

# $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶离子基团的离解常数的计算

邱开雄, 付继军, 简虹, 吉玲, 黄大荣

(昆明医学院 化学教研室, 云南 昆明 650031)

**摘要:** 研究了当离子基团从水中转至蛋白球中时, 离解常数改变的测定. 借助两种溶剂—N, N-二甲基甲 (DMF) 酰胺和甲酰胺 (FA) 模拟了近程相互作用的能量变化. 考虑到处于蛋白球中的离子与它们周围的电解质溶液的相互作用, 研究了 Born 溶剂化能的变化. 由于在酶分子中存在内球静电场, 研究了离子化能的变化. 以上的每项效应对  $A_{sp-102-CO_2^-}$  的能量都有较大的贡献, 且相互补偿.

**关键词:**  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶; 离解常数

**中图分类号:** Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-855X(2005)04-0120-05

## Calculation of Dissociation Constant of Ionogenic Group in $\alpha$ -Chytrysin

QIU Kai-xiong, FU Ji-jun, JIAN Hong, JI Ling, HUANG Da-rong

(Faculty of Basic Medical Sciences, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

**Abstract** Factors determining the change of dissociation constants of ionogenic group into a protein globule from water are researched. The change of the short range interaction is simulated with the aid of two model solvents dimethylformamide (DMF) and formamide (FA). The change of Born solvation energy is studied with consideration to the interaction of ions inside a protein globule with the surrounding electrolyte solution. The change of ion energy due to the intraglobular electric field preexisting in the enzyme molecule is also investigated. Each of the factors listed above gives a considerable contribution to the ion energy in the case of  $A_{sp-102}$  and they compensate each other to a great extent.

**Key words**  $\alpha$ -Chytrysin; dissociation constant

## 0 引言

活性中心的任何一个基团的  $pK$  的变化对于酶的催化都具有很大的作用, 一般根据这些基团在水中的离解度, 可推测它们离解的可能程度; 但是, 当从水中转至弱极性的介质—蛋白球中时, 这种推测则会产生偏差, 因为我们预测的是在弱的有机溶剂中  $pK$  的实际变化. 另一方面, 在球内存在较大的电场, 这种效应在电离过程中不可能不表现出来.

当由水中转至蛋白质中时, 任何一个基团的  $pK$  的总变化取决于离子间的静电相互作用能、非静电的近程相互作用和内球静电场的影响等. 本工作的目标是, 分析以上的贡献和提出定量的测定方法. 我们以全部处在蛋白球中并不直接与外界的水接触的  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶的  $A_{sp-102}$  羧基为计算的具体对象.

## 1 计算方法

考虑到内电场的影响, 本文不打算进行离解值的静电计算. 我们的程序是, 从在水和其它无外电场的介质的离解常数的实验值出发, 而后考虑在蛋白球的作用,  $pK$  值的变化. 这一程序的依据是电化学的实验、电极过程的特点和 Vena 二级效应的理论, 因而这些依据能解释在外电场作用下, 反应能的变化.

我们研究了离子和分子与周围介质的相互作用, 众所周知, 离子 (按 Born) 和极性分子 (按 Kerkvod) 的

收稿日期: 2005-01-30 基金项目: 本项目为昆明医学院科研基金资助项目 (项目编号: 03041).

第一作者简介: 邱开雄 (1964~), 男, 学士, 讲师. 主要研究方向: 结构化学和药物化学.

溶剂化能的静电计算虽能给出正确的值, 但此时所得结果的精度不大. 产生偏差的原因是, 静电的过程对描述离子与邻近离子的相互作用是很近似的, 而以远程溶剂的相互作用, 用 Bktoff<sup>[1]</sup> 的模型较好. 应该指出, 在转移能中, 纯的 Bomian 溶剂化能的贡献一般比较小. 例如, 由  $\epsilon = 78$  (水) 的介质中转至  $\epsilon = 37$  (DMF) 的介质中, 它得到的溶剂化能仅为  $(1/37 \sim 1/78)$ , 即为 1.5%. 但有趣的是, 当转至蛋白球 ( $\epsilon = 4$ ) 中时, 相应的效应增长达  $(1/4 \sim 1/78) \Gamma 0.24$ , 它能引起实质性的效应.

