

文章编号:1000-582X(2004)03-0100-04

用 AFM 研究杜仲抗真菌蛋白的晶体生长*

汪盛^{1,3}, 向焯², 蔡绍哲¹, 王大成²

(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:随着后基因组时代的到来以及蛋白质组学研究的深入开展, 研究蛋白质晶体生长成为生物化学和结构生物学领域一个广泛关注的课题。通过使用原子力显微镜 (Atomic Force Microscope, 简称 AFM) 对杜仲抗真菌蛋白 (eucommia antifungal protein, 简称 EAFP) 的晶体在有母液存在下原位实时动态地进行了晶面生长观察。研究结果表明: 不同过饱和度对 EAFP 晶体生长形貌的影响较大, 较高的过饱和度下生长很快, 生长台阶密度高, 较高的过饱和度下主要进行各向异性二维台阶的发生、发展, 较低的过饱和度下主要采用螺旋位错的生长方式, 当过饱和度极低时生长缓慢, 且晶体表面有很多小孔存在, 晶面生长很不完整; 还对不同过饱和度下晶体生长速率进行了定量的测量, 也反映了过饱和度对 EAFP 晶体生长的影响; 同时对在 AFM 观察过程中由探针的扫描速度和方向对表面形貌的影响进行了讨论。

关键词:晶体生长; 杜仲抗真菌蛋白; 原子力显微镜; 生长台阶

中图分类号: O793

文献标识码: A

自从 1986 年 Binnig 等人首次利用原子力显微镜 (AFM) 在溶液里得到固体材料表面的高分辨率的图像以来, AFM 这一技术得到了广泛的应用^[1]。随后, 在 1992 年 Durbin 等人首次对在有母液存在下溶酶晶晶体表面台阶生长情况进行了报道, 从而使得 AFM 开始进入到蛋白质晶体的研究领域^[2]。近年来, 这一技术得到越来越广泛而深入的应用, 现已用于生物大分子 (蛋白质, 核酸和病毒及其复合物) 的晶体生长研究, 包括生物大分子晶体生长中的杂质的影响^[3]、生长的缺陷结构问题^[4]及控制晶体生长的机理的有关问题^[5-7], 并取得了很大的进展。随着后基因组时代及蛋白质组时代的到来, 以蛋白质为中心的生命科学时代将走上历史舞台, 以生物大分子晶体生长为基石的结构生物学将显得尤为重要^[8-9]。这就使得研究生物大分子的晶体生长成为今后生物学领域里的一个重要课题。

由于生物大分子在许多方面具有独特的性质, 在成分、结构、表面特点和表面势能上都相当复杂, 并且表现出比小分子单位尺寸上的格子相互作用较少^[7], 这样就使得要想通过简单的结晶方法来得到合用的单晶是很难的。科研工作者只能通过尝试法或炒菜法来进行生物大分子单晶体的生长试验^[10-11], 研究蛋白质晶体生长机理并从中得到规律来指导晶体生长实验成为晶体学家们关心的问题。就目前来看, 使用原子力

显微镜来进行生物大分子晶体生长的研究是最有效的方法之一。为了研究 EAFP 蛋白质晶体生长, 笔者利用原子力显微镜 (AFM) 对 EAFP 晶体进行了有母液存在下的原位实时动态观察, 以弄清蛋白浓度对晶体表面形貌的影响。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

原子力显微镜: AutoProbe CP Research Scanning Probe Microscope (Park Scientific Instruments); UV-120-02 型紫外分光仪 (Skimadzu corp. Kyoto Japan); Park 公司生产的超尖的 microlever C 针 (0.01 N/m, Park Scientific Instruments); 数据收集及图像处理软件: Data Acquisition (1.6 beta)、IP 2.1 和 ThermoMicroscopes SPMLab NT Ver. 5.01 (Copyright 2000 ThermoMicroscopes Inc.)。EAFP 蛋白是经分离提纯后的冻干成粉再用二次重蒸馏水配 20 mg/mL 溶液, 醋酸钠、冰醋酸均为分析纯试剂。

