

## 结构生物学的新进展\*

张景强<sup>1)</sup> 卢焯英 张勤奋

(中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)

**摘要** 文章概括地介绍了结构生物学在整个生命科学中的地位, 结构生物学的研究内容和结构生物学的三种主要的研究方法[X 射线单晶衍射方法、核磁共振(NMR)方法和电子显微方法], 介绍了这三种方法在近年来所取得的新成果. 重点介绍了冷冻电子显微技术结合计算机三维重构技术研究病毒三维结构的方法、特点以及所取得的成果. 并简单介绍了物理学家在结构生物学研究中的作用.

**关键词** 结构生物学, 三维结构, 冷冻电镜, 计算机重构方法

## NEW PROGRESS OF STRUCTURAL BIOLOGY

ZHANG Jing-Qiang LU Xin-Ying ZHANG Qin-Fen

(State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract** A brief review of the status of structural biology in the life sciences and the main research methods is given. Three main research methods, X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance, and electron microscopy are described. Emphasis is placed on electron cryo-microscopy and three-dimension computer reconstruction methods, as well as the latest achievements obtained through these methods and the role of physicist in structural biology research.

**Key words** structural biology, three-dimensional structure, cryo-electron microscopy (cryo-EM), computer reconstruction

## 1 引言

结构生物学的名称早在 1970 年就被提出来, 但它包括哪些内容, 意见并不一致. 著名杂志《Current Biology》是介绍生物学领域内最新成就和观点的刊物(1991 年创刊). 在该刊的结构生物学分册中包括 12 个专题: 蛋白质-核酸相互作用、折叠和结合、大分子组装、理论与模拟、核酸、序列与拓扑学、脂质膜蛋白、工程与设计、糖与多糖、生物方法、蛋白质、催化与调节. 由此, 可以归纳出: 结构生物学是以生物大分子和大分子的复合体、组装体的精细空间结构及其运动的测定为基础来阐明生命现象的科学<sup>[1]</sup>. 典型的成功例子是沃森(Watson)和克里克(Crick)应用 X 射线单晶衍射实验获得的 DNA 模型: 它是两条彼此缠绕着的链, 像一个螺旋楼梯, 阶梯由配对的碱基构成, 糖-磷酸骨架在外侧, 两条链互补. 这个模型出色地说明了遗传物质的遗传、生化的结构本质,

解释了 DNA 储存遗传信息和 DNA 分子复制的机制, 被公认为是分子生物学诞生的标志. 由此可见, 生物大分子的空间结构研究是十分重要的. 以蛋白质为例, 几乎所有的蛋白质都是由 20 个氨基酸以肽键连接而成. 在蛋白质中, 氨基酸的排列顺序称为蛋白质的一级结构. 蛋白质的肽链在空中通过卷曲和折叠等形式形成三维空间结构, 其中肽链中局部肽段骨架形成的构象, 如  $\alpha$  螺旋,  $\beta$  折叠、转角、环形和卷曲等, 被称为蛋白质的二级结构. 二级结构进一步在空间盘曲、折叠, 形成包括全部主、侧链在内的专一性三维排列, 被称为三级结构. 一些特定的三级结构的肽链通过非共价键形成的大分子体系的组合, 称为蛋白质的四级结构. 蛋白质的性质和功能不单取决于它的一级结构, 还取决于它的三维空间结构.

\* 国家自然科学基金(批准号: 30070169)结构生物学倾斜项目  
2000-09-29 收到初稿, 2001-02-05 修回

1) 联系人 E-mail: Ls28@zsu.edu.cn 或 JQZHANGEM@21cn.com

一级结构相同的蛋白质在三维空间结构不同时,其功能也将不同,“构象病”就是一个典型例子:美国 Prusiner 发现一种蛋白质 Prion 是引起使人类惊恐的疯牛病和一系列致死性神经变性疾病的原因.其实,健康的动物也有 Prion 蛋白存在,但它与能致病的 Prion 虽然一级结构相同但构象不同,前者以  $\alpha$  螺旋为主,而后者  $\beta$  折叠占很大的比例,前者不会致病,而后者则能引起一系列“构象病”,在一定条件下受到某种影响,前者会变成后者而引起“构象病”<sup>[2]</sup>.因此,生物大分子及其复合物和组装体的三维空间结构与其功能的研究已成为结构生物学的核心内容.

