

[研究快报]

# 金属硫蛋白溶液聚合状态的研究

侯廷军<sup>1</sup> 安 钰<sup>2</sup> 毕汝昌<sup>3</sup> 茹炳根<sup>2</sup> 徐筱杰<sup>1</sup>

(1. 北京大学化学与分子工程学院, 2 北京大学生命科学学院, 北京 100871;  
3 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

关键词 金属硫蛋白; 聚合; 分子识别

中图分类号 O614

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2000)01-0082-03

通过动态光散射实验首次证明了兔肝金属硫蛋白亚型 I 和 II 在不同的缓冲体系中不仅仅是以二聚体的形式, 而且是以多种聚合形式存在<sup>[1]</sup>. 深入考察金属硫蛋白在溶液中的聚合形式对于研究金属硫蛋白的结构和功能都具有非常重要的意义

我们通过计算机模拟<sup>[1]</sup>比较系统地研究了各种因素对金属硫蛋白聚合的影响. 结果表明, 在溶液聚合的分子识别过程中可由多种因素共同调控金属硫蛋白, 这些因素主要包括静电相互作用、疏水性相互作用和溶液中阴阳离子等. 通过这些因素的综合分析, 首次对兔肝金属硫蛋白在溶液中多种聚合形式的形成机制及相应的分子识别过程作出了完整而合理的解释, 同时对大鼠金属硫蛋白亚型 II 的溶液聚合状态进行了初步预测

## 1 实验部分

兔肝金属硫蛋白亚型 I 和 II 在溶液中的聚合状态通过 DynaPro-801 动态光散射仪 (Protein Solutions, Inc., USA) 测定. 所有试剂纯度均为分析纯以上. 将蛋白质样品液于 4℃ 放置过夜, 以 10 000 r/min 的旋转速度离心 12 min, 将其中的悬浮微粒充分沉淀后, 立即将蛋白质样品上清液转移至一新管中, 以防止沉淀浮起, 并弃去沉淀.

DynaPro-801 动态光散射仪通过标准牛血清白蛋白 (BSA) 校准, 再用二次重蒸水清洗样品液通路至零点. 最后通过与仪器连接的 PC 机的 DYNAMICS 软件进行分析得到测试结果. 实验采用了酸碱度在 pH 5.6~8.5 以及 pH 10.6 下的不同缓冲体系.

理论计算部分均采用 NSIGHT II 分子模拟软件包<sup>[2]</sup>, 在 SGIO2 R10000 工作站上进行. 各种聚合体中的静电相互作用通过静电势表面计算, 疏水性相互作用通过分子溶剂可及性表面来计算, 单体和聚合体的动力学稳定性则通过分子动力学考察.

## 2 结果与讨论

通过蛋白质溶液动态光散射实验以及影响金属硫蛋白聚合状态各种因素的研究, 可以解释金属硫蛋白在不同溶液中的聚合状态和分子识别过程.

在二次重蒸水中, 兔肝金属硫蛋白亚型 I 和 II 分子均是以单体形式存在, 这说明所纯化的蛋白质样品是单体, 没有出现因为操作失误而造成的交联, 预示了兔肝金属硫蛋白亚型 I 和 II 分子在其它缓冲体系中的存在状态是蛋白质样品分子在缓冲体系中的自然表现. 疏水表面的计算结果表明金属硫蛋白单体与单体之间的疏水性相互作用并不很强, 仅仅依靠疏水性相互作用不能形成稳定的二聚体. 虽然单体与单体的静电相互作用呈现出一定的互补性, 但还不足以稳定二聚体的构象. 因此, 在二次重蒸水体系中金属硫蛋白以单体形式存在. 预计大鼠金属硫蛋白亚型 II 也应以单体形式存在.

2.1 pH 4.6~8.5 的缓冲体系 为便于比较, 首先考察酸碱度 pH 4.6~8.5 的不同缓冲体系, 结果见

收稿日期: 1999-06-29

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (批准号: 29992590) 资助

联系人简介: 徐筱杰 (1937 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事计算化学研究

表1. 因二次重蒸水体系的酸碱度值也在这个范围之内, 通过与二次重蒸水体系进行比较发现, 除酸碱度外, 还存在影响兔肝金属硫蛋白聚合的其它因素

Table 1 The existing behaviour of rabbit liver metallothioneins in different buffers(pH 5.6~ 8.5)

