

# 利用 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶在低温条件下获得酶-底物复合物实际结构的方法

王薇, 刘一苇, 李宏滨

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

王薇, 刘一苇, 李宏滨. 利用 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶在低温条件下获得酶-底物复合物实际结构的方法. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1828–1835.

Wang W, Liu YW, Li HB. A method to determine the structure of the complex of enzyme and its substrate using 6-phosphate- $\beta$ -glucosidase at low temperature. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1828–1835.

**摘 要:** 利用“酶晶体低温抑活底物固定”方法, 在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 将 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶 (BglA) 晶体与底物对硝基苯- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷-6-磷酸 (pNP $\beta$ G6P) 进行浸泡试验, 通过 X 射线进行衍射数据收集并处理, 获得了完整的底物电子密度图。研究表明, 在不突变酶中关键基团使酶失活, 以及不选用底物类似物替代原有底物的情况下, 通过上述方法, 可以获得酶与底物复合物的实际结构。该研究结果可为今后低温酶学及复合物中间态的进一步研究提供帮助。

**关键词:** 低温, 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶, 晶体, 衍射数据, 底物电子密度图

## A method to determine the structure of the complex of enzyme and its substrate using 6-phosphate- $\beta$ -glucosidase at low temperature

Wei Wang, Yiwei Liu, and Hongbin Li

*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*

**Abstract:** To capture a state of the enzyme in complex with an intact substrate, we developed and adopted a novel

**Received:** April 22, 2013; **Accepted:** May 6, 2013

**Supported by:** Instrumentation Project of Chinese Academy of Sciences (No. yg2010005), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB833602).

**Corresponding author:** Hongbin Li. Tel/Fax: +86-10-64807323; E-mail: hblee@im.ac.cn

Yiwei Liu. Tel/Fax: +86-10-64807376; E-mail: liuyw@im.ac.cn

中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目 (No. yg2010005), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2010CB833602) 资助。

freezing method in crystal preparation procedure. Neither the elimination of the catalytically indispensable ligands, nor mutation or modification of the active site is required. At  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , we soaked the crystal of 6-phosphate-β-glucosidase (BglA) in the liquor containing p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside-6-phosphate (pNPβG6P). The diffraction data at  $2\text{ }\text{Å}$  resolution was collected and an intact and unambiguous electron density map of pNPβG6P was obtained. These results provide an effective method for the research of cryoenzymology and the intermediate state of enzyme-substrate complex in the future.

**Keywords:** low temperature, 6-phosphate-β-glucosidase (BglA), crystal, diffraction data, substrate electron-density map

准确地把握生物大分子及其复合物的结构是了解生命过程的基础,对其三维结构的解析,可给出大量的其本身及所属体系的信息。该工作可大致分成以下 4 个环节:高纯度大分子样品的制备;晶体的获得;结构的解析;结构信息指导下的生物学研究。在目前的技术条件下,样品晶体的质量是影响其结构解析的主要原因<sup>[1-3]</sup>。影响生物大分子晶体及其复合物质量的主要原因是分子的化学稳定性及构象一致性较差而得不到稳定的复合物晶体。例如,在通常条件下,当酶与底物发生反应时,底物会被酶降解,所以不易清楚地看到底物和酶的结合情况。突变酶中关键基团使酶失活以及选用底物类似物替代原有底物的的方法,经常被用来捕捉酶和底物的结合,但由此方法获得的结构多为近似结构。另外,在常温条件下酶与底物的结合一般不太稳定,这样底物即便在失活酶中的位置也经常不易确定。

我们在研究中发现<sup>[4-7]</sup>:在低温 ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 条件下,分子构象的一致性、分子间结合的稳定性都会大大改善,一般酶的生物活性也会大幅度降低。由此获得的酶-底物复合物更为稳定,得到的晶体结构衍射数据更趋于复合物结合时的实际结构<sup>[8-9]</sup>。More 等的研究也发现<sup>[10]</sup>,当温度由  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  降到  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  时,β-葡萄糖苷酶的活性由

