

• 农业生物技术 •

## 家蚕精氨酸激酶原核表达纯化、结构与活性分析

何华伟<sup>1</sup>, 王叶菁<sup>2</sup>, 赵敏健<sup>2</sup>, 位曙光<sup>1</sup>, 赵朋<sup>1</sup>, 蒋文超<sup>1</sup>, 刘莉娜<sup>1</sup>, 赵萍<sup>1</sup>

1 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715

2 西南大学 生物技术学院, 重庆 400715

何华伟, 王叶菁, 赵敏健, 等. 家蚕精氨酸激酶原核表达纯化、结构与活性分析. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1109–1123.  
He HW, Wang YJ, Zhao MJ, et al. Prokaryotic expression, purification and characterization of arginine kinase of *Bombyx mori*. Chin J Biotech, 2017, 33(7): 1109–1123.

**摘要:** 精氨酸激酶 (Arginine kinase, AK) 是无脊椎动物体内能量代谢的关键酶, 在生长发育、营养利用、免疫抗性、胁迫应答等生命活动过程中发挥着重要的调控作用。家蚕精氨酸激酶 BmAK 与能量平衡、抗 NPV 病毒过程相关, 但目前关于其分子结构和酶学性质的研究不多。克隆了 *BmAK* 基因 ORF 序列, 分析了其染色体定位、基因组结构、mRNA 结构、二级结构和三级结构。进化分析表明 AK 在进化过程中高度保守。原核表达获得了可溶性的 BmAK 重组蛋白, 通过 Ni-NTA 亲和层析纯化了 BmAK。圆二色光谱分析显示 BmAK 包含  $\alpha$  螺旋结构, 其  $\alpha$  螺旋结构在 pH 5–10 范围内相对稳定。酶活分析表明 BmAK 的最适温度为 30 °C, 最适 pH 为 7.5。25 °C 时 BmAK 的催化活性最大, 在 15–30 °C 范围内, BmAK 的结构相对稳定, 活性差别不大。BmAK 的结构在 pH 7.0 左右相对稳定。这些研究为揭示 BmAK 的结构和功能提供了基础, 有助于开发以 AK 为分子靶标的绿色安全环保的新型杀虫剂。

**关键词:** 家蚕, 精氨酸激酶, 表达纯化, 结构, 活性

**Received:** January 5, 2017; **Accepted:** April 27, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31402139, 31572465), State Key Program of National Natural Science of China (No. 31530071), Chongqing Research Program of Basic Research and Frontier Technology (Nos. cstc2015jcyjA00040, cstc2015jcyjBX0035), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. XDJK2013A019), Start-up Grant from Southwest University (No. SWU112111).

**Corresponding author:** Yejing Wang. Tel: +86-23-68251575; E-mail: yjwang@swu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31402139, 31572465), 国家自然科学基金重点项目 (No. 31530071), 重庆市基础科学与前沿技术研究专项 (Nos. cstc2015jcyjA00040, cstc2015jcyjBX0035), 中央高校基本科研业务费 (No. XDJK2013A019), 西南大学博士基金 (No. SWU112111) 资助。

网络出版时间: 2017-05-17

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170517.1450.002.html>

# Prokaryotic expression, purification and characterization of arginine kinase of *Bombyx mori*

Huawei He<sup>1</sup>, Yejing Wang<sup>2</sup>, Minjian Zhao<sup>2</sup>, Shuguang Wei<sup>1</sup>, Peng Zhao<sup>1</sup>, Wenchao Jiang<sup>1</sup>, Li'na Liu<sup>1</sup>, and Ping Zhao<sup>1</sup>

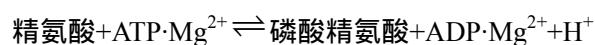
<sup>1</sup> State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China

<sup>2</sup> College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Arginine kinase (AK) is a key enzyme in energy metabolism of invertebrates and plays an important regulatory role in the life activities such as growth and development, nutrition utilization, immune resistance and stress response. Arginine kinase of *Bombyx mori* (BmAK) is related to the energy balance and anti-NPV process, but there is little research on its molecular structure and enzymatic properties. We cloned the ORF sequence of *BmAK* gene, and analyzed chromosomal localization, genomic structure, mRNA structure, secondary and tertiary structure. Phylogenetic analysis indicated that AK was highly conserved in evolution. Soluble recombinant BmAK was obtained by prokaryotic expression, and purified by Ni-NTA affinity chromatography. The circular dichroism spectroscopy showed that BmAK contained  $\alpha$ -helix structures, and its  $\alpha$ -helix structures were relatively stable in the pH range between 5 and 10. Enzyme activity analysis showed that the optimum temperature of BmAK was 30 °C and the optimum pH of BmAK was 7.5. The optimal temperature of BmAK was 25 °C. Between 15 °C and 30 °C, the structure and activity of BmAK was relatively stable. The structure of BmAK was relatively stable at pH 7.0. Our findings reveal the structure and function of BmAK to develop novel green safe and environmentally friendly insecticides.

