

猪胰凝乳蛋白酶与胰蛋白酶的若干种复合物的晶体生长和初步的晶体学研究

曾 杰 陈忠国 李根培 唐有祺

(北京大学物理化学研究所)

卫新成 卢光莹 顾孝诚

(北京大学生物系)

戚 正 武

(中国科学院上海生物化学研究所)

胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶的晶体结构是研究得较早、较清楚的蛋白质结晶学成果之一。1970年 Stroud 等人解出了分辨率为 $2.7 \text{ \AA}$ 的牛胰蛋白酶的三维结构^[1-2]。1972年 Birktoft 等人发表了 $2 \text{ \AA}$ 分辨率的牛胰凝乳蛋白酶的结构数据^[3-4]。1974年 Janin 等人报道了猪胰蛋白酶的研究成果^[5]。这些成果对确定这两种酶的活性中心,探索它们的高效高选择性的催化机理以及关于蛋白质分子的进化等方面的研究起了巨大的推动作用。使人们从分子水平上了解了丝氨酸蛋白酶,为研究酶学理论及分子的进化提供了宝贵的资料。

戚正武等曾于 1963 年从猪胰脏中获得数种结晶蛋白酶^[6],其中有两种晶体(结晶蛋白酶 A 和 B)已被证实是胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶的复合物。蛋白酶晶体 A 在八次重结晶后,其晶型和所含两酶对专一性底物的活力比仍保持不变,表明两种酶蛋白总是以固定的比例共存,这种现象实属罕见。因此研究这两种蛋白水解酶之间的相互作用以及分子的堆积对活性部位的影响是很有意义的。为此我们培养了可用于 X 光结构分析的大晶体,测定了胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶复合物的晶体学参数,为今后研究其三维结构及分子间的交互作用创造了条件。

一、晶体生长

1. 材料 培养晶体所用的猪胰凝乳蛋白酶-胰蛋白酶复合物样品 1 和 2 均由上海生物化学研究所提供。样品 1 为冻干粉,样品 2 为粗滤饼。为防止胰蛋白酶的自溶,培养晶体时加入苯甲脒作为抑制剂,苯甲脒购自 Sigma 公司。

2. 方法 我们采用了悬滴式蒸气扩散法及晶种重复接种技术^[7,8]培养了复合物的晶体。

样品 1 的晶体生长:称取 3 mg 复合物样品,溶于 $100 \mu\text{l}$, 0.1 M , $\text{pH} = 6$ 的磷酸钾缓冲液中(其中含 0.1% 的 NaN_3 作防腐剂),置于 4°C 的水浴中,然后加入重量为复合物样品总重 6% 的苯甲脒,搅拌均匀并静置 30 分钟。将此溶液离心 5 分钟,取上清液待用。

悬滴式蒸气扩散法生长晶体采用了塑料多孔组织培养盒。将 pH 为 0.6,硫酸铵饱和度为 0.25,浓度为 0.1 mol/l 的磷酸钾缓冲液 1 ml 放于培养盒的小孔中作为平衡液。悬滴液为 $4 \mu\text{l}$ 的蛋白酶复合物溶液和 $1 \mu\text{l}$ 的平衡液所组成,将悬滴液放于平衡液的上方,置于 23°C 的温箱中。五天以后即可用显微镜观察到小晶体,十天左右晶体的线度达到 $0.1 \sim 0.2 \text{ mm}$ 。不管我们怎样改变实验条件,都无法用蒸气扩散法得到线度大于 0.2 mm 的晶体。应用重复接种技术以后,得到了可用于 X 光衍射的大晶体。

在重复接种时,平衡液中的硫酸铵饱和度由前述的 0.25 改至 0.30。悬滴是由 $2.6 \mu\text{l}$ 的蛋

本文 1984 年 12 月 28 日收到。

白酶复合物溶液和 $1.4 \mu\text{l}$ 的、pH 为 6.0、硫酸铵饱和度为 0.50、浓度为 0.1 mol/l 的磷酸钾缓冲液组成。晶种先在 pH 为 6.0, 硫酸铵饱和度为 0.50, 浓度是 0.1 mol/l 的磷酸缓冲液中清洗多次后接种到上述悬滴中, 在 23°C 时静置。十天以后所引入的晶种长大至 $0.4 \sim 0.5 \text{ mm}$ 。将上述过程重复 2 至 4 次, 就可获得线度约为 $1.0 \times 0.7 \times 0.5 \text{ mm}$ 适合于 X 射线结构分析的单晶体, 所得的晶体见图 1。

