

江浙蝮蛇毒碱性磷脂酶 A₂ 新单斜晶型晶体结构测定

赵克浩 柴笑梅 宋时英 林政炯*

(中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

周元聪

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 江浙蝮蛇毒碱性磷脂酶 A₂ 具有溶血和抗凝血活性。在不含正辛基吡喃葡萄糖苷(*n*-octyl β-*o*-glucopyranoside, 简称 β-OG) 结晶条件下, 培养出该酶新单斜晶型晶体。采用 X 射线晶体学方法, 成功地解出了不对称单位含 4 个分子的新单斜晶型结构。在分子置换研究中运用自身与交叉旋转函数的联合分析, 在结构修正中使用非晶体学对称性制约, 最终结构模型具有可接受的晶体学 *R* 因子和合理的立体化学参数。与已报道的结合 β-OG 的单斜晶型结构类似, 新晶型中分子也形成具有二重对称性的、被界面识别部位连接的二体, 两个二体再通过非晶体学二重轴联系形成一个赝 222 对称的四聚体。结晶条件改变对四体在晶胞中的堆砌产生重要影响, 导致晶胞参数的显著变化, 然而对二体和四体本身影响较小, 表明单斜晶型中观察到的二体与四体是稳定的。

关键词 蛇毒磷脂酶 A₂; X 射线晶体学; 三维结构; 寡聚体

磷脂酶 A₂(PLA₂, EC3.1.1.4) 广泛存在于生物体内, 尤其富含于哺乳动物胰脏的分泌液和蛇与昆虫的毒液中。来源于蛇毒的 PLA₂ 表现出丰富多样的药理活性, 目前已观察到的由这一类 PLA₂ 引起的药理和病理效应包括: 突触前神经毒性, 肌肉毒性, 心脏毒性, 出血毒性, 溶血毒性, 对血小板聚集的促进或抑制, 抗凝, 肌肉坏死, 水肿, 低血压, 惊厥等^[1,2]。对蛇毒 PLA₂ 的深入研究将有助于进一步揭示其结构和药理活性之间的关系, 对设计新型药物可能具有重要的指导意义^[3,4]。

从江浙蝮蛇毒中分离纯化得到了三种 PLA₂, 按等电点不同分别称之为酸性、中性和碱性 PLA₂。尽管它们的氨基酸序列同源性高达 50% 以上, 却表现出不同的药理活性。其中碱性 PLA₂(BPLA₂) 是一种强烈的溶血毒素^[5,6], 同时具有很强的抗凝血活性^[7]。测定和比较不同晶型 BPLA₂ 的三维结构将有助于揭示晶格力对蛋白质分子结构的影响, 确定分子的刚性与柔性部位、以及探讨分子的聚集态, 从而更好地了解 BPLA₂ 三维结构与功能关系。我们已经测定了 BPLA₂ 正交晶型晶体结构^[8,9]和结合 *n*-

octyl β-*o*-glucopyranoside(β-OG) 的单斜 C₂ 晶型晶体结构^[10] [以下称 C χ (I)], 并讨论了该酶三维结构与功能的关系, 特别是与溶血活性和抗凝血活性的关系。本文重点报道不含 β-OG 条件下培养出的 BPLA₂ 新 C₂ 晶型 [以下称 C χ (II)] 的分子置换法结构测定, 以及和其他晶型结构的比较。

1 材料和方法 (Materials and Methods)

1.1 酶的分离纯化

蝮蛇毒 BPLA₂ 的分离纯化参照文献 [11], 纯化后的蛋白质经 RP-HPLC、聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定均为一条带。在文献 [12] 给出的结晶条件下, 可长出 BPLA₂ 单斜 C χ (II) 晶体, 但是晶体存在严重孪生现象。经过多次改变 pH 值、蛋白质浓度、沉淀剂浓度以及盐浓度等实验, 最后在 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5) 中、150 g/L PEG 4000 沉淀剂、0.1 mol/L Li₂SO₄ 添加剂以及 10 g/L 蛋白质条件下, 两周之内长出了可供 X 射线衍射用的 C χ (II) 晶体。

1.2 X 射线衍射数据收集与处理

单斜晶型 C χ (II) 的衍射数据是在 SIEMENS X-200 面探测仪上收集。X 射线由 Rigaku 转靶 X 射线发生器发生, 波长为 1.5418 Å (1 Å = 0.1 nm), 功率 10 kW。晶体中心与探测器距离为 14 cm, θ

