

结构生物学的时代已经开始

Structural Biology

邹承鲁

(生物大分子国家重点实验室,中国科学院院士 北京 100010)

过去一些年来,英国《自然》杂志每年11月召开一次分子生物学国际学术会议,讨论生物学领域内这一最重要的学科一年来的最新动态。但是1993年的国际学术讨论会的主题为结构生物学,会上曾任哈佛大学和麻省理工学院教授,现为美国布兰代斯(Brandeis)大学教授的皮特斯科(Petsko)宣称结构生物学的时代已经开始。

结构生物学的迅速兴起和发展,使它在近年来的分子生物学研究中已经占据了主流的地位,并且毫无疑问地已成为生物学各前沿领域的基石。虽然结构生物学名称的提出已经有25年,但结构生物学时代的真正形成不过是近几年的事。突出的标志是多种新的国际性的结构生物学专业刊物的创刊。近四年来至少已经有五种新的结构生物学专业期刊,它们是:《J. Structural Biology》(1990)、《Current Opinions Structural Biology》(1991)、《Macromolecular Structure》(1991)、《Structure》(1993),以及由《Nature》1993年特别增加的《Structural Biology》专刊。特别值得注意的是已有几十年历史的《J. Structural Biology》的几次更名。这份杂志创刊时的刊名是《J. Ultrastructure》,主要发表用电子显微镜观察生物体结构的研究论文,后来随着分子生物学成为生物学的主流,1972年更名为《J. Molecular Structure Research》,1990年又改为现名。应该说该刊三次改名在一定程度上反映了整个生物学发展的动向。除上述专业刊物外,另外一些重要的新刊物虽然不直接用结构生物学为名,但内容也是结构生物学的,如《Protein science》、《Biological Macromolecules, Structure and Dynamics》、《Protein, Structure, Function and Genetics》等。

结构生物学的内容

从上述几种主要结构生物学期刊论文内容分析,大部分(约70%)是从蛋白质结构(主要是三维结构)分析阐明其生物学功能。如果说,生物大分子

研究的主流50年代从蛋白质转向核酸,那么现在可以说又从核酸转回蛋白质了。

《Current Biology》是1991年出版的介绍生物学领域内最新成就和观点的刊物。它分六个分支领域:细胞生物学(细胞骨架)、免疫学、神经生物学(信息机制)、生物技术、遗传与发育和结构生物学。值得注意的是六个最重要的分支学科已不包括分子生物学,但是不仅是遗传与发育,所有其他分支实际上都包含分子生物学的内容,并且都离不开结构生物学的影响。结构生物学分册目前包括下面十二个专题:蛋白质-核酸相互作用、折叠与结合、大分子组装、理论与模拟、核酸、序列与拓扑学、脂质膜蛋白、工程与设计、糖及多糖、生物方法、蛋白质、催化与调节。

由此,可以看出,结构生物学是以生物大分子结构及其运动的测定为基础来阐明生命现象的科学。它一直是分子生物学的重要组成部分,只是近年来才飞速发展成为分子生物学的前沿和主流;并且从当前发展趋势来看必将取代分子生物学的位置,成为整个生命科学的前沿和带头学科。

结构生物学与整个生命科学发展的关系

有人认为,如果前一段时间,生物学的特征是强调分析的话,当今应该是从分析重新走向综合的时代了。我认为,分析和综合不是对立的,而是相辅相成的,又是不可分割的。实际上,为彻底揭示生命活动本质的分析研究现在还远远没有完成使命,我们对许许多多生命现象的分子基础还很不了解,因此对生命物质的结构分析,特别是分子乃至原子水平的分析和结构运动的分析,还须大大加强、深入和提高。当然,在分析的基础上也要不断综合,去发现在高一级结构水平上的生命活动规律,但综合必需有结构基础。现在大分子组装体的结构与功能既是结构生物学的重要内容,也正是走向综合的重要

的一步。

神经生物学和细胞生物学所以出现今天这样蓬勃的生气盎然的局面,完全是因为注入了分子生物学这一新鲜血液。今后生物物理学各个领域的研究也一定会因为共享结构生物学的最新成果而作出自己的新贡献。生物膜与细胞内跨膜信息传递,基因结构与基因调控,生物能的产生、传递和作用,神经网络的结构功能,直至感情、学习、记忆这种最高级的生命运动形式都需要,也只有结构生物学水平上的研究才可能最终阐明它们的本质。离子通道和神经递质受体结构研究已给神经生物学带来了全新的面貌,作为现代生物学热点的神经生物学已经不是传统的神经生物学,而是建立在分子生物学,特别是结构生物学基础上的神经生物学了。