样品 2 的晶体生长与样品 1 不同, 样品 2 的蛋白酶复合物溶液浓度是 75 mg/ml 而不是 30 mg/ml 。此时平衡液是 1 ml , pH 为 6.0, 硫酸铵饱和度为 0.50, 浓度是 0.1 mol/l 的磷酸钾缓冲液。含有 $6 \mu\text{l}$ 的蛋白酶复合物溶液和 $1.2 \mu\text{l}$ 平衡液的液滴在 23°C 时置于平衡液之上。在重复接种时, 悬滴液由 $5 \mu\text{l}$ 蛋白酶复合物溶液, $2 \mu\text{l}$ 平衡液及 $3 \mu\text{l}$ 不含硫酸铵的缓冲液组成。最后得到如图 2 所示的大小为 $1.1 \times 0.6 \times 0.6 \text{ mm}$ 的六方锥柱晶体。

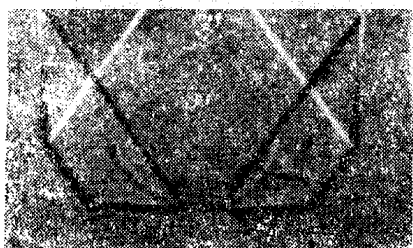


图 1 猪胰凝乳蛋白酶与胰蛋白酶复合物样品 1 的单晶体(放大倍数 50)



图 2 猪胰凝乳蛋白酶与胰蛋白酶复合物样品 1 的六方锥柱形晶体(放大倍数 50)

二、结晶学参数

上述二种晶体用旋进照相法进行了研究, 两者的分辨率均达到 $3.3 \text{ \AA}$ 。

1. 复合物晶体 1 图 3 所示是 $hk0$ 层的旋进照片。从照片中可看出沿 c 轴方向有明显的四重轴对称性。在 a 方向和 $a+b$ 方向上可看到有二重轴对称性。因此晶体属于 $4/mmm$ 劳厄群及 422 点群。从图 4 所示的 $0kl$ 层照片可看到在 $00l$ 型衍射点中在 $l \neq 4n$ 时具有系统消光。从图 3 和图 4 可以得出在二重轴方向无系统消光。因此晶体的空间群为 $P4_122$ 或 $P4_322$, 它的晶胞参数为 $a = b = 128.7 \text{ \AA}$, $c = 119.9 \text{ \AA}$, 晶胞体积 $V = 1.986 \times 10^6 \text{ \AA}^3$ 。

2. 复合物晶体 2 图 5 和图 6 给出复合物晶体 2 的 $hk0$ 和 hkl 层旋进照片。从图 6 中可看到沿 c 轴方向有 3 重轴的对称性, 与 a^* 轴垂直的方向具有镜面对称元素。因此晶体属于 $\bar{3}m$ 劳厄群及 32 点群。图 7 是 $0kl$ 层旋进照片。从这些照片中看到此晶体不具有系统消光。由这些照片可得出此晶体的空间群为 $P321$ 。三方晶胞参数为 $a = b = 148.7 \text{ \AA}$, $c = 89.2 \text{ \AA}$, 晶胞体积 $V = 1.708 \times 10^6 \text{ \AA}^3$ 。

三、讨 论

培养一个适用于晶体结构分析的蛋白质大晶体是很困难的工作。一个合适的蒸气扩散法培养晶体的实验条件, 必须根据具体的蛋白质对蛋白质浓度, 缓冲液体系及沉淀剂的不同组合的条件进行大量的筛选。如果采用通常的蒸气扩散法无法得到足够大的晶体时把重复接种技术和蒸气扩散法结合起来使用常是很奏效的。我们在摸索复合物晶体生长条件时, 不管如何

