

文章编号: 1000-1190(2007)03-0425-06

天花粉蛋白晶体生长的斜锥形成核机制

汪 盛¹, 李根培², 胡文瑞¹, 王大成²

(1. 中国科学院 力学研究所 国家微重力实验室, 北京 100080;

2. 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: 用原子力显微镜(AFM)研究了天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)晶体表面的斜锥形成核过程. 对不同过饱和度下($\sigma = 1.02 \sim 1.65$)的 TCS 晶体成核过程进行了全方位的跟踪观察. 发现在结晶前期, 体系先采用线型生长, 生长成链状聚集体, 再进行侧向链间结合, 最后形成不对称三维斜锥形核; 在后期的成核过程中, TCS 分子以尺寸不一的球形聚集体存在, 并依次连接成串, 进一步形成斜锥形核. 通过 AFM 实验, 详实地观测了 TCS 晶体生长的斜锥形成核过程, 并从结构生物学角度阐释了这一成核现象的微观机制, 给出了两种的成核途径.

关键词: 原子力显微镜; 天花粉蛋白; 晶体生长; 成核机制

中图分类号: Q6-33

文献标识码: A

结晶过程是体系中发生相变的过程^[1-5], 其间伴随着晶核的形成以及后续生长. 通常认为, 这些晶核的结构是由分子或原子紧密排列而成的三维连续体^[6-7]. 成核过程需要克服一定的能垒, 这是与溶液体系的过饱和度及结晶体系性质相关的.

由于结晶体系的复杂性, 生物大分子结晶一直是倍受关注的研究领域. 经典的结晶理论认为: 在结晶条件下, 溶液中的分子趋于形成球形聚集体(有一定大小尺寸的称为晶核). 但由于受研究手段的限制, 对成核过程中所形成的真实核结构了解并不多. 尽管目前很多手段已应用于晶体生长研究, 如: 动态光散射(QELS)^[8-10]、原子力显微镜(AFM)^[11-12]、小角 X-ray 散射^[13]、中子衍射以及计算机模拟^[14-15], 仍然很难得到与晶核结构相关的详实细节. 成核过程是溶液中的分子在已形成的聚集体上进行吸附与脱离的动态过程, 实际的成核路径可能各不相同, 但何种方式是能量最优的、最利于晶核形成的过程, 目前尚不明确^[16].

结晶过程分为 3 个阶段: 成核、成核后生长和生长终止^[17]. 要了解晶体生长的全过程, 对每个阶段都需要进行观察. AFM 具有高的水平和垂直分辨率, 可用于物质表面高分辨率的观测. AFM 现已作为一个重要的手段在各个领域中得到广泛的应用, 尤其是生物大分子晶体生长研究方面, 用

AFM 研究过的 3-D 成核的大分子有: STMV^[18]、thaumatin^[19]、t-RNA^[20].

天花粉蛋白是一种从葫芦科植物瓜蒌的块根中分离得到的碱性单链蛋白(分子量为 27 141), 含有 247 个氨基酸残基, 是 I 型核糖体失活蛋白(RIP). TCS 可形成单斜和正交两种形式的晶体(空间群分别为 C2 和 P2₁2₁2₁)^[21-22]. Li 等首先报道了有关 TCS 晶体的动态生长情况, 认为 TCS 晶体(001)面上有两种生长方式: 沿 $\langle 110 \rangle$ 方向上呈鳞状(scalelike), 沿 $\langle \bar{1}10 \rangle$ 方向上呈圆顶状(domelike)^[23]. 本文将报道正交晶系的 TCS 晶体(空间群为 P2₁2₁2₁)在不同结晶条件下发现的斜锥形成核生长现象, 并对其完整的生长过程进行观测, 探索其微观机制.

1 实验部分

1.1 TCS 晶种生长

TCS 蛋白粉末购自上海东风生物制剂厂, 并做了进一步纯化. 用于 AFM 研究的晶种通过汽相扩散法进行生长: 采用等体积的 15 g/L TCS 溶液(与 Li 等所采取的浓度不一样)和缓冲液配成 10 μ L 悬滴, 池液为含有 0.5 mol Na₃Cit(pH = 5.4)和 2 mol KCl 缓冲液, 在 20 生化培养箱中结晶. 数天后即有合适的晶体出现, 然后小心地将晶体转至 AFM 工

收稿日期: 2007-03-13.

