

含有 NADPH 的藍色螢光蛋白突變與 X 光晶體結構分析

黃文珊¹、陳俊榮^{2*}

嘉南藥理大學 醫藥化學系¹

國立成功大學生物科技研究所&國家同步輻射研究中心生命科學小組²

關於創傷弧菌 CKM-1 基因中選殖出來的藍色螢光蛋白研究已進行了一段時間。藍色螢光蛋白(BFPvv)的基因已藉由分子複製技術選殖出來，重組蛋白利用大腸桿菌系統表現。在近幾年的研究中指出對重組蛋白 BFPvvD7(八個突變位點)和 BFPvvD8(十一個突變位點)兩種多點突變 BFPvv 比野生型藍色螢光蛋白(WT-BFPvv)大幅提升螢光強度；而將 176 位點的甘胺酸(Gly)突變成絲胺酸(Ser)後對螢光亮度的提升亦有顯著的影響。此外，由晶體結構中顯示將 199 位點的離胺酸(Lys)突變成精氨酸(Arg)後，將使突變之精氨酸的側鏈殘基(side chain)較離胺酸的 side chain 更接近輔因子菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氫(NADPH)分子，推論這結構的改變可能是影響發光強度的因素。

為了要瞭解突變位點如何影響螢光強度，我建構了一個雙點突變的 Gly176Ser/Lys199Arg BFPvv 流程，大量表現蛋白並加入輔因子 NADPH 使其與蛋白分子形成複合體後，進而培養出蛋白質晶體。在此雙點突變蛋白序列中加入六個組胺酸(His)作為標記蛋白，並在大腸桿菌 BL21(DE3)中大量表現，藉由鎳離子親和性管柱及膠體過濾層析管柱純化蛋白樣品，再以懸滴蒸氣擴散式的結晶方法培養蛋白質晶體，此雙點突變蛋白質晶體由同步輻射 X-光繞射實驗得到 2.3 Å 解析度的電子密度圖。G176S/K199R BFPvv 晶體屬四方晶系，空間群為 $P4_32_12$ ，在不對稱晶格單元中含有兩個蛋白分子，預估含 52.78% 的溶劑含量。目前我正著手於對 G176S/K199R BFPvv 結構的分析，試圖找出影響螢光強度的原因，並與 WT-BFPvv 做比較。而未來將利用螢光光譜儀分析此 G176S/K199R BFPvv 和 WT-BFPvv 其螢光激發強度，來佐證結構上的差異性與螢光強度所呈現的關係。

關鍵字: NADPH-dependent fluorescent protein、Blue fluorescent protein、Short chain dehydrogenase/reductase、X-ray crystallography、Site directed mutagenesis