长进行到第八到第九层时,它们会合并成一个完整的椭圆形单层.在台阶的合并处,右手的螺旋生长会出现,但随生长层合并会消失.可推测在 EAFP 晶体中, EAFP 分子不仅构象稳定,而且具有较强的调节能力,以适应周围分子环境,结果导致晶体结构密实,衍射能力强.

基于 EAFP 高分辨率的结构,对 EAFP 晶面上各向异性生长中心进行分析.由于分子间沿不同方向具有不同的作用(主要是氢键),使得各个方向上的生长速率也不一样.沿 c 方向上的生长快于沿

b 方向上的,而沿 a 方向上的作用较弱,生长更慢,整个晶体主要呈现出薄片状.这也是与 AFM 实验所得到的结果相一致的.由于这种晶体生长速度快,可作为研究生物大分子晶体生长的模型来研究晶体生长的机理,以期晶体学家提供晶体生长实践的理论基础.

参考文献:

- [1] Binnig G, Rohrer H, Gerber C, et al. Tunneling through a controllable vacuum gap[J]. Appl Phys Lett, 1982, **40**(2): 178-180.
- [2] Durbin S D, Carlson W E. Lysozyme crystal growth studied by atomic force microscopy[J]. J Cryst Growth, 1992, **122**:71-79.
- [3] McPherson A. Crystallization of Biological Macromolecules [M]. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- [4] Monaco A, Rosenberger F. Growth and etching kinetics of tetragonal lysozyme[J]. J Cryst Growth, 1993, **129**:465.
- [5] Vekilov P G, Ataka M, Katsura T. Laser Michelson Interferometry investigation of protein crystal growth[J]. J Cryst Growth, 1993, **130**:317-320.
- [6] Plomp M, McPherson A, Larson SB, et al. Growth Mechanisms and Kinetics of Trypsin Crystallization [J]. J Phys Chem B, 2001, **105**:542-551.
- [7] Kuznetsov Y G, Malkin A J, McPherson A. The influence of precipitant concentration on macromolecular crystal growth mechanisms[J]. J Cryst Growth, 2001, **232**:114-118.
- [8] Huang RH, Xiang Y, Liu XZ, et al. Tow novel antifungal peptides distinct with a five disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. FEBS Letters, 2002, **521**: 87-90.
- [9] Xiang Y, Huang R H, Liu W, et al. Crystallization and preliminary crystallographic studies of a novel antifungal protein with five disulfide bridges from *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. Acta Cryst, 2002, **D58**:1 838-1 840.
- [10] 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.
- [11] Wang S, Xiang Y, Huang R H, et al. Surface Morphology and Kinetic property in Rapid Growth of Protein Crystallization Investigated by Atomic Force Microscopy [J]. Acta Cryst, 2005, **D61**:826-831.

EAFP crystal growth observed by in situ atomic force microscopy

WANG Sheng^{1,2}, XIANG Ye³, LI Genpei^{2,3}, WANG Dacheng^{2,3}

(1. Advanced Biomaterials and Tissue Engineering Center, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074; 2. National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080; 3. Center for Structural and Molecular Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: EAFP (eucommia antifungal protein) is a cysteine-rich peptide consisting of 41 amino residues. EAFP crystals belong to monoclinic form, with $P2_1$ space group and the unit cell parameters: $a = 1.9085 \text{ nm}$, $b = 2.3225 \text{ nm}$, $c = 3.0854 \text{ nm}$, $\beta = 98.64^\circ$, $M_w = 4158.9$. To our surprised, EAFP crystals grow much faster than most of other macromolecular crystals. We have studied the {100} faces of the EAFP crystals by in situ atomic force microscopy in their mother liquor. One type of different anisotropic single-double-like spiral dislocation was found on the {100} faces of EAFP crystals. We have also studied the spiral dislocation sources in more details to find its formation process at low-to-moderate supersaturations and discussed its crystallographic basis to control source center and the whole dislocation growth topography.

Key words: EAFP; antifungal protein; crystals growth; anisotropic; single-double dislocation