中 国 科 学
1985 年 7 月　　B 辑　　第 7 期

绿豆胰蛋白酶抑制剂-猪胰蛋白酶复合物的晶体学研究

张荣光　林光大　严友为　唐伟中　戚正武　曹天钦
（中国科学院上海生物化学研究所）

摘　要

本文报道利用微量静置法培养出绿豆胰蛋白酶抑制剂-猪胰蛋白酶复合物可供X射线衍射分析的单晶体．晶体衍射分辨率 2.7Å． 晶体学参数测定结果为四方晶系，空间群 $I422$，晶胞参数 $a = b = 122.4(2)$Å，$c = 113.4(2)$(Å)． 晶体密度 1.20g/cm^3，溶剂含量36%，每个结晶学不对称单位含一个复合物分子．

1963 年，戚正武等从绿豆中提取到胰蛋白酶抑制剂，其分子量接近 8000，具有 2 个活性中心，7 对二硫键，属于丝氨酸蛋白酶抑制剂中的 Bowman-Birk 类抑制剂． 当它与胰蛋白酶结合时，不论以克分子比 1:2 或 1:1 都能获得相应的复合物结晶[1]．

由于X射线结构测定技术的不断发展，目前，不少不同类型，不同来源的蛋白酶抑制剂及其酶复合物的晶体结构已被测定．属于丝氨酸蛋白酶抑制剂复合物的就有： 牛胰 Kunitz 抑制剂-胰蛋白酶[2]，大豆 Kunitz 抑制剂-胰蛋白酶[3]，卵粘蛋白第三活性区域碎片 (Kazal 抑制剂)-链霉素蛋白酶 B[4]，枯草杆菌蛋白酶及其抑制剂的复合物[5]等等． Bowman-Birk 类抑制剂由于其结构上的特殊性，分子量低，二硫键含量高，又具有两个活性中心，引起人们极大注意而被广泛研究．1981 年 Gaier 等曾报道大豆 Bowman-Birk 抑制剂和α-胰凝乳蛋白酶、β-胰蛋白酶复合物的晶体生长和晶体学参数测定[6]． 但至今尚未见这类抑制剂和它的酶复合物三维结构的报道．

在我们的工作中，已获得可供X射线晶体结构分析用的绿豆 Bowman-Birk 类抑制剂本身及其与酶复合物的单晶． 本文报道绿豆抑制剂和猪胰蛋白酶复合物(摩尔比 1:2)的晶体生长和晶体学参数测定．

一、材料和方法

实验所用的绿豆抑制剂是按文献 [7] 的方法制备．结晶猪胰蛋白酶经 DEAE-Sepharose-CL6B 进一步提纯，以除去自溶产物 α-胰蛋白酶．

将绿豆抑制剂 (MBI) 和猪胰蛋白酶 (TRYP) 按 1:2 的克分子比混合，溶于 0.01M 的醋酸缓冲液，pH4.3，蛋白最终浓度为 2% 左右． 室温下放置 30min． 离心 5min (10000rmp/min)，无明显沉淀．取上清液即为 TRYP-MBI-TRYP 复合物的蛋白溶液．

本文 1984 年 3 月 19 日收到．

我们采用微量静置法生长晶体．用微量注射器吸取 20 μl 复合物蛋白溶液到V型玻璃管中，再加 14μl 0.2*M* 磷酸缓冲液 pH7.28（内含 0.6 饱和度的硫酸铵），用针尖轻轻搅动，使蛋白溶液和缓冲液充分混合，此时可观察到有轻微乳白色．塞紧玻璃管塞子，放置 25℃ 恒温培养箱中．一周后即可观察到有晶体．一个月左右晶体生长基本完成．

TRYP-MBI-TRYP 的晶体为扁平四方体．形状规则，棱角清晰．最大尺寸可达 1 × 1 × 0.2mm^3（图 1）．若用 pH5.8 的醋酸缓冲液代替 pH7.28 的磷酸缓冲液，也能生长出外形相同的晶体，但晶体较小．

