中 国 科 学
1984 年 1 月　　B 辑　　第 1 期

2.4 埃分辨率去五肽胰岛素结构的 X 射线研究

——用镉反常散射解相角问题和模型结构的导出

D. Stuart* 戴金璧　楼美珍　游俊明
R. Todd* 李家瑶　王家槐　梁栋材
（中国科学院生物物理研究所，北京）

摘　　要

本文证明 2.4 埃分辨率去五肽胰岛素三维结构已经解得. 这个结构的测定没有使用重原子衍生物，而只用了由本晶体中镉离子的X射线散射（实部和虚部）获取的相角信息. 这一相角信息具有 0.56 的总品质因数，由它计算的电子密度图可用来建立起蛋白质的初始模型. 由于解相角问题所用方法目前仍属于一种新的方法，我们在文中将予以适当阐述.

在生物化学的发展中，多年以来胰岛素占有特殊的地位. 近十几年已逐渐精细地探知胰岛素的三维结构[1,2]；但是，其结构与生物活力的详细关系仍是未解开的谜[3]. 为了阐明这个中心问题，就目前而言，最有效的手段还只能是先研究活力不同的胰岛素及胰岛素类似物，然后作出一些间接的推断. 着眼于这个广阔的前景，我们实验室和中国科学院上海生物化学研究所的胰岛素研究者在七十年代开始了 B 链羧端去五肽胰岛素（按英文缩写为 DPI）的分析.

研究 DPI 的意义在于，它是从胰岛素 B 链 C 端逐次去掉若干个氨基酸残基而形成的胰岛素衍生物系列中重要的一个. DPI 保持着 80% 母体胰岛素的活力；切除 5 个残基，无论对胰岛素的生物活力还是结合活力影响都很小[4]. 但是，再切除两个残基就产生失活的分子，即去七肽胰岛素（DHPI）. 饶有兴趣的是，DPI 虽然有高生物活力，在中性 pH 溶液中却并不像二锌猪胰岛素那样聚合成六聚体，甚至也不形成二聚体. 对 DPI 结构的最后估价有待于对胰岛素、DPI 和 DHPI 的详尽分析和比较. 对 DHPI 结构的研究，我们实验室正在进行中[5].

本文报道 2.4 埃分辨率 DPI 结构分析的第一阶段结果，即不用重原子衍生物而求得相角问题的解，及 Cd-DPI 晶体起始模型的导出.

一、测定结构的方法

继 DPI 结晶成功[6]之后，曾试图用多对同晶型置换法测定 DPI 结构，且已经做过大量的研究工作去寻找重原子衍生物. 两个看起来合用的衍生物已以低分辨率的结果报道过[7,8]. 可

本文 1982 年 10 月 9 日收到.
* 现通讯处：Laboratory of Molecular Biophysics, Departement of Zoology, South Parks Road, Oxford, OX 13PS, England.

是，我们未能从这两个衍生物获取有用的高分辨率相角信息．像去五肽胰岛素这样的小蛋白质稠密堆积晶体，制备重原子衍生物确实不是易事．

DPI 分子与部分胰岛素分子的相似性是可以预料的，由适当确定位置的胰岛素片段获得 DPI 结构因子的相角信息，即用所谓分子置换法来解决相角问题，应该说是一个可取的途径．但是我们并不乐意用这一方法，其原因有二：（1）这样得到的相角信息未必客观，可能会掩盖 DPI 和胰岛素结构之间的某些真实差别；（2）这样的工作英国约克大学已有人在做[9]．一个新颖的途径是，单用母体晶体的反常散射测定蛋白质结构．1973 年 Argos 和 Matthews 曾报告过关于这个可能性的研究结果；但他们以小牛肝（calf liver）细胞色素 b5 的已测定结构为例子做的对照试验[10,11]，并未得到确定的结论．1981 年，Hendrickson 利用他自己对反常散射法的经验把它与小分子晶体学家所熟知的传统的重原子法结合起来应用于大分子晶体学中，建立了所谓“分解反常定相角”（按英文缩写为 RAP）法；它以概率联合这两种相角信息，使各反射能扬其长而避其短，独自虽粗陋，互补便致善。目前已用这个方法解出了蛋白质 crambin 的高分辨率结构[12]和 haemorythrin 的低分辨率结构[13]．