100% 降到 0.01%,也就是说在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下,该酶基本失活。基于上述考虑,我们提出了“酶晶体低温抑活底物固定”方法。该方法是在低温环境下浸泡底物,此时酶基本失去活性,底物不易降解,而酶和底物结合的稳定性却大大提高,平衡后迅速进行液氮固定,首先,可以获得真实的酶-底物复合物结构;其次,可进一步提高底物的占有率和空间稳定性,提高底物电子密度的质量。

为了进行低温浸泡试验<sup>[11]</sup>,我们选择了 6-磷酸-β-葡萄糖苷酶 (BglA)。根据催化底物分解时是否需要辅因子,BglA 分两类:糖基水解酶家族 1 (Glycoside hydrolase family 1, GH1) 和糖基水解酶家族 4 (Glycoside hydrolase family 4, GH4)。GH4 的 6-磷酸-β-葡萄糖苷酶在催化底物分解时需要金属离子 ( $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  或  $\text{Fe}^{2+}$ ) 和  $\text{NAD}^{+}$  的辅助,同时需要一个还原性环境<sup>[12-15]</sup>,而 GH1 的 6-磷酸-β-葡萄糖苷酶则可以独立完成催化作用<sup>[16-17]</sup>,其大小约 50 kDa。BglA 于 1972 年首次从产气杆菌 *Aerobacter aerogenes* 中被分离得到<sup>[18]</sup>,随后 1974 年在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中又再次被纯化出来<sup>[19]</sup>。BglA 能专一性地水解 6-磷酸-β-葡萄糖苷键,可将底物对硝基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷-6-磷酸 (pNPβG6P) 水解为对硝基苯酚和 6-磷酸-β-葡萄糖<sup>[20-21]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*bglA* 基因 (EC31211186) 由上海捷瑞生物工程公司合成; 宿主杆菌主菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21 (DE3) 和载体 pET-28a 由本室保存; SDS-PAGE 低分子量标准购自中国科学院上海生物化学研究所; His-Trap<sup>TM</sup> HP 5 mL 购自于美国 GE 公司; 蛋白晶体筛选试剂 Crystal Screen HR2-110 和 HR2-112 购自美国 Hampton Research 公司; BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自美国 Pierce 公司; 底物 pNP $\beta$ G6P 由美国 National Institutes of Health (NIH) 的 Dr. John Thompson 提供。

### 1.2 BglA 的表达

将构建好的 pET-28a-*bglA* 重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3), 转化成功的单克隆菌株置于 20 mL LB 培养基中 (卡那霉素 5  $\mu$ g/mL), 过夜培养后接种于 2 L LB 摇瓶, 37  $^{\circ}$ C 振荡培养, 当  $OD_{600}$  达到 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度 0.001 mol/L, 37  $^{\circ}$ C 继续振荡 5 h, 6 000 r/min 离心 10 min 收集细菌。

### 1.3 BglA 的提取与纯化

收集的细菌用 80 mL PBS (pH 7.4) 重悬后, 超声波破碎裂菌, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。利用蠕动泵将上清液与 His-Trap HP 镍柱过夜结合。采用快速蛋白液相色谱法, 以缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0) 和缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 对结合有蛋白的镍柱进行梯度洗脱, 并进行蛋白峰收集及 SDS-PAGE 检测。收集到的蛋白在超滤液

缩管中置换成分子筛缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0), 经 Superdex 200 凝胶层析柱进一步纯化, 蛋白峰收集并再次进行 SDS-PAGE 检测。BCA 蛋白浓度测定法测定蛋白浓度。

### 1.4 蛋白晶体的生长

蛋白晶体的培养采用悬滴式蒸气扩散法, 筛选试剂来源于 Crystal Screen HR2-110 和 HR2-112 试剂盒。将 1  $\mu$ L 蛋白溶液与 1  $\mu$ L 池液混匀, 同 200  $\mu$ L 的池液进行气相平衡, 静置于 16  $^{\circ}$ C 环境生长。

