

八肋游仆虫中心蛋白 N 端半分子 Loop 区首个氨基酸的作用

赵 冰 段 炼 刘 文 赵亚琴 杨斌盛*

(山西大学分子科学研究所, 太原 030006)

摘要: 本文通过分子生物学方法将八肋游仆虫中心蛋白 N 端半分子 loop 区的首个氨基酸, 天冬氨酸 Asp37 和 Asp73, 分别突变为带相反电荷的赖氨酸。使用铽敏化荧光、TNS 疏水探针研究了八肋游仆虫中心蛋白 N 端半分子 loop 区的首个氨基酸的作用。结果表明: 当中心蛋白 loop I 区 37 位的天冬氨酸突变为赖氨酸后, loop I 丧失了金属离子结合能力, 进而影响了中心蛋白依赖于金属离子的构象变化; 而 loop II 区 73 位的天冬氨酸突变为赖氨酸后仍保持金属离子结合能力, 依赖于金属离子的构象变化减小。中心蛋白发挥大部分生物功能都依赖于金属离子, 这就表明 loop I 区 37 位的天冬氨酸在中心蛋白发挥生物功能时起着重要作用, 是不可缺少的。在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes, pH 7.4, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 条件下, 八肋游仆虫中心蛋白 N 端半分子 loop II 与金属离子 Tb^{3+} 和 Ca^{2+} 的结合常数分别为: $K_{\text{II}}(\text{Tb}^{3+}) = (8.31 \pm 0.18) \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $K_{\text{II}}(\text{Ca}^{2+}) = (0.94 \pm 0.12) \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 中心蛋白 N 端半分子的两个金属结合部位结合能力顺序为: $\text{I} > \text{II}$ 。

关键词: 中心蛋白; N 端半分子; Tb^{3+} ; Ca^{2+} ; TNS

中图分类号: O641.1; O614.341; O614.23+1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2011)02-0245-06

Roles of Asp37 and Asp73 in the Loop of N-Terminal Domain of Ciliate Euplotes Octocarinatus Centrin

ZHAO Bing DUAN Lian LIU Wen ZHAO Ya-Qin YANG Bin-Sheng*

(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Ciliate *Euplotes octocarinatus* centrin (EoCen) is a member of the EF-hand superfamily of calcium-binding proteins, which often associated with the centrosomes and basal bodies. To explore the importance of Asp37 and Asp73 in the loop of N-terminal of EoCen, the mutants of N-D37K and N-D73K (D is aspartic acid, and K is lysine) were obtained by molecular biological methods. The experiments of aromatic residue-sensitized Tb^{3+} energy transfer demonstrate that: N-D73K can bind two equivalents Tb^{3+} , which is similar to N-EoCen (WT-EoCen binds four equiv. Tb^{3+}), and N-D37K can only bind one equivalent Tb^{3+} . Using 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate (TNS) as a hydrophobic probe, exposure of the hydrophobic surface upon metal binding was found to be significantly reduced for the metal ion-saturated N-D37K mutant. The results indicate that Asp37 plays an important role in the biological functions of N-terminal domain of EoCen. Meanwhile the conditional binding constants of the N-EoCen loop II were quantitatively found to be $K_{\text{II}} = (8.31 \pm 0.18) \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $K_{\text{II}} = (0.94 \pm 0.12) \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ with Tb^{3+} and Ca^{2+} , respectively, and the order for the metal-binding affinity of the two sites in N-EoCen is $\text{I} > \text{II}$.

