慈菇蛋白酶抑制剂正交晶型的晶体生长和晶体学研究

林光大　张荣光　唐伟中　王丽秀
梁栋材*　戚正武　曹天钦
（中国科学院上海生物化学研究所）

蛋白酶及其抑制剂广泛存在于自然界中．它们在生物体内各种重要生理体系中起着生物调控作用．各种蛋白酶都有其相应的抑制剂．目前已提取的抑制剂就有上百种．对于这些抑制剂已经做了大量的生物化学研究．其中有十来种分子的三维结构已被测定．这些研究表明它们以类底物的方式与蛋白酶结合．结合部位的装配巧妙，形成大量的范德瓦尔键、氢键和盐桥．它们之间有如一种锁与钥匙的相互作用．

为了研究不同类型蛋白酶抑制剂的结构与功能间的关系，我们实验室已经得到绿豆胰蛋白酶抑制剂．它是一种 Bowman-Birk 型抑制剂，具有两个抑制胰蛋白酶的活性中心．我们已获得这个抑制剂及其胰蛋白酶复合物的一系列晶体，并对它们作了X射线晶体学的研究[1-4]．我们实验室也从慈菇（*Sagittaria sagittifolia* L.）中提取出另一种蛋白酶抑制剂[5]，这里称为慈菇蛋白酶抑制剂（Arrowhead inhibitor AHI）．它的分子量约为 15500，是一种多功能的蛋白酶抑制剂．它也具有两个活性中心，能抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶及激肽释放酶．最近从其全部一级结构的测定表明它有别于其他各种已知的丝氨酸蛋白酶抑制剂，是属于新的一族抑制剂．因此对其空间结构很值得研究．我们已经得到这种抑制剂的两种晶型的晶体．本文报道正交型晶体的生长及其晶体学参数的测定工作．

一、材料与方法

张、戚等人的早期工作已经得到 AHI 的微晶体[5]．我们在此基础上改进结晶条件和方法，采用平衡透析法能够重复长出两种晶型的晶体．其中正交型的晶体呈长方形（图 1）．平衡透析法的细节已在另一篇报道中介绍[3]．本工作中所用蛋白浓度约为 10 mg/ml．生长长方形晶体的透析液是 0.02 mol/l 的磷酸缓冲液，内含 0.175 饱和度的硫酸铵，pH 7.2．晶体生长在 25℃ 的恒温箱中进行．静置三周后晶体生长完成，其大小可达 3.0 × 1.0 × 0.5 mm^3．

图 1　AHI 的长方形晶体

二、结果与讨论

用旋进照相法测定长方形晶体的晶胞参数．图 2 表示晶体沿 *b* 轴展开的零层旋进照片，即 *h0l* 衍射．由照片可见衍射点呈 mm 对称性．在

本文 1986 年 4 月 22 日收到．1987 年 1 月 20 日收到修改稿．
* 中国科学院生物物理研究所（北京），兼中国科学院上海生物化学研究所特约研究员．

$h00$ 衍射中存在 h 为奇数的系统消光. 另外,沿 a 轴展开的 $0kl$ 衍射也呈 mm 对称性,在 $0k0$ 衍射中存在 k 为奇数的系统消光. 因此可以推断该晶体属正交晶系,空间群为 $P2_12_12$. 测定晶胞参数 $a = 298 \pm 1$ Å, $b = 194.5 \pm 0.5$ Å, $c = 123.7 \pm 0.5$ Å. 晶胞体积 $V = 7.170 \times 10^6$ Å^3. 用二甲苯/溴苯柱,碘化钾溶液标定的密度梯度法测定晶体密度 $\rho = 1.19 \pm 0.02$g/cm^3.

