

用浸泡法制备生物大分子晶体重原子衍生物的研究

王家槐 楼美珍 游俊明 桂璐璐

(中国科学院生物物理研究所)

蛋白质晶体学经过二十多年的发展,日趋成熟。一百多个蛋白质和几个转移核糖核酸分子的极其复杂的三维结构已被测定,另有二、三个球状植物病毒粒子的空间结构已被深入研究。随着计算机技术在收集、处理衍射数据直到建立、分析分子三维模型等各个环节的深入应用,国内外普遍认为,获得好的生物大分子单晶体及其重原子衍生物,越来越成为测定晶体结构的主要难关。本文报道我们用浸泡法制备重原子衍生物方法的研究。

一、重原子衍生物晶体的比重变化与其衍射强度变化的相关性

用浸泡法制备生物大分子晶体的重原子衍生物,是利用生物大分子晶体内一般含有 30—78% 的母液相^[1],使重原子化合物由外界扩散入晶格内,与生物大分子适当部位结合,使得衍射强度发生变化,用以推算测定晶体结构必需的相角。对于中等分子量的生物大分子,由于重原子的结合,晶体比重可有百分之几的增值。浸泡所用重原子试剂的浓度通常在百分之一克分子以下,故重原子在母液相内无序分布引起的晶体比重增值仅千分之几。可见晶体比重增值主要来自进入晶格的重原子。用煤油-溴苯密度梯度比重柱,以碘化钾溶液标定的方法测晶体比重^[2],误差一般在 0.003 克/厘米³以内。所以,测定晶体的比重变化,可用来对重原子进入晶格与否作初步判断。晶体在浸泡过重原子溶液后无比重变化者,不可能有有效的重原子结合。故用此法可免去费事的 X-射线衍射鉴定。

重原子进入晶格后,所引起的比重增值与衍射强度的变化量有相关性。图 1 为 0.01M 乙

表 1 乙酸铅溶液浸泡胰岛素晶体的时间与衍射强度变化的关系

衍射点	F_P^2	F_{HP}^2 (1 小时)	F_{HP}^2 (2.5 小时)	F_{HP}^2 (5 小时)	F_{HP}^2 (三天)
292	11862	11862	11862	11861	11290
6150	10100	627	450	12911	12757
581	3989	4562	3975	9588	10735
041	4954	39603	38394	16555	12737
0131	8302	17830	17783	6193	4249
4191	4940	6739	6399	1915	2553
9101	6636	12744	12192	6159	6765
11201	11717	1551	1832	11852	12561
1781	8979	2764	3091	16057	17868
2081	8131	4391	5019	17541	17383
322	4547	4084	5011	12082	14302
3195	7526	3159	3538	3614	4670

注: 1. 浸泡条件: $Pb(AC)_2 \cdot 10^{-2}M$ pH5.6
2. F_P^2 为胰岛素母体的衍射强度, F_{HP}^2 为浸泡不同时间后晶体的衍射强度。

酸铅溶液浸泡胰岛素三方二锌晶体的时间曲线,表 1 则给出该晶体部分衍射点强度变化量的时间相关性。可以看出,浸泡五小时后,比重增值率已达 70% 以上,而衍射强度已接近浸泡三天后的饱和量。浸泡一小时后晶体的衍射强度的变化方向与浸泡三天后很不相同,这可能是由于铅离子优先占有某一个结合点所造成的。故晶体的比重增值又有助于判断重原子进的。

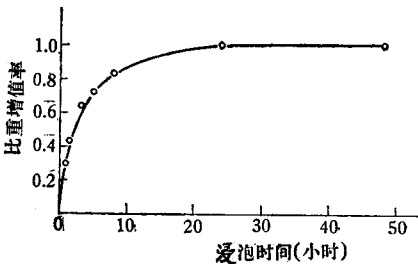


图 1 Pb^{++} 浸泡时间曲线
胰岛素晶体在 $10^{-2}M$ 乙酸铅溶液中 (pH5.6) 浸泡

入晶格的过程。

晶体比重增值与衍射强度变化的平行比较,可用来判断重原子衍生物晶体的质量,有的衍生物比重变化很大,而衍射强度的变化却不大,这是由于重原子在晶体内结合位点多,分布分散,但每个位点的占有率却不高的缘故。以胰岛素三方二锌晶体为例,母体比重为 1.241 克/厘米³, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{HgCl}$ 衍生物为 1.279 克/厘米³, $\text{NH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}(\text{OCH}_3)\text{CH}_2\text{HgCl}$ 衍生物为 1.293 克/厘米³, 第二个衍生物比重变化大,但衍射强度的变化却远不如第一个衍生物。事实上,第一个衍生物晶体内,一个胰岛素分子只结合一个汞化物,占有率很高,第二个衍生物晶体内,一个胰岛素分子至少结合了两个汞,占有率却相对低。另一种情况,衍生物晶体比重并无显著变化,衍射强度却变化很大,这多半是同晶度不好的一种征兆。