1.2 晶种生长及 AFM 图像采集处理

实验所用 EAFP 晶体采用悬滴气相扩散法培养, 在进行 AFM 实验前已对优质晶体生长的条件和可重

* 收稿日期: 2003-11-15

基金项目: 国家重点基础研究资助项目 (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。

复性进行了系统的研究,并获得明确的结果^[12]。结晶实验表明,该蛋白质在比较宽的pH值范围(pH约为4~9)内均可结晶。AFM实验中所用的结晶条件为:20 mg/mL的EAFP蛋白质溶液与池液(用1.5 mol/L NaAc和1 mol/L HAc配制而成,pH约为5.5)以等体积混合,并与池液平衡,于20℃恒温箱静置结晶。若静置1 h后用干净的针尖稍微搅动悬滴则更易获得单晶。在该条件下,晶体容易培养,而且易于重复。EAFP晶体外形与晶体学面的关系,即晶面指标,用X射线衍射方法确定。取尺寸大小合适的EAFP晶体出现时,选取长在玻片上的晶体,小心地连同玻片一起转移至一个密封的有母液的原子力显微镜液池中进行操作。在观测和采集原子力显微成像图时分别使用了接触模式(contact mode)和轻敲模式(tapping mode)。考虑到蛋白质晶体松软的特性,操作AFM系统时采用如下参数:悬臂力常数约为 $0.03 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$,振动频率为8~10 kHz,扫描速度为0.5~2 Hz,并在实际观察过程中用软件进行微调以使系统稳定工作,减少噪音。

2 结果与讨论

由于生物大分子晶体具有自身独有的特点和性质,如:组成复杂、分子量大、具有一定柔性及含水量大等,所以结晶过程总是在很高的过饱和度下进行的。高的过饱和度有利于晶核的生成,但是过饱和度升高就会导致晶核数量过多,从而使得晶体难以长成较大的尺寸,浓度如果很低就会导致溶液中的晶体生长的营养不够,而使得晶体生长受到限制^[13]。笔者在实验中所用的EAFP晶体生长的溶液浓度相对较低,在此使用原位实时动态的原子力显微镜观察EAFP晶体表面形貌变化,主要是通过改变EAFP蛋白质溶液的浓度来观察其晶体的 $\{100\}$ 面在相应的浓度下的生长形貌变化,并定量测定过饱和度对晶体生长速率的影响以及扫描速率和针尖对晶体表面的影响。

2.1 不同过饱和度下EAFP晶体生长形貌变化

过饱和度 $\sigma = \ln(C/C_0)$,其中的 C 为样品溶液中的蛋白质的起始浓度,而 C_0 则表示溶液中的晶体生长处于平衡状态时的蛋白质浓度,平衡浓度 C 。采用紫外吸收法(UV)在280 nm处进行测定得到。

在保持沉淀剂及缓冲剂浓度和溶液pH一定的情况下(1.5 mol/L的NaAc),通过改变蛋白质的初始浓度来改变过饱和度,分别在 σ 为1.78, 1.5, 1.15, 0.45时进行了EAFP晶体表面形貌的观察,从而对其表面生长情况进行观测,相应原位实时动态的原子力显微成像图分别为图1(a)、(b)。

从这一系列的EAFP晶体表面变化图可以看出:由于起始浓度的不同对其生长有很大的影响,在高的蛋白浓度下晶体生长速度很快,在AFM扫描图上表现

为高的台阶密度(如图1(a)所示),即单位时间内晶体表面进行横向生长的台阶数量多,难以用AFM对生长台阶进行连续的捕获,这说明这种浓度下的晶体具有快速生长的特性;在较高蛋白质浓度下,EAFP晶体表面生长表现为二维台阶生长模式(如图1(b)所示),蛋白质分子从溶液中沉积下来,在晶体表面经过吸附及位置调整后在晶体表面形成新的生长层,然后在进行横向的扩展,从而形成一个完整的表面生长层,并且从图上也可以看出台阶生长各向异性;而在较低的蛋白质浓度时,晶体表面却是以一种螺旋位错的方式进行生长(如图1(c)所示),从图上可以看出该浓度下的EAFP表面的螺旋是各向异性,即沿不同方向其生长速率不同;当过饱和度很低时,溶液中的蛋白质浓度也很低,这时晶体生长所需要的蛋白质来源少,溶液中的单位时间里的传质量也减少,这时就导致了晶体表面生长不完整,在原子力显微镜下所看到的很多小孔就说明这点(如图1(d)所示),而且在经过长时间观察后这些小孔洞没有明显消失的迹象。

