

# 合浦珠母贝基质蛋白 KRMP-3 对二价金属离子选择性的研究

吴 晨, 苏境坦, 梁 健, 梁 晓, 谢莉萍, 张荣庆

(清华大学 生命科学学院, 北京 100084)

**摘要:** 用大肠杆菌表达含有 GST 标签的基质蛋白 KRMP-3。利用圆二色谱(Circular Dichroism, CD) 研究不同浓度钙离子和镁离子对基质蛋白 KRMP-3 二级结构的影响。结果表明, 钙离子对其二级结构的变化远大于镁离子; 同时, 采用荧光淬灭法研究 KRMP-3 对钙, 镁, 镉, 钡等二价金属离子的选择性, 结果表明, KRMP-3 对钙离子有特异性选择性, 钙离子与 KRMP-3 的结合常数  $K$  约为  $10^3$  L/mol, 结合位点数  $n$  近似为 1, 表明 KRMP-3 与钙离子的结合能力适中, 推测基质蛋白 KRMP-3 对合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 棱柱层形成起到促进作用。

**关键词:** 生物矿化; 基质蛋白 KRMP-3; 圆二色谱 CD; 荧光淬灭法; 离子选择性

中图分类号: Q518 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)04-0026-06

合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 的贝壳分为角质层、棱柱层和珍珠层<sup>[1]</sup>, 是典型的生物矿化产物。虽然棱柱层和珍珠层的组成成分都以碳酸钙为主(大于 95%), 不同的是, 棱柱层中的碳酸钙晶体为方解石, 而珍珠层中则主要是文石。这种构成上的差异主要是由于贝壳中不同矿化蛋白所致。虽然基质蛋白只占钙化层总重量的 5%, 但其对生物矿化却起到非常重要的作用。

基质蛋白按其去矿化溶液中的溶解性来分, 可分为可溶性基质蛋白(soluble matrix protein)和不可溶性基质蛋白(insoluble matrix protein), 按其等电点来分又可分为极酸性基质蛋白(等电点小于 4.5), 中度酸性基质蛋白(等电点为 4.5 ~ 7)和碱性基质蛋白(等电点大于 7)<sup>[2]</sup>。已知的合浦珠母贝基质蛋白多为酸性的(Nacrein, Prismaticin-14, MSI7 等), 碱性基质蛋白知之甚少。

KRMP-3 基因是从合浦珠母贝外套膜组织中克隆得到的<sup>[3]</sup>, 免疫荧光实验表明, KRMP-3 蛋白分布于棱柱层中。体外碳酸钙结晶实验结果表明, 其能使文石体系结晶出的碳酸钙晶貌发生改变, 同时出现了少量的方解石小颗粒, 故推测其很可能诱导棱柱层中方解石的形成<sup>[6]</sup>。

本实验拟在此研究基础上, 探究 KRMP-3 基质蛋白诱导方解石形成的机制, 利用圆二色谱和荧光光谱的方法, 探究 KRMP-3 基质蛋白对不同二价离子的选择性, 从而初步解释其能够参与生物矿化的

原因。圆二色谱是研究蛋白二级结构的常用手段<sup>[4]</sup>。荧光淬灭法也是研究生物大分子与外界离子相互作用的常用方法之一<sup>[5]</sup>, 通过荧光淬灭法计算出离子与蛋白的结合常数  $K$  以及结合位点数  $n$ , 据此分析蛋白与离子结合能力的强弱, 从而探究基质蛋白在矿化过程中可能起到的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 基质蛋白 KRMP-3 的表达与纯化

利用大肠杆菌 BL21 表达含有 GST 标签的 KRMP-3 蛋白<sup>[6]</sup>。其中 KRMP-3 基因是张岑于 2006 年从合浦珠母贝外套膜组织中克隆得到的, 表达载体为 pGEX-4T-1(Novagen), 培养基采用含有氨苄(100 mg/L)的 LB 培养基, IPTG 浓度为 1mmol/L, 诱导温度为 16°C, 诱导时间为 30 h。重组蛋白的纯化按 GST Gene Fusion System Handbook(Amersham Bioscience)中的方法进行, 采用 GSTrap<sup>TM</sup> FF (GE Healthcare)柱进行分离纯化, 其中上样 buffer 为 50 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, pH 8.0, 洗脱 buffer 为 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 并在其中加入 10 mmol/L 还原性谷胱甘肽(GSH), 脱盐 buffer 为

