

盐酸氯丙嗪对八肋游仆虫中心蛋白C端功能的抑制

董倩 叶旭文 杨静 王文明 赵亚琴 杨斌盛*

(山西大学分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

摘要: 通过荧光光谱分析、等温滴定量热(ITC)、圆二色谱(CD)、电泳等技术研究了盐酸氯丙嗪(CPZ)和八肋游仆虫中心蛋白C端(apoC-EoCen)的结合以及CPZ对蛋白功能的影响。结果表明,在室温下 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes 溶液(pH=7.4)中,CPZ与apoC-EoCen以物质的量之比为1:1结合,条件结合常数约为 $10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。CPZ的结合导致蛋白质的二级结构发生改变, α 螺旋含量减小;对金属离子诱导中心蛋白的聚集产生了抑制作用, Tb^{3+} 敏化荧光强度也降低;阻碍了中心蛋白与着色性病干皮病C组蛋白(XPC)的结合;且影响了apoC-EoCen类核酸酶活性,导致蛋白对pBR322 DNA的切割能力下降;抑制了蛋白质的磷酸化。综合实验结果表明盐酸氯丙嗪是中心蛋白的生物功能阻断剂,对中心蛋白的功能具有良好的调控作用。

关键词: 八肋游仆虫; 中心蛋白; 功能; 盐酸氯丙嗪; 抑制

中图分类号: O629.73 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2021)01-0023-10

DOI: 10.11862/CJIC.2021.019

Inhibition of Functions for C-Terminal Domain of *Euplotes Octocarinatus* Centrin by Chlorpromazine Hydrochloride

DONG Qian YE Xu-Wen YANG Jing WANG Wen-Ming ZHAO Ya-Qin YANG Bin-Sheng*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education,
Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The binding of chlorpromazine (CPZ) to the C-terminal domain of *Euplotes octocarinatus* centrin (apoC-EoCen) and the effect of CPZ on the protein function were studied by fluorescence spectra, isothermal titration calorimetry (ITC), circular dichroism (CD) and electrophoresis. The results illustrated that in $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes solution (pH=7.4) at room temperature, CPZ and apoC-EoCen were combined with a molar ratio of 1:1, in addition, the conditional binding constant was about $10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. The combination of CPZ leads to changes in the secondary structure of the protein, and the content of α -helix is reduced. It inhibits the aggregation of centrin induced by metal ions and reduces the fluorescence intensity of Tb^{3+} sensitization. CPZ suppresses the binding of centrin to xeroderma pigmentosum protein (XPC). The activity of apoC-EoCen nuclease is affected, which results in the decreased capability of protein to cut pBR322 DNA. The results indicate that chlorpromazine hydrochloride is a biological function antagonist of centrin, and it has a good regulatory effect on the function of centrin.

Keywords: *Euplotes octocarinatus*; centrin; functions; chlorpromazine; inhibit

中心蛋白是首次在单细胞绿藻中发现的一种高度保守的钙离子结合蛋白,属于钙调蛋白家族^[1]。它广泛存在于真核生物中,如酵母^[2]、无脊椎动物^[3]、高等植物^[4]、哺乳动物^[5]等,是很多生物的中心体重

要组成部分,在细胞分裂过程中起着重要作用。中心蛋白含有4个EF-手结构域,每个EF-手结构域可以结合一个钙离子。当蛋白结合钙离子后,蛋白构象变得更加开放,疏水区暴露,有利于蛋白和靶肽

收稿日期:2020-08-20。收修改稿日期:2020-10-28。

国家自然科学基金(No.21571117)资助。

*通信联系人。E-mail: yangbs@sxu.edu.cn

之间的结合^[6]。Tb³⁺具有与Ca²⁺相似的配位化学性质,但是其与蛋白质结合后出现明显的荧光敏化。因此常常被用作Ca²⁺结合蛋白的离子探针^[7]。

八肋游仆虫中心蛋白由168个氨基酸残基组成,其分子量约为20 kD。本实验室使用Tb³⁺荧光探针、蛋白质片段等多种方法研究表明,生理条件下每个蛋白质分子可结合4个Ca²⁺,Tb³⁺与Ca²⁺占据相同的结合位点,Ⅲ、Ⅳ位点属于蛋白和金属离子结合的高亲和位点;蛋白与金属离子结合后使得蛋白质从封闭状态到开放状态,从而导致疏水表面暴露,蛋白质聚集;八肋游仆虫中心蛋白的N端在金属离子介导的聚集过程中扮演了重要的角色^[8],而与靶肽的结合完全发生于C端^[9];中心蛋白还可以参与核苷酸切除修复^[10]。

盐酸氯丙嗪(CPZ)是一种吩噻嗪类临床药物^[11],其分子结构如图1所示。它主要作为抗组胺药和安定剂使用,是一种具有多种作用的通用型抗精神病药。其一个重要特征是在在不损伤人的大脑意识的情况下控制过度兴奋和狂躁,改变精神病患者的异常行为。小剂量的CPZ也可以缓解呕吐,对于镇定、降温和抗休克效果明显。此外,在生物医学研究中CPZ常被用作钙调蛋白抑制剂^[12],可以与钙调蛋白结合,从而抑制钙调蛋白的功能。本实验室曾报道另一种吩噻嗪类临床药物——三氟拉嗪与八肋游仆虫中心蛋白N端半分子的结合及对蛋白质功能的影响^[13]。本文报道CPZ与八肋游仆虫中心蛋白C端半分子的结合及对蛋白质功能的影响,深入了解其在分子水平上的相互作用,有助于理解药物结合的热力学和机制,可以为医学研究做出一定的贡献。

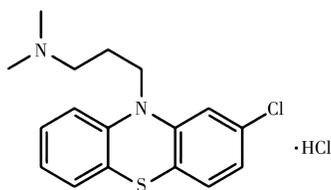


图1 盐酸氯丙嗪的结构

Fig.1 Structure of chlorpromazine

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

GST亲和层析柱材料(Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow)来自GE Healthcare,N-2-羟乙基哌嗪-N'-乙磺酸(Hepes分析纯)、CPZ均来自Sigma公司,氯化

钾(>99%)、Tris(>99.9%)、甘氨酸(>99.5%)、Acrylamide(>99.9%)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、十二烷基硫酸钠(SDS)、bis-acrylamide(纯度大于99.0%)均来自上海生工,乙二胺四乙酸钠(EDTA)来自索莱宝,过硫酸铵(分析纯)来自北京化工厂。

所用仪器有:Eppendorf移液枪、THZ-C摇床(江苏太仓实验设备厂)、KS-600超声波粉碎机(宁波仪器厂)、TGL-16台式高速冷冻离心机(湖南仪器总厂)、F-2700型荧光光谱仪(日本Hitachi公司)、F-2700型荧光分光光度计(日本Hitachi公司)、Chirascan圆二色光谱仪(Applied Photophysics有限公司)、Malvern ITC200等温滴定微量热仪、Cary Varian Eclipse紫外分光光谱仪、METTLER TOLEDO Five easy plus pH计、DYCZ-24DN型迷你双垂直电泳和DYY-10C型双稳时电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 储备液的配制