收稿日期: 2001-01-12 接受日期: 2001-03-05
中国科学院重大项目资助 (KJ 951-A1-601)

* 联系人: Tel, 010-64888513; Fax, 010-64877837; e-mail, lin@sun5.ibp.ac.cn

Table 1 Crystallographic data for C χ (II) crystal form

Cell parameters	$a = 99.77 \text{ \AA}$ (100.45 \AA) ^a
	$b = 54.05 \text{ \AA}$ (54.29 \AA) ^a
	$c = 116.75 \text{ \AA}$ (108.39 \AA) ^a
	$\beta = 120.70^\circ$ (111.76°) ^a
$V_n(\text{\AA}^3/\text{Da})$	2.42 (2.45) ^a
No. of observations	20993
No. of unique reflections	10240
Resolution (\AA)	2.8
Completeness (last shell) (%)	76.3 (65.0)
R_{merge} (last shell) (%)	7.37 (16.7)
Model	
No. of protein atoms in a.u.	3892
No. of water molecules in a.u.	30
R (%) $\{8.0 - 2.8 \text{ \AA}, F > 2\sigma\} / R_{\text{free}}$ (%)	17.8/31.3
RMS deviations	
Bond distances (\AA)	0.008
Bond angles ($^\circ$)	1.24
Dihedral angles ($^\circ$)	26.8
Improper angles ($^\circ$)	0.57
Luzzati plot error (\AA)	0.30
B -factor (\AA^2)	
Main-chain/Side-chain	15.9/17.9
Water molecules	14.5
Ramachandran plot : non-Gly in	
most favoured regions (%)	89.3
Additionally allowed regions (%)	10.7

^aThe values in brackets are those from $C\alpha$ I).

角为 15° 。收集到的数据用 XENGEN (Howard, 1987) 软件包在 Micro Vax II 计算机上处理。按 $C2$ 空间群处理衍射数据, 结果 R_{merge} 为 7.37%, 在 2.8 \AA 范围内共收集到 10 240 个独立衍射点。晶胞参数为 $a = 99.77 \text{ \AA}$, $b = 54.05 \text{ \AA}$, $c = 116.75 \text{ \AA}$, $\beta = 120.71^\circ$ 。按 Matthews^[13] 方法估算其晶胞不对称单位含 4 个分子, 每道尔顿分子量蛋白质所占体积为 $2.42 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, 溶剂含量约为 49.2%。表 1 给出了最终的数据统计结果。从表 1 可以看出, 不含 β -OG 条件下培养出的 BPLA₂ $C\alpha$ (II) 晶型晶体与结合 β -OG 的 $C\alpha$ (I) 晶型比较, 其晶胞参数有显著差别, c 轴相差 8 \AA , β 角相差 9° , 所以两个晶型不能视为同晶, 可认为 $C\alpha$ (II) 是新晶型。

1.3 分子置换法

由于 $C\alpha$ (II) 晶型一个不对称单位中有 4 个分子, 结构解析有一定的难度。采用 CCP4 程序库中的 Polarrfn 程序^[14] 计算自身旋转函数, 结果在不同积分半径和分辨率范围条件下都可以得到几个稳定且相对突出的峰。表 2 列出积分半径为 20 \AA 和分辨率范围为 $8.0 \sim 3.0 \text{ \AA}$ 的自身旋转函数计算结果。其中峰 1 为原点峰, 峰 3、峰 4 和峰 5 的关系近似为互

相垂直(两两间的夹角分别为 89.1° , 89.2° 和 90.9°), 提示晶胞不对称单位中 4 个分子排布可能具有 $\bar{2}22$ 对称性, 峰 6 为最大干扰峰。