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).

作台上的密封液池中进行动态观察.

为了研究整个成核过程,制备了 6 个系列的实验样品.每隔 1 d 取其中的母液 1 μL ,用相同的缓冲液稀释至 1 mL.然后取稀释后的溶液 5 μL ,滴加到新撕开的云母片上,经干燥后备用.

1.2 TCS 晶体成核 AFM 实验

采用 AutoProbe CP Research 原子力显微镜 (Park Scientific Instruments) 进行观测,用 Data Acquisition (1.6 beta) 进行 AFM 控制和数据采集工作.所得 AFM 图片经 Image Processing and Data Analysis ver. 2.1 (ThermoMicroscopes, Copyright 1998) 进行处理,以去除噪音.为了得到高质量的图像,采用弹性系数低,针尖曲率半径小 ($< 10 \text{ nm}$) 的 CSC12/50 和 NSC12/50 (<http://www.spmtips.com>) 作为探针.溶液的过饱和度表示为: ($\mu = \ln(C/C_e)$),平衡浓度 C_e 用 BCA 法测得.

2 结果与分析

2.1 天花粉蛋白晶体动态生长

通过对各种尺寸的 TCS 晶体进行长时间动态观察后发现,在晶体的 (001) 面上没有发现多数大分子晶体所采取的二维台阶及螺旋成核生长方式,而是以一种奇特的斜锥形成核 (见图 1). 这些核的尺寸从几百 nm 长、几十 nm 宽到几 μm 长、几百 nm 宽不等.根据 X 射线单晶衍射分析晶体取向,发现这些核的排列与晶体的 $\langle 110 \rangle$ 方向一致.斜锥状的晶核在图 1 中分别以 2-D 和 3-D 形式列出.

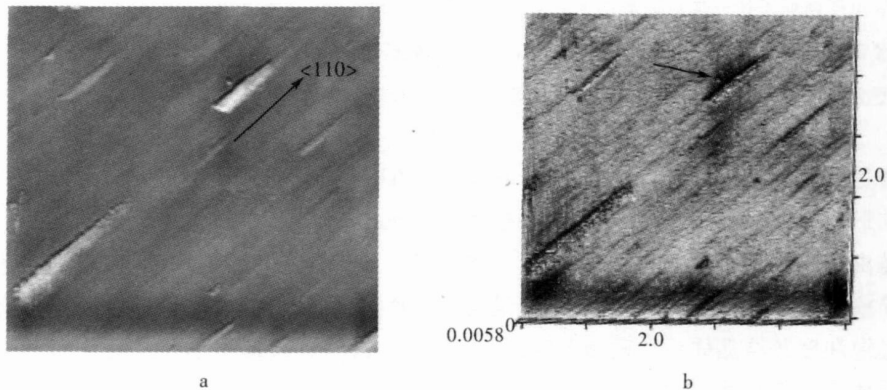


图 1 AFM 观测到的 TCS 晶体 (001) 面上的斜锥状核 (扫描尺寸: $10 \times 10 \mu\text{m}^2$)

Fig. 1 Scalene cone-shaped nuclei on the [001] face of TCS crystal (scan size $10 \times 10 \mu\text{m}^2$)

a. 正在嵌入到晶格中的几个晶核; b. 对左图中的晶核进行 3D 显示,可看出明显的斜锥状 (箭头表示).

2.2 天花粉蛋白晶体斜锥形成核过程

为了说明晶体成核过程分子聚集体的发展过程,首先对起始蛋白溶液中的 TCS 存在状态进行观察.将 15 g/L 的溶液用纯水稀释至原来的 10^{-6} 倍,并加到新撕开的云母片上进行 AFM 观察.经分析发现平均尺寸约为 25 ~ 33 nm,部分为 50 ~ 60 nm.考虑到 AFM 本身的非线性、拉伸效应等误差,可认为 TCS 分子是以单分子形式存在于水溶液中的.