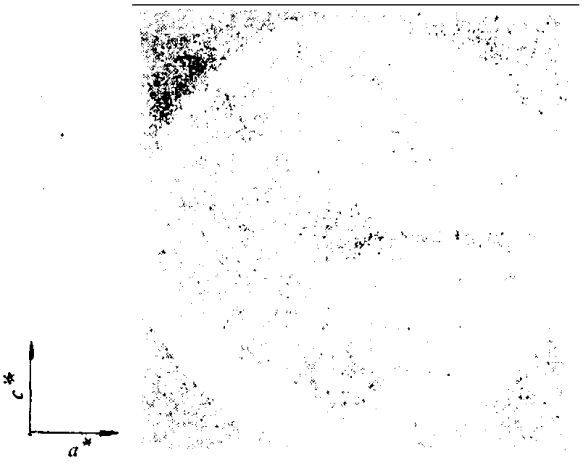

图 2 长方晶体沿 b 轴展开的零层旋进照片
($h0l$ 衍射)

慈菇蛋白酶抑制剂的分子量在生物大分子中并不算大,但是它的正交型晶体的晶胞参数很大,甚至比有些病毒晶体的还大. 因此在用 Matthews 的半经验方法[6] 估算晶胞内所含分子数时遇到了困难. 这个方法是根据对已有 116 种球状蛋白质晶体的统计结果,表明这些蛋白质分子在晶体中单位分子量所占体积 V_M 的范围是 1.68—3.53 Å^3/道尔顿. 晶体内蛋白质分子所占晶胞的体积分数 $V_{prot} = 1.66v/V_M$. 其中 v 为晶体内蛋白质的比容. 对于大多数蛋白质, $v = 0.74$cm^3/g, 因此得半经验公式 $V_{prot} = 1.23/V_M$. 对应这些蛋白质分子在细胞中所占体积分数的范围是 27—65%. 在一般情况下,晶胞内可容纳的分子数较小,多放或少放几个分子都会使 V_M 值超出以上范围. 因此通常可由 V_M 的可能值,结合考虑分子在晶胞中的对称配置来确定晶胞内的分子数. 但对 AHI 正交型晶体,与以上 V_M 值对应的晶胞内分子数,可在 275—131 的范围内选择. 显然这是无法确定的. 在此情况下,我们直接采用称量的办法来测定晶胞内溶剂的含量. 为此,我们挑出较多的大晶体,用滤纸吸去表面的溶剂后立即转移到精密天平上称量. 所用天平是感量为 10^{-7}g 的 Perkin-Elmer AD-2Z 型自动分析天平. 称量后置晶体于干燥器内脱水. 半个月后取出晶体,用同一天平称量. 两次称量的差值即为晶体内溶剂水的含量. 测量总量达 8g 的三批晶体的溶剂水含量平均值为 52%. 由于所用溶剂含有 17.5% 饱和度的硫酸铵,因此还必须考虑晶体内溶剂盐的含量. 可以计算此溶剂的 100g 水中约含盐 10g. 这样可求得晶体内溶剂所占晶体重量的百分数约为 57%,蛋白质约为 43%. 再由测量的晶体和溶剂的比重,它们分别约为 1.19 g/cm^3 和 1.05 g/ml, 可推算出晶体内溶剂所占体积百分数约为 65%,蛋白质所占体积百分数约为 35%. 由这些数值可求得该晶体内每单位蛋白质分子量占有的晶体体积 $V_M \sim 3.22$ Å^3/道尔顿. 此堆积密度允许晶胞中每个晶体学不对称单位约可容纳 36 个,即每个晶胞约可容纳 144 个该抑制剂分子.

如此大的堆积密度可能与该蛋白酶抑制剂分子在结晶溶剂中的自缔合效应有关.

参 考 文 献

[1] 林光大等,科学通报, **30**(1985), 4:319.
[2] 张荣光等,中国科学, B辑, 1985, 7:628.
[3] 林光大等,中国科学, B辑, 1986, 2:153.
[4] 张荣光等,中国科学, B辑, 1986, 3:273.
[5] Zhang Xianyang et al., *Scientia Sinica*, **22**(1979), 1443.
[6] Matthews, B. W., *J. Mol. Biol.*, **33** (1968), 491.