

高效能大分子結晶學相位解析技術 之發展現況

Recent Advances in Phasing Techniques for High-Throughput Macromolecular X-Ray Crystallography

江佳旺、李宜靜、林麗瑩、謝東儒、詹迺立

Chia-Wang Chiang, Yi-Ching Li, Li-Ying Lin, Tung-Ju Hsieh, Nei-Li Chan

X 射線結晶學是目前鑑定生物巨分子三維結構最有效、解析度最高且最廣為採用的技術。以此方法進行結構鑑定涉及以下幾個步驟：樣本的純化與結晶、繞射數據的收集、繞射波相位角的鑑定，以及三維結構之建構與修正。除了晶體的取得一直是結構解析過程中主要的瓶頸外，相位角鑑定亦是此技術成功與否的關鍵之一。近年來由於同步輻射光源使用日益普遍，其波長可調的特性搭配具有異常散射能力的晶體，使我們可使用多波長異常散射法快速解決相位問題，本文將介紹此方法的原理及執行方式。

X-ray crystallography is the most effective and widely used tool in determining the high-resolution three-dimensional structure of biomacromolecule. Key steps of this technique include purification and crystallization of target molecule, collection of X-ray diffraction data, phase determination for each reflection, and construction of a structural model followed by rounds of model refinement. Among them, crystallization and phase determination were known to be the main bottlenecks. With the recent instrumentation advances in crystallographic beamlines, the tunability of synchrotron radiation combined with crystals containing anomalous scatterers allow rapid phase determination by the method of multiple-wavelengths anomalous diffraction. This article introduces the theory and experimental procedure of this revolutionary phasing technique.

一、前言

為闡述相位解析 (phase determination) 在 X 射線晶體學 (X-ray crystallography) 中的重要性，首先我們將對此分子立體結構分析技術的原理做簡單的介紹。X 射線是一種波長短、能量高的電磁波。在分

析生物大分子結構時所使用的 X 射線波長大多介於 0.9 至 2.0 Å 之間。在 X 射線的照射下，晶體中每一個原子周圍的電子都會隨著入射 X 射線的電磁場震盪、產生繞射波 (diffracted X-ray)，由各個電子發出的散射波彼此相互干涉，所得到的結果即稱為晶體之繞射圖形 (diffraction pattern)。上述 X 射

線繞射圖形的產生過程與光學顯微鏡之成像原理十分相似。以大家熟知的光學顯微鏡成像過程為例，首先須有一束平行的可見光照射到待觀測的物體上(相當於將晶體以 X 射線照射)，物體與入射光交互作用後產生散射(相當於晶體形成的繞射圖形)，接著透鏡組會將散射光聚焦即可得到待測物的影像。由以上類比可知，若能將所有構成繞射圖形的 X 射線散射波進行聚焦，我們便能得到晶體結構。由於目前尚無任何材料可以有效的將 X 射線散射波聚焦以形成高解析度的分子影像，所以在實驗上，我們必須先嘗試求得每一個散射波的波函數，再利用電腦程式模擬透鏡聚焦的功能、以重建 (reconstruct) 分子的立體結構。然而，使用 X 射線偵測器僅能測得散射波的強度 (intensity) 而無法記錄其相位角 (phase angle)，因此收集到的數據並不完整，由於散射波相位訊息之缺乏以致無法進行影像重建的現象，即稱為 X 射線晶體學之相位問題 (the phase problem in X-ray crystallography)，而如何透過實驗的方法得到每一個散射波的相位角則是結構解析時必須克服的重要瓶頸。以下將進一步以方程式解釋相位問題，並說明如何可以藉由擾動 (perturbation) 造成散射波強度之變化，以求得相位角。

晶體是由許多在空間中規律排列的分子所組成

的三維陣列，其最小的重複單元稱為單位晶格 (unit cell)。假設在晶格中 N 個原子產生之 X 射線散射波的振幅為 f_1, f_2, \dots, f_j ，相位角為 $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_j$ ，則某個原子在 hkl 方向之散射波 f_j^{hkl} 可記為： $f_j^{hkl} = |f_j| x e^{i\alpha_j^{hkl}}$ ， $\alpha_j^{hkl} = 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)$ ，而所有原子在 hkl 方向的合成波 $F^{hkl} = \sum f_j^{hkl}$ ，因為合成波 F^{hkl} 包含有一晶格中原子的種類、數量與分布 (x_j, y_j, z_j) 等與結構相關的訊息，因此 F^{hkl} 又被稱為結構因子 (structure factor)。

由於波動在數學上可以使用向量的形式來表示(波動之振幅對應於向量的長度，波動之相位角對應於此向量與實軸之夾角)，因此波動之干涉在數學上可以方便地使用向量的加起來處理。以一含有 3 個原子之晶格為例，結構因子 F^{hkl} 可用圖 1 之合向量表示之。若以晶格中電子密度的分布 $\rho(x, y, z)$ 及其產生之繞射波 $f(\rho_j)$ 代替空間中各個原子的位置，則結構因子 F^{hkl} 亦能以圖 2 之積分形式表示。式中 V 為單位晶格的體積， hkl 為繞射指標 (reflection index)， (x, y, z) 為單位晶格中某處的座標，而 $\rho(x, y, z)$ 為距離單位晶格原點 x, y, z 處的電子密度。