图 2 显示了成核过程中 TCS 分子的聚集情况 ($\mu = 1.02 \sim 1.65$).图 2a - e 显示的是前 5 d TCS 的结晶过程,溶液中的 TCS 分子相互作用并以链状形式进行聚集.在第 1 天的结晶中,大多数的单分子形成较大的聚集体 (见图 2a). 这些聚集体呈椭球状:长径为 75 nm,短径为 28 ~ 33 nm.从图 2b 中可看出,经过 2 d 的结晶生长,聚集体继续长大到 100 nm ~ 150 nm 长,35 nm 宽,相当于含有 3 ~

5 个分子,说明 TCS 分子首先沿一个方向上加长.图 2c - d 表明聚集仍然在增长加宽,尺寸可达 160 ~ 300 nm 长,70 ~ 90 nm 宽.4 d 后,体系即可出现微晶,过饱和度达到最高 ($\mu = 1.65$).此时,3-D 核已经形成,它们的平均尺寸为:350 nm ~ 430 nm 长和 110 ~ 140 nm 宽,对应于 3 ~ 4 分子链,含有约 30 ~ 50 个 TCS 分子 (见图 2e).

在体系经过长时间的放置后 (大约 20 d 左右),TCS 晶体已达到相当大的尺寸,为 $0.8 \times 0.7 \times 0.5 \text{ mm}^3$,体系达到平衡且晶体不再生长,体系中的过饱和度变得相当低.同样,对此时的结晶体系采用类似的方法进行 AFM 观测,发现体系中存在大量的球状聚集体,其尺寸为 250 ~ 300 nm,未发现链状聚集体存在.从图 3a 和图 3b 中可以看出,这时 TCS 的聚集明显与前期的不同,主要以球状形式存在,较大的为 220 ~ 250 nm,小的为 150 ~ 170 nm.它们从小到大依次进行连接形成 3-D 结构 (见图 3c).