### 1.5 常温试验

首先, 准备晶体板, 并制备防冻液。防冻液成分: 1  $\mu$ L 50% (V/V) 甘油, 2  $\mu$ L 池液 (0.1 mol/L N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸钠盐 (HEPES sodium), pH 7.5, 10% (V/V) 异丙醇和 20% 聚乙二醇 4 000 (Polyethylene glycol 4 000) (W/V))。制备好的防冻液放入晶体板。用尼龙环挑取 BglA 蛋白晶体, 放入防冻液中, 加入 3  $\mu$ L 20 mmol/L 底物 pNP $\beta$ G6P。用尼龙环挑出蛋白晶体与底物复合物, 放入液氮固定。

### 1.6 低温试验

准备低温晶体板, 用水将含有甘油的纸条润湿, 再将坐滴孔内加满水, 盖上玻璃盖, 以保持环境的湿度; 制备防冻液, 成分为: 1  $\mu$ L 50% (V/V) 甘油, 2  $\mu$ L 池液 (0.1 mol/L N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸钠盐 (HEPES sodium), pH 7.5, 10% (V/V) 异丙醇和 20% 聚乙二醇 4 000 (Polyethylene glycol 4 000) (W/V))。制备好的防冻液放入晶体板。之后用尼龙环挑取出 BglA 蛋白晶体, 放入防冻液中, 迅速置于 -20  $^{\circ}$ C 低温冰箱

中。静置 10 min 后, 迅速取出蛋白晶体板, 快速加入 3  $\mu$ L 20 mmol/L 底物 pNP $\beta$ G6P。再次将晶体板放回-20  $^{\circ}$ C 低温冰箱中。静置 10 min 后迅速取出晶体板, 用尼龙环挑出蛋白晶体与底物复合物, 放入液氮固定。

## 2 结果

### 2.1 BglA 的表达与纯化结果

为了有效地纯化蛋白, 在设计 *bglA* 重组序列时, 在 C 末端多加了 1 段由 6 个组氨酸构成的 His-tag。携带重组质粒 pET-28a-*bglA* 的 *E. coli* BL21 在 37  $^{\circ}$ C 经 IPTG 诱导后, 表达大量可溶性 BglA 蛋白, 分子量大小约 50 kDa。

利用组氨酸标签和咪唑的相互作用, 通过 His-Trap 层析柱梯度洗脱, 在 40 mmol/L 咪唑浓度及 60 mmol/L 浓度附近获得浓度较高的蛋白(图 1)。收集到的蛋白在超滤浓缩管中置换成分子筛缓冲液, 经 Superdex 200 凝胶层析柱, BglA 进一步被纯化(图 2), 随后用 BCA 法进行蛋白浓度测定, 蛋白浓度高达 8 mg/mL。

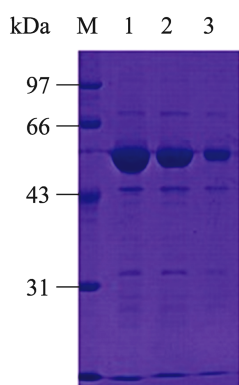


图 1 BglA 镍柱亲和层析之后电泳结果图

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of BglA after purified with a His-Trap HP column. M: protein marker. The collected fractions of BglA corresponding to the SDS-PAGE lanes 1,2,3.

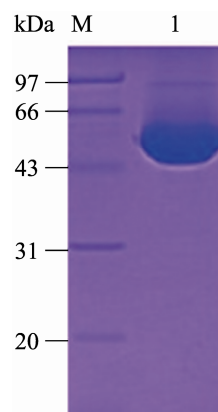


图 2 BglA 凝胶过滤层析之后电泳结果图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of BglA after purified with a Superdex 200 10/300 column. M: protein marker. The collected fraction of BglA corresponding to the SDS-PAGE lane 1.