交叉旋转函数及平移函数的计算用 AMoRe 程序^[15]。以 BPLA₂ 正交晶型分子 A 为搜索模型^[8], 取模型晶胞大小 $75 \times 65 \times 60 (\text{\AA}^3)$ 计算, 给出了几个突出的交叉旋转函数解(表 2)。其中峰 1 和峰 2 最为突出, 具有较高的相关系数, 且满足 $Rc2 = Rs4 \times Rc1$ 的相互关系。式中 $Rs4$ 相当于自身旋转函数的峰 4, $Rc1$ 与 $Rc2$ 相当于交叉旋转函数峰 1 与 2。同时 $Rs4$ 还满足关系式 $Rc4 = Rs4 \times Rc3$ 。类似的关系还有: $Rc3 = Rs3 \times Rc2$, $Rc1 = Rs3 \times Rc4$, $Rc4 = Rs5 \times Rc2$, $Rc1 = Rs5 \times Rc3$ 。由此推论, 交叉旋转函数峰 1、峰 2、峰 3 和峰 5 可能给出了不对称单位中 4 个分子的真实取向。单体平移函数的计算结果表明, 交叉旋转函数峰 1、2 和 5 均能给出突出的相关系数, 尤以峰 1 最为明显。固定峰 1 进行二体平移函数计算, 除峰 2 和 5 外, 峰 3 也给出了明显的平移函数解。三体和平移函数的计算证实了这些峰的正确性。至此可以认为已找到了所有 4 个分子 (A, B, C, D) 的取向与位置。

经过 AMoRe 刚体修正(表 2), 四分子结构模型的相关系数升至 61.4%, R 因子降为 36.1%。Turbo/Frodo 图形分析软件^[16] 分析表明, 这 4 个分子在晶胞中堆积合理, 没有明显的过近接触, 4 个分子间的确存在着 $\bar{2}22$ 对称性的关系, 说明得到了正确的四分子结构解。

1.4 结构修正

由于 $C\alpha$ (II) 晶体的一个不对称单位含有 4 个分子, 并且衍射数据的分辨率只能用至 2.8 \AA , 所以结构修正的整个过程都使用了比较严格的非晶体学对称性(NCS)制约(主链 B 因子 σ 为 6.0 \AA^2 , x, y, z 权重为 $837.36 \text{ kJ/mol} \cdot \text{\AA}^2$; 侧链 B 因子 σ 为 12.0 \AA^2 , x, y, z 权重为 $418.68 \text{ kJ/mol} \cdot \text{\AA}^2$)^[17] 以弥补衍射数据量的不足。结构修正采用 XPLOR 3.851 程序^[18], 数据范围为 $8.0 \sim 2.8 \text{ \AA}$ ($F > 2\sigma$)。程序修正与手工调整交替进行, 用 R_{free} 因子监测修正过程。经几轮位置修正、一轮 3000 K 模拟退火和一轮限制性独立 B 因子修正, 最终模型的 R 因子降至 17.9%。修正结果在表 1 中给出。在钙结合部位的钙离子位置没有发现有峰值较重的电子密度存在, 提示该晶体结构中不含钙离子。这与晶体培养液中没有添加钙离子是一致的。

Table 2 Molecular replacement

self-rotation function									
Peak	α	β	γ	ω	φ	κ	Peak height	Note	
1	0.0	180.0	0.0	90	90	3.1	100.00	Origin	
2	0.0	67.9	180.0	33.9	0.0	180.0	50.35		
3	232.6	1 336	307.4	66.8	232.6	180.0	48.14	R ₃₃	
4	105.4	161.7	74.6	99.1	285.4	180.0	46.71	R ₃₄	
5	202.2	117.1	337.8	58.5	202.2	180.0	43.37	R ₃₅	
6	180.0	78.1	0.0	39	180.0	180.0	20.21	Background	
Cross-rotation function									
Peak	α	β	γ	CC			Note		
1 ^a	81.34	58.18	161.87	23.2			Re1		
2 ^a	281.15	63.55	319.12	21.3			Re2		
3 ^a	192.80	68.59	180.82	18.6			Re3		
4	149.40	55.89	134.37	16.6					
5 ^a	163.42	84.66	310.70	16.5			Re4		
6	246.36	44.09	81.64	16.0					
Translation fit function									
Peak	α	β	γ	x	y	z	CC	R	Molecule
1 ^a	83.27	58.56	160.25	0.16893	-0.00212	0.05425	61.4	36.1	A
2 ^a	281.15	63.55	319.12	0.81098	0.43709	0.81946	61.4	36.1	B
3 ^a	192.80	68.59	180.82	0.76251	0.07051	0.61944	61.4	36.1	C
5 ^a	163.42	84.66	310.70	0.44216	0.91255	0.30809	61.4	36.1	D

α, β, γ , Eulerian angles; x, y, z , fractional Cartesian coordinates; ω, φ, κ , polar coordinates; CC, correlation coefficients; ^areal peak.