RAP 法主要取决于母体晶体反常散射对强度数据的贡献．我们所研究的是含镉去五肽胰岛素（Cd-DPI）．若用 1.54 埃波长的 X 射线（这是收集蛋白质数据所常用的），镉原子就有相当显著的反常散射（$\Delta f'' = 4.65$ 电子[14]）；在这一事实的启示下，我们考察了单用镉离子的相角信息解 Cd-DPI 晶体结构的可能性．

为了行文的一致性，我们将用 Hendrickson 和 Teeter 所用的方法和尺度[12]加以论述．设 DPI 分子和镉离子之间有 1:1 的化学计算比（参考了化学分析工作），比值 $\langle|\Delta F|\rangle/\langle|\Delta F|\rangle$ 应为 5%，$\langle|F_a|\rangle/\langle|F_p|\rangle$ 为 36%．此处 $\Delta F = |F^+| - |F^-|$，$\langle|\Delta F|\rangle$ 是反常差绝对值的方均根，$\langle|F_p|\rangle$ 是母体结构振幅的方均根，$\langle|F_a|\rangle$ 是反常原子实部结构因子振幅的方均根．这两个尺度都表明，Cd-DPI 结构的解是可得的，因为这两者比 haemorythrin 和 crambin 的对应比值都要好[12]．可是再仔细检查又说明了一些对我们不利的差异．在 haemorythrin 的分析中，因每个晶体不对称单位有三个 haemorythrin 分子存在，由分子变换超抽样可得到额外的相角信息．在 crambin 的分析中，因结晶有序性特别好，而且晶体表现出良好的耐辐射性，所以能在很高分辨率范围内收集到高精度的数据．诚然，这些特殊的优越性是 Cd-DPI 晶体所不及的，但是，情况还有另一面．我们进一步考虑最高分辨率数据对 RAP 法的影响．前面在零度衍射角估计了比值尺度，如果在 $\sin\theta/\lambda = 0.35$（对应于 1.43 埃的最小反射面间距）重新计算这两个比例，其值非常显著地上升到 13% 和 60%．这里我们还假定了结构中所有原子的热运动都是相同的．实际上蛋白质原子的热运动和溶剂的流动性很可能对高角度反射会提高这些比值．这清楚地表明，用 RAP 法进行结构分析的最佳策略一般说应当是收集一套尽可能高精度和尽可能高分辨率的数据，而且使用包括全部分辨率范围的数据．上述有利条件，促使我们决定以 RAP 法为基础来着手分析 Cd-DPI 的结构．

二、结晶和衍射数据的处理

制备 DPI 的酶解法如文献[15]所叙述．继 DPI 结晶的最初报道[6]，一系列实验揭示，可得到的晶体质量同结晶介质中金属离子的存在紧密地相关．没有金属离子或用非镉离子都长不出大晶体，加镉离子便长出适宜于高分辨率 X 射线分析的好晶体．结晶介质含有 0.5% DPI，

10% 二甲基甲酰胺，0.05*M* 柠檬酸钠，0.02*M* 三羟甲基氨基甲烷，0.02%Cd^{++}，pH 为 7.5. 晶体参数列于表 1. 设每个结晶学不对称单位有一个 DPI 分子，按 Matthews 的估算法[16]，由 C2 空间群晶胞不对称单位体积预计到，只有 32% 晶体体积的溶剂含量，这意味着 DPI 比通常蛋白质晶体有更紧密的排列[17].

表 1 晶体参数

空 间 群	C2
晶 胞 参 数	$a = 58.56$ 埃
	$b = 27.73$ 埃
	$c = 23.99$ 埃
	$\beta = 100.6°$
晶 胞 体 积	38292 埃^3
晶胞分子数	$Z = 4$
溶 剂 含 量	32%

衍射数据是 1977 年在 Phillips PW 1100 四圆衍射仪上，室温条件下，用简单的背景-峰-背景扫描收集的. 衍射用的 Cd-DPI 单晶体呈厚三角板形，其大小约为 0.7 × 0.4 × 0.2 毫米. X射线源用铜靶标准封闭式细聚焦管，经石墨单晶单色化，波长为

$$\lambda(CuK_\alpha) = 1.5418 \text{ 埃}.$$

对应于 2.4 埃面间距测量得倒易空间全球数据，共 5805 个反射. 定时重复测量两个参考反射点表明，在收集数据期间无明显辐射衰减. 因为当时还是着眼于同晶型置换法，对母体反常散射的效用考虑不多，所以不曾为确保反常散射精度采取过特别的措施，而且沿 k 方向(指标变化最慢)收集数据，致使 Bijvoet 点对 (hkl 与 $h\bar{k}l$) 以相当长的时间间隔进行测量. 数据作了通常的洛伦兹因子和极化因子几何校正，并用半经验方法作了吸收校正[18].

