

蛋白质晶体中的分子堆砌与晶体生长

陈 世 芝

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

提 要

根据蛋白质晶体结构研究的结果,阐述了蛋白质晶体中分子堆砌模式和分子间的相互作用;并讨论了某些因素对分子堆砌及结晶的影响。

关键词 蛋白质晶体,晶体生长,分子堆砌

蛋白质空间结构知识是理解蛋白质如何在生命体系中发挥作用的基础之一,她的最新发展已显示出对有广阔应用前景的蛋白质工程和药物设计的重要性。晶体的X射线衍射法一直是完整地在原子水平上测定蛋白质分子空间结构的主要方法,但这个方法的应用受到很大的限制,即研究对象必须是合适的蛋白质大单晶体。因得不到合适的晶体许多有意义的课题无法开展结构分析。在蛋白质X射线结构分析的各种技术都已取得长足进展的今天,晶体生长技术的薄弱就显得更加突出。因此,加强蛋白质晶体生长的研究已十分迫切。

蛋白质晶体生长的困难在于直到现在我们只能凭经验、依靠大量筛选来寻找合适的晶体生长条件。为了改进这种状况,使蛋白质晶体生长成为一门科学,最近几年,人们开始着手蛋白质晶体生长的基础研究,除热力学和动力学研究外,它的一个重要方面是据据已有的高分辨率高精度蛋白质晶体结构资料,分析蛋白质晶体中分子堆砌模式、分子之间的相互作用,以便深入了解晶体生长机制和结晶过程所涉及的某些因素,从而指导新蛋白质晶体生长的研究。这种研究已经证明是很有价值的。

一、晶体中分子堆砌的特性

蛋白质晶体和其它化合物晶体一样,具有

漂亮的多面体外形,从微观来看,它是由蛋白质分子在三维空间按某种周期重复方式和某些对称操作堆砌而成。众所周知,蛋白质分子的多肽链一般卷曲为具有特定三维结构的不规则的球或椭球,球的内部集中着大量非极性侧链,堆砌很紧密;而在球的表面则分布着比较多的极性侧链。蛋白质分子的这些特性决定了蛋白质晶体在下列几个基本特性方面不同于其它小分子晶体。

蛋白质晶体中存在大量溶剂分子(主要是水还有少量其它小分子) 由于蛋白质分子表面众多极性基团的吸引,使蛋白质分子的表面形成了一层有序溶剂分子,此外,还有大量无序(液态)溶剂分子充填在蛋白质分子之间,这两种溶剂分子的数量约占晶体总体积的30%—60%,最高可达80%。如人嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)^[1]。由于溶剂含量特别高,它们在晶体中可彼此相通,甚至形成笔直的通道。由于这些通道的存在,许多蛋白质在晶体状态仍能发挥生物学活性作用(例如许多酶晶体中,底物会通过通道扩散到催化部位,引起催化反应)。

蛋白质晶体中分子之间直接接触面积很小

在一般小分子晶体中,由于分子体积小,几乎全部或大多数基团都可以参与分子之间的相互作用。因此,分子之间可以达到最大限度的镶嵌接触,完成紧密堆砌。而蛋白质分子是庞大的,

