

# 去 B 链羧端六肽 (B25—30) 胰岛素 初步结晶学研究

万柱礼 楼美珍 梁栋材

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

朱尚权 曹秋平 张友尚

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

## 摘 要

去 B 链羧端六肽 (B 25—30) 胰岛素, 采用悬挂液滴气相扩散法, 在柠檬酸钠缓冲液 pH 5.8; 含有丙酮和氯化钠体系中, 获得可供 X 射线晶体结构分析用的单晶体, 其衍射分辨率在 1.5 Å 以上, 晶体外形为三角形。属于单斜晶系, 空间群为 C 2, 晶胞参数为  $a = 42.60 \text{ Å}$ ,  $b = 37.87 \text{ Å}$ ,  $c = 27.118 \text{ Å}$ ,  $\beta = 125.35^\circ$ 。其结构分析工作正在进行中。

关键词: B 链羧端去六肽胰岛素, 蛋白质单晶体生长

## 一、引 言

为了阐明胰岛素结构与生物活力的详细关系, 就目前而言, 最有效的手段还只能是先研究活力不同的胰岛素和胰岛素类似物。去 B 链羧端五肽、六肽、七肽胰岛素构成这一研究的良好系列。通过酶促半合成, 可以得到去六肽胰岛素 (DHI)<sup>[1]</sup>, 因而有可能进行 DHI 的晶体结构分析。去五肽胰岛素 (DPI) 生化分析表明, 其生物活性为天然胰岛素生物活性的 40%<sup>[2]</sup>, 去七肽胰岛素 (DHPI) 的生物活性基本丧失了天然胰岛素的生物活力<sup>[3]</sup>, 而去 B 链羧端六肽胰岛素 (DHI) 的生物活力正好处于有活性和无活性之间, 使其在这一系列研究里有其特殊重要地位。特别有兴趣的是 B 25-Phe, 它在化学结构上格外重要, 即它的苯环对胰岛素分子生物功能的发挥起着十分关键的作用。Tager 实验室鉴定了人的天然变异胰岛素分子, 其变异发生在 B 25-Phe 为 Leu 所取代<sup>[4]</sup>, 但就这一个氨基酸残基的改变使分子的受体结合和生物活力分别严重下降到 9% 和 2%<sup>[5]</sup>, 而 B 24-Phe 被 Leu 置换, 则维持了大约 20% 的生物活力<sup>[6,7]</sup>。B 24-Phe 为 Ser 取代<sup>[8]</sup>, 生物活力为天然胰岛素的 16%。而 B 25-Ser 胰岛素只有 0.5% 的生物活力。就是说, B 24-Phe 无论被 Leu 还是 Ser 所取代, 总可维持 20% 左右的生物活

力;但 B 25-Phe 为 Leu 或 Ser 取代后,活力就严重损失,降到 1%左右。DHI 就是保存了 B24-Phe,而去掉 B 25-Phe 以后六肽的胰岛素 B 链羧端修饰物。其三维结构的阐明必将为了解胰岛素结构和活力关系、医学临床以及分子遗传领域提供重要信息。

## 二、实验与结果

通过对晶体生长的缓冲液体系、pH、离子浓度及蛋白浓度等条件和几种晶体生长方法的系统摸索,最后用悬挂液滴气相扩散法,在柠檬酸钠缓冲液体系中(见表1);获得可供X射线晶体结构分析用的 DHI 单晶体,晶体外形为三角形(见图1)。它的外形与 DPL 晶体十分相似。

表1 DHI 晶体生长条件

| 生长液 | A 液                | B 液         |
|-----|--------------------|-------------|
|     | 柠檬酸钠 0.2mol/L(50%) | DHI 蛋白      |
|     | 氯化钾 1% (8%)        | 溶于 0.02 N   |
|     | 丙酮 (42%)           | 盐酸          |
|     | pH 5.8             | 浓度 11 mg/ml |