**Keywords:** *Bombyx mori*, arginine kinase, expression and purification, structure, activity

精氨酸激酶 (Arginine kinase, AK) (EC 2.7.3.3) 是无脊椎动物体内一种重要的磷酸原蛋白激酶。它可逆地催化 ATP 上的  $\gamma$  磷酸基团转移到精氨酸上, 从而形成 ADP 和一种具有高能键的储能分子——磷酸精氨酸<sup>[1]</sup>。反应方程式如下:



精氨酸激酶属于磷酸原激酶家族。磷酸原激酶催化 ATP 的高能磷酸基团可逆地转移到生物体内天然的胍基化合物, 从而在细胞内部进行能量转移, 因此在无脊椎动物体内能量代谢、存储和利用方面发挥着重要的调节作用<sup>[2-3]</sup>。作为体内能量代谢的关键酶之一, 精氨酸激酶广泛地参与了体内的能量代谢, 同时还与胁迫应答、离子

交换、免疫抗性等过程相关<sup>[4-8]</sup>。在无脊椎动物体内, 精氨酸激酶的表达具有一定的时空特异性。精氨酸激酶在不同的组织中均有表达, 特别是在能量需求较高的组织如脑、肌肉、神经元、复眼或精巢等组织中高量表达<sup>[9]</sup>。除此之外, 精氨酸激酶在不同组织中的表达量还受到外界因素的调控, 如蜕皮激素可能参与调控家蚕精氨酸激酶的表达, 从而导致精氨酸激酶在熟蚕期表达量达到最大, 在蛹期表达量下降<sup>[10]</sup>。与滞育型棉铃虫相比, 在非滞育型棉铃虫脑中, 精氨酸激酶具有更高的反应活性, 表明精氨酸激酶可能参与了棉铃虫蛹期的发育调控<sup>[11]</sup>。在烟草夜蛾中, 精氨酸激酶在中肠和腹足中高量表达, 可能与营养

消化吸收和运动相关<sup>[12]</sup>。

由于精氨酸激酶在生命活动过程中的重要作用,多种不同来源的精氨酸激酶基因被克隆和体外表达,其结构和功能的研究也不断深入。1995年, Ellington 等首先克隆了美洲鲎精氨酸激酶基因,并对其序列进行了分析<sup>[13]</sup>。随后, Maleszka 等克隆分析了蜜蜂的精氨酸激酶基因<sup>[14]</sup>。2006年,王华兵和徐豫松从家蚕中克隆了精氨酸激酶,并分析了其在不同组织和时期的表达特征<sup>[10]</sup>。之后,美洲大蠊<sup>[15]</sup>、蝗虫<sup>[16]</sup>、凡纳滨对虾<sup>[17-18]</sup>、家蚕<sup>[19]</sup>、棉铃虫<sup>[9-11,20-21]</sup>、海参<sup>[22]</sup>、锯缘青蟹<sup>[23]</sup>、烟草夜蛾<sup>[12]</sup>、捻转血矛线虫<sup>[24]</sup>等精氨酸激酶基因相继被克隆,并对其时空表达、结构活性等进行了研究。陈克平等发现家蚕精氨酸激酶在抗 NPV 的家蚕品种中高表达,推测其可能与家蚕抗 NPV 病毒相关<sup>[4]</sup>。

虽然家蚕精氨酸激酶的研究已经取得了一些进展,但对其分子结构和酶学性质则知之甚少。本文从家蚕中克隆了精氨酸激酶基因,并将其构建到原核表达载体,进行表达纯化。在此基础上,进一步分析了其酶学性质和蛋白结构,为深入理解其分子结构和生物学功能提供了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

蛋白分子量 marker、硫酸卡纳霉素 (Kana)、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 宝生物工程 (大连) 有限公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  和 *E. coli* Transetta (DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司; dNTPs、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自上海生工; *EcoR* I、*Hind* III 和 Q5 高保真 DNA 聚合酶购自 New England Biolabs 公司;质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公

司。感谢美国西南医学中心张学武教授馈赠表达载体 pSKB2。pSKB2 是基于 pET-28a(+)改造的载体,将 thrombin 的酶切位点替换为 prescission 的酶切位点,其他保持不变。

### 1.2 生物信息学分析

利用家蚕基因组数据库 SilkDB (<http://silfdb.org/>) 和 Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) 分析家蚕精氨酸激酶 (BmAk) 染色体定位、基因组 DNA 和 mRNA 序列,利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 BmAk 蛋白分子量、等电点、结构域,并预测其二级结构和三级结构。以 BmAk 氨基酸序列为模板进行 Blast 分析,利用分子进化软件 Mega<sup>[25]</sup> 构建系统发育进化树。