收稿日期: 2012-04-20; 修回日期: 2012-07-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(U0831001)

作者简介: 吴晨(1986-), 男, 北京人, 硕士研究生, 主要从事合浦珠母贝基质蛋白方面研究, 电话: 13401069783, E-mail: deshechin@sina.com; 谢莉萍, 通信作者, E-mail: lpxie@mail.tsinghua.edu.cn

10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 蛋白的分离纯化均用 AKATA 完成。最后利用试剂盒 BCA Protein Assay Kit (Pierce) 测量蛋白浓度。

## 1.2 圆二色谱实验方法

利用 Jasco J-715 型圆二色谱仪<sup>[7]</sup>研究钙、镁离子对基质蛋白 KRMP-3 二级结构的影响。将 200  $\mu$ L 含 GST 标签的 KRMP 蛋白加入到 1 mmol/L 比色皿中, 通过圆二色谱仪测其 Cd 值。之后, 分别加入 1 mol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液 0.2  $\mu$ L (钙离子终浓度为 1 mmol/L), 1 mol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液 2.0  $\mu$ L (钙离子终浓度为 10 mmol/L), 1 mol/L 的  $\text{MgCl}_2$  溶液 0.2  $\mu$ L (镁离子终浓度为 1 mmol/L), 1 mol/L 的  $\text{MgCl}_2$  溶液 2.0  $\mu$ L (镁离子终浓度为 10 mmol/L), 通过圆二色谱仪分别得到其圆二色谱, 通过比较来分析其二级结构的变化。其中 J-715 型圆二色谱工作参数为: 波长范围 190~250 nm (有效波长 200~250 nm), 25 $^{\circ}$ C, 比色皿光径 1 mm, 分辨率 0.2 nm, 扫描速率 100 nm/min, 扫描 3 次取平均值。

## 1.3 荧光淬灭法

用 F-4500 FL Spectrophotometer 研究不同浓度、不同二价金属离子对 KRMP-3 的影响, 根据其荧光淬灭程度分析 KRMP-3 的离子选择性。将 200  $\mu$ L 含 GST 标签的 KRMP 蛋白加入到荧光杯中, 测其荧光强度, 之后在蛋白中加入 1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液, 每次加 0.2  $\mu$ L, 共加 6 次, 并逐一测其荧光强度, 即可分别得到含不同浓度钙离子 (1~6 mmol/L) 的 KRMP-3 的荧光光谱。同样方法, 将氯化钙溶液换成氯化镁, 氯化镧, 氯化钡, 即可得到含不同浓度镁, 镧, 钡的 KRMP-3 的荧光光谱。其中 F-4500 FL Spectrophotometer 的工作参数为: 波长扫描荧光发射谱, 激发波长为 280 nm, 扫描范围 300~400 nm, 扫描速率 1 200 nm/min, 激发狭缝和发射狭缝宽度为 10 nm, 电压 400 V, 反应时间 2.0 s。

## 2 结果与分析

### 2.1 基质蛋白 KRMP-3 的表达结果

用表达纯化获得的重组蛋白进行 SDS 电泳, 在 36 kD 处可以看到一条清晰的电泳条带 (图 1)。由于 KRMP-3 的预测分子质量为 9.8 kD, GST 标签约为 26 kD, 故目标蛋白带 GST 标签的 KRMP-3 分子质量约为 36 kD, 即图中箭头所指位置。应用 BCA 法测得蛋白浓度约为 0.47 g/L。

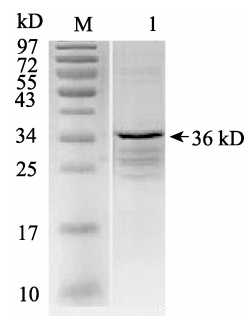


图 1 用大肠杆菌表达含 GST 标签的 KRMP-3 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE of KRMP-3 protein with GST expressed by *E. coli* M.marke

