

用单对同晶加反常散射法测定去 B 链 羧端五肽(B_{26} — B_{30})胰岛素晶体结构 4 埃分辨率的初步结果

李家瑶 宋时英 李 军 王家槐 饶子和

(中国科学院生物物理研究所)

在 R3 胰岛素晶体结构分析的基础上^[1,2], 研究胰岛素类似物及不同种属胰岛素的晶体结构, 以探索该激素的结构与功能的关系, 是我们一直深感兴趣的课题。生化工作者指出: B 链羧端切去八肽后, 胰岛素基本丧失活性^[3], 去七肽后仍有微弱活力^[4], 去六肽后保存有相当的活力^[5], 而去五肽胰岛素 (DPI) 则保有高达 70—80% 的活力^[6]。这种胰岛素结构的变化影响其生物功能的现象, 是很吸引人的。首先我们选用了 DPI 作为研究的对象, 因为可获得它的供 X 射线衍射分析用的单晶^[7]。

DPI 是用胃蛋白酶将胰岛素作限制性酶解后得到的^[6], 晶体属单斜晶系, C2 空间群, $a = 58.6$ 埃, $b = 27.7$ 埃, $c = 24.0$ 埃, $\beta = 100.6^\circ$ 。我们找到了一个合用的重原子衍生物——汞碘络离子 DPI。本文报道用单对同晶加反常散射的方法 (SIR 法) 计算得到的 4 埃分辨率的 DPI 电子密度图的初步分析 (重原子位置分析将另文发表^[8])。

用 SIR 法求解蛋白质晶体结构已有所报道^[9], 它中对蚯蚓血红蛋白 (Hemerythrin) 的分析^[10], 同样采用了汞碘络离子衍生物。尽管本工作所用衍生物同晶度不够好 (b 轴缩短了约 1.2%), 重原子分布也较分散, 使分析工作只能限于 4 埃分辨率, 但仍可借助于已知的胰岛素结构获得一些关于 DPI 的结构信息。

概率法求相角及电子密度的计算都是用自编的程序在 013 电子计算机上完成的。由于不

能事先确定重原子的绝对构型, 所以整个计算工作是用修正后的重原子参数就一对对映体算了两套相角和两套电子密度图。现将所用重原子参数及计算蛋白质电子密度图的一些误差指标列于表 1。

为了考察所得相角的可信度, 在 331 个点中挑选了衍生物反常散射最大的 17 个点, 计算其平均 m 因子为 0.83, 大大高于总的平均 m 因子 (0.53)。另外又选取母体或衍生物的弱点计 24 个, 其平均 m 因子仅 0.39。这说明, 反常散射的大小对于确定相角的贡献程度不同, 这是合理的。

由于计算中应用的独立衍射点只有 331 个, 难以用 Wilson 统计求绝对比例因子。表 1 中 K_p 是根据衍生物晶体相对于母体晶体的比重增加值, 大致估算重原子总的有效占有率后推算得到的, 以使 K_p 以及相应的 n 、 E 、 E' 处于大体上合理的一个水平上, 并以此来估算绝对电子密度数值。电子密度图取 $a = \frac{1}{2}$, $b = \frac{1}{2}$, $c = 1$ 的独立区, 在三个轴向上的步长大体上都为 1 埃。两套密度图分别以 1.5 厘米 = 1 埃的比例绘制在玻璃板上。

比较两套密度图, 发现相应于重原子为正构型的一套有几个截面密度分布过于稀疏, 而且二次轴上有长范围的接近于 0.6 个电子/埃³ 的密度粘连, 不易于由该图获得合理的分子配置; 而相应于反构型的一套分子边界清楚, 部分

表 1 重原子参数及某些误差指标*

x	y	z	n	$\bar{m}$	K_p	$\bar{B}$	R	E	E'	$\overline{\phi_b - \phi_M}$
0.1736	0	0.1106	0.585	0.53	4.88	22	0.51	90.3	18.6	10°
0.1362	0.4188	0.4342	0.315							
0.9593	0.1417	0.2012	0.345							
0.4042	0.2685	0.0979	0.20							

$$* R = \frac{\sum_{HKL} ||F_H| - |F_{HC}||}{\sum_{HKL} |F_H|} \quad F_H \text{ 和 } F_{HC} \text{ 为重原子结构因子的观测值与计算值,}$$

$$E = \left[\frac{\sum_{HKL} (k|F_{HP}|_{(O)} - |F_{HP}|_C)^2}{N} \right]^{1/2} \quad F_{HPO} \text{ 和 } F_{HPC} \text{ 为衍生物结构因子的观测值与计算值,}$$

$$E' = \left\{ \frac{\sum_{HKL} [k(|F_{HP+}| - |F_{HP-}|) - 2|F''_H| \cos(\nu + \omega)]^2}{N} \right\}^{1/2}$$