Tb³⁺储备液的配制参照文献^[14]进行。

CPZ溶液的配制:准确称取0.1777 g的CPZ加入1 mL的Hepes溶液(10 mmol·L⁻¹,pH=7.4)中,搅拌均匀至溶解,配制成0.5 mmol·L⁻¹的CPZ溶液,避光保存备用。

pBR322 DNA储备液的配制:在无菌环境下用移液枪取一定量的pBR322 DNA(浓度为0.5 μg·μL⁻¹),用无菌水稀释至所需浓度,并将其分装储置于-20℃下。

1.2.2 荧光光谱分析

CPZ和apoC-EoCen作用的荧光通过荧光光谱仪测定^[15]。隔3 min扫描1次,记录保存相关数据。同样可以测定Tb³⁺的敏化荧光光谱。

1.2.3 等温滴定量热分析

apoC-EoCen与CPZ结合的热力学常数通过等温量热分析得到,实验在30℃下进行^[16]。apoC-EoCen浓度为0.08 mmol·L⁻¹,CPZ浓度为4 mmol·L⁻¹,分别将其置于样品池及注射器中。

1.2.4 CD色谱的测定

通过Biologic Mos型CD光谱仪测定圆二色光谱(CD),扫描范围为190~260 nm,样品均溶解于Hepes缓冲溶液(10 mmol·L⁻¹,pH=7.4)中^[17]。所有实验均在室温下进行,扫描3次取平均值,扣除稀释效应。

1.2.5 共振光散射测定

共振光散射(RLS)通过扫描同步荧光光谱实现。设定激发波长为250 nm,扫描范围为250~600 nm,

电压为 400 V,激发和发射狭缝均为 10 nm。取 1 mL apoC-EoCen 和不同浓度的 CPZ 混合溶液于 1 cm 的比色皿中, apoC-EoCen 浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后加入 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tb^{3+} , 每次加 $2 \mu\text{L}$, 隔 3 min 扫描 1 次, 最终结果为 3 次扫描结果的平均值。

1.2.6 apoC-EoCen 的磷酸化修饰

将 apoC-EoCen ($0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 Mg^{2+} ($0.132 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 ATPNa_2 ($1.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均溶解于 Hepes 缓冲溶液 ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$) 中, 分别加入 0、5、10、30、50 倍的 CPZ, 置于恒温水浴 ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) 反应 10 h, 得到磷酸化蛋白 (P-apoC-EoCen)。利用 PD-10 脱盐柱将多余的金属离子和 ATP 等洗脱。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳来检测蛋白的电迁移率^[18]。

1.2.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳

将提前制备好的 apoC-EoCen 和 XPC 混合样品放置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜反应, apoC-EoCen 的电迁移率在室温下用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 电泳时间约 3 h 完成, 用考马斯亮蓝 R-250 染色, 然后用乙醇或冰乙酸脱色后在紫外可见透射反射仪中观察。

1.2.8 琼脂糖凝胶电泳分析

pBR322 DNA、apoC-EoCen 和 CPZ 按一定比例混合, 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应约 3 h, 通过琼脂糖凝胶电泳实验研究 apoC-EoCen、CPZ 和 pBR322 DNA 三者之间的相互作用。实验结果置于紫外可见透射反射仪下进行观察^[13]。

1.2.9 分子对接

apoC-HsCen 2 与 apoC-EoCen 的序列同源性高达 71.8%, 与钙调蛋白的同源性也在 50% 以上^[19]。如此高的同源性使得它们之间的生物功能基本相似, 因此我们选择 apoC-HsCen 2 (PDB: 2GGM) 的结构作为模板, 利用自动对接软件 Discovery Studio 3.0 (DS) 对小分子 CPZ 与 C 端半分子之间的结合位点和结合模式进行模拟, 找到最优结合位点, 即能量最低位点^[20]。这种研究方法的优点在于在实验基础上可以直观地看到两者之间的结合状态。

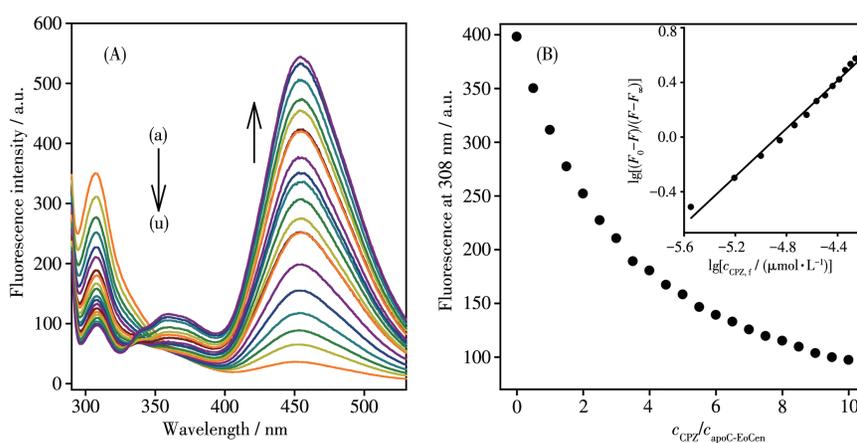
2 结果与讨论

2.1 CPZ 与 apoC-EoCen 的结合

2.1.1 荧光光谱

图 2A 是在 $\text{pH}=7.4$ 、 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hepes 缓冲条件下, 用 CPZ 滴定 apoC-EoCen 的荧光光谱。从图 2A 可以看出, 308 nm 处是 apoC-EoCen 的最大荧光发射峰。随着 CPZ 滴加到 apoC-EoCen 溶液中, 可以看到位于 308 nm 处的 C 端半分子蛋白荧光强度逐渐下降, 而在 355 和 452 nm 处出现了 CPZ 的 2 个特征荧光峰, 并在 335 nm 处出现了等荧光点。表明 CPZ 与 apoC-EoCen 结合生成了复合物。

将 apoC-EoCen 在 308 nm 处的荧光强度对 $c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 作图, 得到图 2B。从图 2B 可以看出, apoC-EoCen 在 308 nm 处的荧光强度随着 $c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 的增大而逐渐减小。利用 CPZ 与 apoC-EoCen 反应形成



Concentration of CPZ from a to u was 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; All experiments were carried out in $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hepes buffer ($\text{pH}=7.4$); Inset: plot of $\lg[(F_0 - F)/(F - F_\infty)]$ vs $\lg c_{\text{CPZ},t}$ and fitting curve

图 2 (A) CPZ ($2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的加入对 apoC-EoCen ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1 mL) 荧光光谱的影响; (B) 随 $c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 变化的荧光强度 (308 nm) 滴定曲线, 以及 CPZ 滴定 apoC-EoCen 的拟合曲线

