

# X-射线结构生物学简介

大型仪器中心 刘一苇

# 内容提要

- 重要工作回顾
- 目前的焦点
- 技术路线与基本原理
- 仪器中心的技术条件
- 所内的相关工作
- 致谢

# 诺贝尔奖评委都是结构人的亲家！

- 和分子空间结构相关的工作共获得诺贝尔奖**25**项，占诺贝尔奖自然科学部分的**8%**
- 其中**10**项和**X-射线结构生物学**研究直接相关
- 理论指导和实际应用极大地改变了人类的生存状态

# 回顾X-射线结构生物学荣获的10项诺贝尔奖

**1946年**，美国科学家萨姆纳(**James Batcheller Sumner**)因发现酶结晶、美国科学家诺思罗普(**John Howard Northrop**)、斯坦利(**Wendell M. Stanley**)因制出酶和病素蛋白质纯结晶而共同获得诺贝尔化学奖。

**1958年**，英国科学家桑格(**Frederick Sanger**)因确定胰岛素分子结构获诺贝尔化学奖。

**1962年**，英国科学家肯德鲁(**John C. Kendrew**)、佩鲁茨(**Max F. Perutz**)因研究蛋白质的分子结构获诺贝尔化学奖。

**1962年**，英国科学家克里克(**Francis Crick**)、威尔金斯(**Maurice Wilkins**)、美国科学家沃森(**James Watson**)因发现脱氧核糖核酸的分子结构而共同获得诺贝尔生理学或医学奖。

**1964年**，英国科学家霍奇金(**Dorothy Crowfoot Hodgkin**)因用X射线方法研究青霉素和维生素**B12**等的分子结构获诺贝尔化学奖。

# 回顾X-射线结构生物学荣获的10项诺贝尔奖

- **1972年**，美国科学家穆尔(**Stanford Moore**)、斯坦(**William Howard Stein**)，美国科学家安芬森(**Christian Boehmer Anfisen**)因研究核糖核酸酶的分子结构而共同获得诺贝尔化学奖。
- **1982年**，英国科学家克卢格(**Aaron Klug**)因以晶体电子显微镜和X射线衍射技术研究核酸蛋白复合体获诺贝尔化学奖。
- **1988年**，德国科学家戴森霍费尔(**Johann Deisenhofer**)、胡贝尔(**Robert Huber**)、米歇尔(**Hartmut Michel**)因第一次阐明由膜束的蛋白质形成的全部细节而共同获得诺贝尔化学奖。
- **2003年**，美国科学家罗德里克·麦金农由于在细胞膜离子通道的结构和机理研究方面的贡献而获得了诺贝尔化学奖；
- **2009年**，美国科学家Venkatraman Ramakrishnan、Thomas A. Steitz和以色列科学家Ada E. Yonath,因对核糖体结构和功能的研究共同获得诺贝尔化学奖。