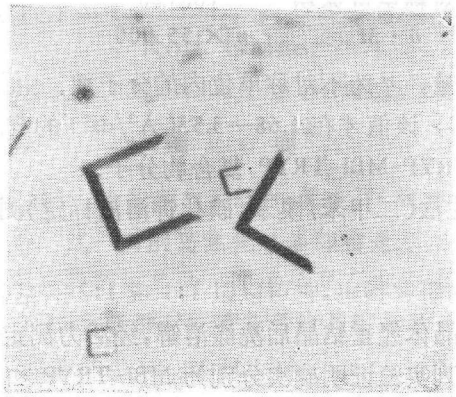

图 1　TRYP-MBI-TRYP 晶体

二、结果与讨论

X 射线分析结果表明晶体是完整的单晶．衍射分辨率可达 2.7 Å，图 2 为沿 *c* 轴展开的零

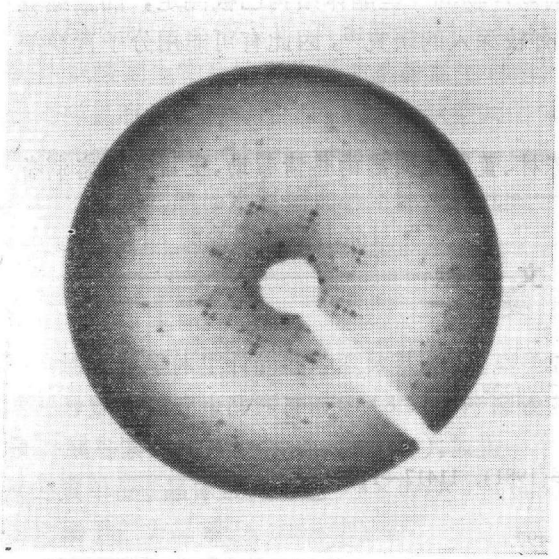

图 2　TRYP-MBI-TRYP 晶体沿 *c* 轴展开的 Buerger 徘徊照片（*hko* 衍射）

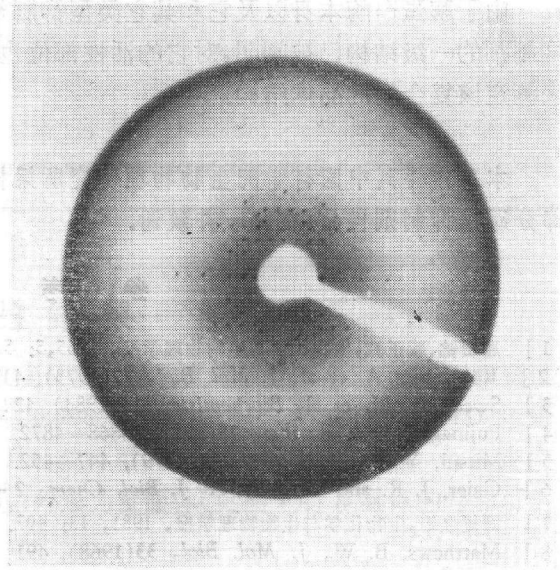

图 3　TRYP-MBI-TRYP 晶体沿 *a* 轴展开的 Buerger 徘徊照片（*okl* 衍射）

层 (hko) 衍射的徘循照片，显示了 4 重对称性. 同时在 $a+b$ 方向也显示了 2 重对称性. 因此晶体属 42 点群. 结合沿 a 轴方向展开的 okl 徘循照片 (图 3) 的分析，得系统消光规律为 $hkl: h+k+l=$ 奇数; $ool: l=$ 奇数; $hoo: h=$ 奇数. 由此可确定晶体空间群为 $I422$. 晶胞参数 $a=b=122.4(2)$Å, $c=113.4(2)$Å. 晶胞体积 $V=1698930$Å^3, 不对称单位体积 $=106180$Å^3.

TRYP-MBI-TRYP 复合物的分子量为 55000, 用 Matthews 方法[8]可推算结晶学不对称单位所含有的分子数. 此时, 每单位蛋白质分子量的晶体体积为

$$V_m=\frac{\text{不对称单位体积}}{n\cdot M}=\frac{106180}{n\times 55{,}000}=1.93/n(\text{Å}^3/\text{dal})$$

其中 M 为复合物的分子量, n 为不对称单位内的分子数. 由此计算结果可见, 只有当取 $n=1$ 时, $V_m=1.93$Å^3/dal, 该值才在 1.68—3.53(Å^3/dal) 的范围[8]之内. 由此可判断每个结晶学不对称单位含一个 TRYP-MBI-TRYP 复合物分子.

在室温下, 用密度梯度柱法(二甲苯/溴苯, 碘化钾溶液标定)测得 TRYP-MBI-TRYP 的晶体密度 $D=1.20$g/cm^3.

文献[1]对绿豆抑制剂的研究指出, 它可以以 1:1 或 1:2 的克分子比结合胰蛋白酶并形成相应的复合物结晶. 此两种晶体经重结晶后洗涤溶解, 经活力测定、氨基酸组成分析、紫外光谱吸收及分子量测定等一系列实验证明确实分别为 MBI-TRYP 和 TRYP-MBI-TRYP 两种复合物的晶体. 由静置法生长的 TRYP-MBI-TRYP 复合物晶体, 经溶解后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳. 结果表明它的电泳行为既不同于 MBI, 也不同于 TRYP, 其电泳速度介于两者之间, 进一步证实了所得晶体确实为抑制剂与酶复合物晶体. 另外, 在我们最近的工作中也获得了 MBI-TRYP 复合物的单晶, 大小、外形与 TRYP-MBI-TRYP 晶体大致相同, 但易碎裂. 由于它是抑制剂与胰蛋白酶反应的中间产物, 估计没有 TRYP-MBI-TRYP 复合物稳定.

由于胰蛋白酶本身以及它和其它类型抑制剂复合物的一些晶体结构已被测定, 而且绿豆抑制剂的一级结构已被阐明, 对它的活性部位也有较深入的研究[9], 因此有可能用分子置换法来测定该复合物的晶体结构.

本工作得到中国科学院生物物理研究所梁栋材、董贻诚同志的热情帮助, 王丽秀同志制备部分绿豆抑制剂样品, 在此一并致谢.

参 考 文 献

[1] 屈贤铭、臧正武, 生物化学与生物物理学报, 1965, 5: 519.
[2] Rühlmann, A. et al., *J. Mol. Biol.*, **77**(1973), 417.
[3] Sweet, R. M. et al., *Biochemistry*, **13**(1984), 4212—4228.
[4] Fujinaga, M. et al., *ibid.*, **79**(1982), 4868—4872.
[5] Mitsui, Y. et al., *Nature*, **277**(1979), 447—452.
[6] Gaier, J. R. and Tulinsky, A., *J. Biol. Chem.*, **256**(1981), 11417—11419.
[7] 谭复隆等, 生物化学与生物物理学报, 1981, 13: 407.
[8] Matthews, B. W., *J. Mol. Biol.*, **33**(1968), 491—497.
[9] Chi, C. W. et al., in *Proteins in Biology and Medicine* (Ed. Bradshaw, R. A. et al.), Acad. Press, New York, 1982, 341—362.