并卷曲为特定三维结构的球体或椭球体,使得发生在分子间的有利相互作用仅仅涉及分子表面基团的少数部分,与整个分子所含有大量

原子数目相比,显得少多了。例如:在 B Ste arothermophilas apo 与 holo 型甘油醛-3-磷酸脱氢酶中,处于分子间接触的表面积分别只

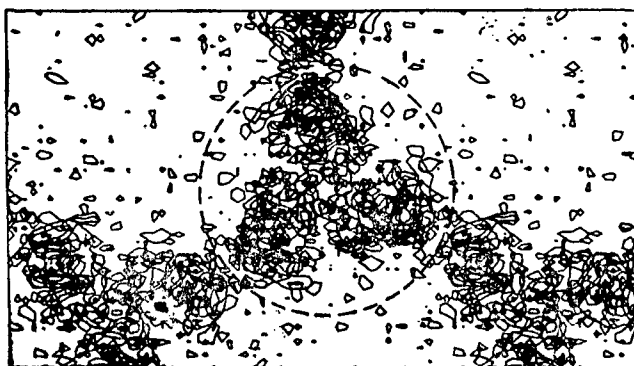


图1 PNP 电子密度图沿三重轴方向的投影
虚线圈表示 PNP 三体的界面,密度稀疏处为溶剂区

占分子总面积的 7.0% 和 8.1%^[2]。在总共10096个原子中,分子接触部位只找到 27 个氢键及由 165 个原子产生的范德瓦耳接触^[3]。蛋白质晶体中分子的堆砌仅取决于数量不多的精巧的相互作用,因而蛋白质晶体十分脆弱。由图 1 可以看到三个 PNP 分子间接触部位是很少的,而晶体中有着广阔空间能容纳大量的水^[4]。

接触部位构象的易变性 相邻蛋白质分子的接触部位往往是构象易变的一些侧链或连接 α -螺旋的环状肽段,例如 R. molischianum 细胞色素 c 晶体结构所阐明的那样^[4]。显然,这种构象易变性有利于分子间更好地嵌合,产生有效相互作用,这种相互作用又使这些易变构象“冻结”起来。因而增加了蛋白质晶体的有序程度。

有序水参与了蛋白质分子之间的相互作用

充填在蛋白质分子不规则表面的有序水分子以水桥方式将相邻蛋白质分子连接起来,在蛋白质晶体中起“粘合剂”的作用。1.67 Å R. Molischianum 细胞色素 c 晶体结构分析^[4]表明,这种蛋白质-水-蛋白质的氢键比蛋白质分子之间接触部位的直接相互作用数目要多三倍以上。由此可见这种有序水在加强晶体中分子之间相互作用的重要性。水对蛋白质的“粘合”作

用不只表现为“单水桥”形式,有时还表现为“双水桥”或多水分子组成的“水网”形式,如在天门冬氨酸蛋白酶 (aspartic proteinase) 晶体中所发现的那样^[5](图 2)。因而,蛋白质晶体与许多其它化合物晶体的一个重要不同就是前者在生长过程有很多水分子参与了分子之间的相互作用。一旦失水,蛋白质晶体就被破坏,其重要原因之一就在于此。

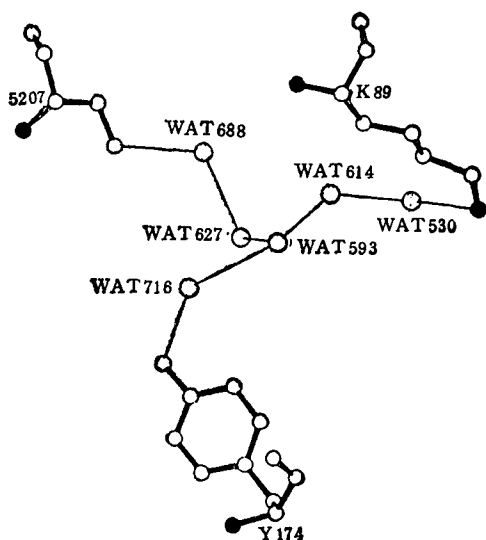


图2 天门冬氨酸蛋白酶晶体中 Tyr 174 Lys 89 和 Ser 207 之间的水网

一维堆砌可能是三维堆砌的前身 最近有人详细比较分析了鸡蛋白溶菌酶几种晶型的分子堆砌模式^[4],发现它们共有一、两种相同的分子链。如图3所示,三斜晶型c轴分子链也存在于单斜晶型与四方晶型中。还有一个例子是牛胰蛋白酶抑制剂(BPTI),它可培养出三种晶型,由X射线衍射初步分析发现都含有一