# 回顾X-射线结构生物学荣获的10项诺贝尔奖

1946——蛋白分子结晶

1958——解析胰岛素分子结构

1962——解析肌红蛋白、血红蛋白的分子结构

1962——解析DNA结构

1964——解析青霉素和维生素B12等的分子结构

1972——解析DNA、RNA酶的分子结构

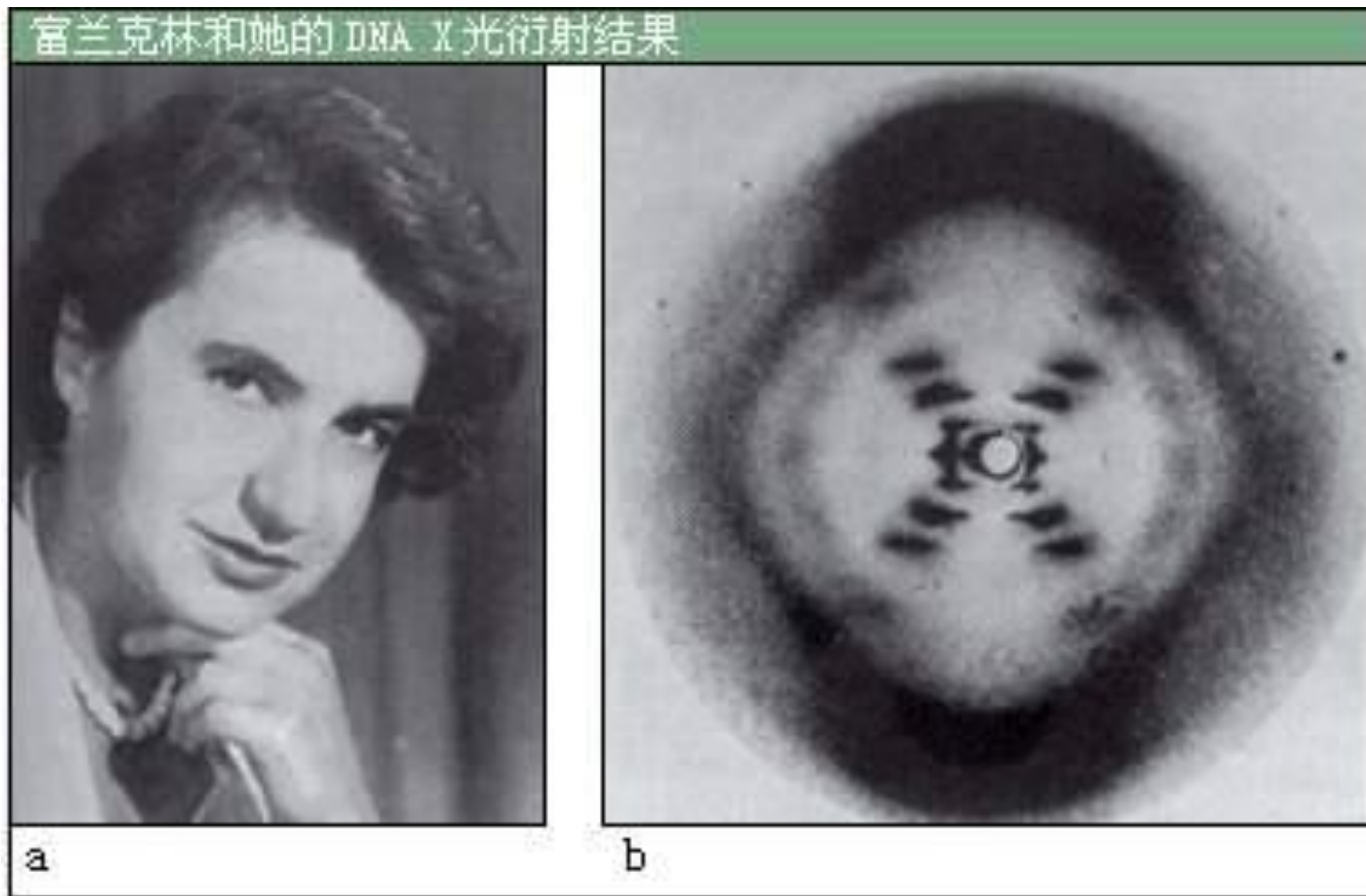
1982——解析核酸、蛋白复合体结构

1988——解析膜蛋白结构

2003——解析离子通道结构

2009——解析核糖体结构

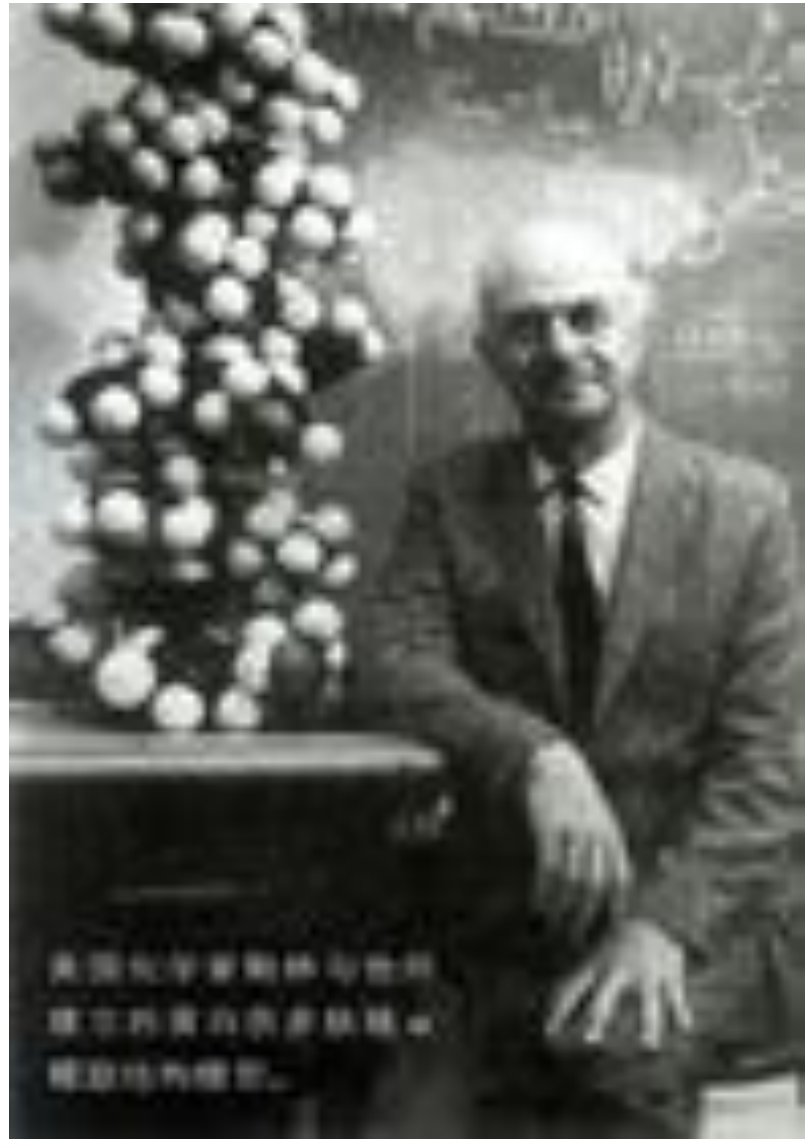
# DNA空间结构的研究孕育了现代生物学



1951的工作

