

# 一种蛇毒金属蛋白样品的 XAS 研究\*

李树军<sup>1</sup> 赵伟<sup>2</sup> 储旺盛<sup>2</sup> 牛立文<sup>2</sup>  
滕脉坤<sup>2</sup> 胡天斗<sup>1</sup> 谢亚宁<sup>1</sup> 吴自玉<sup>1;1)</sup>

1(中国科学院高能物理研究所 北京 100039)

2(中国科学技术大学 合肥 230026)

**摘要** 测试一种含锌蛇毒金属蛋白 Acutolysin A 不同 pH 值环境下的 XAS 曲线,实验结果表明不同的 pH 值对样品的结构有一定的影响. EXAFS 模拟的结果显示,该蛋白晶体 PDB 数据的精度不足以给出金属离子的精细局域结构. 而利用不含氢原子的 Cluster 从头计算拟合出的 XANES 谱同样与实验谱有一定的差别,说明氢原子对 XANES 的贡献不可忽略. 实验还发现 X 射线辐照对样品的损伤较小.

**关键词** Acutolysin A 金属蛋白 锌蛋白 XANES EXAFS

## 1 引言

金属蛋白(如金属酶)是已知蛋白中的一大部分(约四分之一到三分之一),它们在动物和植物的生命活动中扮演着重要角色,参与一些基础的化学反应,例如电子转移、氧的束缚、催化、活化等. 金属蛋白利用金属的化学性质来实现其特定的且具有支配性的各种生物功能,这往往和金属的氧化还原反应过程有关,而这些化学反应又伴随着金属离子周围微弱的结构变化. 要了解这些反应的机理,我们必须研究这些微小的结构变化,但它们是如此之小,以至于只有亚原子分辨率上的实验或技术才能分辨这些变化,此时, XAS(X-Ray Absorption Spectroscopy)手段几乎是最重要的方法<sup>[1]</sup>.

XAS 曲线可以分为两个部分,一般将吸收边以上 50eV 以内的吸收曲线成为 XANES(X-Ray Absorption Near Edge Structure),而吸收边以上 50eV 一直延伸到 1keV 的区域称为 EXAFS(Extended X-Ray Absorption Fine Structure). XAS 技术用于生物体系中多种金属格点的研究开始于 20 年前<sup>[2-4]</sup>,一方面是由于当时对 XAS 吸收截面物理本质的认识取得的突破<sup>[5-7]</sup>,另一方面则要归功于高强度的同步辐射 X 射线光源的发展,使得极稀浓度样品的测量可

以进行,而恰恰绝大多数的生物样品都属于这种情形.

本文研究的样品是一种来自于蛇毒的含锌金属蛋白酶. 含锌金属蛋白酶广泛分布于不同种属来源的蛇毒中,其生物学功能涉及胞外间质的调节、组织基底膜的损伤、肿瘤细胞的侵染、组织愈合修复以及大分子配基相互作用等生物学过程. 由于其在临床和潜在的药物治疗等方面的巨大的应用前景,对蛇毒锌金属蛋白酶的研究已经越来越引起人们的广泛关注,已成为国内外蛇毒研究的一个热点. 根据蛇毒金属蛋白酶的功能特性,可以将其分为出血性和非出血性两大类<sup>[8,9]</sup>. 具有出血活性的蛇毒锌金属蛋白酶不仅能水解破坏血管壁基底膜中的胶原成份,而且也与肿瘤的转移、侵染等病理过程相关,因而可作为开发治疗肿瘤药物的靶物质.

根据蛇毒锌金属蛋白酶的结构域构成及分子量可以将其分为四类,分别为 P-I, P-II, P-III 和 P-IV, 其中 P-I 类仅有 1 个金属蛋白酶结构域. Acutolysin A 是从皖南尖吻蝮蛇蛇毒中纯化得到的分子量约 22.8KD 的 P-I 型蛇毒锌金属蛋白酶. Acutolysin A 具有出血活性和蛋白酶水解活性,其晶体学结构<sup>[10]</sup>是解出的第一个具有强出血活性的蛇毒锌金属蛋白酶(pH7.5 和 pH5.0, PDB 代码

\* 国家自然科学基金纳米研究重大项目(90206032)和国家杰出青年基金(10125523)资助

1) E-mail: wuzy@mail. ihep. ac. cn

分别是 1BSW 和 1BUD, 分辨率分别是  $1.95 \text{ \AA}$  和  $1.90 \text{ \AA}$ ).