Fig. 2 (A) Fluorescence spectra produced by addition of CPZ ($2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) to 1 mL apoC-EoCen ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (B) Titration curve of fluorescent intensity at 308 nm against concentration ratio of CPZ and apoC-EoCen

apoC-EoCen-CPZ复合物的平衡方程,可将荧光强度与反应表观结合常数、结合位点数建立式1所示方程:

$$\lg[(F_0-F)/(F-F_\infty)] = n \lg c_{\text{CPZ},i} + \lg K \quad (1)$$

其中 F_0 为 apoC-EoCen 在 308 nm 处的初始荧光强度; F 为任一滴定点的荧光强度; F_∞ 为 CPZ 与 apoC-EoCen 完全结合后 apoC-EoCen 在 308 nm 处的荧光强度; K 为 CPZ 与 apoC-EoCen 结合的条件结合常数; n 为 apoC-EoCen 的 CPZ 结合位点数; $c_{\text{CPZ},i}$ 为任一滴定点时 CPZ 的游离浓度。根据文献^[21],使用 CPZ 的总浓度代替 CPZ 的游离浓度,由式1用 $\lg[(F_0-F)/(F-F_\infty)]$ 对 $\lg c_{\text{CPZ},i}$ 作图可得近似的 K 和 n (图2B, Inset)。CPZ 与 apoC-EoCen 的结合比为 1:1, 结合常数为 $(1.91 \pm 0.04) \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Supporting information)。

2.1.2 等温滴定量热分析

为了进一步研究 CPZ 和 apoC-EoCen 之间的相互作用,我们选用等温量热滴定进行分析。图3为室温下在 HEPES 缓冲溶液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$) 中 CPZ 滴定 apoC-EoCen 的等温量热滴定曲线。通过单位点结合模型拟合,获得结合常数为 $(1.12 \pm 0.15) \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, apoC-EoCen 有 1 个 CPZ 的结合位点,与前面的荧光滴定结果一致。热力学参数列于表1,可以看出熵是正数、焓是负数、吉布斯自由能是负数,表明 CPZ 和 apoC-EoCen 反应的过程是焓熵共同驱动的自发放热反应,它们之间反应的主要作用力是静电作用^[22]。

2.1.3 CD 光谱分析

在室温、 $\text{pH}=7.4$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES 缓冲溶液下测得的 apoC-EoCen 和 apoC-EoCen-CPZ 复合物的远紫外圆二色谱如图4所示。由图4可见, apoC-EoCen 的 CD 光谱在 208 和 222 nm 附近出现了 2 个负吸收峰,这是中心蛋白由 α 螺旋结构组成的 2 个特征峰。加入 10 倍的 CPZ 并形成 apoC-EoCen-CPZ 复合物后, 2 个峰的正吸收减少, 中心蛋白的 α 螺旋含量降低了约 40%, 说明钙调蛋白抑制剂 CPZ 的结合, 对中心蛋白的二级结构产生了影响, 导致 α 螺旋部分解旋, 椭圆率降低。

表1 25 °C下通过ITC和荧光光谱测量CPZ与apoC-EoCen结合的热力学数据
Table 1 Thermodynamics data of CPZ binding with apoC-EoCen measured by ITC and fluorescence spectrometry at 25 °C

Method	$K / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	$\Delta S / (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
ITC	$(1.12 \pm 0.15) \times 10^4$	1	55.2	-6.77 ± 0.81	-23.51
Fluorescence	$(1.91 \pm 0.04) \times 10^4$	0.9			

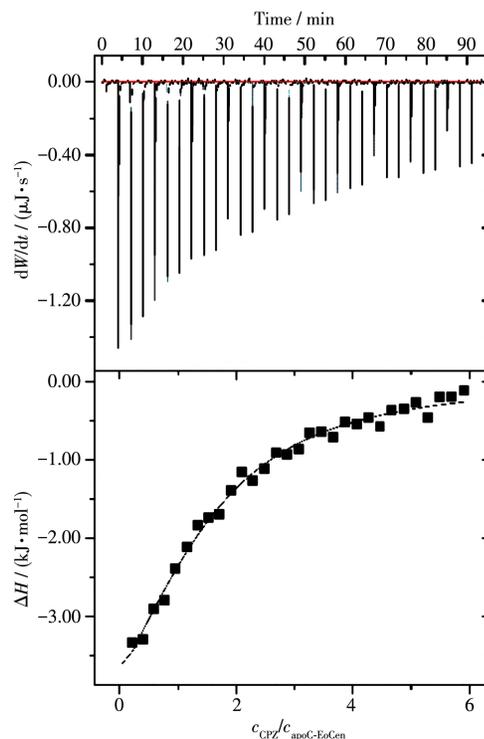
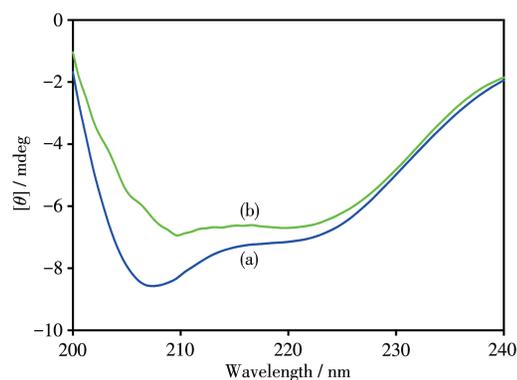


图3 25 °C下CPZ ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)对 apoC-EoCen ($0.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的等温量热滴定曲线

Fig.3 Calorimetric titration curve of CPZ ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) to apoC-EoCen ($0.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) at 25 °C



Condition: $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES buffer, $\text{pH}=7.4$, 25 °C; Ratio of CPZ added to apoC-EoCen ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 0 (a), 10 (b)

图4 apoC-EoCen和apoC-EoCen-CPZ复合物在水中的远紫外CD光谱

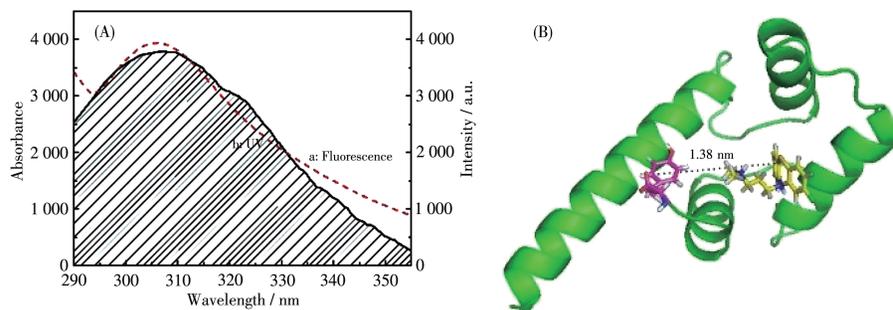
Fig.4 Far-UV CD spectra of apoC-EoCen and apoC-EoCen-CPZ complex in aqueous solution

2.1.4 CPZ与 apoC-EoCen 之间的福斯特共振能量转移及分子模拟

根据福斯特非辐射能量转移理论^[23],能量供体和受体发生能量转移的条件有2个:一是供体的荧光发射光谱和受体的紫外吸收光谱存在着一定的重叠;二是供体和受体之间的距离 $r < 7$ nm,二者不可缺一。图5A为室温下在290~355 nm范围内供体 apoC-EoCen 的荧光发射光谱和受体 CPZ 的紫外吸收光谱的重叠。由此计算得到光谱重叠积分 J 为 $2.69 \times 10^{-15} \text{ cm}^6$,已知 $K^2=2/3$, $n=1.336$, $\Phi=0.14$ ^[24],由此得到福斯特临界能量转移距离 R_0 为2 nm,能量转移效率 $E=0.91$,进一步计算得到能量供体 apoC-EoCen 的168位酪氨酸残基和受体 CPZ 之间的距离 r 为1.36 nm (Supporting information)。 $0.5R_0 < r < 1.5R_0$,证明蛋白供体和 CPZ 之间发生了无辐射能量转移。