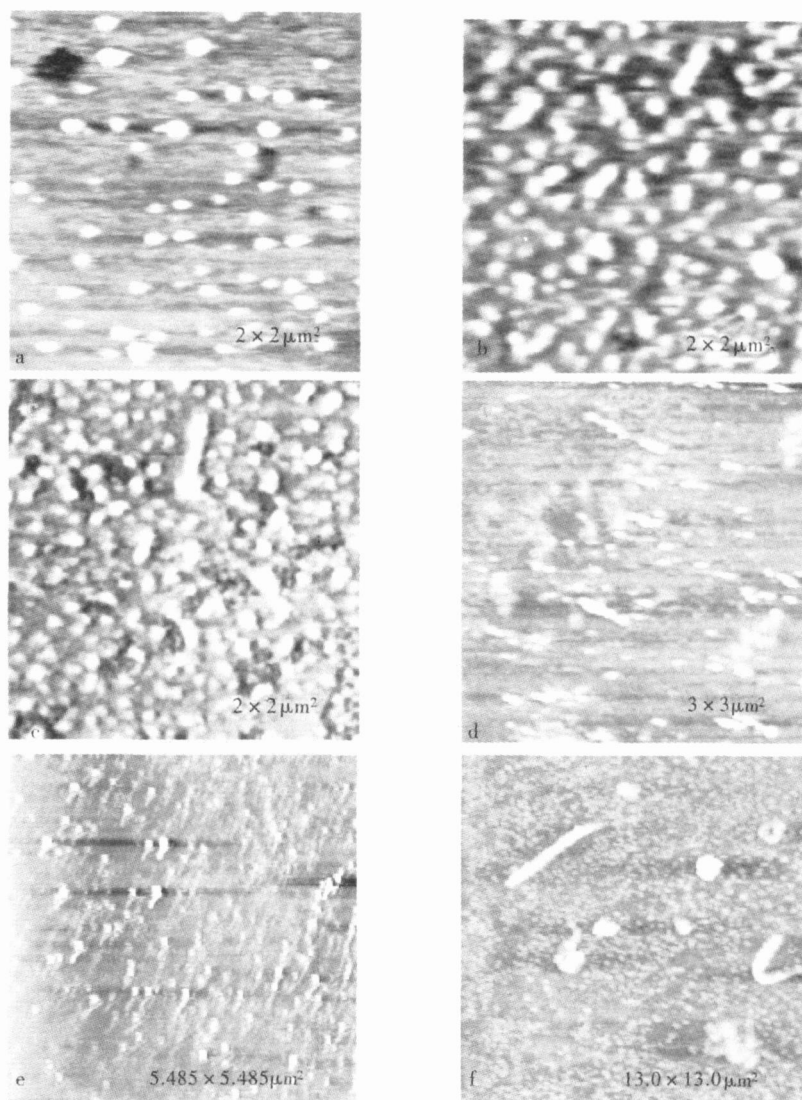


图 2 TCS 晶体生长溶液中分子聚集态变化系列图

Fig. 2 Sequence of images show the stepwise process from monodisperse amorphous clusters to regular scalene cone-shaped aggregates in the early stage of TCS crystallization

a. 椭球形二聚体, 75nm 长、28~33 nm 宽; b. 更大的聚集体 100 nm~150 nm 长、35 nm 宽; c-d. 变长的 TCS 分子链, 160~300 nm 长、70~90 nm 宽; e. 有序的斜锥形晶核的形成, 350 nm~430 nm 长、110~140 nm 宽, 排列方向高度一致. f. 在已经长成的大晶体上出现的大的聚集体, 4.286 μm 长、480~520 nm 宽.

迄今为止,多数大分子晶体都采用跟小分子晶体类似的方式进行成核生长,如 2-D 台阶和螺旋位错生长,部份晶体采用 3-D 成核方式生长. 为了证实 TCS 晶体采取的是一种特别生长方式:斜锥形成核生长,本研究对许多不同尺寸的 TCS 晶体做了大量动态原位实时观察. 从未发现有任意的生长台阶及螺旋位错,只发现斜锥状成核生长方式(见图 1 和图 2f),这是其他生物大分子及小分子结晶中所没有的.

2.3 天花粉蛋白晶体成核途径和结构基础

通过对 TCS 晶体生长过程进行全程观测,发现 TCS 分子在不同过饱和度影响下,可能采取两

种不同的途径进行(如图 4 所示). 首先,单分散的 TCS 分子主要以链状形式聚集,在之后 2~3 d 的成核过程中,随着过饱和度的增加,分子链继续加长、变宽. 当过饱和度达到最高时($\sigma = 1.65$), 结晶体系处于能量最高状态, TCS 分子即可形成完整的 3-D 不对称核(图 2e). 这些聚集体平均尺寸为 350 nm~430 nm 长、110~140 nm 宽, 对应于 3~4 个不同的分子链. 在后期的成核过程中,溶液中的蛋白浓度较低,不能为分子链的侧向生长提供足够的营养. 同时,溶液中进行的动态平衡使得 TCS 分子吸附和脱离聚集体的几率相同,所以 TCS 分子主要以球形聚集体存在. 但各球形聚集

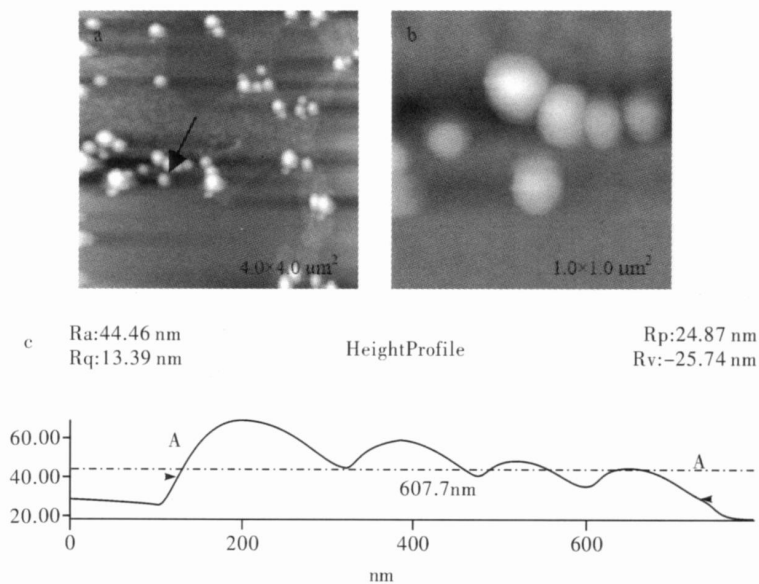


图 3 生长后期溶液中 TCS 的球形聚集体(采用 $5\ \mu\text{m}$ 扫描器采集数据,分辨率为 512×512 线)

