

中子散射技术在生物大分子领域的应用

伍国琳 马建标*

(南开大学高分子化学研究所 吸附分离功能高分子材料国家重点实验室 天津 300071)

摘 要 随着中子源和散射装置的改进, 中子散射技术在生物大分子领域的应用也日益广泛, 且许多方面是其它 (X 射线等) 散射技术无法比拟的。本文综述了中子散射在生物大分子的结构和动态性能等方面的研究进展和方法, 同时也讨论了中子散射技术在应用过程中的一些优缺点。

关键词 中子散射 生物大分子

Neutron Scattering's Application in Biopolymers' Study

WU Guolin, MA Jianbiao*

(The State Key Laboratory of Functional Polymer Material for Adsorption and Separation,

Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Neutron scattering has been used more and more widely, as neutron sources and scattering techniques have been developed. For the basic properties of the neutron the usefulness of neutrons scattering is better than other scattering techniques (X-Ray scattering, Raman scattering etc.) at a lot of areas especially in biopolymer studies. Because firstly, H has a very big neutron scattering cross-section as neutron scattering can tell us the site of H and H-bond distinctly and it is very important in the researches of the biopolymer structures. Secondly, neutron can distribute H and D for they have different neutron scattering cross-sections, so we can use isotopic substitution at studies, it is very useful for the researches of compound biopolymers and a lot of biopolymers are compounds. At the same time biopolymers' dynamic behaviors can be obtained by neutron scattering too. In this paper the applications of neutron scattering in biopolymers including structure and dynamics of biomacromolecules are reviewed.

Key words Neutron scattering, Biopolymer

70 年代以来, 中子散射技术以其特有的性质, 成为了继 X 射线和电子衍射之后的又一研究物质微观结构的有效方法。近年来, 中子散射技术在蛋白质等生物大分子结构研究领域得到了广泛的应用。在这个领域里, 使用得较广泛的是中子衍射和小角中子散射两项技术。前者相当于一个高倍数 (10^9)、小视野的显微镜, 可用于研究溶剂水的结构、位置及氢键在蛋白质分子中的精确位置。后者则相当于倍数稍低、视野较大、适用于尺度在几纳米到几十纳米, 分子量在 $10^4 \sim 10^6$ 间的中、大分子集团的观察, 例如, 大分子周围的脂质、胶束结构、类脂膜结构或微囊的结构。中子散射不仅可以定位生物大分子中的氢核, 提供静态结构信息, 而且可以提供氢核、水分子及大分子的分子运动动力学信息。

中子散射用于生物大分子高级结构研究包括以下几个方面^[1]:

伍国琳 女, 24 岁, 博士生, 现从事生物医用高分子材料方面的研究。*联系人
2000-11-15 收稿, 2001-06-15 修回

(1) 生物大分子及其晶体主要是 C、H、O 的化合物, 测定氢原子和氢键的位置是十分重要的。由于氢元素具有较大的中子散射截面, 所以在高分辨率时利用中子衍射可以定位生物大分子中的氢原子和氢键的位置。

(2) 利用小角中子散射(SANS)来研究生物大分子的形状和结构。

(3) 中子散射同时也可用于生物大分子的动力学研究, 获得原子和分子的动态信息。

(4) 中子散射可以区分氢中的氘。利用中子对氢和氘的灵敏度, 低分辨率时在生物研究中使用“同位素标记”方法, 利用 SANS 来测定复合生物大分子的结构及分子组成。

1 定位生物大分子中的氢原子和水分子的位置与状态

近年来, 人们对于蛋白质序列方面的研究已经有了长足的进展, 然而对于各种蛋白质高级结构及其周围水分子的动态性能的了解进展缓慢。许多大的蛋白质分子的结构至今仍是未知的。蛋白质分子中有将近一半的元素是氢原子, 定位蛋白质分子中的氢原子对于研究蛋白质分子的结构起着非常重要的作用, 而确定氢原子位置的最有效方法就是中子衍射。同时有研究表明, 水合水分子对于球形蛋白等生物大分子结构的稳定起着非常重要的作用^[2]。在高分辨率时, 用中子衍射不仅可以定位蛋白质分子中的氢, 同时也可以定位生物大分子中水合水分子的位置。图 1 显示的就是由中子衍射获得的单晶鸡蛋蛋白溶菌酶分子的三维结构。在图中定位了溶菌酶分子和键连的水分子中总共 960 个氢原子。它是由 157 个键连的水分子, 696 个质子和 264 个氘原子组成的^[3]。