### 1.3 表达载体构建

根据 *BmAk* 的 cDNA 序列,利用 Primer Premier 软件进行引物设计,正反向引物分别为 5'-CCGAATTCATGGTCGACGCCGCAACC-3' 和 5'-CGCAAGCTTCTACAGAGACTTCTCGATCTTGATGAGCT-3', 其中下划线部分分别表示 *EcoR* I 和 *Hind* III 的酶切位点。以 5 龄 3 天家蚕后部丝腺组织 cDNA (本实验室提供) 为模板,通过 PCR 扩增获得 *BmAk* 基因,利用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。将扩增获得的 DNA 片段通过凝胶回收试剂盒纯化回收,将 pSKB2 载体与目标 DNA 片段同时进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,再利用 T4 DNA 连接酶将二者连接。将连接产物转化 DH5 $\alpha$ , 并通过菌落 PCR、双酶切和基因测序对重组质粒进行验证。

### 1.4 蛋白原核表达

蛋白表达纯化参考之前的方案<sup>[26-28]</sup>, 此处简述如下。选择正确的重组质粒转化 Transetta (DE3) 细胞,首先挑取单菌落 37 °C 过夜培养,

然后接种到含有卡那霉素的 LB 培养基中培养至  $OD_{600}$  约 0.8–1.0, 加入 0.1 mmol/L IPTG 在 16 °C 和 37 °C、220 r/min 转速下分别培养 20 h 和 4 h 诱导 *BmAK* 表达, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, 加入缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 10% Glycerol) 悬浮细胞, 冰浴超声破碎。破碎后的细胞于 4 °C、12 000 r/min 离心, 分别收集上清和沉淀, 进行 15% SDS-PAGE 电泳。利用考马斯亮蓝染色分析不同培养温度下 *BmAK* 的表达情况。发现 *BmAK* 在两种温度下均在上清中表达, 故选择 37 °C 进行大量表达纯化。

### 1.5 重组蛋白的纯化

在 37 °C、220 r/min 转速下加入 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 以大量表达重组 *BmAK* 蛋白。收集细胞, 冰浴超声破碎, 然后在 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集上清。利用 0.45  $\mu$ m 滤膜对上清过滤, 然后在 4 °C 下进行 Ni-NTA 亲和层析纯化, 利用包含不同咪唑浓度的缓冲液进行梯度洗脱, 分别收集不同组分的洗脱液, 进行 15% SDS-PAGE 分析。考马斯亮蓝染色后, 选择条带单一的梯度洗脱液进行浓缩, 并利用 HiPrep 26/10 (GE Healthcare) 脱盐除去咪唑, 同时置换为缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 5% 甘油)。收集脱盐后的蛋白溶液, 浓缩后于 -80 °C 冻存。

### 1.6 凝胶过滤分析

取冻存的重组 *BmAK* 蛋白, 解冻后于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清载入 Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) 凝胶层析柱进行凝胶过滤分析, 上样体积 0.5 mL 流速 0.5 mL/min, 流动相为缓冲液 B。收集蛋白组分, 进行 15%

SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色分析。

### 1.7 二级结构分析

利用 Millipore 超滤浓缩离心管将纯化的 *BmAK* 蛋白置换于磷酸缓冲液 PBS 中, 然后借助圆二色光谱仪 MOS-500 (Bio-Logic, 法国) 对 *BmAK* 蛋白的二级结构进行分析。测试温度为 25 °C, 波谱扫描范围为 190–250 nm, 所用比色皿光程为 1 mm, 蛋白浓度为 0.1 mg/mL, 扫描速度为 240 nm/min。

分别将不同 pH 值的缓冲溶液与纯化的 *BmAK* 蛋白在室温下孵育 30 min, 然后利用 MOS-500 进行二级结构分析, 以不含蛋白的相应 pH 缓冲溶液为空白对照。所有的实验重复 3 次, 取平均值进行分析。

### 1.8 酶学活性检测

*BmAK* 的酶学活性检测参考于振行等<sup>[29]</sup>。酶活反应体系如下: 57 mmol/L 精氨酸, 66 mmol/L 乙酸镁, 2 mL 溴百里酚蓝指示剂, 53.2 mg ATP 钠盐, 反应总体积为 20 mL。反应溶液现配现用, 并利用 NaOH 调节 pH 到 7.5, 注意避光保存。反应溶液首先在 30 °C 温育 10 min, 然后取 1 mL 反应液加入比色皿中, 再加入 10  $\mu$ L 纯化的 1 mg/mL *BmAK*, 利用 DU 800 型紫外分光光度计 (BECKMAN, 美国) 测定 575 nm 处吸光值在 1 min 中内下降的数值。重复上述实验, 取 3 次测定的平均值为 *BmAK* 的活性。