Fig. 3 Post-nucleational nucleation pathways of TCS crystallization

b 中显示的是 a 中的一个聚集体(箭头所示),c 则表示 b 中聚集体的轮廓.

体间还没有完全融合,聚集体内部还存在分子无序性.随着 TCS 分子不断进行自我调整,有序度增加,3-D 不对称晶核最终形成.

TCS 分子属于 α 型的球型蛋白,含有 8 个螺旋和 13 个 β 折叠.其中几乎所有的螺旋都位于分子内部,而 13 个 β 折叠则位于分子表面(如图 5a 中所示).TCS 分子含有两个结构域:其一从 N 端到 Pro 181,另一个则从 Ser182 到 C 端.TCS 分子中带正电的残基有 13 个 Arg 和 10 个 Lys,带负电的有 10 个 Glu 和 9 个 Asp,大多位于分子表面,易于形成离子对.

分析发现,TCS 分子间沿 $\langle 110 \rangle$ 或 $\langle 1\ 10 \rangle$ 这两个方向上有 6 个弱的相互作用(作用距离在 $0.347 \sim 0.478\ \text{nm}$),存在两个大的结构域之间;而有 89 个氢键存在于 2 个小结构域之间,其中有 13 个强相互作用(作用距离 $< 0.323\ \text{nm}$).大-大和小-小结构域间的相互作用交替沿这个方向排列.从图 5b 中分子堆积图的可及表面可看出,其外形与 AFM 观察得到的聚集形状相似.大的结构域之间的相互作用主要是通过相邻分子间的 Asp1 和 4 进行作用,小结构域之间主要通过一个分子的 3,7 和 11,12 与另一个分子的 8 和 11,12 进行作用.另外,TCS 分子中存在两个大的疏水区,分别位于大结构域与小结构域上.大的疏水区含有 1(Tyr 14, Phe17, Ile18 和 Leu21), 4(Gly128, Leu132, Ala135 和 Leu139), 5(Ala147, Ala148, Ala150, Leu151 和 Ile155) 及一个大的片: 1(Phe4, Leu6), 4(Ala48, Ile50 和 Leu52), 6(Met72 和 Tyr 74) 和 7(Tyr 81).小的疏水区则含有 7(Tip 192, Leu195 和 Ile199), 8(Val232, Val233 和 Ile237), 11,12(Val213, Leu215, Val223 和 Ile225) 及

其他一些残基,如:Leu239, Leu241 等.这些疏水残基可以被包埋在晶格内侧,避免与晶体表面的水接触,起到排水作用,有助于晶体形成.

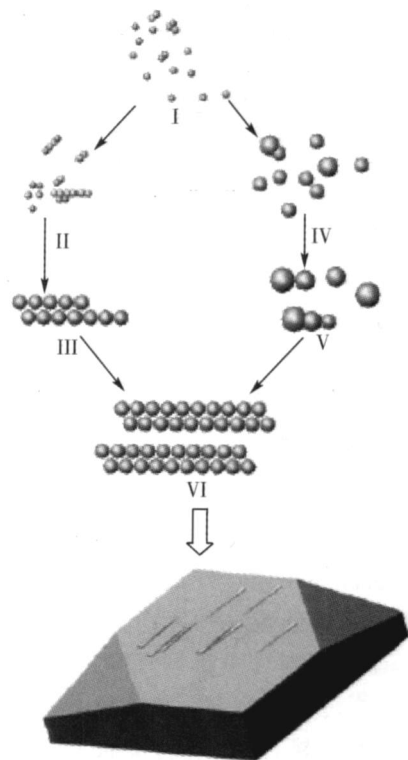


图 4 TCS 晶体生长成核途径模型图

Fig. 4 Schematic illustration of nucleation pathways
其中沿 I-II-III-VI 表示微晶出现前的过程;
另一长途径表示微晶出现后很长时间内成核途径.

