

蛋白质和磷脂酶 A₂ 等电点的理论预测

郝军山 冯晓勇 袁静明

(山西大学分子科学研究所, 太原 030006)

提 要

应用计算数学方法计算了胰岛素等 9 种蛋白质的等电点, 结果表明计算值同实验测定值比较吻合, 二者间的差异不显著 ($P > 0.05$)。同时还预测了 49 种磷脂酶 A₂ 的等电点。这一预测结果不仅对这类酶的分离纯化有一定参考价值, 也有助于了解磷脂酶 A₂ 同功酶的性质。

关键词 等电点预测, 蛋白质, 磷脂酶 A₂

等电点 (pI) 作为蛋白质的一个理化指标, 在蛋白质化学、酶学、蛋白质晶体学的理论研究和实践工作中都具有十分重要的意义。然而, 迄今为止几乎所有已知生物大分子的 pI 都是通过等电聚焦、层析聚焦^[1]等实验测定的, 因受测定条件(如离子强度、温度等)的影响, 即使对同一种蛋白质而言测定结果也各异。我们应用一个经过改进的数学模型, 根据蛋白质的氨基酸组成, 借助自行设计的计算机程序求解, 可以实现对蛋白质 pI 的预测^[2]。从思想方法上看, 预测法不过是一种外推, 但这类预测结果有助于指导进一步的研究工作, 尤其在缺乏实验测定等信息之情况下, 预测仍不失为一种方便、迅速的测试手段。

磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂ EC3.1.1.4, 简称 PLA₂) 是一类热稳定、亲脂而依赖钙的蛋白酶, 因其特异的化学结构和复杂的生理功能使之成为研究脂代谢、生物膜磷脂结构和酶系、脂蛋白间相互作用, 以及有关凝血与溶血机制等方面的重要工具酶。因此, PLA₂ 业已成为蛇毒研究领域里十分令人瞩目的对象。迄今已知其一级结构的 PLA₂ 约有 50 多种^[3], 但有关 PLA₂ 等电点的研究报道甚少。所以, 本文给出的关于 49 种 PLA₂ 等电点的预测结果, 对了解 PLA₂ 同功酶的性质及其分离纯化工作有一定

参考价值。

1 材料与 方法

预测蛋白质 pI 的原理与方法, 见文献[2]。49 种 PLA₂ 的氨基酸组成分析, 见文献[4]。

2 结果与 讨论

有关胰岛素等 9 种蛋白质 pI 的理论计算结果、同相应实测值之比较结果以及关于 49 种 PLA₂ 的 pI 预测结果见表 1。

由表 1 可见, 应用计算数学方法预测胰岛素等 9 种蛋白质和酶的 pI, 计算值同实测值吻合较好, 二者间的误差不显著 (t 检验, $P > 0.05$)。就 49 种 PLA₂ 的 pI 预测而言, 本文作者仅查询到 9 种 PLA₂ 的 pI 实测值。可以看出, 10, 11, 51, 55, 57 和 58 号样品 pI 预测值同实测值吻合较好, 而 49, 50 和 56 号样品的 pI 预测值同实测值偏差较大。究其原因可能有三: a. 由于目前尚未获得这 3 种 PLA₂ 的空间结构数据, 我们推测其空间结构内核可能有相当数量的带负电荷的可解离基团, 形成一个亲水内核 (有别于大多数蛋白质分子的疏水内核!) 遂使 pI 实测值显著高于 pI 理论计算