1. 表达纯化得到的 KRMP-3 蛋白, 分子质量约为 36kD

M. marker; 1. KRMP-3 protein, the molecular weight is about 36kD

### 2.2 钙、镁离子对基质蛋白 KRMP-3 二级结构的影响

已有实验结果显示<sup>[6]</sup>, 在文石结晶体系 (含钙、镁离子) 中加入高浓度 KRMP-3 蛋白时, 会产生少量的方解石。为了确认哪种离子起到主要作用, 本实验利用圆二色谱来研究其与 KRMP-3 相互作用的情况, 并采用 GST 蛋白 (0.34 g/L) 作为空白对照。图 2 中显示的是在 KRMP-3 蛋白及 GST 蛋白溶液中分别加入 1 mmol/L 钙离子和 10 mmol/L 钙离子时的圆二色谱图。由图中可以看到, 当加入钙离子之后, 蛋白质的 CD 值发生了明显的变化, 尤其当加入高浓度钙离子时, 蛋白质的 CD 值变化也极为明显。圆二色谱图可以反映蛋白的二级结构, CD 值变化大说明其二级结构改变较大。从 KRMP-3 的圆二色谱图的变化可以看到, 钙离子的加入明显影响了 KRMP-3 的二级结构, 表明钙离子与 KRMP-3 蛋白很可能发生相互作用。相反, 镁离子对 KRMP-3 蛋白的圆二色谱图却没有影响 (图 3)。从对照组可以看到, 无论加入钙离子还是镁离子, 其对 GST 蛋白的圆二色谱图都基本没有改变。由此可以说明, 钙离子可能同 KRMP-3 蛋白发生相互作用, 从而改变其二级结构。

### 2.3 荧光淬灭法研究 KRMP-3 蛋白的离子选择性

圆二色谱实验显示了 KRMP-3 蛋白对钙离子具有结合能力, 为了进一步确认其对钙离子是不是具有选择性, 本文另外选取了与钙同族的镁, 镧, 钡等

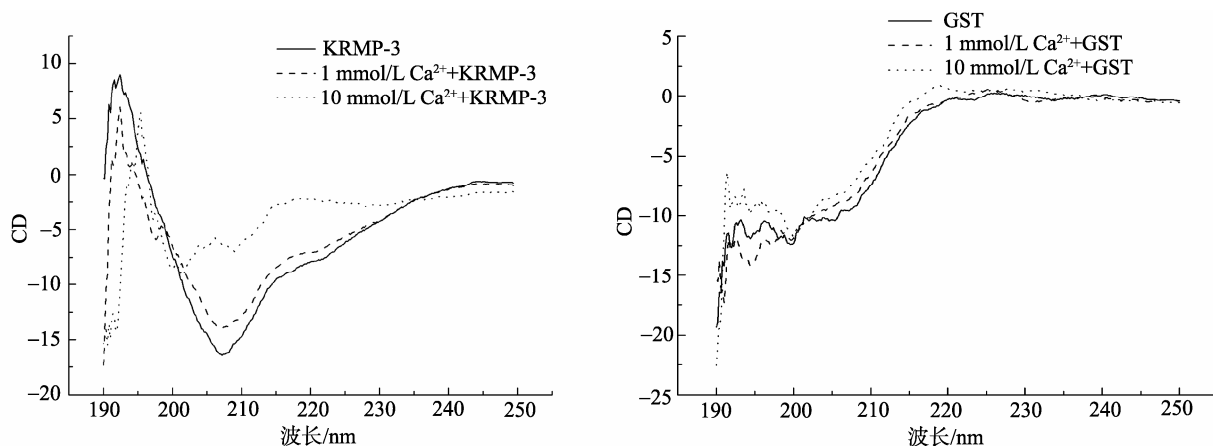


图2 不同浓度钙离子对 KRMP-3 蛋白及 GST 二级结构的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of Ca ion on the secondary structure of KRMP-3 protein and GST