# 大麻花模型错了

- 莱纳斯·卡尔·鲍林首先指出衍射图像对应螺旋结构，并搭建了相应的以DNA为基础的三螺旋模型(碱基朝外)。他的模型和衍射图不完全一致，但他认为小节无关。

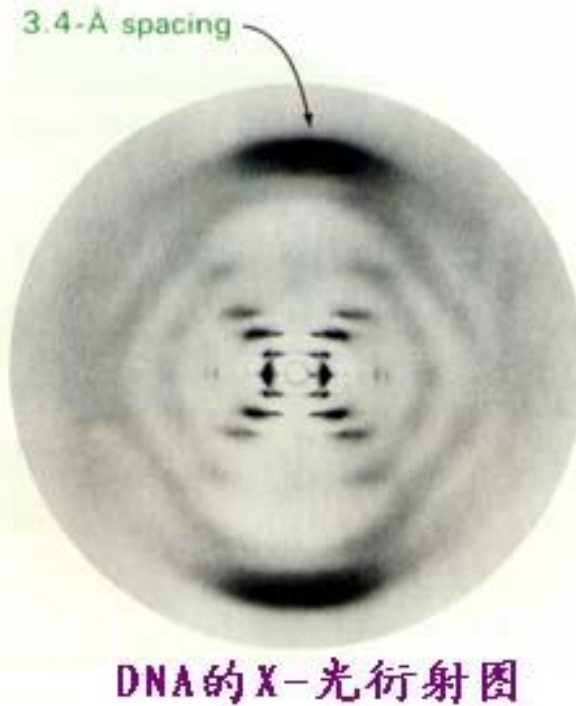




# 听老板的没错！



威尔金斯：建议和他们合作



1953



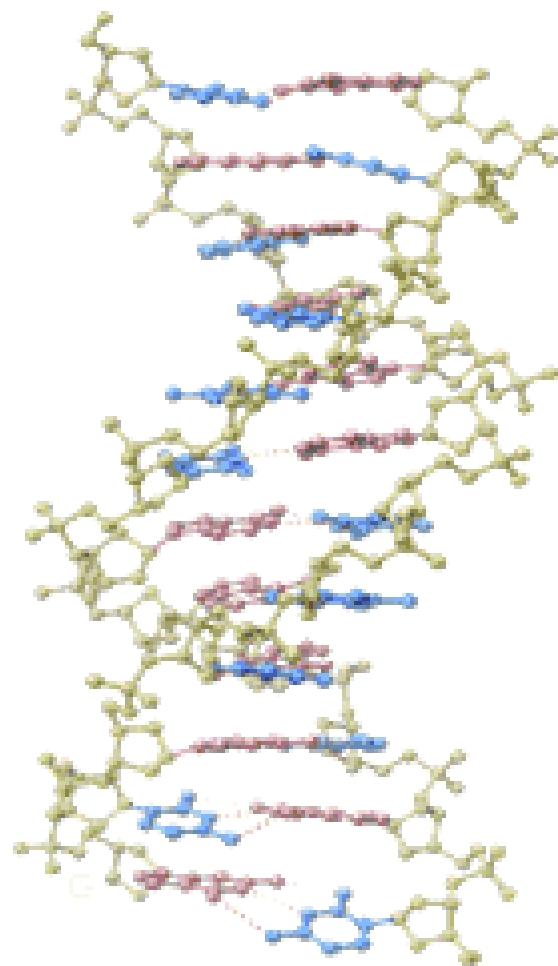
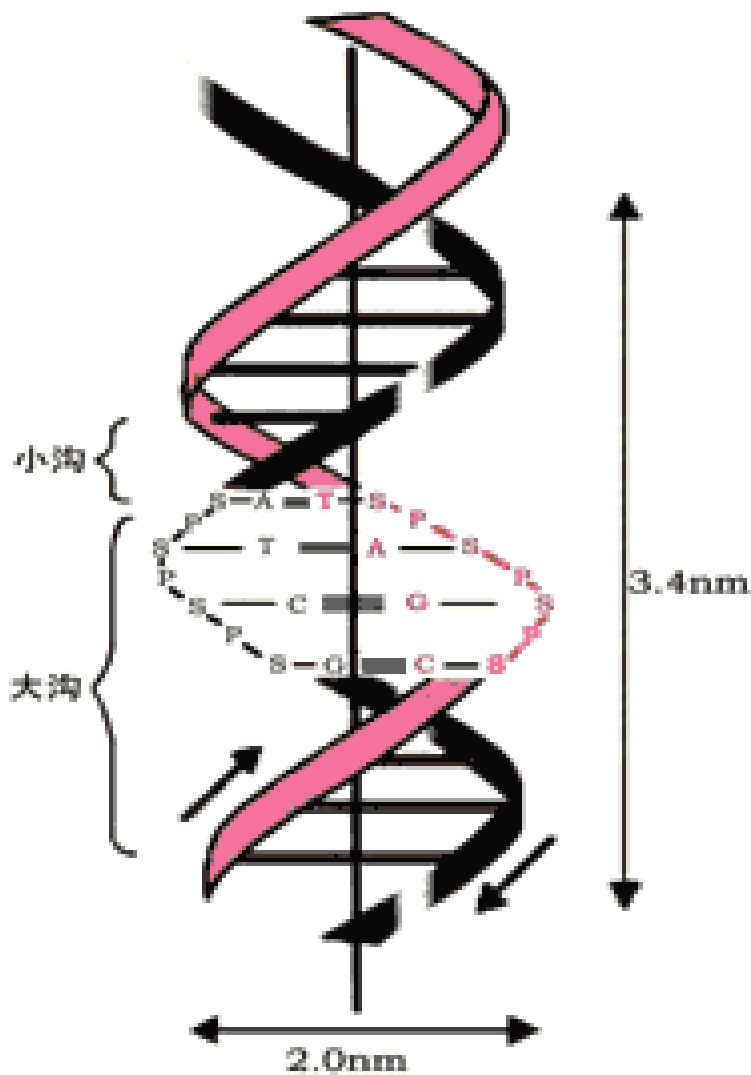
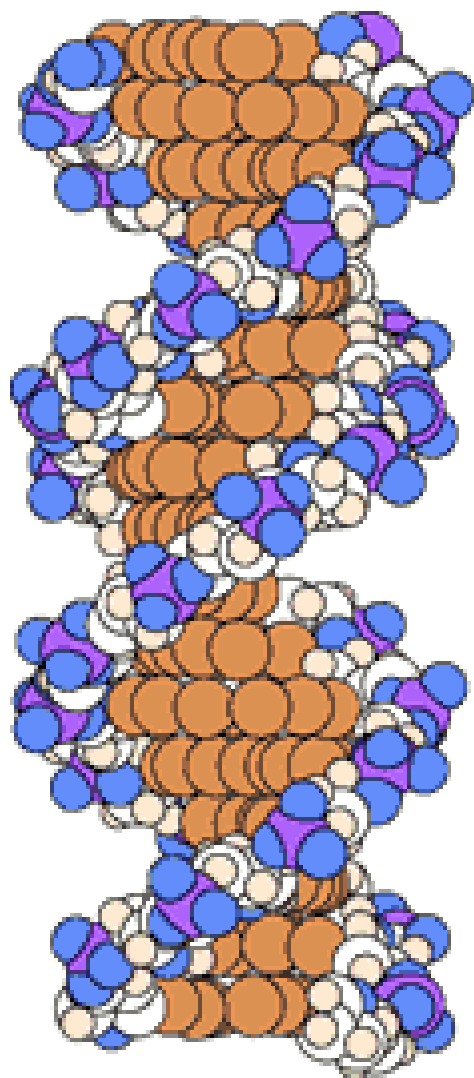
富兰克林：我自己来