在实验测定的基础上,通过自动对接软件 Dis-

covery Studio 3.0 可以更加直观地看到 CPZ 与 apoC-EoCen 之间的结合位点以及结合模式。图5B是最小结合能为 $-36.88 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时对应的结构。如图5B所示,CPZ 的吩噻嗪环和第4个 EF-hand 结构域的 F 螺旋上的168位酪氨酸残基芳环之间的距离是1.38 nm,与福斯特能量转移得到的结果吻合。仔细分析 CPZ 与 apoC-EoCen 之间结合的驱动力可知其分为2种:(1)静电作用,质子化的吩噻嗪与去质子化的 E144 间的作用。(2)疏水作用,CPZ 与 F109、L122、M141、I142、F145、I153、I161、T165、M162、S166 间的作用。除 F109 和 L122 分别位于第3个 EF-hand 结构域的 E 和 F α -螺旋之外,其它10个氨基酸残基均位于第4个 EF-hand 结构域,其中9个氨基酸残基分别位于第4个 EF-hand 结构域的 E 和 F α -螺旋,I153 是唯一位于 loop 区的氨基酸残基。



Cartoon ribbon model structure of apoC-EoCen; Black dotted line represents the distance between Tyr and CPZ; green: apoC-EoCen, yellow: CPZ, purple: Tyr

图5 (A) apoC-EoCen 荧光光谱 (a) 和 CPZ 吸收光谱的重叠 (b); (B) apoC-EoCen 和 CPZ 的分子对接图

Fig.5 (A) Overlap of apoC-EoCen fluorescence spectrum (a) and CPZ absorption spectrum (b); (B) Molecular docking between apoC-EoCen and CPZ

2.2 CPZ对 apoC-EoCen 功能的抑制

2.2.1 对 Tb³⁺结合的影响

八肋游仆虫中心蛋白不含色氨酸残基,含有4个酪氨酸残基 Y46、Y72、Y79 和 Y168,分别位于第 I、II 结构域和蛋白质的末端。因此,当 Tb³⁺与蛋白质结合时,占据 III 和 IV 结合位点(高亲和位点)的 Tb³⁺出现弱荧光敏化,而占据 I 和 II 结合位点(低亲和位点)的 Tb³⁺出现强荧光敏化^[25]。由此得出八肋游仆虫中心蛋白的4个金属离子结合部位是不等价的,结合顺序为 IV \approx III > I、II^[26]。C 端半分子的酪氨酸残基只有1个,当用 Tb³⁺滴定时仍可观测到在 490、545、590 和 620 nm 附近出现的 Tb³⁺特征峰(图6A)。可见,随着 Tb³⁺的不断加入,其在 490、545、590 和 620 nm 处的特征峰荧光强度逐渐增大,直至不变。

这表明 Tb³⁺与 apoC-EoCen 结合后发生了 Y168 残基与结合 Tb³⁺间的非辐射能量转移。将 545 nm 处的荧光强度对 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 作图(图6C 曲线 a),可以看出, $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}} < 1.0$ 时,Tb³⁺在 545 nm 处荧光强度随着 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 的增加而线性地增加;在 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 为 1.0~2.0 范围内,尽管 Tb³⁺在 545 nm 处荧光强度仍随着 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 的增加而线性地增加,但增加幅度明显减少;当 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}} > 2.0$ 时,Tb³⁺在 545 nm 处荧光强度不再随着 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 的增加而增加。表明 Tb³⁺和 apoC-EoCen 以 2:1 的结合比结合。在 III 和 IV 结构域分别引入色氨酸残基的研究表明,Tb³⁺优先占据蛋白质的第 IV 结合位点^[27],即结合于第 IV 结合位点的 Tb³⁺出现强荧光敏化,而结合于第 III 结合位

点的 Tb^{3+} 出现弱荧光敏化。图 6B 是在 10 倍 CPZ 存在的条件下, 用 Tb^{3+} 滴定 apoC-EoCen 的荧光光谱。同样将 545 nm 处的荧光强度对 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 作图(图 6C 曲线 b)。由该曲线可得, 当 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}} < 1.0$ 时, Tb^{3+} 在 545 nm 处荧光强度随着 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 的增加而线性地增加; 当 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}} > 1.0$ 时, Tb^{3+} 在 545 nm 处荧光强度不再随着 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 的增加而增加。表明 Tb^{3+} 和 apoC-EoCen-CPZ 以 1:1 的结合比结合, 即 CPZ 与 apoC-EoCen 的结合导致 Tb^{3+} 的 1 个结合部位被破坏。由图 6C 曲线 b 的斜率及图 5B 分子对接的 CPZ 作用部位可推断, CPZ 与 apoC-EoCen 的结合导致其第 IV 结合部位丧失 Tb^{3+} 结合能力。

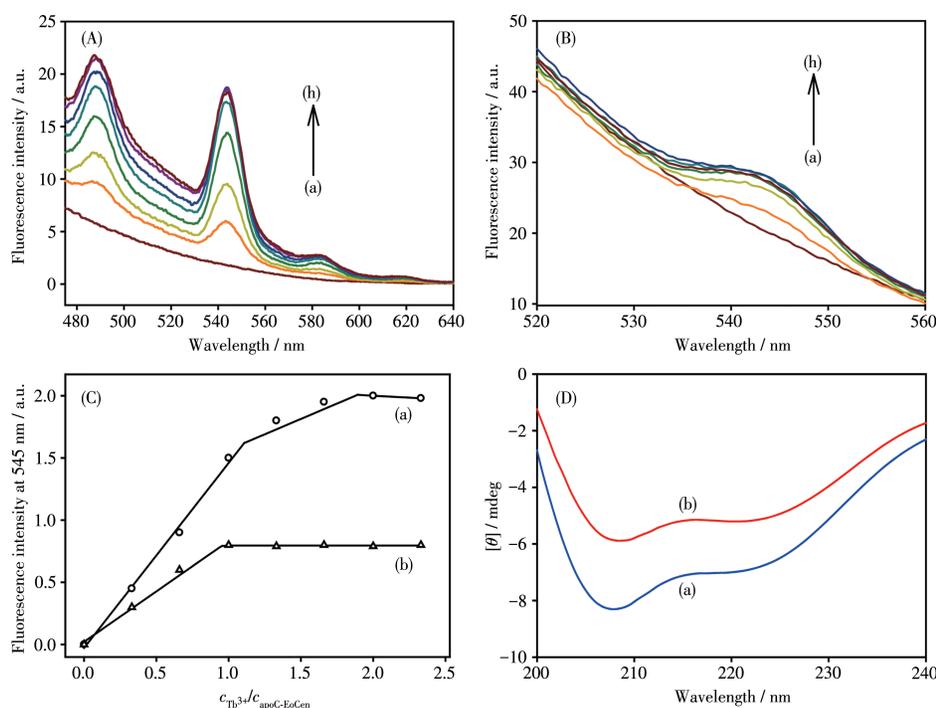
根据式 1 拟合图 6C 的 Tb^{3+} 荧光敏化数据可得, 在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes、 $\text{pH}=7.4$ 的条件下, Tb^{3+} 与 apoC-EoCen 的结合位点数 n 为 2.04 ± 0.25 , 条件结合常数