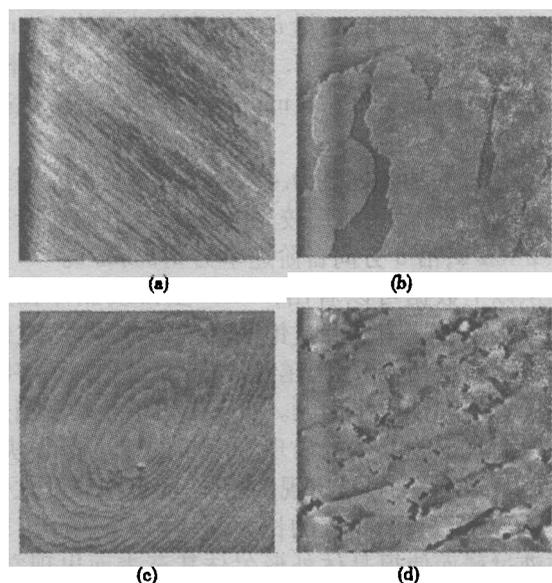


图1 不同过饱和度下EAFP晶体生长形貌的变化
(以上各图均为 512×512 线扫描,扫描尺寸
 $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$,扫描速率0.5行/s)

以上现象可能与EAFP蛋白分子较小,且分子间的相互作用较强,因而在蛋白分子或分子团簇比较容易从溶液相进入固相的晶体表面并在晶体表面进行新一层的生长。另外利用蛋白质分析软件X-PLOR(NIH 2.9.1版)^[14]对EAFP晶体中各种相互作用分析表明:一个EAFP分子与周围的12个相邻分子间有218个残基间的相互作用,其中有18个是强的相互作用,有72个较强作用,其余为较弱相互作用(间距小于4 Å)。在18个较强的作用中只有仅两个作用对结晶学 a 方向有贡献,而对结晶学 b 方向上只有两个强

的相互作用,其余大部分都与 c 方向上的作用相关,这表明:在 c 方向上分子间的相互作用较其余两个方向都强。正是由于在 EAFP 晶体中各 EAFP 分子间的相互作用的差别,使得 EAFP 在结晶过程中,当分子或分子簇从溶液相进入到晶相时受到不同方向上作用力,从而表现出表面形貌上的不对称,进而影响到整个晶体的外貌。

2.2 溶液过饱和度对晶体生长速率的影响

实验中通过对不同过饱和度的 EAFP 晶体母液的进行原位实时动态的观察,使得 AFM 能在连续变化的晶面形貌图进行生长台阶的捕获,并经专业的 AFM 图像处理软件 IP2.1 对图像中的台阶变化及对应台阶沿不同结晶学方向传播的相对位置及扩展时间进行处理分析,然后计算出 EAFP 晶体的 $\{100\}$ 面上的台阶传播生长速率,得到如下结果:

- 1) 当过饱和度 σ 大于 1.78 时,难以进行测量和表征;
- 2) 当过饱和度 σ 降至 1.5 时,沿结晶学 c 方向台阶速率约为 24.2 nm/s;沿 b 方向台阶速率为 12 nm/s;
- 3) 当过饱和度 σ 为 1.15 时,其台阶传播速率为:沿 c 方向台阶速率为 8.8 nm/s;沿 b 方向台阶速率为 4.1 nm/s;
- 4) 当过饱和度 σ 为 0.45 时,EAFP 表面主要进行的是螺旋生长,生长速率较为缓慢:沿 c 方向台阶速率为 5.2 nm/s;沿 b 方向台阶速率为 2.5 nm/s。