### 2.2 晶体生长结果

晶体的生长条件筛选选用 Hampton Research 的 Crystal Screen 的 HR2-110 和 HR2-112 试剂盒, 共 98 个不同条件的池液, 每个池液含有缓冲液, 沉淀剂和盐 3 类成分。观察发现有几个不同的条件均生长出了晶体, 其中在池液成分为 0.1 mol/L HEPES sodium (pH 7.5)、10% (V/V) 2-propanol、20% (W/V) PEG 4 000 的生长条件下, 经过 2 周的时间, 生长出了能够达到 X 射线衍射条件的晶体(图 3)。

### 2.3 数据收集、处理结果及底物电子密度图

在-20  $^{\circ}$ C 的低温条件下, 利用“酶晶体低温抑活底物固定”方法, 将 BglA 晶体与底物进行浸泡, 并用液氮固定, 通过 X 射线进行衍射数据收集并处理, 获得了完整的底物电子密度图。BglA 晶体衍射数据的空间群属于 P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, 最高分辨率为 2  $\text{Å}$ , 结构采用分子置换法解析。数据收集和优化的统计数据如表 1 所示。在利用“酶晶体低温抑活底物固定”方法进行低温试验前, 我们选用前期生长良好的 BglA 晶体, 使用常规



图3 在某一条件下得到的蛋白晶体

Fig. 3 Crystals of BglA. The crystals of BglA grown at 16 °C, and the longest dimension of the crystals is 290 μm.

表1 BglA 晶体衍射数据

Table 1 Data collection and refinement statistics

Data collection	BglA
Space group	$P2_12_12_1$
<b>Cell dimensions</b>	
a, b, c (Å)	52.841, 103.695, 185.075
Resolution (Å)	50.00–2.00 (2.07–2.00)
$R_{\text{merge}}$	0.098 (0.536)
$I/\sigma(I)$	15.267 (3.442)
Completeness (%)	93.1 (97.7)
Redundancy	5.1 (5.3)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	41.07–2.00
No. of reflections	61 382
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.236 7/0.281 5
<b>r.m.s deviation</b>	
Bond length	0.018 8
Bond angle	1.705 4
Mean B factor (Å <sup>2</sup> )	28.5
Water molecules	79

Values in parentheses are from the highest resolution shell.

方法,进行了酶与底物浸泡的对比试验。所用晶体的空间群属于 I222, 晶胞参数为  $a=69.441 \text{ \AA}$ ,  $b=86.902 \text{ \AA}$ ,  $c=161.765 \text{ \AA}$ , 最高分辨率为  $2.4 \text{ \AA}$ , 结构采用分子置换法解析。经优化处理后得到了水解底物的电子密度图。通过对比的衍射电子密度图显示,底物 pNPβG6P 在经低温处理的 BglA 晶体结构中有完整的电子密度;对于未经低温处理的 BglA 晶体,底物在相应位置已经被水解(图 4)。

### 3 讨论

#### 3.1 低温防冻剂配方的选择

在利用“酶晶体低温抑活底物固定”方法进行低温试验时,选用甘油作为主防冻剂,但当用尼龙环挑出单颗晶体放入防冻剂之后,晶体出现了迅速融化的现象。之后,我们对此环节进行改进,尝试放入多颗晶体,以使溶液达到饱和状态。在放入第 1 颗晶体时,晶体依然很快融化;继续放入第 2 颗,晶体只是部分开裂;放入第 3 颗晶体后,该晶体完好。另外,我们也尝试将晶体加入不含甘油的池液,晶体并未开裂或融化,但经过  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  低温处理后,再次观察发现晶体部分开裂,用尼龙环挑晶体时出现了断裂现象,说明此时的晶体脆性增强,防冻剂的保护不可或缺。因此,找到适合各种温度的多体系低温防冻剂配方,使晶体不易开裂并可以承受更深的低温是我们需要进一步解决的问题。

#### 3.2 “酶晶体低温抑活底物固定”方法对底物电子密度的影响

本研究使用的“酶晶体低温抑活底物固定”方法,是在  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下将 BglA 晶体与 pNPβG6P 进行浸泡,通过 X 射线收集衍射数据