表 1 某些蛋白质等电点的理论预测

样品编号	(文献)	可解离基团及其含量(个数/每样品分子)									氨基酸 总数	pI	
		α -COOH	Asp	Glu	Cys	Tyr	α -NH ₂	His	Lys	Arg		计算值	实测值
1	(4)	2	0	4	6	4	2	2	1	1	51	5.34	5.3
2	(4)	1	4	2	0	5	1	1	0	4	59	4.78	4.6
3	(5)	1	1	3	6	5	1	0	6	4	58	10.23	10.0
4	(6)	1	3	8	2	5	1	3	18	2	104	10.31	10.7
5	(6)	1	5	5	8	6	1	4	10	4	124	9.70	9.5
6	(7)	1	6	4	8	11	1	6	3	12	240	9.71	9.5
7	(8)	1	8	5	10	4	1	2	14	4	245	9.87	9.5
8	(9)	1	9	5	0	13	1	5	9	4	274	6.61	6.7
9	(10)	1	43	51	6	12	1	10	51	9	489	4.63	4.4
10	(11)	1	5	5	14	9	1	1	19	3	122	10.16	10.3
11	(12)	1	6	5	14	9	1	1	19	3	122	10.10	10.2
12	(13)	1	7	6	14	8	1	3	19	4	122	10.06	
13	(13)	1	7	6	14	9	1	1	13	4	123	9.49	
14	(14)	1	11	5	14	9	1	1	10	6	122	7.11	
15	(15)	1	10	4	14	10	1	2	14	5	121	9.60	
16	(16)	1	8	19	14	8	1	2	7	5	123	4.72	
17	(17)	1	9	7	14	13	1	2	7	5	122	4.95	
18	(18)	1	10	8	14	8	1	2	6	4	122	4.43	
19	(19)	1	7	2	14	8	1	2	15	2	120	9.96	
20	(20)	1	11	3	14	9	1	1	6	5	119	4.82	
21	(20)	1	10	4	14	9	1	1	5	5	120	4.64	
22	(20)	1	9	3	14	9	1	1	5	5	119	5.07	
23	(20)	1	10	3	14	9	1	1	5	6	119	5.10	
24	(20)	1	9	2	14	9	1	1	6	5	119	7.09	
25	(20)	1	9	2	14	9	1	3	4	6	119	6.33	
26	(20)	1	10	2	14	9	1	3	8	6	118	9.05	
27	(20)	1	7	5	14	9	1	3	7	4	118	6.34	
28	(20)	1	7	1	14	9	1	3	10	5	119	9.88	
29	(21)	1	11	3	14	9	1	1	10	4	118	7.10	
30	(21)	1	7	1	14	9	1	3	10	6	118	9.97	
31	(21)	1	6	3	14	9	1	1	5	4	116	7.09	
32	(21)	1	8	3	14	9	1	2	5	5	119	6.09	
33	(21)	1	10	4	12	10	1	2	8	3	117	5.11	
34	(21)	1	10	9	14	8	1	2	6	4	122	4.38	
35	(22)	1	6	5	8	8	1	6	11	6	128	9.88	
36	(22)	1	10	11	10	7	1	4	7	3	142	4.46	
37	(22)	1	9	7	15	8	1	2	7	5	122	4.95	
38	(22)	1	9	8	16	8	1	2	6	5	122	4.65	
39	(22)	1	9	10	14	8	1	2	8	4	123	4.61	
40	(22)	1	9	6	14	8	1	3	9	4	125	5.87	
41	(22)	1	9	5	14	7	1	2	12	2	124	7.25	
42	(22)	1	9	4	13	9	1	4	8	6	123	8.52	
43	(22)	1	7	5	14	9	1	2	7	3	122	5.51	
44	(22)	1	7	1	13	9	1	3	10	5	123	9.89	
45	(22)	1	7	3	14	13	1	2	8	5	123	9.23	
46	(22)	1	10	4	14	12	1	2	10	7	123	9.24	
47	(22)	1	10	4	14	10	1	3	11	5	123	9.01	

续表

样品编号	(文献)	可解离基团及其含量(个数/每样品分子)									氨基酸 总数	pI	
		α -COOH	Asp	Glu	Cys	Tyr	α -NH ₂	His	Lys	Arg		计算值	实测值
48	(22)	1	5	1	4	1	1	2	1	1	39	4.34	
49	(23)	1	17	10	12	9	1	2	8	6	124	4.26	7.6
50	(24)	1	14	9	14	8	1	2	7	8	123	4.57	10.4
51	(25)	1	14	9	14	9	1	1	8	6	135	4.39	4.15
52	(25)	1	15	10	14	9	1	1	16	5	135	4.99	
53	(25)	1	19	9	12	7	1	2	11	9	132	4.65	
54	(25)	1	15	10	11	6	1	2	17	6	136	5.70	
55	(26)	1	14	6	14	9	1	2	18	6	121	9.46	9.3
56	(26)	1	16	5	14	9	1	1	9	6	121	4.57	6.9
57	(26)	1	14	6	14	10	1	2	17	6	126	9.25	10.0
58	(26)	1	17	12	16	9	1	1	8	4	126	4.02	4.0

