

的 RIA 分析结果是相吻合的(表 5)。

Tr-ABS-IFMA 作为一种补充方法,其中 Eu-cDTPA-Avidin 为通用标记物,对于方法的普及是有一定意义的。

TrFIA 使用非同位素标记物,标记方法简便快速。标记物在一定条件下,观察 Eu·IgG 至少可存放 6 个月,保留了原有的生物活性和荧光强度。测量速度快,每测一个样品只需 1s。

总之,TrFIA 优点很多,如能解决仪器的国产化,这是一项很有发展前景的免疫分析技术。

参 考 文 献

- 1 Lipschitz D A *et al.* *The New England J of Med.* 1974; **290** (22): 1214
- 2 Walters G D *et al.* *J clin path.* 1973; **26**: 770
- 3 军事医学科学院放射医学研究所免疫室铁蛋白放免试剂盒
- 4 汪月增等,中国人民解放军军医进修学院学报,1981;2(2): 172

一种工程二硫键设计的计算机辅助程序*

邓巧临 来鲁华 徐筱杰

(北京大学化学系物理化学研究所,北京 100871)

摘 要

通过理论预测蛋白质中潜在的合理突变位点是蛋白质分子设计的一个重要方面。根据目前已知晶体结构的二硫键的立体化学规律,从空间几何关系出发,编制了辅助工程二硫键引入的程序,并对 150 个已知结构的二硫键进行检验,取得了令人满意的结果。

关键词 计算机辅助设计,工程二硫键,立体化学,蛋白质工程

二硫键是蛋白质中广泛存在着的一类共价连接,它对于稳定蛋白质的结构、使其保持正确的构象起重要的作用。通过定点突变技术在天然蛋白质中引入工程二硫键,改善蛋白质的性能,例如提高酶的热稳定性,已成为目前蛋白质工程中一个十分活跃的领域^[1]。人们就此已经进行了一些有益的尝试,例如对枯草杆菌蛋白酶, T4 溶菌酶等引入工程二硫键,取得了一些成功的例子,但也留下了不少失败的记录。如何在实验之前筛选可能的或是较好的突变位点,已成为分子设计中的一个令人关注的问题。

目前,已获得了四百多个蛋白质的晶体结构数据,其中对于二硫键的结构进行统计分析得到了不少立体化学上的规律。根据这些规律,利用计算机模拟来确定合理的突变位点已成为可能^[2-4]。

程序的计算过程为:首先输入原子坐标,通过几何方法产生 S 原子位置,然后对二硫键分级,并检验合理性。

程序需要输入蛋白质的 C_{α} 和 C_{β} 坐标,坐标可以从蛋白质晶体结构数据库(PDB)中获得。对于甘氨酸,由于 β 位的氢原子坐标无法从 X 射线晶体结构中得到,需要通过 C_{α} , C_{β}

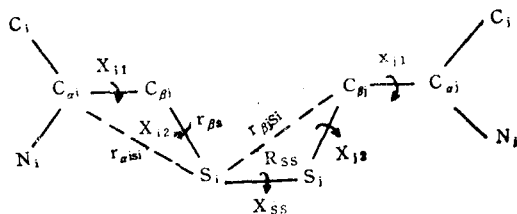


图 1 二硫键几何关系

N 原子位置,根据几何关系确定引入 C_{β} 的位置^[5]。

对于已知蛋白质中的二硫键的立体化学分

1 方法和程序

二硫键的几何关系如图 1 所示。

* “863”蛋白质工程资助项目。

收稿日期: 1991-07-22 修回日期: 1991-10-16

析的结果表明,在形成二硫键的一对半胱氨酸中, $C_{\alpha i}-C_{\alpha j}$, $C_{\beta i}-C_{\beta j}$ 间的距离分布有一定的规律性。 $C_{\alpha i}-C_{\alpha j}$ 距离分布在 $3.8-6.8 \text{ \AA}$ 范围内,在 $5.0 \text{ \AA}$, $5.8 \text{ \AA}$ 和 $6.2 \text{ \AA}$ 处有三个分布高峰。 $C_{\beta i}-C_{\beta j}$ 间距离基本上分布于 $3.5 \text{ \AA}-4.5 \text{ \AA}$ 之间。根据这些规律,选择突变位点时首先计算残基对的 C_{α} 间和 C_{β} 间距离,规定 C_{α} 距离上限为 $6.8 \text{ \AA}$, C_{β} 间距上限为 $4.5 \text{ \AA}$ 。如果残基对 C_{α} 间和 C_{β} 间距均低于上限,则这对残基是潜在的突变位点。