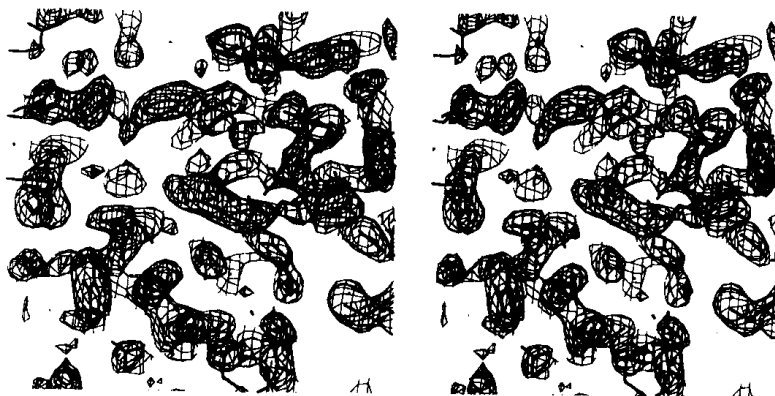


Fig.1 The final 2Fo-Fc electron density map in the region around Ca²⁺-binding loop contoured at the 1.0 σ level

2 结果和讨论 (Results and Discussion)

2.1 模型质量

C α II)修正模型含有不对称单位中全部4个蛋白质分子,共计3 832个非氢蛋白质原子以及30个有序水分子(表1)。Luzatti^[19]统计结果表明,整个模型坐标的误差为0.30 Å。PROCHECK程序^[20]分析表明所有氨基酸残基二面角均分布在合理的区域内,其中89.3%的残基位于二面角最佳区域,10.7%位于可接受区域。主链及侧链与电子密度匹配

的相关系数分别为0.82和0.79。4个分子主链电子密度清晰,只有位于溶剂区的 β -翼^[1]转角处78~81肽段、89~90肽段及C末端个别几个残基电子密度表现较差。图1示出A链部分肽段与其2Fo-Fc电子密度匹配的立体对图。主链原子的平均温度因子为15.9 Å²,侧链原子的平均温度因子为17.9 Å²。这些都表明结构模型是可靠的。

2.2 分子结构

由于在修正过程中采用了非晶体学对称性限制,因此在C α II)模型中,不对称单位所含4个分

子的结构应认为是等同的。以下用分子 A 进行分析比较。

2.2.1 与 $C2(I)$ 晶型结构比较 两种 $C2$ 晶型 $BPLA_2$ 分子的 α 碳原子叠合均方根偏差为 0.36 \AA ，如果去掉偏差较大的 Gly^{32} 和肽段 $56 \sim 59$ ，叠合偏差减至 0.29 \AA 。主链原子叠合的均方根偏差为 0.46 \AA ，偏差最大的部位为钙结合环区。某些位于分子表面的带电荷残基如 Arg^6 、 Lys^{11} 、 Glu^{53} 、 Lys^{54} 、 Lys^{111} 、 Lys^{129} 和 Lys^{132} 等的侧链构象也存在较大的差别。

2.2.2 与正交晶型结构比较 $C2(II)$ 晶型与正交晶型 $BPLA_2$ 主链 α 碳原子间的偏差为 0.47 \AA ，三段长螺旋 ($1 \sim 14$ 、 $39 \sim 55$ 和 $89 \sim 109$)和催化活性部位残基 (His^{48} 、 Asp^{99} 、 Tyr^{52} 和 Tyr^{73})都能很好地叠合，结构差别发生在：(1) 钙结合部位， Ser^{31} 、 Gly^{32} 和 Gly^{33} 的部分主链原子偏差高达 2.0 \AA ；(2) β -翼部位 (特别是转角处 $77 \sim 81$)，该部位伸向溶剂区；(3) C 末端肽段 $127 \sim 132$ ，不同于正交晶型，在 $C2(II)$ 晶型中此肽段参与了分子间的相互作用，电子密度较清晰；(4) 其他分子表面环区如 $53 \sim 67$ 肽段。