### 1.9 最适反应温度和热稳定性分析

将 *BmAK* 的酶活反应体系分别在 10 °C、20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C 和 80 °C 孵育 10 min, 然后再按照上述测活方法检测 *BmAK* 活性。以 *BmAK* 的最高反应活性为 100%, 其他温度下活性相对最高活性作图, 从

而确定 BmAK 的最适反应温度。接下来将 BmAK 溶液分别在 10 °C、20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C 和 80 °C 孵育 10 min, 然后在最适反应温度下测定 BmAK 的活性, 从而分析 BmAK 的热稳定性。

### 1.10 最适反应 pH 和 pH 稳定性分析

将 BmAK 的酶活反应体系分别设定为 pH 6.5、6.75、7.0、7.25、7.50、7.75 和 8.0 的缓冲溶液, 其他保持不变, 然后再按照上述测活方法在最适温度下检测 BmAK 活性。以 BmAK 的最高反应活性为 100%, 其他 pH 下活性相对最高活性作图, 从而确定 BmAK 的最适反应 pH。接下来将 BmAK 分别在 pH 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 的缓冲溶液中孵育 10 min, 然后在最适反应温度和最适反应 pH 下测定 BmAK 的活性, 从而分析 BmAK 的 pH 稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 BmAK 基因克隆与分析

根据家蚕基因组数据库和 PubMed 数据库, 以 5 龄 3 天家蚕后部丝腺组织 cDNA 为模板, 利用设计的引物进行 PCR 扩增, 获得长度约为 1 068 bp 的序列。将获得的 DNA 片段与 pSKB2 载体通过双酶切后连接, 转化 DH5 $\alpha$ , 首先通过菌落 PCR 扩增验证, 然后以 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切对构建成功的质粒验证 (图 1A), 最后通过基因测序进一步确认克隆构建成功。

*BmAK* 基因在 GenBank 数据库中的登录号为 692924, 该基因定位于家蚕第 5 号染色体 (图 1B)。该基因全长 11 377 bp, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成 (图 1C)。mRNA 全长 1 285 bp, 其中包括一段编码 1 068 bp 的开放阅读编码框 (ORF), 编码 355 个氨基酸。*BmAK* 基因 mRNA

的 5' 末端存在一段长 51 bp 的非翻译区序列 (5'-UTR), 3' 末端包含一段长 148 bp 的非翻译区序列 (3'-UTR) 和一段由 17 个 A 组成的 polyA 加尾信号 (图 1D)。

2006 年, 王华兵等利用 5' RACE 法从家蚕中克隆了 *BmAK* 基因<sup>[10,30]</sup>。该基因包含 2 个外显子和 1 个内含子, cDNA 全长 1 268 bp, 编码 355 个氨基酸, GenBank 登录号为 DQ272299。与本文克隆的 *BmAK* 基因相比, 二者在基因结构方面存在一定差异, 但编码的氨基酸完全相同。这种基因结构的差异可能与家蚕的品种相关, 本文采用的家蚕品种为大造, 而王华兵等采用的家蚕品种为 C108<sup>[10,30]</sup>。

### 2.2 BmAK 蛋白结构分析

ProtParam 分析显示 BmAK 蛋白分子量约为 40 kDa, 等电点为 5.87。利用在线服务器 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析发现 BmAK 蛋白包含两个典型的结构域, 其中 20–91 位氨基酸残基组成了 ATP-胍基磷酸转移酶 N 末端结构域, 113–355 位氨基酸残基组成了 ATP-胍基磷酸转移酶结构域 (图 2A)。利用 Pubmed 分析 BmAK 蛋白保守的结构域和关键氨基酸位点, 发现 BmAK 属于磷酸原激酶超家族中类精氨酸激酶家族一员, 其中第 62–65 位、67 位、193 位、224 位、270 位、272–273 位、313–314 位氨基酸残基被认为是与精氨酸结合的保守位点, 第 121 位、123 位、125 位、184 位、220 位、228 位、279 位、281–283 位、308 位、310 位、312–313 位、323 位被认为是与 ADP 结合的保守位点, 第 305–326 位氨基酸残基形成了底物特异环 (图 2B)。利用 PSIPRED 分析 BmAK 蛋白的结构, 发现 BmAK 蛋白由 2 个显著的结构域组成, 其中 N 末端结构域由 6 段短的  $\alpha$  螺

旋结构组成，C 末端结构域由多段  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  片层结构组成 (图 2C-D)。

### 2.3 BmAK 蛋白系统进化分析

将 BmAK 氨基酸序列通过 Pubmed 提交进行 BLAST 分析，选取 24 种与 BmAK 序列同源的物种进行系统进化分析，结果如图 3 所示。进化树分析显示，家蚕 BmAK 与同为鳞翅目的冬尺蠖蛾 *Operophtera brumata*、小菜蛾 *Plutella*