透過公式 1 之傅立葉變換 (Fourier transform)，可由結構因子得到晶格中之電子密度的分布 $\rho(x, y, z)$ ，

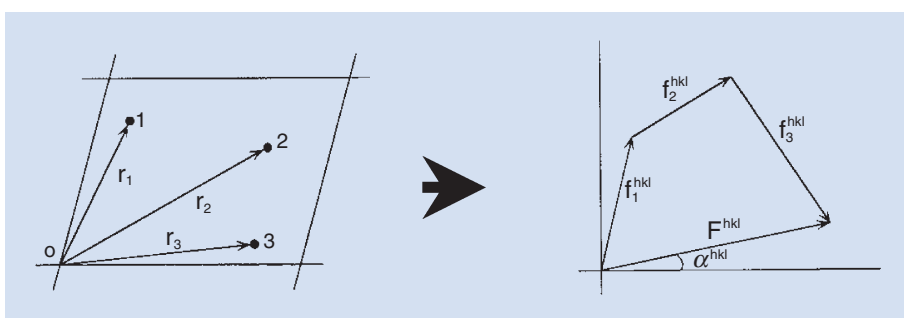


圖 1. 一個三原子分子之結構因子的振幅與相位角可由各個原子散射波的向量合表示之。

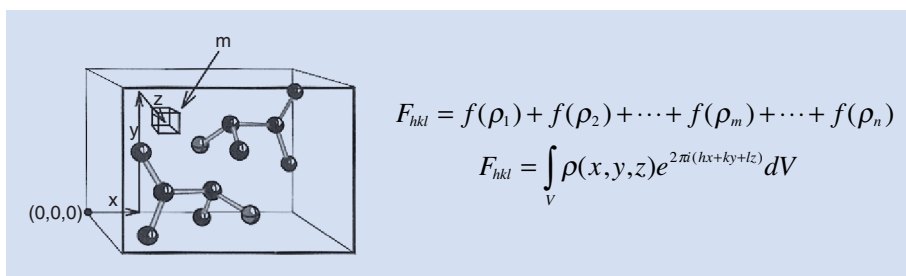


圖 2. 結構因子之積分表示法。

此即希望求得的分子結構。如前所述，向量係由長度與相位角所定義，即 $F_{hkl} = |F_{hkl}| \cdot e^{i\alpha_{hkl}}$ ，將之帶入公式 1 中，可得公式 2。由於繞射強度數據中僅提供了 $|F_{hkl}|$ 、而沒有 α_{hkl} ，因此無法從繞射強度數據直接得到結構因子 F_{hkl} ，也就無法直接計算電子密度函數。此即前述之相位角問題。

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (1)$$

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{i\alpha_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (2)$$

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha_{hkl})}$$

蛋白質等生物大分子主要由大量的 C、N、O、H 等輕原子組成，因而解決相位角問題，主要是應用所謂的重金屬同型取代法 (isomorphous replacement by introducing heavy atoms) 來造成結構因子的改變。這種方法的基本原理是把含有電子多、散射能力強的重金屬，如 Pt、Hg...等，引進到蛋白質晶體中，然後設法找出這些數量較少的重原子在晶格中的位置，再配合重金屬擾動前後之 F_P 、 F_{HP} 向量及重金屬向量 F_H 三者間應形成一個密閉三角形的關係 (the phase triangle)，即可順利解決相位角問題 (圖 3)。

我們可以由測量得知向量 F_P 及 F_{HP} 之長度 $|F_P|$ 和 $|F_{HP}|$ ，在找出重金屬的位置及其產生之散射向量 F_H 後，可通過作圖法求出各個繞射點的相位角。做法如下：在平面上選取任意原點 O 作一 $-F_H$ 向量，然後以向量 $-F_H$ 的終點為圓心，以 $|F_{HP}|$ 的大小為半徑畫一個圓，再以 O 為原點、 $|F_P|$ 的大小為半徑畫另一個圓，此兩圓相交於兩點，由於 phase triangle 在此二交點處成立，可知此時對應之相位角即為 F_P 可能的相位角值 (圖 4)。理論上，若是只獲得一組重原子衍生物數據 (single isomorphous replacement, SIR)，經計算後，其相位角的解並不是唯一的；為了從二者中分辨出正確的相位角，通常會結合數個不同的重原子衍生物所得到的數據 (multiple isomorphous replacement, MIR)，

並透過如圖 5 所示的作圖來求得更精確的相位角。

利用 MIR 方法解決相位角問題雖然概念上十分單純，但是要把重原子引進到晶體中而不造成晶格及大分子結構的改變，在實際上並不容易，要找到一個高同質性的重原子衍生物所花費的時間有時甚至可長達數年之久，因而此方法無法滿足當前從事高效能結構解析實驗室的要求。隨著同步輻射 X 射線光源技術的成熟 (請參閱本刊中簡玉成與趙俊雄博士撰寫之相關報導)，目前本領域中之實驗室皆改以多波長異常散射相位解析法 (multiwavelength anomalous diffraction phasing, MAD phasing) 作為解決相位角問題的主要工具。

