

## 物理环境影响蛋白质晶体形核的研究进展

陈瑞卿, 刘君, 鹿芹芹, 刘永明, 尹大川

西北工业大学生命学院 空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西安 710072

**摘要:** 物理环境是影响蛋白质晶体形核的重要因素。文中回顾了各种物理环境如光、电场、超声波、磁场、微重力、温度、机械振动、异相形核界面对蛋白质晶体形核的影响, 并对各物理环境下蛋白质晶体形核的可能机制进行探讨, 展望了利用物理环境影响蛋白质晶体形核的研究前景。

**关键词:** 蛋白质, 晶体, 形核, 物理环境

## Effects of physical environments on nucleation of protein crystals: a review

Ruiqing Chen, Jun Liu, Qinqin Lu, Yongming Liu, and Dachuan Yin

Key Laboratory for Space Bioscience & Biotechnology, School of Life Sciences, Northwestern Polytechnic University, Xi'an 710072, China

**Abstract:** This paper reviews the effects of physical environments (including light, electric field, ultrasound, magnetic field, microgravity, temperature, mechanical vibration, and heterogeneous nucleation interface) on protein crystal nucleation. The research results are summarized and the possible mechanisms of the effects are discussed. In the end of this review, the application prospects of these physical environments (including coupled environments) in protein crystallization are presented.

**Keywords:** protein, crystal, nucleation, physical environment

X 射线单晶衍射技术已经解析了 85% 以上的已知蛋白质结构 (PDB, www.pdb.org), 是迄今应用最广泛的生物大分子结构解析技术。该技术需要高质量的蛋白质晶体作为衍射对象, 但由于蛋白质晶体的制备困难, 所以蛋白质结晶是蛋白质结构解析的

“瓶颈”问题之一<sup>[1]</sup>。蛋白质结晶过程受多参数影响<sup>[2-3]</sup>, 如物理、化学或生化因素等, 这些因素影响了蛋白质晶体的形核及生长过程。晶体的形核与生长是蛋白质结晶过程中不可分割的 2 个阶段, 其中, 形核作为结晶过程中的第一个阶段, 是获取蛋白质

**Received:** April 26, 2010; **Accepted:** August 27, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 10772150), New Century Excellent Talents in University (No. NCET-06-0885), Ph.D Programs Foundation of the Ministry of Education of China (No. 200806990011), Fundamental Research Foundation of Northwestern Polytechnical University in China (No. 3).

**Corresponding author:** Dachuan Yin. Tel/Fax: +86-29-88460254; E-mail: yindc@nwpu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 10772150), 新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-06-0885), 国家博士点基金 (No. 200806990011), 西北工业大学基础科研重点项目 (No. 3) 资助。

晶体过程起决定性作用的环节。因此,合理控制蛋白质晶体的形核,不仅可以提高获得晶体的机会,同时也有利于提高晶体的衍射质量。

蛋白质晶体的形核和生长受到一些物理环境因素的影响,如温度<sup>[4-5]</sup>、光<sup>[6-7]</sup>、电场<sup>[8-11]</sup>、超声波<sup>[12-13]</sup>、磁场<sup>[14-16]</sup>、微重力<sup>[17-18]</sup>、机械振动<sup>[19]</sup>、异相形核界面<sup>[20-21]</sup>等。重视和把握这些影响蛋白质结晶的因素,有助于获得高质量的晶体,为蛋白质晶体结构的解析打下基础。

## 1 蛋白质晶体的形核

### 1.1 蛋白质晶体形核的条件

形核是蛋白质分子有序聚集进而形成稳定结晶簇的自发过程。在该过程中,分子需要高度的选择性和正确的取向<sup>[22]</sup>。形核需要达到一定的过饱和度,通过蛋白质结晶溶液体系的相图(示意如图1,引自文献<sup>[23]</sup>),有助于深入理解形核的过程。从相图可了解到系统中相关变量(例如蛋白质浓度、温度、溶剂特征、pH及离子强度等)条件下的物质状态。

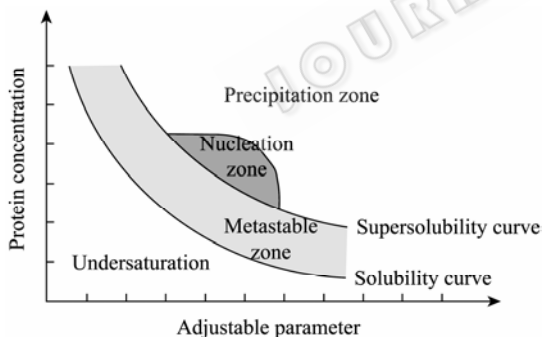


图1 蛋白质结晶溶液体系相图<sup>[23]</sup>

Fig. 1 Schematic illustration of the phase diagram of protein crystallization solution<sup>[23]</sup>.