Key words: centrin; N-terminal; Tb^{3+} ; Ca^{2+} ; TNS

收稿日期: 2010-09-06。收修改稿日期: 2010-09-25。

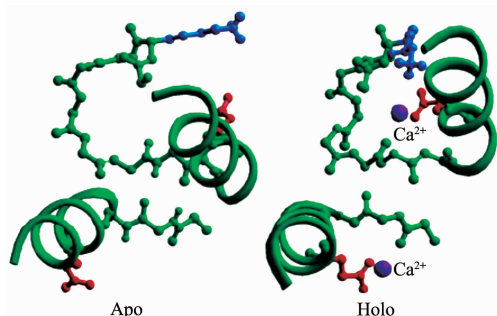
国家自然科学基金(No.20771068; 20901048)和山西省自然科学基金(No.20901048)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: yanghs@sxu.edu.cn

中心蛋白是分子量约为 20 kDa 的酸性蛋白,属于高度保守的 EF-Hand 钙结合蛋白超家族^[1-2]。自从绿藻中心蛋白发现以来,这些蛋白在微管组织中心(MTOC)中时间和空间上的分布,以及这种蛋白在细胞循环调控中的重要作用就成了细胞生物学研究的内容之一^[2-6]。最初,中心蛋白被认为是纤维的主要成分,参与核与鞭毛单细胞鞭毛器的连接,随后发现,中心蛋白是中心粒、中心体以及有丝分裂纺锤体极体中广泛存在的组成成分^[3,7-8]。

八肋游仆虫中心蛋白(EoCen)与人中心蛋白HsCen1、HsCen2、HsCen3 以及钙调蛋白的同源性分别为 60%、62%、66%和 50%^[9]。氨基酸序列分析表明 EoCen 由 2 个相对独立的区域(N 端和 C 端)组成,每个区域包含 2 个 EF-Hand 结构和 2 个钙离子结合位点。由于每个 EF-Hand 的氨基酸序列都不同,这就决定了 4 个钙离子结合位点的性质也不同^[10]。例如人中心蛋白 HsCen2 的 loop IV 区有一个高亲和位点^[11-12],而 HsCen3 则表现出不同的结合行为:它有 3 个 Ca^{2+} 结合位点,其中 1 个位于 N 端区域,而且是 1 个 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的混合结合位点^[12-13]。本实验室过去的研究工作发现,八肋游仆虫中心蛋白的 4 个 Ca^{2+} 结合位点可分为两类,分别是 C 端荧光弱敏化的高亲和位点和 N 端荧光强敏化的低亲和位点,4 个结合部位结合能力为 $\text{IV} > \text{III} > \text{I}, \text{II}$ ^[14]。

图 1 为钙调蛋白 N 端半分子的 2 个 EF-Hand 结构结合金属离子前后的构象变化^[15]。中心蛋白结合金属离子的结构模式可能与钙调蛋白类似。



Side chain of the conserved lysine in position 2 of EF1 forms a salt bridge with the side chain of glutamate in position 12 in the apo form; Ca^{2+} binding triggers the movements of the glutamate 12 and 12' side chains that are accompanied by the movement of the helix

图 1 钙调蛋白 N 端半分子结合金属离子前后的构象变化^[15]

Fig.1 Conformational change of N-terminal EF-Hand domain of CaM induced by Ca^{2+} ^[15]

中心蛋白可能是一个钙离子传感器,在 Ca^{2+} 饱和和状态下,中心蛋白与特定的靶蛋白相互作用来调控细胞活性。一般来说, Ca^{2+} 的结合使得 EF-Hand 结构的 α 螺旋发生改变,转为以“开放”的构象存在,这样就导致了疏水腔的暴露,进而结合靶肽^[13,16]。蛋白质发挥功能时通常伴随着构象的变化,2-对甲苯胺基-6-萘磺酸(TNS)已经被广泛用于金属离子诱导的中心蛋白构象变化的探针^[17]。本实验室过去的研究发现:中心蛋白结合金属离子后,C 端和 N 端发生的构象变化是不同的,N 端能暴露出比 C 端更多的疏水表面^[18]。

中心蛋白 loop 区最规范的序列中都包含 3 个 D(天冬氨酸),目前所发现的 EF-hand 结构中,第一位的 D 都是非常保守的,很少有第一位不是 D 的^[16]。由于中心蛋白 N 端是高变区,有人预测它与不同中心蛋白的功能多样性有关^[3,11,19]。本文将中心蛋白 N 端半分子 loop 区的首个氨基酸天冬氨酸突变为赖氨酸,研究 N 端 I、II 结合部位结合能力的差异以及天冬氨酸在 N 端半分子构象变化中的作用,从而探索 N 端半分子首个氨基酸在中心蛋白发挥生物功能中的作用。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