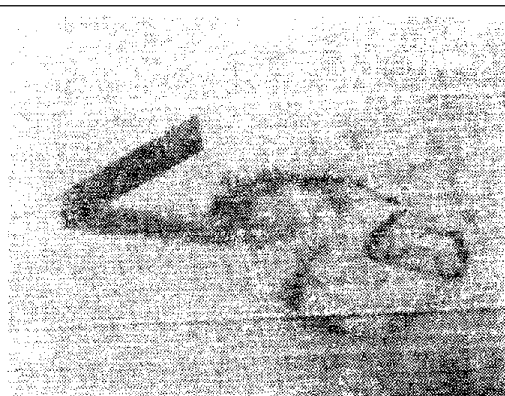


图1 DHI 单晶体

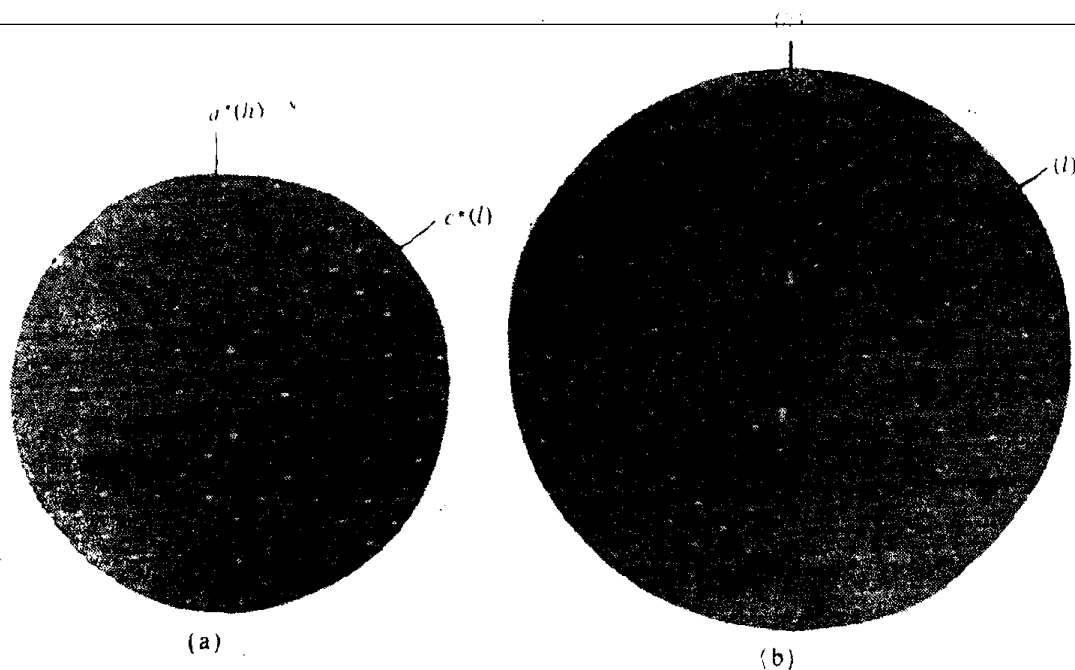


图2 DHI 晶体沿  $b$  轴展开的零层 ( $h0l$ ) 照片 (a) 和非零层 ( $h1l$ ) 照片 (b)

晶体生长具体操作如下:取  $10\ \mu\text{l}$  A 液与  $10\ \mu\text{l}$  B 液混合,将其放在经硅化后的一块显微镜盖玻片上,然后让它悬放在含 1 ml A 液的小穴上,小穴边加油使它完全密封,放置室温,一个月后即可得到满意的单晶体。

X 射线衍射分析表明, DHI 晶体衍射分辨率在  $1.5 \text{ \AA}$  以上。图 2 (a), (b) 分别是 DHI 晶体沿  $b$  轴 ( $h0l$ ,  $h1l$ ) 展开的零层和非零层衍照照片。图 3 给出 DHI 晶体沿  $a$  轴 ( $0kl$ ) 展开的零层衍照照片。根据  $b$  轴和  $a$  轴衍射点花样分析表明, DHI 晶体属于单斜晶系, 空间群为  $C2$ 。晶体学参数列于表 2。从表 2 可以看到, DHI 晶体与 DPI 晶体的空间群相同, 但晶胞参数明显不同,  $a$  轴缩短,  $b$  轴增长,  $\beta$  角度增大, 因而它们虽然有相同的晶体外形, 同属一个空间群, 但是完全不同的晶型。