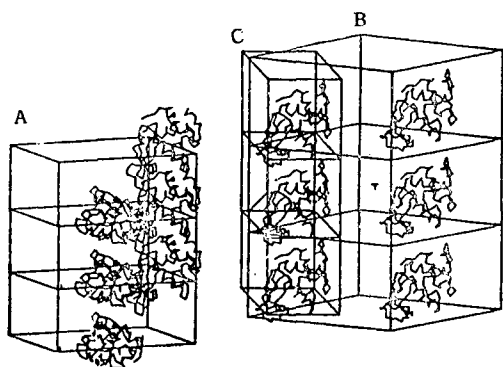


图3 鸡蛋白溶菌酶几种晶型分子堆砌型

A为单斜晶型(不对称单位由两个分子组成); B为四方晶型; C为三斜晶型,它重复出现于四方与单斜晶型中。

个二十几埃的短周期,精细结构测定表明,这三种晶型中的分子沿着这个短轴方向都形成同一种分子链^[6,7]。分析比较这些重复出现于不同晶型中的分子链,发现分子链中的分子相对取向基本类似,它们之间的相互作用较分子其它方向的相互作用强,虽然相互作用的细节不尽相同。因此,可以认为将多晶型看成是由同一种线型分子链以不同的方式组装而成。如在BPTI分子中,三种不同的晶型可看成是分子链绕短周期的轴作不同角度旋转后组装而成。这些发现可能暗示着蛋白质分子的线型聚积体是三维蛋白质晶体形成的前身。

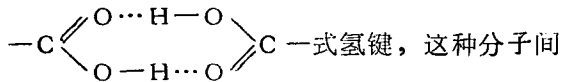
二、影响分子堆砌与结晶的某些因素

蛋白质结晶就是蛋白质分子堆砌的过程,蛋白质晶体中分子的堆砌取决于大分子表面为数甚少然而是很精巧的相互作用,不少作者成功地利用某种蛋白质的种属差异来寻找有利于结晶的分子表面;另一些作者则试图通过和蛋白质表面残基相互作用的某些离子或分子来改

变结晶液中蛋白质分子的表面性质,从而影响结晶过程。随着越来越多的高分辨率结构的获得,这些离子或分子与蛋白质分子表面相互作用的本质以及对晶体形成的影响开始被揭示。现在根据较典型的实例就五种因素分述于下:

1 氢离子: 结晶溶液的pH值一直是寻找晶体培养条件的最重要参数之一。pH值的改变通过直接影响蛋白质分子表面极性基团的带电情况来影响分子之间的相互作用,从而影响分子的堆砌方式。胰凝乳蛋白酶分子的X射线晶体研究表明,当把结晶液从pH4.2提高到6.7时,观察到了一些有意义的结构变化^[8],变化主要涉及酶分子的表面包括二聚体间的界面和二聚体内两个分子间的接触部位。涉及极性侧链残基,如:酪氨酸、组氨酸、门冬氨酸、谷氨酸等残基取向的变化。

一般认为在等电点附近是得到晶体的好条件,但并不具有普遍意义。 α -眼镜蛇毒素(α -cobratoxin)等电点为9.5,在 $\text{pH} \geq 9$ 的条件下形成油滴,得不到晶体,而在 $\text{pH} < 3$ 的几种条件下却能长出5种不同晶型^[9],在这个pH下大多数酸性氨基酸残基被质子化了,而所有的碱性氨基酸残基却是带电的。对其中一种晶型的结构分析结果发现有三个羧基位于离二重旋转轴1.5 Å左右处。这提示形成了分子间



相互作用促进了晶体的形成。

有时,蛋白质晶体生长对pH的要求十分苛刻,根据北京胰岛素结构研究组的经验^[10]要获得十分漂亮的三方二铗猪胰岛素晶体,pH应控制在 6.40 ± 0.02 ,若pH稍低,得到的是一种很疏松的发白的晶体。胰岛素B₁₀ His咪唑环的N₃ pK为6.0,若pH低于6.4就有更多的B₁₀ His的N₃处于质子化状态,从而影响和Zn²⁺结合的能力,不利于六聚体的形成,因而不能得到漂亮的晶体。

2 金属离子: 有些蛋白质需要金属离子参与才能表现其生物活力,这种情况下金属离子可能有助于维持分子某些三维结构特征,如很

多金属酶和 Ca^{2+} 结合蛋白等;而另一些情况表明,有些金属离子特别是过渡元素二价金属离子,对蛋白质生物活性并没有什么作用,却能促进蛋白质晶体生长,这个奥秘由于近年来不少高分辨率结构的获得已逐一被揭示。实验表明, Cd^{2+} 离子是生长去 B 链羧端五肽胰岛素 (DPI) 大单晶的重要因素^[11], 1.5 Å 分辨率晶体结构^[12]揭示出 Cd^{2+} 与 3 个相邻 DPI 分子中