N-2-羧乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(Hepes);2-对甲苯胺基-6-萘磺酸(TNS)(Sigma 公司);稀土氧化物 Tb_4O_7 , 纯度不低于 99.99%(湖南稀土金属材料研究所产品);其他均为分析纯试剂。

主要酶及生化试剂:限制性内切核酸酶 BamH I、Sal I、T₄ DNA 连接酶,为 Promega 公司产品;Taq DNA 聚合酶购于大连 TaKaRa 公司;质粒小量提取试剂盒及 DNA 回收试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司;LB 培养基所用的试剂 Tryptone、Yeast Extract、Sodium Chloride 购于上海 Sangon 公司;核酸分子量标准为 MBI 公司产品。

Hitachi F-2500 和 Hitachi-850 荧光光谱仪、HP8453UV-Vis 吸收光谱仪、Beckman 酸度计、PM-10 超滤膜、Eppendorf 移液枪、Amicon Model 8010 超滤器。

1.2 储备液的配制

稀土溶液:将稀土氧化物(Tb_4O_7)用适量的浓盐酸溶解,用双蒸水配成 pH=5~6 的溶液备用,以二甲酚橙为指示剂,在 pH=5.6 的乙酸-乙酸钠缓冲液中

用标准 EDTA 溶液滴定,测定其标准浓度。

TNS 溶液:称取一定量的 TNS,加入少量 NaOH 溶液溶解,三次蒸馏水定容到 50 mL,4 °C 放置备用,使用时稀释到所需浓度。

1.3 蛋白的表达和纯化

在八肋游仆虫中心蛋白 N 端半分子 N-EoCen 质粒的基础上用突变试剂盒 TaKaRa MutanBEST Kit D401 通过定点突变技术得到了重组表达质粒 pGEX-6p-N-D73K。利用 PCR 技术,在全分子突变体 D37K 的基础上得到了 N 端突变体 N-D37K。DNA 序列测定表明所得到的突变体只含有目的位点的突变基因,而没有其他任何位点的随机突变。将重组质粒转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,在诱导剂 IPTG 诱导下实现蛋白可溶性表达。融合蛋白经 PPase 酶切和 GST 亲和层析后得到目的蛋白。同时将野生型蛋白(EoCen)和课题组之前构建完成的片段分子蛋白(N-EoCen)诱导表达纯化得到目的蛋白。经 SDS-PAGE 分析显示所有蛋白均不含杂蛋白条带,达到实验所需纯度。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶包含 390 mmol·L⁻¹ Tris (pH 8.8),10%过硫酸铵,15% acrylamide/bis (29:1),0.05% TEMED。Tris-Glycine 电泳缓冲液包含 25 mmol·L⁻¹ Tris (pH 8.3),250 mmol·L⁻¹ 甘氨酸。电泳在室温下进行,天然胶用冰袋保护。样品在浓缩胶部分时,电

泳仪电源电压设置为 80 V,样品进入到分离胶后将电压调为 120 V。电泳时间约为 2 h。电泳完成后胶片经考马斯亮蓝 R-250 染色,甲醇-冰乙酸脱色液脱色。最后经 VILBER LOURMAT 凝胶成像系统成像。

1.5 光谱测定

荧光光谱在 Hitachi-850 和 Hitachi F-2500 荧光光谱仪上测得。测定 TNS 的荧光时,激发波长选定 320 nm,激发和发射狭缝均为 10 nm,从 350~600 nm 记录荧光发射谱。实验均在室温、10 mmol·L⁻¹ 的 Hepes, pH 7.4 的条件下进行。为了便于不同滴定数据的对比并消除滴定中的稀释效应,荧光变化用摩尔荧光强度 $\text{Fluorescence}/c_{\text{protein}}$ 来表示。