从以上数据可以看出,EAFP 蛋白质晶体在生长过程中其生长速率受到过饱和度的影响很大,过饱和度越大生长越快,越小则越慢,这是因为受到了溶液中的浓度梯度和传质作用大。实际工作中还发现当过饱和度再高时尽管晶体的出现和生长的速度都很快,但晶体质量却不好,容易出现多晶体,而过饱和度太低晶体生长过慢不利于晶体的长大,有时甚至还会出现由于溶液过稀而使得晶体外形欠佳甚至表面出现空洞,从而影响晶体对 X 射线的衍射能力,通过 AFM 实验能够为进行晶体生长的工作者如何寻找合适的生长条件提供一个重要的参考。

2.3 扫描速率和方向对晶体表面形貌的影响

由于蛋白质晶体生长的特殊性,整个实验只能在有母液存在下进行工作,当蛋白质晶体处于溶液中时本来就比较疏松的晶体表面变得比较容易受到外界干扰。在观察 EAFP 蛋白质晶体生长实验中发现,由于扫描速率(4 行/s)和方向的不同使得晶体表面呈现不同形貌,如图 2 所示。这两张图是在较低过饱和度下将晶体转入工作台后,在整个系统稳定后对 EAFP 晶体 $\{100\}$ 表面进行扫描得到的,图 2(a)是由下而上进行的扫描,图 2(b)则是由上而下地进行扫描得到,从这两张连续的扫描图上可以看出,两图均为螺旋位错

的生长方式,但两图在生长中心的形状及台阶的扩展方向上有所不同,即发生了局部变形。

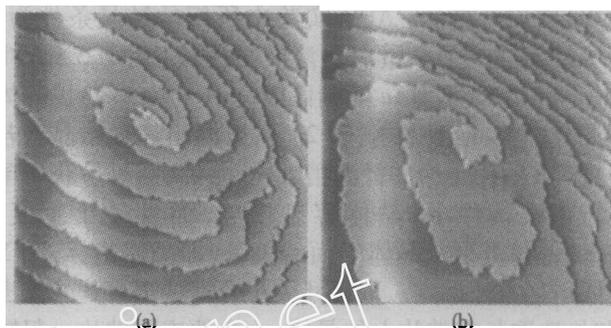


图 2 不同的扫描速率和方向所引起的 EAFP 晶体表面形貌变化
(以上两图为 512×512 线连续扫描的图,扫描尺寸 $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$,扫描速率 4 行/s)

以上现象可能是由于该蛋白质晶体的生长速度较快,并且在生长初期时,溶液的蛋白质浓度较高,使得晶体表面附近的浓度梯度较大,当扫描探针在压电陶瓷带动下快速扫描时就会扰动了晶体表面的浓度场,从而表现出在两张连续图上的表面形貌略有不同。同时由于蛋白质晶体表面本身仍具有一定的柔性,而探针针尖即是刚性的,当在进行快速扫描时,就可能对表面分子或分子团簇的吸附及其在晶体表面的位置调整有影响。当控制仪器使之只进行同一方向上的快速扫描和将扫描速率减小后发现这种现象消失了,且整个晶体表面的形貌稳定,这更充分说明了扫描速率及方向对晶体生长的影响。因此,在实际晶体生长过程中由于外界因素造成体系不稳定(如地面振动等),会影响到实际晶体质量,应该保持体系的稳定使得生长出的晶体才可能具有较高质量。

3 结 论

用 AFM 对杜仲抗真菌蛋白的晶体进行在其生长条件下的 $\{100\}$ 面原位实时动态的观察。发现 EAFP 蛋白质晶体在不同过饱和度下晶体表面的生长方式各不一样,高浓度时为高密度台阶生长;在较高浓度时为各向异性的二维台阶生长;在较低浓度时则表现为各向异性的螺旋台阶生长;在低过饱和度下台阶生长缓慢且晶面生长不完整。对不同过饱和度下晶体生长作定量测量:当 $\sigma > 1.78$ 时,EAFP 晶体的 $\{100\}$ 面上生长速率很快,难以进行测量和表征; σ 为 1.5 时,台阶沿不同结晶学 c 方向台阶速率约为 24.2 nm/s; b 方向台阶速率为 12 nm/s;过饱和度 σ 为 1.15 时, c 方向台阶速率为 8.8 nm/s; b 方向台阶速率为 4.1 nm/s;过饱和度(为 0.45 时,EAFP 表面呈现为螺旋生长,生长速率较为缓慢: c 方向台阶速率为 5.2 nm/s; b 方向台阶速率为 2.5 nm/s;以上说明 EAFP 溶液的浓度对晶面