S 原子的位置根据几何关系确定^[4]。计算中采用已知二硫键结构参数的平均值作为标准参数。 S_i 原子位于以 $C_{\beta i}$ 为中心, $r_{\beta s}$ 为半径的球面上,同时也位于以 $C_{\alpha i}$ 为中心, $r_{\alpha i s_i}$ 为半径的球面上。两个球面相交于一个圆。此外, S_i 原子还位于以 $C_{\beta j}$ 为中心, $r_{\beta j s_i}$ 为半径的球面上。第三个球面与上述圆之间有几种可能的位置关系: a. 不相交(无法确定 S 原子位置); b. 相交于一点(少有的情况); c. 相交于两个点(通常的情况)。因此,一般来讲, S_i 有两个位置,同理 S_j 也有两种位置,这样可以获得四种二硫键几何。

在确定了 S 原子的位置之后,程序计算全部可能的二硫键几何的参数 R_{ss} , X_{ss} , X_{i1} , X_{j1} , X_{i2} 和 X_{j2} (见图 1)。然后根据参数进行分级,筛选出较好的突变位点。对于已知蛋白质中的二硫键构象的分析表明: X_{ss} 分布在 90° 附

近; X_{i1} 和 X_{j1} 值聚集在 60° 和 180° 周围; X_{i2} 和 X_{j2} 分布较广,没有明显的规律^[1]。由此规定参数限制为:

$$R_{ss} = 1.6-2.4 \text{ \AA}, |X_{ss}| = 90^\circ \pm 30^\circ$$

$$|X_{i1}| \text{ 或 } |X_{j1}| = 30^\circ-90^\circ \text{ 或 } 150^\circ-180^\circ$$

如果工程二硫键满足上述全部限制,属于 A 类;如果 X_{i1} 或 X_{j1} 不满足限制,划为 B 类;如果 R_{ss} 或 X_{ss} 超出限制或者 S 原子无法定位,则归于 C 类。

引入工程二硫键,是在原有的蛋白质结构基础上更换基团。原子数目可能增多,这样可能会引入过近的非键接触。因此有必要进行合理性检验,挑选出不合理的情况,使得所引入的工程二硫键不仅在二硫键部位构象合适,而且对于整体的蛋白质结构也合理。

2 结果和讨论

程序对一些已知的二硫键进行了验证,以检验程序。所选用的 150 对已知二硫键来自 36 个分辨率较高 ($\leq 2.0 \text{ \AA}$) 的蛋白质晶体结构数据(查自 PDB 库)。在 150 个已知的二硫键当中,模拟得到 A 类的有 124 对, B 类和 C 类各有 13 对。模拟得到 A 类和 B 类结果的共占 91.5%, 并且这些模拟的二硫键的各项参数与实验观测值吻合得很好。例如, 1 CRN 和 2 ALP 的最佳预测值(四个二硫键几何中级别最高的)与实验测定值比较结果列于表 1 之中。

表 1 1CRN 和 2ALP 的模拟结果(M)与晶体结构(O)的比较

PDB 码	二 硫 键	R_{ss}	X_{ss}	X_{i1}	X_{j1}	X_{i2}	X_{j2}	级别
1 CRN	3-40(M)	2.25	-76.5	-45.3	-59.3	-77.2	-74.7	A
	(O)	2.00	-78.8	-51.1	-63.2	-74.6	-75.1	
	4-32(M)	2.25	103.6	-61.4	-49.2	-86.1	-120.6	A
	(O)	2.04	105.6	-64.6	-54.3	-82.8	-118.0	
	16-26(M)	2.20	-87.5	-176.2	-62.8	-90.8	-58.9	A
	(O)	2.05	-86.4	179.5	-65.3	-93.1	-58.0	
2 ALP	42-58(M)	1.94	-78.0	-101.6	-63.7	-163.1	-88.4	B
	(O)	2.03	-88.4	-86.3	-70.2	-156.9	-88.5	
	137-159(M)	2.00	97.8	-57.6	-57.9	-94.0	-89.3	A
	(O)	2.00	102.4	-57.3	-59.2	-96.6	-88.2	
	189-220(M)	2.05	81.9	81.0	-61.9	111.7	-65.6	A
	(O)	2.00	82.8	82.7	-61.6	111.9	-65.6	

表 1 中可以看到,无论是 A 类还是 B 类,模拟的工程二硫键各项立体化学参数与实验观测值都十分相近,这些都是较好的突变位点.图 2 显示了 5PTI 中三个二硫键的模拟结构与晶体结构叠加的图象.

