

文章编号: 1004-0374(2009)01-0004-03

专题: 同步辐射光源在
生命科学中的应用

同步光源之应用于病毒学研究

陈 荣*

(中国科学院上海巴斯德研究所, 上海 200025)

摘要 即将在2009年投入使用的上海同步光源(Shanghai synchrotron research facility, SSRF)属第三代设施。它的成功建设和即将投入使用给国内不同领域包括来自于物理学、材料科学和生命科学的研究人员带来前所未有的机遇。病毒学是生命科学的一个重要分支, 其研究在 SARS 冠状病毒和禽流感爆发后越来越受到重视。本文给出了同步光源在病毒学研究中应用的一些想法。目的在于抛砖引玉, 促进讨论和交流, 为更好地利用光源做出努力。

关键词: 同步光源; 病毒学; X 射线衍射; 小角 X 射线衍射; X 射线荧光; 近边 X 射线吸收精细结构; 红外显微光谱学

中图分类号: O432.1; Q939.4 **文献标识码:** A

Application of synchrotron to virology studies

CHEN Rong*

(Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China)

Abstract Shanghai synchrotron research facility(SSRF)will be ready for use in 2009. The successful construction of this third generation resources has brought unprecedented opportunity for scientists from numerous distinct fields including physics, material sciences and life sciences in China. Research on virology, an important branch within life sciences, has received increasing attention in China since the epidemics of SARS-CoV and avian influenza. This paper presented some thoughts on potential application of SSRF on virology-related studies. The purpose of this paper is to stimulate discussion, promote idea exchange and thoughts sharing, eventually towards better usage of SSRF.

Key words synchrotron; virology; x-ray diffraction; small-angle x-ray diffraction; x-ray fluorescence; x-ray absorption near-edge structure; infrared microspectroscopy

即将在2009年投入使用的上海光源属第三代光源, 将建成包括高强度 X 射线在内的多个线站, 向上海和全国其他地区以至全世界的科学家提供很好的服务, 有广阔的应用前景。目前同步光源在病毒学的研究主要集中于两个方面: 一是利用 X 射线获得病毒颗粒和病毒蛋白晶体衍射数据; 二是通过小角 X 射线衍射获得病毒颗粒或病毒蛋白分子在溶液中的形状、大小、组装过程以及构象变化。下面就这两个方面的应用做一些介绍, 同时针对其他同步光源资源在病毒学中的可能应用进行一些探讨。

1 同步光源的特点和优点

同步光源所产生的辐射粒子(波)具有可利用波长范围宽、强度高、流量大、单色性好和稳定性高的特点。由于同步光源的单色性好、强度大和光斑小的特点, 其对于生物样品的检测就具有了较高的空间分辨率和时间分辨率, 也具有更高的灵敏度。很多在实验室条件下无法开展或灵敏度和精确度不够要求的工作, 利用同步光源能够取得很好的成果。

收稿日期: 2008-12-02

*通讯作者: rongchen@sibs.ac.cn

2 同步光源在病毒学中应用的一些设想

病毒学是一门特殊的生命科学,其特殊性在于研究对象是病毒。病毒的生存和繁殖依赖于宿主细胞。一直以来,病毒的自身组装(在宿主细胞内完成)以及病毒和宿主细胞的相互作用就成为病毒学家关注的中心。病毒致病性的实现在根本上依赖于病毒蛋白的功能,因此病毒及其蛋白结构、组装以及病毒带来的宿主细胞变化就一直是病毒学研究的热点。从这一点看,同步光源能够提供很好的实验手段,方便对病毒蛋白和病毒感染的细胞做一些深入的研究。

2.1 X射线晶体衍射 这是作为同步光源最为人所熟知的应用。利用X射线通过晶体衍射得到的斑点,结合通过其他途径得到的相应信息,就能够解析分子结构。同步光源所能提供的X射线存在强度高、单色性好、稳定性好的特点,同时具有光斑小的优点。单色性好能够显著增加衍射信号的信噪比,提高衍射数据的质量。强度高方便对微小晶体的利用,并可收集大晶胞晶体的衍射图谱。事实上,晶体衍射的强度与晶体中晶胞(unit cell)存在数目多少直接相关。相同大小的晶体,晶胞尺度(unit cell dimension)越大,所含的晶胞数目就越少,X射线衍射强度也会相应减弱。因此,往往出现以下情况:某类晶体在实验室配置的X射线发生器上无任何衍射斑点或非常微弱,而在同步光源X射线下有质量不错的高分辨率衍射斑点。同步光源对大尺度晶胞晶体结构的解析是不可缺少的。