综上所述，在不同晶型中 $BPLA_2$ 分子三维结构十分相近，晶格力对分子结构的影响有限，只涉及分子表面某些肽段或侧链，然而钙结合部位构象易变，其构象与钙离子存在与否密切相关。结合了钙离子的正交晶型的钙结合部位结构紧密，而没有结合钙离子的单斜晶型的相应部位结构较松弛。

2.3 聚集体结构

与 $C2(I)$ 类似， $BPLA_2$ $C2(II)$ 晶型中也存在二

体 (图 2)，AD 与 BC。以下用二体 AD 进行分析比较。两种单斜晶型二体的 α 碳原子叠合偏差为 0.41 \AA 。和 $C2(I)$ 相比，二体内分子之间极性相互作用基本一致，均存在两对氢键 $Lys^{69} NZ \dots Cys^{126} O$ 和 $Ser^{130} N \dots Glu^{53} OE2$ ；疏水相互作用也极其相似，如肽段 $19 \sim 34$ 与相邻分子的相应部位及 C 端肽段 $122 \sim 133$ 的部分残基之间，以及肽段 $53 \sim 70$ 同相邻分子的肽段 $122 \sim 132$ 之间均存在广泛的疏水相互作用。这种二体和某些其它来源的 PLA_2 二体 (如 $C. atrox$ PLA_2 二体^[21])有着类似性：二体界面的形成，均涉及界面识别部位的残基 $19 \sim 24$ 和 $122 \sim 124$ ，以及钙离子结合环区残基。我们已用光散射动力学实验以及聚丙烯酰胺凝胶电泳实验证实了 $BPLA_2$ 在溶液中以二体的形式存在，并指出单斜晶型二体可能是 $BPLA_2$ 在溶液中的存在方式^[10]。这种界面识别部位连接的二体可能有某种生物学功能，它利于保护催化活性部位避免酶在到达靶部位之前与非靶部位磷脂发生作用而消耗掉。

与 $C2(I)$ 类似，在 $C2(II)$ 晶型中两个二体 (AD, BC)再通过非晶体学二重轴联系形成类似“蝴蝶”状的 $\mu 222$ 对称的四聚体 (图 3)。四体的形成最终使得所有的位于界面识别部位的疏水残基完全内埋于四体内部，四体是晶体状态下的稳定结构。两种单斜晶型四体主链 α 碳原子的叠合偏差为 0.45 \AA 。 $C2(I)$ 晶型结构测定结果表明^[12]，一个 β -OG 分子结合在单体酶分子的疏水通道内，另一个 β -OG 分子进入四体疏水内核，它们主要占据空隙对四体结构本身不产生重要影响，这是可理解的，另一方面也提示了四体结构的稳定性。



Fig.2 The dimer (AD) in $C2(II)$

Only the $C\alpha$ backbone structure is shown.

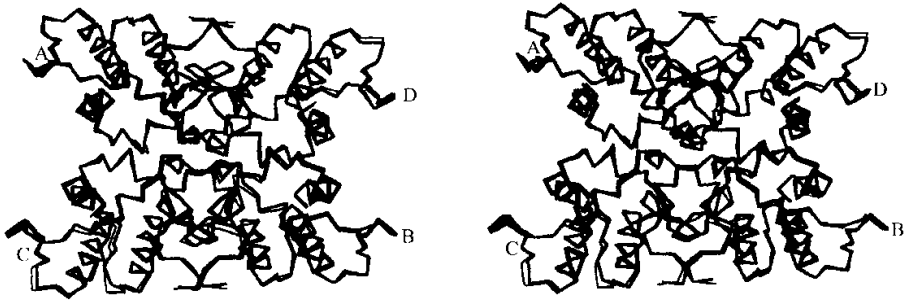


Fig.3 Superposition of the tetramers in C2 (II) (thick line) and C2 (I) (thin lines)
Only the Ca backbone structure is shown.