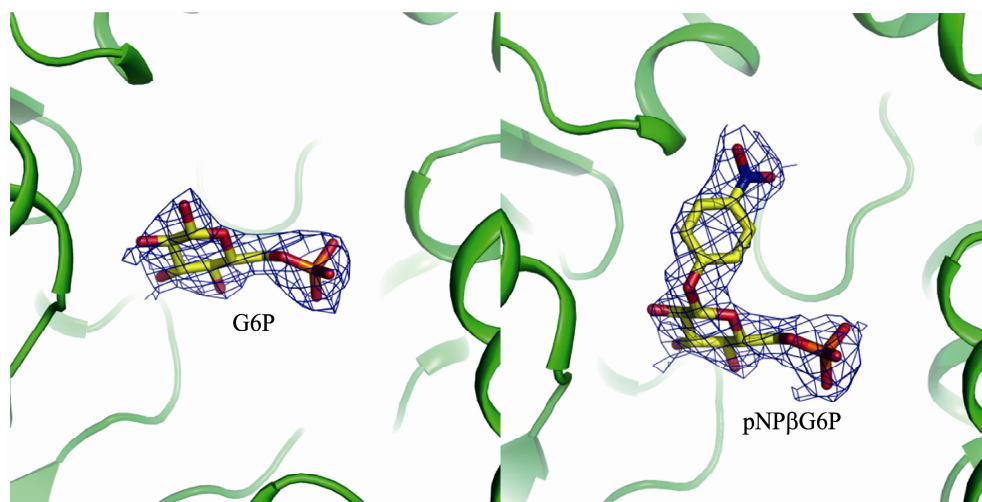


图 4 不同条件下获得的底物电子密度图

Fig. 4 Comparison between the electron density of bound substrates from two methods. 2Fo-Fc electron density map is contoured at  $1.0 \sigma$ , the left shows that the substrate was hydrolyzed at normal temperature, the right shows that the electron-density of the substrate was intact at  $-20^\circ\text{C}$ .

并处理, 最终获得了完整的底物电子密度图。与常规方法相比较, 使用的底物相同, 但取得的效果却差别明显。我们认为, 用常规方法无法获得完整的底物电子密度, 因为一般酶在常规温度下都能够迅速水解底物, 而“酶晶体低温抑活底物固定”方法是在保持天然结构的状态下, 将酶活力降低到几乎失活的水平, 延缓底物的水解。另外在低温状态下, pNP $\beta$ G6P 的  $\beta$  糖苷键的柔性会降低, 使得硝基苯基团的位置更固定, 也有利于取得较好的电子密度。

### 3.3 低温酶学及复合物中间态的进一步研究

为了进一步试验“酶晶体低温抑活底物固定”方法在低温酶学研究领域的普适性, 在获得了 BglA 与其底物复合物的实际结构后, 我们还利用本实验室现有的酰亚胺酶 (Imidase) 与其特异性底物进行了浸泡试验, 获得了比较完整的

底物电子密度图。由于复合物晶体的衍射数据低于  $3 \text{ \AA}$ , 我们正在进行进一步的优化筛选, 以期获得优于  $3 \text{ \AA}$  的数据结果, 进而得到理想的底物电子密度图。另外, 我们也正在选择其他的酶与底物进行低温浸泡试验, 进一步扩大复合物中间态的研究范围。

### 3.4 低温条件下的单晶生长

从“酶晶体低温抑活底物固定法”自然派生出的一个思路便是研究深低温条件下生物大分子单晶生长的技术。如前所述, 在深低温条件下生物大分子有着更好的化学稳定性和构象一致性, 有望得到分辨率更高的晶体。目前, 我们已经利用溶菌酶在  $-20^\circ\text{C}$  低温环境下进行晶体生长实验, 以不同浓度 DMSO 替代甘油作为主防冻剂进行梯度试验, 获得了生长良好的晶体, 并得到了较高分辨率的衍射数据。