K 为 $1.70 \times 10^{16} \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$; 而 Tb^{3+} 与 apoC-EoCen-CPZ 的结合位点数 n 为 1.09 ± 0.06 , 条件结合常数 K 为 $2.00 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Supporting information), 与 III 和 IV 结构域分别引入色氨酸残基后所测得的结合常数吻合^[28]。

图 6D 是 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes、 $\text{pH}=7.4$ 条件下 Tb_2 -apoC-EoCen 和 Tb -apoC-EoCen-CPZ 的 CD 光谱。可以看出, 在 10 倍 CPZ 的存在下, 位于 208 和 220 nm 处蛋白质的 2 个负吸收峰减少近 40%, 即 CPZ 的结合使蛋白质的分子结构发生改变, α 螺旋含量降低。

2.2.2 CPZ 对 apoC-EoCen 聚集的影响

中心蛋白的生物功能之一是金属离子结合诱导的蛋白质聚集^[29]。尽管其聚集驱动力主要集中在 N 端, 但是 C 端也有一定的聚集能力^[30]。图 7A 是在室温、 $\text{pH}=7.4$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes 缓冲溶液时, 用 Tb^{3+} 滴定 apoC-EoCen 的 RLS 光谱。可见, 随着 Tb^{3+} 的不断加入, 280 nm 处的 RLS 强度逐渐增强。增大



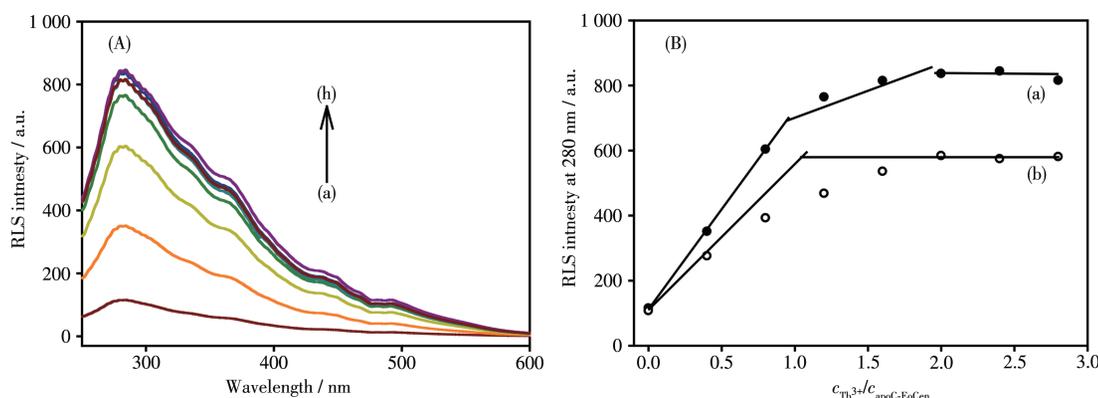
Condition: (A) Titrating apoC-EoCen with $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tb}^{3+}$, the protein concentration was $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, from a to h, the ratios of Tb^{3+} added to apoC-EoCen were 0, 0.33, 0.66, 1, 1.33, 1.66, 2, 2.33, respectively; (B) $c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}=10$, the experiment condition was the same as A; (C) Fluorescence intensity selected at 545 nm in Fig.A as curve a, and fluorescence intensity at 545 nm in Fig.B as curve b; (D) Ratios of CPZ added to Tb_2 -apoC-EoCen were 0 (a), 10 (b), respectively, $c_{\text{apoC-EoCen}}=25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 6 在 CPZ 不存在 (A) 和存在 (B) 的情况下 Tb^{3+} 敏化的荧光光谱; (C) 在 CPZ 不存在 (a) 和存在 (b) 的情况下, Tb^{3+} 在 545 nm 处的荧光强度与 $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 的关系; (D) Tb_2 -apoC-EoCen 和 Tb -apoC-EoCen-CPZ 的远紫外 CD 光谱

Fig.6 Tb^{3+} sensitized fluorescence spectra in the absence (A) and presence (B) of CPZ; (C) Fluorescence intensity of Tb^{3+} at 545 nm as a function of $c_{\text{Tb}^{3+}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ in the absence (a) and presence (b) of CPZ; (D) Far-UV CD spectra of Tb_2 -apoC-EoCen and Tb -apoC-EoCen-CPZ

到某一点时,基本保持稳定。将280 nm处的RLS强度对 $c_{Tb^{3+}}/c_{apoC-EoCen}$ 作图(图7B曲线a),可以发现类似于图6的 Tb^{3+} 敏化荧光滴定, Tb^{3+} 和apoC-EoCen以2:1的结合比结合。由 Tb^{3+} 滴定apoC-EoCen-CPZ的RLS光谱可得其滴定曲线如图7B曲线b所示,即 Tb^{3+} 与apoC-EoCen-CPZ的结合比为1:1。根据式1拟合图7B的 Tb^{3+} 诱导RLS数据可得,在 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Hepes, pH=7.4的条件下, Tb^{3+} 与apoC-EoCen的结合位点数 n 为 1.95 ± 0.10 ,条件结合常数 K 为 $1.15\times 10^{16}\text{ L}^2\cdot\text{mol}^{-2}$;而 Tb^{3+} 与apoC-EoCen-CPZ的结合位点数 n 为 1.00 ± 0.06 ,条件结合常数 K 为 $2.14\times 10^8\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Supporting information),与 Tb^{3+} 敏化荧光所得结果一致。



apoC-EoCen concentration was $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; apoC-EoCen was titrated with $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tb}^{3+}$, and the experiments were performed in Hepes ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=7.4); from a to h, the ratios of Tb^{3+} added to apoC-EoCen were 0, 0.33, 0.66, 1, 1.33, 1.66, 2, 2.33, respectively

图7 (A) Tb^{3+} 滴定apoC-EoCen的RLS光谱;(B)在CPZ比例不同($c_{CPZ}/c_{apoC-EoCen}=0$ (a), 10 (b))的情况下, RLS光谱在280 nm处的强度与 $c_{Tb^{3+}}/c_{apoC-EoCen}$ 的关系

Fig.7 (A) RLS spectra of apoC-EoCen titrated with Tb^{3+} ; (B) RLS intensity at 280 nm as a function of $c_{Tb^{3+}}/c_{apoC-EoCen}$ in the presence of different proportions of CPZ: $c_{CPZ}/c_{apoC-EoCen}=0$ (a), 10 (b)