2 结果与讨论

2.1 变性胶电泳和天然胶电泳分析

N-D37K 和 N-D73K 突变蛋白在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中 [图 2A (泳道 1 和 2)] 与野生型 N-EoCen [图 2A (泳道 4)] 有相同的迁移速率,所以在 N 端首个氨基酸突变后,分子量没有大的改变,依然是 10 kDa。与变性胶不同的是,N-EoCen [图 2B (泳道 2)] 比 N-D73K 和 N-D37K [图 2B (泳道 1 和 3)] 更接近胶片的底部(在电泳体系中对正极),表明 N-D37K 和 N-D73K 比 N-EoCen 拥有更多的正电荷,由于天冬氨酸带负电,而赖氨酸带正电,这就证明得到了纯度较高的 N-D37K 和 N-D73K 突变蛋白。

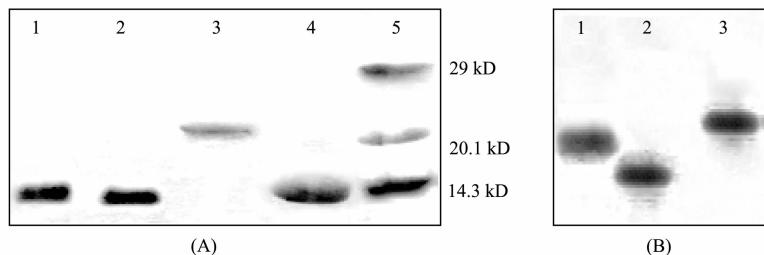


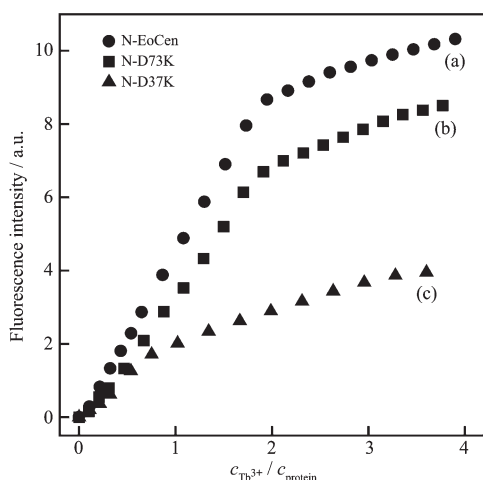
图 2 (A) 15%变性胶分析,(1) N-D37K;(2) N-D73K;(3) EoCen;(4) N-EoCen;(5) Marker;
(B) 15%天然胶分析,(1) N-D73K;(2) N-EoCen;(3) N-D37K

Fig.2 (A) Purified N-D37K (1), N-D73K (2), EoCen (3), N-EoCen (4), Marker (5) monitored by 15% SDS-PAGE;
(B) Purified N-D73K (1), N-EoCen (2), N-D37K (3) monitored by 15% native PAGE

2.2 中心蛋白的 Tb³⁺ 荧光敏化

Tb³⁺ 是被广泛应用的 Ca²⁺ 结合蛋白的离子探针^[20]。将 Tb³⁺ 加入到蛋白溶液中,当酪氨酸或色氨酸在 280 nm 处激发时,在 545 nm 处可以检测到 Tb³⁺ 的敏化荧光。图 3 是 Tb³⁺ 在 545 nm 处的摩尔敏化荧光强度对 r , 即 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{protein}}$, 所作的滴定曲线。从图 3 中可以看到,对于 N-EoCen 和 N-D73K,随着前 2 个

Tb³⁺ 的加入,其摩尔敏化荧光强度都得到增强,并且都在 $r=2$ 时增强减弱,说明每个 N-EoCen 和 N-D73K 都结合 2 个 Tb³⁺ 离子,只是 N-D73K 的最大摩尔敏化荧光强度比 N-EoCen 降低了大约 20%,而 N-D37K 的摩尔敏化荧光强度在 $r=1$ 时增强减弱,说明每个 N-D37K 只结合 1 个 Tb³⁺, 且其最大摩尔敏化荧光强度大约只有 N-EoCen 的 25%。这些结果



Measuring the fluorescence intensity at 545 nm; Protein concentration is $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes, pH 7.4, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl

图 3 Tb^{3+} 分别滴定 N-EoCen (a), N-D73K (b)和 N-D37K (c)蛋白的滴定曲线

Fig.3 Titration curves for the addition of Tb^{3+} to N-EoCen(a), N-D73K(b) and N-D37K(c), respectively

表明当中心蛋白 N 端 loop I 区的 37 位天冬氨酸突变为赖氨酸后,中心蛋白 loop I 区丧失了金属离子结合能力。

从八肋游仆虫中心蛋白的一级结构可见,N 端 loop I 区 37 位天冬氨酸突变为赖氨酸后,loop I 区的净电荷由-1 变为+1,而金属离子带正电,由于排斥作用,导致 Loop I 丧失了金属离子结合能力。loop II 区 73 位的天冬氨酸突变为赖氨酸后,loop II 区的净电荷由-3 变为-1,仍能结合金属离子,与实验结果相吻合。N-D73K 的敏化荧光强度相对于野生型 N-EoCen 有所降低,这可能是由于 73 位的天冬氨酸突变为赖氨酸后, $\text{Tb}_2\text{-N-D73K}$ 与 $\text{Tb}_2\text{-N-EoCen}$ 的三级结构不同所致。

2.3 $\text{Tb}^{3+}/\text{Ca}^{2+}$ 与 N-D37K 结合常数的计算

从 N-D37K 的 Tb^{3+} 荧光滴定曲线 (图 3c) 可以得知:一个 N-D37K 结合一个 Tb^{3+} ,即 $n=1$,用 $c_{\text{t},\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{b},\text{Tb}^{3+}}$ 对 $1/(nc_{\text{t},\text{N-D37K}}-c_{\text{b},\text{Tb}^{3+}})$ 作图(图 4),按照(1)式^[21]拟合。

$$\frac{c_{\text{t},\text{Tb}^{3+}}}{c_{\text{b},\text{Tb}^{3+}}} = 1 + \frac{1}{K(c_{\text{t},\text{N-D37K}} - c_{\text{b},\text{Tb}^{3+}})} \quad (1)$$

其中 $c_{\text{t},\text{Tb}^{3+}}$, $c_{\text{b},\text{Tb}^{3+}}$ 分别是铽离子的总浓度和结合浓度, $c_{\text{t},\text{N-D37K}}$ 是 N-D37K 的总浓度。由图 4 可得 Tb^{3+} 与 loop II 的结合常数, $K_{\text{II}} = (8.31 \pm 0.18) \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

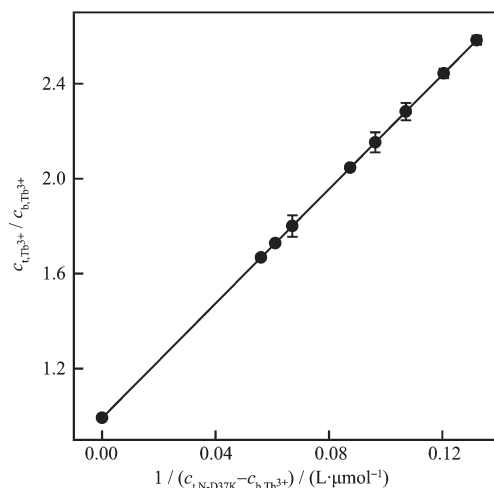


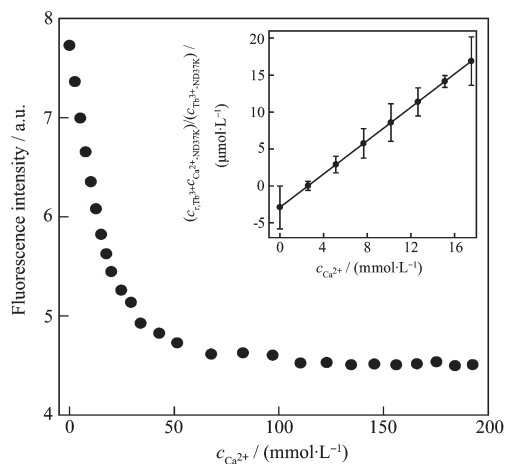
图 4 $c_{\text{t},\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{b},\text{Tb}^{3+}}$ 对 $1/(c_{\text{t},\text{N-D37K}}-c_{\text{b},\text{Tb}^{3+}})$ 作图