ϕ_b 为最优相角, ϕ_M 为最可几相角。

电子密度可以连续跟踪,特别是借助于已知的胰岛素 A, B 链配置方式,可以在独立区内找到一个比较合理的 DPI 分子排布方案。另一方面,根据戴金壁同志提出的方法(未发表),分别用 $|F_{HP}|e^{i(\alpha_p)_\pm}$ 和 $|F_{HP}|e^{i(\alpha_p)_\mp}$ 作系数计算电子密度图。 $(\alpha_p)_\pm$ 是用重原子正构型推得的相角, $(\alpha_p)_\mp$ 是用重原子反构型推得的相角, F_{HP} 是衍生物结构因子。在用 $(\alpha_p)_\mp$ 计算的密度图上反构型重原子的相对占有率表现比用 $(\alpha_p)_\pm$ 计算的图上正构型重原子的表现更接近于实际的重原子结构(表 2)。这一结果与我们以上的判断相吻合。

图 1 表示由反构型图分析得到的 DPI 分子在晶胞内的配置情况。图中大体给出了 A、B 链所处位置的投影。图 2(见封三)是独立区电子密度迭合图。总的看来, B 链的电子密度表现较好,中段和尾部可连续跟踪; A、B 链氨端所在部位的电子密度较乱,不易跟踪。胰岛素在 R3 晶体中大致沿三次轴“站”在那儿,而 DPI 在 C2 晶胞中则大致上顺 a 轴“躺”在那儿,即分子的长方向沿 a 轴伸展,占 1/2,而在 b 轴和 c 轴上则各占 1/2 和 2/3。

分析结果表明, DPI 分子构象与胰岛素大体相似。虽然目前尚不能清晰辨认肽链走向,

表 2 以 $|F_{HP}|e^{i(\alpha_p)_\pm}$ 和 $|F_{HP}|e^{i(\alpha_p)_\mp}$ 为系数的电子密度图上重原子表现的比较*

	重 原 子 坐 标				$ F_{HP} e^{i(\alpha_p)_\pm}$ 图 表 现			
	x	y	z	n	x	y	z	n
	x	y	z	n	x	y	z	n
正 构 型	10	0	2	0.59	10.5	0	2	62
	8	12.5	9	0.32	9	12.5	9	26
	57.5	4.2	4	0.35	57.5	4.5	4.5	29
	24	8	2	0.20	23.5	8	2	37
	重 原 子 坐 标				$ F_{HP} e^{i(\alpha_p)_\mp}$ 图 表 现			
	x	y	z	n	x	y	z	n
	x	y	z	n	x	y	z	n
反 构 型	10	0	2	0.59	10.5	0	2	58
	38	2.5	9	0.32	37.5	2	8	49
	27.5	11	4	0.35	27.5	11.5	4.5	31
	54	7	2	0.20	54	7	3	21

* 表中 x 、 y 、 z 分隔数分别为 58, 28, 24。

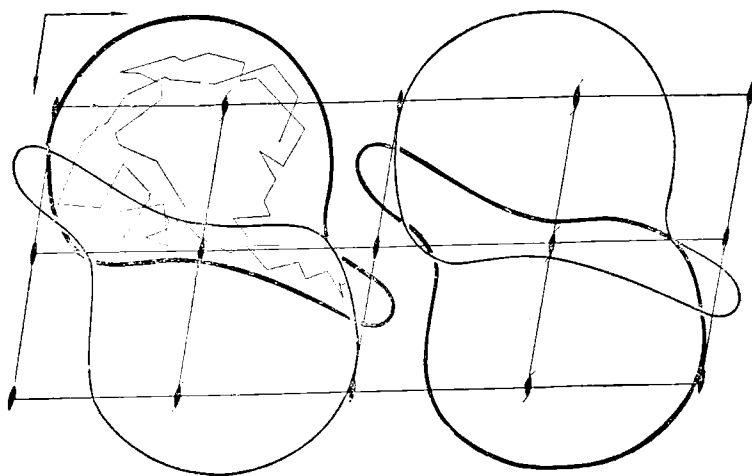


图1 DPI在C2晶胞内的分子配置示意图

但B链中部螺旋直至相应于胰岛素分子B₂₀—B₂的U形转折都较清楚,且反映出切掉了末端五肽的状态。与B链相比,A链结构仍较松散。与胰岛素相对照,DPI晶体结构一个最显著的特征是晶胞中四个分子间并不存在以二重轴或二重螺旋轴相关联的二聚体。尽管分子间仍有某些部位相接触(如在二重轴附近两分子的B链间,二重螺旋轴相关两个分子的B头与B尾间等),但从总体来看,分子是以单体形式存在的。这一现象是胰岛素及其类似物晶体结构研究中的首次观察。