从图1可看出,蛋白质结晶溶液体系相图一般可分为4个区域:欠饱和区、亚稳区、形核区和沉淀区。在溶解度曲线以下是欠饱和区,自发的形核不会发生;亚稳区是晶体生长的最佳区域,但在任何合理的时间内都不会自发形核;在形核区,过饱和度足够大,可以保证自发的形核发生;在沉淀区,由于过饱和度太高,更容易迅速形成沉淀<sup>[23-24]</sup>。

### 1.2 蛋白质晶体形核的机理

相比于小分子物质,由于蛋白质分子本身结构的复杂性,其晶体的形核机理相当复杂。上世纪90年代,有关蛋白质晶体形核机理方面的研究比较多<sup>[25-26]</sup>,但与晶体生长过程相比,形核过程的研究还是很少。这种现状与形核过程的重要性地位并不相称。出现这种现象的主要原因在于形核过程的复杂性及深入研究的难度较大。

通常认为,蛋白质晶体形核的驱动力是过饱和度和,从自由能角度看,却不是一个体系自由能降低的过程。下文将分别从过饱和度和体系自由能变化角度来探讨形核过程。

#### 1.2.1 过饱和度与形核

Baird等<sup>[27]</sup>研究了蛋白质晶体形核的机理,提出形核是由过饱和度驱动的。其研究将形核过程中的相对过饱和度 $\sigma$ 定义为:

$$\sigma = (c/c_s) - 1 \quad (1)$$

式中: $\sigma$ 是溶液的相对过饱和度,为无量纲数; $c$ 是溶液中蛋白质的质量浓度; $c_s$ 是蛋白质的溶解度。

在任何时间内蛋白质在系统中均遵循质量守恒定律:

$$m_0 = c_s(\sigma(t) + 1)V + m_1(t) \quad (2)$$

式中: $m_0$ 是蛋白质的初始质量; $V$ 是溶液的体积; $t$ 是时间; $m_1$ 是在一段时间 $t$ 后晶体从溶液中析出的质量。

将方程(2)对时间 $t$ 求微分有:

$$\frac{dm_1(t)}{dt} = -c_s V \frac{d\sigma(t)}{dt} \quad (3)$$

此方程的意义可表述为在某一时刻晶体质量的增长率与过饱和度的降低率相关。

由经典的形核理论,晶体生长溶液中出现临界晶核的速率即形核率 $I(\sigma)$ (定义为单位时间单位体积内出现晶核的数量)可表示为:

$$I(\sigma) = I' c_s^2 (\sigma + 1)^2 \exp(-I'' / (\ln(\sigma + 1))^2) \quad (4)$$

式中: $I'$ 是比速率; $I''$ 是无量纲数。

由 (4) 式可知过饱和度越大, 形核越快, 说明适宜大小的过饱和度可驱动蛋白质形核。

与小分子晶体的形核相比, 蛋白质晶体形核需要更大的过饱和度, 这已经得到了无数事实的支持。出现这种现象的原因, 可能与蛋白质分子本身的复杂程度有关, 而且因为蛋白质分子需要在溶液中获得一致取向时才有机会形核, 从而使其形核更加困难。

### 1.2.2 晶体的形核自由能

晶核形成时自由能  $\Delta G$  的变化, 也被认为是形核过程的驱动力, 这是从自由能角度而言的观点。晶核形成时, 不仅需要达到一定的临界尺寸<sup>[28]</sup>, 而且需要越过一定的能量势垒才能形成稳定的晶核。 $\Delta G$  依赖于有序堆积聚集体的尺寸, 临界尺寸又与晶核形成时的能垒相关。

Gacia-Ruiz<sup>[29]</sup>研究了形核过程中能量势垒的变化。将晶核假定为球形模型 (表面张力不随方向而改变), 从而推导出形成结晶簇半径为  $r$  时的自由能表达式:

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\frac{\pi r^3}{v}kT \ln S + 4\pi r^2\gamma \quad (5)$$

式中:  $r$  是结晶簇半径;  $v$  是摩尔体积, 定义为晶胞体积与每单位晶胞中分子数之间的比例;  $k$  为玻尔兹曼常数;  $T$  为体系的绝对温度;  $S$  为溶液的过饱和度, 定义为溶液实际的活度 (或浓度) / 在平衡时的活度 (或浓度);  $\gamma$  是结晶簇表面的比能, 可认为是表面张力。将方程 (5) 对  $r$  求导并令导数值为 0, 可得到临界晶核半径  $r^*$  的表达式:

$$r^* = \frac{2v\gamma}{kT \ln S} \quad (6)$$

将 (6) 代入 (5) 式可得达到临界尺寸晶核时, 溶液所需要克服的能量势垒  $\Delta G^*$  的表达式:

$$\Delta G^* = \frac{16\pi v^2\gamma^3}{3[kT \ln S]^2} \quad (7)$$

晶核形成率  $I$  即单位体积的晶核数在单位时间内形成临界晶核的速率可表达为:

$$I = B \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{kT}\right) \quad (8)$$