1. 蛋白质是生命活动的主要承担者

一切生命活动,如生长、运动、呼吸、免疫、消化、光合作用,以及对外界环境变化的感觉并作出必要的反应等,都必须依靠蛋白质来实现。新陈代谢是生命活动的主要特征,而构成新陈代谢的所有化学变化都是在酶的催化之下进行的,除最近发现的极少数具有催化功能的核糖核酸以外,所有的酶都是蛋白质。虽然遗传信息的携带者是核酸,但遗传信息的传递和表达不仅仍然是在酶的催化之下,并且也是在蛋白质的调节控制之下进行的。

每一个蛋白质都有它自己的一定的氨基酸序列和一定的空间结构。50年代中,胰岛素分子的氨基酸序列及二硫键连接方式的阐明,是蛋白质一级结构测定的开始。40年来氨基酸序列被测定的蛋白质已有6万个。蛋白质分子,除有以氨基酸组成的并有一定顺序的肽链结构以外,还具有肽链在空间的卷曲折叠而形成的三维空间结构。第一个被测定空间结构的蛋白是肌红蛋白。只有处在特定的三维结构中的蛋白质分子才是能够发挥生物功能的活性蛋白。因此,即使肽链的氨基酸序列不变,只要空间结构被破坏,就会导致蛋白质功能的丧失。蛋白质在肽链保持完整条件下空间结构的破坏称为蛋白质的变性。这一概念是我国科学家吴宪在30年代初根据他在国内的工作首先提出来的,长期来被国际上广泛接受。

预计在未来不太短的时间内,X射线晶体衍射仍然是蛋白质空间结构测定的主要方法。美国蛋白质数据库存入的结构,十年前是100个左右,一年前则是1500个,现在是2500个,也就是说结构测定的速度已达到平均每天超过一个的水平。几乎每一个重要蛋白质高分辨率结构的测定,都从分子水平上阐明了一项基本生命现象。但是,这些结构已被测定的蛋白质,只不过是自然界数以百万计的蛋白质中的微不足道的部分。在结构研究领域内,近20年来发展起来的二维核磁共振方法已经显示了

它对蛋白质在溶液中的空间结构和运动状态方面研究的优势,现已解出了上百个较小蛋白质的结构,也许在不远的将来还会为生物大分子空间结构测定带来又一次突破。

结构与功能关系的研究,一直是蛋白质研究的核心问题之一。过去最常用的方法是用化学方法修饰蛋白质的侧链基团,以观察对蛋白质生物活性的影响。现在,体外基因突变技术,特别是定点突变的发明,可以任意改变蛋白质分子中的氨基酸残基,以观察其对生物功能的影响。另一个重要的问题是蛋白质空间结构与其生物活性的关系,这是近年来发展最为迅速的领域,也是结构生物学的核心。我们新近的研究结果指出,空间结构对酶的功能至关重要,即使极其细微的扰乱也会导致酶活力的丧失。但是,蛋白质分子并不是一个刚性分子,它的空间结构在一定程度上是在不断运动之中,即使在晶体状态下运动也不停止。实际上,蛋白质的功能不仅与分子结构本身密切相关,而且必须依赖于结构的这种运动性能。酶分子活性部位的一定程度的柔性,亦即可运动性,正是酶充分发挥其催化功能所必需的。

经过多年的研究,遗传信息由DNA到RNA再到多肽链的合成过程已经基本清楚。需要进一步搞清的问题是,这一过程是怎样得到调节控制的。这不但是细胞发育分化的基础,也和生物体与各种环境因素的相互作用以及疾病的发生有密切关系。现在看来调节主要发生在转录阶段,通过某些特定蛋白质与DNA的结合,从而控制信使RNA的合成。核小体中组蛋白与DNA的结合已被阐明;一些转录调节蛋白,如亮氨酸拉链蛋白与DNA的结合方式也已得到高分辨率的结构;其他转录调节蛋白—DNA复合物结构正在不断解出,这都将使转录调节在分子水平上得到阐明。另一个需要进一步搞清的问题是,以一定氨基酸顺序排列的多肽链怎样折叠成有一定空间结构的蛋白质。这是分子生物学中心法则目前还完全没有解决的两大问题。除实验研究外,从理论上,如何根据蛋白质的氨基酸序列预测蛋白质空间结构,也是一个受到广泛重视的研究方向。