当酸由水中转至蛋白球中时,  $pK$  值变化的计算, 选择随后的步骤. 首先, 从水中转至模拟蛋白球介质的非水溶剂中, 根据其实验资料的  $\Delta pK$  值, 这种离子和偶极的转移能, 主要取决于与其邻近离子和偶极的相互作用的变化, 而不是静电作用.

酸性基团在蛋白球中的离解不同于在非水溶剂中的离解, 即离解时, 转至水中所形成的氢离子的离解甚至不如非水相. 所以, 与在蛋白质中的质子给予体的离解比较, 不应采用  $\Delta pK$ , 而这个值要扣除  $\lg v_{H^+}$ ,  $v_{H^+}$ —水的离子在该溶剂中的“绝对活度系数”, 它又取决于  $H^+$  从水中转至溶剂中的能量. 众所周知, 单个离子活度系数严格的热力学测定是不可能的, 但目前应用一些超热力学的假设, 已拟定了测定这些值的可靠方法.

我们应用两个模型溶剂—DMF 和 FA (因它们的化学性质接近蛋白质) 完成了进一步的计算. 这些溶剂原则上是不相同的, 非质子的 DMF 不可能象 FA 一样作为氢键的给予体, 所以, 在两个模型范围内, 邻近相互作用贡献的解释实质上是不同的.

第一阶段的计算是借助于模型溶剂估计邻近相互作用的贡献; 第二阶段是离子和偶极由模型溶液转至蛋白球中时, 转移能的静电计算<sup>[2]</sup>, 在这一阶段蛋白球作为无结构的电解质研究, 此时应考虑转移至处于接近到蛋白质的介面的活性中心区的离子, 它们既与蛋白球的介电质作用, 又与外部的介质作用, 离子由一个介质 (1) 转至其它介质 (2) 中的转移能由下式计算:

$$\Delta G = N \cdot e^2 \left( \frac{1}{\epsilon_2} \cdot \frac{1}{2a} - \frac{1}{\epsilon_1} \cdot \frac{1}{2a} - \frac{k}{\epsilon_2} \cdot \frac{1}{4d} \right) \quad (1)$$

这里,  $N$ —阿佛加德罗常数,  $e$ —电子的电荷,  $\epsilon_1$  和  $\epsilon_2$ —统计的介电率,  $a$ —离子半径,  $d$ —界面至离子中心的距离.

第一、二项描述在介质 2 和 1 中离子电荷能, 第三项是离子在介质 2 中与它们在介质 1 中的离子氛相互作用有关的能量 (离子及其离子氛间的距离等于  $2d$ , 在研究电荷过程时, 在 Bomian 溶剂化能项中, 出现补偿因子  $1/2$ ).

计算离子氛力的方法<sup>[3]</sup> 是以伪金属 ( $k = 1$ ) 和相应于整齐的半球形式的近似蛋白球作为外部介质为根据来描述的 (引出了三种离子氛). 仿效方程 (1) 的结论, 我们计算了溶剂化能, 以  $(1/2\epsilon_2) \sum \varphi_i$  替代了后一项, 这里的  $\varphi_i$  是所有离子氛在离子中心构成的势, 水 ( $\epsilon_1 = 78$ ) 是实际反应的外部介质, 所以, 计算静电贡献必需先计算离子由模型溶剂 (M. S) 转至假想溶剂 ( $\epsilon = \epsilon_{H_2O}$ ) 的能量:

$$\Delta G = \frac{N \cdot e^2 \cdot 1}{2a} \left( \frac{1}{\epsilon_{H_2O}} - \frac{1}{\epsilon_{M.S}} \right) \quad (2)$$

选择正确的离子半径是静电计算中最复杂的问题, 显然, 离子的有效半径应大于它非溶剂化的晶体衍射半径. 因为, 首先, 应用这个半径计算的能量总是高于 Bomian 溶剂化能, 其次, 此时并未考虑与邻近介质的特殊相互作用. 对于不同的模型溶剂应考虑到这些特殊的差值, 所以, 以下将研究对每一种具体情况的离子半径的选择.