*xylostella* 的精氨酸激酶序列相似度最高，暗示了这些物种的精氨酸激酶具有相似的进化起源。序列差异最大的是斑马鱼 *Danio rerio*、小鼠 *Mus musculus* 和智人 *Homo sapiens* 的肌酸激酶，显示了精氨酸激酶在不同物种中的进化差异。总体来看，精氨酸激酶在低等和高等生物中的序列相当保守，暗示了精氨酸激酶在低等和高等生物生命活动过程中都发挥着重要的功能。

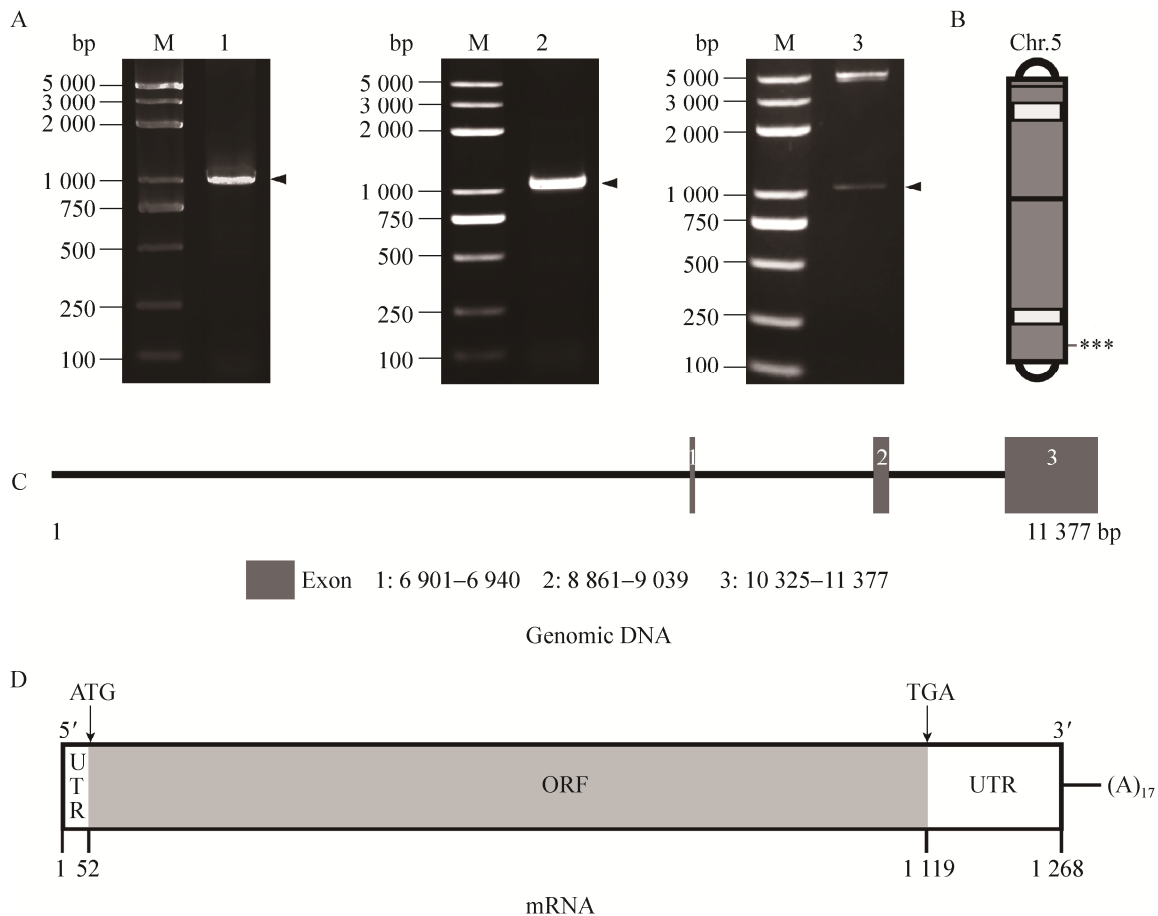


图 1 *BmAK* 基因的克隆和分析 (A: *BmAK* 基因克隆、菌落 PCR 和双酶切验证; B: 染色体定位; C: *BmAK* 基因组 DNA 示意图; D: *BmAK* 基因 mRNA 示意图)

Fig. 1 Cloning and analysis of *BmAK*. (A) 1% agar gel analysis of *BmAK*. M: DNA marker; 1: PCR product; 2: colony PCR product; 3: double enzyme digestion products. (B) Chromosomal localization of *BmAK* gene. (C) The diagram of *BmAK* genomic DNA sequence. (D) The diagram of *BmAK* mRNA sequence. ATG: start codon; TGA: stop codon; UTR: untranslated region; ORF: open reading frame.