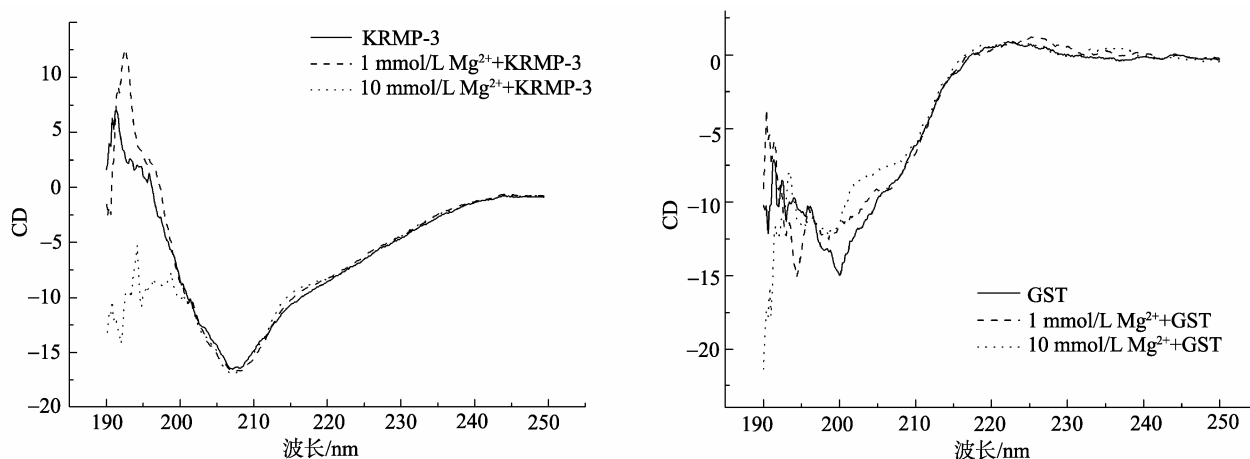


图3 不同浓度镁离子对 KRMP-3 蛋白及 GST 二级结构的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of Mg ion on the secondary structure of KRMP-3 protein and GST

二价金属离子作为淬灭剂，利用荧光淬灭法研究 KRMP-3 蛋白对离子的选择性。

生物大分子含有荧光基团(KRMP-3 中主要是色氨酸)，加入外界离子后可能发生荧光淬灭现象，这种现象可以间接说明蛋白与离子相互作用的强弱<sup>[5]</sup>。图 4~图 7 分别显示了在 KRMP-3 蛋白溶液中加入不同浓度的钙，镁，镉，钡离子后荧光淬灭程度的变化。从图中可以清楚地看到，在加入了一系列浓度梯度的钙离子后，KRMP-3 的荧光强度发生了显著的淬灭现象，且其峰值随着浓度的增加有规律的递减；而加入镁，镉，钡等离子后，虽然也发生了小幅度的荧光淬灭，但其淬灭程度要小于钙离子，且其峰值并没有出现规律性的递减。对照组为 GST 蛋白的荧光光谱图，从图中可以看到，当加入钙，镁，镉，钡离子后，其荧光强度基本不

发生变化，说明前面的荧光淬灭是由 KRMP-3 蛋白引起的，钙离子更容易与 KRMP-3 蛋白结合，从而使得荧光强度降低。由此可见，KRMP-3 蛋白确实更“偏爱”于钙离子。结合圆二色谱的实验结果，我们发现，钙离子对 KRMP-3 的结构影响要大于其他离子，说明 KRMP-3 对钙离子可能具有一定的选择性。

#### 2.4 KRMP-3 蛋白与钙离子结合常数 $K$ 和结合位点数 $n$ 的计算

为了确认 KRMP-3 与钙离子结合能力的强弱，本实验对钙离子结合常数  $K$  和结合位点数  $n$  进行了计算。荧光淬灭的机理可以分为动态淬灭和静态淬灭<sup>[8-9]</sup>。动态淬灭遵循 Stern-Volmer 方程： $I_0/I=1+K_q\tau_0 [Q]=1+K_{sv}[Q]$ 。其中  $I_0$  和  $I$  分别表示未加入淬灭剂(本

实验中的二价离子)和加入淬灭剂之后的荧光强度, [Q]表示淬灭剂浓度,  $K_q$  为双分子淬灭过程速率常数,  $\tau_0$  为无淬灭剂时的分子平均寿命,  $K_{sv}$  为 Stern-Volmer 淬灭常数。由此可见, 假设钙离子使 KRMP-3 蛋白发