Fig.4 Plot of $c_{\text{t},\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{b},\text{Tb}^{3+}}$ versus $1/(c_{\text{t},\text{N-D37K}}-c_{\text{b},\text{Tb}^{3+}})$

在 Tb-N-D37K 体系中, Ca^{2+} 的加入能使 545 nm 处铽离子的敏化荧光猝灭。图 5 是 Ca^{2+} 滴定 Tb-N-D37K 体系的荧光猝灭曲线,这种荧光猝灭来自于 Ca^{2+} 和 Tb^{3+} 与蛋白的竞争结合,即蛋白体系从 N-D37K-Tb 转化为 N-D37K-Ca。钙离子与 N-D37K 的 loop II 的结合常数可以通过图 5 和(2)式^[21]拟合得到。

$$\frac{c_{\text{f},\text{Tb}^{3+}} - c_{\text{f},\text{Tb}^{3+}}^0}{c_{\text{f},\text{Tb}^{3+}}^0} = \frac{K_{\text{Ca-N-D37K}}}{K_{\text{Tb-N-D37K}}} \cdot c_{\text{t},\text{Ca}^{2+}} \quad (2)$$

所得 Ca^{2+} 与 N-D37K 的 loop II 的结合常数为 $K_{\text{II}} = (0.94 \pm 0.12) \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。



Experimental condition: $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, at pH 7.4 and 25°C ; Concentration of N-D37K was $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Inset is the plot of $(c_{\text{Tb}^{3+}} - c_{\text{Tb}^{3+}}^0)/c_{\text{Tb}^{3+}}^0$ versus $c_{\text{t},\text{Ca}^{2+}}$

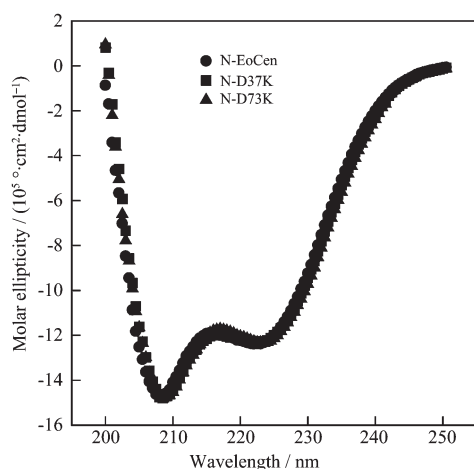
图 5 Ca^{2+} 滴定 N-D37K-Tb 的荧光竞争曲线

Fig.5 Fluorescence quenching curve for the addition of Ca^{2+} to N-D37K-Tb

Tb^{3+} 和 Ca^{2+} 与中心蛋白 loop I、loop II 的平均结合常数分别为 $K_{I,II}(Tb^{3+})=(2.13\pm0.10)\times10^5\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 和 $K_{I,II}(Ca^{2+})=(7.52\pm0.02)\times10^2\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ [21], 分别大约是 N-D37K 的 loop II 结合常数 $K_{II}(Tb^{3+})=(8.31\pm0.18)\times10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 和 $K_{II}(Ca^{2+})=(0.94\pm0.12)\times10^2\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 3 倍和 8 倍。可以推断 Tb^{3+} 和 Ca^{2+} 与中心蛋白 loop I 的结合能力比 loop II 大, 中心蛋白 N 端半分子的 2 个金属结合部位结合能力顺序为 $I > II$ 。这与 Ye 等 [22] 提出的 charge-ligand-balanced 模型是一致的。

2.4 金属离子诱导的蛋白构象变化

远紫外圆二色谱可用于研究蛋白质的二级结构。图 6 是 N-EoCen, N-D73K 和 N-D37K 在生理条件下的圆二色谱。可见突变体 N-D73K、N-D37K 的 CD 谱与 N-EoCen 几乎完全重合, 表明 loop 区天冬氨酸的突变没有引起蛋白质二级结构发生大的变化。