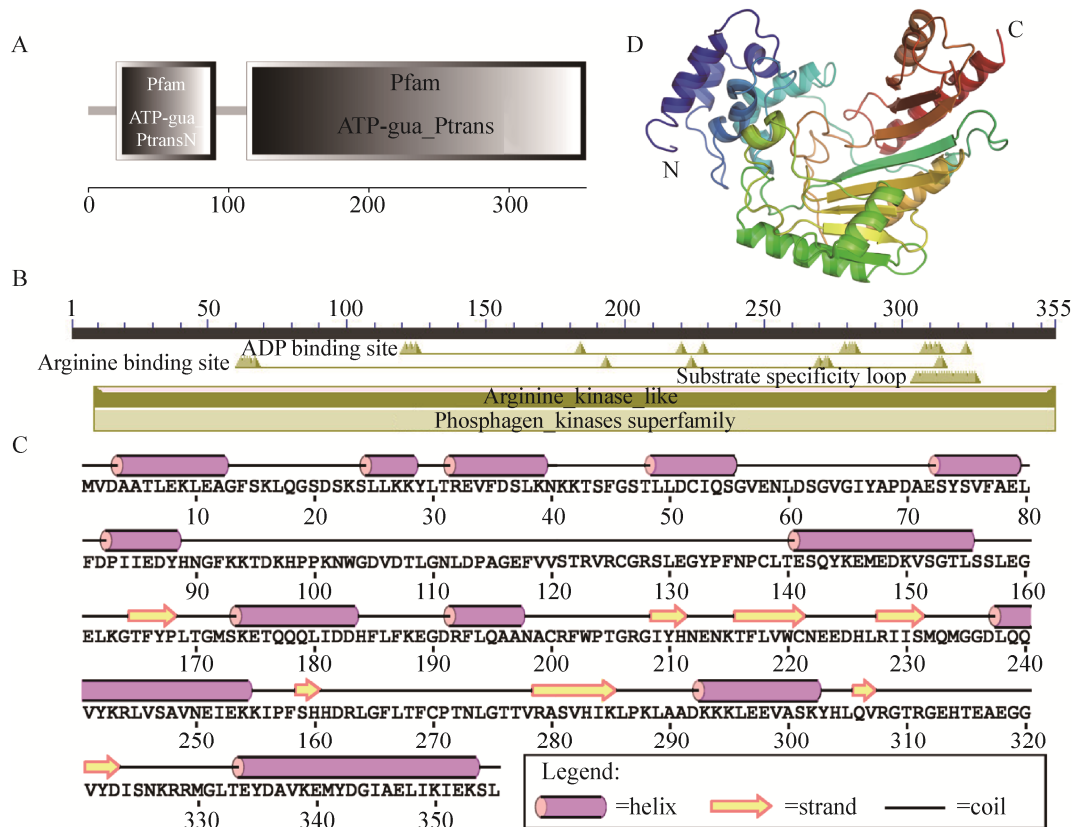


图 2 BmAK 分析 (A: 结构域预测; B: 保守结构域和关键氨基酸位点分析; C: 预测的 BmAK 二级结构; D: 预测的 BmAK 三级结构)

Fig. 2 Analysis of BmAK. (A) Domain prediction. (B) Analysis of the conserved domain and key amino acid residues. (C) The predicted secondary structures of BmAK. (D) The predicted tertiary structure of BmAK.

## 2.4 BmAK 蛋白表达纯化

将克隆获得的 *BmAK* 基因与 pSKB2 载体连接, 经双酶切和基因测序验证后, 将正确构建的重组表达质粒 pSKB2-*BmAK* 转化 *Transtetta* (DE3) 表达细胞, 在 16 °C 和 37 °C 下, 分别加入 0.1 mmol/L IPTG 诱导含有 6 个组氨酸标签 (6×His) 的重组 BmAK 蛋白 (6×His-BmAK, His<sub>6</sub>-BmAK) 表达。SDS-PAGE 显示, 无论在 16 °C 还是 37 °C, 上清中均存在一条约为 43 kDa 的明显蛋白条带, 表明成功表达了重组 His<sub>6</sub>-BmAK 蛋白, 且目的蛋白主要以可溶性蛋白的表达形式存在于细胞裂解后的上清中, 在沉淀中几乎看

不到目的蛋白的条带 (图 4A)。因此, 我们选择在 37 °C 下培养细胞诱导目的蛋白的表达。

在 37 °C 下, 加入 0.1 mmol/L IPTG 大规模诱导重组 BmAK 蛋白表达, 然后在 4 °C 下通过 Ni-NTA 亲和层析法纯化目的蛋白, 分别利用包含 20–500 mmol/L 咪唑浓度的缓冲溶液梯度洗脱。SDS-PAGE 结果显示, 大多数洗脱组分获得的目的蛋白纯度都超过了 90%, 其中包含 500 mmol/L 咪唑的缓冲溶液洗脱的目的蛋白纯度超过了 98% (图 4B)。收集包含 500 mmol/L 咪唑的缓冲溶液洗脱的 His<sub>6</sub>-BmAK 蛋白, 脱盐浓缩后冻存于 -80 °C。