生荧光淬灭是由动态淬灭引起的, 那么  $I_0$  和  $I$  比值会和钙离子浓度成正比, 故选取波长为 346 nm 的荧光强度, 以钙离子浓度为横坐标, 荧光强度比值为纵坐标作图, 得到图 8。

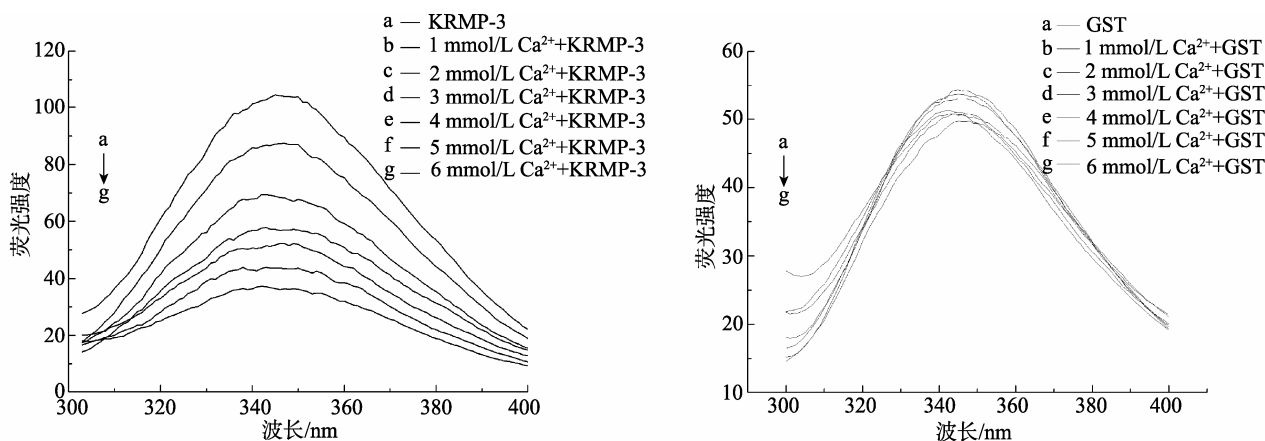


图 4 含有不同浓度钙离子的 KRMP-3 蛋白及 GST 的荧光光谱

Fig. 4 The fluorescence spectra of KRMP-3 protein and GST with different concentrations of Ca ion

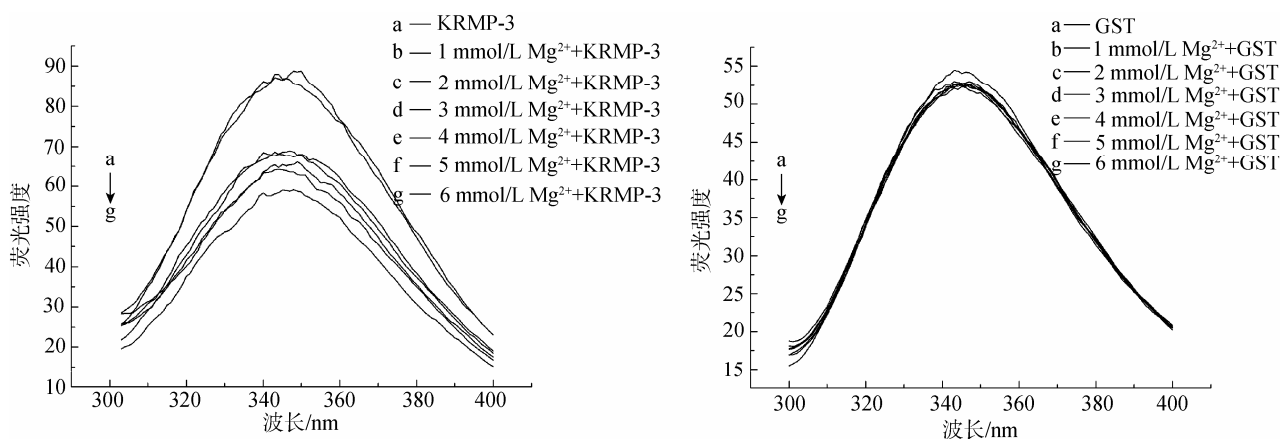


图 5 含有不同浓度镁离子的 KRMP-3 蛋白及 GST 的荧光光谱

Fig. 5 The fluorescence spectra of KRMP-3 protein and GST with different concentrations of Mg ion