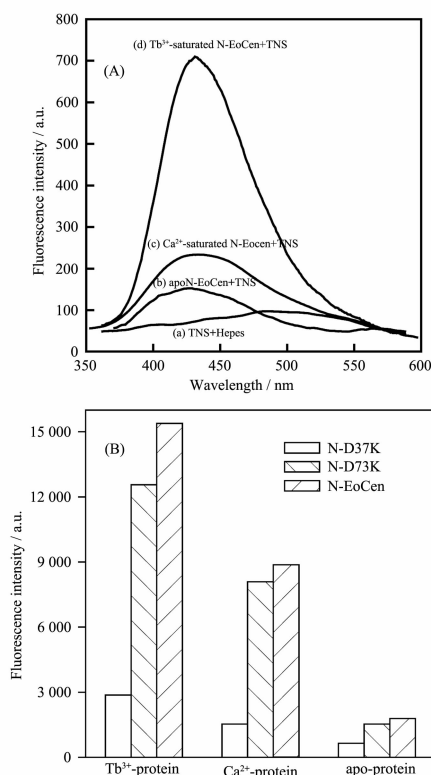
Experimental condition: in $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hepes and $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl at pH 7.4 and $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

图 6 N-EoCen、N-D73K 和 N-D37K 的圆二色(CD)光谱
Fig.6 Far-UV light CD spectra of N-EoCen and mutants

TNS 是一种疏水荧光探针, 它在水溶液中量子产率低, 基本不发荧光, 但在非极性溶液中或者和蛋白的疏水区结合后, 其量子产率大增, 荧光大大增强, 最大荧光峰发生蓝移 [23]。将 TNS 分别加入到 apoN-EoCen、 Tb^{3+} 饱和 N-EoCen 以及 Ca^{2+} 饱和 N-EoCen 中, 测得的荧光光谱如图 7A 所示。可见蛋白质使 TNS 的最大荧光峰由 500 nm 蓝移到 435 nm , 荧光强度增强; Tb^{3+} 饱和蛋白的增强效应远大于 Ca^{2+} 饱和蛋白的效应。表明 N-EoCen 结合金属离子后暴露出疏水残基、疏水面, 即 N-EoCen 的三级结构在结合金属离子后发生了改变。

用 TNS 分别滴定 N-EoCen、N-D73K 和 N-D37K

的空蛋白、 Tb^{3+} 饱和蛋白以及 Ca^{2+} 饱和蛋白, 其 435 nm 处最大荧光强度如图 7B 所示。从图中可以看出, 在没有结合金属离子时, 空蛋白使 TNS 435 nm 处荧光增强, 有少部分疏水表面的暴露, 而且 N-EoCen、N-D73K 和 N-D37K 的暴露程度也不相同, 37 位和 73 位天冬氨酸的突变导致疏水表面暴露程度减小, 即突变在一定程度上改变了蛋白的三级结构; Tb^{3+} 饱和蛋白的疏水暴露程度大于 Ca^{2+} 饱和蛋白, 都远大于空蛋白; 结合金属离子后, N-D37K 的疏水暴露程度较 N-EoCen 和 N-D73K 都小得多。说明 Asp37 突变后, loop I 丧失了金属离子结合能力, 从而影响了中心蛋白依赖于金属离子的构象变化。



Protein concentration was $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hepes, $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, at pH 7.4 and $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

图 7 (A) TNS 荧光光谱: (a) 只有 TNS 时; (b) 加入 apoN-EoCen 时; (c) 加入 Ca^{2+} -saturated N-EoCen 时; (d) 加入 Tb^{3+} -saturated N-EoCen 时; (B) Apo-protein, Ca^{2+} -saturated protein 和 Tb^{3+} -saturated protein 的荧光柱状图

Fig.7 (A) Emission fluorescence spectra of TNS alone (a); in the presence of apoN-EoCen (b); Ca^{2+} -saturated N-EoCen (c) and Tb^{3+} -saturated N-EoCen (d); (B) Plot of Fluorescence of apo-protein, Ca^{2+} -saturated protein and Tb^{3+} -saturated protein