图 2 明显地反映出模拟是相当有效的.

在 13 个模拟为 C 类的二硫键中有 6 个是 S 原子无法固定位置,还有 4 个二硫键是由于 S—S 键长超出了程序规定的上限.在这些例子中,程序找出了正确位点,但未能准确地确定

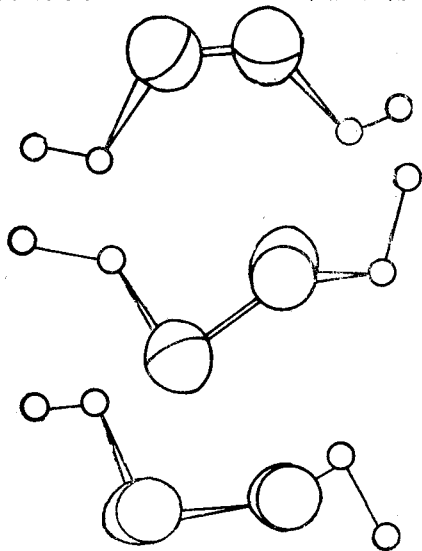


图 2 5PTI 中三个二硫键的模拟结果与晶体结构的比较

S 原子位置,这是因为在程序中采用标准参数,例如 C_β 和 S 间距定为 $1.87 \text{ \AA}$, $C_\alpha C_\beta S$ 键角为 114° . 实际在形成二硫键时,这些参数是略有不同的,个别的甚至偏离较大,因此造成了个别的模拟结果不理想.

目前已在一些天然酶中引入工程二硫键,例如枯草杆菌蛋白酶^[6,7], T4 溶菌酶^[8],二氢叶酸还原酶^[9,10]和核糖核酸酶 T1^[11]等等. 采用程序对这几种酶进行模拟预测,结果发现蛋白质工程所改造的位点的确都是潜在的可引入二硫键的位点,即在野生型蛋白质结构中有关的残基对位置合适,可以引入工程二硫键. 但这些二硫键均为 C 类,划为 C 类的原因有两类,见表 2.

实验结果证明 1SBT、2LZM、4DFR 中所引

表 2 工程二硫键的模拟结果

酶	PDB 码	分辨率	二硫键	C 类原因
枯草杆菌蛋白酶	1SBT	2.5	22-87	$R_{SS} = 2.6$
			24-87	S24 无法定位
T4 溶菌酶	2LZM	1.7	3-97	$XSS > 120^\circ$
二氢叶酸还原酶	4DFR	1.7	39-85	S39 无法定位
核糖核酸酶 T1	1RNT	1.9	24-84	S24 无法定位

入的工程二硫键的结构不同于天然蛋白质中的二硫键,属于新的类型,而且这些二硫键都是立体化学非优化的二硫键,存在固有张力.这或许是几个二硫键的引入没有大幅度改善酶的热稳定性原因之一.

与前三个酶不同,在核糖核酸酶 T1 中 24-84 位引入的工程二硫键大幅度地提高了酶的热稳定性. 在这个蛋白质中,原来已存在两个二硫键(2-10, 6-103), Nishikawa 等人又在 24-84 位引入工程二硫键. 程序预测的结果说明已有的两个二硫键都是 A 类二硫键,并且预测值与实际值吻合得很好. 但 24-84 位的 C_β 间距为 $4.68 \text{ \AA}$,超出了规定的上限,放松限制后找到这对残基确为潜在的突变位点,但 S24 无法定位. 这是由于 Tyr 和 Asn 带有较大的侧链,空阻效应大,致使 S 原子用标准参数无法定位.

值得注意的是: 程序为表 2 中的四个蛋白酶提供了一些较好的突变位点,例如枯草杆菌蛋白酶中 Pro5-Val 8, Val 28-Val 1121, Ile35-Ala92, T4 溶菌酶中 Gly28-Ala63, Arg148-Ala160 等位点,这些残基对位置适宜,突变为半胱氨酸后可以形成立体化学上合适的二硫键,这些位点可供实验工作者参考.