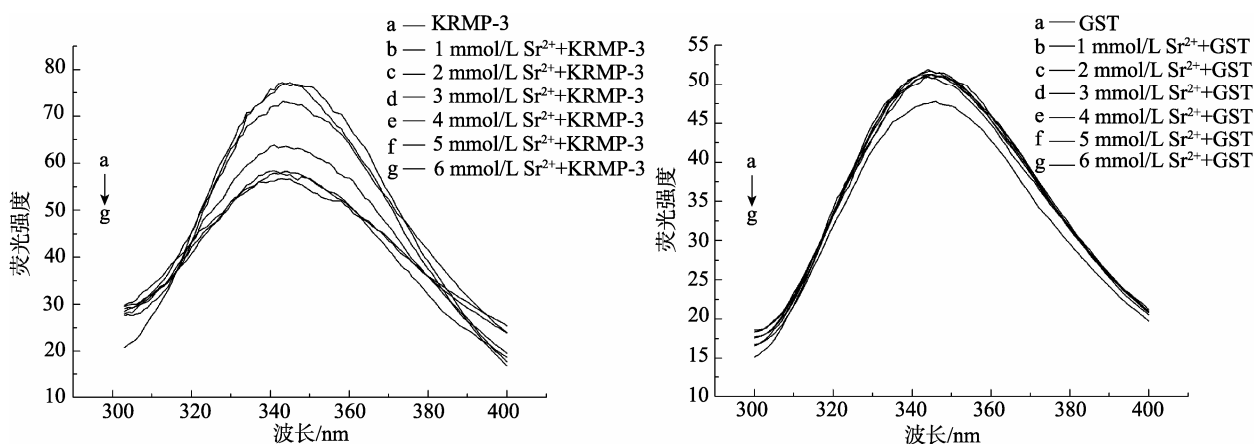


图 6 含有不同浓度锶离子的 KRMP-3 蛋白及 GST 的荧光光谱

Fig. 6 The fluorescence spectra of KRMP-3 protein and GST with different concentrations of Sr ion

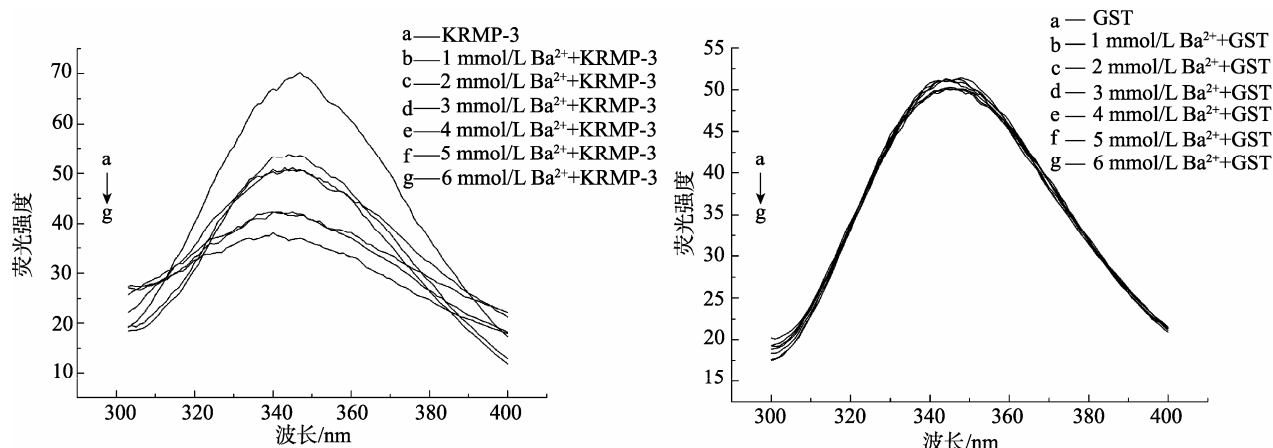


图 7 含有不同浓度钡离子的 KRMP-3 蛋白及 GST 的荧光光谱

Fig. 7 The fluorescence spectra of KRMP-3 protein and GST with different concentrations of Ba ion

