

文章编号 :1000-6281(2008)01-0064-03

溶菌酶晶体形貌的原子力显微成像观测

刘玉红,于泳*,康琦

(中国科学院力学研究所微重力实验室,北京 100080)

摘 要: 为研究蛋白质晶体的生长机理,采用气相扩散法制备溶菌酶晶体,使用原子力显微成像技术观测了溶菌酶晶体(101)生长面的形貌。发现溶菌酶晶体(101)面生长呈现螺旋位错的特征,其台阶平均高度为 2.9 nm,相当于单分子层的厚度。而以前在高过饱和度条件下得到的溶菌酶晶体的 AFM 图像显示为二维成核生长机理,其台阶高度为双分子层的厚度 5.6 nm。这说明气相扩散法制备蛋白质晶体时,由于溶液的过饱和度较小,溶菌酶在溶液中可能不形成多聚物而是以单个分子的形式结合到晶体上,即(101)面的主要生长单元并非具有 4₃ 螺旋结构的四聚体,而是溶菌酶单分子。这一结果为蛋白质晶体生长机理的探索提供了实验依据,是对溶菌酶晶体生长单元认识的补充。

关键词: 蛋白质晶体;溶菌酶;原子力显微镜;气相扩散法

中图分类号: O78; TG15.21⁺5.7 **文献标识码:** A

在分子生物学和药物学研究中,X-射线晶体衍射方法是测定分子结构模型的主要手段。经近十多年的发展,其相关实验技术和结构测定技术已趋完善。而该方法成功的前提是要获得大体积且高质量的蛋白质晶体样品。相比之下,如今仍缺少能指导蛋白质结晶实践的理论和技巧。因此,如何制备大体积且高质量单晶是使用 X-射线衍射法测定蛋白质分子三维结构的瓶颈。蛋白质晶体的生长是一个受多因素影响的,复杂的物理化学过程。其中,如浓度、温度、pH 值、沉淀剂、流场等和人们尚未了解的其它一些因素,都会影响晶体生长速率、晶形和晶体表面形貌,从而影响最终结果。深入研究蛋白质晶体生长机制,了解和控制这些因素对复杂物理化学过程的影响,对建立能指导结晶实践的蛋白质晶体生长机理相关理论和技巧有一定意义。迄今,人们用不同的实验技巧观察和研究了不同蛋白质晶体表面形貌的变化,以及蛋白质结晶机理。原子力显微成像技巧是近二十年发展起来的,能够在分子水平上观察材料表面形貌的重要技巧。由于该技巧在溶液环境下能够进行直接的实时、原位观测,在生物大分子晶体生长相关研究中已得到广泛应用^[1]。

溶菌酶是研究蛋白质晶体生长机理的主要模型蛋白,Nimura 等^[2]及 Konnert 等^[3]曾使用原子力显微镜研究了批量法制备溶菌酶晶体的生长情况。

本文用气相扩散法制备溶菌酶晶体,用原子力显微成像技巧观测了晶体的(101)面表面形貌,研究了气相扩散法制备的溶菌酶晶体的生长机理。

1 材料与方法

用结晶级的 Sigma (Cat ,NoL6876 ,Lot NO46F80601)鸡蛋清溶菌酶配制 30 mg/ml 溶菌酶溶液(未做进一步的纯化处理)。在 HAC-NaAC (50 mmol/L ,pH=4.7)缓冲条件下,以 1 mol/L NaCl 溶液为沉淀剂,制备池液为 1 000 μ l NaCl 溶液。将 8 μ l 溶菌酶溶液与 NaCl 溶液等比例混合,制成 16 μ l 悬滴,置于 20 $^{\circ}$ C 恒温箱中静置生长晶体。3 天后,取出靶用溶菌酶晶体,用 AFM AutoProbe CP Research Scanning Probe Microscope (Park Scientific Instruments ,CA)观察。AFM 对溶菌酶晶体进行扫描,分析软件为 ProScan Data Acquisition,扫描速度为 0.5 Hz,采用 Contact 模式。由于蛋白质晶体表面较软,扫描过程中易被针尖损坏,需要用较小的力扫描;同时所用的力太小会影响成像效果。均衡以上因素,选择 Microlevers 06 微悬臂的 D 针,弹性常数为 0.5 nN,室温 25 $^{\circ}$ C 下进行原子力显微成像。所用的化学试剂均为分析纯,并用超纯水配制待用。配制的溶液,使用前经超速离心(10 000 cpr)只取上层液。