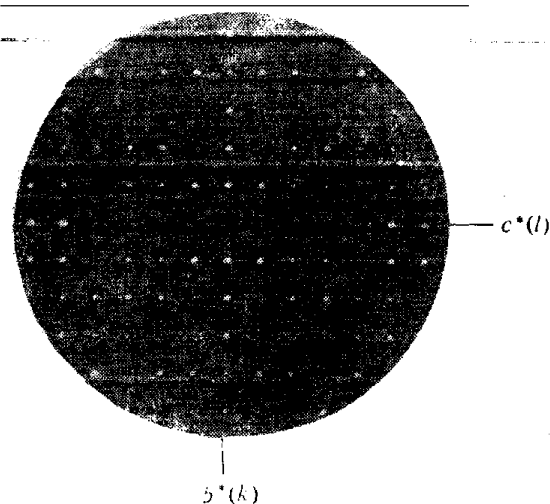


图 3 DHI 晶体沿  $a$  轴展开的零层 ( $0kl$ ) 照片

表 2 DHI 和 DPI 晶体的晶体学参数

| 晶体学参量    | DHI                                                                                                 | DPI                                                                                                 |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 空间群      | $C2$                                                                                                | $C2$                                                                                                |
| 晶胞参数     | $a = 42.6 \text{ \AA}$<br>$b = 37.9 \text{ \AA}$<br>$c = 27.2 \text{ \AA}$<br>$\beta = 125.4^\circ$ | $a = 58.7 \text{ \AA}$<br>$b = 27.9 \text{ \AA}$<br>$c = 24.0 \text{ \AA}$<br>$\beta = 100.6^\circ$ |
| 晶胞体积     | $35796.7 \text{ \AA}^3$                                                                             | $38634.8 \text{ \AA}^3$                                                                             |
| 不对称单位分子数 | 1                                                                                                   | 1                                                                                                   |

### 三、讨 论

DHI 晶体外形呈三角形, 其三条棱的长度差异不十分明显。因此, 在开始寻找 2 次轴方向时遇到一些麻烦。单斜晶系中, 只有 2 次轴 (即  $b$  轴) 的选取是唯一的。因此, 只有确定了晶体学  $b$  轴才能准确确定 DHI 晶体的晶胞参数和空间群。其  $c$  轴方向可以任意选取, 而  $a$  轴的选择也不是任意的, 否则将会出现体心  $I$  格子。所以, 按照 Bravais 格子的选取原则最后定为  $a = 42.60 \text{ \AA}$ ,  $b = 37.87 \text{ \AA}$ ,  $c = 27.18 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 125.35^\circ$ , 空间群为  $C2$ 。经与四圆衍射仪所测晶胞参数和格子选取进行比较, 结果是完全一致的。

我们曾提到, 去 B 链羧端六肽胰岛素是处于去 B 链羧端五肽胰岛素和去 B 链羧端七肽胰岛素之间。有趣的是, DHI 晶体和 DPI 晶体<sup>[9]</sup>是在完全不同的生长体系中获得相同晶体的外形, 相同的空间群。而 DHI 晶体和 DHPI 晶体<sup>[10,11]</sup>是在十分相同的生长体系中获得完全不同晶体外形和空间群。它们之间的差别, 就其一级结构而言, 仅仅是在 B 链羧端差一个氨基酸。也就是说 B24-Phe 或 B25-Phe。可见这两个芳香环在结构中的重要性。DPI 是至今为止测定了空间结构的胰岛素衍生物中唯一一个在晶体中以单体形式存在, 而又具有相当高生物活力的胰岛素衍生物<sup>[12]</sup>。DHI 单晶体的获得又将为胰岛素衍生物的空间结构中增加另一个以单体形式存在的结构。

$1.2 \text{ \AA}$  胰岛素晶体结构表明, 其 B 链主链在肽段 B 20—B 23 位置出现一段回折结构。在具有相当高生物活性的 DPI 分子中的 B 25-Phe 的侧链方向刚好与胰岛素分子中相反, 但仍保持了主链回折结构。而基本丧失生物活力的  $2.4 \text{ \AA}$  分辨率的 DHPI 最近的分析结果表

明<sup>[13]</sup>, 由于 B 24-Phe 以后肽段的去除, 其 B 20—B 23 回折被破坏, 甚至完全解开, 这可能是造成活性下降的重要原因。前面曾经提到, B 24-Phe 在结构上是非常保守的。DHI 分子正好保留了 B 24-Phe, 那么在 DHI 晶体结构中 B 20—B 23 段回折的表现将是我们所关注的主要位置之一。它的结构的完成必将为胰岛素 B 链羧端结构与活力之间提供新的重要信息。目前已完成一套 1.7 Å DHI 晶体的衍射数据工作, 其结构分析工作正在进行中。

### 参 考 文 献

- [1] 曹秋平等, *Nature*, 292(1981), 774—775.
- [2] Gattner, H. G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356(1976), 1397—1404.
- [3] 鲁子贤等, 中国科学, 1980, 10: 990—994.
- [4] Shoelaen, S. et al., *Nature*, 302(1983), 540—543.
- [5] Olefsky, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 255(1980), 6098—6105.
- [6] Gattner, H. G. et al., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361(1980), 1135—1138.
- [7] Tager, H. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77(1980), 3181—3185.
- [8] Shoelso, S. et al., *ibid.*, 80(1983), 7390—7394.
- [9] 北京胰岛素结构研究组, 中国科学, 1976, 306—307.
- [10] 常文瑞等, 中国科学 B 辑, 1982, 6: 528—530.
- [11] 王大成等, 科学通报, 31(1986), 7: 550—553.
- [12] Liang, D. C. et al., *Biochemical Society Transactions*, 600 th Meeting, Oxford, Vol 11, 1983, 419—425.
- [13] 王大成等, 中国科学 B 辑, 1988, 7: 709—718.