用光学方法处理的蛋白质晶体 电子显微镜图像

李 钦   张 树 政   郑师海   董碧珍   潘少华
(中国科学院微生物研究所)   (中国科学院物理研究所)

在生物化学和分子生物学研究中,经常要对所获得的蛋白质晶体进行电子显微镜观察.通过电镜观察,可以了解在晶体内蛋白质分子的排列情况以及分子的形状和大小等重要资料.但是,这种观察多采用负染色法,所以照片的反差一般是低的.而且由于染色时对结晶的损伤、染色颗粒及胶片颗粒的干扰等因素,使电镜照片不可避免地带有严重的噪声,影响对结果的分析,限制了电子显微镜高分辨率的发挥.为了得到较好的照片,往往要拍摄多次才行.近年来,采用光学处理方法,可以明显改善电镜照片的反差和清晰度^[1-3].它的基本原理是利用噪声是无规则的,而结晶内的分子是有规则排列的性质,实现周期平均运算,从而提高信噪比.国内该项研究刚刚开始,尚未见报道.我们利用周期平均法对四种蛋白质晶体电镜照片进行了光学处理和晶格间距的计算,得到了较为满意的结果.本文报道此研究结果.

材 料 与 方 法

1. 牛肝过氧化氢酶结晶系匈牙利布达佩斯出品的结晶悬液(Catalase cryst., from beef liver, Budapest, Hungary),活力为 2000 单位/毫克.

2. 红曲霉葡萄糖淀粉酶结晶及电镜照片见前报^[4,5]. 本工作使用我们以前的电镜照片进行光学处理.

3. 红曲霉葡萄糖淀粉酶肽段结晶的制备:用无锡酶制剂厂生产的糖化酶酶制剂(生产菌株为 *Monascus* sp. AS 3.2199)经浸出,硫酸铵分级沉淀,收集 45—60% 的沉淀部分.再用胰凝乳蛋白酶水解,得到肽段混合液,在冰箱中放置数周,即出现结晶,初步判断为分子量 10,000 左右的肽段结晶.用此结晶进行电镜观察.我们也曾用垂直板型凝胶电泳方法^[6]制备红曲霉葡萄糖淀粉酶的提纯样品(E_3 和 E_4),按上法得到了外形相同的结晶.

4. 胰蛋白酶结晶是中国科学院上海生物化学研究所生产的.

晶格间距的计算采用比较的方法,先用间距 0.2 毫米的标准光栅,拍摄光学衍射图,计算出仪器常数.在相同条件下,拍摄未知样品的光学衍射图,根据衍射点间的距离和仪器常数即可计算出晶格间距.

用 Hu-11A 型电子显微镜分别对上述材料进行观察和拍摄.电镜照片的光学处理分别采用相干光系统(激光光源和傅里叶变换透镜等)和非相干光系统(白光源及透镜列阵等).详细的原理及实验装置,另文发表^[7].

本文 1980 年 7 月 10 日收到.

结 果

图 1 为牛肝过氧化氢酶结晶的电子显微图像用相干光处理的结果。经负染的牛肝过氧化氢酶结晶的电子显微照片 a 带有“噪声”，模糊不清。光学频谱衍射图 b 显示出周期结构和由于噪声引起的衍射图。去掉“不需要的”噪声后，制成光学滤波器 c。照片 a 通过光学滤波后重现成转换像 d，这个像 d 清楚地显示出了被无序结构掩盖的有序结构，照片清晰度明显提高。从衍射图上计算的晶格间距分别为 $34.0 \text{ \AA}$ 和 $84.6 \text{ \AA}$ 。

图 2 是牛肝过氧化氢酶结晶电子显微图像用非相干光处理的结果。未经处理的电镜照片

图 1 牛肝过氧化氢酶结晶的电子显微图像用相干光处理结果

a. 未处理的图像； b. 光学衍射图；
c. 光学滤波器； d. 处理后的图像。
电子放大 62,500 倍

图 2 牛肝过氧化氢酶结晶的电子显微图像用非相干光处理结果

a. 未处理的图像； b. 处理后的图像。
电子放大 62,500 倍

图 3 红曲霉葡萄糖淀粉酶结晶的电子显微图像用相干光处理结果

a. 未处理的图像； b. 光学衍射图；
c. 光学滤波器； d. 处理后的图像。
电子放大 54,000 倍

图 4 红曲霉葡萄糖淀粉酶肽段结晶的电子显微图像用相干光处理结果

a. 未处理的图像； b. 光学衍射图；
c. 光学滤波器； d. 处理后的图像。
电子放大 86,000 倍

图5 红曲霉葡萄糖淀粉酶肽段结晶的电子显微图像用非相干光处理结果

a. 未处理的图像; b. 处理后的图像。
电子放大 86,000 倍

图6 胰蛋白酶结晶的电子显微图像用相干光处理结果

a. 未处理的图像; b. 光学衍射图;
c. 光学滤波器; d. 处理后的图像。
电子放大 56,000 倍

a 带有严重噪音,经光学周期平均后得到处理像 b.

图3是红曲霉葡萄糖淀粉酶结晶的电子显微图像用相干光处理结果。从衍射图上计算的晶格间距分别为 $53.4 \text{ \AA}$ 和 $48.3 \text{ \AA}$ 。

图4是红曲霉葡萄糖淀粉酶肽段结晶的电子显微图像用相干光处理结果。从衍射图上计算的晶格间距分别为 $57.9 \text{ \AA}$ 和 $71.9 \text{ \AA}$ 。

图5是红曲霉葡萄糖淀粉酶肽段结晶的电子显微图像用非相干光处理结果。

图6是胰蛋白酶结晶的电子显微图像用相干光处理结果,计算出的晶格间距为 $79.1 \text{ \AA}$ 。

讨 论

1. 从上述结果看,用相干光(图1、3、4、6)和非相干光(图2、5)方法处理蛋白质晶体电子显微镜图像,均能提高照片的信噪比,清楚地显示出蛋白质晶体的内部有序结构。

2. 从图1、3、4和6看,各种蛋白质晶体的衍射图是特异性的,它与晶体内分子的排列有关。例如,图1中牛肝过氧化氢酶结晶的衍射图反映其分子排列的各行之间有一个位移。从光学衍射图上还可以计算晶格间距。计算得到的牛肝过氧化氢酶结晶的晶格间距分别为 $84.6 \text{ \AA}$ 和 $34.0 \text{ \AA}$,与文献报道的用X-射线衍射法得到的晶格间距 $84.4 \text{ \AA}$ 和 $33.9 \text{ \AA}$ ^[1],基本一致。其它三种结晶的晶格间距未见报道。

致谢:红曲霉葡萄糖淀粉酶的结晶材料是何秉旺同志提供的。电子显微镜观察是在中国科学院生物物理研究所中心实验室进行的,由徐伟、鲁崎唔、管汀鹭和傅广礼等同志协助摄制,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Meek, G. A., *Practical Electron Microscopy For Biologists*, 2nd edition, John Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto, 1976, 320, 407.
- [2] Fraser, R. D. B., *J. Ultrastructure Research*, **31** (1970), 203.
- [3] Warren, R. C. & Hicks, R. M., *J. Ultrastructure Research*, **36** (1971), 861.
- [4] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组,微生物学报, **16** (1976), 200.
- [5] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组,生物化学与生物物理学报, **10** (1978), 4: 349.
- [6] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组,生物化学与生物物理进展, 1976, 4: 36—39.
- [7] 董碧珍、郑师海、潘少华、李钦,光学学报, 1981, 1: 37—42.