## REFERENCES

- [1] Heras B, Martin JL. Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2005, 61(9): 1173–1180.
- [2] Abergel C. Spectacular improvement of X-ray diffraction through fast desiccation of protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60(8): 1413–1416.
- [3] Su D, Lou ZY, Sun F, et al. Dodecamer structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10. *J Virol*, 2006, 80(16): 7902–7908.
- [4] Liu Y, Xiong Y, Naidenko OV, et al. The crystal structure of a TL/CD8 $\alpha\alpha$  complex at 2.1 Å resolution-implications for modulation of T cell activation and memory. *Immunity*, 2003, 18: 205–215.
- [5] Bowman GD, O'Donnell M, Kuriyan J. Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature*, 2004, 429(6993): 724–730.
- [6] Mi Y, Wood G, Thoma L. Cryoprotection mechanisms of polyethylene glycols on lactate dehydrogenase during freeze-thawing. *AAPS J*, 2004, 6(3): e22.
- [7] Dobrianov I, Kriminski S, Caylor CL, et al. Dynamic response of tetragonal lysozyme crystals to changes in relative humidity: implications for post-growth crystal treatments. *Acta Cryst Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2001, 57(1): 61–68.
- [8] Kuo A, Bowler MW, Zimmer J, et al. Increasing the diffraction limit and internal order of a membrane protein crystal by dehydration. *J Struct Biol*, 2003, 141: 97–102.
- [9] Ellis MJ, Antonyuk S, Hasnain SS. Resolution improvement from 'in situ annealing' of copper nitrite reductase crystals. *Acta Cryst Crystallogr D Biol Crystallogr*, 58: 456–458.
- [10] More N, Daniel RM, Petach HH. The effect of low temperatures on enzyme activity. *J Biochem*, 1995, 305(1): 17–20.
- [11] Liu WD. Structural analysis of hydroxyquinol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* DLL-E4 and crystallographic study on two pesticide degradation related enzymes [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese).  
刘卫东. *Pseudomonas putida* DLL-E4 1,2,4-苯三酚 1,2-双加氧酶的晶体结构及两种农药降解相关酶的蛋白质晶体学研究[D]. 南京农业大学, 2010.
- [12] Raasch C, Streit W, Schanzer J, et al. *Thermotoga maritima* AglA, an extremely thermostable NAD<sup>+</sup>-, Mn<sup>2+</sup>-, and thiol-dependent alpha-glucosidase. *Extremophiles*, 2000, 4(4): 189–200.
- [13] Robrish SA, Fales HM, Gentry-Weeks C, et al. Phosphoenolpyruvate-dependent maltose: phosphotransferase activity in *Fusobacterium mortiferum* ATCC 25557: specificity, inducibility, and product analysis. *J Bacteriol*, 1994, 176(11): 3250–3256.
- [14] Suresh C, Rus'd AA, Kitaoka M, et al. Evidence that the putative alpha-glucosidase of *Thermotoga maritima* MSB8 is a pNP alpha-D-glucuronopyranoside hydrolyzing alpha-glucuronidase. *FEBS Lett*, 2002, 517(1/3): 159–162.
- [15] Thompson J, Gentry-Weeks CR, Nguyen NY, et al. Purification from *Fusobacterium mortiferum* ATCC 25557 of a 6-phosphoryl-O-alpha-D-glucopyranosyl: 6-phosphoglucohydrolase that hydrolyzes maltose 6-phosphate and related phospho-alpha-D-glucosides. *J Bacteriol*, 1995, 177(9): 2505–2512.
- [16] Thompson J, Robrish SA, Bouma CL, et al. Phospho-beta-glucosidase from *Fusobacterium mortiferum*: purification, cloning, and inactivation by 6-phosphoglucono-delta-lactone. *J Bacteriol*, 1997, 179(5): 1636–1645.
- [17] Thompson J, Ruvinov SB, Freedberg DI, et al. Cellobiose-6-phosphate hydrolase (CelF) of *Escherichia coli*: characterization and assignment to the unusual family 4 of glycosylhydrolases. *J Bacteriol*, 1999, 181(23): 7339–7345.