与蛋白质相比,核酸的三维结构测定慢得多,主要是因为难以得到晶体。目前进入数据库的DNA结构尚不到200个,现在主要的兴趣在核酸与蛋白复合物的结构。但核酸一级结构测定已有突破,预计2005年,甚至更早一点的时间就可以完成人基因组DNA全序列的测定。

2. 膜结构是生物体的基本结构之一

除细胞的外周膜之外,细胞内还有多种功能各不相同的膜结构。膜主要由磷脂和蛋白质组成,代谢活动旺盛的膜,如线粒体膜,蛋白是主要成分;相

反,如神经细胞的外周膜,则以磷脂为主要成分。由于磷脂是以甘油、脂肪酸酯和磷酸酯组成,因此既有脂溶性部分,也有水溶性部分。它在水溶液中的稳定结构是以脂溶性部分向内,水溶性部分向外的双层结构,这也是膜的基本结构。膜中的蛋白,有的完全结合在膜的表面;有的穿透整个膜的双层;有的部分在膜的内部,部分暴露在表面;还有一些镶嵌在膜的内部。此外,膜结构上有时还有少量的糖和RNA。现已知道,糖在细胞间的识别及信息传递中起重要作用,糖蛋白结构的重要性正在开始受到重视。可以说,糖是生物大分子领地上最后的一块刚开始开垦的神秘的土地。

许多极为重要的生命活动都与膜结构紧密相关。能量转换是生命活动的根本需要,无论是动物从食物的氧化中通过氧化磷酸化作用获得能量,还是植物从光能通过光合磷酸化作用取得能量,都是与膜,即线粒体膜和叶绿体膜的作用相关联。第一个捕光蛋白复合体结构已被解出,使我们对光能转换机制开始有所了解;最近解出的质子交换ATP酶的结构使能量转换机制的阐明又前进了一大步。也是因为膜蛋白结晶的困难,全面了解各种膜蛋白的结构和功能还需要一段艰巨的努力。为了完成一个完整细胞所有的复杂功能,细胞内部有多种以膜包围而与细胞浆相对隔离的小体,即细胞器。每一种细胞器都有其相对独立的、特定的功能。例如,细胞核含有担负遗传功能的染色体,它为核膜所包围,以保持染色体的相对独立性和稳定性;溶酶体含有多种水解酶,仅在特定情况下发挥其功能,如果不被膜结构保护,将会无控制地破坏细胞的蛋白质等重要物质而导致细胞死亡。

近年来对于膜研究的极大重视,主要是来自细胞与其周围环境的相互作用。由于膜外层的亲水和内层的疏水性质,一般物质是不能自由通过细胞膜的,这就保护了细胞内部环境的相对稳定性,尽管外部环境不断变化,细胞活动不会受过多的影响。但是,细胞又需要不断与外部环境进行相互作用。对单细胞生物,必须通过其外周膜,有选择地吸取外界的营养物质,排斥外界有害物质使其不能进入细胞内;还要通过外周膜接受外界传来的信息,调整自己的生命活动以适应环境的变化。对多细胞的高等生物而言,除上述各种活动外,还有细胞间的物质交换和信息传递。这些重要的生命活动,都要通过外周膜上的蛋白质(其中不少是糖蛋白)才能进行。细胞生物学和神经生物学领域内的许多重要问题都和膜-蛋白体系有密切关系。

3. 从分子水平和结构与功能角度认识细胞内外和细胞间的信息传递

细胞的信息传递是通过细胞表面的一类被称为受体的蛋白进行的。现在知道,激素、神经递质、

细胞生长因子和分化因子,以及某些药物等,都首先通过它们与细胞表面的特异受体蛋白结合,然后通过结合所引起的一系列的变化,把信息传递到细胞内部,最终造成细胞对信息的反应。动物的感知行为也必须通过受体才能实现。受体蛋白的空间结构测定也面临通道蛋白同样的困难,但由cDNA序列推断的氨基酸序列也已经对受体作用,因而对激素作用、神经传导和细胞间信息传递等取得了不少宝贵的资料。现在知道信息传递有多条途径,其中G蛋白的研究成果获1994年诺贝尔生理学奖。这种蛋白在得到受体的信息后能与鸟三磷(GTP)结合,因此称为G蛋白,然后通过不同的第二信使把信息传递到细胞内。它是细胞信息传递过程中的一个关键环节。因此G蛋白在细胞生长调节等方面有重要作用。癌细胞生长失调也与此有关。癌基因ras所编码的蛋白质也是一种G蛋白。