偶极在能量中的静电贡献由以下方程计算:

$$\Delta G_s = -N \cdot \frac{\mu^2}{d^3} \left[ \epsilon - \frac{1}{2} \epsilon + 1 \right] \quad (3)$$

这里的  $\mu$  是偶极矩, 其余的符号与前相同. 考虑到, 当键离解后, 遗下的偶极的变化不大, 所以偶极对总的溶剂化的贡献也不大, 仅限制了一个偶极, 即无离解时的键  $O-H$  ( $\mu = 1.5D$ , 半径为  $0.2 \text{ nm}$ ) 的超溶剂化的计算. 要计算偶极与外部介质的相互作用, 则应从分别带有电荷的  $O$  和  $H$  原子构成的离子氛的势能出

发,象对离子一样的进行计算.

第二阶段是对介电常数为  $\epsilon_2$  的无规则球的离子(或偶极矩)的模型系统的计算.第三阶段是对酶球结构的计算,由于它们的刚性,而构成了被研究离子的外层,所以,它们的存在与静电场无关.

事实上,离子与内静电场的相互作用在一定程度上与定向极化的溶剂化能类似,在这里同样发生与固定偶极间的相互作用,但是,在定向偶极的球中实际上与离子的存在无关,这就构成了原则的差异,所以,当在各向异性的液体中,离子的溶剂化能在任一点都相同时,这一贡献与被研究离子的定域密切相关.

在进行具体的模型计算以前,还必需讨论一个问题,即活性中心离子基团间的氢键问题,我们采取以下的氢键分布作为所有处于中性状态的基团的最佳构型:

按照 [2, 3] 的资料认为,在天然的丝氨酸蛋白酶中不存在  $\text{His-57} \cdots \text{Im} \cdots \text{Ser-195} \cdots \text{OH}$  氢键.当由 ( ) 转至 ( ) 时,并不影响氢键的总数,在这里没有标明  $\text{Asp-102}$  羧基的另一个氢键,因为在离解时它们仍然保留原有的氢键不变,对于天门冬氨酸离解的状态最佳构型是保留相同数目的氢键.

如果 O 原子是阴离子的一部分,则  $\text{N-H} \cdots \text{O}$  氢键更牢固,因此从结构 ( ) 转至 ( ) 时氢键系统的能量增加,但是我们在一级近似的的情况下,将  $\text{N-H} \cdots \text{O}^-$  键的能量分为两部分,即中性氢键  $\text{N-H} \cdots \text{O}$  的能量和  $\text{N-H}$  偶极与负电荷的静电相互作用的能量,在这一近似中,对于结构 ( ) 和 ( ) 的中性状态的贡献可能是恒定的.

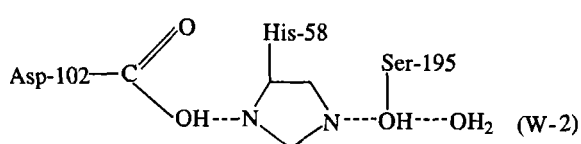


图1 中心离子基团的构型(I)

Fig.1 Configuration of the central ionogenic groups(I)

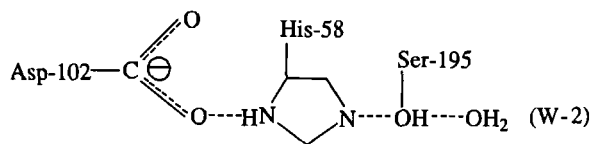


图2 中心离子基团的构型(II)