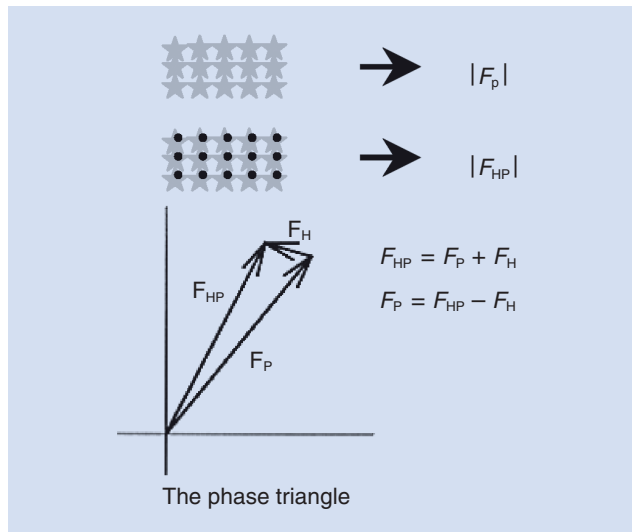


圖 3. 重原子衍生物之結構因子可由原始分子與重原子的散射向量合表示之。

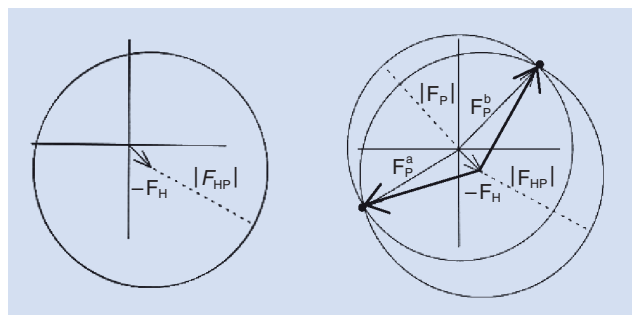


圖 4. 同質重原子取代法解析相位角之原理。右圖中二圓相交處即是相位角的可能解。

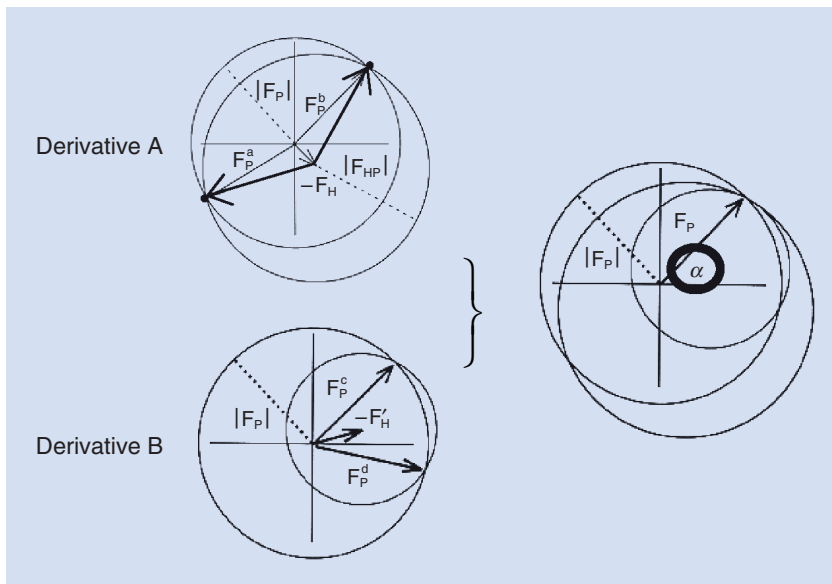


圖 5. 使用二個不同的重原子衍生物，再透過圖 4 的向量分析，即可得到正確的相位角。

二、多波長異常散射相位解析法 (MAD Phasing)

在上一節的敘述中，假設入射 X 射線並不會被晶體的組成原子所吸收，因此 X 射線之照射並不會影響一原子核周圍電子密度分布的對稱性，此時原子的散射符合 Friedel 定律 (Friedel's law)，即 $|F^{hkl}| = |F^{-h-k-l}|$ 、 $I^{hkl} = I^{-h-k-l}$ (圖 6)。雖然此假設在大多數情況下皆能成立，但是當用於數據收集之 X 射線的波長 (亦可視為能量) 與重原子內層電子之能階躍遷 (electronic transition) 所需能量相符時，會有入射 X 射線能量被吸收的現象發生。由於電子

躍遷破壞了重原子電子密度的對稱性，造成 Friedel 定律不復成立 (breakdown of Friedel's law)，此時重原子的散射因子 (atomic scattering factor) 可被表示為： $F = f^0 + f' + f''$ ，其中 f^0 是無異常散射情況下的原子散射係數， f' 是在異常散射發生時散射因子向量的實部修正項， f'' 則為虛部的修正項。由圖 7 可知，由於虛部的修正項，重原子散射波的振幅及相位會發生變化，並進而造成結構因子的改變，亦即 $|F_{HP}^{hkl}|$ 不等於 $|F_{HP}^{-h-k-l}|$ ；此現象稱為異常散射 (anomalous scattering)。由以下的圖解可知，因異常散射造成之結構因子的改變亦可用於相

