

[ 通 讯 ]

## 溶剂化对修饰超氧化物歧化酶稳定性的影响\*

李维忠<sup>1,2</sup> 缪方明<sup>1</sup><sup>(1)</sup> 天津师范大学晶体化学研究所, 天津 300074; <sup>(2)</sup> 北京大学物理化学研究所, 北京 100871)

关键词: 酶稳定性, 有限差分法, 超氧化物歧化酶, 化学修饰, 反应场能

静电作用是影响生物大分子稳定性的重要因素, 通过突变或化学修饰方法, 引入或屏蔽掉酶的可电离残基的电荷而合理改变酶分子电场, 是对蛋白质进行分子设计、提高酶稳定性的一个可行方法.

铜锌超氧化物歧化酶 (Cu, ZnSOD) 是专一清除超氧阴离子自由基  $O_2^-$  的金属酶<sup>[1]</sup>, 具有重要药用价值, 但天然酶在体内半衰期仅 5-10min. 为增加其稳定性, 可对酶表面的赖氨酸进行化学修饰<sup>[2]</sup>. 常见修饰剂为聚乙二醇、淀粉及月桂酸等<sup>[3]</sup>. 在生理 pH 条件下, 赖氨酸侧链的氨基是质子化的, 带一个正电荷, 酶被修饰后, 此氨基生成酰胺, 导致酶电场发生显著变化. 本文使用 FDPB (finite difference solution to Poisson-Boltzman equation) 方法<sup>[4]</sup>, 计算了赖氨酸修饰前后酶的分子电场及其与溶液间的静电作用能, 讨论了改变溶剂化能对提高酶稳定性的贡献.

在溶液状态下的蛋白质的内部及外部的静电场符合 Poisson-Boltzman 方程<sup>[4]</sup>:

$$\nabla \varepsilon(r) \nabla \phi(r) - \varepsilon(r) \kappa^2(r) \sinh(\phi(r)/kT) = 4\pi \rho(r) \quad (1)$$

$$\varepsilon \kappa^2 = 8\pi e^2 N I / kT \quad (2)$$

其中  $\phi$  是静电势,  $\varepsilon$  是介电常数,  $\kappa$  是 Debye-Hückel 常数,  $\rho$  是电荷密度,  $e$  是电子电量,  $N$  是阿佛加德罗常数,  $I$  是离子强度,  $k$  是 Boltzman 常数,  $T$  是绝对温度.

方程 (1) 的求解使用有限差分法<sup>[5,6]</sup>. 这是一种在空间划分三维网络的数值方法. 通过迭代求出每个网格点上的静电势值  $\phi$ . 此方法还可以计算出在溶液和溶质介电环境中的静电能  $E_{\text{solution}}$  及  $E_{\text{solute}}$ , 其差值叫反应场能, 就是溶质分子与溶液的静电作用能:

$$E_{\text{reaction}} = E_{\text{solution}} - E_{\text{solute}} \quad (3)$$

本文工作所用程序为本实验室开发的大分子静电势软件包 MMEP<sup>[7]</sup>. 所有计算均在 SGI Indigo2 工作站上进行. Cu, ZnSOD 的坐标取自其 0.2nm 分辨率的晶体结构测定数据, 并在此基

基础上进行了初步的能量优化, 原子电荷依从 CHARMM 力场, 可电离基团的电荷按其生理 pH 环境下的电离状态指定. Cu, ZnSOD 共有 20 个赖氨酸残基, 修饰酶的赖氨酸侧链不带电荷.

FDPB 计算中网格密度为  $96 \times 100 \times 76$ , 网格间距为 0.0941 nm. 由于 FDPB 是一种数值算法, 其计算结果与网格划分有关, 故 SOD 及修饰 SOD 必须使用完全相同的骨架和网格. 两者之间的构象差异及小分子修饰链的影响归入介电常数之中加以考虑. 蛋白质和水的介电常数分别取 4 和 80.

在正常生理环境的离子强度 ( $0.146 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 下, 对 SOD 及修饰 SOD 进行 FDPB 计算, 得到 SOD 在溶液和均一溶质环境中静电能分别为  $54338.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  和  $55516.58 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . 反应场能为  $-1178 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . 而修饰 SOD 在溶液中和均一溶质环境中静电能分别为  $49476.79 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  和  $51924.86 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 反应场能为  $-2448.06 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . SOD 在修饰以后与溶液的静电相互作用能下降了  $1270.07 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . 因此, 从静电作用方面考虑, 修饰 SOD 在溶液中更能稳定存在.