Fig.2 Configuration of the central ionogenic groups(II)

## 2 计算结果及讨论

现在计算  $\text{Asp-102}$  的  $\text{pK}$  值,我们用 DMF 作为第一个溶剂模型,该溶剂的特点是与阴离子的范德华作用很弱,按一系列羧酸的  $\text{pK}$  值的资料,当由水中转至 DMF 中时,  $\text{pK}$  值提高到  $6.1 \pm 0.2$ <sup>[4]</sup>,文献 [1] 指出,它们间的偏差不会高于 0.2,  $\lg \gamma_{\text{H}^+} = -2.5$  即 DMF 对质子的溶剂化比水强.因而,对于我们有趣的是  $\Delta \text{pK} - \lg \gamma_{\text{H}^+} = 8.6$  (等价于  $+0.507 \text{ eV}$ ) 的值,即在模型溶剂中,对羧基离解和在水中氢离子的产量都是极为不利的,主要因为未考虑邻近相互作用能.在 DMF 中,  $\text{CO}_2^-$  离子不形成氢键.而中性的羧基形成一个氢键,与此相反,在蛋白球中无论是  $\text{CO}_2^-$  或是  $\text{COOH}$  都形成四个氢键,  $\text{Asp-102}$  离解后使  $\text{Asp-102} \cdots \text{HN}$  ( $\text{His-57}$  咪唑基) 键的能值更有利.  $\text{NH} \cdots \text{O}$  键的平均能值约为  $14.63 \text{ kJ}$  ( $0.157 \text{ eV}$ )<sup>[4]</sup>,相应于校正后的  $\Delta \text{pK} - \lg \gamma_{\text{H}^+}$  值为 6.0

现在来估计  $\text{CO}_2^-$  的有效半径.考虑到氧原子的范德华半径和邻近 C-H 键的碳原子的屏蔽  $\text{CO}_2^-$  离子的特征大小约为  $0.50 \text{ nm} \times 0.32 \text{ nm} \times 0.36 \text{ nm}$ .我们取直径为算术平均值的球代替该离子的大小,即球半径为  $0.2 \text{ nm}$ ,考虑到邻近相互作用的离子被球部分包裹应在该值上加一个校正值,在 DMF 中, C-H 键的氢原子对阴离子的旋转,故对于  $0.2 \text{ nm}$  要加上  $0.06 \text{ nm}$ ,即为氢原子范德华半径的一半.在 DMF 中,对键的所有偶极未考虑邻近相互作用,于是离子半径则取  $0.26 \text{ nm}$ .应当指出的是,如果  $\text{CO}_2^-$  离子是具有半轴为  $0.310 \times 0.235 \times 0.235 \text{ nm}$  的椭圆球,并应用金属椭圆球表面势计算该球的能量,其结果仅比具有半径为  $0.26 \text{ nm}$  的球的能量高 0.4%.

当半径为  $0.26 \text{ nm}$  的离子从 DMF 中转至蛋白球中的  $\text{Asp-102}$  的羧基的位置时,计算能量的损失为  $0.440 \text{ eV}$ ,这是当蛋白球的  $\epsilon = 4$  时,球面离球的中心为  $0.16 \text{ nm}$  时 ( $\epsilon$  其它值的结果列于表 1) 计算得的结果.由于邻近相互作用或是静电能都很弱,所以得到很大的总能量损耗值  $0.765 \text{ eV}$ ,则应是很弱的酸 ( $\text{pK}$  为 17),它的酸离解是不真实的,而结果确实发生实质性的内球静电场的补偿效应.多肽链和它的偶极及离子在  $\text{Asp-102}$  阴离子的中心构成了很大的正的势能,而获得了很大的能量,即在 4D 和 6D 的变体中分别计