式中:  $B$  为指前因子, 近似为常数, 其值很难从理论上得到。 $B$  与形成晶核时的化学动力学、溶液的粘性、分子电荷、分子体积和溶液的密度等有关。

根据上述所有公式, 可见形核过程与溶液过饱和度之间存在密切的关系。

Durbin 和 Feher 的研究表明<sup>[30]</sup>, 在过饱和的大分子溶液中, 如果过饱和度  $c/c_s$  超过 1, 在正常的结晶条件下, 大分子聚集体自由能随其尺寸增大而增大, 当聚集体的尺寸达到一定值, 其自由能达到最大, 尺寸继续增加, 自由能将开始减小。由于自由能减小过程是一个自发进行的过程, 因此, 该有序聚集体的继续生长也相应地自发进行。此时的有序聚集体即为临界晶核 (即与最大自由能对应时的聚集体半径为临界晶核半径  $r^*$ )。高过饱和度溶液 ( $S_a > S_b$ ) 的形核自由能要明显低于低过饱和度溶液的形核自由能 ( $\Delta G_a^* < \Delta G_b^*$ , 如图 2, 引自文献<sup>[29]</sup>), 可见高过饱和度可降低形核势垒。研究还发现, 形成晶核所需要的时间高度依赖于形核势垒的大小。

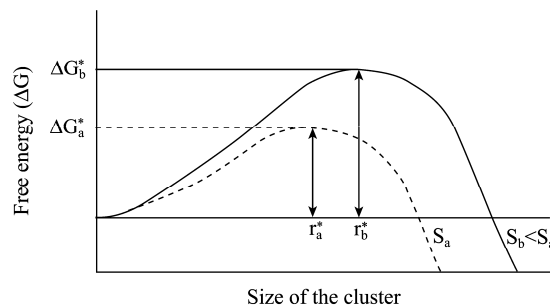


图 2 形核自由能随过饱和度的变化图<sup>[29]</sup>

Fig. 2 Variation in the free energy as a function of supersaturation<sup>[29]</sup>.

## 2 各种物理环境下蛋白质晶体的形核

### 2.1 光

近年来, 光照作为影响蛋白质结晶的一个重要因素, 越来越受到结晶学家的重视。主要工作集中在: 激光和紫外光照射的影响。

利用激光照射蛋白质结晶溶液的研究发现,一定强度飞秒激光照射可以促进蛋白质晶体形核,明显缩短形核时间,同时提高蛋白质晶体的质量<sup>[31-33]</sup>。有研究认为,激光促进蛋白质晶体形核的原因是在激光照射下,蛋白质溶液中产生了局部过饱和<sup>[34]</sup>。

在高过饱和溶液中,自发形核容易产生。利用激光照射,可在低过饱和溶液中形成局部高过饱和区,实现蛋白质在低过饱和度溶液中的形核,从而有利于生长高质量的蛋白质晶体。Sasaki 等<sup>[32]</sup>的研究也佐证了上述观点:在低过饱和度溶液中,应用传统的方法 AcrB 膜蛋白不会结晶,而在飞秒激光(波长 780 nm、脉冲宽度 200 fs)照射下得到了 AcrB 膜蛋白晶体,生长期为 3~5 d。膜蛋白的溶解度非常低,其结晶至今仍很困难,而 60% 的商业药物靶向蛋白都是膜蛋白。因此,此技术的发现对于在低过饱和溶液中结晶膜蛋白并提高其质量有很大价值。激光照射不仅对膜蛋白的结晶有重要的价值,对可溶性蛋白的结晶也有重要的影响。Adachi 等<sup>[35]</sup>的研究表明在相同条件下运用传统方法未得到葡萄糖异构酶、核糖核酸酶晶体,而运用飞秒激光则诱导了葡萄糖异构酶、核糖核酸酶、布氏锥虫的前列腺素 F2a 合酶的形核,同时明显缩短了布氏锥虫的前列腺素 F2a 合酶的结晶期。

Okutsu 等<sup>[6,36]</sup>研究了氙灯产生的紫外光对蛋白质结晶的影响,发现紫外照射可促进溶菌酶和核糖核酸酶 A 的形核。在氙灯照射下测定蛋白质的活性,发现在较短的照射时间内蛋白质的活性不受影响。选用不同波长的氙灯进行照射,发现溶菌酶的形核数量与波长有很大关系,在波长为 400 nm 时形核数量基本不变,而在波长为 280 nm、300 nm 时形核数量明显增加,且在 280 nm 处的形核数量最大。实验表明,蛋白质表面的氨基酸残基(如丝氨酸、酪氨酸)在光照下会发生电子跃迁,形成一种中间态,进而形成稳定的二聚体,这通过 SDS-PAGE 电泳进行了验证。二聚体会吸引周围的溶菌酶分子形成稳定临界尺寸的晶核,从而促进形核。

## 2.2 电场

带电物质在电场中会受到电场力作用,蛋白质为两性物质,在不同 pH 值下带有不同电荷,当溶液 pH 值小于蛋白质等电点 pI 时,蛋白质带正电;反之带负电,因此蛋白质溶液在电场中时会受到电场力的作用。Taleb 等<sup>[8]</sup>于 1999 年报道了电场对溶菌酶结晶的影响,实验结果表明:在外加电场作用下,溶菌酶晶体数量明显减少、尺寸增大,晶核形成率显著降低,且在阴极形核的几率比较大。对其进行理论分析,可认为,在电场作用下,蛋白质溶液可形成浓度梯度,导致结晶溶液中出现局部过饱和现象,最终影响蛋白质晶体的形核和生长<sup>[37]</sup>。Al-haq 等<sup>[38]</sup>全面综述了电场对蛋白质结晶的影响,指出电场对蛋白质晶体的形核及晶体生长过程有很大的影响。