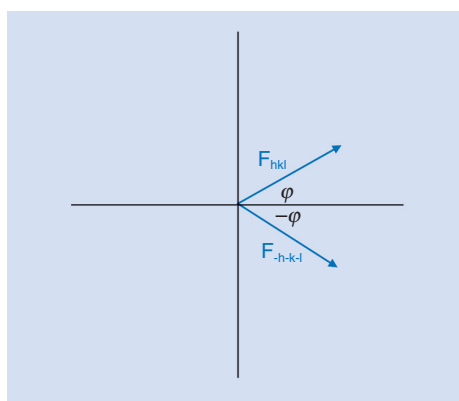


圖 6. Friedel 定律之向量示意圖。

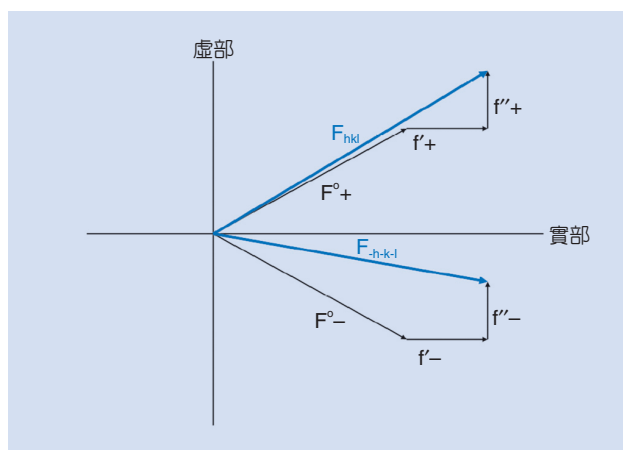


圖 7. 以向量圖表示異常散射對 Friedel 定律的影響。

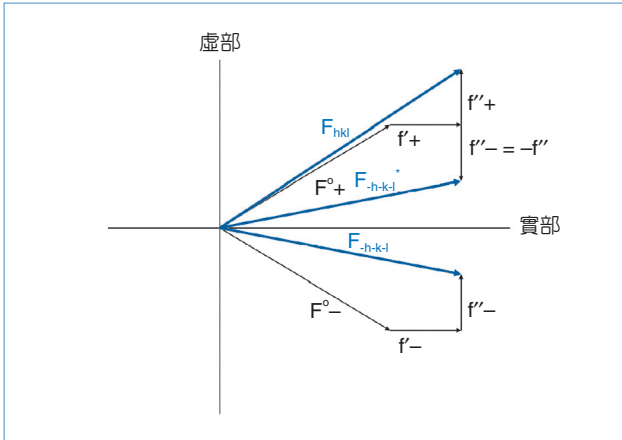


圖 8. F_{hkl} 與 F_{-h-k-l} 間相關性之向量分析圖。

位解析。

由於 f' 是實數，因此 $f'_- = f'_+$ ；反之，由於 f'' 為虛數，因而 $f''_- = -(f''_+)$ 。若將 F_{HP}^{-h-k-l} 之共軛複數 $F_{HP}^{-h-k-l*}$ 引入，由於 $|F_{HP}^{-h-k-l}| = |F_{HP}^{-h-k-l*}|$ ，並配合上述二關係式，則由圖 8 之作圖可知 $F_{HP}^{-h-k-l} = F_{HP}^{-h-k-l*} - 2 \cdot f''$ 。由此式可得新的相位關係以及三個相位圓。如圖 9 所示，在任意選取的原點以 $|F_P|$ 為半徑作一個圓，再畫出已知大小及相位的向量 $-F_H$ ，並分別加入 $[f'_H + f''_H]$ 、 $[f'_H - f''_H]$ 二向量，以其終點為圓心分別以 $|F_{HP}^{hkl}|$ 及 $|F_{HP}^{-h-k-l}|$ 為半徑作兩圓，這三個圓的交點即為 F_P 相位的唯一解。由於此種相位解析技術僅需要另外製備一種重原子衍生晶體即可，因此又稱為單同質取代異常散射相位解析法 (single isomorphous replacement with anomalous scattering, SIRAS phasing)。SIRAS 雖比 MIR 稍微簡單，但是如同前言中所述，此方法仍涉及重原子衍生晶體之置備，加上繞射數據收集時使用至少兩個不同的蛋白晶體，因此相位角的誤差受此二晶體同質性的影響甚大。

另一種使用異常散射的方式則只需使用一顆含有重原子的晶體，並在重原子之吸收邊緣 (absorption edge) 及其前後等 3-4 個波長 (圖 10) 之 X 射線下所得到的不同繞射數據，由於重原子在這些波長下的 f' 及 f'' 變化甚大，因此可以任意選取其中一組數據 $F_{HP}^{\lambda_1}$ 作為 F_P ，再將其他波長之繞射數據 (如 $F_{HP}^{\lambda_2}$ 、 $F_{HP}^{\lambda_3}$... 等) 分別視為衍生物之結構因子 F_{HP1} 、 F_{HP2} ... 等，即可推導出 $F^{\lambda_1}_{HP} = F^{\lambda_2}_{HP} +$