算得 0.479 eV 和 0.718 eV. 这一效应主要补偿了溶剂化能损失, 考虑所有的其它因素, 则较大地减少了这种效应 (见表 2), 而使自由能分别提高了 0.317 eV 和 0.078 eV, 即使  $pK$  提高了 5.4 和 1.3 个单位.  $\epsilon$  从 3 变为 6 -  $\Delta pK$  为 5.6 ~ 5.2 和 0.2 ~ 2.5 结果无实质性的变化,

第二个模型溶剂是 FA, 当羧酸由水中转至 FA 中时,  $pK$  的平均变化值  $\Delta pK = 1.85^{[5]}$ ,  $\lg \chi_{H^+} = -0.7$ , 因此  $\Delta pK - \lg \chi_{H^+}$  为 2.55, 效应比非质子的 DMF 较大的减少, 因为在 FA 中溶剂和阴离子间保持有较弱的氢键, 在 FA 中和在蛋白球中, 无论对于 COOH 或是  $CO_2^-$  氢键数都是相同的, 故不须校正.

在 FA 的模型中对 Boman 溶剂化能进行静电计算时, 须研究电荷与介质的相互作用能, 即处于球界面的牢固的邻近相互作用, 所以, 在该球体中包裹了与 O 连接成氢键 N-H ... O 的 NH

表 1 溶剂化能的变化对 Asp-102-COOH 电离能的贡献 (eV)

Tab 1 Contribution of the change of solvation energy to the ionization energy of Asp-102-COOH

二 FA ( $\Delta pK - \lg \chi_{H^+} = 8.6 - 0.507$ eV)					FA ( $\Delta pK - \lg \chi_{H^+} = 2.55 - 0.150$ eV)				
氢键的校正为 -0.152 eV									
基 团	$\epsilon$ 为以下值时 球蛋白中的转移能				基 团	$\epsilon$ 为以下值时 球蛋白中的转移能			
	3	4	5	6		3	4	5	6
$CO_2^-$ 离子	0.611	0.440	0.388	0.269	$CO_2^-$ 离子	0.554	0.409	0.324	0.266
OH 偶极	-0.039	-0.030	-0.024	-0.020	OH 偶极	-0.042	-0.033	-0.027	-0.023

基, 这个球体的平均半径等于 0.295 nm, 在 Asp- $CO_2^-$  的能量的静电贡献是 0.409 eV, 电离的总能量损耗等于 0.526 eV (见表 1).

既然在 FA 的模型中我们包含了蛋白球中邻近相互作用的氢键, 就应从内球势场中由偶极基团与 Asp- $CO_2^-$  形成的氢键中除去, 这就意味着, 在 FA 的溶液中的四个氢键 N-H ... O 的能量等于在蛋白球中相应的键能. 象在 FA 中一样, 在蛋白质中, 氢键的能量会使它的静电组成相对偏低, 因为在具有低介电常数的介质中静电能较大. 与 FA 的模型相反, 在 DMF 的模型中, 我们计算了偶极 O-H 和 N-H 与天冬氨酸盐的电荷形成氢键的相互作用, 即相应的贡献并不偏低. 这可能在 FA 中计算的  $pK$  值比在 DMF 中更加密切相关 (见表 2).

除去四个氢键所构成的势能, 而降低了内球静电场的能量, 其值为 0.34 eV 和 0.36 eV (相应于 6D 和 4D 的变体), 所以, 在 FA 的模型中比在 DMF 的模型中, 其溶剂耗损能减少, 而与内球场相

表 2 电荷与  $\epsilon = 4$  的内球静电场的相互作用在 Asp-102-COOH 电离能中的贡献  
Tab 2 Contribution of the interaction of the charge and intraglobular electric field ( $\epsilon = 4$ ) to the ionization energy of Asp-102-COOH

基 团	二甲酰胺		甲酰胺	
	6D	4D	6D	4D
$CO_2^-$ 离子	-0.718	-0.479	-0.352	-0.091
OH 偶极	+0.025	+0.025	-0.005	-0.005
在 His-57 中 NH 偶极的位置改变 (见、式)	+0.006	+0.006	+0.006	+0.006

互作用所得的能量则增加, 结果两个模型计算的能差并不大, 即为 0.10 ~ 0.12 eV,  $pK$  为 1.65 ~ 2.0 个单位. 用两个相似模型的一套参数进行计算, 得到相似的结论, 若用两个完全不同的模型, 它们的  $\Delta pK$  值虽差 6 ~ 7, 对它们计算的结果也是比较吻合的.