注: 首列数字 1—58 分别指不同的蛋白质样品。

1: 胰岛素; 2: 表皮生长因子 (EGF); 3: 抑肽酶; 4: 人细胞色素 C; 5: 牛 RNase; 6: 弹性蛋白酶; 7: 胰凝乳蛋白酶原; 8: 枯草杆菌蛋白酶; 9: 蛋白质二硫键异构酶, 10, 11: 分别为烙铁头蛇 *T. flavoviridis* 碱性蛋白 II, 碱性蛋白 I; 12, 13: 分别为 *A. piscivorus piscivorus* Lys-49; *A. piscivorus piscivorus* Asp-49; 14—16: 均来自烙铁头蛇, 分别为 14: *Trimeresurus flavoviridis*; 15: *T. flavoviridis* PL-X; 16: *T. okinavensis*; 17: 响尾蛇 *Crotalus adamanteus*; 18: 菱斑响尾蛇 *Crotalus atrox*; 19: 巨蝰 *Bitis caudalis*; 20—28 均来自眼镜蛇, 分别为 20: *N. naja naja*; 21: *N. naja atra*; 22: *N. naja kaouthia* CM-III; 23: *N. naja kaouthia* CM-II; 24: *N. naja oxiana* E3; 25: *N. melanoleuca* DE-III; 26: *N. melanoleuca* DE-I; 27: *N. melanoleuca mossambica* CM-I; 28: *N. melanoleuca mossambica* CM-II; 29: 中性 PLA2 (III); 30: 碱性 PLA2; 31: 金环蛇 *Bungarus multicinctus*; 32: 眼镜蛇 *Naja melanoleuca* DE-II; 33: 巨蝰 *Bitis gabonica*; 34: 菱斑响尾蛇 *Crotalus atrox*; 35: 蜜蜂 *Apis mellifera*; 36: 壁虎 *Heloderma suspectum*; 37: 响尾蛇 *Crotalus adamanteus*; 38: 西部菱斑响尾蛇 *Western Crotalus atrox*; 39: 烙铁头蛇 *T. okinavensis*; 40: 来自猪 *Sus scrofa*; 41: 来自牛 *Bos taurus*; 42—44: 均来自眼镜蛇, 分别为 42: *Hemachatus haemochatus*; 43: *Naja mossambica mossambica*; 44: *Naja mossambica pallida*; 45: 海蛇 *Laticauda semifasciata*; 46: 裂颊海蛇 *Enhydrina schistosa*; 47: 虎蛇 *Otechis scutatus*; 48: 墨西哥蜥蜴 *Mexican Heloderma horridum*; 49, 50: 分别为福建圆斑蝰蛇 *Vipera russelli siamensis* 毒性 PLA2, 碱性 PLA2; 51—54: 分别为圆斑蝰蛇 *V. russelli* PLA2 III-3, III-6, III-10, I; 55, 56: 分别为浙江蝮蛇短尾亚种 *Agkistrodon halys brevicaudus* 碱性 PLA2, 毒性 PLA2; 57, 58: 分别为蝮蛇日本亚种 *A. halys blomhoffii* PLA2-I, PLA2-II。

值; b. 这 3 种 PLA₂ 可能为结合蛋白, 带有某些辅基其中包含相当数量的带负电荷的可解离基团, 而本文计算并未考虑这些可能存在的带电基团, 所以 pI 计算值偏低似在意料之中; c. 因为迄今彻底阐明其一级结构的 PLA₂ 为数不多, 则对这些 PLA₂ 氨基酸组成分析结果的准确性给 pI 预测值带来的影响不容忽视。这里可以胰岛素为例来说明这一问题, 可解离带电基团数目之较小变化引起胰岛素 pI 预测值的改变见表 2。由表 2 可见, 除 Cys, Tyr 外其他可解离带电基团在数目上增加或减少 1 个, 引起胰岛素 pI 预测值的改变极其显著 (t 检验。P < 0.001)。此外, 由表 2 还可看出各解离基团对蛋白质 pI 贡献的大小次序: a. 酸性可解离基团: α 羧基 > Asp > Glu > Tyr > Cys;

表 2 可解离带电基团含量变化对胰岛素 pI 预测值的影响

可解离基团	可解离基团含量变化		
	-1	+1	+2
α -COOH	+0.711007	-0.564368	
Asp	—	-0.518951	
Glu	+0.698210	-0.469904	
Cys	+0.000003	-0.000002	
Tyr	+0.000012	-0.000011	
α -NH ₂	-0.576264	+0.705875	
His	-0.549030	+0.440937	
Lys	-0.576434	+0.712034	
Arg	-0.576435	+0.712046	
α -COOH }*	-0.004050	+0.003947	+0.007795
α -NH ₂ }			