我们认为,晶体比重的测定,是较迅速而简便的筛选重原子衍生物、考察衍生物质量好坏的有效方法之一。

二、两种络合机制与两种浸泡特点

在绝大多数情况下,重原子试剂通过扩散进入晶格是一个络合过程。Blundall 和 Johnson 把能与蛋白质分子结合的重原子分为“软”与“硬”两类^[3],我们则倾向于用共价络合和电价络合的概念。过渡元素原子,尤其是半满以上 d 电子轨道的重金属元素,有强烈的与蛋白质侧链基上的氧、硫、氮共价配位的倾向,其中汞、铂金属已成功的广泛应用。另一类如铅以及一些镧系元素如钐、钕等不属此例,它们通常以正离子形态与蛋白质的羧基、以及核酸分子的磷酸根形成电价络合。共价络合与电价络合最显著的区别,是前者较后者稳定,结合力强。下面我们以乙基氯汞-胰岛素衍生物与乙酸铅-胰岛素衍生物为例,考察其络合几率及浸泡特点。

共价络合的络合常数大,故重原子试剂在浸泡溶液内的浓度不需很高, 1×10^{-4} — $5 \times 10^{-3}M$,即足以达到络合平衡,由于浓度稀,一

般要浸泡一周以上,以利充分平衡。图 2 为乙基氯汞的浸泡曲线。相比之下,电价络合试剂在浸泡溶液内的浓度需要较高,一般在 $1 \times 10^{-3}M$ — $1 \times 10^{-2}M$ 。图 3 为乙酸铅的浸泡曲线,在浓度达到 $0.1M$ 数量级时,晶体内无序分布铅离子对比重的贡献已不可忽略,所以曲线比较平缓的斜率继续上升。由于浓度高,达到平衡所要求的时间就短。图 1 已显示,一天之内即