收稿日期:2007-05-31;修订日期:2007-08-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 10472127, No. 10432060)。

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(No. 10472127, No. 10432060)。

作者简介:刘玉红(1982-),女(汉族),山东人,硕士。E-mail:liuyuhongjy@163.com。

*通讯作者:于泳(1967-),男(汉族),山东人,副研究员。E-mail:yuyong@imech.ac.cn。

2 结果与讨论

图 1 为使用原子力显微镜观察到的溶菌酶晶体 (101) 面的表面形貌图,是典型的螺旋位错。图 1a 显示溶菌酶晶体 (101) 面不平,起伏较大,晶体的生长中心只占据一部分晶面。在图 1b 的三维岛堆状生长中心,S 处为一螺旋位错。从图中清楚可见,台阶的边缘并不光滑均匀,而呈锯齿状,台阶的生长受到“杂质”影响。又发现在生长中心处有凹陷(如图中箭头所示),该凹陷可能是由于溶菌酶分子因某种原因聚集成 300 nm ×300 nm 所谓的“活性”中心,即台阶生长中心。取出晶体时,生长中心溶解而形成

凹陷。

图 2 是溶菌酶晶体台阶高度的测量图,对图 1b 进行截面分析,测量螺旋位错的台阶高度。通过原子力显微镜图像的处理软件 AFM IP 2.1,在图 1b 所显示的溶菌酶晶体的台阶上画一条线 Line1,得到沿 Line1 的高度剖面图;选择“Measure Height”可得到两个标志点,这里两个标志点均显示为 A。调整 A 的位置,使得一个 A 位于高度剖面的左端,对应一个高度较低的台阶的位置,另一个 A 位于高度剖面的右端,对应最高台阶的位置,两个标志点高度相差的距离包含晶体 5 个台阶高度。如图 2 所示,5 层台阶总高度为 14.34 nm,即每个台阶平均表观高度为