Acutolysin A 的蛋白水解活性在弱碱性条件下具有高活性, 在酸性条件下处于低活, 在  $\text{pH} > 9$  以后活力迅速下降. 活性中心含一个锌, 与保守序列 H142E143XXH146XXGXXH152 上的 3 个组氨酸咪唑环上的氮原子和一个水分子形成四配位, 该水分子被认为是酶催化反应中的亲核攻击基团. 通过  $\text{pH} 7.5, \text{pH} 5.0$  的晶体结构比较推测, 蛋白活性随  $\text{pH}$  值的变化可能与这个催化水分子的极化程度相关. 我们认为, 要探索该蛋白活性随  $\text{pH}$  值的变化机理, 就需要精确测定不同  $\text{pH}$  条件下的活性中心原子间的相互作用状态. 因此, 我们选择了多个  $\text{pH}$  条件下的蛋白溶液样品, 使用 XAS 方法对这些样品进行了测试, 力求寻找不同  $\text{pH}$  活性状态下活性中心的结构差异.

## 2 实验

蛋白溶液样品的制备在中国科学技术大学蛋白质晶体学实验室进行. 采集中国皖南尖吻蝮蛇粗毒, 参考徐洵等<sup>[11]</sup>的方法, 采用改进后的两步柱层析分离纯化<sup>[10]</sup>得到 Acutolysin A 的纯品, 再将脱盐冻干的蛋白干粉溶于不同  $\text{pH}$  值的缓冲液中, 表 1 给出了 6 个样品的缓冲液及蛋白浓度.

表 1 样品调制表

样品	$\text{pH}$ 值	缓冲液种类	缓冲液浓度/ (mmol/L)	蛋白浓度/ (mg/mL)
1	2.5	甘氨酸	200	200
2	3.0	甘氨酸	100	200
3	5.0	醋酸-醋酸钠	20	200
4	8.0	Tris-HCl	20	200
5	9.0	Tris-HCl	20	200
6	10.0	双甘氨酸	200	200

XAS 测试在北京同步辐射实验室 (BSRF) 1W1B 光束线上进行. 储存环运行在  $2.2 \text{ GeV}$  下, 测试时的流强范围为  $80\text{--}120 \text{ mA}$ . Wiggler 引出的同步辐射光经硅双晶单色器分离出单色光, 双晶单色器失谐 30% 以抑制高次谐波. 测试采用荧光模式, 前电离室的气体为 25% 的氩气和 75% 的氮气的混合气, 荧光电离室采用 100% 的氩气. 实验中测试的是锌的 K 边, 采用 Cu-3 滤波片, 在常温下进行测试.

表 2 XAS 测试扫描条件表

扫描范围/eV		步长/eV	停留时间/s
-150	-50	5	2
-50	100	0.5	3
100	300	3	3
300	800	6	5

溶液样品测试时封装如下: 在厚度为  $1.5 \text{ mm}$  的铝板上开一个直径为  $5 \text{ mm}$  的孔, 完全清洗干净后将溶液样品采用很薄的塑料薄膜封在其中, 同时保证各处溶液厚度的均匀并没有气泡. 测试范围为边前  $150 \text{ eV}$  到边后  $800 \text{ eV}$ , 每条谱至少连续测试两次, 并进行比较以确认 X 射线中对样品的损伤情况. 具体的分段扫描范围和步长及停留时间等条件见表 2.

## 3 结果与讨论

图 1 是  $\text{pH}$  值为 5.0 样品两次扫描得到的两条谱线的比较. 经仔细比较, 两条曲线吻合得相当好, 叠加在一起的时候几乎可以完全重合, 而且吸收边的位置也没有移动, 对于其它  $\text{pH}$  值的样品也有同样的结论. 这说明在扫描时间内 X 射线对样品的照射没有导致锌周围局域结构的变化 (即损伤较小), 实验得到的谱线可以反应出样品的原始结构. 实际上, 为了确认 X 射线长时间照射对样品的损伤, 在实验前我们专门对此蛋白的溶液样品进行了多次扫描, 并将每次得到的谱线叠加在一起进行比较, 没有发现可以归因于光致蛋白变性的谱图变化, 而且从蛋白溶液样品的外部形态上也没有发现变化, 因此认为实验得到的谱图是可以代表样品中锌离子周围原始的局域结构的.