3 结 论

本文根据已知二硫键的立体化学规律引入工程二硫键,程序可在 Micro-VAX II VMS 系统上运行,其优点在于能够迅速地检查各种可能性,筛选出潜在的合理突变位点,为实验工作提供有益的信息. 程序的不足之处是计算中采用了标准参数和刚性蛋白质骨架结构的假定. 从上述的结果可知,这个程序是可行的,预

测结果具有一定的参考价值,可以为实验提供指导,减少实验工作的盲目性。

参 考 文 献

- 1 Srinivasan N, Sowdhamini R, Ramakrishnan C *et al.* *J Peptide Protein Res*, 1990; **36**: 147
- 2 Pabo C O, Suchanek E G. *Biochemistry*, 1986; **25**: 5987
- 3 Hazes B, Dijkstra B W. *Protein Engineering*, 1988; **2**: 119
- 4 Sowdhamini R, Srinivasan N, Shoichet B *et al.* *Protein Engineering*, 1989, **3**: 95
- 5 Altman S L, Rotations. *Quaternions and double groups*. Oxford: Clarendon Press, 1986: 73
- 6 Wells J A, Powers D B. *J Biol Chem*, 1986; **261**: 6564
- 7 Katz B A, Kossiskoff A. *J Biol Chem*, 1986; **261**: 15480
- 8 Wetzel R, Perry L J, Baase W A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 401
- 9 Villafranca J E, Howell E E, Oatley S J *et al.* *Biochemistry*, 1987; **26**: 2182
- 10 Villafranca J E, Howell E E, Voet D H *et al.* *Science*, 1983; **222**: 782
- 11 Nishikawa S, Adiwinata J, Morioka H *et al.* *Protein Engineering*, 1990; **3**: 443

7 种方法提取质粒 DNA 用于序列分析的比较

陈 劲 春

(中国科学院植物研究所,北京 100044)

提 要

对取自同一摇瓶内的菌体,采用 7 种不同提取质粒的方法分离 DNA,将分离的 DNA 做电泳观察、紫外吸收及序列分析,结果表明 CTAB 法具有快速、方便、可行的特点。

关键词 质粒 DNA, DNA 序列分析, CTAB 法

基因序列分析,是了解基因结构和进行 DNA 重组的必需手段之一。自从 Sanger 法和 Gilbert 法被发明并荣获诺贝尔奖以来,已有许多改进,并朝着精确、快速、方便并日趋自动化。目前用于序列分析的 DNA,可使用单链 DNA,亦可使用双链 DNA (质粒);前者可读性好,但是制备单链 DNA 比较麻烦,至少需 3 天时间;采用质粒测序,一般可读 250bp 左右,但制备时间短,对于插入片段不太大的质粒或者无需全部测序的质粒,提取质粒测序显然省时省事。提取质粒的方法已有多种,究竟哪一种方法比较实用,本文旨在这一目的进行实验。结果表明,CTAB 法^[1]具有快速、方便、可读性较好的特点。

1 材 料 和 方 法

1.1 质粒 pSbl 82, 自建^[2];载体为 pUC 119, 插入一段 2.1 kb Hind III 蓝藻 (*Anac-*

ystis nidulans 6301) 的染色体 DNA。

1.2 细菌培养 受体菌为 JM 109, 培养基为 2×YT; 挑选单一菌落接种于 2ml 培养液, 300r/min, 37℃ 过夜; 第二天扩增至 100ml, 氨苄青霉素浓度为 50μg/ml; 第三天上午停止培养, 分别依次从摇瓶里移出 5ml 培养液到已标明 2—7 号码的 eppendorf 管, 按方法 2—7 的具体步骤提取质粒。剩余的菌液按方法 1 进行分离质粒 DNA。

1.3 提取质粒方法 方法 1. 碱性粗提^[4], 再通过 Sephacryl S-1000 柱; 方法 2. CTAB 法; 方法 3. DEPC 法^[3]; 方法 4. QIAGEN tip 法 (简称 QT, 见 Instrument in Kit); 方法 5. 碱性粗提, 再用 QT 法; 方法 6. 碱性粗提, LiCl 沉淀 RNA 再过 QT; 方法 7. 碱性粗提, LiCl 沉淀 RNA 再过 DE-52 柱。