细胞学的基本知识早就告诉我们,所有细胞的分裂都有一个周期。直到现在,我们才从分子水平认识到细胞是如何控制其分裂周期的。一种可以称之为周期蛋白的物质在细胞内的浓度发生着周期性的变化,它的不断合成使其浓度不断增加,在细胞分裂之前达到高峰。周期蛋白活化了细胞内的蛋白激酶,后者活力的升高所引起的一系列化学变化会最终导致细胞分裂。在细胞分裂时,周期蛋白则迅速被水解,浓度下降;在子细胞中周期蛋白又重新合成并积累,这样开始下一个周期。控制这个周期的分子机制,在从酵母到人的细胞中是完全一致的,说明生命活动在分子水平上的高度一致性。周期蛋白结构的解出必将使我们对细胞分裂有更深入的认识。

一个单一的受精卵细胞怎样在发育过程中逐渐分化成为一个由千千万万不同类型和不同功能的细胞组成的成熟个体,一直是细胞学研究的核心问题之一,也是发育生物学的中心内容。现在知道细胞的分化也是由基因决定的,是在一类决定细胞分化信息的由基因编码的蛋白质的控制之下的。例如,编码控制果蝇复眼细胞分化的有关蛋白的基因已被分离,DNA序列测定的结果表明,它和癌基因有类似的特点,它所编码的蛋白质是一个膜蛋白,与某些生长因子受体结构相似,很可能具有酪氨酸蛋白激酶的活性。细胞发育分化的研究实际上已经是基因调控的分子生物学研究,而如前所述基因调控的分子生物学研究基础仍然是结构生物学。

在神经生物学领域中,神经细胞中信息的存储和组织以及神经细胞间信息传递的研究,现在都已进入了分子水平。以电生理学而言,脑组织中的电流活动与膜的离子通道密切相关。即使是象钠离子那样的普通物质,也必须通过跨膜的、有一定结构的钠离子通道蛋白才能出入细胞。通道蛋白大体上

可分为配体控制(如乙酰胆碱受体)和电压控制(如钠离子通道蛋白)两大类,它们都具有特定的专一性。因此钾、钠离子出入细胞各有其自己的特有的通道蛋白,二者不能通用。钠离子虽然较小,却不能利用钾离子通道。这是因为钾离子与其通道蛋白配位结合后引起通道蛋白空间结构的变化造成钾离子的通过,而钠离子正因为太小,配位结合后不足以引起通道蛋白的空间结构变化,所以反而不能通过。这两种离子通道蛋白的氨基酸序列现已清楚,但由于膜蛋白结晶的特殊困难,空间结构尚未解出。其他不少通道蛋白的编码基因DNA序列,以及由此得到的蛋白序列已经测定,在膜上的结构与其作为离子通道的功能关系也已有一定了解。

动物一般有极强的感觉能力,这是动物生存所不可缺少的,也是神经生物学研究的重要内容之一。例如,某些动物感知气味的灵敏度可高达 10^{-12} ,并能分辨化学物质的光学异构体。现在这些现象已经从分子水平开始得到阐明。视觉、味觉和嗅觉等都有自己的受体,这些受体也都是蛋白质。这些受体蛋白质不但有极高的专一性,并且以极高的亲和力与配体结合,这就是生物体感觉的分辨力和灵敏度的分子结构基础。

大脑的研究也许是神经生物学领域中最复杂的问题了。思维、感情、学习、记忆都是大脑的活动,不少人认为它将是21世纪最活跃的研究领域,现在也已开始进入分子生物学研究的范围。我相信21世纪大脑研究将有突破性的进展,并且最主要的进展必将从分子水平上取得。人的大脑可能含有 100×10^{12} 个突触接点,其物质基础仍然离不开受体蛋白。正是这些突触接点的连接组织方式决定了人脑的活动。记忆的基础可能与突触接点连接组织方式的改变有关,某些蛋白质的磷酸化能对突触接点的加强或减弱起调节作用,从而影响突触的连接组织方式。