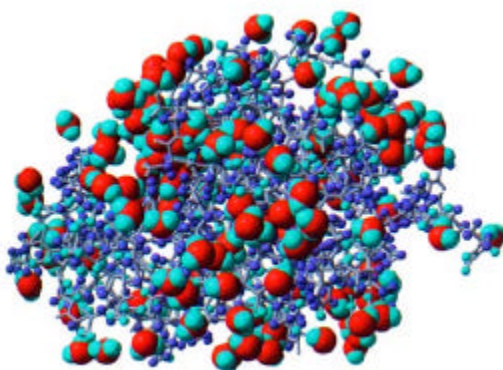


图 1 溶菌酶分子及其键连水分子中 H 和 D 的三维排列结构

又如, 图 2 显示了 Trp 62 的吲哚环上的水分子。从图中可以判断水分子可能与吲哚环上的 π 电子相互作用形成了一种新型的氢键。图 3 中显示的是 Tyr 53 上键连的水分子。从图中可见 Tyr 53 上 OH 基中的氢原子并未与水分子形成氢键, 而是水分子中的一个氢原子与酪氨酸残基中的氧原子(YO)、另一个氢原子与谷氨酸残基主链上的氧原子(QO)形成了氢键。研究表明, 水分子的这两个氢原子分别处于与 YO 和 QO 距离相等的位置上, 而且两个氧原子(YO 和 QO)与水分子中的两个氢原子均形成氢键。从图中还可发现, 在图 2 和图 3 的样品中游离水和键合水是同时存在的^[1]。早在 Franklin 和 Gosling 进行的第一次 DNA 纤维衍射实验时就发现湿度的控制对于 A-DNA 和 B-DNA 间的转变有着重要的影响, DNA 双螺旋结构周围键连的水分子对于确定 DNA 的最终结构有着重要的作用^[4]。可见水合情况对于 DNA 等大分子结构稳定性是非

常重要的。利用中子散射的方法可以准确地指出生物大分子中水所处的位置。例如, Pope 等利用中子散射的方法定位了氘代 A-DNA 分子周围的四个水分子的位置, 从它们与 DNA 双螺旋链的距离可以判断出这些水分子是否可以与 DNA 分子间形成直接键连的氢键以及氢键的强弱^[5]。



图 2 Trp 62 中吲哚环上的水分子



图 3 Tyr 53 上键连的水分子

此外在生物功能高分子方面, Langan 等近期利用中子衍射可以定位氢原子位置这一特点重新研究了纤维素的结构, 发现其氢键网络与以前利用 X 射线衍射得到的人们长期以来所公认的结果有很大出入, 于是他们利用中子散射重新修正了纤维素的结构及其分子内氢键系统, 使人们对其结构有了一个更完整正确的认识^[6]。

2 生物大分子的结构研究

生物高分子结构研究是生命科学的一个重要的研究领域。在 20 世纪后半叶, X 射线单晶结构分析被用于生物大分子(例如蛋白质和 DNA)的三维结构, 揭示出了生命科学中许多未知的奥秘, 但对于一些生物大分子的结构仍然存在着许多疑问。人类进入 21 世纪, 对生物大分子结构的研究日益引起人们的重视, 已经成为世界瞩目的一个科学研究领域。而中子散射技术的引入将使这一研究领域产生前所未有的突破性进展。