# 天不生仲尼万古长如夜！

- 在其它螺旋模型久攻不下、走投无路的困境里，决定尝试双螺旋方案，结果使得两个年轻人“一夜成名”！



原来就是一段小麻花吗！

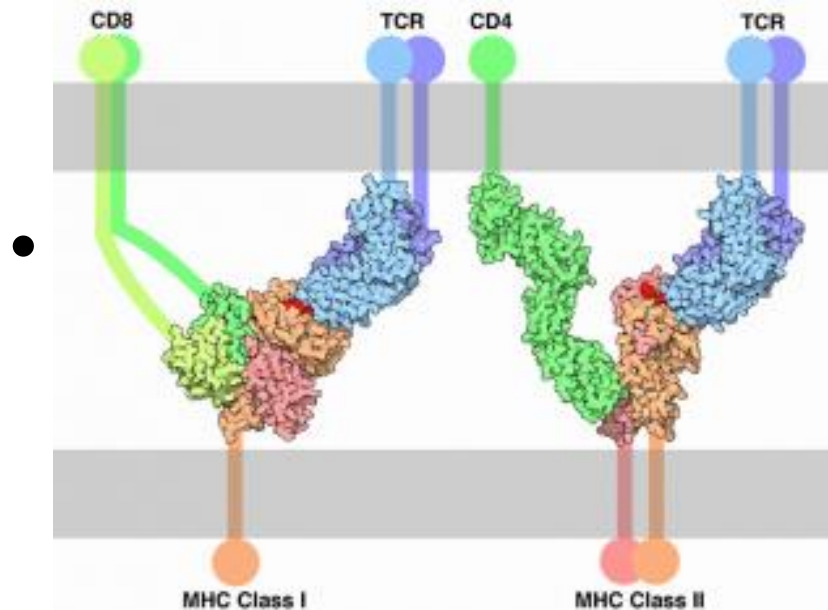
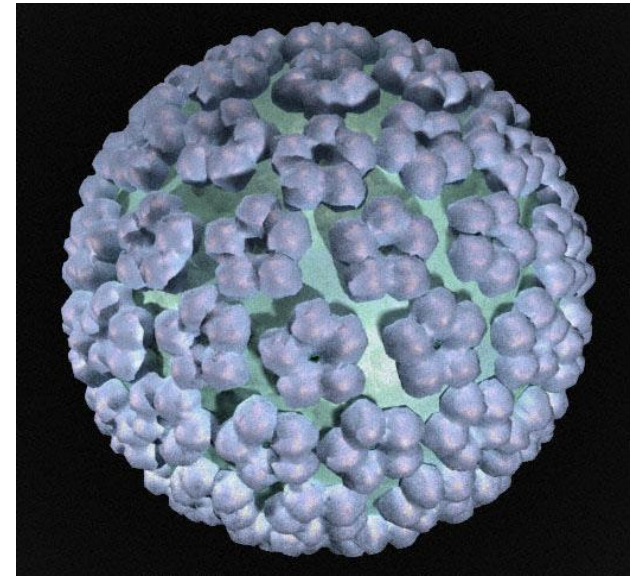


# 小麻花大功用！

- **Francis Crick** 和 **James Watson** 的论文不仅正确地搭建出**DNA**的结构，同时还正确地预见到它承载了生物信息编码储存功能，及生物信息复制与**DNA**结构特点的联系。