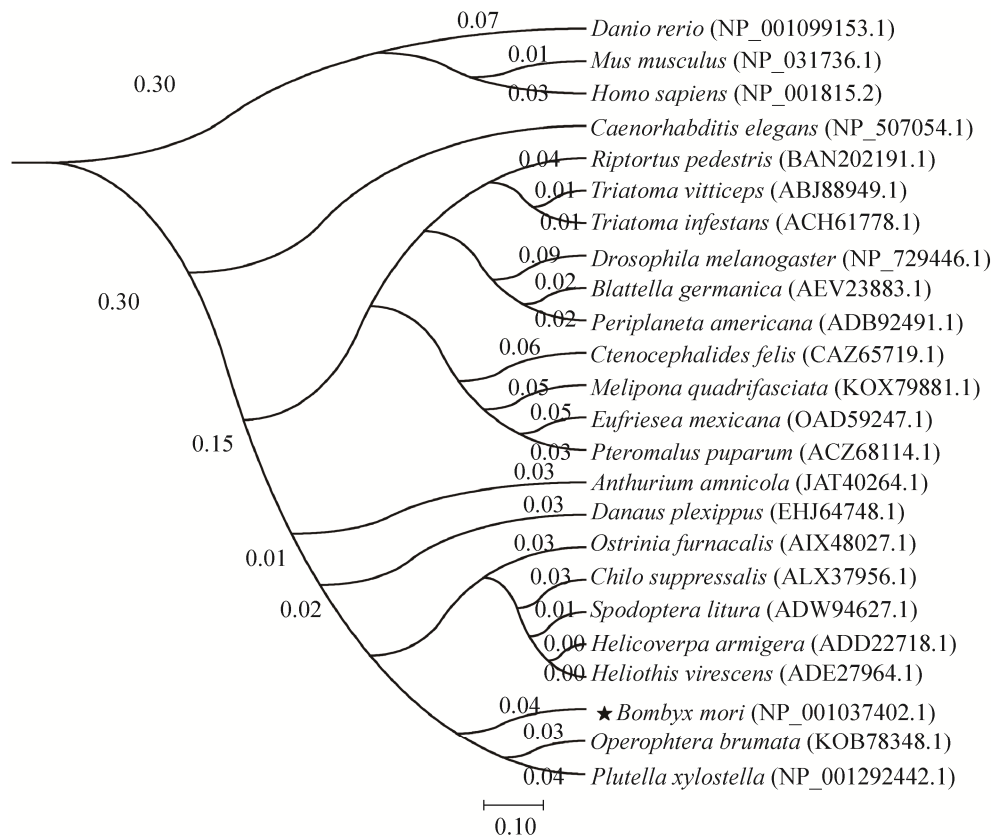


图3 BmAK 与其他物种同源蛋白的进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of BmAK and AKs from other species.

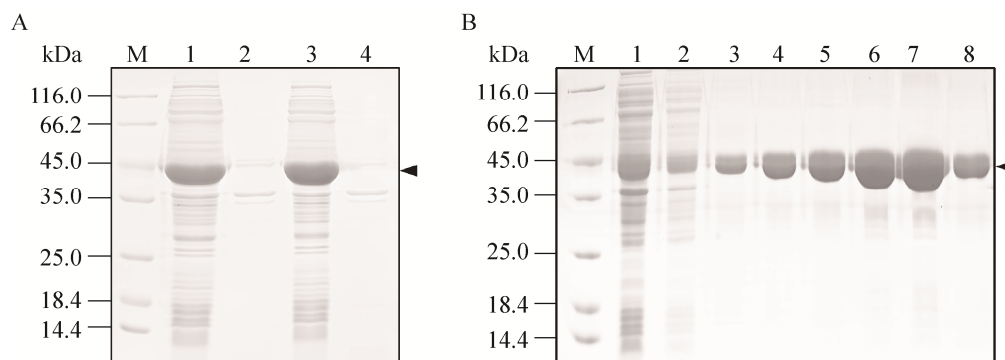


图4 BmAK 表达纯化 (A: BmAK 表达分析; B: Ni-NTA 亲和层析纯化 BmAK)

Fig. 4 Expression and purification of BmAK. (A) Analysis of BmAK expression. M: protein molecular weight marker; 1: 16 °C supernatant; 2: 16 °C pellet; 3: 37 °C supernatant; 4: 37 °C pellet. (B) Purification of BmAK via Ni-NTA affinity chromatography. M: protein molecular weight marker; 1: supernatant; 2: pellet; 3-8: elutions of 20, 40, 80, 100, 200 and 500 mmol/L imidazole.