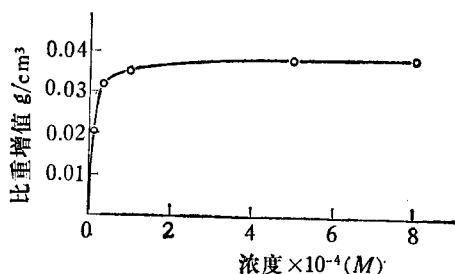


图 2 乙基氯汞浸泡浓度-晶体比重增值曲线

胰岛素晶体在不同浓度乙基氯汞溶液 (pH6.4) 浸泡一周

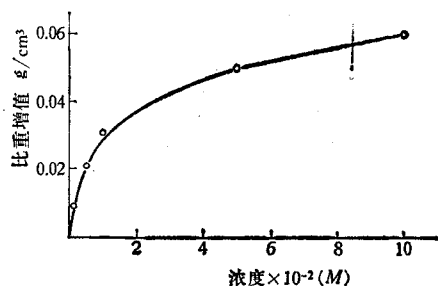


图 3 乙酸铅浸泡浓度-比重增值曲线

胰岛素晶体在不同浓度乙酸铅溶液 (pH5.6) 浸泡三天

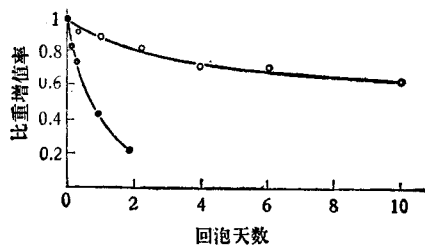


图 4 乙基氯汞和乙酸铅的回泡行为

●—— 胰岛素晶体在 $8 \times 10^{-4}M$ 乙基氯汞溶液 (pH6.4) 浸泡 8 天后,在 pH6.3 空白缓冲液中回泡。

○—— 胰岛素晶体在 $10^{-2}M$ 乙酸铅溶液 (pH5.6) 泡三天后,在 pH5.6 空白缓冲液中回泡。

达平衡。图 4 则为两个衍生物的回泡曲线,即将衍生物晶体回泡到空白缓冲液,进行洗脱,它清楚地显示乙基氯汞不易洗脱,它们与胰岛素的结合要比铅牢得多。

胰岛素分子 $1.8 \text{ \AA}$ 分辨率结构模型^[4]显示,距汞原子最近的是胰岛素分子 B 链第十位组氨酸咪唑环上的 N^{δ_1} ($2.2-2.5 \text{ \AA}$),在共价键范围内^[5],参与配位的还有来自胰岛素二聚体另一分子的 B_9 丝氨酸残基的 O^{γ} ($2.5-2.8 \text{ \AA}$),基本在离子键范围内^[6,7]。已知有机汞倾向于形成直线型共价络合物 $R-Hg^+ \cdots X$ (R 为有机基团, X 为共价配体),而与此直线垂直的方向常常有负离子存在^[5,7]。这是与我们观察到的络合几乎一致的。与此相对应,所有三个铅离子在晶体中全分布于羧基附近。其中 Pb_1 位于胰岛素二聚体内两个 B_{13} 谷氨酸残基的自由羧基的 O^{δ_2} 之间,距离最短处 $1.7 \text{ \AA}$,甚至短于 $Pb-O$ 共价键 ($2.0-2.5 \text{ \AA}$)^[8]。显然,当这个铅离子进入该空间时,这两个残基要发生位移才行,之所以会发生这种现象可能由于 Pb_1 距三重轴太近,使三个与对称轴相关联的铅离子,彼此相排斥的缘故,另两个铅离子位于六聚体表面,都在与羧基成离子键的范围内。

上述配位环境以及重原子浸泡行为的研究,是与两种络合机制的分析一致的。这里,我们还要提一下另两种应用很广泛的铂和铀, Dicherson 等人发现^[9],铂类化合物经常出现在甲硫氨酸残基或胱氨酸残基的硫原子;或是组氨酸残基的氮原子附近,浸泡浓度一般也较低,显然是共价络合。事实上,甲硫氨酸和胱氨酸并不带电荷,故不可能是电价络合。铀比较特殊,Blake 认为^[10],铀与氧有异常的亲和力,铀氧系化合物进入蛋白质晶体,它作为一个无机络离子,其个别配体有可能为蛋白质侧链基上的氧所取代,从而与蛋白质结合。我们的结果支持这种说法, UO_2F_2 进入胰岛素晶体,都分布在羧基氧附近,而且挨得很近。

了解不同种类试剂的浸泡行为,对于寻找重原子衍生物,摸索合适的浸泡条件显然是很有用的。

三、调节重原子试剂浸泡行为的一个途径

迄今为止,在蛋白质晶体学中,应用最广泛的重金属元素是汞,它不仅原子序数大,反常散射效应也大,又可以生成很多稳定的有机汞化合物,而且它还有很强的形成共价络合物的能力。在对胰岛素络合的情况下,即使用浓度低达 $1 \times 10^{-5} M$ 的乙酸汞溶液浸泡,晶体也很快碎裂,可见 Hg^{++} 与该晶体作用剧烈。如用不同类型的有机汞化物 $R-Hg^+$ 去浸泡 (R 代表有机基团),则有相当一部分可引起不同程度的衍射强度变化,而不破坏晶体。Watson 等人^[11]曾讨论过有机基团的极性及其大小、形状对于试剂进入蛋白质晶体的效应,我们则进一步研究了有机基团的吸电子性或推电子性,对汞离子络合能力的影响。我们设想,有机基团的吸电子性越强,使 $R-Hg^+$ 内的汞离子正电性越强,它接受配体原子上孤对电子形成共价络合的能力也越强。蒋明谦等人曾对有机基团的诱导效应在 σ 键上的传递作了系统的研究,提出了诱导效应指数的定量概念^[12]。从他们提供的参数,我们发现,氯代甲基氯汞 ($ClCH_2HgCl$) 与乙基氯汞 (CH_3CH_2HgCl) 相比,分子大小几乎一样,而由于氯的负电性在 σ 键上的传递, $ClCH_2-$ 的诱导效应指数 (40.2×10^{-3}) 比 CH_3CH_2- 的指数 (-12.4×10^{-3}) 大得多,我们由此预言, $ClCH_2Hg^+$ 应比 $CH_3CH_2Hg^+$ 有更强的正电性,它接受配体原子的孤对电子形成共价络合的能力更强。在同样的条件下,用这两种试剂去浸泡胰岛素三方二锌晶体, $ClCH_2Hg^+$ 引起晶体比重和衍射强度的变化都要比 $CH_3CH_2Hg^+$ 大得多见表 2, $ClCH_2Hg^+$ 在晶体中不仅以更高的占有率占有了相当于 $CH_3CH_2Hg^+$ 所占有的两个位置,而且以相当高的占有率占有了另外两个位置。这个结果很好的证实了我们的设想。这给我们提供一个途径,即选择不同诱导效应指数的有机基团,来调节 $R-Hg^+$ 型化合物中汞的结合能力,从而获得较理想的重原子衍生物,甚至提供几个衍生物。