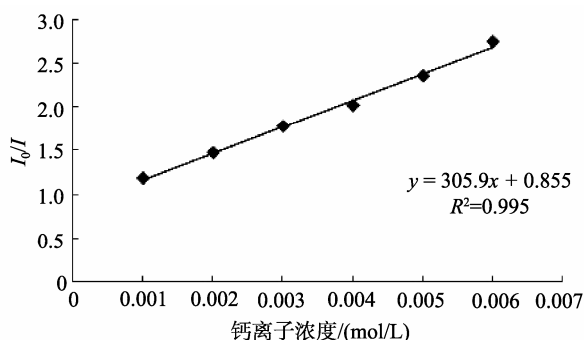


图 8 动态淬灭拟合曲线

Fig. 8 The fitting curve of dynamic quenching

由图中拟合的线性方程可以得到  $K_{sv}$  为 305.9 L/mol, 而生物大分子理论最大值  $K_{sv}$  是小于 100 L/mol 的, 故可认为由钙离子导致的荧光淬灭不是动态淬灭, 而是由静态淬灭。

仿照文献<sup>[10-11]</sup>中的方法来计算结合常数  $K$  和结合位点数  $n$ 。假设游离的 KRMP-3 蛋白的浓度为  $[P]$ , 淬灭剂钙离子的浓度为  $[Q]$ , 假设蛋白与钙离子有  $n$  个独立的结合位点, 则当加入钙离子之后, 蛋白与  $n$  个钙离子形成蛋白复合物, 即  $Q_nP$ , 其结合常数

$$K = \frac{[Q_nP]}{[Q]^n[P]} \quad (1)$$

设加入钙离子后, 蛋白的总浓度为  $[P_0]$ , 即  $[P_0] = [P] + [Q_nP]$ , 由于蛋白的摩尔浓度远小于钙离子, 故平衡时钙离子的浓度近似等于初始浓度, 因此(1)式可改写为

$$K = \frac{([P_0] - [P])}{[Q]^n[P]} \quad (2)$$

在静态淬灭中, 由于生成的配合物是非荧光性的,

故荧光强度与溶液中游离的蛋白质浓度成正比, 即

$$\frac{[P_0]}{[P]} = \frac{I_0}{I} \quad (3)$$

结合(2)和(3)可以得到

$$\lg(I_0/I - 1) = \lg K + n \lg[Q] \quad (4)$$

从(4)中可以看到,  $\lg(I_0/I - 1)$  和  $\lg[Q]$ 成线性关系, 以  $\lg[Q]$ 为横坐标,  $\lg(I_0/I - 1)$ 为纵坐标作图, 可以得到图 9。

由图中拟合的线性方程可以得知,  $n \approx 1.23$ ,  $K \approx 10^3$  L/mol,  $R^2 = 0.997$ 。

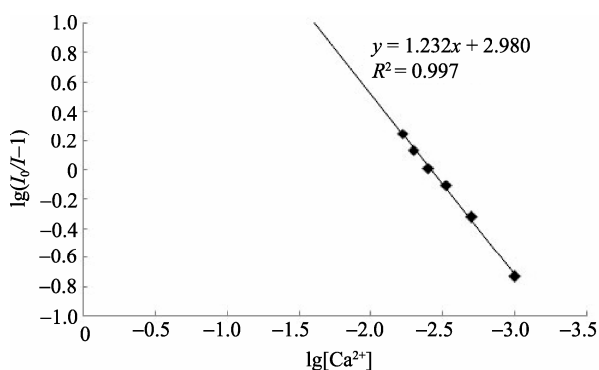


图 9 静态淬灭拟合曲线

Fig. 9 The fitting curve of static quenching

### 3 讨论

KRMP-3 是位于合浦珠母贝棱柱层的一种碱性基质蛋白, 圆二色谱和荧光光谱的实验结果显示了 KRMP-3 对钙离子具有选择性。利用方程计算得到 KRMP-3 与钙离子的结合位点数近似为 1, 结合常数约为  $10^3$  L/mol, 说明 KRMP-3 与钙离子的结合程度