Buffer	MT- I	MT- II
HA c-NaAc(0.1 mol/L, pH 4.6)	Dimer	Trimer
Citrate acid-Na citrate(0.1 mol/L, pH 5.6)	Dimer	Trimer
HCl-Na cacodylate(0.1 mol/L, pH 6.5)	Dimer	Trimer
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.1 mol/L, pH 7.5)	Trimer of tetramer	Tetramer
Tris-HCl(0.1 mol/L, pH 8.5)	Trimer	Trimer or tetramer

在乙酸-乙酸钠、柠檬酸-柠檬酸钠和盐酸-二甲砷酸钠等体系中, 由于金属钠离子在负电势孔道中的结合稳定了金属硫蛋白二聚体的构象。静电势分析表明兔肝金属硫蛋白亚型 I 的二聚体与单体之间的静电相互作用主要体现为负电势之间的静电排斥, 而且兔肝金属硫蛋白亚型 I 三聚体中二体与单体之间的疏水性相互作用相对较弱, 所以在这一组缓冲体系中, 兔肝金属硫蛋白亚型 I 以二聚体形式存在。但兔肝金属硫蛋白亚型 II 三聚体中二聚体与单体之间的静电排斥作用明显弱于兔肝金属硫蛋白亚型 I, 而且兔肝金属硫蛋白亚型 II 三聚体中的二体与单体之间的疏水性相互作用很强, 足以克服弱的静电排斥而形成三聚体。但兔肝金属硫蛋白亚型 II 的三聚体形成后, 构象变化使得三聚体与单体在另一侧的三体界面上很难形成好的几何匹配, 从而不能形成四聚体。

大鼠金属硫蛋白亚型 II 三聚体中单体和二体之间的疏水性相互作用比兔肝金属硫蛋白亚型 I 的要强一些。疏水相互作用应该足以克服单体和二聚体之间的静电排斥, 但二聚体中两个单体的  $\beta$  结构域的柔性相对较大, 所以在这一缓冲体系中, 预计大鼠金属硫蛋白亚型 II 以二聚体(或二聚体与少量不稳定的三聚体)形式存在。

在 Tris-HCl 体系中, 阳离子是 Tris-H<sup>+</sup> 离子。Tris-H<sup>+</sup> 能部分地中和金属硫蛋白的单体中的二体界面的负电势, 单体与单体之间的疏水相互作用成为稳定金属硫蛋白二聚体主要的相互作用。在这种缓冲体系中, 金属硫蛋白的二聚体不如在含金属钠离子的缓冲体系中的二聚体结合紧密, 但这反而有利于二聚体与单体在三体界面上形成三聚体。在这种缓冲体系中, 二聚体的形成为三聚体的形成提供了基础, 而三聚体的形成则稳定了二聚体的构象。但三聚体形成过程中构象的变化会破坏三聚体与单体在另一个三体界面上的几何匹配, 所以兔肝金属硫蛋白亚型 I 以三聚体形式存在, 而兔肝金属硫蛋白亚型 II 由于三聚体与单体在另一个三体界面上的疏水性相互作用比较强, 因此以三聚体或四聚体形式存在。估计大鼠金属硫蛋白亚型 II 是以三聚体形式存在。

在磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲体系中, 阳离子也是金属钠离子, 但由于阴离子变为磷酸根离子, 所以金属硫蛋白的聚合状态也发生了变化。磷酸根离子在  $\beta$  结构域和柔性区之间的结合使得二聚体的稳定性相应增加, 在形成三聚体的过程中的构象变化不会破坏另外一个三体界面, 因此三聚体与单体形成四聚体的能垒会大大降低, 所以兔肝金属硫蛋白亚型 II 以四聚体形式存在。而兔肝金属硫蛋白亚型 I 形成三聚体后, 由于三聚体与单体在另一个三体界面上的疏水相互作用比较弱, 只能形成不稳定的四聚体。通过比较可以推测大鼠金属硫蛋白亚型 II 也是以较稳定的四聚体形式存在。

2.2 Tris 体系 在 Tris 体系中, 酸碱度变为 pH 10.6, 金属硫蛋白的二聚体与单体之间的静电排斥作用增强, 所以兔肝金属硫蛋白亚型 I 以二聚体形式存在(表2), 而兔肝金属硫蛋白亚型 II 尽管由于二聚体与单体之间的疏水性相互作用比较强, 能形成三聚体, 但形成的三聚体已经变得不稳定。在同样条件下, 大鼠金属硫蛋白亚型 II 也会以二聚体形式存在。