从图 5 中可以看出,沿 $\bar{1}10$ 方向上的 TCS 分子 A 和 B 以相邻的两个大结构域进行作用,而分子 C 和 D 间则以小的结构域相互作用.小结构域之间的相互作用较强,且两个小结构域间还存在一定程度的重叠.而两个大结构域之间则主要以疏水残基间的相互作用为主,正是这些疏水残基的存在使 TCS 分子间沿这个方向上作用加强,更容易形成分子链,甚至可以形成数微米长的大聚集体.

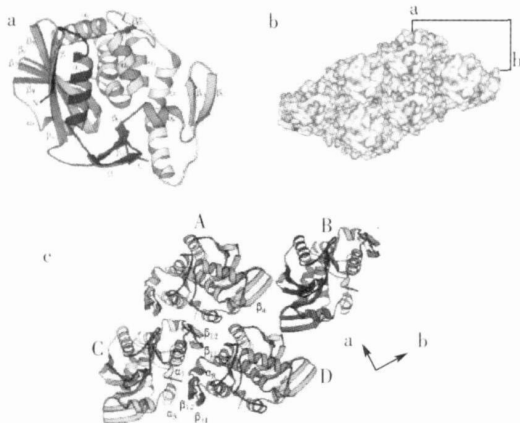


图 5 沿 $\bar{1}10$ 方向 TCS 分子相互作用图

Fig. 5 Schematic drawing of the TCS molecules in flat ribbon and accessible surface along $\bar{1}10$

a. 单个的 TCS 分子,含有 8 个螺旋和 13 个折叠; b. 沿 $\bar{1}10 > 6$ 个 TCS 分子形成方向中可及面积; c. 表明沿 $\bar{1}10 >$ 方向上 TCS 分子间小-小及大-大结构域间的作用.

3 结论

本研究通过全程观测,发现 TCS 晶体在结晶过程中采用了两种成核方式.在结晶前期,TCS 分子趋向于形成长链.随着过饱和度增加($\sigma = 1.02 \sim 1.65$),链增长并加宽,然后链间进行侧向结合,最终形成斜锥形晶核.而在成核后期 TCS 分子首先形成球状聚集体,再依次连接起来形成斜锥形晶核.这个阶段,溶液中的过饱和度相对较低,TCS 分子间有足够的时间形成球状聚集体,然后这些晶核沉积到晶体表面进行生长.显然两种过程都经历了从无序到有序的过程,最后嵌入到晶格中去.实验结果表明:TCS 成核过程受到过饱和度的影响,从而采取不同的生长方式进行.这一现象显示出跟别的大分子晶体生长与众不同,这种斜锥形成核机制有待于进一步深入研究.

参考文献:

[1] Feher G. Mechanism of nucleation and growth of protein

crystals[J]. *J Cryst Growth*, 1986, **76**:545-546.

[2] Rosenberger F. Inorganic and Protein Crystal Growth-Similarities and Differences [J]. *J Cryst Growth*, 1986, **76**: 618-636.

[3] Feigelson R S. The Relevance of Small Molecule Crystal Growth Theories and Techniques to the Growth of Biological Macromolecules[J]. *J Cryst Growth*, 1988, **90**:1-13.

[4] Boistelle R, Astier J P. Crystallization mechanism in solution [J]. *J Cryst Growth*, 1988, **90**:14-30.

[5] Oxtoby D W. Homogeneous nucleation: theory and experiment [J]. *J Phys Condens Matter*, 1992, **4**:7 627-7 650.

[6] Chernov A A. Modern Crystallography III: Growth of Crystals[M], Springer, Berlin, 1984.

[7] Milchev A. Electrochemical phase formation on a foreign substrate-basic theoretical concepts and some experimental results[J]. *Cont Phys*, 1991, **32**(5):321-332.