- [18] Palmer RE, Anderson RL. Cellobiose metabolism in *Aerobacter aerogenes* 3. Cleavage of cellobiose monophosphate by a phospho- $\beta$ -glucosidase. *J Biol Chem*, 1972, 247(11): 3420–3423.
- [19] Wilson G, Fox CF. The beta-glucoside system of *Escherichia coli* IV. Purification and properties of phospho-beta-glucosidases A and B. *J Biol Chem*, 1974, 249(17): 5586–5598.
- [20] Yin J, Liu YW, Li J, et al. Cloning, expression, crystallization and characterization of a novel 6-phospho- $\beta$ -glucosidase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2008, 24(10): 916–924 (in Chinese).  
尹捷, 刘一苇, 李洁, 等. 腾冲嗜热厌氧杆菌 6-磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶的表达与结晶及其功能鉴定. *生物化学与分子生物学报*, 2008, 24(10): 916–924.
- [21] Totir M, Echols N, Nanao M, et al. Macro-to-micro structural proteomics: native source proteins for high-throughput crystallization. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e32498.

(本文责编 郝丽芳)



## Nature: 蛋白结构分析的新里程碑

利用 X 射线晶体学技术研究蛋白质结构, 需要用许多已知数据来填补数据的缺口。而现在, 科学家们应用 X 射线新技术, 从头解析了蛋白质的准确结构, 构建了该蛋白的完整 3D 模型, 这是蛋白结构分析的一个重要里程碑。

溶菌酶 (Lysozyme) 是一种已经被广泛研究的蛋白。日前, 美国能源部 (DOE) SLAC 国家加速器实验室的研究人员, 使用直线加速器相干光源 LCLS (Linac Coherent Light Source) 和复杂的计算机分析工具, 从头生成了溶菌酶的准确模型。这项研究于 11 月 24 日发表在 *Nature* 杂志上。

一直以来, 由于许多重要蛋白的结晶体太小, 传统的 X 射线技术难以对其进行分析。而 LCLS 的特殊性质能够帮助人们解析更小的结晶体, 揭示更多重要的蛋白质结构。

在用 X 射线技术确定蛋白结构时, 需要综合海量数据以获得足够准确的信号, 对于缺乏参考数据的蛋白来说, 并不那么实用。“现在我们的实验显示, 新 X 射线技术可以从头展现未知生物结构的确切信息。”马普医学研究所的科学家 Thomas Barends 说。

蛋白的结构直接决定着它们的功能 (例如, 蛋白与其他分子的结合/相互作用), 蛋白结构分析能够为人们提供重要信息, 帮助人们开发高度靶向性的治疗药物。迄今为止, 人们所了解的蛋白结构大多离不开 X 射线晶体学技术。一个世纪以来, 许多诺贝尔奖成果都得益于这一技术。

早在数十年前, 人们就解析了溶菌酶的结构。现在研究人员利用这一蛋白, 来考量新 X 射线技术的准确性。他们将溶菌酶晶体浸泡在含有钨的溶液中, 这种金属与溶菌酶结合, 能够在 X 射线的照射下产生强信号。研究者们利用钨原子的这种信号, 对溶菌酶分子的结构进行了准确的重建。

研究团队准备进一步调整和改善这一技术, 将其应用于更多更复杂的蛋白质, 如膜蛋白。膜蛋白承担了大量的重要细胞功能, 是新药研发中的重要靶标, 然而人们目前只知道少数膜蛋白的结构。

“这项研究是一个重要的里程碑,” 曼彻斯特大学的化学教授 John R. Helliwell 说。“X 射线技术迎来了新的机遇, 可以解析更小样本的 3D 结构, 这一点令人鼓舞。”

LCLS 在短短几年的应用中, 就获得了如此成就, Barend 相信“X 射线检测设备、相关软件以及结晶技术的进一步发展, 定会在不久的将来催生更多的新成果”。

(来源: 生物通 日期: 2013-11-27)