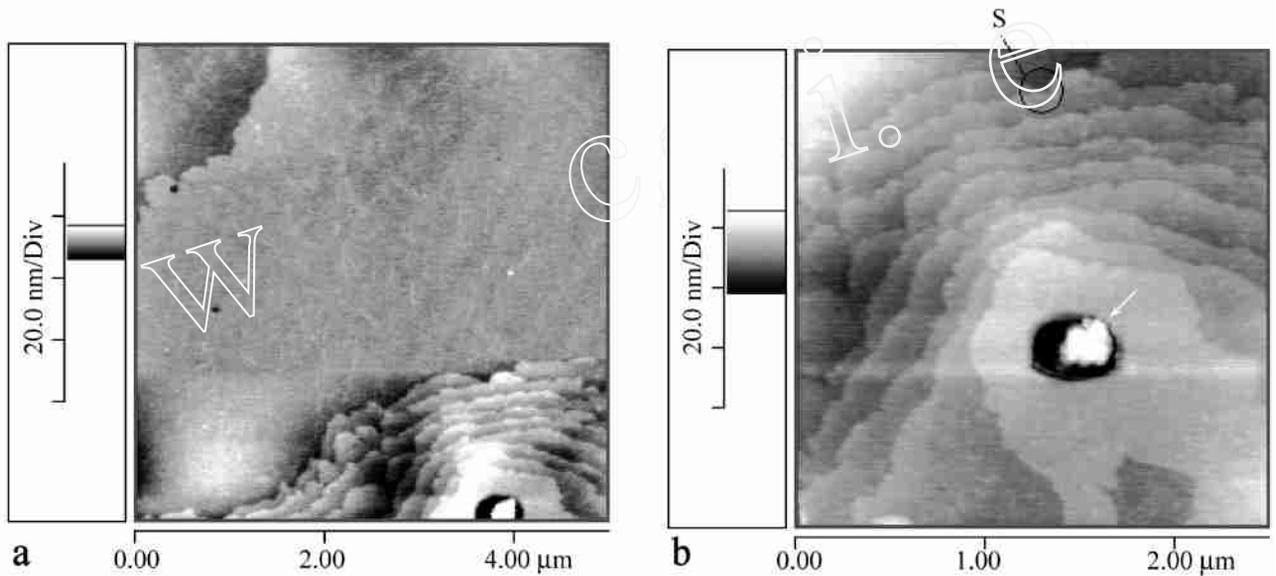


图 1 溶菌酶蛋白质晶体 (101) 面的原子力显微成像图。扫描范围 :a :5 μm ;b :2.5 μm

Fig. 1 The AFM image of the (101) face of lysozyme crystal. Scanning range :a :5 μm ;b :2.5 μm

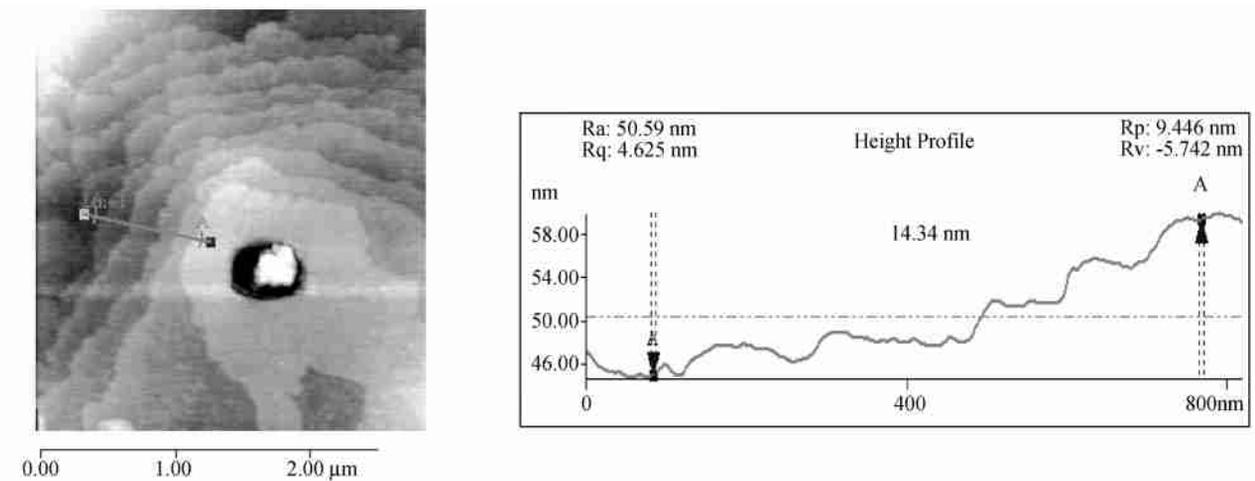
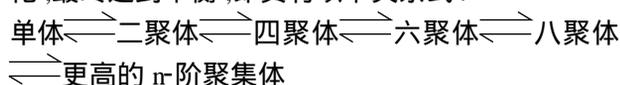


图 2 溶菌酶晶体台阶高度的测量图。

Fig. 2 The metrical image of the step height of the lysozyme crystal.