的氮氧原子以及三个水分子配位,形成相当规则的八面体,如图 4 所示。于是,通过直接或间接(水桥)作用, Cd^{2+} 将四个相邻的蛋白质分子牢牢地拉在一起,这就很好地解释了 Cd^{2+} 促成生长大单晶以及 Cd^{2+} -DPI 晶体具有高衍射能力的原因。

α -眼镜蛇毒素 (α -cobratoxin) 晶体是在对 MPD 溶液透析而生长出来的^[9], 实验发现

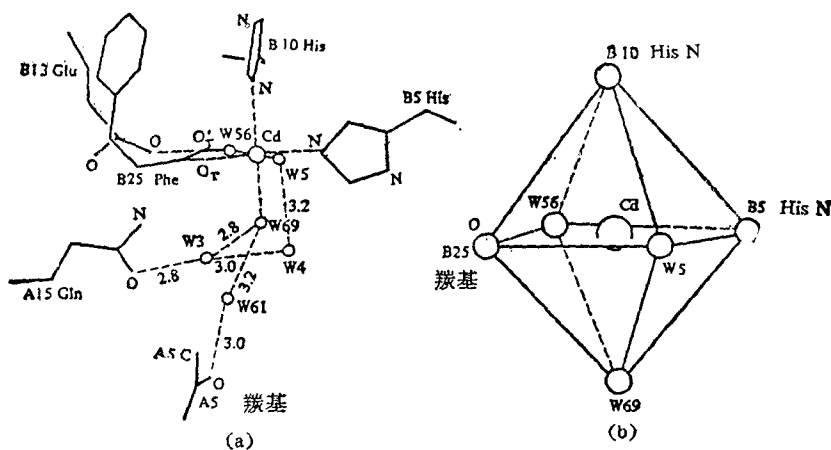


图 4 Cd^{2+} 离子与分子(1)的 ND1 B10, 分子(3)的 NE2 B5, 分子(6)的 OTB 25 及三个水分子配位。 Cd^{2+} 还通过 W_{69} - W_{61} 二水桥与分子(7)的原子相连接^[11]

在微量 (1mmol/L) 的 HgI_2 或 HgAc_2 溶液中会使晶体生长得更好、更大。结构分析结果发现 Hg^{2+} 离子正好位于二重轴上, 与相邻两个分子的二硫桥恰好形成正方形配位, 因而加强了分子间的相互作用。另一个突出的例子是: 摸索硫氧还原蛋白 (*E. Coli* thioredoxin) 的结晶条件长期都没有结果, 直到加入了二价铜离子才获得了成功。后来的晶体结构结果表明铜离子通过与一个分子的 Asp2 及 Asp43 与另一个相邻分子的 Asp10 作用, 将两个二体蛋白分子连接在一起, 形成稳定的层状结构^[12]。

3 其它溶剂分子: 除了水分子外, 还发现结晶液中的一些沉淀剂分子在蛋白质分子结晶的过程中也参与晶格的形成。如 *R. Molishianum* 细胞色素 c ^[2] 晶体中的 NH_4^+ , 它与一个分子的 Glu84 相连又与另一个分子的 Asp105 相连; *Streptomyces griseus* 丝氨酸蛋白酶晶体中的 Na^+ ^[14] 处于四个氧原子来自 D_{123} ,

L_{242} , G_{116} 及两个水分子所形成的八面体中间, 通过共用一条棱(由这两个水分子构成的)的两个八面体将两个蛋白质分子连接在一起。在 β -胰凝乳蛋白酶抑制剂中的 K^+ ^[15] 也有上述类似的情况。同时在这个蛋白分子的晶格中还发现了阴离子 SO_4^{2-} 的存在。特别有意思的是 *Centruroides Sculpturatus* Ewing 蝎神经毒素 Uariant 3^[16] 高分辨率晶体结构对 MPD 的揭示, 发现 MPD 分子处在蛋白质分子中由四个芳香环组成的口袋内, 如图 5 所示, 它的两个羟基朝向分子表面, 和另一个蛋白质分子的 Lys8、Asn33 形成氢键, 就这样 MPD 分子将两个相邻的分子牢牢地抓在一起, 因而对稳定晶格起了重要作用。