虽然膜蛋白的重要性如上所述已毋庸置疑,但膜蛋白的结构测定,仍然远远落后于一般蛋白质的结构测定,在已知结构的2478个蛋白质中仅有6个膜蛋白。无疑,膜蛋白结构测定的突破一定会给整个生物学的前进开辟全新的广阔领域。

结构生物学的新目标

如果说空间结构测定已经有40年的历史,那么今天的结构生物学已经完全超越单纯空间结构测定的本身,而是直接瞄准待测结构的生物大分子的功能,瞄准那些与功能紧密联系在一起的生物大分子复合物的结构,如酶与底物(DNA聚合酶—DNA)、酶与抑制剂[溶菌酶—(NAG)₃]、激素与受体(人生长激素与其受体)、抗原与抗体(流感病毒

神经氨酸—单克隆抗体)、DNA与其结合蛋白(Lambda阻抑蛋白与操纵子,TATA box与其结合蛋白)等。进一步的目标又提高到由许多生物大分子组成的极其复杂的大分子组装体的结构(macromolecular assembly),如组成细胞骨架的微管系统(microtubules)、病毒与抗体复合物、由200多种不同的蛋白质组成的细菌鞭毛(flagella)、含有100多种蛋白的细胞核膜孔、由组蛋白和DNA组成的核小体、由60个不同的蛋白质分子和3条RNA链组成的分子量高达230万的核糖体等。其中核糖体大亚基的分析已达2.9埃分辨率,是当前X射线晶体结构分析的一个突破。如果说早期如溶菌酶与其抑制剂(NAG)₃复合物结构分析为揭示酶的作用机制提供了重要信息,随后紫菌光合作用中心三维结构的解析又为阐明光合作用机理以及膜蛋白的空间结构分析铺设了道路,那么现在DNA聚合酶—DNA、人生长激素与其受体、TATA box与其结合蛋白、核小体、核糖体等复合物结构的阐明则为DNA复制、激素作用、基因调控、遗传信息转录翻译和光合作用等重要生命活动的分子机理又提供了关键的信息。今后对生物大分子发挥生物功能认识上的突破还要依赖于这些相互作用的大分子复合物的结构细节的阐明。

结构生物学的另一特点是不再满足于静态结构的测定,而追求与生物大分子发挥生物功能相伴随的动态的结构的变化。生物大分子及其复合体的结构不是刚性的,而是有柔性的,存在着在不同层次的不同自由度的运动,它们是生物大分子发挥生物功能的基础和条件。另一方面,生物大分子发挥功能的过程就是和其他分子相互作用的过程,也是构像变化的过程,因此生命的结构必然是运动的结构,结构分析也必须分析结构的运动。X射线晶体结构分析正努力在第四维时间坐标上跟踪、分辨和描述生物大分子的结构变化,即所谓四维结构测定。由于同步辐射所提供的X射线光源可以达到很高强度,因而可以在以秒计的时间范围收集一套完整的衍射数据,使得在以秒计的时间范围内的结构动态测定成为可能。但X射线分析毕竟受收集衍射数据所需时间的限制,目前核磁共振(NMR)方法应该还是测定生物大分子动态结构的最佳手段;尤其在蛋白质折叠的研究中,NMR是当前捕捉和鉴定折叠中间物的产生、结构和演变最有效的手段,但是它所能测定的蛋白质的分子量目前还只在2~3万道尔顿的水平。

当今,学科的交叉和融合已经成为科学发展的必然趋势。生物物理学和分子生物学、生物化学等姐妹学科之间现在已经不能划出明确的界线,也已经不存在什么纯粹的生物物理学、纯粹的分子生物学、纯粹的生物化学等。生命科学的每一分枝无一