3 结 论

中心蛋白发挥大部分生物功能都依赖于金属离子,当中心蛋白 loop I 区 37 位的天冬氨酸突变为赖氨酸后,loop I 丧失了金属离子结合能力,进而影响了其依赖于金属离子的构象变化。说明 loop I 区 37 位的天冬氨酸在中心蛋白发挥生物功能时起着重要作用,是不可缺少的。而 loop II 区 73 位的天冬氨酸突变为赖氨酸后仍保持金属离子结合能力,依赖于金属离子的构象变化减小。在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes、pH 7.4、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 条件下,中心蛋白 loop II 与 Tb^{3+} 以及 Ca^{2+} 的结合常数分别为 $K_{\text{II}}(\text{Tb}^{3+})=(8.31 \pm 0.18) \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $K_{\text{II}}(\text{Ca}^{2+})=(0.94 \pm 0.12) \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, N 端半分子的 2 个金属结合部位的结合能力顺序为: $\text{I} > \text{II}$ 。

参考文献:

- [1] Huang B, Mengersen A, Lee V D. *J. Cell Biol.*, **1988**,**107**: 133-140
- [2] Schiebel E, Bornens M. *Trends Cell Biol.*, **1995**,**5**:197-201
- [3] Salisbury J L. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1995**,**7**:39-45
- [4] Salisbury J L, Suino K M, Busby R, et al. *Curr. Biol.*, **2002**, **12**:1287-1292
- [5] Wolfrum U, Giessl A, Pulvermuller A. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: Kluwer Academic Publishers, **2002**:155-178
- [6] Tourbez M, Firanesco C, Yang A, et al. *J. Biol. Chem.*, **2004**, **279**(46):47672-47680
- [7] Salisbury J L, Baron A, Surek B, et al. *J. Cell Biol.*, **1984**,**99** (3):962-970
- [8] Salisbury J L, Floyd G L. *Science*, **1978**,**202**(4371):975-977
- [9] Daunderer C, Schliwa M, Craf R. *Eur. J. Cell Biol.*, **2001**,**80**: 621-630
- [10] Juan M S, Fatiha K, Liliane A, et al. *J. Mol. Biol.*, **2010**, **395**:191-204
- [11] Wiech H, Geier B M, Paschke T, et al. *J. Biol. Chem.*, **1996**,**271**(37):22453-22461
- [12] Durussel I, Blouquit Y, Middendorp S, et al. *FEBS Lett.*, **2000**,**472**(2):208-212
- [13] Cox J A, Tirone F, Durussel I, et al. *Biochemistry*, **2005**,**44**: 840-850
- [14] Zhao Y Q, Feng J Y, Ling A H, et al. *Spectrochim. Acta Part A*, **2009**,**71**:1756-1761
- [15] Biekofsky R, Turjanski A, Estrin D, et al. *Biochemistry*, **2004**,**43**:6554-6564
- [16] Rigden D J, Galperin M Y. *J. Mol. Biol.*, **2004**,**343**:971-984
- [17] Wang Z J, Ren L X, Zhao Y Q, et al. *Spectrochim. Acta Part A*, **2007**,**66**:1323-1326
- [18] Duan L, Zhao Y Q, Wang Z J, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**,**102**:268-277
- [19] Bhattacharya D, Steinkter J, Melkonian M. *Plant. Mol. Biol.*, **1993**,**23**:1243-1254
- [20] YANG Pin(杨频), YANG Bin-Sheng(杨斌盛). *Introduction to Methods of Ion Probe* (离子探针方法导论). Beijing: Science Press, **1994**:9-13
- [21] REN Lie-Xiang(任列香), ZHAO Ya-Qin(赵亚琴), FENG Jiu-Ying(丰九英), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(Wuji Huaxue Xuebao), **2006**,**22**:87-90
- [22] Ye Y M, Lee H W, Yang W, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, **127**:3743-3750
- [23] McClure W O, Edelman G M. *Biochemistry*, **1966**,**5**:1908-1919