4 洗涤剂分子: 膜蛋白是嵌合在磷脂双层中发挥生物学功能的一种脂蛋白, 它们具有相当大的疏水面, 造成在水溶液中结晶的极大困难, 而中性洗涤剂的加入不仅可以改善膜蛋白

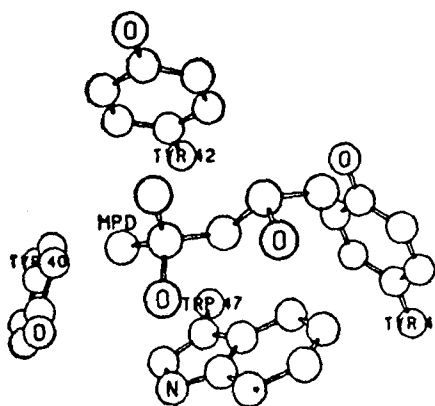


图 5

MPD 分子处于四个芳香环组成的口袋内,它的两个羟基与另一分子的侧链形成氢键

分子在水溶液中的溶解度,而且由于中性洗涤剂分子脂肪链与蛋白质分子疏水面的结合,减少蛋白质分子之间非专一的、无特定几何要求的范德瓦耳作用,增强了有一定取向的极性或氢键作用,以利于规则排列成晶体(图6)。这种添加洗涤剂的方法在光合作用反应中心蛋白质等膜蛋白的晶体生长研究中获得了很大的成功^[18]。

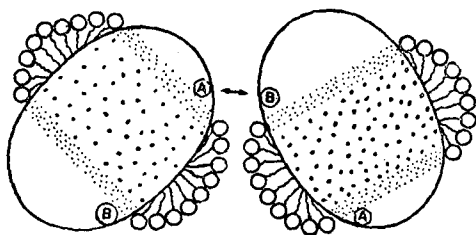


图 6 洗涤剂分子对膜蛋白分子的作用

它封闭了膜蛋白分子的疏水面,使蛋白质分子之间的相互作用局限在非疏水部分,如 A 与 B^[17]

5 蛋白质分子的均一性:蛋白质的纯度对晶体生长的影响至关重要,每当晶体生长遇到困难时,将原料进一步纯化往往能达到较好的效果,这一点已被广泛地接受。根据我们多年工作的经验,仅仅从排除杂质这个角度来理解还不够。有的蛋白质在一级结构水平上的微观不均一性也常常导致结晶失败。例如谷胺酰胺与门冬酰胺的去酰胺产物就是不利于晶体生长的

一个重要因素。猪胰岛素分子中共有六个酰胺基(A₅, A₁₅, A₁₈, B₄ Gln, A₂₁, B₃ Asn),它们很容易从蛋白质分子上掉下来。胰岛素结构研究组曾发现:将猪胰岛素的 HCl 溶液放在 37℃ 保温一周,会产生不少去两个酰胺基的胰岛素,用此原料长出的晶体是发白疏松的,不能用于 X 射线衍射;还发现回收胰岛素也含有大量去两个以上酰胺基团的胰岛素。用这种胰岛素只能长出球状的晶粒,基本上没有衍射能力。根据晶体中分子的堆砌模式和分子之间的相互作用力的要求,这种由于酰胺基的缺损而造成晶体点阵式结构完整性受到严重影响的现象也是可以想象的。

蛋白质的水解作用也会导致分子的微观不均一性,但有时利用限制性水解反而得到能结晶的蛋白质原料。因而近来有人用这种化学修饰方法改进某些蛋白质分子的结晶性能。例如、免疫球蛋白族的蛋白质、骨髓瘤的蛋白质、补体成分 C₃ 等都是在水解断裂后才能结晶的^[19]。

综上所述,蛋白质进行结晶取决于其分子表面的性质,在结晶液中加入的离子和小分子是通过合适的蛋白质分子表面的环境来发挥其作用的,这种环境提供有利的静电相互作用,疏水相互作用和合适的空间配置,这些离子和分子加入到晶格中去,使分子间获得更完美的堆砌和更有利的相互作用,因而促进了晶体生长。