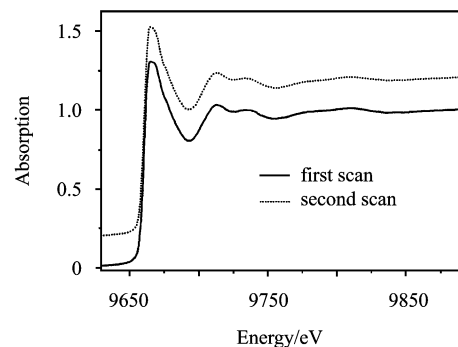


图 1  $\text{pH}$  值 5.0 样品两条谱线的比较

图 2 是 6 种不同  $\text{pH}$  值样品的 XANES 谱图比较, 可以看出不同  $\text{pH}$  值样品的曲线还是有明显差别的. 一是  $\text{pH}$  值等于 2.5 的样品的主吸收峰要比其它样品的主吸收峰明显的尖锐, 而其它样品的主

吸收峰都几乎分裂为双峰,尤其是 pH 值等于 10 的样品可以看出明显的双峰;二是 pH 值为 8.0 的样品的吸收边出现的能量位置比较高,但是否为实验的原因现在还不能确定. 如果不是实验引入的误差,这似乎是表示吸收原子锌的电子结构和其它样品有所不同,计算出来的局域结构应该体现出相应的差别. 为了更清楚的说明这种差别,图 3 给出了各个谱线的一阶微分曲线. 每条微分曲线上的最大值点对应的是吸收边位置(图中加一竖线便于比较). 可以发现,pH 值等于 8.0 样品的吸收边能量明显要比其它样品高(最大值在竖线右侧),pH 等于 5.0 的样品的吸收边要比其它的低一些(最大值出现在竖线左侧). 在主峰右侧的小的肩峰(图中用另一条竖线标出位置)对应的是主吸收峰分裂出的小峰的位置,明显的差别是 pH 值等于 2.5 的样品没有此肩峰,也就是吸收峰没有分裂,其它的样品都有不同程度的分裂,但 pH 值为 5.0 的样品的分裂非常微弱.

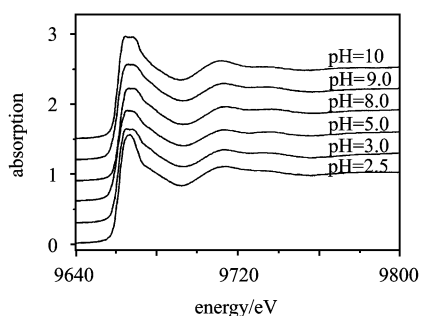


图 2 不同 pH 值样品的 XANES 比较

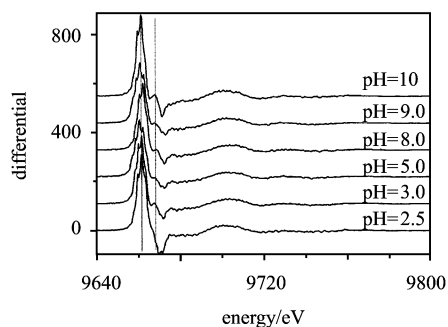


图 3 XANES 谱的一阶微分曲线比较

从此可知,各样品的 XANES 谱的质量是比较好的,相互间也体现出了一定的差别. 因此,可以使用各样品的 XANES 谱,利用 MXAN 软件包进行从头计算来求解锌离子周围的局域结构,目前这项工作正在进行当中.

由于 EXAFS 拟合结果可以达到很高的精度,因此对蛋白质晶体学数据是一个很好的补充和修正,图 4 给出的三条曲线的比较充分的说明了这一点. 图中,直接利用该蛋白晶体的 PDB 数据(PDB 代码: 1BSW)计算出来的实空间中锌离子第一配位层的 EXAFS 曲线(PDB simulation)和实测曲线(pH 值等于 10 的样品)相比,差别是非常大的,说明晶体学的结构数据和实际结构相比有较大的出入,尽管该 PDB 数据的分辨率达到了很高的  $1.95 \text{ \AA}$ ,但直接使用晶体学数据是不能进行精细结构的研究的<sup>[12]</sup>. 如果使用 EXAFS 拟合程序对实验曲线进行拟合,可以得到修正的键长结果,拟合曲线(Exafs fitting)和实测曲线十分接近,仍然存在小的差别可能和高层配位原子的贡献有关. 实际拟合了锌离子的前两个配位壳层,表 3 给出了第一配位层的键长数据,并和原始的 PDB 数据进行了比较.

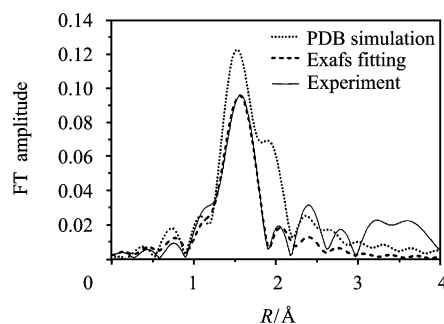


图 4 PDB 数据、实测谱以及拟合谱的比较

表 3 PDB 数据和 EXAFS 拟合键长比较

原子种类	$N_{\text{His152}}$	$N_{\text{His142}}$	$N_{\text{His146}}$	$O_{\text{Wat300}}$
PDB 数据	1.991	1.992	1.995	2.241
EXAFS 拟合数据	2.013	2.013	2.013	2.131