Penkova 等<sup>[39]</sup>的研究表明,在使用坐滴法的结晶实验中,电场强度为 2~4 kv/cm 时,可抑制铁蛋白质和去铁铁蛋白质晶体的形核,在 4~6 kv/cm 时下却促进此二者的形核;电场强度为 2~6 kv/cm 时,可促进溶菌酶晶体的形核。分析原因,认为可能是在外加电场作用下,溶菌酶向阴极移动,溶液中可能会形成浓度梯度,出现局部过饱和,从而促进蛋白质晶核的形成。但当溶质流动较少时,可能反而会抑制晶核的形成。因此,一定的溶质流动速度可能会导致晶体快速形核。

电场对蛋白质结晶的影响是一个涉及多参数的过程,例如结晶的方法、蛋白质的种类、电场强度、电场作用的时间、电极的分布位置及电极数等,因此其对形核的影响比较复杂,当条件适宜时会促进形核,反之会起到抑制的作用。近期 Koizumi 等<sup>[11]</sup>的研究表明可以通过改变交流电场的频率成功控制溶菌酶晶核形成速率,从而影响晶核形成数量。

## 2.3 超声波

声结晶作为声化工的一个分支,主要是通过超声波来控制结晶过程的一门新技术。声结晶很早就应用于小分子物质,其作用包括可以缩短形核诱

导期、促进晶核形成、改变溶液过饱和度及亚稳区宽度、影响晶体晶型以及控制晶体的尺寸等<sup>[40-41]</sup>。近 10 年来超声波已成为强化结晶过程的热点问题之一, 然而其对蛋白质结晶的影响却很少有报道。Luft 和 DeTitta<sup>[12]</sup>曾于 1999 年将超声波用于蛋白质结晶。运用的是超声波振动可产生能量的原理, 使溶液中的聚四氟乙烯珠子移动, 将大晶体粉碎为均匀的微小籽晶。将这些微籽晶加入过饱和度低的蛋白质溶液中, 就可以实现在亚稳区生长蛋白质晶体。

Kakinouchi 等<sup>[13]</sup>研究了超声波直接应用于蛋白质结晶时的作用。超声波应用于结晶过程时会产生较高的能量, 超声的时间及超声的照射点也会对结晶造成一定的影响。研究发现: 一组实验为在结晶实验开始后的 0 min、超声照射 10 s 后的结晶样品, 与未超声以及超声作用 60 s 的对照样品相比, 超声 10 s 明显缩短了诱导形核的时间, 促进了形核, 产生的晶体数量最多; 另一组实验的处理方式为, 在结晶开始后的 30 min、超声照射 60 s。与对照相比, 这种处理方式得到的样品其形核所用时间反而增加了, 但与未超声处理的样品相比, 也有促进形核的作用。分析原因, 认为可能是由于超声波打碎了已经形成的结晶簇或晶核, 因此延长了形核诱导期。一定条件下的超声波处理可明显降低蛋白质形核的诱导期<sup>[42]</sup>, 促进晶核的形成, 在不同浓度下有同样的效应。在该实验中超声波加速溶菌酶晶核形成的原因可能是由于其打碎了一些事先已经形成的蛋白质晶体作为新的形核中心, 从而减少了形核时间, 可见超声波对蛋白质的作用力大于其分子间的结合能。

## 2.4 磁场

Yin 等<sup>[15]</sup>研究了磁场中的蛋白质结晶过程, 发现蛋白质结晶溶液体系在磁场中会受到磁化力的作用, 有可能抑制溶液中的对流和沉降。Sazaki 等<sup>[14]</sup>在 1997 年研究了磁场对蛋白质晶体形核和晶体生长的影响, 并证实 10 T 强磁场下, 溶菌酶、铁蛋白质晶体的形核数减少, 同时晶体尺寸增大, 且晶体呈现明显的择优取向现象。可见磁场作用可以控

制蛋白质晶核的数量, 对于生长个数少尺寸大的晶体可能是一种很有效的方法。但近期的研究报道给出了相异的结果。如本课题组<sup>[43]</sup>最近研究发现, 在强磁场条件下, 顺磁溶液中溶菌酶晶体的特异取向会随着 pH 值的改变而改变, 根据该研究结果, 推论得出溶菌酶分子的磁各向异性会受到溶液中 pH 值影响, 进而影响分子在磁场中的取向。分子在磁场中的共同取向可能有助于分子进行有序排列, 从而促进形核。近期 Gavira 等<sup>[44]</sup>的研究也得到类似的结果。其研究发现恒定磁场可降低溶菌酶晶核形成的诱导时间, 提高晶核的形成密度。当撤去磁场时, 相应的效应也随之消失。这些研究结果表明, 磁场可能有助于蛋白质晶体的形核。由于过去的报道互不一致, 相关的研究还有待进一步深入进行。