目前已知高分辨率结构的病毒和病毒蛋白中,绝大多数都是利用同步光源X射线获得晶体衍射数据的。一些代表性的工作包括:哈佛大学Stephen Harrison组解析了SARS冠状病毒的spike蛋白与受体分子复合体的结构^[1];普渡大学Michael Rossmann组解析了多种picornavirus的结构^[2,3];Scripps Research Institute的Johnson组解析了多个病毒的结构^[4-7];法国Felix Rey组解析了semliki forest virus的融合蛋白结构^[8];国内饶子和研究组解析了SARS冠状病毒多个蛋白的结构^[9,10]。感兴趣的读者,还可以参看关于病毒膜蛋白晶体结构的综述^[11,12]。

Scripps Research Institute的Vi jay Reddy组和Johnson Johnson组共同相继开发了VIPERdb^[13]和VIPERdb2^[14]服务网站,对结构病毒学研究者是个很好的可利用资源。

关于同步光源应用于结构病毒学的研究还可参

考文献[15]。

2.2 小角X射线衍射 若希望得到X晶体衍射数据,三维晶体的生成是必要条件。而小角X射线衍射则能够从并非那么规则排列的分子中获得有用信息。小角衍射所获得的结构分辨率在纳米量级,尽管不能和X射线衍射数据的Å量级相比,但可以提供包括溶液中分子形状大小、构象变化以及大分子聚合体的组装等有用信息。可以直接获得的参数包括分子量大小、分子回转半径大小、分子体积和最大径长。另外,如果知道单分子的大小和形状,也可以用来判定寡聚体有几个单体组成。最近Johnson Johnson组利用小角X射线衍射分析了病毒壳颗粒在成熟过程中的形状和构象变化^[16]。有兴趣的读者还可以参考文献[17-21]。

2.3 微束近边X射线吸收精细结构(x-ray absorption near-edge structure XANES) 特定元素的氧化态情况和配位情况随所处微环境变化而变化。利用微束XANES技术,对某一特定区域进行近边X射线扫描,对入和出的X射线强度进行对比,能够获得关于金属离子的价态和配位情况的信息^[22]。这个研究手段可用于任何耦合有金属离子的蛋白研究。比如人副流感病毒2的V蛋白的C端与宿主细胞MDA-5识别,调节β干扰素的表达^[23]。V蛋白的C端有一个富半胱氨酸区域,结合有Zn离子。可通过Zn离子的价键长变化进一步研究V蛋白的结构功能关系及其与宿主蛋白的相互作用。

2.4 红外显微学 蛋白质、脂类、DNA和碳水化合物都是由很多不同的单体通过化学键的形式联系在一起。这些化学键都有自己的振动频率,波长大概2-20 μm,处在红外区域。而且,蛋白质、脂类、DNA和碳水化合物中同样化学键振动的特征谱线也有不同,实际上在红外光谱中各有自己的指纹^[24]。同步光源能够提供空间分辨率很高(微米量级)的强光,对细胞样品进行扫描,根据特征指纹,获得蛋白质、脂类、DNA和碳水化合物的分布图。红外显微在病毒学应用还少有报道。一个可能的实验设计是:可以分析宿主细胞被病毒感染后,信号通路进行调整,各类物质的分布可能发生变化,这些变化可以借助红外显微光谱研究。

2.5 微束X射线荧光分析 可以对细胞或组织切片中的元素分布进行定量检测,能够以较高的空间分辨率(高于微米量级)检测细胞中微量元素分布^[21,25-28]。在收集硒代蛋白晶体多波长衍射图谱之前,考虑到

微环境的变化, 需要利用微束 X 射线荧光准确测定硒的最强吸收波长。这方面病毒学的应用还少有报道。可以设想的一个实验是: 某病毒的感染引起细胞内金属离子的迁移和再分布, 这种现象可借助微束 X 射线荧光进行分析。

3 结论

同步光源由于其独有的特点和优点, 在包括结构生物学和细胞生物学的生命科学领域有广阔的应用前景。考虑到病毒学所研究的是需要在生物安全实验室中处理的病毒, 所以为了更好地在病毒学研究中应用同步光源的资源, 合适的用户终端包括生物安全实验室是需要具备的。