如果使用从 XANES 谱计算得到的结构参数来模拟锌离子实空间中第一配位层的 EXAFS 曲线,得到的结果要明显好于 PDB 数据,一些小的结构特征也出现了,但仍然不能算是成功. 分析原因如下:用于 XANES 拟合的初始结构模型(cluster)来自于该蛋白的 PDB 数据(代码:1BSW),而该 PDB 数据中是不含有氢原子的. 由于 XANES 拟合是基于多重散射理论的,其中氢原子能够发生相干散射,其作用不可忽略,所以不包含氢原子的初始结构模型引入的计算误差是相当大的,造成 XANES 计算出来的结构参数不够准确. 因此需要在 XANES 计算使用的初始结构模型中加入氢原子,重新进行计算,这项工作将在以后的文章中讨论.

## 4 结论

金属蛋白 Acutolysin A 的不同 pH 值溶液样品的 XAS 谱显示出了一定的差别,表明了不同样品中锌的局域精细结构有所不同,这可能和该蛋白在不同 pH 值下活性的不同有关,进一步的计算结果也许能够揭示这种结构和功能的关系。

蛋白质晶体学的 PDB 数据不能给出金属离子局域精细结构,EXAFS 可以修正 PDB 的结构参

数,在金属蛋白的研究中发挥重要的作用. 使用 XANES 曲线,从 PDB 结构模型出发,利用从头计算方法求解结构参数,由于初始的 PDB 结构模型中不含有氢原子,造成计算结果误差较大,因此在初始结构模型中加入氢原子是必要的。

本次实验是在 BSRF 的 1W1B 光束线(XAS 实验站)上完成的,期间,实验站上的胡天斗、谢亚宁、刘涛志老师以及杜永华同学都给予了很多的帮助,在此表示感谢。

## 参考文献 (References)

- 1 Hasnain S S, Hodgson K O. *J. Synchrotron Rad.*, 1999, **6**: 852
- 2 Cramer S P. *X-Ray Absorption: Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES*. Koningsberger D C and Prins R, eds, New York: Wiley, 1988. 257
- 3 Scott R A. *Structural and Resonance Techniques in Biological Research*. (D. L. Rousseau, ed.), Orlando, Florida: Academic Press, 1984. 295
- 4 Powers L. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, **1**:683
- 5 Rehr J J, Ankudinov A L. *J. Synchrotron Rad.*, 2003, **10**: 43
- 6 WU Z Y et al. *Physica Scripta*, 2003 (in press)
- 7 Natoli C R, Benfatto M, Longa S D et al. *J. Synchrotron Rad.*, 2003, **10**: 26
- 8 Hite L A, Shannon J D, Bjarnason J B et al. *Biochemistry*, 1992, **31** (27): 6203
- 9 Hite L A, Jia L G., Bjarnason J B et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, **308**(1): 182
- 10 GONG W, ZHU X, LIU S et al. *J. Mol. Biol.*, 1998, **283**(3): 657
- 11 XU X, WANG C, LIU J et al. *Toxicon*, 1981, **19**(5): 633
- 12 Hasnain S S, Strange R W. *J. Synchrotron Rad.*, 2003, **10**:9

## XAS Study of a Venom Metalloprotein \*

LI Shu-Jun<sup>1</sup> ZHAO Wei<sup>2</sup> CHU Wang-Sheng<sup>2</sup> NIU Li-Wen<sup>2</sup>  
TENG Mai-Kun<sup>2</sup> HU Tian-Dou<sup>1</sup> XIE Ya-Ning<sup>1</sup> WU Zi-Yu<sup>1;1)</sup>

1 (Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

2 (University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

**Abstract** In this paper, we probed the Acutolysin A—a Zinc protein purified from venom—by XAS technique, and its XAS curves in solution state of different pH values, were obtained. It was confirmed that the intense X-Rays didn't damage the samples during the experiment, and the curves among different pH values did present some differences. Through the comparison between simulated EXAFS curve based on PDB structure and an experimental signal, we concluded that the PDB data does not qualify for the fine structure research due to the limited resolution. At the same time, XANES analysis result could not reconstruct the experimental EXAFS curve either, because the PDB cluster used in the XANES calculation is free of Hydrogen atoms, therefore, a Hydrogen-contained cluster might be essential to the good fitting of XANES.

**Key words** Acutolysin A, metalloprotein, Zinc protein, XANES, EXAFS

\* Supported by NSFS(90206032) and National Natural Science Funds for Distinguished Young Scholar(10125523)

1)E-mail:wuzy@mail.ihep.ac.cn