表 2 乙基氯汞与氯代甲基氯汞浸泡效应比较

	比重(克/厘米 ³)	重原子位置	占有率(电子数)	$\frac{\sum \Delta F }{\sum F_P }$
乙基氯基-胰岛素	1.279	Hg _I	45.9	0.36
		Hg _{II}	30.1	
氯代甲基氯基-胰岛素	1.321	Hg _I	69.2	0.69
		Hg _{II}	47.9	
		Hg _{III}	57.0	
		Hg _{IV}	45.6	

注: 1. 此处所引参数均系 2.5 Å 分辨率的修正结果;
2. $\sum|\Delta F|/\sum|F_P|$ 系取 2.5 Å 分辨率 hko 型 171 个衍射点统计结果, F_P 表示母体结构振幅。 $\Delta F = F_{HP} - F_P$, 其中 F_{HP} 表示衍生物结构振幅。

当然,试剂中有机基团的作用是多方面的,不能单用碳-汞键的诱导效应来解释一个试剂的浸泡行为。

伍伯牧、窦士奇同志曾协助部分衍射实验,谨此致谢。

(上接第 62 页)

记 Hela 细胞,可以得到一些 [³⁵S]Met 标记所发现不了的斑点,可见利用不同标记方法进行细胞内蛋白组分的研究仍有潜力可挖。

从目前已有的资料来看,体细胞内蛋白质两向凝胶电泳图谱的测定,所提供的信息是多方面的:首先是可以测定组织中蛋白质的种类、数量,并可对它们进行定位和定量。其次是利用 [³⁵S]Met 及其它放射性标记法如 [¹⁴C]Sev、 [¹⁴C]Ala 等,可测定不同组分的磷酸化和糖苷化情况,以及这些变化的半衰期;除此以外还可以跟踪体细胞在转化、分化、或激素反应过程

参 考 文 献

[1] Matthews, B. W.: *The Proteins*, New York, Academic Press, 3nd. ed., 2, 476, 1976.
[2] *International Table For X-Ray Crystallography*, 2nd. ed., Kynoch Press, 3, 1968.
[3] Blundall, T. L. et al.: *Protein Crystallography*, Academic Press, 182, 1976.
[4] 北京胰岛素结构组:《中国科学》1974 年第 6 期,第 591 页。
[5] Canty, A. J. et al.: *J. Chem. Soc. Dalton*, 2018, 1976.
[6] Hiroaki, S. et al.: *J. Organometal. Chem.*, 120, 161, 1976.
[7] Taylor, N. J. et al.: *J. Chem. Soc. Dalton*, 438, 1975.
[8] Wyckoff, R. W. G.: *Crystal Structure*, 2nd. ed., Interscience Publishers, 1, 135, 1963.
[9] Dickerson, R. E. et al.: *J. Mol. Biol.*, 45, 77, 1969.
[10] Blake, C. C. F.: *Advances in Prot. Chem.*, Academic Press, 23, 59, 1968.
[11] Watson, H. C. et al.: *J. Mol. Biol.*, 8, 166, 1964.
[12] 蒋明谦等,《化学学报》1962 年第 28 期,第 275 页。

[本文于 1980 年 3 月 18 日收到]

中,细胞内蛋白质组分的变化,从而为探讨转化、分化和激素反应中,各蛋白质组分在体细胞基因表达和调控中所起的作用提供信息。

参 考 文 献

[1] O'Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, 250, 4007, 1975.
[2] O'Farrell, P. Z. et al.: *Cell*, 12, 1133, 1977.
[3] Garrells, J. I.: *Trends Biochem. Sci.*, 5, 281, 1980.
[4] Celis, J. E. et al.: *Trends Biochem. Sci.*, 6, 197, 1981.
[5] Bravo, R. et al.: *Cell Biol. Int'l. Rep.*, 5, 93, 1981.