参 考 文 献

- 1 Charles EB. *J Crystal Growth*, 1985; 76: 535
- 2 Skarzynski T *et al J Mol Biol*, 1988; 203:1097
- 3 Skarzynski T *et al. J Mol Biol*, 1987; 193:171
- 4 Salemme F R *et al. J Crystal Growth*, 1988; 90: 237
- 5 Suguna K *et al. J Mol Biol*, 1987; 196: 877
- 6 Wlodawer A *et al. J Mol Biol*, 1987; 193: 145
- 7 Wlodawer A *et al. J Mol Biol*, 1987; 198: 469
- 8 Richard L V, Alexander T. *Biochemistry*, 1973; 12: 4193
- 9 Malcolm D W, Wolfram S. *Eur J Biochem*, 1981; 120: 113
- 10 北京胰岛素结构研究组. *中国科学*, 1974;6:592
- 11 戴金壁等. *中国科学*, 1986; (B)11:1167
- 12 戴金壁等. *中国科学*, 1986; (B)10:1043
- 13 Holmgren A *et al. Proc Nat Acad Sci USA*, 1975;

DNA 指纹图谱法及其应用

刘 德 立

(华中师范大学生物系, 武昌 430070)

提 要

DNA 指纹图谱法是利用卫星 DNA 作探针, 探测不同生物的卫星区, 产生相应的 DNA 指纹图谱的杂交方法。它是八十年代中期发展起来的最新技术。短暂几年, 该法得到迅速发展和完善, 并在法医学、人类遗传学以及鸟类和其它哺乳类的遗传研究中得到广泛应用。

关键词 DNA 指纹图谱, 指纹技术, 卫星 DNA 探针

随着分子生物学的飞速发展, 各种先进技术正在不断涌现和完善, 并在各个领域得到广泛应用。八十年代中期出现的 DNA 指纹技术 (DNA fingerprinting) 就是其中之一。

一、DNA 指纹图谱的发现

在人类染色体中, 含有许多分散的具有串联重复单位的微小卫星区 (minisatellite)。在这些区域中, 由于重复单位的数目不同和重复拷贝数的等位性不同, 所以, 许多卫星区表现出高度多态性 (high polymorphism)^[1-3]。1985 年, Jeffreys 等人发现, 这些区域可通过一种 10—15 个碱基对的核心序列来检测^[3,4]。根据这种核心序列合成的探针能同时检测到许多高度可变的位点 (即卫星区), 产生相应的 DNA 图谱。不同生物, 同一生物的不同品种, 甚至同一品种的不同个体, 其所含卫星区各异。因此, 杂交产生的 DNA 图谱各不相同, 就象人的指纹一样。所以, 把这种具有个体特征和种属特性

的 DNA 图谱称之为 DNA 指纹图谱。这种利用人体卫星区 DNA 作为探针, 探测不同生物的卫星区, 产生相应的 DNA 指纹图谱的杂交方法叫 DNA 指纹图谱法。

二、卫星 DNA 探针的制备

人类卫星 DNA 探针最初由 Jeffreys 小组合成^[3]。他们首先从人肌红蛋白基因的卫星区分离出单一重复单位。该重复单位由 33 对碱基组成。然后, 头尾相接, 再克隆到质粒 pUC13 中, 得到一重组体——PAV 33.7。用限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 同时切割, 产生一个 767 碱基对的插入片段。该片段几乎是 23 个完整的重复单位 (每个重复单位是 33 个碱基对), 如图 1 所示。将人体 DNA 用 Sau 3A 部分消化, 形成 10—20kb 片段, 克隆到噬菌体 λ L 47.1, 构成人的基因库。再用由重组体 PAV 33.7 制备的探针进行筛选。杂交结果表明: 在 3×10^5 个重组体中至少有 40 个从强到弱的杂

72: 2305

- 14 Sielecki A R *et al.* *J Mol Biol*, 1979; 134: 781
- 15 Harry M G. *J Mol Biol*, 1989; 205: 201
- 16 Almassy R J *et al.* *J Mol Biol*, 1983; 170: 497
- 17 Garavito R M *et al.* *J Crystal Growth*, 1986;

76: 701

- 18 Deisenhofer J *et al.* *Nature*, 1985; 318: 618
- 19 Huber R *et al.* *Hoppe-Seyler's, Z Physiol Chem Bd S*, 1980: 1389

[本文于 1989 年 10 月 24 日收到]