# 其它的重要工作

- M. M. Rossmann 和 S. Harrison 有关病毒晶体结构的工作；



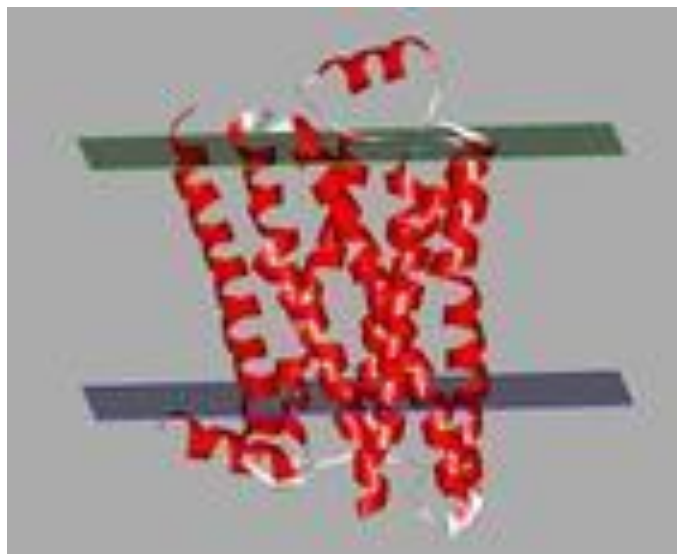
D. Wiley 结构免疫学方面的工作；

# 内容提要

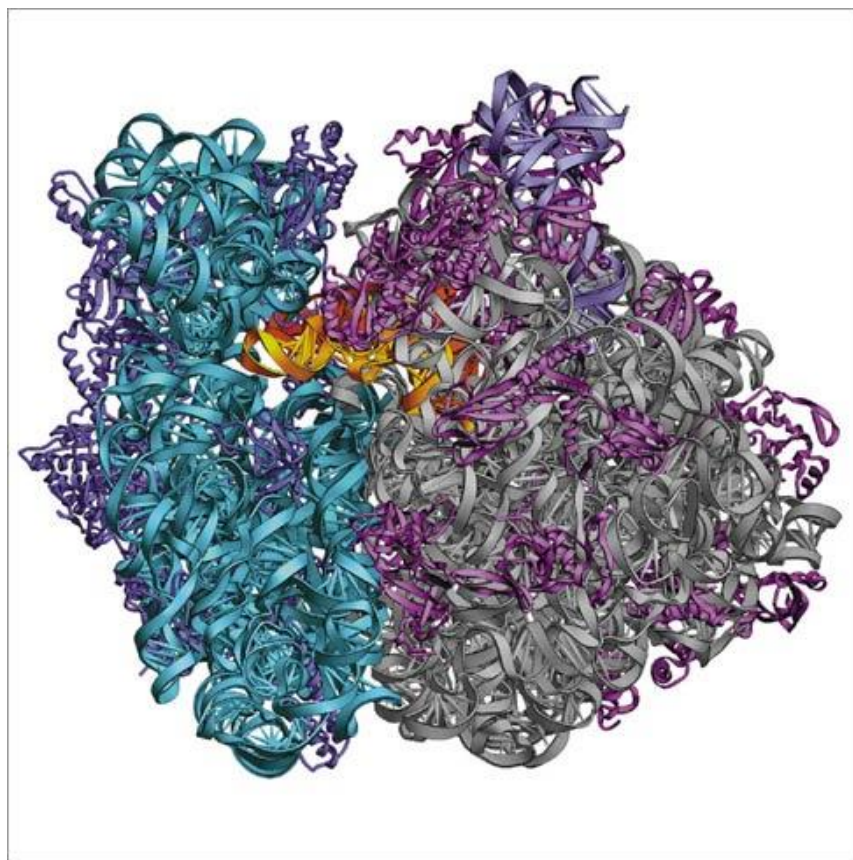
- 重要工作回顾
- **目前的焦点**
- 技术路线与基本原理
- 仪器中心的技术条件
- 所内的相关工作
- 致谢

# 好像还能出诺贝尔奖!

- 大复合体的结构
- 膜蛋白的结构
- 药物靶蛋白的结构



**GPCR结构** (86%的药物靶点)



**核糖体结构**

# 结构解析果真了不起！

- 结构与功能及执行功能的微观机制密切相关

生物大分子通常是链状的，这些链状分子往往在空间折叠成一定的结构才会具备生物学功能。生物系统的功能及执行其功能的微观机制与它各组分的分子结构密切相关。



# 结构解析果真了不起！

- 正确理解庞杂数据的基础

准确地把握生物大分子及其复合物的结构是了解生命过程微观能流,物流,信息流时空秩序的基础，也是综合全面正确理解已知庞杂数据的关键。现代生物学正是以**DNA**双螺旋结构的发现作为其诞生的标志。


# 结构解析果真了不起！

- 为进一步的工作指明方向

生物分子的结构容纳了生物系统大量的相关信息。对其进行仔细的研判经常是展开进一步深入工作的起点。

- 结构生物学定义

通过对生物大分子或其复合物,在原子或亚原子分辨水平上,进行结构测定并利用结构数据研究其功能及相关生物问题的学科.



[美] P. E. 波恩 H. 魏西希 编  
刘振明 刘海燕 等译

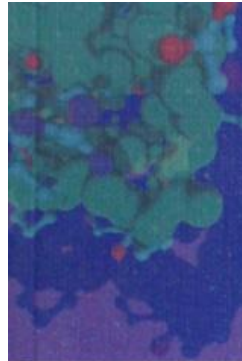
# Structural Bioinformatics

# 结构生物信息学



 化学工业出版社  
生物·医药出版分社

B



[美] P. E. 波恩 H. 魏西希 编  
刘振明 刘海燕 等译

# Structural Bioinformatics

# 结构生物信息学



 化学工业出版社  
生物·医药出版分社

B

# 内容提要

- 重要工作回顾
- 目前的焦点
- **技术路线与基本原理**
- 仪器中心的技术条件
- 所内的相关工作
- 致谢

# 为什么要用X-射线？

- X光的波长可能给出原子分辨的信息。
- 对X光所有材料的折射率都是1，无法制造X光透镜直接成像。
- 利用散射光信息，还原电子云密度，进而破解结构。
- 直接测量分子的散射数据信噪比低，目前还得不到原子分辨的结构。

# 为什么要用晶体？

- 晶体是微观分子空间周期排列形成的宏观物体。
- 晶体样品的电子云是三维空间里的周期函数，可以看做是许多空间特定方向（宏观的）平面波的叠加。
- 如果能够测出这些平面波的振幅及其相互间的位置关系，叠加后就可以得到晶体的电子云，也就得到组成分子的电子云。
- 这些平面波的振幅可以用X光进行测量（信噪比远大于1），其相互间的位置关系也有多种办法得出。
- 利用晶体把对微观分子的测量转换成对宏观平面波的测量，极大地提高了数据的信噪比（ $\sim 10^{15}$  倍）。

# 四个方面的工作

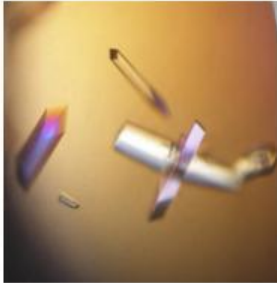
- 生物大分子样品的获取
- 高衍射分辨晶体的培养
- 晶体X-射线衍射数据的采集
- 结构解析与功能分析（解释已知数据，提出新的猜测）

# 生物大分子样品的获取

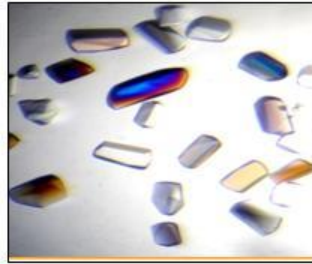
- 结晶对样品的两个基本要求：毫克数量级以上的样品量；化学与物理的均一性。
- 分子来源：天然产物中提取；分子生物学手段制备（大肠杆菌、酵母、昆虫细胞）
- 分离纯化：梯度离心，梯度沉淀，加标签，各种液相色谱，其它方法。
- 鉴定：**SDS**，**Native**电泳，色谱结果，光散射法，分析型超速离心机。



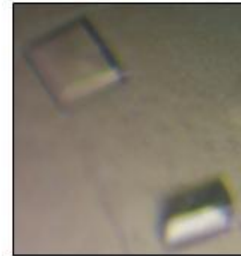
# 高衍射分辨单晶的培养



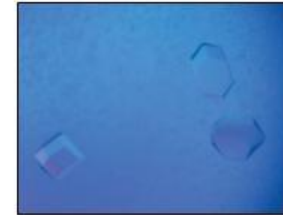
PRRSV-3CL protease,



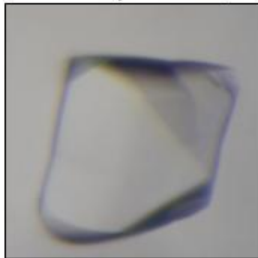
Glycerol kinase.



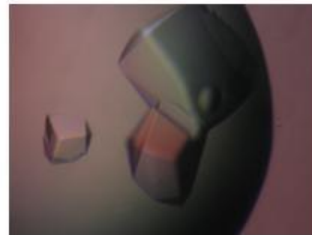
Grass fish  $\beta$  2M.



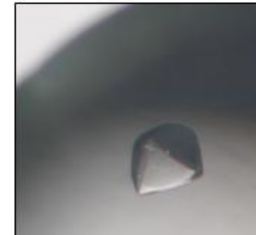
Mamu-A\*01 complex



Mannonate dehydratase.



SrtB



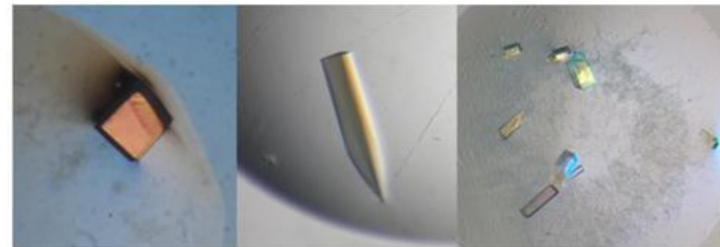
Mamu-A\*02 complex.