2.1 利用小角中子散射研究生物大分子的形状和结构

如前所述, 小角中子散射适用于尺度在几到几十 nm 的生物大分子结构的研究。同时由于中子是中性质子, 所以不受磁场和电场的影响, 具有很好的穿透性, 可以很容易地穿过生物大分子, 利用三维小角中子散射(3D-SANS)研究生物大分子纳米级的立体结构。例如近期, 人们就利用小角中子散射解释了免疫球蛋白 A(IgA)的结构。免疫球蛋白 IgA 对人体自身免疫力起着重要的作用, 它不仅存在于血液中, 同时也是胃、肠道粘膜表面抗体的重要组成, 但是长期以来人们对于它的三维结构一直不是很清楚。近期, Perkins 等在 ISIS 利用 SANS 研究得到了 IgA 的立体结构(如图 4)。IgA 的这种两端展开的 T 形结构使其较其它抗体更易接近较远处游离的外来粒子上的抗原。从而正确解释了其具有较高免疫功能的原因^[7]。

此外, 近 10 年来, 由于天然生物大分子应用的广泛, 人们对其结构的研究也越来越重视。目前研究大分子结构的方法并不少(电镜—纳米技术, X 射线衍射, 核磁共振等), 其中确定 1~100nm 度范围内大分子结构的最有效、简便的方法是 SANS。Evmenenko 等便利用 SANS 确定了壳聚糖等多种天然多糖类大分子的立体结构, 这对于此类生物大分子材料的应用具有重要

的指导意义^[8]。

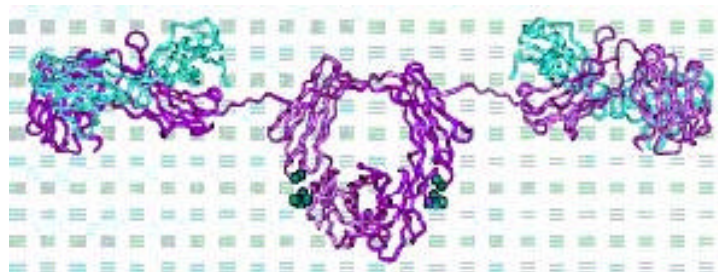


图 4 免疫球蛋白 A 的缎带结构

2.2 生物大分子复合物结构的研究

生物大分子在生物体内很少是单独存在的，多是以多组分复合物的复杂形式存在，例如蛋白质与脂的复合物、DNA 键连蛋白质是一种 DNA 和蛋白质的复合物、核糖体是各种形式的蛋白质与 RNA 的复合物。在 SANS 实验中利用 H 和 D 之间散射截面 s 的巨大差别($s_H=80 \times 10^{-24} \text{cm}^2$, $s_D=80 \times 10^{-24} \text{cm}^2$)，可以获得生物大分子复合物的结构。

2.2.1 对比变异法 (Contrast Variation method)^[9,10] 图 5 是一个“反差图”，横坐标是普通水-重水 ($\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$) 混合物中重水的百分比，纵坐标是热中子“散射密度”，对于体积为 V 的物质的散射密度等于该体积内所有原子的散射长度之和除以 V ，相当于用热中子观察该物质时物质的“密度”。图中列出了混合水 (斜度最大的线) 和酯类、蛋白质、DNA、RNA 以及某些氘化 (用氘代氢) 物的“密度”曲线，水-重水混合物在约 9(wt)% 重水时“密度”为零，即中子看来它是真空。更为重要的是，混合水的散射密度在许多点上与蛋白质、DNA、RNA 等物质相等。也就是说，在这些特殊的水-重水混合物比值上，它的“密度”与蛋白质、DNA 等一致，而使得这些物质在这一特殊点上对中子而言和“水”背景完全一样而“消失”。这样便可以把其他成分突出出来加以测定。