强度观测量被还原到倒易空间一个独立象限的结构振幅和反常散射差值 (从此开始所有计算在日立 M160 计算机上进行). 在这一步，对反常差观测值，特别是作为不同指标的函数，作了特别小心的检查；对 k 指标(收集数据时变化最慢的指标)的分析，揭示出其明显的非随机分布 (见表 2). 这可能是由于收集数据时未观测出的衰减所致. 因此，作了下面的简单处理. 对每个负值的 k，由 $\sum|F_{hkl}|$ 对 $\sum|F_{h\bar{k}l}|$ 之比求得其对应的比例因子；考虑各 k 值相邻层变化的连续性趋势，将比例因子光滑化；然后各层反射数据乘以对应的比例因子. 所导出的比例因子 $k = 1$ 时的值为 1.0 变化到 $k = 10$ 时的值为 1.12. 经校正后，反常差绝对值均值为相同次序反射的母体结构振幅均值的 6.7%，这和对每个不对称单位一个镉离子反常散射所预估的值相当.

表 2 关于 k 指标的反常差值分析(未作 k 相关校正，外层分布者被略去)

k	反常反射数	$\overline{\lvert F_p\rvert}$	$\overline{\Delta F}$	$\overline{\lvert\Delta F\rvert}$	$\overline{\lvert\Delta F\rvert}/\overline{\lvert F_p\rvert}$
1	178	708	−1	48	0.068
2	180	707	−1	47	0.066
3	174	761	−14	51	0.067
4	166	652	3	57	0.087
5	149	659	−13	50	0.076
6	134	630	−25	49	0.078
7	118	569	−24	44	0.077
8	99	490	−31	50	0.102
9	71	475	−23	41	0.086
10	47	461	−85	104	0.225
11	16	450	−70	87	0.193
总 计	1332	642	−15	52	0.081

三、DPI 结构的初步测定

1. 镉结构的测定

当镉离子落在晶体中确定的排列位置时，我们便可期望由反常差值 ΔF^2 帕特逊综合的原子间向量峰导出其位置[19]. 自然，由于反常散射信息很弱，一些错误的观测量可能使帕特逊图变得不好解释；因此，我们选择了一个可靠的反常差观测量数据子集[12]，同时用随机实验误差效应对发生于这些观测量的偏差作保守的校正[20]. 当反常差值超过 180（含任意比例的反常差绝对值均值 $\langle|\Delta F|\rangle$ 为 48），或 $\overline{|F_p|}[\overline{|F_p|} = (|F^+| + |F^-|)/2]$ 小于 $3\sigma_F$，或 $|\Delta F|$ 小于 $0.75\sigma_{\Delta F}$ 时，则予以剔除. 此处 σ_F 和 $\sigma_{\Delta F}$ 分别是 F 和 ΔF 的标准偏差. 为了部分地校正由于实验误差引起的对反常差值的超估，ΔF 值留其符号而代之以 $(\Delta F^2 - 0.4\sigma^2_{\Delta F})^{\frac{1}{2}}$. 如此得到的数据子集占反常差观测值总数的三分之一，并达到 2.4 埃分辨率范围.

用上述数据计算的反常差值帕特逊图立即可得出，每个结晶学不对称单位含有一个镉离子. 图 1 示出帕特逊图的一个哈克截面 ($v = 0$). 在图中位置 $(2x, 0, 2z)$ 上的 Cd-Cd 向量峰达到原点峰高的 40%，超过这个综合图噪音水平的好几倍. 在分析的这一阶段，我们曾试图测定出现于各 DPI 分子中的六个硫原子，但是实际上并不那么容易，所以我们决定绕开这部分信息来继续分析工作. 在以后再次检查这套图时，根据事后辨认可找到 Cd-S 峰，但也不比噪音水平高出很多. 与此同时，我们还探索过“奇”傅立叶综合[21]. 这个综合只要求结构因子振幅的信息，可产生包含有反常原子结构“正像”和“负像”的密度图. 在我们的特殊情况下，因这套综合图在原点含有反对称中心，截面 $y = 0$ 是 y 的真正零坐标值. 可惜这套图未提供任何新信息，甚至靠事后辨认也不可解释. 应该说这是由于信噪比太高所致，这个事实意味着我们解 DPI 结构的任务仍然是很艰巨的.