在以上的计算中阴离子的电荷中心定域在两个氧原子的中间, 这只适用于在对称的环境中的离子或自由离子, 但在蛋白球中离子的环境则是不对称的. 在  $O_{\delta_2}$  原子上的内球静电势为 0.28 V 比离子中心正, 而  $O_{\delta_1}$  为 0.15 V 比离子中心负 (对于 4D 的变体分别为 0.18 V 和 0.06 V), 因而, 在这种情况下  $O_{\delta_2}$  原子的负电向中心移动. Asp- $O_2^-$  周围分布的不是中性的  $I_m$ , 而是阳离子  $I_m^+$ , 故静电势减少为 +0.19 eV 和 -0.09 eV (6D 的变体) 及 +0.11 V 和 -0.01 V (4D).

但应着重指出, 与羧基的两种形式  $C \begin{matrix} \diagup O^- \\ \diagdown O \end{matrix}$  和  $C \begin{matrix} \diagup O \\ \diagdown O^- \end{matrix}$  的能差  $\geq 1.5$  eV<sup>[14]</sup> 相比势能差并不大, 所以, 全

部电荷定域在一个氧原子上而使共振能的损失不大,电荷重心的较小移动在该近似计算中可认为是正确的.而我们的计算仅限于电荷重心移动不大的情况,所以本计算的假设可认为是正确的.

#### 参考文献:

- [1] Bktoft J, Kraut J, Freer S. A Detailed Structural Comparison Between the Charge Relay System in Chymotrypsinogen and in Chymotrypsin[J]. *Biochemistry*, 1976, (15): 4481~4485.
- [2] Matthews D, Martin K. Basis for Substrate Preference of Amino Acid Transport System L over Transport System A[J]. *Biochemistry*, 1977, (25): 8875~8883.
- [3] Clare B W, Etal. Solvation of Ions. The Effect of Anion Solvation on Acid Dissociation Constants in Methanol[J]. *Amer Chem. Soc*, 1966, (88): 1911~1916.
- [4] Mandel M, Decroly P. Dissociation Constants of Carboxylic Acids in Formamide[J]. *Trans Faraday Soc*, 1960, (56): 29~36.

(上接第98页)

- [3] 孙庆国,肖学英,宋明礼,等. 高分散氢氧化镁的制备[J]. *盐湖研究*, 1999, 7(2): 35~42.
- [4] 翟学良,高贵平,李素芬. 卤水-氨法连续沉淀氢氧化镁[J]. *海湖盐与化工*, 1996, 25(2): 5~7.
- [5] Mullin J W, Murphy J D, Schenlo, et al. Spoons[J]. *Aging of Precipitated Magnesium Hydroxide*, 1989, (28): 1725~1730.
- [6] Tuek M, Gnot W. Precipitation of Magnesium Hydroxide from Brine, 1995, (34): 244~250.
- [7] 方裕勋,罗新. 卤水-白云石法氢氧化镁沉淀过程实验和研究[J]. *无机盐工业*, 1998, 30(2): 9~11.
- [8] 刘光启. 化学化工物性数据手册(无机卷)[M]. 北京:化学工业出版社, 2002. 297.
- [9] 丁绪淮,谈遵. 工业结晶[M]. 北京:化工出版社, 1985. 75~78.
- [10] 张克从,张乐. 晶体生长科学与技术[M]. 北京:科学出版社, 1997. 171~247.