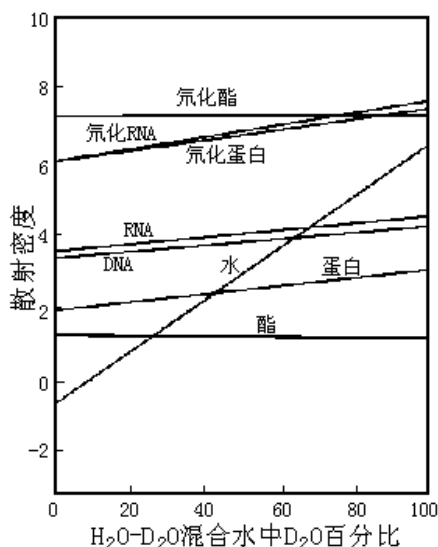


图 5 $\text{H}_2\text{O}-\text{D}_2\text{O}$ 混合水和一般生物分子的热中子散射密度

例如病毒结构常常是 RNA 外层包着蛋白质。因而,用中子研究它的结构时,可以把它“养”在混合水中,先调整水中重水的比例使蛋白质“消失”,专门观察 RNA 的结构,再改变水的成分使 RNA “消失”,专门观察蛋白质外壳的结构。此外,对于一些双组分复合生物高分子材料也可用此方法研究其结构。

2.2.2 三重同位素替代法(triple isotopic substitution) [11,12] 对比变异法只能使一种组分“消失”,对于多组分复合物,如果要研究其中一种组分的结构,就必须把其它所有组分的散射“扣除”。这时上述方法就无能为力了。于是人们又设计了三重同位素替代(TIS)方法来研究多组分复合物。

此方法的基本原理是研究溶液(I)和(II)的散射曲线之差,即差谱。其中溶液(I)包括 1, 2 两种不同氘代形式的粒子,溶液(II)中包括一种氘代形式介于 1, 2 之间的第三种形式的粒子 3, 其散射长度 $b_3=(1-d)b_1+db_2$, 式中 b_1, b_2 为溶液(I)中 1, 2 两种粒子的散射长度, d 为粒子 2 在 1, 2 混合物中的百分含量。在两种溶液中溶剂对谱线的影响是相等的, 所得的差谱与溶剂中水-重水比例无关。计算结果发现所得差谱相当于一种散射密度等于 1, 2 两种粒子散射密度之差, 即 $b_F=b_1-b_2$, 的粒子在“真空”中的散射曲线。这样, 在(I)、(II)两种溶液所有粒子中氘代程度一致的组分在差谱中其散射信号均被“扣除”了, 仅余下在(I)、(II)两种溶液中氘代程度不一致的那一种组分的散射信号。利用这种方法就可以研究多组分复合物中任一组分的结构了。

利用这种方法人们研究了大肠杆菌中 30s 核糖体中全部蛋白质和 16SrRNA 的旋转半径, 所得的数据与早先的研究结果完全吻合, 充分证明了这一方法的可靠性。同时也证明了 TIS 可分析大分子复合物中小到 2(wt)%~3(wt)%的组分, 且不受溶剂中重水含量的影响^[13]。此种方法为一些复杂复合生物高分子材料结构的研究提供了一个有效的途径, 解决了长期以来在材料结构方面困扰人们的许多问题。

3 生物大分子的动力学研究

生物学家的研究表明, 生物大分子的动态力学特性与其一系列生理功能有着密切的联系。这些动态特性是指介质内部粒子的各种运动, 包括固体和液体的各种元激发, 如晶格点阵的振动(即声子谱), 磁矩的扰动, 液体分子的扩散, 不同分子或分子团之间的振动、旋转、离子迁移等。而这些都可以归结为能量问题, 它们大都在 1~100meV 之间, 而中子的能量恰恰与研究对象具有相同的数量级, 因而利用中子与物质的相互作用所引起的能量和动量的变化, 就可以测定出研究对象内部的能量状态。这就是利用热中子非弹性散射(INS)进行动态研究的基本原理^[14]。由于 ^1H 核的不相干中子散射截面相当大, 而且氢核在蛋白质中大量存在且分布均匀, 所以此方法是通过氢原子作为探针来研究蛋白质的动力学信息的。

目前, 人们对于蛋白质分子在皮秒(ps)范围内的结构的不规则变动利用动态模拟等理论方法已经研究得非常细致了, 然而, 长期以来并没有很多相应的实验数据来验证所得到的结论。利用非弹性中子散射(INS)方法, 人们得到了几种蛋白质在皮秒范围的动力学信息, 及湿度和温度对其流动性等动力学性能的影响^[15~18]。研究发现溶液中的蛋白质和低含水量的蛋白质粉末的内部动力学情况不同。例如, 将溶菌酶粉末中 D_2O 的含量从 0.07g D_2O /g 蛋白质增加到 0.20g D_2O /g 蛋白质时中子散射峰强度有所降低, 这是由于均方位移增加所造成的。Doster 等利用 INS