改变实验条件,晶体长到一定的大小就不再变大。这迫使我们采用重复接种技术,最后使我们

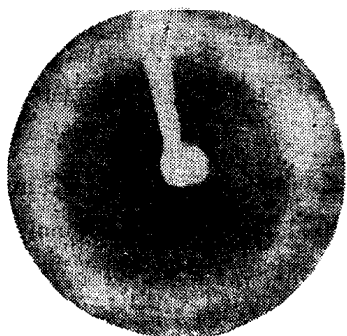


图3 复合物晶体1的 $hk0$ 旋进照片



图4 复合物晶体1的 $0kl$ 旋进照片

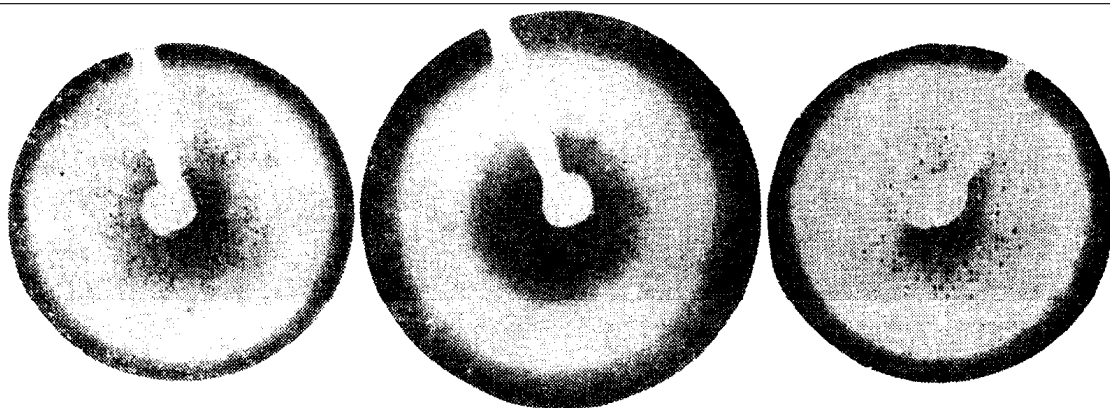


图5 复合物晶体2的 $hk0$ 旋进

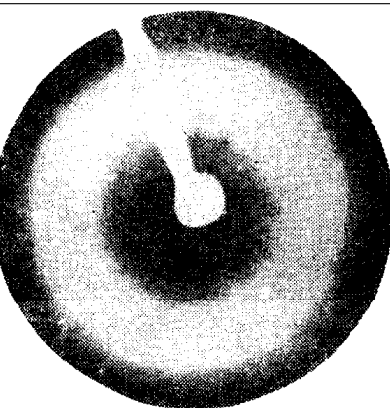


图6 复合物晶体2的 $hk1$ 旋进

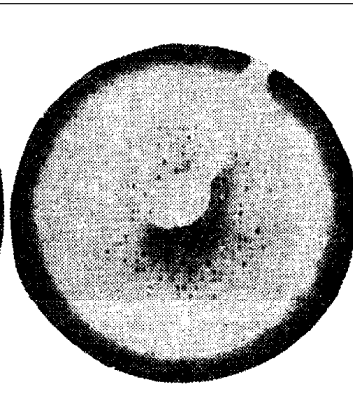


图7 复合物晶体2的 $0kl$ 旋进

得到了很大的单晶体。

按照 Matthews 的方法计算^[9],二种复合物晶体的不对称单位中均可能有4至7个蛋白酶分子。这为我们今后解出它们的立体结构增加了一定的困难。因为胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶的晶体结构已被精确地测定。因而用分子置换法来测定它们的复合物的三维结构并进而详细地研究这二种蛋白酶分子间的相互作用是有可能的。这二个晶体的进一步研究正在进行中。

致谢:感谢彭志忠教授和马喆生教授在我们摄制旋进照片时给予我们的支持。

参 考 文 献

- [1] Stroud, R. M., Kay, L. M., Cooper, A. M. and Dickerson, R. E., *Abstr. 8th Int. Cong. Biochem.*, 1970.
- [2] Stroud, R. M., Kay, L. M. and Dickerson, R. E., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **36** (1971), 125—140.
- [3] Birktoft, J. J., Blow, D. M., Henderson, R. and Steitz, T. A., *Phil. Trans. Roy. Soc., London* **8**(1970), 257—267.
- [4] Birktoft, J. J. and Blow, D. M., *J. Mol. Biol.*, **68**(1972), 187—240.
- [5] Janin, J., Sweet, R. M. and Blow, D. M., *Proc. Int. Res. Conf.*, 2nd, 1974.
- [6] 戚正武、吴克佐、许实荣, *生物化学与生物物理学报*, **3**(1963), 2: 191.
- [7] Reid, B. R., Koch, G. L. E., Bonlanger, R., Hartley, B. S. and Blow, D. M., *J. Mol. Biol.*, **80**(1973), 199—201.
- [8] 曾杰、陈忠国、李培根、唐有祺、卫新成、卢光莹, *化学通报*, 1985, 4: 27—30.
- [9] Matthews, B. W., *J. Mol. Biol.*, **33**(1968), 491—497.