[参 考 文 献]

- [1] Li F, Li W, Farzan M, et al. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*, 2005, 309(5742): 1864-8
- [2] Xiao C, Bator-Kelly CM, Rieder E, et al. The crystal structure of coxsackievirus A21 and its interaction with ICAM-1. *Structure*, 2005, 13(7): 1019-33
- [3] Hadfield AT, Diana GD, Rossmann MG. Analysis of three structurally related antiviral compounds in complex with human rhinovirus 16. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(26): 14730-5
- [4] Fisher AJ, Johnson JE. Ordered duplex RNA controls capsid architecture in an icosahedral animal virus. *Nature*, 1993, 361(6408): 176-9
- [5] Tang L, Johnson KN, Ball LA, et al. The structure of pariacoto virus reveals a dodecahedral cage of duplex RNA. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(1): 77-83
- [6] Wikoff WR, Duda RL, Hendrix RW, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the dsDNA bacteriophage HK97 mature empty capsid. *Virology*, 1998, 243(1): 113-8
- [7] Wikoff WR, Schildkamp W, Johnson JE. Increased resolution data from a large unit cell crystal collected at a third-generation synchrotron X-ray source. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2000, 56(Pt 7): 890-3
- [8] Gibbons DL, Vaney MC, Roussel A, et al. Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature*, 2004, 427(6972): 320-5
- [9] Su D, Lou Z, Sun F, et al. Dodecamer structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10. *J Virol*, 2006, 80(16): 7902-8
- [10] Zhai Y, Sun F, Li X, et al. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(11): 980-6
- [11] White JM, Delos SE, Brwcher M, et al. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2008, 43(3): 189-219
- [12] Harrison SC. Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15(7): 690-8
- [13] Shepherd CM, Borelli IA, Lander G, et al. VIPERdb: a relational database for structural virology. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(Database issue): D386-9
- [14] Carrillo-Tripp M, Shepherd CM, Borelli IA, et al. VIPERdb2: an enhanced and web API enabled relational database for structural virology. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Database issue): D436-42
- [15] Johnson JE. Virus structure analysis with synchrotron radiation: methods and results. *J Synchrotron Radiat*, 2004, 11(Pt 1): 89-92
- [16] Lee KK, Gan L, Tsuruta H, et al. Virus capsid expansion driven by the capture of mobile surface loops. *Structure*, 2008, 16(10): 1491-502
- [17] Tsutakawa SE, Hura GL, Frankel KA, et al. Structural analysis of flexible proteins in solution by small angle X-ray scattering combined with crystallography. *J Struct Biol*, 2007, 158(2): 214-23
- [18] Neylon C. Small angle neutron and X-ray scattering in structural biology: recent examples from the literature. *Eur Biophys J*, 2008, 37(5): 531-41
- [19] Petoukhov MV, Svergun DI. Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(5): 562-71
- [20] Bernadó P, Mylonas E, Petoukhov MV, et al. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(17): 5656-64
- [21] McRae R, Lai B, Vogt S, et al. Correlative microXRF and optical immunofluorescence microscopy of adherent cells labeled with ultrasmall gold particles. *J Struct Biol*, 2006, 155(1): 22-9
- [22] Yang L, McRae R, Henery MM, et al. Imaging of the intracellular topography of copper with a fluorescent sensor and by synchrotron x-ray fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11179-84
- [23] Chatziandreou N, Stock N, Young D, et al. Relationships and host range of human, canine, simian and porcine isolates of simian virus 5 (parainfluenza virus 5). *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 10): 3007-16
- [24] Dumas P, Sockalingum GD, Sule-Suso J. Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications? *Trends Biotechnol*, 2007, 25(1): 40-4
- [25] Fahrni CJ. Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: exploring the subcellular topography and speciation of transition metals. *Curr Opin Chem Biol*, 2007, 11(2): 121-7
- [26] Kikuchi K, Komatsu K, Nagano T. Zinc sensing for cellular application. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(2): 182-91
- [27] London RE. Methods for measurement of intracellular magnesium: NMR and fluorescence. *Annu Rev Physiol*, 1991, 53: 241-58
- [28] Twining BS, Baines SB, Fisher NS, et al. Quantifying trace elements in individual aquatic protist cells with a synchrotron X-ray fluorescence microprobe. *Anal Chem*, 2003, 75(15): 3806-16