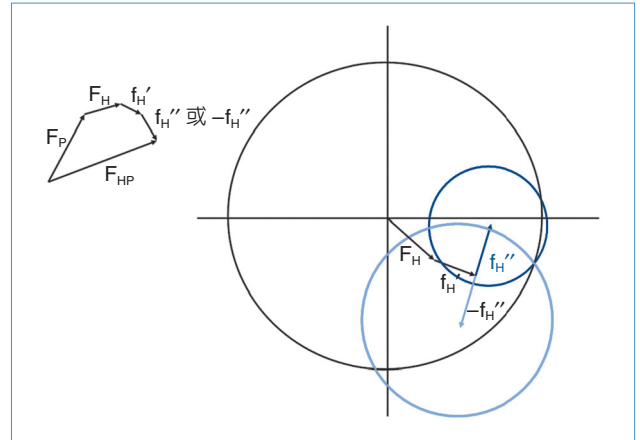


圖 9. 以 SIRAS phasing 進行相位解析之向量圖。

$f'^{\lambda_2} + f''^{\lambda_2}$ 之關係式，再配合圖 11 之作圖法可求出相位角。由於繞射數據之收集需使用不同波長的 X 射線，所以這個技術稱為「多波長非尋常散射法 (multi-wavelength anomalous diffraction, MAD phasing)」。一般實驗室中由 X 射線產生器提供的光源其波長不可調整，因此無法執行這種繞射實驗，必須利用同步輻射光源其波長可變的特性來收集繞射數據。

三、Se-MAD Phasing 之實驗流程

1. Selenium 為當今使用最廣泛的 MAD Atom

以 MAD phasing 解析大分子結構時，需要利用重原子對蛋白中的胺基酸進行標定，以引入具有異常散射能力的原子。目前常用的重原子主要有三類，(1) 以 cystein、hisitidine 及 methionine 這些胺

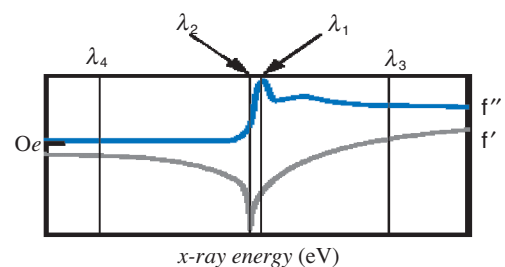


圖 10. 收集 MAD phasing 數據時 X 射線波長之選取原則。(見 http://www.bmsc.washington.edu/scatter/AS_wavechoice.html)

基酸為主，能夠與 class B 重原子 (如 Hg, Au, Pt, Ir 等) 反應形成共價鍵。(2) 以 glutamic acid 和 aspartic acid 為主，能夠與 class A 重原子 (鑷系與銅系的金屬，如 U、Sm) 結合。以上兩類重原子的引入主要都是藉由將晶體浸泡於含有重原子的溶液中，使得重原子能夠直接與晶體中的蛋白進行反應。(3) 將蛋白中 methionine 側鏈的 S 置換成 Se。此種取代方式是直接在培養基內加入已經有 Se 標定之 seleno-methionine，使得生物在合成蛋白時直接以 seleno-methionine 取代原有 methionine 的位置。使用 Se 的好處有以下幾點：(1) 能夠直接於生物體內合成蛋白時，就將 S 置換成 Se，不需經過浸泡等步驟。(2) 標定後的蛋白其性質與原蛋白差異不大，產生的晶體品質較浸泡的晶體品質好。(3) 所有的同步輻射中心都能夠產生 Se-MAD 所需的吸收波 K edge (12.658 keV)。綜合以上優點可知 Se 是目前最廣泛用於 MAD phasing 技術中的重原子。

2. 利用 *E. coli* 表現系統生產 Se 原子標定的蛋白及得到 Se 標定蛋白的晶體

由於我們需要將目標蛋白上 methionine 的 S 取代之為 Se，因此在培養目標蛋白時為提高置換率，首先要將目標蛋白的表達質體轉殖到無法自行合成 methionine 的 methionine-auxotroph BL21 (DE3) strain B834，再在培養過程中菌株進入指數生長期時將培養基換成只具有碳源、礦物質、維生素及胺基酸的基本培養基 (minimum medium)，並且將胺基酸 methionine 以 seleno-methionine 取代，先培養一段時間，待菌體內的殘留的 methionine 消耗完畢之後，再加入 IPTG 進行目標蛋白的誘導表現。此時產生之目標蛋白便會含有 seleno-methionine。

這些含有 Se 的蛋白，其性質與原蛋白十分類似，所以精製時只要依循原蛋白的純化方法即可。因為 Se 較 S 易被氧化，所以在純化的過程中建議加入還原劑 dithiothreitol，以確保操作過程中 Se 的穩定。為了確保目標蛋白的確含有 Se，可使用高敏感度質譜儀進行測定，此方法亦可用於計算目標蛋白被 Se 標定的效率，效率越高越有利於計算結構因子的相位角。此外，Se 標定的蛋白在結晶時