MHC H-2Kd wild-Malarial Parasite  
9 mer Peptide Complex



Fructose 1-phosphate  
kinase.

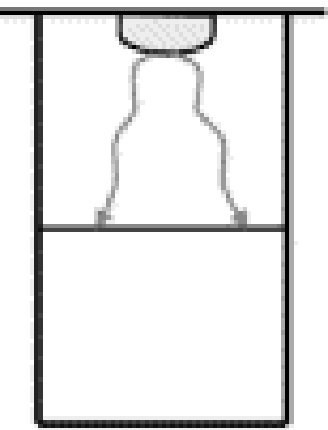


ILT1 R142C

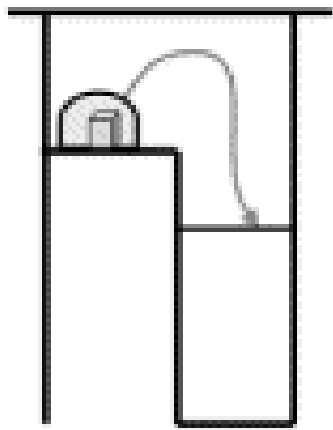
*简单，不就一个盖玻片两滴溶液吗！*

- 生长条件筛选：
- 蛋白浓度，PH值，缓冲液成份；
- 沉淀剂成份，添加剂成份，各自的液量；
- 生长温度(4度或20度)，生长方法，人手或机械手。

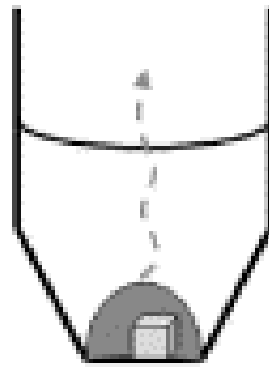
# 高衍射分辨晶体的培养



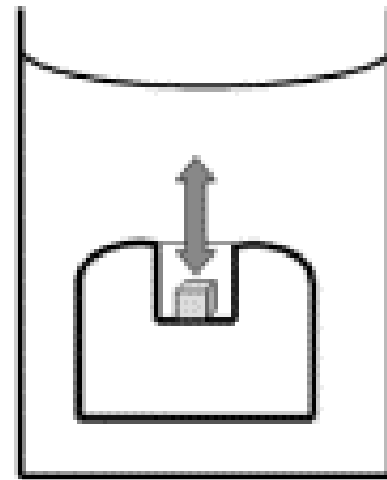
**The Classic:  
HDVD**



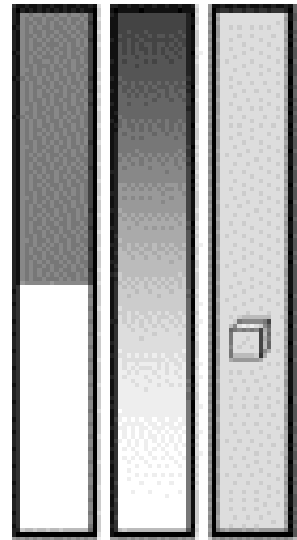
**The Variant:  
SDVD**



**Micro-  
batch  
under oil**



**Micro-  
dialysis**



**Free  
interface  
diffusion**

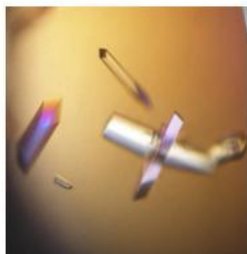
# 气相扩散法原理

- 生长池封闭后，池液表面的蒸汽压（水）是池液的饱和蒸汽压；液滴表面的蒸汽压是液滴的饱和蒸汽压。因盐浓度的关系，液滴的饱和蒸汽压大于池液的饱和蒸汽压。

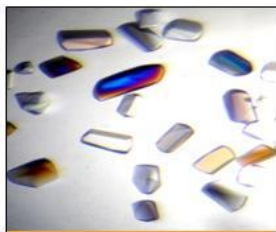
# 气相扩散法原理

- 生长池的蒸汽压大于池液的饱和蒸汽压而小于液滴的饱和蒸汽压。于是池液不断吸收水分，液滴不断蒸发而被浓缩，直至平衡。在此过程中，液滴中的蛋白浓度达到过饱和。

# 单晶X-射线衍射数据的采集



PRRSV-3CL protease,



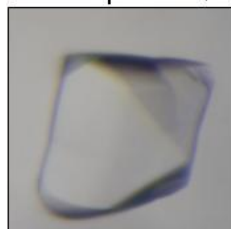
Glycerol kinase.



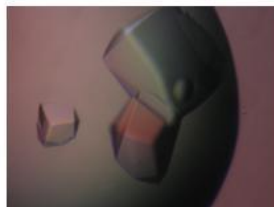
Grass fish  $\beta$  2M.



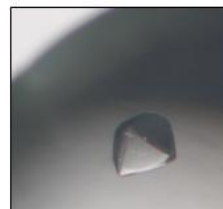
Mamu-A\*01 complex



Mannonate dehydratase.



SrtB



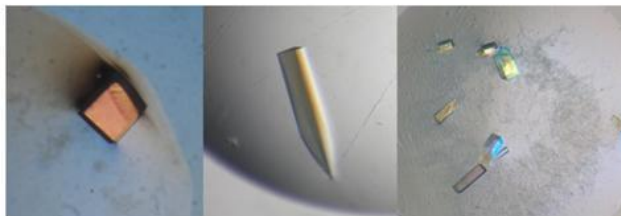
Mamu - A\*02 complex.



MHC H-2Kd wild-Malarial Parasite  
9 mer Peptide Complex



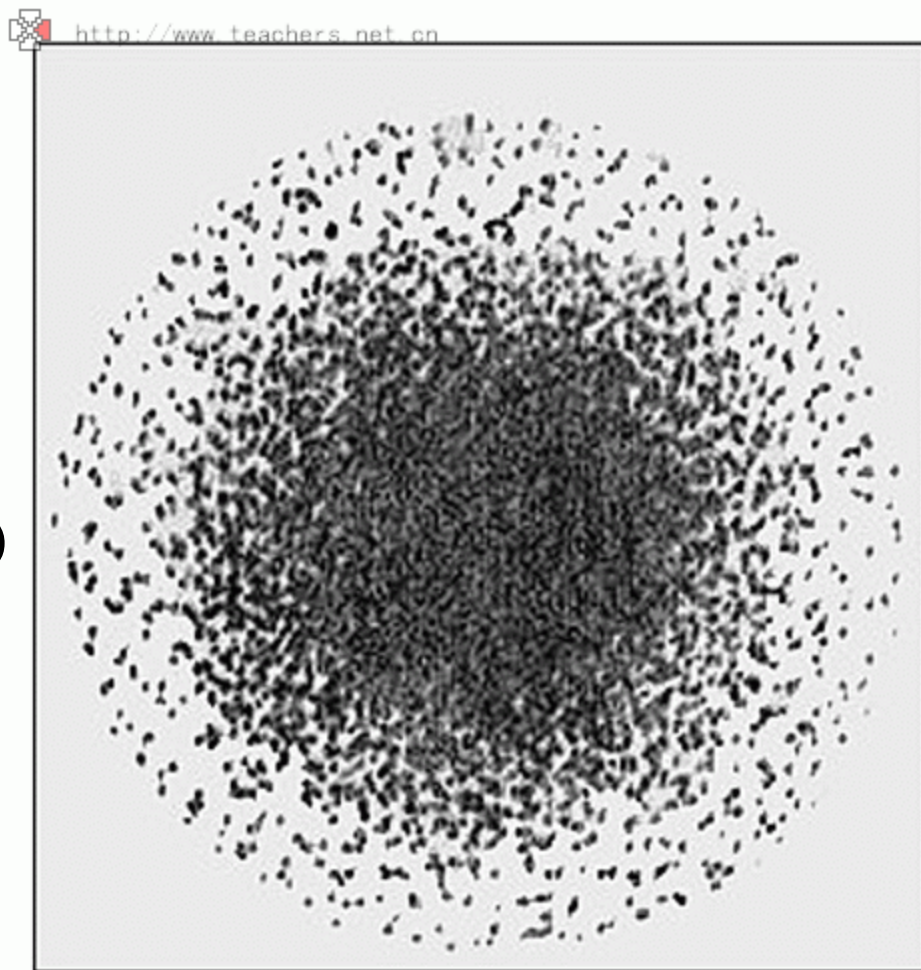
Fructose 1-phosphate  
kinase.