不在运用分子生物学的概念和技术,并且无一不在逐步走向结构生物学,而分子生物学和结构生物学诞生本身又是得益于物理学的成就。再举一个例子,看看国际上是如何看待生物物理学和生物化学的关系的。在1993年布达佩斯国际生物物理学大会的五个大会报告中四个是关于蛋白质结构研究的,唯一的从表面上看似乎是非蛋白质的大会报告,是日本大阪SANGYO大学信息工程系的义泽(Yoshizawa)教授作的“颜色视觉分子基础”,显然这是神经生物学的内容,但它的基本实验是测定鸡的各种视锥色素蛋白和壁虎的两种视觉色素蛋白的氨基酸序列,结果发现后者是视锥色素蛋白。他在此基础上,构建了视觉色素蛋白的系统发育进化树,阐明了视锥色素蛋白要比视杆色素蛋白(rhodopsin)进化更早,说明颜色视觉和光视觉要比微光视觉更早。他还根据氨基酸序列计算的电荷,推测进化过程中由于酸性氨基酸取代了碱性氨基酸而发生视锥色素蛋白向视杆色素蛋白的转变。比较鸡的视锥色素蛋白和视杆色素蛋白的“漂白”过程发现后者的中间物Ⅱ的寿命较长,从而解释了为什么视杆色素蛋白对光有较高的敏感性。这个由信息工程系的科学家做的有关视觉机理的研究,是建立在“蛋白质分子结构基础”上的,其工作内容,蛋白质的序列分析,似乎完全“应该”归类于生物化学范畴,却恰恰被国际生物物理大会认为是近三年来生物物理学领域内最优秀的成果之一而选作大会报告。

今天,生命科学家的任务是要运用人类所有的对自然,特别是对生命的知识和认识,运用人类已经掌握的全部技术来研究生命,而不能只固守在自己已经习惯的一小块领地上,只遵循自己一贯的概念,只用自己熟悉的方法进行工作,那是不能进步的,也不能为科学发展做出贡献。我国生物学家也只有适应国际潮流,与其他姐妹学科相互渗透携手前进才能向新的高度进军。

建立结构生物学研究中心刻不容缓

在不久前举行的以结构生物学为主题的中国

科学院香山会议上,到会专家一致呼吁刻不容缓地在中国建立结构生物学研究中心。

1953年分子生物学时代开始,60年代突飞猛进,可是我国不但没有立即作出反应,十年动乱期间反而对这一新兴学科进行了违反科学的批判。1976年“文化大革命”结束后,经过一些科学家的呼吁,才逐渐对分子生物学的发展给以一定的重视,但直到1987年才在上海生物化学所建立分子生物学国家重点实验室。国际上从1953到1987的30余年间分子生物学的飞速发展,不仅造成了我国在这一重要基础研究领域与国际先进水平的巨大差距,也是我国当前生物高新技术产业举步维艰的根本原因。

与1953年我国的分子生物学水平相比,我国当前在结构生物学上应该说已有相当基础。生物大分子国家重点实验室在蛋白质晶体结构分析、溶液构像变化与生物活性关系以及膜蛋白等方面已经做出了一批较高水平的成果,曾多次被重要国际会议邀请做大会报告或特邀报告,并被邀请在国际核心期刊上撰写有关领域的综述性论文,因此在国际上享有一定的声誉。另外,在电子显微镜、隧道电子显微镜、各种光谱技术等方面我国也有相当好的实验室。

现在国际上结构生物学的新时代开始还不太久,应该认真吸取我国在1953年对待分子生物学的惨痛教训,从速以生物大分子国家重点实验室为核心,组织国内各单位高水平的研究课题,给以足够强度的投资,建立跨单位的结构生物学研究中心。这样我们才可能保持我国在某些领域内的国际先进地位,并且经过努力,建成在国际上举足轻重的研究中心。由于结构生物学对生命科学的全面影响,它也必将推动我国生命科学的全面发展。可以预见,在今后一个不太长的时间内,结构生物学必然会出现像当年分子生物学一样的辉煌。希望那个时候,全人类共享的成果中也有中国科学家贡献的光和热。

(责任编辑 蔡德诚)

(上接第32页)

文。(4)一个被加密的PIN的安全性不仅依赖于加密设计或算法安全,而主要靠密钥的保密。(5)PIN的明文绝不可存在于获取装置之中,除非装置具有物理安全。(6)只有客户个人才能被卡的发行人授权选择PIN。PIN的颁发或任何与帐户识别信息相关的登记处理,均能保证使个人操作在安全强制过

程中进行。(7)存储的加了密的PIN将被替换保护。(8)PIN的泄露只能发生在其生命周期的结束。(9)PIN校验的责任取决于发行者可否通过校验功能代表其他人设定。(10)对PIN的存储和加密必须使用不同的加密密钥。(11)在PIN和PIN的保密无效写入时应告知客户。

(责任编辑 王宏章)