下一步分析，就是精确测定镉离子位置和热运动参数. 为修正这些参数，使用了可靠的反常差值数据子集，就如同在同晶型置换法中用强同晶型差值来修正重原子参数一样. 取镉原

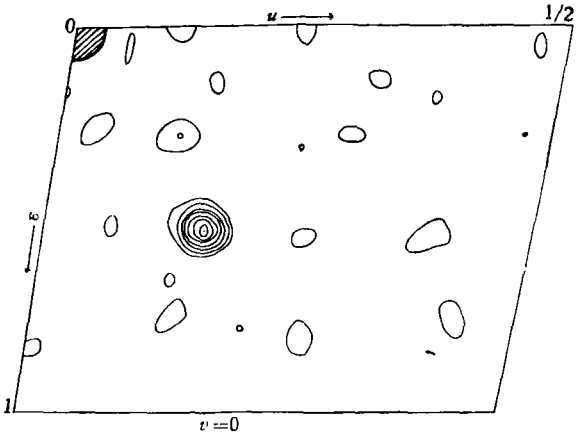


图 1　反常差值帕特逊综合的哈克截面 ($v = 0$).
（原点峰高为 199，等高线起线值为 10，间隔为 10，对应于 Cd-Cd 向量峰的高为 80）

表 3　修正后的镉原子参数

x	0.0813(0.0003)
y	0.0
z	0.2600(0.0012)
B_{11}	0.00028
B_{22}	0.00398
B_{33}	0.00422
B_{13}	0.00046

子的反常散射因子虚部 $\Delta f''$ 为 4.65 电子，并引进一个比例因子，用最小二乘法修正两个坐标参数 x 和 z 及四个温度因子参数，对于 447 个观测值其偏离因子降至

$$R_{Cd} = \sum|K|\Delta F| - 2\delta|/\sum K|\Delta F| = 0.32,$$

式中 K 为适当的比例因子，δ 为镉原子反常散射虚部贡献的结构因子振幅计算值. 表 3 列出了修正后的参数. 到这一步，硫原子位置在差值傅立叶图上仍然没有清楚地表现出来.

这个结构有一个很重要的特点就是能够无疑地确定镉原子的位置. 通常，在 RAP 分析中重原子坐标的手性不能唯一地确定，须按化学的合理性检查两套傅立叶图建立正确的手性. 而我们这里的镉原子构成中心对称的位置分布，不存在这个问题，因而可得到唯一的相角信息.

2. DPI 相角的计算

由已知的镉结构可直接得到母体结构的相角信息[11,22]. 这样，一个给定的反射有相角 ϕ 的概率可表达为:

$$P_{ano}(\phi) = N\exp\{-[\Delta F + 2\delta\sin(\psi - \phi)]^2/2E^2\}, \quad (1)$$

式中 E 是误差估计，N 是归一化因子，ψ 是反常原子散射实部贡献的结构因子相角. 为给出 E 值，考虑结构因子向量三角形缺合误差 E_o 和实验误差 $\sigma^2_{\Delta F}$ 两种来源[23]；实际上选取了一个带有任意性的 E_o 值，使用如下估值关系式

$$E = (0.5\sigma^2_{\Delta F} + 15^2)^{\frac{1}{2}}. \quad (2)$$

从另一角度，来自"局部结构"即镉原子的相角信息用 Sim 方法[24]可表达成如下概率分布:

$$P_{Part}(\phi) = N'\exp[2Q|F_p||F_a|\cos(\psi - \phi)/\langle F_u^2\rangle], \quad (3)$$

式中 N' 是归一化因子，Q 是形状因子 (可带任意性地置之为 2)，$|F_a|$ 是反常原子散射实部贡献的结构因子振幅(其相角为 ψ)，$\langle F_u^2\rangle$ 是其余原子散射因子振幅的方均值，是 $\sin\theta/\lambda$ 的函数.