对水合肌红蛋白在 4~350K, 0.1~100ps 范围内原子运动情况的研究还发现, 在 180K 以下, 肌红蛋白的动力学行为基本上只有振动这一种运动方式; 在 180K 以上则发生变化, 产生非振动的运动方式^[16]。另外, 利用准弹性非相干中子散射 (IQEN), Wanderlingh 等还研究了肌红蛋白^[19]和溶菌酶^[20]等生物大分子中水合水的动力学信息, 发现它们转换和旋转速度均比自由水低, 空间结构也有所改变。同时还利用氘代溶剂的方法研究了水合水对生物大分子动力学性能的影响。

当然, 中子散射技术也有它的不足之处。最主要的缺点是需有庞大的设备 (核反应堆或专用强中子源加速器), 且中子源的运转费昂贵, 所以只能到有限的源、有限的地方进行散射实验, 不可能像普通 X 射线分析那样广泛和普及。同时就目前而言对大分子工作往往中子源强度还嫌不足, 因而常常需要较大量的样品。现在美国、日本和欧洲正在建造第三代大功率中子源, 它将提供比现今功率高 30 倍的中子源。而对于一些发展中国家, 例如韩国、印度尼西亚、中国等也开始认识到这项技术对于物质研究的重要性。最近, 中国政府投资 50 亿 (1998 年) 在中国原子能研究院建造 CARR (Chinese Advanced Research Reactor), 希望在中国建成世界上一流的中子散射仪^[21]。台湾也将投资相当数量的资金用于 CRR II 中子源的建造。新一代中子源的建成, 将对中子散射在生物大分子研究领域的应用起到重要的作用。

参考文献

- [1] Niimurn N. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 1999, 60: 1265~1271.
- [2] Rupley J A, Careri G. Adv. Prot. Chem., 1991, 41: 37~171.
- [3] Niimura N, Minezaki Y, Nonaka T et al. Nature Structure Biology, 1997, 4 (11): 909~914.
- [4] Shotton M W, Pope L H, Forsyth V T et al. Biophys. Chem., 1997, 69(1): 85.
- [5] Pope L H, Shotton M W, Forsyth V T et al. Physica B, 1998, 241~243: 1156~1158.
- [6] Langan P, Nishiyama Y, Chanzy H. J. Am. Chem. Soc., 1999, 121: 9940~9946.
- [7] Perkins S J, Ullman C G, Brissett N C et al. Immunol Reviews, 1998, 163: 237.
- [8] Evmenenko G, Alexeev V, Reynaers H. Polymer, 2000, 41: 1947~1951.
- [9] 杨桢. 物理, 1994, 23(2): 113~116.
- [10] Zaccai G, Jacrot B. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1983, 12: 139~157.
- [11] Serdyuk I N, Zaccai G. Journal of Molecular Structure, 1996, 383: 197~200.
- [12] Parlov M Yu, Serdyuk I N. J. Appl. Cryst., 1987, 20: 105~110.
- [13] Harriaon D H, May R P, Moore P B. J. Appl. Crystallogr., 1993, 26: 198~206.
- [14] 刘圣康. 中子物理. 北京: 原子能出版社, 1986: 255~258.
- [15] Cusack S, Smith J, Finney J et al. Physica B, 1986, 136: 256~259.
- [16] Doster W, Cusack S, Petry W. Nature, 1989, 337(27): 754~756.
- [17] Smith J, Cusack S, Poole P L et al. J. Biomol. Struct. Dyn., 1987, 4: 583.
- [18] Zanotti J M, Bellissent-Funel M C, Parello J. Physica B, 1997, 234~236: 228~230.
- [19] Giordano R, Teixeira J, Wanderlingh U. Physica B, 1995, 213~214: 769~771.
- [20] Wanderlingh U, Giordano R, Kagunya W W. Physica B, 1997, 234~236: 210~212.
- [21] 李寿. 物理, 1997, 10: 600~608.