ILT1 R142C

# 单晶X-射线衍射数据的采集

- 原子对X光散射主要是核外电子对X光的散射。
- 晶体的散射（衍射）图谱和晶体电子云的分布相关。



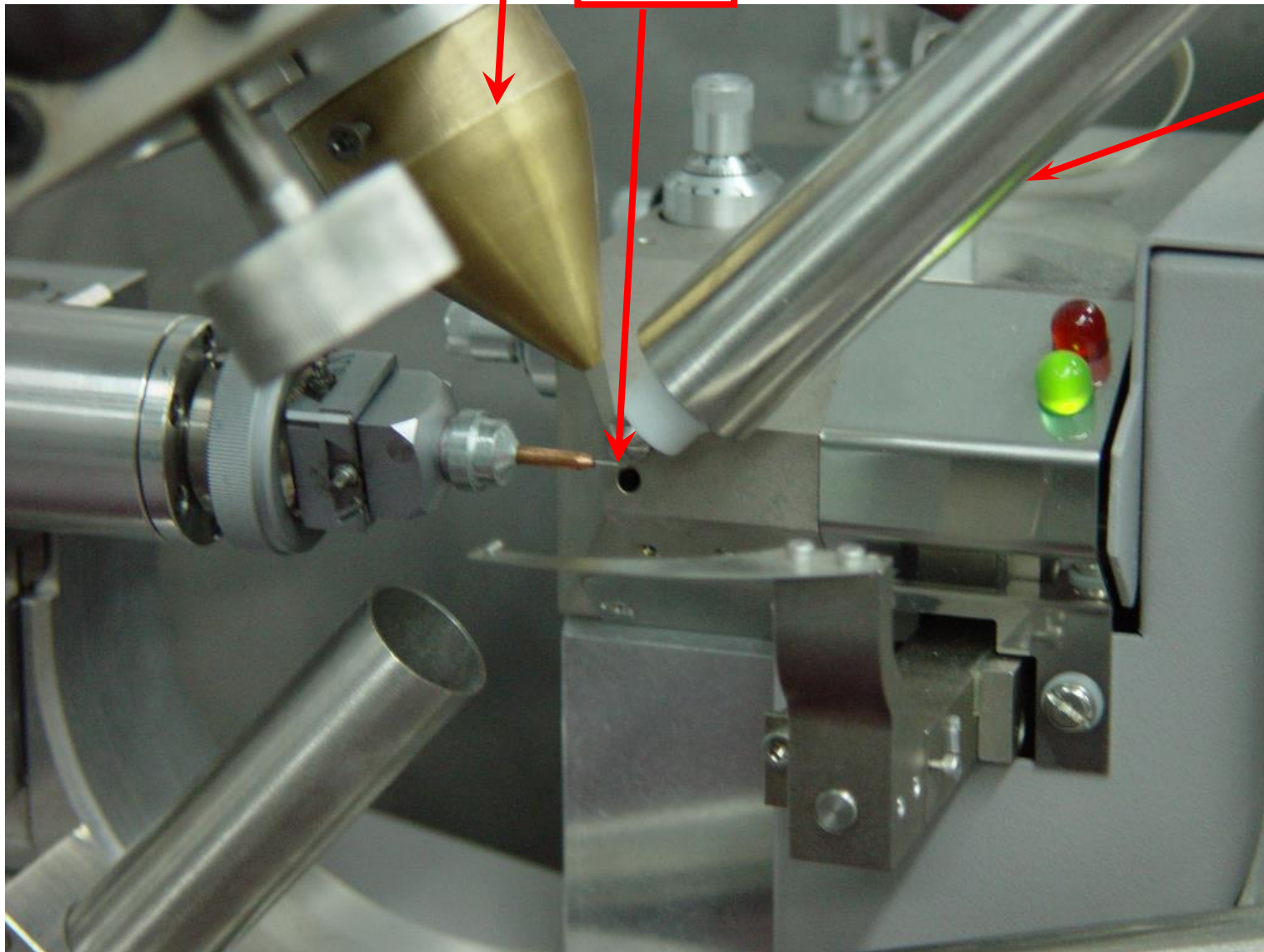
在通常状况下氢原子电子云示意图

荧光探测器

# 单晶X-射线衍射数据的采集

晶体

冷冻装置

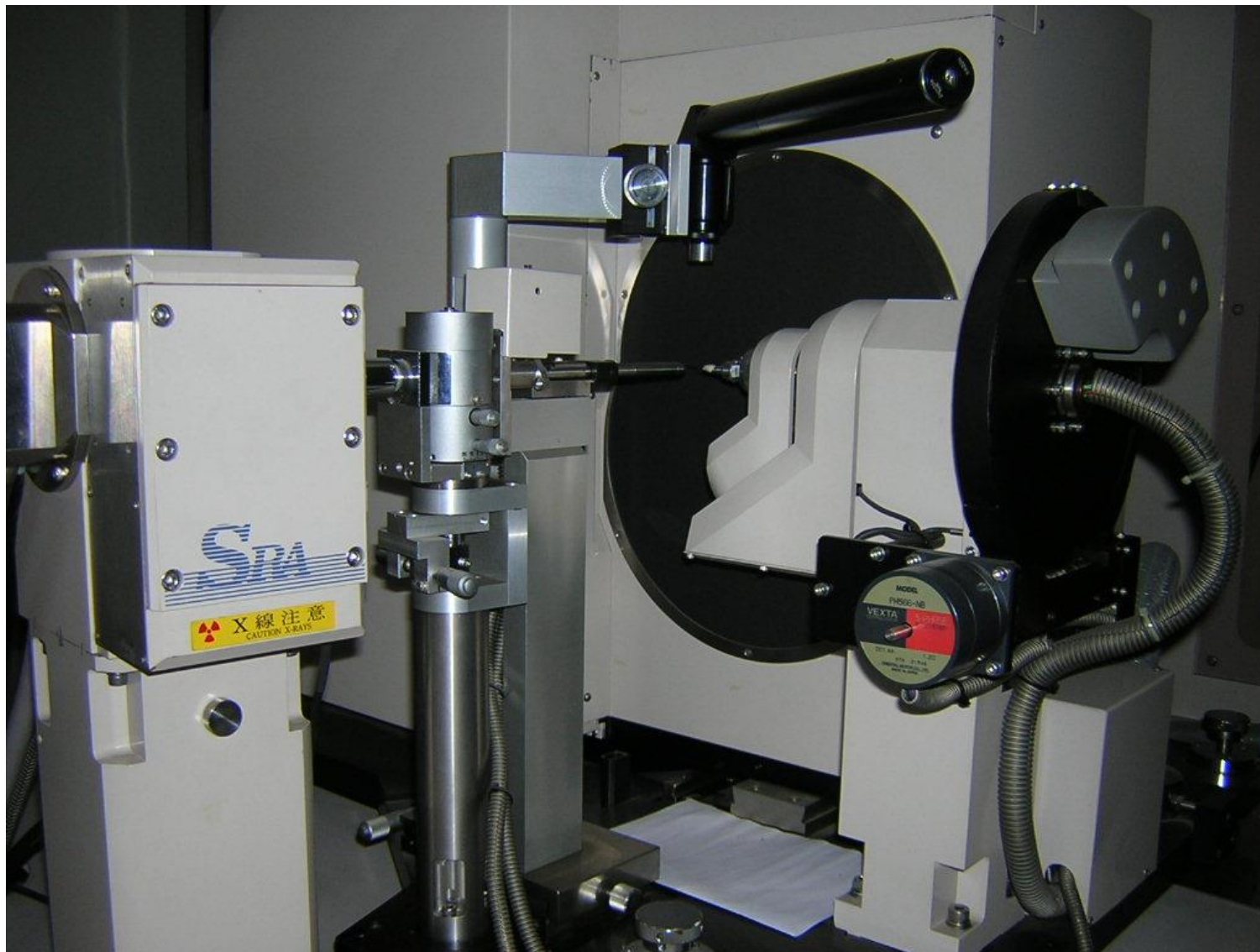




# CCD X射线衍射仪



# DIPX射线面探测仪



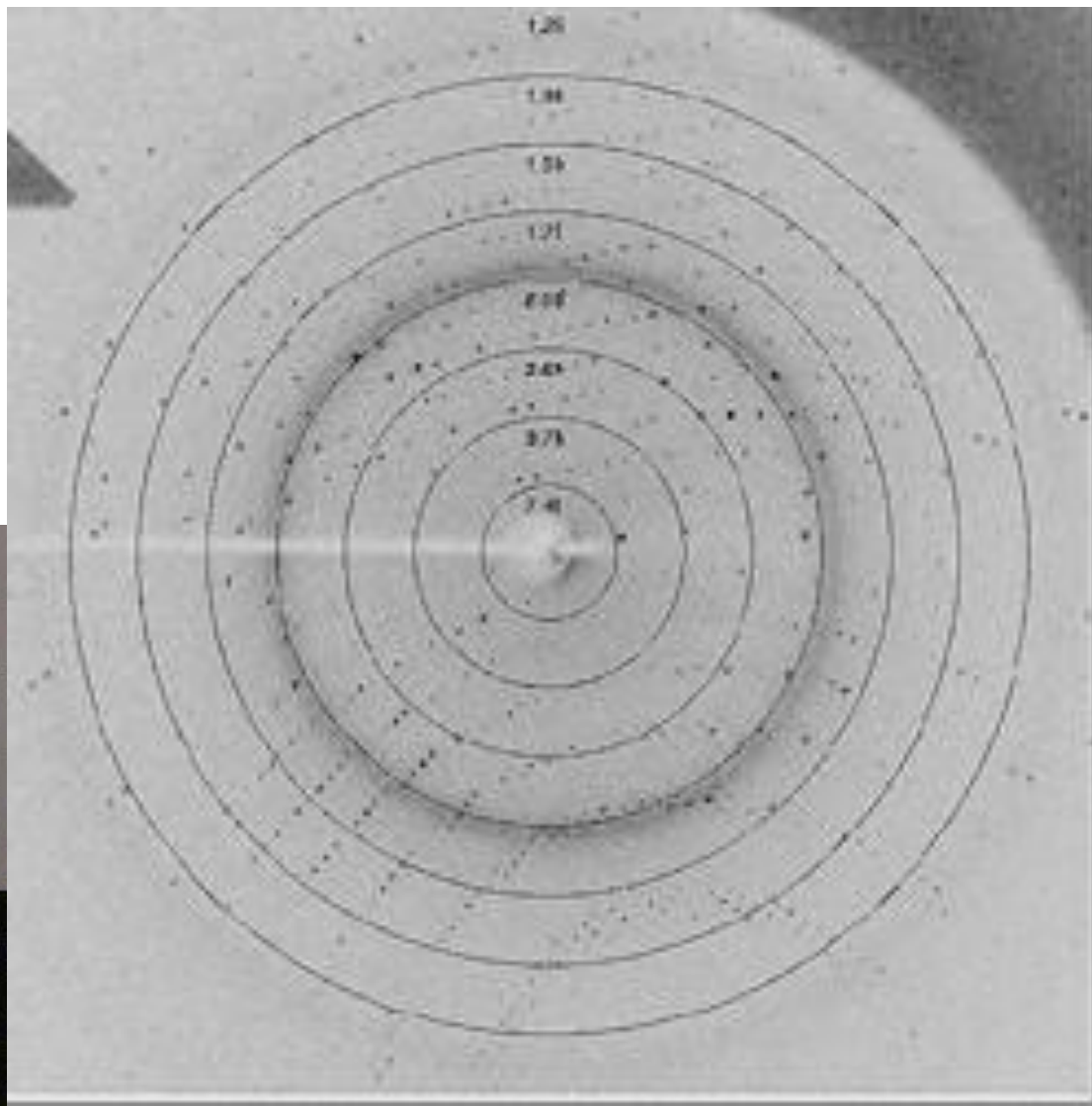
# 单晶X-射线衍射数据的采集

- 利用衍射仪收集衍射强度
- 通常收集的衍射点有数万到数十万



# 晶体X-射线衍射数据的采集

- 蛋白晶体的X-射线衍射图
- 衍射（布拉格）条件  $2d \sin \theta = \lambda$

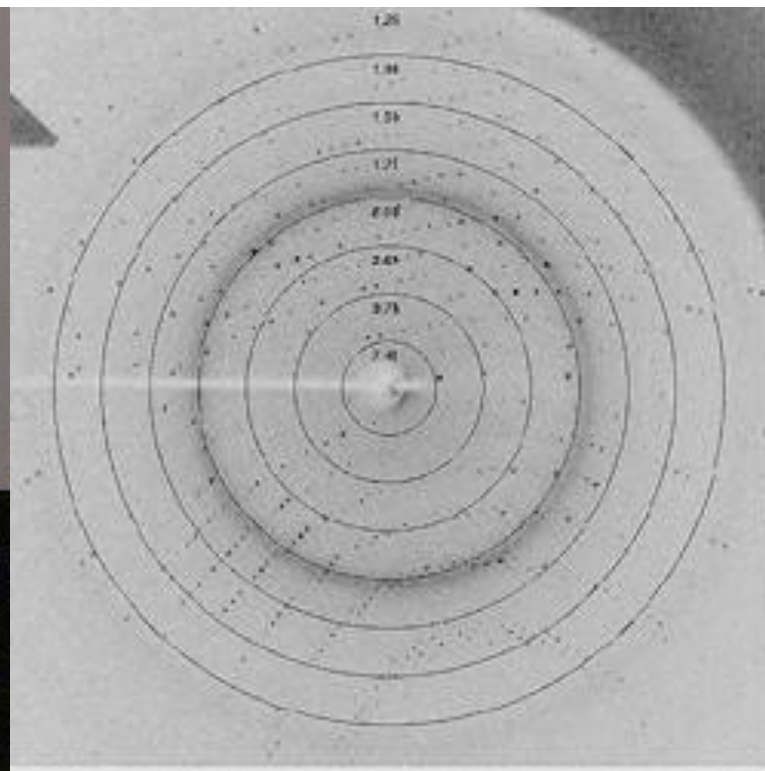


Cullinan I  
530,20 cts.



Cullinan I  
530,20 cts.