并不是很强,这或许可以解释 KRMP 在贝体内的生理功能。这种与钙离子中等的结合强度使得 KRMP-3 既可以从海水中特异性地捕捉钙离子,又可以在一定条件下释放出所结合的钙离子以促进碳酸钙方解石晶体的形成,从而从结构方面说明了 KRMP-3 是有可能参与棱柱层的形成的。

此外,实验结果显示, KRMP-3 对钙离子是具有明显的选择性的。当碳酸钙结晶体系中的镁离子含量达到一定程度时,结晶出来的碳酸钙晶体是文石,而在海水中钙,镁离子都存在的条件下,贝壳中的棱柱层依然能形成这种棱柱状的方解石晶体,这很有可能是棱柱层存在着一些蛋白,他们能特异性的识别钙离子, KRMP-3 就很有可能具有这种功能。有结果显示<sup>[6]</sup>,当在含有镁离子的碳酸钙结晶体系中加入 KRMP-3 时,文石的晶貌会出现明显的变化,同时还有少量小颗粒的方解石产生。而本实验显示的 KRMP-3 对钙离子的选择性可以初步解释这种现象。

根据上述实验结果推测, KRMP-3 之所以具有调节棱柱中方解石形成的作用原因在于 KRMP-3 对钙离子的选择性,它能够特异地捕捉海水中的钙离子,将其“搬运”到贝壳中,并在合适的条件下释放出钙离子,使在棱柱层形成的微区间内形成一个类似于方解石形成的体系(无镁),从而诱导方解石的形成。

## 参考文献:

- [1] Addadi L, Weiner S. Biomineralization: A pavement of pearl [J]. *Nature*, 1997, 389(6653): 912-915.
- [2] Marin F, Luquet G, Marie B, et al. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2008, 80: 209-276.
- [3] Zhang C, Zhang R. Matrix proteins in the outer shells of molluscs [J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2006, 8(6): 572-586.
- [4] 赵南明, 周海梦. 生物物理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [5] 丘冠英, 彭银祥. 生物物理学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2000.
- [6] 梁健. 合浦珠母贝基质蛋白 KRMP-3 的功能研究[D]. 北京: 清华大学, 2009.
- [7] Wang Q, Zhang R. The extra C-terminal tail is involved in the conformation, stability changes and the N/C-domain interactions of the calmodulin-like protein from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. *BBA-Proteins and Proteomics*, 1784(11): 1514-1523.
- [8] 陈国珍. 荧光分析法(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [9] 郭兴家. 荧光猝灭法研究胆红素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *分析实验室*, 2007, 26(4): 11-15.
- [10] 吴文华, 赵妍, 曹焱. 荧光猝灭法对葫芦巴碱与人血清白蛋白间相互作用的研究[J]. *中医药学报*, 2010, 36(8): 57-59.
- [11] Wang Y P, Wei Y L, Chuan D. Study on the interaction of 3,3-bis (4-hydroxy-1-naphthyl)-phthalide with bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2006, 177(1): 6-11.

## Ionic selectivity of KRMP-3, a shell matrix protein of *Pinctada fucata*

WU Chen, SU Jing-tan, LIANG Jian, LIANG Xiao, XIE Li-ping, ZHANG Rong-qing  
(School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Received: Apr., 20, 2012

**Key words:** Biomineralization; matrix protein KRMP-3; Circular dichroism; fluorescence quenching; ionic selectivity

**Abstract:** KRMP-3 with GST-tag is expressed in *Escherichia coli*. Using Circular dichroism (CD), we have studied the changes of KRMP-3 secondary structure with concentrations of calcium and magnesium ions, and we found that calcium ion has much stronger effect than magnesium ions. Moreover, we also studied ionic selectivity of KRMP-3 using fluorescence quenching method with  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$ , and we found that KRMP-3 has very high selectivity towards calcium ion. The static quenching constant  $K=10^3 \text{L/mol}$  and the binding sites number  $n=1$ , suggesting KRMP-3 has a moderate binding capacity with calcium ion. We speculate KRMP-3 could promote the formation of the *Pinctada fucata* prismatic layer.

(本文编辑: 康亦兼)