结构生物学一直是分子生物学的重要组成部分,由于近年来的飞速发展,它已成为分子生物学的前沿和主流,并且从当前的发展趋势来看必将成为整个生命科学前沿和带头学科之一.尤其是人类基因组工作草图绘制完成后,生命科学进入后基因时代,结构生物学将处在具有战略性的关键地位,在人类基因组测定之后,将进一步集中研究蛋白质的结构与功能,特别是蛋白质的三维结构,这是揭示基因组功能的基本途径.1993年,首次召开了以结构生物学为主题的国际学术会议,会上宣称结构生物时代已经开始.邹承鲁院士亦于1995年在《科学导报》发表了“结构生物学的时代已经开始”的论文<sup>[1]</sup>.在美、欧、日等地区和国家都非常重视结构生物学的发展,突出的标志是除了在《Nature》、《Science》、《JMB》和《Cell》等权威的杂志发表大量的结构生物学论文外,还出现了大量的结构生物学杂志:《J. Structural Biology》(1990年创刊),《Current Opinion in Structural Biology》(1991年创刊),《Macromolecular Biology》(1991年创刊),《Structure》(1993年创刊),以及《Nature》增办的《Nature Structural Biology》等.

结构生物学的主要方法和技术基础全部来自现代物理、化学和数学的最新发展,尤其是物理学新的方法和技术.许多结构生物学的重要成果都是由物理学家(应该说原来的物理学家,现在已成为结构生物学家)所取得.例如,诺贝尔奖获得者 J. Crick, A. Klug 和 Nehr 等原来都是物理学家.其实一个世纪以来,不少物理学巨匠都对生命科学有浓厚兴趣.例如,玻尔对生命现象有深刻的理解,1932年他在题为“生命之光”的演说中指出:“试图将有机体简单地还原为化学的相互作用来解答‘生命是什么’的问题所面临的困难与试图通过画出每个电子的位置来描述原子时遇到的困难一样”.又指出:“生物学也像物

理学一样,它运用了新的概念和新的研究方法时,对生物学的理解就能上升到一个新的水平”.另一位巨匠薛定谔(E. Schrödinger)1945年出版了《生命是什么》的书,认为“对生命的研究可能会展示出在纯粹研究无机现象时无法发现的全新自然界景观”.“对生命现象的研究可能产生出物理和化学新定律”,并指出“可以用精确的概念,即物理学和化学的概念来考虑生物学的本质问题.”薛定谔的思想在生物学界产生了巨大影响,影响了几代生物学家. DNA 结构的发现者沃森和克里克就是一个典型的例子,还在芝加哥大学读书时的沃森就被《生命是什么》一书吸引,后来他自己说:正是这本书引导他去寻找基因的奥妙.而克里克读了这本书后写道:我有一个印象,“伟大的事情就在角落里”,而“伟大的事情”就是“利用 X 射线晶体学方法对蛋白质和核酸的研究”.

21世纪无疑将是生命科学的世纪,美国科学信息研究所出版的《Science Watch》每年都要公布一批全世界最热门的研究项目(hottest research),1995年和1996年各仅有一项为非生命科学的,1997年所列的16项则全部被生命科学所囊括.这从一个侧面反映了生命科学的时代已经来临.但整个生命科学的问题,单靠生物学家是无法完全解决的.我们回顾分子生物学的发展历程就可以清楚看到,分子生物学的兴起和发展是物理学、化学渗透到生物学研究的结果.反过来,今天它的成就又向物理学、化学及各个技术学科提出了许多新的问题,形成了许多新的研究领域.因此,生命科学的发展需要大量的物理学家、化学家以及其他学科和技术专家的参与才能得到迅速发展.目前,西方发达国家许多青年物理学家都涉足生命科学,特别是结构生物学,并作出了杰出的贡献.一个有趣的现象是涉足结构生物学的物理学家中华人占很高的比例,尤其在应用电镜进行研究的领域中,有美国 Texas 大学的周正洪博士和他的导师——著名的结构生物学家 Wah Chiu,此外,还有王大能、李蔚玲等.将来是否会出现像理论物理那种情况,我们拭目以待.不过作者相信,我国的年轻物理学家中将会有不少人涉足结构生物学的研究,并将为我国结构生物学在国际上占有一席之地作出贡献.