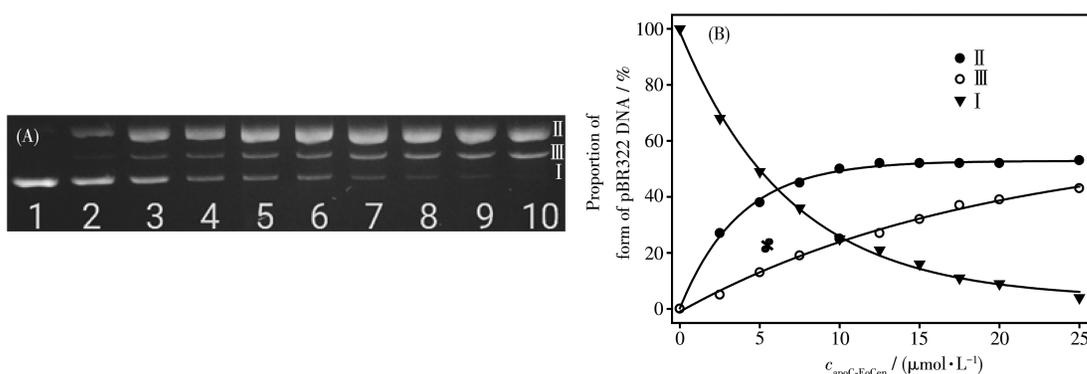
2.2.3 CPZ对apoC-EoCen类核酸酶活性的抑制

2.2.3.1 apoC-EoCen的类核酸酶活性

pBR322 DNA质粒是一种超螺旋型(I)核酸大分子,能够被一些具有切割活性的小分子、蛋白等切割成切口型(II)以及线型(III)。它们具有不同的迁移速率,其大小顺序一般为超螺旋型>线型>缺刻型。图8A为不同浓度的apoC-EoCen对pBR322 DNA切割的凝胶电泳图。1~10号泳道为pBR322 DNA, 2~10号泳道为分别加入2.5、5、7.5、10、12.5、15、17.5、20、25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ apoC-EoCen后的pBR322 DNA。从图8A中可以看出,最初DNA只有超螺旋一种形式,随着apoC-EoCen浓度的增大,线型和缺刻型条带逐渐变亮,而超螺旋DNA条带慢慢变暗,即DNA逐渐由超螺旋状态变为线型和缺刻型,直到超螺旋型完全消失。将图8A中3种不同形式的DNA进行黑度扫描并对apoC-EoCen浓度作图得到图8B。从图8B可以看出,当apoC-EoCen终浓度为 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, pBR322 DNA完全由I型转变为II和III型。即apoC-EoCen像apoN-EoCen^[31]一样有类核酸酶活性。

2.2.3.2 不同浓度CPZ对apoC-EoCen类核酸酶活性的影响

图9A是不同浓度CPZ对apoC-EoCen类核酸酶活性的影响。其中1~10号泳道为相同浓度的pBR322 DNA, 2~10号泳道为加入终浓度为 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的apoC-EoCen, 3~10号泳道为含有不同浓度CPZ的apoC-EoCen类核酸酶活性, $c_{CPZ}/c_{apoC-EoCen}$ 分别为5、10、15、20、25、30、40、50。由图中可见,随着CPZ浓度的增大,线型和切口型pBR322 DNA条带逐渐由亮变暗,直到消失;而超螺旋型pBR322 DNA逐渐出现,其条带逐渐变亮。说明CPZ和apoC-EoCen的结合抑制了apoC-EoCen的类核酸酶活性,阻碍了其对pBR322 DNA的切割,使得pBR322 DNA保存为最初的超螺旋形式。将图9A中3种不同形式的pBR322 DNA进行黑度扫描并对 $c_{CPZ}/c_{apoC-EoCen}$ 作图得到图9B。从图9B可以看出,开始蛋白将DNA切割成II和III型DNA,随着CPZ浓度的增大,II和III型DNA均逐渐减少, I型DNA逐渐增加;当加入20倍的CPZ时, III型DNA基本消失;当加入50倍

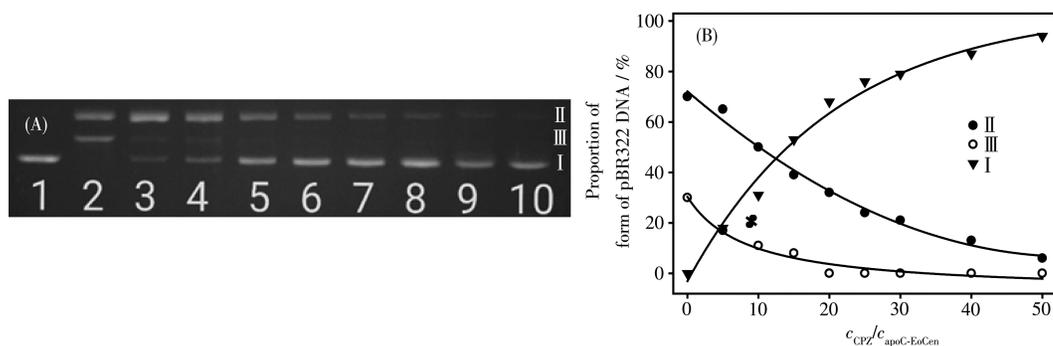


10 mmol·L⁻¹ Hepes, pH=7.4, 4 °C reaction for 3 h; lane 1: pBR322 DNA, lanes 2~10: 0.003 5 g·L⁻¹ pBR322 DNA added with 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 and 25 μmol·L⁻¹ apoC-EoCen, respectively, $V_{\text{total}}=10 \mu\text{L}$

图8 (A) apoC-EoCen切割pBR322 DNA的琼脂糖凝胶电泳图; (B) 不同构型DNA的比例与apoC-EoCen浓度的关系

Fig.8 (A) Agarose gel electrophoresis for pBR322 DNA cutting with different concentrations of apoC-EoCen;

(B) Relationship between proportion of different configurations pBR322 DNA and apoC-EoCen concentration



10 mmol·L⁻¹ Hepes, pH=7.4, at 4 °C for 3 h, total volume: 10 μL; Lane 1: pBR322 DNA, lanes 2~10: pBR322 DNA+apoC-EoCen, lanes 3~10: pBR322 DNA+apoC-EoCen+CPZ ($c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$)=5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, respectively; final pBR322 DNA concentration: 0.003 5 g·L⁻¹

图9 (A) CPZ对apoC-EoCen裂解DNA影响的琼脂糖凝胶电泳图; (B) 不同构型DNA的比例随 $c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 变化的曲线

Fig.9 (A) Agarose gel electrophoresis for effect with different proportions of CPZ on apoC-EoCen cleaving DNA;

(B) Relationship between proportion of different configurations pBR322 DNA and $c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$