为了计算概率分布(1)和(3)式，对概率相角[25]计算程序作了扩充；还用这个程序按类似于 Hendrickson 和 Teeter 方法[12]求其联合概率相角. 这个方法有三种方式供选择: a) 当反常散射相角概率分布为单峰，对应的品质因数 m_{ano} 超过 m_{comb}，并且 $m_{ano} > 0.4$ 时，则取用反常分布; b) 或者，当局部结构相角概率分布为尖峰 ($m_{Part} > 0.7$) 时，则选用反常分布的最近峰; c) 否则，两个分布相乘而取其联合分布 ($P_{comb}(\phi) = P_{ano}(\phi) \cdot P_{Part}(\phi)$). 1548 个独立反射中有 1539 个反射定得相角，总品质因数是 0.564，还有些统计学数据列于表 4. 因为 Q 值[方程(3)]和 E 值[方程(1)和方程(2)]的选取是带有任意性的，所以品质因数在傅立叶综合中只是一个良好的加权方案.

3. 傅立叶综合

用系数 $m|F_p|e^{i\alpha_{RAP}}$ 计算傅立叶综合，其中 m 为由 RAP 法计算得的品质因数，α_{RAP} 为

表 4 相角测定品质因数

信 息 来 源	贡 献 反 射 数	平均品质因数
局 部 结 构	1539	0.419
反 常 散 射	1323	0.381
联 合 相 角	1323	0.495
总 联 合 信 息	1539	0.546

对应的"最佳"相角．这套图以相等但任意取的间隔画出等高线，并以 1cm 相当于 1 埃的比例复画到玻璃板上．这套图的质量颇如我们所预期的结果，而且与大多数用多对同晶型置换法求得相角的蛋白质傅立叶图略有不同．通常，由于同晶度不足，晶体衰减，数据统一不善等原因，同晶型置换相角的质量从低分辨率到高分辨率单调地下降；结果是因低噪音与低效力分辨率相结合而密度图常只有带特征性的表现，结构的主要特点十分明显，然而细节可能就失去了．我们的（及 Hendrickson 和 Teeter 在高分辨率得到的）傅立叶图的表现就大不相同，因为 RAP 法不依赖于同晶度和精确的统一比例，在高角度的相角信息（若得精确测量）应当有如在低分辨率一样保持着一定的精度．不过，这些低分辨率相角本身就不怎么精确，以致因高噪音与大量结构细节的重叠而使所得等高图在质量上出现不规则性．

得到这套图后，我们在最初解释它时格外小心，特别是因为程序作了不少修改，错误在所难免．所以，虽然图的某些区域可以清楚地置以溶剂而另外一些地方看来相当明显地是属于蛋白质分子，但是我们还是决定在作彻底解释之前寻找独立于这个结果的验证手段．图的质量可以从两个典型区域作出判断（见图 2）．