除了恒定磁场, 梯度磁场对形核的研究也有报道。Wakayama 等<sup>[45]</sup>发现, 当蛋白质结晶溶液处于梯度磁场中的不同位置时, 晶核形成会有不同的表现。研究表明, 在梯度磁场中, 当磁力与所受重力反向时, 溶菌酶结晶溶液的重力水平降低 5%, 晶体数少于对照组, 这可能是由于失重减少了溶液的沉降和对流; 当磁场与所受重力同向时, 溶菌酶结晶溶液的重力增加 5%, 晶体数量多于对照组, 这可能是由于超重增加了溶液中的沉降和对流, 易形成临界晶核所致。可见梯度磁场可通过改变重力水平影响晶体生长过程中的沉降和对流, 从而影响蛋白质晶体形核及生长过程<sup>[46]</sup>。

## 2.5 微重力

蛋白质结晶通常在常重力条件下进行。随着空间科学及技术的迅速发展, 在微重力环境下生长蛋白质晶体成为可能。自上个世纪 80 年代开始, 探空火箭、返回式卫星、空间站等手段被大量用于开展空间蛋白质结晶实验。一般认为, 空间微重力主要通过两个方面的作用影响蛋白质结晶: 一方面, 微重力条件下自然对流基本消失。在此情况下, 溶质运输受到限制, 从而导致生长中的晶体周边出现溶质缺乏区, 使晶体生长过程中的溶质运输主要由扩

散完成。这被普遍认为是改善晶体质量的主要原因之一。另外一个方面,空间微重力条件下,沉降现象消失。在常重力条件下,研究表明<sup>[17]</sup>,当晶体尺寸增长到 1  $\mu\text{m}$  时,原来在溶液中悬浮的晶体,会在重力作用下发生沉降,从而容易发生晶体之间的融合,导致晶体质量变差。在空间微重力环境中,由于导致沉降的重力因素消失,因此沉降现象消失。这也是解释晶体质量提高的主要原因之一。

微重力环境对形核的影响方面,研究结果显示,微重力环境下,晶体形核时间延长,数量减少,尺寸增大<sup>[17-18,47]</sup>。可见微重力条件下晶体形核的机会是减少的。

过去,受航天活动机会及发射成本等的限制,空间蛋白质结晶仅取得了有限的成功。长远看,随着未来空间环境利用的逐步普及,空间蛋白质结晶无论在实际应用还是在继续深入机理研究方面,均有望迎来新的重要发展。

## 2.6 温度

温度与蛋白质的溶解度具有直接的相关性,对于大部分蛋白质而言,在一定的温度范围内,其溶解度随温度的升高而增加。但一些蛋白质具有倒溶解度,即溶解度随温度的升高而降低。因此温度可通过调节蛋白质的溶解度从而改变溶液的过饱和度,继而影响蛋白质晶体形核和生长过程。

以温度作为推动力,结晶实验可快速并且可逆地控制过饱和度,影响晶体的数量、尺寸及质量<sup>[48-49]</sup>。Murai 等<sup>[5]</sup>的研究发现,在相同浓度下,溶菌酶在不同温度下的形核数有显著差异。在高浓度的溶菌酶溶液中,低温下形核数要明显多于高温下。在低浓度的溶菌酶溶液中,在温度升高到一定值时没有晶体出现,这说明温度的升高使溶菌酶溶液进入未饱和区,从而无法形核,不能获得晶体。Lin 等<sup>[50]</sup>研究了不同温度下 10 种蛋白质结晶的相图,通过计算发现改变温度可控制形核区的面积,进而影响蛋白质晶体的形核与生长。

温度梯度法是目前普遍应用于结晶的一种方

法,当需要解析某种未知结构的蛋白质时,其最佳的结晶温度尚不明确时,温度梯度法将是一种很好的选择,此法可明显促进形核<sup>[51]</sup>。Murai 等<sup>[52]</sup>通过计算机来控制冷却速率,在单一的微孔板上产生许多温度点,形成在不同冷却速率下的温度梯度,将 20  $^{\circ}\text{C}$  下没有蛋白质晶体生长的溶液进行冷却,冷却速率为 1.5  $^{\circ}\text{C}/\text{d}$ ~4  $^{\circ}\text{C}/\text{d}$ ,用显微镜进行观察,发现快速冷却条件下可促进形核,冷却速度慢的条件下晶体数量少尺寸大,以此可成功控制晶体数量及晶体的尺寸。本课题组<sup>[4,53]</sup>使用温度扫描的方法对蛋白质结晶进行了筛选,结果表明温度扫描明显促进了蛋白质晶体形核,明显提高了筛选的成功率。温度梯度法虽然可以通过改变温度来控制蛋白质晶体的形核,然而温度变化有一定的局限性,因为并非所有蛋白质对温度变化都是很敏感的。