* α -COOH 和 α -NH₂ 同时增、减相同数目。b. 碱性可解离基团: Arg > Lys > α 氨基 >

His. 表 2 还表明,即使不了解蛋白质由几条肽链构成,由于 α 羧基和 α 氨基对 pI 的贡献大致相当,它们在含量上的相同增、减引起 pI 预测值的改变不显著 (t 检验, $P > 0.05$), 则应用我们的模型预测蛋白质 pI 与实测 pI 不会产生较大偏差。

有关蝮蛇蛇毒中三型 PLA_2 同功酶的 pI 实验测定结果分别为: 酸性 4.15—4.9, 中性 6.9 左右,碱性 8.7—10^[27]。尽管由于 PLA_2 结构上的特异性,种属间 PLA_2 同功酶的 pI 尚有一定差异,但基本上可据此将表 1 中 49 种 PLA_2 按上述三型划分开。值得特别指出的是福建圆斑蝥蛇 (*Vipera russelli siamensis*) 碱性 PLA_2 (50 号样品)其 pI 预测值为 4.57, 似应归入酸性 PLA_2 , 这一推断可与李跃生等认为它与文献报道的碱性 PLA_2 在生理效应上不属同一类型的论断相互印证^[25]。

PLA_2 同功酶家族庞大,还有继续扩大的趋势。本研究给出的预测结果有助于了解 PLA_2 同功酶的性质。

参 考 文 献

- 1 Stuyterman L A A, Wizenens J. *J Chromatogr*, 1978; **150**: 31
- 2 冯晓勇, 郝军山, 袁静明. 山西大学学报(自然科学版), 1991; **14**: 176
- 3 Verheij H M, Slotboom A J, De Haas G H. *Rev physiol Biochem Pharmacol*, 1981; **91**: 91
- 4 沈孝宙等. 激素的生物化学. 北京: 科学出版社, 1983: 85—86
- 5 华东化工学院主编. 生化药物(药品集)第七分册, 上海: 上海科学技术出版社, 1984: 82
- 6 沈 同等. 生物化学(上册), 北京: 人民教育出版社, 1980: 98—134
- 7 Blackburn S. *Enzymology*. Vol 3 (*Enzyme structure and function*), New York: Marcel Dekker Inc, 1976: 11—164
- 8 Lehninger L. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers, 1982: 125
- 9 Croft L R. In: *Handbook of Protein sequence analysis*. 2nd ed, Wiley: Chichester, 1980: 215—221
- 10 Fdman J C, Ellis L, Blacher R W. *Nature*, 1985; **317**: 267
- 11 Liu S Y, Yashizumi K, Oda N *et al*. *J Biochem*, 1990; **107**: 400
- 12 Yoshizumi K, Liu S Y, Miyata T *et al*. *Toxicon*, 1990; **28**: 43
- 13 Maraganore J M, Heinrichson R L. *J Biol Chem*, 1986; **261**: 4797
- 14 Tanaha S, Mohri N, Kihara H *et al*. *J Biochem*, 1986; **99**: 281
- 15 Kini R M, Kawabata S, Iwanaga S. *Toxicon*, 1986; **24**: 1117
- 16 Joubert F J, Haylett T. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 1981; **362**: 907
- 17 Heinrichson R L, Krueger E T, Keim P S. *J Biol Chem*, 1977; **252**: 4913
- 18 Randolph A, Sakmar T P, Heinrichson R L. In: Liu T Y *et al*, eds, *Frontiers in protein chemistry*. Amsterdam: Elsevier North-Holland, 1980: 297—322
- 19 Viljoen C C, Botes D P, Kruger H. *Toxicon*, 1982; **20**: 715
- 20 Davidson F F, Dennis E A. *Biochim Biophys Acta*, 1990; **1037**: 7
- 21 Liu C S, Len H-L, Chang C S. *Int J Pept Protein Res*, 1989; **34**: 257
- 22 Francoise G. *Eur J Biochem*, 1989; **186**: 22
- 23 徐光涛, 冉永禄, 张耀时等. 动物学研究, 1981; **2** (增刊): 9
- 24 李跃生, 刘广芬, 王晴川等. 生物化学与生物物理学报, 1985; **17**: 607
- 25 Teng C M *et al*. *Biochim Biophys Acta*, 1984; **786**: 204
- 26 武祥福, 陈远聪. 动物学研究, 1981; **2** (增刊): 13
- 27 陈远聪, 袁士龙编. 中国生物化学会专题讨论会文集(4), 毒素的研究和利用, 北京: 科学出版社, 1988: 68—73