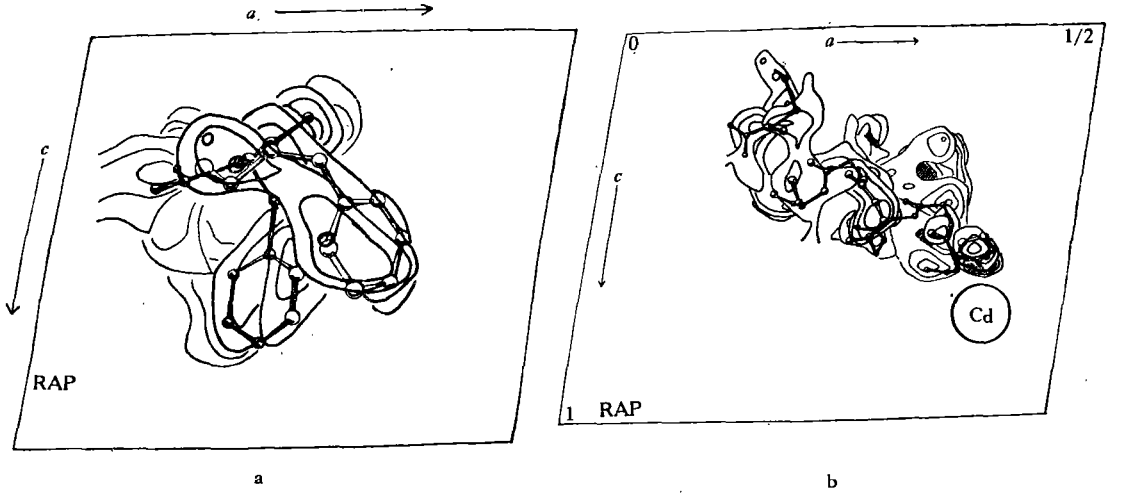


图 2　RAP 电子云密度叠合图．

[a. 示出残基 B24 和 B25（两者均为苯丙氨酸）的密度．其范围是：x = 4—18埃(1/a)，z = 2—16埃(1/c)，y 截面为 0—8/28．坐标取自 DPI 精化模型，仅为观察方便标出原子位置．等高线所取间隔相同但带有任意性．b. 示出 B 链一个螺旋段．其范围是：x = 0—1/2，z = 0—1，y 截面为 9/28—14/28．精化坐标所标原子仅为观察方便；就大部而言只示出主链原子，但为明瞭起见，也包括了 His 10（和镉离子配位的残基）和 Cys 19（硫桥之一半）的侧链原子]

4. RAP 图的进一步验证

旋转函数是对傅立叶图的一个独立性的验证．利用 1.8 埃分辨率胰岛素结构的精化坐标[26]，按胰岛素分子 I 设计了一个参考分子．在以下的讨论中，我们仍然保持中国使用的两个独立分子的编号系统，即在我们的系统中的分子 I 对应于牛津和约克命名法中的分子 II．这样，我们的分子 I 就是在四锌胰岛素和八目鳗胰岛素中基本保持不变的分子[27,28]，所以它被认为是更"典型"的胰岛素结构．这个参考分子由 A5—A21，B7—B25 总共 36 个残基组成．这个分子（以 Cd 取代 Zn）安排在一个足够大的正交单胞中，确保相邻分子间至少有 20 埃的距离，以免分子间向量搅乱帕特逊综合．用 Ten Eyck 的方法[29]在 5 埃分辨率计算了这个模型

的结构因子. 然后用快速旋转函数[30]来比较观测的和计算的两帕特逊图(取 5—10 埃范围的全部数据),帕特逊向量的截限是 20 埃. 有若干因素影响着旋转函数的特征,首先是 DPI 单胞中分子堆积得很紧密;其次,受到严重修剪的胰岛素分子具有一个很近似的内部对称轴;第三,在 DPI 单胞中,镉原子相对于 DPI 分子的位置并不正好与胰岛素单胞中锌原子相对于胰岛素分子的位置相对应;最后一点就是 DPI 分子与胰岛素分子有着实际的差异. 由于这些因素的综合影响,所得结果自然不大清晰. 令人欣慰的是,借助于由 Cd 离子对 DPI 分子的定位,我们发现,旋转函数图中最大峰出现于同 RAP 傅立叶图所显示的 DPI 分子真实方位相联系的位置. 这为我们对 RAP 图进行可靠的解释提供了一个重要的证据.

5. RAP 图的解释

证实了 RAP 图的正确性,我们很快就测量出认为是螺旋结构区域的 13 个 C_α 原子的粗坐标. 然后,用这些坐标按刚体拟合法[31]导引出胰岛素两个分子在 DPI 的 C2 单胞中的旋转和平移. 对胰岛素分子 I 施行重叠之后,测量的 DPI 坐标和由胰岛素分子 I 变换过来的坐标之间方均根偏差是 0.97 埃,与我们在测量坐标中所预计的误差相当. 分子 II 等效原子的拟合就不大好了. 施以重叠所作的适当变换,得到胰岛素分子 I 除去残基 B26—B30 后所有原子的坐标. 为进一步比较和分析,所得到的这些坐标被直接画在 DPI 傅立叶图上. 我们没有花时间在这些坐标的基础上做广泛的模型重建工作,而是用 RAP 图作为"过滤器",从这个模型切除那些在 DPI 和胰岛素分子中占据明显不同位置的残基;如此得到的模型共包括 302 个原子,约有 20% 的蛋白质非氢原子暂时被放弃,它们是 B 链头部 4 个残基,及 A12—A14, A21 和 B25 的侧链,后 5 个残基都作为甘氨酸处理.