## 2.7 机械振动

事实上,在蛋白质结晶过程中,机械振动总是存在的。但是该环境对蛋白质结晶的影响研究未见报道过。本课题组最近研究了主动机械振动对蛋白质结晶的可重复性及结晶条件筛选成功率的影响<sup>[19]</sup>。发现在机械振动环境中,低过饱和度条件下的蛋白质晶体形核数量减少;而高过饱和度条件下的蛋白质晶体形核数量与对照组相当,甚至增加。经详细研究发现,机械振动总体上抑制蛋白质晶体的形核。但是在高过饱和度条件下,足够高的过饱和度保证了在机械振动下的晶体形核,但是在没有机械振动的情况下,由于过饱和度高,蛋白质分子聚集太快,最后形成了沉淀,从而使在高过饱和度条件下蛋白质在没有振动时形核数量反而较低。除了抑制形核外,另一个有趣的发现是,机械振动下生长的蛋白质晶体通常在外观上看起来更完美,预示其晶体质量可能更好。

## 2.8 异相形核

MchPerson 第一次将异相形核材料用于蛋白质结晶实验<sup>[20]</sup>,以此来控制形核时的过饱和度。这一研究意义很大,因为其指出了一种在较低过饱和和条

件下形核的途径, 非常有利于生长高质量的晶体。此后多种异相形核材料如多孔渗水硅<sup>[54]</sup>、聚合体膜<sup>[55]</sup>、脂肪酸薄膜<sup>[56]</sup>、多微孔合成沸石<sup>[57]</sup>、功能化处理的云母片<sup>[58]</sup>、氢氟酸处理的盖玻片<sup>[59]</sup>等被用于诱导及控制蛋白质晶体的形核。2009年 Asanithi 等<sup>[21]</sup>第一次将碳纳米管薄膜用于蛋白质结晶, 研究表明应用这种纳米尺度的多孔材料可以控制形核, 使在过饱和度低的溶液中生长数量少尺寸大的蛋白质晶体。此技术成功地用于 MyBP-C 蛋白质的结晶, 衍射分辨率达 1.6 Å, 是传统结晶方法下获得最好衍射分辨率的 2 倍。这种材料微孔尺寸与晶核的尺寸大小相当, 可促进蛋白质晶体的快速形核, 是蛋白质晶体形核极好的候选材料。

由于使用异相形核的方法对很多蛋白质的结晶有效, 因此, 近年来结晶学家一直在寻求一种结晶的通用晶核<sup>[60]</sup>。2009年 Saridakis 和 Chayen 对近年来异相形核多孔材料的研究进行了总结<sup>[61]</sup>, 指出迄今为止最接近于通用晶核的是 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> (称作生物玻璃), 这种晶核促进了 14 种蛋白质的结晶, 其中包括了多种传统方法难于结晶的蛋白质。然而到目前为止, 仍不能说已经找到针对于所有蛋白质结晶的通用晶核。

### 3 展望

随着生命科学领域的飞速进展, 迫切需要对各类蛋白质的结构进行解析, 这对于以蛋白质为靶点的药物设计是至关重要的, X 射线单晶衍射法解析蛋白质结构需要获得高质量的晶体, 形核作为蛋白质结晶的第一步, 并对晶体质量起到一定的操控作用, 因此形核方法的研究是不容忽视的。

目前对于许多晶体形核方法的机制尚不明确, 有待科学家们进一步的探索。新的可控制形核的方法相继出现, 与已有的结晶技术相融合, 取得了部分阶段性的成果, 如磁场与电场的结合对蛋白质晶体形核率的提高, 多物理场耦合作用有望成为下一阶段蛋白质晶体形核研究的热点之一。随着许多新

型的异相形核材料用于结晶实验, 通过材料表面的功能化控制晶体形核的数量及时间亦将成为这个领域的研究重点。

### REFERENCES

- [1] Yin DC, Wakayama NI, Harata K, et al. Formation of protein crystals (orthorhombic lysozyme) in quasi-microgravity environment obtained by superconducting magnet. *J Cryst Growth*, 2004, 270(1/2): 184–191.
- [2] McPherson A. Introduction to protein crystallization. *Methods*, 2004, 34(3): 254–265.
- [3] Li XX, Xu XD, Dan YY, et al. The factors during protein crystallization: a review. *Crystallogr Rep*, 2008, 53(7): 1261–1266.
- [4] Zhang CY, Yin DC, Lu QQ, et al. Cycling temperature strategy: a method to improve the efficiency of crystallization condition screening of proteins. *Cryst Growth Des*, 2008, 8(12): 4227–4232.
- [5] Murai R, Yoshikawa HY, Kawahara H, et al. Effect of solution flow produced by rotary shaker on protein crystallization. *J Cryst Growth*, 2008, 310(7/9): 2168–2172.
- [6] Okutsu T. Photochemically-induced crystallization of protein. *J Photochem Photobiol C*, 2007, 8(3): 143–155.
- [7] Kashii M, Hosokawa Y, Kitano H, et al. Femtosecond laser-induced cleaving of protein crystal in water solution. *Appl Surf Sci*, 2007, 253(15): 6447–6450.
- [8] Taleb M, Didierjean C, Jelsch C, et al. Crystallization of proteins under an external electric field. *J Cryst Growth*, 1999, 200(3/4): 575–582.
- [9] Hammadi Z, Astier JP, Morin R, et al. Spatial and temporal control of nucleation by localized DC Electric Field. *Cryst Growth Des*, 2009, 9(8): 3346–3347.
- [10] Hou D, Chang HC. ac field enhanced protein crystallization. *Appl Phys Lett*, 2008, 92(22): 223902.
- [11] Koizumi H, Fujiwara K, Uda S. Control of nucleation rate for tetragonal hen-egg white lysozyme crystals by application of an electric field with variable frequencies. *Cryst Growth Des*, 2009, 9(5): 2420–2424.
- [12] Luft JR, DeTitta GT. A method to produce microseed stock for use in the crystallization of biological macromolecules. *Acta Cryst D Biol Crystallogr*, 1999, 55(Pt 5): 988–993.
- [13] Kakinouchi K, Adachi H, Matsumura H, et al. Effect of ultrasonic irradiation on protein crystallization. *J Cryst*