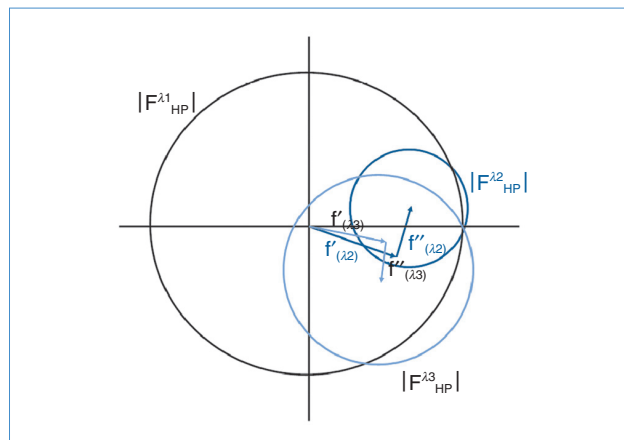


圖 11. 以 MAD phasing 進行相位解析之向量圖。

的條件，也與原蛋白接近，只要將養晶條件做些微調整，再進行 Se 標定蛋白的結晶實驗，便有機會得到含有 Se 蛋白的晶體。

3. X 射線繞射數據收集

當得到含有 Se 蛋白的晶體後，下一步就是收集晶體的繞射數據。由於高能量 X 射線會對晶體造成傷害，所以在數據收集之前，需要用低溫冷凍的方法將晶體保存在零下 160 °C，以減少晶體受到的輻射傷害。在進行 MAD 實驗時，需要先收集晶體之螢光放射光譜 (X-ray absorption fine-structure, XAFS)，找出 Se 之吸收邊緣的波長，並訂出如圖 10 之 λ_1 、 λ_2 、 λ_3 、 λ_4 等二至四個波長。一般來說，要得到相位參數最少需要兩個波長的數據，通常波長的選擇，會以 λ_2 為優先，它具有最小的 f' 。 λ_3 則是第二選擇的波長，具有最大的 f' 與明顯的 f'' 。如果晶體之輻射傷害不大，則可繼續於 λ_1 收數據，它具有最大的 f'' ，有助於重原子位置的搜尋。若晶體仍非常穩定，則 λ_4 數據的加入可進一步減小相位角計算的誤差，計算後的結構細節可能會更清楚。

4. 資料處理

X 射線偵測器所產生的影像檔並不能直接用來計算大分子的結構，所以需要利用電腦軟體 (如 HKL2000、XENGEN 和 MADNES 等) 對這些資料進行處理。首先，程式必須求出晶體的方向矩陣

(orientation matrix, 即晶體之座標軸與入射光間的相對位置), 再依此訊息鑑定出影像檔上每個繞射點的繞射指標 (hkl) 及其強度 (intensity)。此時即可利用相位分析軟體以前述之向量分析法決定每個結構因子的相位角、並計算電子密度。

5. 以全自動化軟體計算數據化後的繞射資料

過去研究大分子晶體學者在計算繞射資料時, 是利用不同的軟體, 先找出晶格中重原子的位置 (heavy atom search), 解出結構因子的相位角 (calculate phases), 然後計算電子密度圖, 再以手動的方式將各個胺基酸的結構放入電子密度圖中 (model building), 再透過反覆的結構精算 (structural refinement) 及手動結構修正, 方能得到最終的結構模型。但目前隨著軟體的快速發展, 除了部分的手動結構修正外, 其他的計算皆能夠由單一的軟體 (如 SOLVE/RESOLVE、SHARP/autoSHARP) 完成, 在取得一套 MAD 數據後, 通常在一、二天之間即能解出結構, 有效的縮短了結構解析所需的時間。

6. 其他 MAD Atoms 的應用

以 Se 作為 MAD atom 之應用雖然十分廣泛, 但是使用時仍有限制, 有些經 Se 標定的蛋白在細菌中表現時, 會形成不可溶之包含體 (inclusion body) 或是無法表現的情形, 也有一些蛋白根本不含 methionine 或者其數目很少, 這些蛋白只能利用 Class A、B 這兩類重原子標訂後再進行 MAD 實驗。此外, 鹵素原子 (Br、I) 亦可作為 MAD atom, 此部分將在下節討論。

四、單波長異常散射相位解析法

利用單波長異常散射方法 (single-wavelength anomalous diffraction, SAD phasing) 來解決相位問題並不是一項新的技術, 不過最近此技術又開始吸引眾人的目光。拜電腦軟 (硬) 體及方法學的快速進步所賜, 在收集晶體繞射數據時, 可以更準確地記錄及分析一些微弱的訊號差異, 這有助於利用蛋白質結構當中一些較重的原子 (例如: S、P...等) 所產生的異常散射訊號來解決蛋白質相位問題。由於