胰岛素晶体结构研究中,人们对以结晶学或非结晶学二重轴所联系的两个分子间的结合面已经讨论了很多^[1,2,11],说明了它的结构和生物学意义。我们在DPI的晶体结构中未见到这种二体结合面。我们认为这是问题的另一个方面,而不能就此说明此结合面对胰岛素的活性不重要。这一结果与DPI溶液构象的研究是吻合的^[12]。胰岛素在生理条件下很可能以单体形式起作用,而分子在二聚化时发生的一些构象改变也许类似于胰岛素分子与其受体结合时所发生的构象变化^[1],因此,我们在晶体条件下所见到的单体形式是有一定意义的。目前在4埃分辨率下以一个同晶度不太好的衍生物,用SIR法计算的电子密度图所能提供的结构信息是有

限的。我们期望进一步的工作能得出更多更可靠的结果。

梁栋材和王大成同志参加电子密度图的分析 and 讨论,楼美珍、龚海颢、齐维忠和丁玉敏同志协助绘制电子密度图,龚海颢同志协助准备部分计算机纸带,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 北京胰岛素结构研究组:《中国科学》,1974年,第6期,591页。
- [2] Blundell, T. L., et al.: *Recent Progr. Horm. Res.*, **27**, 1, 1971.
- [3] Broner, W. W. & Chance, R. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 219, 1967.
- [4] 鲁子贤、虞荣华:《第三次中国生物化学学术会议论文摘要汇编》,1979年5月出版,第3页。
- [5] 上海胰岛素研究小组:《中国科学》,1972年,第1期,第21页。
- [6] 中国科学院上海生化所胰岛素组,北京胰岛素结构组,生物物理所生化制备组:《生物化学与生物物理》,1976年,第8期,第61页。
- [7] 北京胰岛素结构研究组:《生物化学与生物物理》,1976年,第8期,第67页。
- [8] 王家槐等:待发表。
- [9] Blake, C. C. F. & Evans, P. R.: *J. Mol. Biol.*, **84**, 585, 1974.
- [10] Sienkamp, R. E., et al.: *J. Mol. Biol.*, **100**, 29, 1976.
- [11] Dodson, E. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **125**, 387, 1978.
- [12] 中国科学院生物物理研究所胰岛素小组:《生物化学与生物物理学报》,1976年,第8期,第79页。

[本文于1979年8月10日收到]

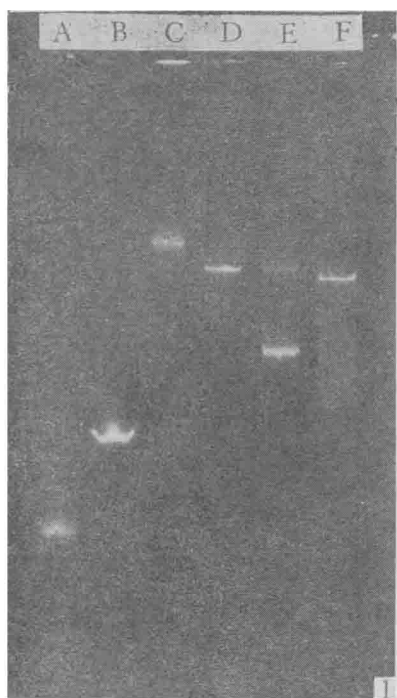


图1 平板琼脂糖凝胶电泳图谱

A: 质粒 pBR 322, B: 质粒 pBR 322 用 EcoRI 酶解 C: 质粒 pCB, D: 质粒 pCB 用 EcoRI 酶解, E: 质粒 pCR1 F: 质粒 pCR1 用 EcoRI 酶解, 电泳条件: 0.7% 琼脂糖, 电压 80V, 用 0.04M Tris-醋酸缓冲液 (pH 8.0), 电泳进行 5 小时。



图2 重组质粒 pCB 电子显微照片 50,000 ×

用里程计测量了五个 pCB 质粒的不同电镜照片, 得到平均分子长度为 $5.3\mu(5.0\mu-5.5\mu)$ 。换算成平均分子量约为 10.97×10^6 道尔顿, 相当于文献报道的 pCR1 (8.7×10^6 道尔顿) 和 pBR 322 (2.6×10^6 道尔顿) 两质粒分子量之和。