# 电子云和衍射的关系

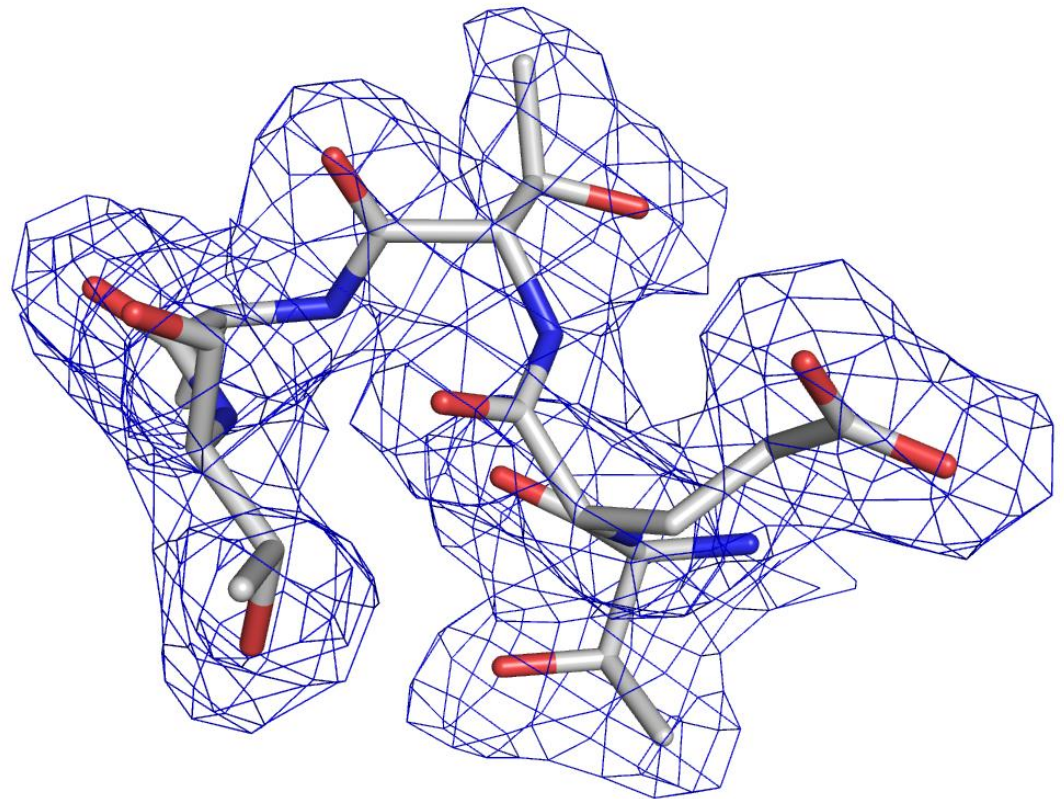


- $\rho(x,y,z) = \sum F(h,k,l) \exp[-2\pi i (hx+ky+lz) + \phi(h,k,l)]$

# 结构解析与功能分析

(解释已知数据, 提出新的猜测)

- 用分子置换法、同晶置换法、反常散射法破解各衍射点相位
- 将各衍射点的强度依其相位叠加在一起生成分子的电子密度图
- 以电子密度图为引导建立分子模型
- 功能分析与进一步的工作



# 内容提要

- 重要工作回顾
- 目前的焦点
- 技术路线与基本原理
- **仪器中心的技术条件**
- 所内的相关工作
- 致谢



# 蛋白制备、鉴定仪器



Mechanical Press



Pressure Cells



细胞破碎仪

# 蛋白制备、鉴定仪器



蛋白质纯化仪



等温滴定微量热仪(ITC)



动态光射仪器



生物大分子相互作用仪



L8-80M

超速冷冻离心机



# 单晶培养间



# 单晶X-射线衍射数据采集系统



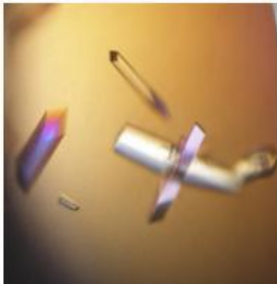
# 内容提要

- 重要工作回顾
- 目前的焦点
- 技术路线与基本原理
- 仪器中心的技术条件
- 所内的相关工作
- 致谢

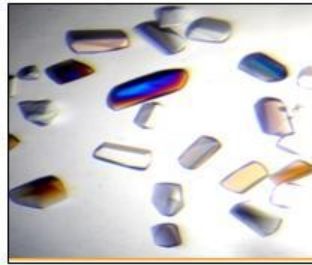
# 涉猎晶体结构的课题组

- 田波，高福，高斌，黄力，刘双江，谭华荣，向华，马延和，董志杨，温廷益，金诚，钟谨（共十余个）。

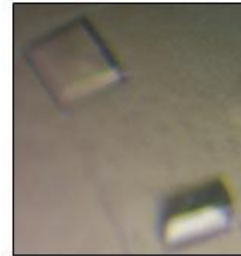
# 微生物所的培养的部分单晶



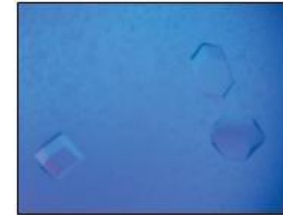
PRRSV-3CL protease,



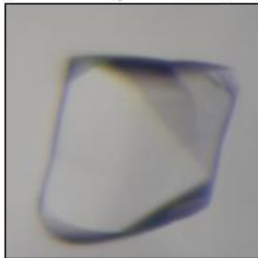
Glycerol kinase.



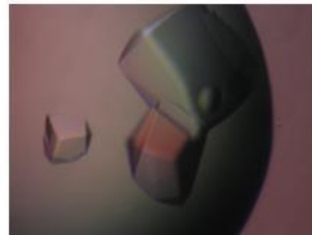
Grass fish  $\beta$  2M.



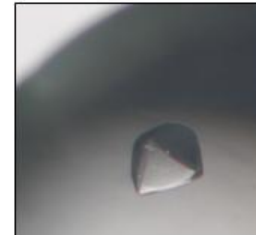
Mamu-A\*01 complex



Mannonate dehydratase.



SrtB



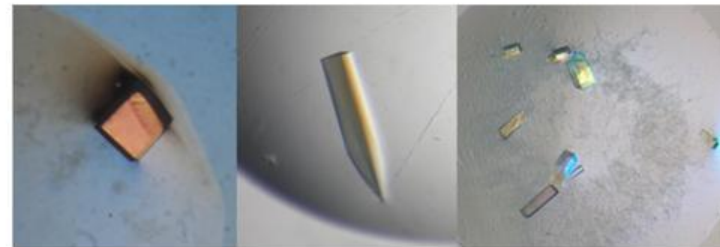
Mamu-A\*02 complex.



MHC H-2Kd wild-Malarial Parasite  
9 mer Peptide Complex

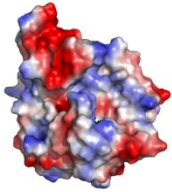


Fructose 1-phosphate  
kinase.



ILT1 R142C

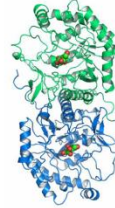
# 微生物所的解析的部分结构



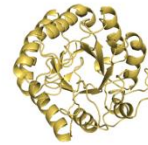
mannanase from thermoacidophile Alicyclobacillus acidocaldarius



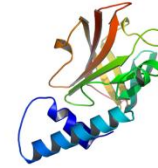
complexed 6-phospho-beta-glucosidase with substrate and NAD



mannonate dehydratase in complex with its substrate analogue



Mannanase



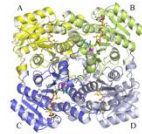
Sortase B from S.suis.



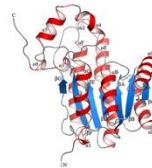
ILT1 from human body



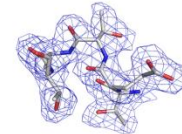
Hpr of thermoacidophile Alicyclobacillus acidocaldarius



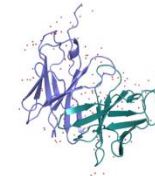
gluconate 5-dehydrogenase from S.suis



gluconate 5-dehydrogenase from S.suis



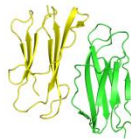
electron density map of several amino acids in the Intimin-Tir complex



Cd8 of Monkey



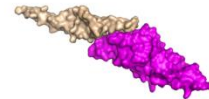
Beta2m of Fish



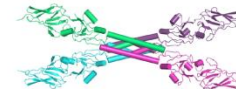
Beta2m of Chicken



3cl



Intimin-Tir complex from enterohemorrhagic E. coli (EHEC)



Intimin-Tir complex from enterohemorrhagic E. coli (EHEC)



Mannanase from Thermoacidophile Alicyclobacillus acidocaldarius



谢谢大家