S、P 等原子本身即普遍存在於蛋白質與核糖核酸當中, 搭配 SAD phasing, 不僅能有效縮短晶體繞射數據收集的時間, 減少晶體之輻射損害以確保數據的品質。其最大的優點在於其可省略傳統解決相位問題中一些費時的步驟 (例如: 須得到具有重原子衍生物的蛋白質晶體), 因此大幅地簡化了實驗流程。另一個使 SAD phasing 獲得青睞的原因則來自目前歐、美、日等先進國家大力倡導的蛋白質結構基因體計畫 (structural genomics)。由於結構基因體計畫中設定的目標蛋白質為數眾多, 各國莫不竭盡所能地發展更新更快的策略以期能夠更有效率地決定蛋白質三維結構, 因此各計畫也投注了相當比例的資源去發展一套高度自動化的流程, 任何能簡化流程的技術皆被納入討論, 使得 SAD phasing 又再度回主流的行列中。有鑑於 SAD phasing 技術應用於解決蛋白質相位問題上具有相當大的潛能, 因此這一部份的內容主要包含: SAD phasing 方法簡介、SAD phasing 運用上的一些準則。

1. SAD Phasing 方法簡介

以目前較為普遍流行的 sulfur-SAD phasing 為例。硫原子外層具有 16 個電子, 二十種天然胺基酸中, cysteine 與 methionine 含有硫原子, 因此多數蛋白質中皆有硫原子的存在。與依賴外加重金屬以產生異常散射訊號的 MIR 或 Se-MAD phasing 比較之下, 利用 sulfur-SAD 方式來解決相位問題, 有其優勢存在。理論上硫原子在其 K -吸收邊緣 (sulfur K -edge; 5.02 Å) 附近會有最強的異常散射訊號, 有利於解決蛋白質相位問題。不過使用此波長所收集的數據無法提供足夠的解析度, 因此無法適用於蛋白質晶體結構解析。幸運地, 在大分子晶體結構解析實驗常用波長中 (~1 Å), 硫原子仍保有微弱的異常散射訊號 (Cu $K\alpha$ X 射線波長為 1.54 Å, 此時硫原子的 $\Delta f''$ 訊號為 0.56 個電子)。Bi-Cheng Wang 等人早在 1985 年即開始研究如何將微弱的硫原子異常散射訊號, 應用於相位問題的解決。他們認為: 若能準確的紀錄晶體繞射數據, 理論上只要硫原子所貢獻的 phasing power ($\langle \Delta F^{+/-} \rangle / \langle F \rangle$) 大於 0.6%, 就可以藉 sulfur-SAD phasing 方法來解決所謂的相位問題。大概流程為: 利用 anomalous

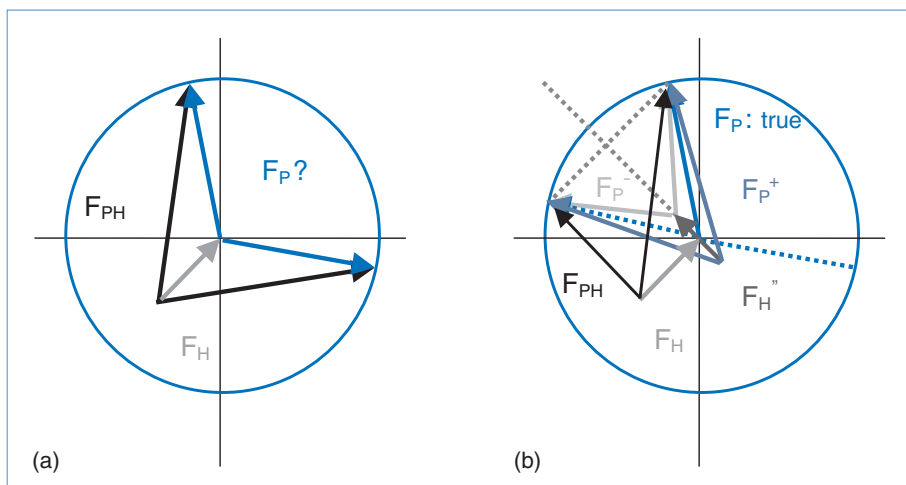


圖 12. SIR 與 SAD phasing 之比較。
(a) SIR phasing 的 phase circle；
(b) SAD phasing 的 phase circle。

difference pattern map 找出硫原子在晶格中的位置 (sulfur substructure)，得到硫原子位置之後計算 F_S 及 F_S'' 向量，搭配 $|F_P^+|$ 及 $|F_P^-|$ ，利用 Wang 論文中的相位三角圖 (圖 12) 可得到初始相位角。

在圖 12 的左圖中有兩個紅色的 F_P 向量皆能滿足 phase triangle 的要求 ($F_{PH} = F_H + F_P$)，但其中只有一個 F_P 向量是正確的；僅靠 SIR 並無法區分究竟何者為真。因此除了前述尋找其他重原子衍生物晶體，以 MIR phasing 方式解決 phase ambiguity 之外，另一常用的做法是以 SIR 數據搭配 solvent flattening (或其他 density modification 的方法) 來分辨真正的相位角。右圖則是假設左圖中的重原子能產生異常散射訊號 F_H'' 而導出的向量關係圖。由此圖可知，SAD phasing 雖然與 SIR phasing 一樣會有 phase ambiguity 的問題存在；然而此時 F_H 向量之起點 (亦為 F_{PH} 之起點) 與兩個可能的 F_P 向量間，不再如左圖般呈現對稱的情形 (亦即兩個可能的 F_{PH} 向量的大小不再一樣)。因此若藉由計算估計 F_{PH} 的大小，則對於部分 F_P 向量而言，此訊息可用於確定其真正的相位角。因此在單一波長照射下，利用單顆晶體繞射數據搭配 solvent flattening，SAD phasing 即可得到正確的 F_P 向量。