为考察盐效应对 SOD 及修饰 SOD 反应场能的影响, 在 6 种不同离子强度条件下 ( $0.0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.146, 0.50 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行了 FDPB 计算, 使用网格同上. 结果见表 1.

表 1 不同离子强度条件下 SOD 及修饰 SOD 的反应场能 ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

Table 1 Reaction field energy of SOD and modified SOD at different ion strength ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

	$I/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.00	0.01	0.05	0.10	0.146	0.50
SOD	$E_{\text{solution}}$	54345.07	54344.28	54342.13	54340.00	54338.60	54332.39
	$E_{\text{solute}}$	55516.58					
	$E_{\text{reaction}}$	-1171.5	-1172.3	-1174.5	-1176.6	-1178	-1184.2
Modified SOD	$E_{\text{solution}}$	49514.36	49508.33	49493.26	49482.92	49476.79	49457.88
	$E_{\text{solute}}$	51924.86					
	$E_{\text{reaction}}$	2410.5	-2416.6	-2431.6	-2442	-2448.1	-2467
	$\Delta E$	1239	-1244.3	1257.1	1265.4	-1270.07	-1282.8

由表 1 可以看出, 随着盐浓度的上升, 分子的静电能有所下降. 这是因为盐的屏蔽作用. SOD 和修饰 SOD 由于电荷分布不同, 其反应场能对离子强度的敏感程度亦不同. 离子强度从 0.0 到 0.50, SOD 反应场能变化了  $12.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . 而修饰 SOD 变化了  $56.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 即随着离子强度的升高, 溶剂化作用对修饰 SOD 的稳定作用更强一些. 这是因为 SOD 在中性 pH 条件下分子净电荷约为 -4, 而修饰 SOD 因失去赖氨酸侧链上的电荷, 使酶分子净电荷负了许多, 其分子电场的强度更大一些, 根据离子在电场下的 Boltzman 分布定律, 修饰 SOD 分子表面局部的盐浓度比 SOD 更大一些, 所以其反应场能的变化对离子强度的依赖更加突出. 但总体上说, 酶分子的反应场能与离子强度关系不大.

由于分子的反应场能与其形状和电荷分布紧密相关, 所以分子构象的变化会影响反应场能的高低. 在构成蛋白质的二十种氨基酸中, 赖氨酸的侧链是柔性最大的, 其强烈的热运动会对反应场造成显著影响. 为考察这种效应, 对 SOD 体系进行了分子动力学模拟, 从分子动力学轨迹中取出 10 个平均构象分别进行了反应场能的计算.

分子动力学的初始坐标是在晶体坐标的基础上经过能量优化得到的, 在优化和分子动力学模拟过程中, 加入厚度为 1.0 nm 的溶剂水分子. 为保持酶结构的合理性, 对酶的骨架和活性部位加

上能量约束项, 分子动力学初始温度为 300K, 用 Maxwellian 方法分配初始速度, 加上温度耦合项以控制体系温度, 平衡 20ps, 时间间隔为 0.001ps, 每 0.1ps 记录一次坐标, 共记录 200 个构象, 然后从每 20 个构象中求出平均构象. 这样得到在溶液状态下 SOD 的 10 个可能构象. 构象骨架均方根偏差为 0.186nm.

为减少计算量, 此处使用较粗的网格为  $59 \times 65 \times 46$ , 网格间距 0.133nm. 在分子动力学模拟过程中各个时间段的 SOD 及修饰 SOD 反应场能见表 2.