Table 2 The existing behaviour of rabbit liver metallothioneins in Tris solution (with or without CaCl<sub>2</sub>)

Buffer	MT- I	MT- II
Tris(25 mmol/L, pH 10.6)	Dimer	Dimer or trimer
Tris(12 mmol/L, pH 10.6) + CaCl <sub>2</sub> (0.2 mol/L)	Dimer	Dimer

在 Tris 体系中加入 CaCl<sub>2</sub>后, 由于金属钙离子的结合作用, 使金属硫蛋白的二聚体结合得更加紧密, 即使兔肝金属硫蛋白亚型 II 也不能形成三聚体, 这与实验结果完全吻合。预计大鼠金属硫蛋白亚

型 II 也是以二聚体形式存在

### 参 考 文 献

- 1 AN Yu(安 钰). Ph. D. Thesis, Peking Univ. (北京大学博士论文)[D], Beijing, 1999: 1—100
- 2 NSIGHT II, User Guide, Molecular Simulation Package[M], San Diego: Molecular Simulation Inc., 1999: 1—300

## Studies on the Metallothionein Polymerization in Different Buffers

HOU Ting-Jun<sup>1</sup>, AN Yu<sup>2</sup>, BIRu-Chang<sup>3</sup>, RU Bing-Gen<sup>2</sup>, XU Xiao-Jie<sup>1\*</sup>

(1. College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University,

2. College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

3. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** In this paper, the naturally occurred polymerization for rabbit metallothionein monomers has been studied in different milieu, while leaves out the aggregation caused by the oxidation of cysteine, since the latter circumstance was the result of purification lapsus. After the purification of metallothionein monomers, dynamic light scattering technique is used to detect the polymerized states of rabbit liver metallothionein I and II in different buffers, which is the first systematical detection of polymerized states of MTs in solutions. The effects of different factors contributing to methothionein aggregations have been investigated by computational simulations. The calculation results showed that the metallothionein polymerization would be regulated by many factors including electrostatic interactions, hydrophobic interactions and different ions in buffers. A molecular recognition mechanism of MTs' polymerization in solutions is proposed on the bases of experimental results and theoretical calculations.

**Keywords** Metallothionein; Polymerization; Molecular recognition

(Ed: R, J, L)

(上接81页)

序号	刊名	主办单位	主管部门	序号	刊名	主办单位	主管部门
37	石油地球物理勘探	石油地球物理勘探局	中国石油天然气集团公司	50	现代化工	中国化工信息中心	国家石油和化学工业局
38	建筑技术	北京建工集团总公司	北京市科委	51	中国兽医科技	中国农科院兰州兽医研究所	农业部
39	中国农村水利水电	水利部农村水利司	水利部	52	新建筑	华中理工大学	湖北省科委
40	工业建筑	冶金部建筑研究总院	国家冶金工业局	53	机车电传动	铁道部株洲电力机车研究所	铁道部
41	上海环境科学	上海市环境保护局	上海市建设委员会	54	特种铸造及有色合金	中国机械工程学会	中国科协
42	石油炼制与化工	石油化工科学研究院	中国石化集团公司	55	稀有金属材料与工程	国家有色金属工业局	陕西省科委
43	中国药学杂志	中国药学会	中国科协	56	中国新药与临床杂志	中国药学会	中国科协
44	合成橡胶工业	兰州化学工业公司 中国石化集团公司 合成橡胶技术开发中心	中国石化集团公司	57	中医杂志	上海医药管理局科技情报所 中国中医药学会	国家医药管理局
45	中国机械工程	中国机械工程学会	中国科协	58	家庭医生	中山医科大学	卫生部
46	湖北农业科学	湖北省农业科学院 湖北省农业厅 华中农业大学 湖北农垦总公司	湖北省农业科学院	59	汽车与驾驶维修	中国科协普及工作部	中国科协
47	工程塑料应用	兵器工业第五三研究所 中国工程塑料工业协会等	中国兵器工业总公司	60	无线电	中国电子学会	中国科协
48	材料保护	武汉材料保护研究所	武汉材料保护研究所	61	农村百事通	江西科学技术出版社	江西省科委
49	电池	全国电池工业信息中心 湖南轻工研究所	国家轻工局	62	大众医学	上海科学技术出版社	上海市科委
				63	航空知识	中国航空学会	中国科协
				64	少年科学画报	北京出版社	北京出版社

\* 原载《科技日报》1999年12月2日第7版