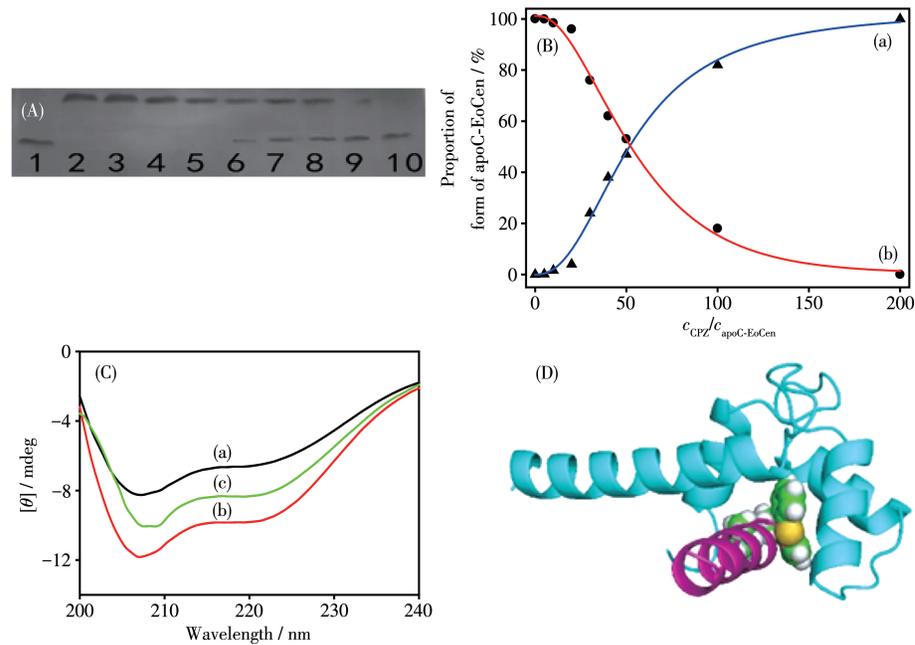
CPZ时,只剩下I型DNA。

2.2.4 CPZ对apoC-EoCen与靶肽结合的抑制

XPC是以人着色性干皮病C组蛋白中覆盖中心蛋白结合序列的多肽,它参与许多细胞内生物分子反应。在pH=7.4、10 mmol·L⁻¹ Hepes缓冲条件下, XPC和apoC-EoCen可形成1:1的复合物。图10A是CPZ对apoC-EoCen-XPC复合物影响的天然凝胶电泳图。其中1号泳道为apoC-EoCen, 2号泳道为apoC-EoCen-XPC, 3~10号泳道是 $c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 分别为5、10、20、30、40、50、100、200时的apoC-EoCen-XPC。由图10A可见,随着CPZ浓度的增加,apoC-EoCen-XPC复合物逐渐减少,直到复合物全部消失,而apoC-EoCen条带逐渐从无到有。这表明CPZ的结合抑制了apoC-EoCen-XPC复合物的形成。将

图10A中蛋白及其复合物进行黑度扫描并对 $c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 作图(图10B),其中曲线a为apoC-EoCen随CPZ浓度的变化,曲线b为apoC-EoCen-XPC随CPZ浓度的变化。从图10B可以看出,随着CPZ浓度的增大,曲线a呈上升趋势,曲线b呈下降趋势,CPZ抑制了蛋白和XPC的结合,使得复合物含量逐渐下降。当加入50倍的CPZ时,apoC-EoCen和apoC-EoCen-XPC复合物含量基本各占一半。

中心蛋白C端结构域是其靶蛋白结合功能区,许多靶肽如蜂毒素^[32]、XPC^[33]在溶液中处于随机卷曲态,当与中心蛋白结合后便形成 α -螺旋结构。图10C谱线a是apoC-EoCen的远紫外CD光谱,可见在208和220 nm处出现蛋白质 α -螺旋结构的特征峰;当apoC-EoCen与XPC结合形成apoC-EoCen-XPC复



Condition: (A) $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, pH=7.4, at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for 6 h, total volume= $10 \text{ } \mu\text{L}$, protein concentration= $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (C) protein concentration= $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, target peptide ratio=1:1, CPZ concentration= $250, 750 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, total volume= $300 \text{ } \mu\text{L}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$; (D) apoC-EoCen (blue), XPC (purple), CPZ (green)

图 10 (A) 不同比例的 CPZ 加入 apoC-EoCen 和 XPC 中的天然凝胶电泳图; (B) apoC-EoCen (a) 和 apoC-EoCen-XPC (b) 随 $c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$ 的变化; (C) 远紫外 CD 光谱中 CPZ 对 apoC-EoCen 与 XPC 复合物的影响(a: apoC-EoCen; b: apoC-EoCen-XPC 复合物; c: apoC-EoCen-XPC 与 CPZ 共存); (D) apoC-EoCen 与 XPC 或 CPZ 结合的缎带模型

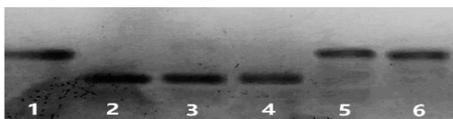
Fig.10 (A) Non-denaturing gel electrophoresis diagram for effect of adding CPZ with different proportions to apoC-EoCen combined with XPC; (B) apoC-EoCen (a) and apoC-EoCen-XPC (b) changes with $c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}$; (C) Far-UV CD spectra for effect of CPZ on apoC-EoCen binding to XPC (a: apoC-EoCen; b: apoC-EoCen-XPC complex; c: apoC-EoCen-XPC combined with CPZ); (D) Cartoon ribbon model structure of apoC-EoCen combined with XPC and CPZ

合物后,位于 208 和 220nm 处的 2 个特征负峰明显增大(谱线 b), α -螺旋结构含量增加;CPZ 与 apoC-EoCen 结合导致蛋白质 α -螺旋结构含量减少;图 10C 谱线 c 是 apoC-EoCen-XPC 中加入 10 倍 CPZ 后的远紫外 CD 光谱,可知 apoC-EoCen 的 α 螺旋含量减少约 25%。这些结果表明 CPZ 的结合抑制了 apoC-EoCen 和 XPC 形成复合物。

图 10D 是 apoC-EoCen 和 CPZ 结合能量最低结构与 apoC-EoCen-XPC 晶体结构(PDB:2GGM)的叠加图。由图 10D 可见,CPZ 与 XPC 的 N 端占据 apoC-EoCen 的同一结合部位,尤其是存在 XPC 的色氨酸残基与 apoC-EoCen 间的疏水作用。因此,CPZ 与 apoC-EoCen-XPC 的结合可看作配体的置换反应,CPZ 将蛋白质结合的 XPC 置换。由此,可根据 apoC-EoCen-XPC 的结合常数计算得到 CPZ 与 apoC-EoCen 间的结合常数为 $5.52 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Supporting information),与其它方法所得数据吻合。

2.2.5 CPZ 对 apoC-EoCen 磷酸化的抑制

蛋白质磷酸化是重要的生物化学反应过程,通过蛋白激酶的催化将 ATP 上的 γ -磷酸基转移到蛋白质底物的丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)或酪氨酸(Tyr)残基上来实现中心蛋白的磷酸化^[34]。根据我们实验室之前的研究,蛋白激酶 A(PKA)在 apoC-EoCen 上的磷酸化位点是 Ser-166(KQTS)^[35]。CPZ 作为钙调蛋白抑制剂,通过聚丙烯凝胶电泳实验可以研究其是否对磷酸化蛋白质有影响。如图 11 所示,apoC-EoCen 终浓度为 $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,1~6 号泳道加 apoC-EoCen,2~6 号泳道加磷酸化溶液混合物(Mg^{2+} 与 ATP 及 PKA),3~6 号泳道加不同浓度的 CPZ, $c_{\text{CPZ}}/c_{\text{apoC-EoCen}}=5、10、30、50$ 。蛋白质经过磷酸化后条带下移,当加入 5 倍和 10 倍的 CPZ 时,P-apoC-EoCen 条带没有发生明显变化,当加入 30 倍 CPZ 时,P-apoC-EoCen 完全转化为 apoC-EoCen。说明 CPZ 的结合抑制了磷酸化蛋白质的形成,阻碍了蛋白质的磷酸化。