- Growth, 2006, 292(2): 437–440.
- [14] Sazaki G, Yoshida E, Komatsu H, et al. Effects of a magnetic field on the nucleation and growth of protein crystals. *J Cryst Growth*, 1997, 173(1/2): 231–234.
- [15] Yin DC, Lu HM, Geng LQ, et al. Growing and dissolving protein crystals in a levitated and containerless droplet. *J Cryst Growth*, 2008, 310(6): 1206–1212.
- [16] Surade S, Ochi T, Nietlispach D, et al. Investigations into protein crystallization in the presence of a strong magnetic field. *Cryst Growth Des*, 2010, 10(2): 691–699.
- [17] Kundrot CE, Judge RA, Pusey ML, et al. Microgravity and macromolecular crystallography. *Cryst Growth Des*, 2001, 1(1): 87–99.
- [18] Snell EH, Helliwell JR. Macromolecular crystallization in microgravity. *Rep Prog Phys*, 2005, 68(4): 799–853.
- [19] Lu QQ, Yin DC, Liu YM, et al. Effect of mechanical vibration on protein crystallization. *J Appl Crystallogr*, 2010, 43(3): 473–482.
- [20] McPherson A, Shlichta P. Heterogeneous and epitaxial nucleation of protein crystals on mineral surfaces. *Science*, 1988, 239(4838): 385–387.
- [21] Asanithi P, Saridakis E, Govada L, et al. Carbon-nanotube-based materials for protein crystallization. *Acs Appl Mater Interfaces*, 2009, 1(6): 1203–1210.
- [22] Nanev CN. How do crystal lattice contacts reveal protein crystallization mechanism? *Cryst Res Technol*, 2008, 43(9): 914–920.
- [23] Chayen NE. Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation. *Prog Biophys Mol Biol*, 2005, 88(3): 329–337.
- [24] Navarro A, Wu HS, Wang SS. Engineering problems in protein crystallization. *Sep Purif Technol*, 2009, 68(2): 129–137.
- [25] Ataka M. Nucleation and growth kinetics of hen egg-white lysozyme crystals. *Prog Cryst Growth Charact Mater*, 1995, 30(2/3): 109–128.
- [26] Saikumar MV, Glatz CE, Larson MA. Lysozyme crystal growth and nucleation kinetics. *J Cryst Growth*, 1998, 187(2): 277–288.
- [27] Baird JK, Hill SC, Clunie JC. Kinetics of protein crystal nucleation and growth in the batch method. *J Cryst Growth*, 1999, 196(2/4): 220–225.
- [28] Feher G. Mechanisms of nucleation and growth of protein crystals. *J Cryst Growth*, 1986, 76(3): 545–546.
- [29] Garcia-Ruiz JM. Nucleation of protein crystals. *J Struct Biol*, 2003, 142(1): 22–31.
- [30] Durbin SD, Feher G. Protein crystallization. *Annu Rev Phys Chem*, 1996, 47(1): 171–204.
- [31] Yoshikawa HY, Murai R, Sugiyama S, et al. Femtosecond laser-induced nucleation of protein in agarose gel. *J Cryst Growth*, 2009, 311(3): 956–959.
- [32] Sasaki T, Mori Y, Kawamura F, et al. New developments in crystal growth from solutions: oxides, proteins, and nitrides. *J Cryst Growth*, 2008, 310(7/9): 1288–1297.
- [33] Murai R, Yoshikawa HY, Takahashi Y, et al. Enhancement of femtosecond laser-induced nucleation of protein in a gel solution. *Appl Phys Lett*, 2010, 96(4): 043702.
- [34] Nakamura K, Sora Y, Yoshikawa HY, et al. Femtosecond laser-induced crystallization of protein in gel medium. *Appl Surf Sci*, 2007, 253(15): 6425–6429.
- [35] Adachi H, Takano K, Hosokawa Y, et al. Laser irradiated growth of protein crystal. *Jpn J Appl Phys*, 2003, 42(7B): L798–L800.
- [36] Furuta K, Horiuchi H, Hiratsuka H, et al. Photochemically induced nucleation of ribonuclease A enhanced by a stable protein dimer produced from the photochemical reaction of Tyr residual groups. *Cryst Growth Des*, 2008, 8(6): 1886–1889.
- [37] Hammadi Z, Veessler S. New approaches on crystallization under electric fields. *Prog Biophys Mol Biol*, 2009, 101(1/3): 38–44.
- [38] Al-haq MI, Lebrasseur E, Tsuchiya H, et al. Protein crystallization under an electric field. *Crystallogr Rev*, 2007, 13(1): 29–64.
- [39] Penkova A, Gliko O, Dimitrov IL, et al. Enhancement and suppression of protein crystal nucleation due to electrically driven convection. *J Cryst Growth*, 2005, 275(1/2): e1527–e1532.
- [40] Luque de Castro MD, Priego-Capote F. Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization). *Ultrason Sonochem*, 2007, 14(6): 717–724.
- [41] Virone C, Kramer HJM, van Rosmalen GM, et al. Primary nucleation induced by ultrasonic cavitation. *J Cryst Growth*, 2006, 294(1): 9–15.
- [42] Nanev CN, Penkova A. Nucleation of lysozyme crystals under external electric and ultrasonic fields. *J Cryst Growth*, 2001, 232(1/4): 285–293.
- [43] Yin DC, Geng LQ, Lu QQ, et al. Multiple orientation responses of lysozyme crystals to magnetic field when paramagnetic salts are used as the crystallization agents.