## 2 结构生物学的主要研究方法

结构生物学的主要研究方法有三种:X射线单晶衍射方法、核磁共振(NMR)方法和电子显微学方

法.

X 射线单晶衍射技术是由 H. W. 布拉格和 W. L. 布拉格父子于 1912 年提出和发展起来的. 此技术最先用于无机晶体分析, 后来 1953 年, 沃森和克里克用于 DNA 晶体分析, 至 60 年代, 肯德鲁和佩鲁兹用于研究血红蛋白和肌红蛋白, 逐渐成为生物大分子晶体结构研究的重要手段, 直至今天仍占据统治地位. 它的优点是分辨率高, 达到原子分辨率, 既可研究水溶性蛋白、也可研究膜蛋白和大分子组装体与复合体. 它能给出生物大分子的分子结构和构型, 确定活性中心的位置和结构, 从分子水平理解蛋白质如何识别和结合客体分子, 如何催化, 如何折叠和进化等生命的基本过程, 进而阐明生命现象. 例如, 1997 年底, 应用 X 射线单晶衍射方法完成了有关核小体 (nucleosome) 的核心颗粒分辨率为 0.28nm 的精细空间结构的测定<sup>[3]</sup>, 每个核小体的盘状核心含有 8 个组蛋白形成的八面体、外绕 146 个碱基对组成的 DNA, 这一杰出的成就对了解基因转录、DNA 复制与修复的动态过程都很重要. 此外, 应用 X 射线单晶衍射技术测定蛋白质和核酸的晶体结构并结合分子模拟技术, 已经为新药物的设计提供了一个全新的方向, 大大缩短了新药的研制过程. 新药的设计和开发, 要求对这些药物靶标 (drug target) 的结构、性能有精确的了解, 由于迄今对其了解甚少, 现有临床药物绝大多数是通过尝试筛选获得的, 导致研制一个新药常常需十多年, 甚至几十年的时间. 最近通过对爱滋病病毒 (HIV) 蛋白酶的精细结构测定, 并以此为靶标设计酶的抑制剂作为治疗爱滋病的有效药物获得巨大成功, 已显著减少爱滋病死亡数量. 然而 X 射线单晶衍射方法也有缺点, 就是样品必须为晶体, 但生物大分子结晶困难, 特别是膜蛋白和病毒等分子组装体结晶更是困难, 而且所获得的结果是结晶状态的结构, 而不是自然状态的结构. 其次对于像病毒那样大的分子组装体, 测量其精细结构十分复杂. 原因有二: 一是大晶胞含有的原子极多, X 射线衍射点极多, 常常无法区分、辨认和探测; 其二是大晶胞所产生的衍射点强度过弱, 特别在高分辨时, 无法与背景区分. 高亮度和极细聚焦的同步 X 射线源出现, 使第一个问题基本获得解决, 第二个问题也有明显的改善. 同步辐射 X 射线源最早出现在 20 世纪 60—70 年代, 它是利用已有的高能物理研究所用的同步加速器和储存环建立起来的, 采用“寄生的”模式运行, 其亮度比常规 X 射线装置约大  $10^4$  倍, 这是第一代同步辐射 X 射线装置. 第二代出

现在 80 年代初, 它力求减少电子束的面积和发散角的乘积, 使亮度比第一代又增大约  $10^4$  倍. 90 年代的第三代发射角度更小, 又使 X 射线源亮度增大了约  $10^4$  倍<sup>[4]</sup>. 英国牛津大学 S. David 的研究小组应用第三代同步辐射 X 射线源测得的最大结构是蓝舌病毒 (bluetongue virus), 其衣壳直径约 69nm, 分辨率为 0.35nm<sup>[5]</sup>. 此外他们还与本文作者的研究小组合作, 研究更大的质多角体病毒 (CPV, 直径约 80nm). 但到目前为止, 大部分的研究成果仍是直径 30nm 左右的小病毒.

第二种方法是核磁共振技术 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR). 原子核是带电荷粒子, 和外层电子相似, 也有自旋现象. 实验证明, 随着原子序数和核同位素质量不同, 核的自旋量子数分别为 0, 1/2 和 1. 在外静磁场  $H_0$  作用下, 核自旋量子数不为零的原子核会发生能级分裂. 如果同时将射频磁场  $H_1$  作用到原子核系统上, 当射频磁场的频率  $\omega$  满足关系式  $\omega = \gamma H_0$  时, 原子核就吸收了射频磁场的能量, 从低能级跃迁到高能级, 这些能级是量子化的, 是每一种结构特征的, 这就是核磁共振现象. 关系式  $\omega = \gamma H_0$  为核磁共振条件,  $\gamma$  为磁旋比. 不同原子核的磁旋比是不同的, 因而也有不同的共振频率. 核的运动不是孤立的, 它与核外电子、周围环境的原子和分子均有相互作用, 因此, 通过核磁共振谱研究, 可获得物质结构的信息. 以蛋白质为例, 它的二级结构如  $\alpha$  螺旋,  $\beta$  折叠、转角、环形和卷曲等, 体现了蛋白质分子主链原子在三维空间各种不同的排列规律性. 位于不同二级结构域的原子核间距, 原子核间的相互作用以及多肽段的动态特性, 都直接反映蛋白质三维结构的特征. 这些具有不同结构特征的原子核间距、肽键二面角、肽键的动态特性等都具有特征的核磁共振谱线. 因此, 我们分析核磁共振谱就可以获得蛋白质的三维结构.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  是核磁共振检测的主要对象, 各有不同的共振频率, 从而形成核磁共振氢谱、碳谱和氮谱三部分. 核磁共振方法的最大特点是可以直接在溶液中测定自然状态下的大分子三维空间结构, 其分辨率已接近 0.2nm, 但因为大分子量的生物分子的核磁共振图谱非常复杂, 难以解释, 因此它只能测量分子量较小 (15—25kDa) 的生物分子, 至今最大可测定 35kDa 的生物分子<sup>[6]</sup>; 其次在测定中要求样品是高纯度且数量相对较多, 使样品制备亦有困难; 此外, 核磁共振只能用于水溶液性的生物样品, 对膜蛋白或病毒等的组装体、复合体就无法测定.

第三种方法是电子显微学方法,电子晶体学是其中之一,常用于蛋白质晶体结构研究,故也称为蛋白质电子晶体学.与X射线晶体学相似,它主要借助电子与晶体的相互作用来研究晶体结构.但由于固体对电子的散射远大于固体对X射线的散射,电子与固体相互作用也较X射线相互作用复杂得多,电子可以会聚成像等特点,这使电子晶体学又与X射线晶体学有所不同.首先,电子晶体学只需样品是几微米大小,约20nm厚的一层单胞的片晶(二维晶体),制备较简单.尤其是自身具有部分亲水、部分疏水结构的膜蛋白,相对较易生成二维片晶.其次,电子晶体学不仅能从电子衍射谱中获得电子衍射数据,而且还能够从电子显微镜像中获得晶体结构信息.实际上,电子晶体学方法是从电子衍射谱中获得结构函数的振幅,从成像中获得结构函数的相位,因此数据处理较X射线晶体学简单,但分辨率相对较低,目前最高的接近0.3nm.由于膜蛋白结晶困难,而膜蛋白二维结晶相对容易些,因而膜蛋白的研究仍寄希望于电子晶体学,其中最成功的例子是植物捕光复合物II(Light-Harvesting Complex II, LHC-II)的结构研究,获得0.34nm的分辨率<sup>[7]</sup>,除氢原子外,还可以进行原子定位.此后尚未有人获得更高分辨率的结构.另一种方法称为冷冻电镜计算机三维重构方法或单颗粒技术.这种技术特点是:急速冷冻( $10^3-10^4$ °C/s)样品悬液,样品被包埋在无定形的非晶态冰薄膜中,这样既不损伤样品,又可使样品保持着自然状态,因而样品制备简单,缺点是分辨率稍低.利用这种技术研究的病毒样品,目前分辨率接近0.7nm,预计这几年来内可达0.4nm.核糖体可达1.0nm,而离子通道可达2.0nm.

### 3 冷冻电镜计算机三维重构方法

20世纪70年代初,人们通过电子显微镜,应用相位衬度成像,可直接获得原子像.然而生物材料却困难得多.第一个困难是电子辐射损伤,对于生物材料来说,电子散射大约3/4是非弹性散射,它的典型的电子能量损耗是20eV.任何原子要在像中显示出来,总要散射电子束的几个电子,因而它至少接收约100eV数量级的能量,这个值对于具有10eV的碳链来说是太大了,碳链往往被破坏<sup>[8]</sup>.因此,要想获得单个的生物大分子的高分辨率的像实际上是不可能的.当然,我们可以采取低剂量技术,使用小于 $0.5\text{eV}/\text{Å}^2$ 的电子束,生物材料就不会被损伤,此时统

计噪音远大于信号,信号被遮盖了,但用叠加或平均的方法就能很好解决.在 $0.5\text{eV}/\text{Å}^2$ 剂量下,记录1000个或更多个分子像,把这些像叠加起来,获得一个平均像.由于噪音是随机的,而分子信息是定向叠加的结果,信噪比就增加 $\sqrt{N}$ 倍( $N$ 为叠加数).对于分子规则排列的蛋白质晶体,可以用衍射方法进行叠加式平均,从而形成了蛋白质电子晶体学方法.为了获得好的信噪比,就需要有足够数量的分子像去平均,这就要求在显微像中有足够多的分子像数.因而电镜放大率不能太高,通常是30000—40000倍.在低剂量和低放大倍数下获得高分辨率的像,这就是蛋白质电子晶体学的难点.同时,往往还不能获得最佳聚焦,为了获得高分辨,要收集相位衬度传递函数第一个零点以外的信息,因而显微像要用相位衬度传递函数进行解调和处理零点问题,使图像处理较复杂.而对于像病毒那样的单颗粒样品,只能采用计算机方法进行叠加,这就形成冷冻电镜计算机重构方法.同样,为了获得较高分辨率,需要较多的病毒叠加,这就需要病毒样品是高纯度和高浓度.

另一个困难是生物材料在自然状态下都含有水分,当进入电镜的高真空时会发生强烈的脱水(干燥),使三维结构发生严重的畸变.解决办法可采用冷冻水合技术.生物材料在含水的自然状态下,迅速浸入被液氮冷却的乙烷中,使样品能高速冷冻( $10^3-10^4$ °C/s),水来不及结成冰晶而形成玻璃态的冰,非晶的冰不会损伤样品(否则,固定形状的冰的生长会损伤样品).病毒悬液滴于有许多微米级的孔的所谓微筛膜(作支持)上,在这些小孔中就形成厚约20nm的薄冰,包埋和保护着病毒.低温下( $-160$ °C— $-170$ °C)观察时,由于有薄冰的保护,病毒不但不会被干燥,而且能被瞬时冷冻固定下来,保持着完全的自然状态.这是冻冷电镜突出的优点.此外,样品被冷冻后,生物材料提高了对电子辐射的抗性,一般冷冻水合的生物材料能承受的电子剂量比常温下增加一个数量级,部分解决了辐射损伤的问题.

冷冻水合的生物大分子主要由C、H、O、N等轻元素组成,本身对电子散射差别很小,与冰之间也非常小,加上为防止辐射损伤,使用低剂量成像,结果像的信噪比非常差.因此,必须平均成千个分子像来提高信噪比.但如何叠加?一张电镜照片内含有许多病毒颗粒,但不能直接叠加,因为它们取向不同;此外,电镜的像实际上是样品三维结构的二维投影,如何从二维投影中获得三维结构?三维重构是

建立在中央截面定律基础上的. 经过简单的数学推导就可以证实中央截面定律: 三维物体的沿  $z$  轴的二维投影  $\rho(x, y)$  的二维傅里叶变换  $S(\rho_x, \rho_y)$  与该物体的三维傅里叶变换  $F(\rho_x, \rho_y, \rho_z)$  在  $z$  方向  $z=0$  的中心截面  $F(\rho_x, \rho_y, 0)$  等价, 这就是中央截面定理. 有了这个定理, 可通过傅里叶变换把三维结构与二维投影之间的关系建立起来. 当有各方向的足够多的二维投影就可获得这物体三维傅里叶变换各方向的足够多的中央截面, 就可合成这物体的三维傅里叶变换, 通过反变换就获得该物体的密度函数——三维结构. 这种方法可以在很广的范围内应用, 从无固定结构特征的细胞器和超分子复合体 (supramolecular assembly) 到大分子的晶体.

病毒除少数无定型外, 大多数具有一定的对称性, 如二十面体对称 (常称球状病毒) 和螺旋对称 (常称杆状病毒), 目前研究得最多的是二十面体病毒. 对于二十面体病毒, 三维重构数据处理中最重要的步骤是通过等价线来确定病毒颗粒的对于电子束的取向和中心位置. 为了获得高分辨率, 通常采用最佳离焦量 (即 Scherzer 聚焦), 此时相位衬度函数有一个最宽的平台, 分辨率为最高, 但像的衬度很弱. 因此, 通常在拍得最佳离焦量的高分辨率照片后, 改变其离焦量 (如增加  $2\mu\text{m}$ ) 再拍一张照片, 这样一大一小离焦量的两张照片称为离焦对. 大离焦量的照片虽然分辨率低 (如低于  $3\text{nm}$ ), 但衬度好, 用于计算病毒颗粒的取向和中心位置, 小离焦量的照片的数据用于重构. 病毒颗粒的取向和中心位置是通过等价线来计算的. 对于病毒颗粒两个不同方向的投影 (显微像), 它们的二维傅里叶变换相当于三维傅里叶空间两个不同法向的中央截面. 此两截面必有一交线. 在这条交线上, 两截面的傅里叶值 (振幅和相位) 是一致的. 这条线就是交互等价线 (cross common lines). 由于病毒是二十面体对称, 可把某一中央截面进行 5-3-2-2 对称操作得到另外 59 个截面. 这些截面均与另一病毒颗粒像的中央截面相交而得到交互等价线, 对于具有二十面体对称的病毒颗粒, 任何两个不同方向的投影的二维傅里叶变换之间有 60 条交互等价线. 任何一条交互等价线的位置 ( $\alpha, \alpha'$ ) 都是由病毒颗粒相对于电子束取向 ( $\theta, \phi, \omega$ ) 决定的, 而病毒颗粒投影像的中心位置 ( $x_0, y_0$ ) 则决定交互等价线的傅里叶相位. 因此, 通过交互等价线的方法可以计算出二十面体对称的病毒的取向和中心位置. 此外在每个二十面体对称的颗粒自身的傅里叶变换内亦存在等价线, 称为自身等价线 (self com-

mon-lines). 与交互等价线一样, 这些等价线的位置决定于颗粒取向. 可见, 用单个颗粒像本身亦可计算出其取向和中心位置. 实际操作中可以根据不同的情况交替使用. 由中央截面定理可见, 我们取得了足够的颗粒的取向和中心位置, 三维傅里叶空间就可以填满, 进行傅里叶反变换, 就可以得到原物体的三维结构, 病毒颗粒越多, 分辨率就越高. 在实际计算处理中, 因为没有一个好的傅里叶空间数据内插法, 所以, 进行三维重构时不使用直接反傅里叶变换, 而是使用傅里叶-贝塞尔合成法.

由于应用冷冻电镜与计算机重构技术研究病毒三维结构所需样品制备简单, 对病毒的大小没有限制, 使其发展很快, 至今已有 100 多个病毒的三维结构被冷冻电镜计算机重构方法所阐明, 远远超过 X 射线晶体学的 30-40 种病毒的数量. 而且有超过一半的病毒其直径大于 X 射线晶体学所测定三维结构中最大的蓝舌病毒 ( $69\text{nm}$ ), 其中较大的有人疱疹病毒 ( $125\text{nm}$ )、人巨细胞病毒 ( $130\text{nm}$ )、双链 DNA 小球藻病毒 ( $190\text{nm}$ ) 和虹彩病毒 ( $190\text{nm}$ ), 可见, 冷冻电镜计算机三维重构方法是在病毒等大的大分子组装体 (如核糖体、离子通道等) 的结构与功能研究中非常有前途的方法, 虽然其分辨率还有待提高, 但所提供的资料和数据对于生命科学的许多研究来说, 已经是十分宝贵和重要的依据, 甚至已经满足了某些研究的要求.

1997 年, 《Nature》杂志分别发表了 Bötcher<sup>[9]</sup> 和 Conway<sup>[10]</sup> 关于应用冷冻电镜计算机三维重构方法研究乙肝病毒衣壳的三维结构的论文, 分别达到  $0.74\text{nm}$  和  $0.9\text{nm}$  的分辨率, 当时引起了国际学术界的强烈反应. 著名结构生物学家 D. J. DeRosier 在这期《Nature》杂志中发表题目为“谁还需要晶体”<sup>[11]</sup> 的文章, 指出“这是一个大进步 (指冷冻电镜技术). 它使分子生物学家不用结晶就可以获得大分子及其衍生物的结构梦想变成现实.”我国两院院士把这成果评为 1997 年世界十大科技进展之一, 并认为: “他们发现乙肝病毒的结构是由乙肝病毒蛋白分子成双成对地组合成球状结构, 其表面有大量针状物, 如同蜷缩成团的刺猬, 而这些针状物很可能是病毒对付人体免疫系统的武器.”“这一成果可以帮助科学家从分子角度研究乙肝的致病机理, 从而为研制乙肝疫苗和药物奠定了基础”.

2000 年, 我国留美青年学者周正洪博士在《Science》发表了题目为“疱疹病毒  $0.85\text{nm}$  衣壳结构”<sup>[12]</sup> 的论文, 这是结构生物学发展的另一个重要成果. 人

疱疹病毒(HSV)是一种能引起多种疾病的大而复杂的病毒。周博士应用冷冻电镜计算机三维重构方法,在JEM-4000透射电镜上,在加速电压为400kV时,使用LaB<sub>6</sub>电子枪,获得了约0.7nm分辨率的像。从130张显微照片中选取并合并了5860个病毒颗粒的像,最后获得0.85nm的HSV空间三维结构,衣壳显示出超过30种公认的 $\alpha$ 螺旋结构。人疱疹病毒分辨率与乙肝的大致相当,但是人疱疹病毒比乙肝病毒要复杂100倍,也比应用第三代同步辐射X光源(ESRF)所测定的最大的病毒——蓝舌病毒(BTV)<sup>[5]</sup>要复杂得多,因此是结构生物学的一个重要进展。他与本文作者的研究小组合作,已获得了质多角体病毒(衣壳直径约80nm)0.8nm分辨率的三维结构,而且还在继续努力,可望达到0.5nm的分辨率。

冷冻电镜还可以进行病毒-受体复合物和病毒-抗体复合物的三维结构研究,这种研究方法是由Wah Chiu创立的。1990年,他的研究小组应用冷冻电镜方法研究轮状病毒中和单克隆抗体(抗VP4蛋白)Fab复合物的三维结构<sup>[13]</sup>,证实病毒表面突起是由VP4的二聚体构成的,病毒抗原结合位点位于这些突起末梢的两侧,两个抗体的Fab片段结合在病毒的每个突起上,形成突起物末端的双叶结构,并证明这两个Fab在化学组成上相同但结构上是不同的,双叶结构的作用与细胞吸附和病毒入侵有关。如果把这种研究方法与用X射线单晶衍射所获得的病毒衣壳高分辨三维结构结合起来那就更有意义了。美国Purdue大学的T.J.Smith<sup>[14]</sup>在1996年应用冷冻电镜研究人鼻癌病毒-14(HRV-14)和它的强中和抗体的Fab(Fab-17-1A)片段复合物的三维结构,结合用X射线单晶衍射研究HRV-14的三维

结构,结果表明Fab-17-1A(抗体)并不诱导病毒构型的变化,而是抗体决定簇经构型的变化去适应病毒抗原决定簇部位,并因而获得中和反应。Fab-17-1A同病毒大部分受体识别部位的区域接触,并深深插入HRV-14细胞受体结合处。这些成果对于免疫研究是十分可贵的。

由此可见,冷冻电镜计算机重构方法虽然其发展历史较晚,但特别有利于病毒、核糖体、离子通道等大的复合体、组装体等的结构与功能的研究,是结构生物学的新发展方向。这些研究既是结构生物学的重要内容,又是正在走向综合的重要的一步。

## 参 考 文 献

- [1] 邹承鲁. 科学导报, 1995, 11(4): 7 [Zou C L. Science & Technology Review, 1995, 11(4): 7 (in Chinese)]
- [2] 王大成. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(4): 340 [Wang D C. Prog. Biochem. Biophys., 2000, 27(4): 340 (in Chinese)]
- [3] Luger K, Mader A W, Richmond R K *et al.* Nature, 1997, 389, 251
- [4] 吴自勤. 物理, 1997, 26: 702 [Wu Z Q. Wuli (Physics), 1997, 26: 702 (in Chinese)]
- [5] Grimes J M, Burroughs J N, Gouet P *et al.* Nature, 1998, 395: 47
- [6] Kay I E, Gardner K H. Current Opinion in Structural Biology, 1997, 5: 722
- [7] Kuhlbrand W, Wang D N, Fujiyoshi Y. Nature, 1994, 367: 614
- [8] Dubochet J, Knaperk E. Chiemica Script, 1979, 14: 267
- [9] BÜtcher B, Wynne S A, Growther R A. Nature, 1997, 386: 88
- [10] Conway J F, Cheng N, Steven A C *et al.* Nature, 1997, 386: 91
- [11] DeRosier D J. Nature, 1997, 386: 26
- [12] Zhou Z H, Dougherty M, Chiu W *et al.* Science, 2000, 288: 877
- [13] Prasad B V V, Chiu W *et al.* Nature, 1990, 343: 476
- [14] Smith T J. Nature, 1996, 383: 350

## ·物理新闻·

### 一 句 话 新 闻

- ★ 美国利弗摩尔国家实验室已在压力为1.2Mbar和温度为4500K以上时将无序氧流体压缩为氧金属。(摘自Physical Review Letters, 2 Apr., 2001)
- ★ 在核工业中起着关键作用的铀,其晶体结构与加热后原子体积的反常行为一直困扰着物理学家们将近30年。最近,美国Rutgers大学的S. Savrasov教授将两个现存理论组合后解释了这

些反常行为。(摘自Nature, 2001, 410: 793)

- ★ 伦敦大英博物馆模拟视听演播室在2001年5月2日播出由Paul Dirac制作的一部描述在地球破裂时认识到宇宙是由反物质构成的“走向反世界”科幻片,演示了在反世界中的模拟舞蹈与音乐。

(云中客)