10 mmol·L⁻¹ Hepes, pH=7.4, 30 °C reaction in a water bath for 10 h, total volume=10 μL, protein concentration=100 μmol·L⁻¹

图 11 CPZ 对 apoC-EoCen 磷酸化影响的聚丙烯凝胶电泳图

Fig.11 Polypropylene gel electrophoresis diagram for effect of CPZ on apoC-EoCen phosphorylation

3 结论

通过光谱分析、电泳、等温量热滴定、Tb³⁺荧光探针和分子对接等方法,在 pH=7.4、10 mmol·L⁻¹ Hepes 条件下,研究了钙调蛋白抑制剂 CPZ 与 apoC-EoCen 的相互作用。结果表明,CPZ 与 apoC-EoCen 以 1:1 结合比与 apoC-EoCen 的 4 个 α-螺旋间的疏水区结合而形成复合物,条件结合常数约为 10⁴ L·mol⁻¹; apoC-EoCen 具有类核酸酶活性,可将 pBR322 DNA 切割为切口型(II)、线型(III)DNA,而 CPZ 抑制了 apoC-EoCen 的类核酸酶活性;CPZ 与 apoC-EoCen 的结合导致蛋白质第 IV 结构域的金属离子结合能力丧失,进而抑制金属离子结合诱导的聚集;CPZ 通过疏水作用占据 apoC-EoCen 的靶肽结合部位而抑制其与 XPC 的结合;CPZ 还抑制 PKA 对 apoC-EoCen 的磷酸化。多种实验手段证明,CPZ 是一种良好的中心蛋白生物功能阻断剂,在以后的医学研究中有着良好的应用前景。

Supporting information is available at <http://www.wjhxsb.cn>

参考文献:

[1] Salisbury J L, Baron A, Surek B, Melkonian M. *J. Cell Biol.*, **1984**,**99**(3):962-970
 [2] Baum P, Furlong C, Byers B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1986**,**83**(15):5512-5516
 [3] Wolfrum U. *Biol. Cell*, **1992**,**76**(3):373-381
 [4] Zhu J K, Bressan R A, Hasegawa P M. *Plant Physiol.*, **1992**,**99**(4):1734-1735
 [5] Salisbury J L. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1995**,**7**(1):39-45
 [6] Radu L, Durussel I, Assairi L, Blouquit Y, Miron S, Cox J A, Craescu C T. *Biochemistry*, **2010**,**49**(20):4383-4394
 [7] Duan L, Zhao Y Q, Wang Z J, Li G T, Liang A H, Yang B S. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**,**102**(2):268-277
 [8] Zhao Y Q, Song L, Liang A H, Yang B S. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2009**,**95**(1):26-32

[9] Zhao Y Q, Feng J Y, Wang Z J, Liang A H, Yang B S. *Spectrochim. Acta A*, **2008**,**70**(4):884-887
 [10] Zhang W L, Shi E X, Zhao Y Q, Yang B S. *J. Inorg. Biochem.*, **2018**,**180**:15-25
 [11] Bhattacharyya M, Chaudhuri U, Poddar R K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1990**,**167**(3):1146-1153
 [12] Lee I S, Park T J, Sun B C, Kim Y S, Rhee I J, Kim K T. *Biochem. Pharm.*, **1999**,**6**(58):1017-1024
 [13] 叶旭文, 张文龙, 王志军, 赵亚琴, 杨斌盛. 高等学校化学学报, **2019**,**40**(11):2257-2264
 YE X W, ZHANG W L, WANG Z J, ZHAO Y Q, YANG B S. *Chem. J. Chinese Universities*, **2019**,**40**(11):2257-2264
 [14] 张文龙, 许彩虹, 杨斌盛. 无机化学学报, **2014**,**30**(1):106-112
 ZHANG W L, XU C H, YANG B S. *Chinese J. Inorg. Chem.*, **2014**,**30**(1):106-112
 [15] Song Y X, Song Z, Yang B S. *Chem. Res. Chin. Univ.*, **2019**,**35**(1):53-59
 [16] Shi E X, Zhang W L, Zhao Y Q, Yang B S. *Metallomics*, **2017**,**9**:1796-1808
 [17] Zhao Y Q, Yan J, Song L, Feng Y N, Liang A H, Yang B S. *Spectrochim. Acta Part A*, **2012**,**87**:163-170
 [18] Zhao Y Q, Guo X J, Yang B S. *RSC Adv.*, **2017**,**7**(17):10206-10214
 [19] Zhao Y Q, Yang J, Chao J B, Yang B S. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2019**,**136**:503-511
 [20] Duan L, Liu W, Wang Z J, Liang A H, Yang B S. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2010**,**15**(7):995-1007
 [21] Song Z, Wang J L, Yang B S. *Spectrochim. Acta Part A*, **2014**,**118**(2):454-460
 [22] Ross P D, Subramanian S. *Biochemistry*, **1981**,**20**(11):3096-3102
 [23] Ishtikhari M, Khan S, Badr G, Mohamed A O, Khan R H. *Mol. Biosystems*, **2014**,**10**(11):2954-2964
 [24] Li M, Zhang W L, Yang B S. *J. Inorg. Biochem.*, **2019**,**193**:15-24
 [25] Wang Z J, Zhao Y Q, Ren L X, Li G T, Liang A H, Yang B S. *J. Photochem. Photobiol. A*, **2007**,**186**(2/3):178-186
 [26] 刘文, 段炼, 赵亚琴, 梁爱华, 杨斌盛. 科学通报, **2010**,**55**(27):3118-3122
 LIU W, DUAN L, ZHAO Y Q, LIANG A H, YANG B S. *Chin. Sci. Bull.*, **2010**,**55**(27):3118-3122
 [27] Rong Z J, Zhao Y Q, Shi E X, Zhang W L, Yang B S. *Electroanalysis*, **2017**,**29**(5):1232-1242
 [28] Zhao Y Q, Feng J Y, Liang A H, Yang B S. *Spectrochim. Acta Part A*, **2009**,**71**(5):1756-1761
 [29] Rong Z J, Tian Y N, Yang B S. *RSC Adv.*, **2014**,**4**(81):43262-43269
 [30] Zhao Y Q, Yan J, Song L, Feng Y N, Liang A H, Yang B S. *J. Fluoresc.*, **2012**,**22**(1):485-494
 [31] Zhang W L, Shi E X, Feng Y N, Zhao Y Q, Yang B S. *RSC Adv.*, **2017**,**7**(82):51773-51788
 [32] Zhao Y Q, Diao X L, Yan J, Feng Y N, Wang Z J, Liang A H, Yang B S. *J. Lumin.*, **2012**,**132**(4):924-930
 [33] Shi E X, Zhang W L, Zhao Y Q, Yang B S. *RSC Adv.*, **2017**,**7**(44):27139-27149
 [34] Krupa A, Preethi G, Srinivasan N. *J. Mol. Biol.*, **2004**,**339**:1025-1039
 [35] Zhao Y Q, Yan J, Chao J B, Liang A H, Yang B S. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2013**,**18**(1):123-136