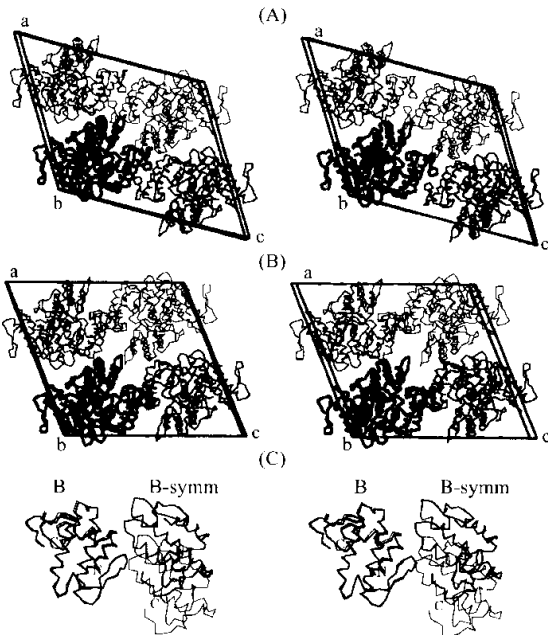


Fig.4 Crystal packing comparison of the two crystal forms (A) C2 (II) and (B) C2 (I), both are viewed down the crystallographic *b* axis. (C) Close-up view of molecular contacts. B.symm indicates the symmetry related molecule of molecule B. The heavy lines represent C2 (II) and the light lines represent C2 (I).

2.4 晶体堆积

BPLA₂ 两种单斜晶型晶胞的 *a*, *b* 轴很接近, 然而 *c* 轴相差大约 8 Å, β角相差 9°。仔细分析发现它们的 *c*sinβ 或 *d*(001) 值很接近, 相差仅为 0.28%, 因而具有相似的晶胞体积(表 1)。晶体堆积比较发现, 两种晶胞四体均按层分布, 层内四体排列相似, 差别在于相邻四体层的相对排列: 即两相邻四体层沿 *a* 轴方向作大幅度(约 20 Å)的相对位移, 从而导致 *c* 轴与 β角的显著差别[图 4(A), (B), (C)]。在 C2 (I) 晶型中, 分子 B β-翼转角 78~80 和它的晶体学对称分子 B.symm 56~59 环区有较强的

相互作用, 包括两对主链氢键(T⁵⁶ O...G⁸⁰ N; T⁵⁶ O...N⁷⁹ N)。而在 C2 (II) 中, 相应部位只有一对侧链氢键(N⁷⁹ OD¹...K⁵⁴ NZ)。这些不同可以理解为什么与 C2 (II) 相比, 含 β-OG 的 C2 (I) 晶型晶体容易生长(生长的时间变短, 孪生数目减少), 衍射数据质量也较好。BPLA₂ 结构测定结果表明^[12], β-OG 的存在对四体结构本身没有重要影响, 且 β-OG 分子不存在于四体之间, 对四体排列不产生直接影响; β-OG 是两性分子, 推测主要由于 β-OG 引起结晶环境, 特别是介电常数的变化, 而导致不同晶体堆积的形成。

感谢 北京大学化学系邵美成教授对 BPLA₂ 不同晶型的分子堆积特点提出了宝贵的意见。

References

- 1 Ami R K, Ward R J. Phospholipase A₂-A structural review. *Toxicon*, 1996, **34**(8): 827-841
 - 2 Evans H J, Kini R M. The anticoagulant effects of snake venom phospholipase A₂. In: Kini R M, Wiley John, Sons K U ed. *Venom phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, 1997, 353-360
 - 3 Schevitz R W, Bach N J, Wery J P. Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory phospholipase A₂. *Nature Struct Biol*, 1995, **2**(5): 458-465
 - 4 Scott D L, White S P, Otwinowski Z, Yuan W, Gelb M H, Sigler P B. Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A₂. *Science*, 1990, **250**: 1541-1546
 - 5 Chen Y C, Maraganore J M, Reardon I, Heinrikson R L. Characterization of the structure and function of the three phospholipases A₂ from the venom of *Aghkistrodon halys* Pallas. *Toxicon*, 1987, **25**(4): 401-409
 - 6 Wu X F, Jiang Z P, Chen Y C. A comparison of three phospholipase A₂ from the venom of *Aghkistrodon halys* Pallas. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1984, **16**: 664-671
- (引自: 生物化学与生物物理学报)