- Cryst Growth Des, 2009, 9(12): 5083–5091.
- [44] Gavira JA, Garcia-Ruiz JM. Effects of a magnetic field on lysozyme crystal nucleation and growth in a diffusive environment. *Cryst Growth Des*, 2009, 9(6): 2610–2615.
- [45] Wakayama NI, Ataka M, Abe H. Effect of a magnetic field gradient on the crystallization of hen lysozyme. *J Cryst Growth*, 1997, 178(4): 653–656.
- [46] Sazaki G. Crystal quality enhancement by magnetic fields. *Prog Biophys Mol Biol*, 2009, 101(1/3): 45–55.
- [47] Han Y, Cang HX, Zhou JX, et al. Protein crystal growth on board Shenzhou 3: a concerted effort improves crystal diffraction quality and facilitates structure determination. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324(3): 1081–1086.
- [48] Christopher GK, Phipps AG, Gray RJ. Temperature-dependent solubility of selected proteins. *J Cryst Growth*, 1998, 191(4): 820–826.
- [49] McPherson A. Crystallization of proteins by variation of pH or temperature. *Methods Enzymol*, 1985, 114: 125–127.
- [50] Lin YB, Zhu DW, Wang T, et al. An Extensive study of protein phase diagram modification: increasing macromolecular crystallizability by temperature screening. *Cryst Growth Des*, 2008, 8(12): 4277–4283.
- [51] D'Arcy A, Mac Sweeney A, Stihle M, et al. The advantages of using a modified microbatch method for rapid screening of protein crystallization conditions. *Acta Cryst D Biol Crystallogr*, 2003, 59(Pt 2): 396–399.
- [52] Murai R, Nakata S, Kashii M, et al. Cooling-rate screening system for determining protein crystal growth conditions. *J Cryst Growth*, 2006, 292(2): 433–436.
- [53] Wang XK, Yin DC, Zhang CY, et al. Effect of temperature programmes on protein crystallisation. *Cryst Res Technol*, 2010, 45(5): 479–489.
- [54] Chayen NE, Saridakis E, El-Bahar R, et al. Porous silicon: an effective nucleation-inducing material for protein crystallization. *J Mol Biol*, 2001, 312(4): 591–595.
- [55] Fermani S, Falini G, Minnucci M, et al. Protein crystallization on polymeric film surfaces. *J Cryst Growth*, 2001, 224(3/4): 327–334.
- [56] Kubo T, Hondoh H, Nakada T. Impurity effects on orientation of lysozyme crystals nucleated on fatty acid thin films. *J Cryst Growth*, 2008, 310(7/9): 1744–1748.
- [57] Sugahara M, Asada Y, Morikawa Y, et al. Nucleant-mediated protein crystallization with the application of microporous synthetic zeolites. *Acta Cryst D Biol Crystallogr*, 2008, 64(Pt 6): 686–695.
- [58] Tosi G, Fermani S, Falini G, et al. Crystallization of proteins on functionalized surfaces. *Acta Cryst D Biol Crystallogr*, 2008, 64(Pt 10): 1054–1061.
- [59] Guo YZ, Yin DC, Lu QQ, et al. Enhancement of nucleation during hanging drop protein crystallization using HF Treatment of cover glasses. *Cryst Res Technol*, 2010, 45(2): 158–166.
- [60] Chayen NE. Turning protein crystallisation from an art into a science. *Curr Opin Struc Biol*, 2004, 14(5): 577–583.
- [61] Saridakis E, Chayen NE. Towards a 'universal' nucleant for protein crystallization. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(2): 99–106.