

快速获得蛋白质晶体的 X 射线劳厄像

姜 晓 明

(中国科学技术大学基础物理中心)

构成生物体新陈代谢的几乎全部的化学反应都是在活性蛋白质——酶的催化下进行的。酶作为催化剂,有高度的专一性、效率高及条件温和等一般催化剂不可比拟的优点。蛋白质的结构以及酶催化反应过程中中间态的结构,对催化机制的了解有着重要意义。X 射线衍射方法在蛋白质的空间结构测量中一直占有重要地位。一般说来,最令人信服的结果是来自 X 射线衍射法。

酶催化反应或肌红蛋白与血红蛋白的配位结合反应中的结构中间态,在生理温度下典型的寿命是毫秒或更短。这些瞬变的中间态不可能形成稳定的结晶体,于是不可能用 X 射线晶体学的方法直接研究,但是可以从类似的可结晶稳定结构(例如酶同底物的类似物或抑制剂的络合物)推测出来。某些情况下,晶体中的稳定结构经过光激活可产生瞬变中间态。例如,一氧化碳肌红蛋白和一氧化碳血红蛋白在脉冲光照射下产生的光分解以及随后在黑暗中与 CO 的重新化合。如果激发的中间态的寿命比记录 X 射线衍射图谱所需的最短时间长,那么它们的晶体结构就可直接研究。常规的 X 射线衍射数据收集方法——回转法中,所用光源是单色 X 光,获取一张图谱需较长的时间。即使采用配备有常规单色器的强同步辐射光源,回转照相所需最少时间也是分钟的量级。

下面介绍用多色 X 射线源获得劳厄图谱的实验方法^[1]。用这种方法可在小于一秒的时间内获取大分子的劳厄图谱,若再结合计算机模拟计算就可用于测定大分子的空间结构。这样的劳厄技术同样可用于化学结晶学、固体物理和表面衍射等研究方面。

劳厄衍射用波长从 λ_1 到 λ_2 的“白”X 光,波长范围 $\Delta\lambda = \lambda_1 - \lambda_2$ 。位于二个半径分别为 $1/\lambda_1$ 和 $1/\lambda_2$ 的 Ewald 球之间的所有倒易点,

都会对某个波长的入射波产生衍射位置,会对劳厄像有贡献。有一些劳厄反射是多重的,内含几个结构因子的贡献。但是可以证明,当 $n\lambda \leq \lambda_1\lambda_2/\Delta\lambda$ 时,只有一个结构因子 $F(h'k'l')$ 对劳厄反射有贡献,其中 λ 是产生 $(h'k'l')$ 反射的波长, $(h', k', l') = (nh, nk, nl)$ 。对于小的 $\Delta\lambda$, 此条件近似为 $n \leq \lambda/\Delta\lambda$ 。一般 X 射线衍射图谱中的所有反射点中,大约有 80% 的反射点属于一级反射,98% 属于五级以下衍射。

文献 [1] 给出了马的氧化血红蛋白稳定晶体的劳厄图像,曝光时间为一分钟,样品经过几次曝光之后才产生严重的辐照损伤。后来的实验中^[2], 血红蛋白晶体的曝光时间缩短到 450 ms。采用“点射”(single-shot)技术并且用更强的光源,可使曝光时间缩短到 10ms。

X 射线劳厄技术还没有普遍用来进行蛋白质的晶体结构分析。中子劳厄技术已用于肌红蛋白的研究^[3], 然而所用热中子谱的 $\Delta\lambda/\lambda_1$ 值约为 3, 所以许多劳厄反射中含有多个结构因子的贡献。

多色光的 X 射线劳厄衍射技术与单色光情形相比有四个优点:(1)最大限度地应用了同步辐射源的多色谱;(2)缩短了曝光时间,减少了辐照损伤;(3)用静止晶体直接获得积分衍射强度,不用转动样品;(4)可以同时记录成千上万个衍射点。这些优点对静态和动态实验均有帮助。若应用到动态实验,则可以提供在生物化学反应过程中结构变化的信息,例如可直接研究短寿命的结构中间点的结构。由此可见,劳厄技术将为时间分辨的晶体学提供有力的研究手段。

[1] K. Moffat et al., *Science*, **223**(1984), 1423.

[2] D. H. Bilderback et al., *Nucl. Instrum. Methods*, in press.

[3] A. C. Nunes, *J. Appl. Crystallogr.*, **8**(1975), 20.