表 2 SOD 及修饰 SOD 的反应场能在分子动力学模拟过程中的变化 ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

Table 2 Variation of reaction field energy of SOD and modified SOD in molecular dynamic simulation ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

$t / \text{ps}$	SOD			Modified SOD			$\Delta E$
	$E_{\text{solution}}$	$E_{\text{solute}}$	$E_{\text{reaction}}$	$E_{\text{solution}}$	$E_{\text{solute}}$	$E_{\text{reaction}}$	
0-2	24215.84	24661.84	-446.0	22433.73	24231.54	-1797.8	-1351.8
2-4	24530.31	24880.93	-350.6	22432.15	24229.74	-1797.6	-1447.0
4-6	25776.68	26134.74	-358.0	23806.02	25606.57	-1800.6	-1442.0
6-8	26521.22	26881.94	-360.7	24346.41	26188.16	-1841.8	-1481.1
8-10	25749.42	26115.07	-365.9	23486.17	25312.69	-1826.5	-1460.6
10-12	26315.49	26689.45	-374.0	24218.81	26060.70	-1841.9	-1467.9
12-14	25035.12	25403.74	-368.6	23145.46	24972.19	-1826.7	-1458.1
14-16	25864.79	26228.95	-364.2	23813.06	25621.41	-1808.3	-1444.1
16-18	25299.52	25652.56	-353.1	23406.37	25179.67	-1773.3	-1420.2
18-20	25902.30	26254.11	-351.8	23669.38	25467.66	-1798.3	-1446.5

由表 2 可以看出, 分子的构象变化对其反应场能有较大的影响, 使 SOD 和修饰 SOD 反应场能分别有  $95 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  和  $68 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  的波动. 修饰 SOD 波动比 SOD 小是因为赖氨酸的侧链在分子动力学中的构象极易发生变化. 这种变化只影响了 SOD 的反应场能, 对不带电荷的修饰 SOD 影响不大. 由于所用网格较粗, 计算的反应场能和表 1 中有较大差别, 但 SOD 和修饰 SOD 反应场能的差值与前面的计算结果仍能吻合:  $\Delta E$  在  $-1400 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  左右波动, 表明 SOD 和修饰 SOD 在反应场能上的差值可以衡量其在溶液状态下的稳定性.

可电离基团所带电荷是形成反应场的主要原因, 由于这些基团大多分布在酶分子的表面, 它们与强极性的溶剂间有较强的相互作用. 天然 SOD 酸性与碱性的可电离基团分布比较均匀, 当酶被修饰后整个酶分子电场变强, 诱导溶剂电场的的能力增加, 因此会使反应场能的值更负. 修饰 SOD 的反应场能比 SOD 下降约  $1270 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 因此修饰 SOD 在溶液中的稳定性比天然 SOD 要高. 由于溶剂水分子本身具有非常高的极性, 所以离子强度的影响不大. 构象的变化对反应场能的影响比离子强度明显.

#### 参 考 文 献

1 McCord J M, Fridovich I. *J. Biol. Chem.*, 1969, 224:6049

- 2 Yang Baozhen (杨保珍), Zhang Tianmin (张天民). *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* (中国医药工业杂志), **1990**, **21**:519
- 3 Yan Jiaqi (阎家麒), Xie Wenzheng (谢文正). *Shenwu Huaxue Yu Shenwu Wuli Jinxuan* (生物化学与生物物理进展), **1994**, **21**:154
- 4 Sharp K A, Honig B. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **1991**, **19**:301
- 5 Warwicker J, Watson H C. *J. Mol. Biol.*, **1982**, **157**:671
- 6 Gilson M, Sharp K A, Honig B. *J. Comp. Chem.*, **1987**, **9**:327
- 7 Li Weizhong (李维忠), Wang Jinling (王瑾玲), Liu Xiaolan (刘小兰), et al. *Huaxue Tongbai* (化学通报), **1996**(3): 58

## Solvation Interaction and Stability of Modified Superoxide Dismutase

Li Weizhong<sup>1,2</sup> Miao Fangming<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>*Institute of Chemical Crystallography, Tianjin Normal University, Tianjin 300074 P. R. China.*

<sup>2</sup>*Institute of Physical Chemistry, Peking University, Beijing 100871, P.R.China)*

**Abstract** The stability of Copper, Zinc superoxide dismutase increases remarkably when the lysines on the surface of the enzyme are modified. The finite difference solution to the Poisson-Boltzman equation (FDPB) method is used to calculate the electrostatic interaction between solution and enzyme. The results show that the reaction field energy of SOD is reduced by about 1270 kJ·mol<sup>-1</sup> after modification.

**Keywords:** Enzyme stability, Finite difference, Superoxide dismutase, Chemical modification, Reaction field energy

---

Received 1997-12-15, revised 1998-01-07. Correspondent: Miao Fangming.