## 2.5 BmAK 蛋白溶液存在形式分析

将纯化的 BmAK 蛋白通过凝胶过滤层析柱分析 BmAK 在溶液中的存在形式,结果如图 5A 所示。BmAK 流经 Superdex 200 10/300 GL 凝胶层析柱,显示为一个单一锐利的对称峰形。SDS-PAGE 结果显示,该峰代表的为重组 His<sub>6</sub>-BmAK 蛋白(图 5B)。根据图 5A 的洗脱体积,可以推算出重组 His<sub>6</sub>-BmAK 在溶液中的分子量约为 43 kDa,表明重组表达的 His<sub>6</sub>-BmAK 蛋白在溶液中主要以单体的形式存在。

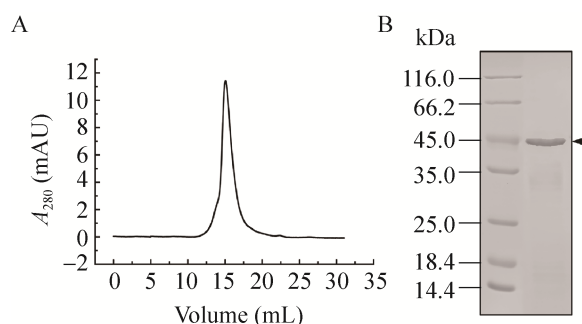


图 5 BmAK 在溶液中的存在形式分析 (A: 凝胶过滤层析分析; B: SDS-PAGE 分析洗脱物)

Fig. 5 Analysis of the existing form of BmAK in Solution. (A) Gel filtration analysis. (B) SDS-PAGE analysis of the elution.

## 2.6 BmAK 蛋白二级结构分析

通过圆二色光谱法分析 BmAK 蛋白的二级结构,结果显示,BmAK 蛋白的圆二色光谱在约 208 nm 和 222 nm 处具有两个明显的负峰,在约 192 nm 处具有一个明显的正峰(图 6A),表明获得的重组 BmAK 蛋白含有一定的  $\alpha$  螺旋结构,这与之前 BmAK 蛋白结构预测的结果基本一致。利用软件 Biokine v4.74 可以计算出 BmAK 中  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠链和无规则卷曲结构的含量分别约为 32%、8%和 60%,因此 BmAK 的圆二色光谱图显示出  $\alpha$  螺旋结构的特征峰, $\beta$  折叠链和无规则卷曲结构的特征峰在圆二色光谱图中表现不明显。

利用圆二色光谱法进一步分析不同 pH 的缓冲溶液对 BmAK 蛋白二级结构的影响,结果如图 6B 所示。从图中可以看出,随着 pH 值的改变,BmAK 圆二色光谱图中  $\alpha$  螺旋结构的特征峰发生了显著的改变。由于  $\beta$  折叠链和无规则卷曲结构的特征峰在 BmAK 的圆二色光谱图中表现不明显,因此,直接利用圆二色光谱研究 pH 对 BmAK 蛋白中  $\beta$  折叠链和无规则卷曲

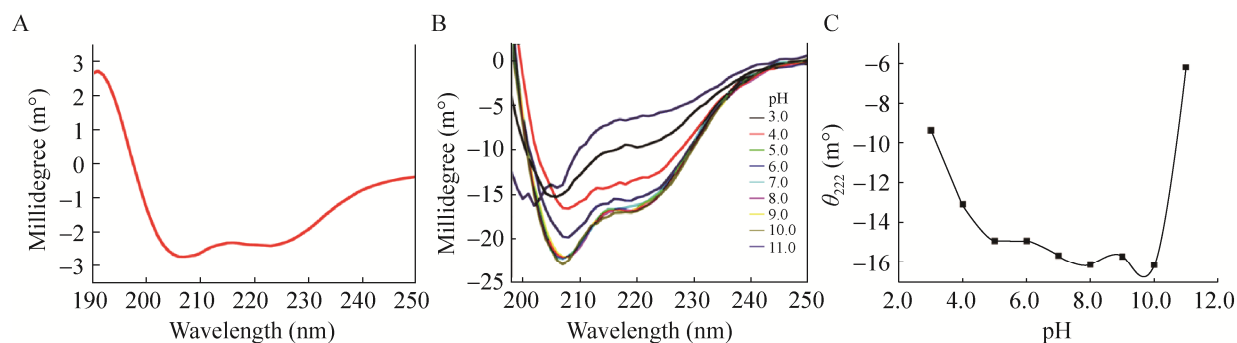


图 6 BmAK 二级结构分析 (A: 圆二色光谱分析 BmAK 二级结构; B: 圆二色光谱分析 pH 对 BmAK 二级结构的影响; C:  $\theta_{222}$  分析 pH 对 BmAK 蛋白  $\alpha$  螺旋结构的影响)

Fig. 6 Analysis of BmAK secondary structures. (A) Analysis of the secondary structure of BmAK by circular dichroism spectroscopy. (B) Analysis of the effects of pH on the secondary structures of BmAK by circular dichroism spectroscopy. (C) