



解析蛋白结晶的过程

说起蛋白结晶，中国可有着很悠久的历史呢。1965 年中国首次人工合成了结晶牛胰岛素。这是第一个与天然蛋白有着相同性质并具有生物活性的人工合成蛋白，也是蛋白结晶的首个成功例子。2004 年，中国科学院生物物理研究所常文瑞研究员发现的菠菜主要捕光复合物(LHC-II)的晶体结构，以封面形式在《Nature》杂志上发表（图 1）。

最近，饶子和院士等在《Nature》杂志上发表文章，展示了禽流感病毒 H5N1 聚合酶内部的晶体结构。此外，饶教授已经解析出了 50 多个重要蛋白质的晶体结构，包括艾滋病病毒基质蛋白 SIV-MA、IgA Fc 受体（CD89，JBC 的封面，图 2）、第一个 SARS 病毒蛋白-3CL PRO。看着饶教授的丰硕成果，大家可能都很感兴趣蛋白结晶是怎么样做的，简单说吧，就是将表达目的蛋白的 DNA 片段 PCR 之后克隆到表达载体上，然后在大肠杆菌中诱导表达，得到大量的蛋白并纯化，摸索结晶条件，等它结晶（时间长短不定），拿到晶体之后进行 X 射线衍射，收集衍射图谱，通过计算，很快就能得到蛋白质的原子结构。看上去似乎很简单，其实不然。在 1971 年蛋白数据库 PDB (www.pdb.org) 刚刚成立时，只有可怜的 7 个蛋白结构；不过蛋白结晶的方法也在不断改进，因此 PDB 的结构数也呈指数增长，目前已达到了 52684 个。生物通就结合饶教授的文章，给大家解析一下蛋白结晶的过程。

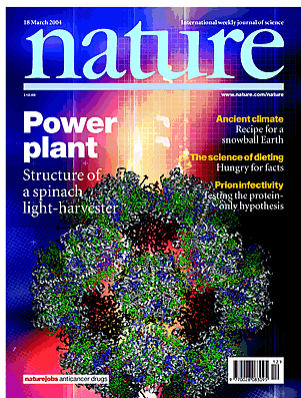


图 1 LHC-II 的晶体结构

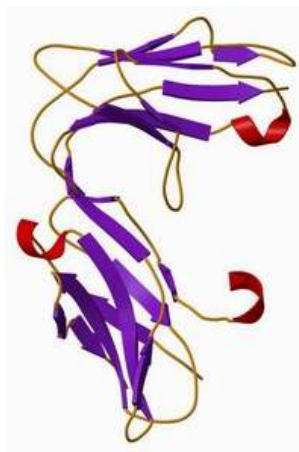


图 2 IgA Fc 受体的结构

1. **蛋白表达和纯化** 这个大家都比较熟悉了，简单说一说。用 PCR 扩增目的蛋白的结构域。PCR 产物纯化后克隆到大肠杆菌表达载体上。饶教授在两篇文章中分别用了 pGEX 6p-1 (GE Healthcare)¹ 和 pET-28a (Novagen)² 的载体，然后在大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中进行表达，再利用相应的层析柱纯化，如果需要的话，还要用蛋白酶将较大的标签切除。这一步的关键是得到大量纯化的蛋白质 (>10mg)，其浓度通常在 10mg/ml 以上，才能进行结晶条件的筛选。不过蛋白表达量高了，经常就会形成包涵体，所以还要优化变复性的条件，使蛋白正确折叠。

2. **蛋白结晶** 蛋白质晶体的培养，通常是利用气相扩散 (Vapor Diffusion) 的原理来完成；也就是将含有高浓度的蛋白质 (10~50mg/ml) 溶液加入适当的溶剂，慢慢降低蛋白质的溶解度，使其接近自发性的沉淀状态

时，蛋白质分子将在整齐的堆栈下形成晶体。包含纯化蛋白、缓冲液和沉淀剂的小液滴，与大样品池中相似缓冲液和更高浓度沉淀剂之间形成平衡。起初，蛋白溶液的小液滴包含了低浓度的沉淀剂，随着水分蒸发并转移到大样品池中，沉淀剂浓度也增大到最适合蛋白结晶的水平。当系统处于平衡状态，这种最佳条件就继续维持直至晶体形成。

两种最主要的气相扩散方法分别是悬滴

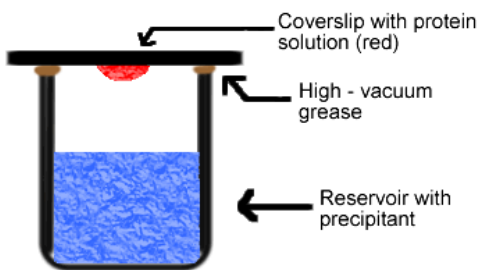


图 3 悬滴法

每一种蛋白质形成结晶的条件皆有所差异。影响晶体形成的条件很多，包括 pH 值、温度、离子强度、盐的比浓度、有机添加剂、还原剂和去污剂等，因此蛋白质结晶所需进行的试验数量是巨大的。到目前为止，还没有一套理论可以预测结晶的条件，所以必须不断测试各种条件的组合，才可能得到一颗完美的单一晶体。看起来是不是有点像“不可能的任务”，所幸现在也有商业化的结晶平台推出。

QIAGEN公司推出了[EasyXtal](#) 及[NeXtal](#) [蛋白结晶平台](#)系列产品，为蛋白结晶研究提供了新的实验工具，让我们能在最短的时间内获得最广范围的条件筛选，快速完成晶体培养实验。[EasyXtal](#) 及[NeXtal](#)蛋白结晶平台有 1824 种无冗余的蛋白结晶条件，包含了促进蛋白结晶最显著的试剂，采用网格筛选、稀疏矩阵筛

(hanging drop) 和坐滴 (sitting drop) 法。它们之间的区别就在于蛋白液滴在容器中的位置不同(图3和图4)。坐滴法中蛋白溶液(红色)位于大样品池溶液(蓝色)上方的底座上，与悬滴法相反。一般来说，悬滴法比较常用。而坐滴法更有利于利用显微摄像技术自动监测蛋白质的结晶情况,相对来说更适于高通量蛋白质结晶。不过两种方法都需要从外面封闭的密封的容器。

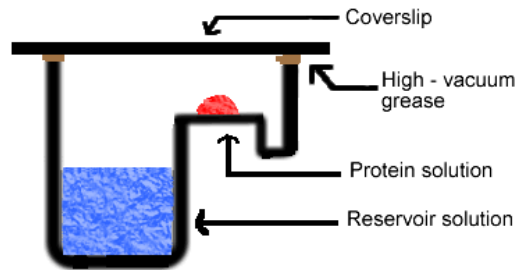


图 4 坐滴法

选、离子采样筛选三种蛋白结晶筛选策略或其有机组合，可以对蛋白质、多肽、核酸、大分子复合物以及水溶性小分子等进行结晶条件的筛选。

如此大的工作量，用手工来完成，一是太累，二是太慢。多种不同结晶条件的筛选过程的趋势是自动化，是因为该过程要求建立成百上千的相似实验以找到为数甚少的合适结晶条件。自动化显著地提高了实验通量，改进了实验的可重复性，并且由于实验最小化容许使用少得多的昂贵的蛋白质和结晶溶剂而降低了费用。不过，自动化过程中的一个挑战是必须能够移取不同粘性的溶液；另一个挑战为液滴定位：微小液滴必须被极其精确地放置，以使蛋白质液滴和结晶溶剂的液滴能彼此融合且不受结晶池的边缘干扰而变形。

TTP LabTech公司的纳升级液体处理工作站-Mosquito Crystal是目前唯一能在96孔板上进行自动化蛋白晶体悬滴生长的仪器。顾名思义,以蚊子来命名微量液体分装设备,不乏幽默之意。Mosquito可从样品板中一次一排地吸取和分配液体,使得微量的蛋白质溶液可分配到一个悬滴生长板盖的所有96个“窗口”上。同时这也意味着结晶溶剂的微滴能以镜像方式加入到蛋白质液滴之上,然后倒转板盖,微滴就被放置到相应的微孔之上。

Mosquito用于悬滴法晶体生长的优势包括:悬滴设置在两分钟之内即可完成,无需湿度控制;只需常规的(便宜的)平底96孔板和板盖;在添加筛选溶液时更换加样针避免了清洗步骤;自动化设置保证了准确性和可重复性。

对于坐滴法, Mosquito可将液滴高度精确地定位到标准结晶板的结晶池中央或者原有液滴之上,即使使用更小的液滴也不必担心蛋白质微滴和结晶溶剂微滴不会融合在一起。当利用成像系统自动筛选微滴时,由于目标区域小很多,晶体更容易被找到。系统设置速度快, 4分钟可完成一个三结晶池96孔的Greiner结晶板设置。

Mosquito的精密性和可重复性允许用户在每个微孔中设立若干个多成分的液滴——即使在高密度的96孔悬滴晶体生长板中,以便同时评估不同的样品、结构、复合物、蛋白质修饰(如携带不同的标签或构建不同的截短体)、蛋白质/池液体积比或者蛋白质浓度对晶体生长的影响。可以在一个坐滴或悬滴晶体生长板中产生288个条件,帮助研究人员节省了宝贵的时间和蛋白样品

3. 数据收集、构建模型 盼星星、盼月亮,终于盼到结晶出现,就可以进行X射线衍射了。快速将晶体降到接近液氮的温度,以减少热力学振动(增加分辨率);将晶体固定在一个针上,并置于X射线光路中;用X射线照射,用检测仪记录衍射图;旋转晶体,收集更多的衍射图;通过电脑计算,将衍射图转换成二维电子密度图,显示原子的位置;结合多个二维图,得出三维图像;用已知的氨基酸序列及结构合理的相关知识,构建一个符合衍射图像的蛋白模型。

以上就是蛋白结晶的大致流程了。如果大家还想了解更多的细节,可以查看饶子和教授等近期发表的文章。