2. SAD Phasing 運用上的準則及展望

目前在 SAD phasing 的實際應用上，可以由一些重要的資訊來評估 SAD phasing 的成功率。主要是評估數據的解析度 (resolution) 及 phasing power

兩項重要數值。一般認為解析度至少要在 3 \AA 以上，才較適用 SAD phasing。雖然理論上 phasing power 的值有 0.6% 即可行，但歸納目前部分成功的例子，發現 phasing power 的數值大於 1% 成功率較高。以波長 1.54 \AA 的 X 射線為例，硫原子的 $\Delta f''$ 訊號為 0.56 個電子，換算後，大約是 120 個胺基酸需要有五個左右的硫原子才能提供足夠的 phasing power。

若結構中硫原子數目過少，替代方案之一是以波長較長的 X 射線來增加硫原子的異常散射訊號 (Cr $K\alpha$ X 射線波長為 2.29 \AA ，此時硫原子的 $\Delta f'' = 1.14$ 個電子)，可以顯著地提高硫原子的 phasing power。不過當波長變長時，空氣吸收效應 (absorption effect) 也變強。Weiss 等人利用同步輻射所產生不同波長的光源 ($1.5 - 2.64 \text{ \AA}$) 進行實驗分析，發現以波長 1.9 \AA 的 X 射線收集到的數據，能得到最好的重原子次結構。

倘若蛋白序列中缺乏足夠之重原子，將蛋白質晶體短暫浸泡在含有 $0.2 - 1.0 \text{ M}$ 鹵素離子 (Br^- , I^-) 的溶液中，快速取出後再以 SAD phasing 方法進行結構解析，也有成功的例子。因此只要有合適的蛋白質晶體及光源，利用 SAD phasing 是一個不錯的選擇。

五、結語

藉由 MAD phasing 以往需要耗時數月、甚至

數年之久的相位角鑑定工作，如今只需得到一個高品質、含有異常散射核種的晶體即可獲得解決，此高效能相位解析技術無異為 X 射線結晶學領域帶來劃時代的影響。此技術除了已成功運用於 *de novo* 相位解析外，由於其操作簡單、所得電子密度圖品質甚高，加上與分子置換法 (molecular replacement) 相較此方法解得的相位角完全不含初始模型帶來的偏差 (free of model bias)，因此本技術亦已廣泛用於鑑定同源蛋白間局部結構差異的相關研究上。相信未來此技術將持續在結構生物學領域中扮演重要的腳色。

參考文獻

1. W. A. Hendrickson and M. M. Teeter, *Nature*, **290**, 107 (1981).
2. Z. Dauter, *Curr Opin Stru Biol*, **12**, 674 (2002).
3. B. C. Wang, *Methods Enzymol*, **115** (B), 90 (1985).
4. Z. J. Liu, E. S. Vysotski, C. J. Chen, J. P. Rose, J. Lee, and B.C. Wang, *Protein Sci.*, **9**, 2085 (2000).
5. E. J. Gordon, G. A. Leonard, S. McSweeney, and P. F. Zagalsky, *Acta Crystallogr. D*, **57**, 1230 (2001).
6. E. Micossi, W. N. Hunter, and G. A. Leonard, *Acta Crystallogr. D*, **58**, 21 (2002).
7. W. Kwiatkowski, J. P. Noel, and S. Choe, *J. Appl. Crystallogr.*, **33**, 876 (2000).
8. M. S. Weiss, T. Sicker, and R. Hilgenfeld, *Structure*, **9**, 771 (2001).

• 江佳旺先生為國立中興大學生化碩士，現就讀於國立中興大學生化所博士班。

- 李宜靜小姐為國立中興大學生化碩士，現就讀於國立中興大學生化所博士班。
- 林麗瑩小姐為中國醫藥大學基礎醫學碩士，現就讀於國立中興大學生化所博士班。
- 謝東儒先生為國立中興大學生化碩士，現就讀於國立中興大學生化所博士班。
- 詹迺立先生為美國愛荷華大學生化博士，現任國立中興大學生化所助理教授。
- Chia-Wang Chiang received his M.S. in biochemistry from National Chung Hsing University. He is currently a Ph.D. student in the Institute of Biochemistry at National Chung Hsing University.
- Yi-Ching Li received her M.S. in biochemistry from National Chung Hsing University. She is currently a Ph.D. student in the Institute of Biochemistry at National Chung Hsing University.
- Li-Yin Lin received her M.S. in biomedical science from Chinese Medical University. She is currently a Ph.D. student in the Institute of Biochemistry at National Chung Hsing University.
- Tung-Ju Hsieh received his M.S. in biochemistry from National Chung Hsing University. He is currently a Ph.D. student in the Institute of Biochemistry at National Chung Hsing University.
- Nei-Li Chan received his Ph.D. in biochemistry from the University of Iowa, USA. He is currently an assistant professor in the Institute of Biochemistry at National Chung Hsing University.