生长形貌及生长速率都有较大的影响,这可能与其晶体内部晶格堆积中分子间的相互作用相关,如氢键、范德华力以及残基间的接触面大小等;实验中还发现扫描速度及方向对晶体生长都有影响,这说明晶体生长过程中的表面扰动对晶体生长也有一定的影响;由于EAFP晶体生长具有极为快速的生长特性,研究这种晶体的生长机理将对以后进行高通量的结构基因组学的研究工作很有帮助,具有很重要的意义。

参考文献:

- [1] BINNING G, QUATE C F, GERBER C. Atomic force microscope[J]. *Phys Rev Lett*, 1986, 56: 930-933.
- [2] DURBIN S D, CARLSON W E. Lysozyme crystal growth studied by atomic force microscopy [J]. *J Cryst Growth*, 1992, 122: 71-79.
- [3] MALKIN A J, KUZNETSOV YU G, MCPHERSON A. Incorporation of Microcrystals by Growing Protein and Virus Crystals[J]. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1996, 24: 247-252.
- [4] MALKIN A J, KUZNETSOV YU G, MCPHERSON A. Defect Structure of Macromolecular Crystals[J]. *J Struct Bio*, 1996, 117: 124-137.
- [5] PLOMP M, MCPHERSON A, LARSON S B, et al. Growth Mechanisms and Kinetics of Trypsin Crystallization[J]. *J Phys Chem B*, 2001, 105: 542-551.
- [6] KUZNETSOV YU G, MALKIN A J, MCPHERSON A. AFM studies of the nucleation and growth mechanisms of macromolecular crystals[J]. *J Cryst Growth*, 1999, 196: 489-502.
- [7] MALKIN A J, KUZNETSOV YU G, LAND T A, et al. Mechanism of growth for protein and virus crystals[J]. *Nature structure biology*. 1995, 2: 956-959.
- [8] 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.
- [9] MCPHERSON A, MALKIN A J, KUZNETSOV YU G, et al. The effects of microgravity on protein crystallization: evidence for concentration gradients around growing crystals [J]. *J Cryst Growth*, 1999, 196: 572-586.
- [10] MCPHERSON A, MALKIN A J, KUZNETSOV YU G, et al. Atomic force microscopy applications in macromolecular crystallography [J]. *Acta crystallographica Section D*, 2001, 57: 1053-1060.
- [11] 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 Cryst Growth*, 2000, 217: 161-169.
- [12] XIANG Y, HUANG R, LIU W, et al. Crystallization and Preliminary crystallographic studies of a novel protein with five disulfide bridges from *Eucommia ulmoides* Oliver[J]. *Acta Cryst*, 2002, D58: 1838-1840.
- [13] MCPHERSON A. *Crystallization of Biological Macromolecules*[M]. New York: COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, 1999. 383-388.
- [14] SCHWIETERS C D, KUSZEWSKI J J, TJANDRAN, et al. The Xplor - NIH NMR Molecular Structure Determination Package[J]. *J Magn Res*, 2003, 160: 66-74.

The Growth of EAFP Crystal by *In Situ* Atomic Force Microscopy

WANG Sheng^{1,3}, XIANG Ye², CAI Shao-xi¹, WANG Da-cheng²

(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: The dynamic changes of morphology on the {100} face of EAFP(*eucommia* antifungal protein) crystals were examined by *in situ* Atomic Force Microscopy (AFM) in their mother liquor. According to the AFM results different supersaturations are responsible for these morphological changes. At high supersaturations the EAFP crystals grow very fast and the density of growth steps is very high. At higher supersaturations the formation and development of 2-D step dominate the growth of EAFP surface. At lower supersaturations the anisotropic spiral dislocations are major growth on the EAFP crystal surface. At very low supersaturations the EAFP crystals grow very slow and there are many holes in the surface which indicate the incomplete growth of the surface. Meanwhile the effects of scanning rate and scanning direction are studied here.

Key words: crystal growth; *eucommia* antifungal protein; Atomic Force Microscopy; growth steps

(编辑 李胜春)