- 7 Ruan C G, Chen D W, Chen H, Chang W, Wu X F, Chen Y C. Studies on the anticoagulant action of the phospholipases A from the snake venom of *Aghkistrodon halys* Pallas in Zhejiang. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1984, **16**: 603—609
(引自:生物化学与生物物理学报)
- 8 Zhao K H, Song S Y, Lin Z J, Zhou Y C. Crystal structure of a basic phospholipase A₂ from *Aghkistrodon halys* pallas at 2.13 Å resolution. *Acta Cryst*, 1998, **D54**: 510—521
- 9 Zhao K H, Song S Y, Lin Z J, Zhou Y C. Refined structure of basic phospholipase A₂ from venom of *Aghkistrodon halys* Pallas in orthorhombic crystal form I at 0.25 nm resolution. *Sci China Ser*, 1999, **C42**: 80—89
- 10 Zhao K H, Lin Z J, Zhou Y C. Basic Phospholipase A₂ from *Aghkistrodon halys* Pallas snake venom-Implications for its association and anticoagulant activities by X-ray Crystallography. *Toxicon*, 2000, **38**: 901—916
- 11 Wu X F, Chen Y C. Isolation, Purification and properties of the basic phospholipase A₂ from the snake venom of *Aghkistrodon halys pallas* in Zhejiang. *Zoological Research*, 1981, **4**: 13—21
- 12 Niu X T, Meng W Y, Gui L L, Wang X Q, Lin Z J, Gu P Z, Zhou Y C. The crystallization and preliminary crystallographic analysis of the monoclinic crystal form of basic phospholipase A₂ from the venom of *Aghkistrodon halys* Pallas. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1996, **28**: 206—209
(引自:生物化学与生物物理学报)
- 13 Matthews B W. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 1968, **33**: 491—497
- 14 Collaborative Computational Project, Number 4 The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Cryst*, 1994, **D50**: 760—763
- 15 Navaza J. AMoRe: An automated package for molecular replacement. *Acta Cryst*, 1994, **A50**: 157—163
- 16 Jones T A, Zou J Y, Cowan S W. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst*, 1991, **A47**: 110—119
- 17 Kleywegt G J, Jones T A. Where freedom is given, liberties are taken. *Structure*, 1995, **3**: 535—540
- 18 Brunger A T. *XPLOR manual*, version 3.1. Yale university, New Haven, CT, 1992
- 19 Luzzati P V. Traitement statistique des erreurs dans la determination des structures cristallines. *Acta Cryst*, 1952, **5**: 802—810
- 20 Laskowski R, Macarthur M, Moss D, Thornton J. PROCHECK: A program to check stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystal*, 1993, **26**: 283—290
- 21 Brunie S, Bolin J, Gewirth D, Sigler P B. The refined crystal structure of dimeric phospholipase A₂ at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center. *J Biol Chem*, 1985, **260**: 9742—9749

Structure Determination of Basic Phospholipase A₂ from the Venom of *Aghkistrodon halys* Pallas in A New Monoclinic Crystal Form

ZHAO Ke-Hao, CHAI Xiao-Mei, SONG Shi-Ying, LIN Zheng-Jiong*

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

ZHOU Yuan-Cong

(Shanghai Institute of Biochemistry, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Basic phospholipase A₂ from the venom of *Aghkistrodon halys* Pallas (*Aghkistrodin blomhoffii* brevicaudus) exhibits hemolytic and anti-coagulant activities. A new monoclinic crystal form with four molecules per asymmetric unit was grown in the absence of *n*-octyl β-*o*-glucopyranoside (β-OG). The enzyme structure was determined by the molecular replacement method. The combined analysis of self- and cross-rotation function was used and non-crystallographic symmetry restraints were imposed to the structure refinement. The final model gave an acceptable crystallographic *R* factor and reasonable stereochemistry. Two molecules formed an interfacial-recognition-site linked dimer and two such dimers constituted a tetramer having pseudo 222 symmetry. Structural comparison with previously reported monoclinic forms, in which β-OG was bound, showed that the variation of crystallization conditions had effects on the crystal packing, leading to significant changes of the cell parameters. Nevertheless, the structures of both the dimer and tetramer in the two crystal forms closely resembled to each other, indicating that the oligomers found in the monoclinic crystal forms were stable.

Key words venom phospholipase A₂; X-ray crystallography; three-dimensional structure; oligomer

Received: January 12, 2001 Accepted: March 5, 2001

This work was supported by the Chinese Academy of Sciences (No. KJ951-A1-601)

* Corresponding author: Tel, 86-10-64888513; Fax, 86-10-64877837; e-mail, lin@sun5.ibp.ac.cn