在这一阶段所建立的模型还不是对 DPI 分子完全和精确的描述. 对 10—3.8 埃分辨率范围的全部反射,其观测结构振幅和由模型计算结构振幅之间的相对平均偏离 (R 因子) 是 0.46. 这个指标表明模型还有相当大的缺陷,然而也可以清楚地看到,它决不比花很多劳动由多对同晶置换法得到的电子密度图建立的许多模型差. 近几年的事实越来越清楚地说明,对这样一些人工推导出的电子密度图的修正可以同时大大地改善原子的位置和表观热运动参数. 所以在此阶段我们没有对所得结果作更详细的分析,而宁可直接转到用高效力的约束参数最小二乘法对起始模型进行修正. 我们将有另文报道修正结果,在此只是指出:方法的成功为本文所描述的过程提供了最后的证据.

总而言之,这里给出的结果是 RAP 法效力的进一步证明;而且可以预言,这一技术将证明是其效用比得上多对同晶置换法的一个工具,至少对中等分子量的金属-蛋白质和结晶蛋白质-金属复合物是如此.

参 考 文 献

[1] Adams, M. J., et al., *Nature*, **224**(1969), 491—495.
[2] 胰岛素结构研究组,中国科学,1972,1: 3—20.
[3] 北京胰岛素结构研究组,同上,1974,6: 591—609.
[4] 中国科学院上海生物化学研究所胰岛素组,同上,1976,4: 429—436.
[5] 常文瑞等,中国科学 B 辑,1982,6: 528—530.
[6] 北京胰岛素结构研究组,中国科学,1976,3: 306—307.
[7] 王家槐等,科学通报,**25**(1980),8: 369—371.
[8] 李家瑶等,同上,25,(1981),16: 1011—1013.
[9] Bi R. C., et al., *Proceedings of the XII International Congress of Crystallography*, Ottawa, 1981.

[10] Mathews, F. S., et al., *J. MOl. Biol.*, **64**(1972), 449—464.
[11] Argos, P. & Mathews, F. S., *Acta Cryst.*, **B29**(1973), 1604—1611.
[12] Hendrickson, W. A. & Teeter, M. M., *Nature*, **290**(1981), 107—113.
[13] Smith, J. & Hendrickson, W. A., *Proceedings of the XII International Congress of Crystallography*, Ottawa, 1981.
[14] Cramer, D. T., *International Tables of X-ray Crystallography*, Vol. IV. Kynoch, Birmingham 1974. 148—151.
[15] 中国科学院上海生物化学研究所胰岛素组等，中国科学，1976，3：301—305.
[16] Matthews, B. W., *J. Mol. Biol.*, **33**(1968), 491.
[17] Matthews, B. W., in *The Proteins* (Eds. Neurath, H. & Hill, R. L.), Vol. 3rd ed., Academic Press, 1977, 403—590.
[18] North, A. C. T., et al., *Acta Cryst.*, **A24**(1968) 351—359.
[19] Rossmann, M. G., *ibid.*, **14**(1961), 383—388.
[20] Blundell, T. L. & Johnson, L. N., *Protein Crystallography*, Academic Press, London, 1976, 347.
[21] Okaya, Y., et al., *Phys. Rev.*, **98**(1955). 1857.
[22] Hendrickson, W. A., *Acta Cryst.*, **A35**(1979), 245—247.
[23] Ten Eyck, L. F. & Arnone, A., *J. Mol. Biol.*, **100**(1976). 3—11.
[24] Sim, G. A., *Acta Cryst.*, **12**(1959), 813—815.
[25] Blow, D. M. & Crick, F. H. C., *ibid.*, **12**(1959), 794—802.
[26] Wang D. C., et al., *Scientia Sinica*, **B25**(1982). 603—610.
[27] Bentley, G. A., et al., *Nature*, **261**(1976), 166—168.
[28] Cutfield, J. F., et al., *J. Mol. Biol.*, **132**(1979), 85—100.
[29] Ten Eyck, L. F., *Acta Cryst.*, **A33**(1977), 486—492.
[30] Crowther, R. A., *The Molecular Replacement Method* (Ed. Rossmann, M. G.), Gordon & Breach Inc., New York, 1973, 171.
[31] Hendrickson, W. A., *Acta Cryst.*, **A35**(1979), 158—163.
[32] Hendrickson, W. A. & Konnert, J. H., in *Computing in Crystallography* (Ed. Diamond. R.. et al.), 13.01—13.23, Indian Academy of Sciences, Bangalore, 1980.