2.9 nm。溶菌酶蛋白质晶体的结构和生长机理的研究表明: 4_3 螺旋对称元素在溶菌酶蛋白质晶体的结构对称性中占支配地位。蛋白质分子在溶液中形成有序 4_3 螺旋结构聚集体, 然后这些有序聚集体再进入晶格。对台阶生长速率起支配作用的是具有 4_3 螺旋结构的聚集体。也就是说, 具有 4_3 螺旋结构的聚集体是溶菌酶晶体的主要生长单元^[4]。这些聚集体含有数目不等的溶菌酶分子, 它们可以互相转化, 最终达到平衡, 即具有以下关系式:



对于不同的晶面, 虽然起支配作用的生长单元均具 4_3 螺旋结构, 但聚集体内所含蛋白质的分子数可能是不同的。Nadarajah 等的研究认为 4_3 螺旋结构的八聚体为 (110) 面的生长单元^[4], 4_3 螺旋结构的四聚体为 (101) 面的生长单元^[5]。溶菌酶蛋白质晶体结构表明, 在四方晶体中溶菌酶分子呈“四方柱”形状, 其平均尺寸为: 2.80 nm × 2.80 nm × 3.79 nm。因此, 以前溶菌酶晶体的 AFM 显示为二维成核生长机理, 其台阶高度为双分子层的厚度 5.6 nm^[1,4,5]。

在本工作中, 通过原子力显微镜成像得到的溶菌酶蛋白质晶体 (101) 面的表面形貌清楚地表明, 生长中的溶菌酶蛋白质晶体表面呈现典型的螺旋位错的特征, 其每个台阶平均高度为 2.9 nm, 相当于单分子层的厚度。这一结果, 不同于前人所得的结果。

说明气相扩散法制备蛋白质晶体时, 由于溶液的过饱和度较小, 溶菌酶在溶液中可能不形成多聚物而是以单个分子的形式结合到晶体上, 即 (101) 面的主要生长单元并非具有 4_3 螺旋结构的四聚体, 而是溶菌酶单分子。认为由于结晶实验的条件不同, 溶液的过饱和度不同, 溶菌酶在溶液中集聚方式也不同, 导致了溶菌酶晶体生长单元发生了变化, 从而影响晶体生长机制, 反映在表面形貌的不同。

参考文献:

- [1] McPherson A, Malkin A J, Kuznetsov Y G, Plomp M. Atomic force microscopy applications in macromolecular crystallography [J]. *Acta Cryst*, 2001, D57:1053 - 1060.
- [2] Rong L, Yamane T, Niimura N. Measurement and control of the crystal growth rate of tetragonal hen egg-white lysozyme imaged with an atomic force microscope [J]. *J Crystal Growth*, 2000, 217:161 - 169.
- [3] Konner J H, D'Antonio P, Ward K B. Observation of growth steps, spiral dislocations and molecular packing on the surface of lysozyme crystals with the atomic force microscope [J]. *Acta Cryst*, 1994, D50:603 - 613.
- [4] Nadarajah A, Meirong L, Pusey M L. Growth mechanism of the (110) face of tetragonal lysozyme crystals [J]. *Acta Cryst*, 1997, D53:524 - 534.
- [5] Meirong L, Nadarajah A, Pusey M L. Growth of (101) faces of tetragonal lysozyme crystals: determination of the growth mechanism [J]. *Acta Cryst*, 1999, D55:1012 - 1022.

AFM observations of Lysozyme crystals surface morphology

LIU Yu-hong, YU Yong*, KANG Qi

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

Abstract: In order to study the growth mechanism of protein crystals, the surface morphology of (101) face of lysozyme crystals obtained by gas diffusion method was observed by AFM imaging. The growth of (101) face of lysozyme crystals showed a spiral dislocation characteristic, and the average height of the step was about 2.9 nm, which corresponded to unimolecular height. While in the past experiments, the AFM images of lysozyme crystals grown with high supersaturation showed two-dimensional nucleation mechanism, and the height of the step was about 5.6 nm, which corresponded to bimolecular height. The result in this article indicated, when the protein crystal was obtained by gas diffusion method under low supersaturation, the lysozyme in liquid might not form multiple dimers but the single molecule that attached to the crystal face, which was to say the main growth unit of (101) face was not tetramer with 4_3 helix structure but single molecule. This result could be an experimental basis for the studies of growth mechanism of protein crystals and it was the supplement for understanding the growth units of lysozyme crystals.

Keywords: protein crystals; lysozyme; AFM; gas diffusion method

* Corresponding author