[8] Malkin A J, McPherson A. Crystallization of satellite tobacco mosaic virus. II. Postnucleation events [J]. *J Cryst Growth*, 1993, **126**:555-564.

[9] Malkin A J, McPherson A. Light scattering investigations of protein and virus crystal growth: ferritin, apoferritin and tobacco mosaic virus[J]. *J Cryst Growth*, 1993, **128**:1 232-1 235.

[10] Malkin A J, McPherson A. Light-scattering investigations of nucleation processes and kinetics of crystallization in macromolecular systems[J]. *Acta Crystallogr*, 1994, **D50**:385-395.

[11] Li G, Li J, Bai C, et al. Process from monodispersion to regular aggregation in Duck Cu, Zn superoxide dismutase crystallization observed by atomic force microscopy [J]. *J Cryst Growth*, 2003, **249**:354-362.

[12] Yau S T, Vekilov P G. Quasi-planar nucleus structure in apoferritin crystallization[J]. *Nature*, 2000, **406**:494-497.

[13] Finet S, Bonnete F, Frouin J, et al. Lysozyme crystal growth, as observed by small angle x-ray scattering, proceeds without crystallisation intermediates[J]. *Eur Biophys J*, 1998, **27**:263-271.

[14] ten Wolde P R, Frenkel D. Enhancement of Protein Crystal Nucleation by Critical Density Fluctuations [J]. *Science*, 1997, **277**(26):1 975-1 978.

[15] Pellegrini M. Simulation of protein crystal nucleation [J]. *Proteins: Struct Funct Genet*, 1997, **28**:515-521.

[16] McPherson A. Crystallization of Biological Macromolecules [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998.

[17] Kierzek A M, Zielenkiewicz P. Models of protein crystal growth [J]. *Biophys Chem*, 2001, **91**:1-20.

[18] Malkin A J, Kuznetsov Y G, Land T A, et al. Mechanisms of growth for protein and virus crystals[J]. *Nat Struct Biol*, 1995, **2**:956-959.

[19] Malkin A J, Kuznetsov Y G, Glantz W, et al. Atomic Force Microscopy Studies of Surface Morphology and Growth Kinetics in Thaumatin Crystallization [J]. *J Phys*

- Chem, 1996, **100**:11 736-11 743.
- [20] 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**:2 582-2 588.
- [21] 王大成, 金雷, 马星奇, 等. 高分辨率高精度天花粉晶体结构研究—1.1 埃分辨率衍射数据的收集[J]. 生物物理学报, 1995, **11**(2):161-165.
- [22] 潘克桢, 林玉娟. 天花粉蛋白 2.6 埃分辨率的晶体和分子结构[J]. 中国科学: B 辑, 1992, **8**:820-829. 15: 386.
- [23] Li B S, Li G P, Wang C, et al. Structure-governed growth phenomenon of a trichosanthin crystal [J]. Langmuir, 2002, **18**:6 723-6 726.

Scalene cone-shaped nucleation in trichosanthin crystallization by atomic force microscopy

WANG Sheng¹, LI Genpei², HU Wenrui¹, WANG Dacheng²

(1. National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080; 2. Center for Structural and Molecular Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: An interesting nucleation mechanism of scalene cone-shaped nuclei of trichosanthin (TCS) is investigated by Atomic Force Microscopy (AFM). The whole nucleation pathways are presented here at different supersaturations ($\sigma = 1.02 \sim 1.65$). In the early stages of TCS nucleation, molecules tend to form chainlike clusters and accumulate with more ones. Finally, many asymmetric 3-D scalene cone-shaped nuclei appear on the growing surfaces of TCS crystals. During the post-nucleational process TCS molecules form various size sphere-shaped clusters which are then connected together from big to small ones in sequence to form 3-D aggregates. Later they transform into scalene cone-shaped ones before landing on the TCS crystal surfaces. These AFM results are used to elucidate nucleation pathways during the whole nucleation process and two models of nucleation are present.

Key words: Atomic Force Microscopy; trichosanthin; crystal growth; nucleation mechanism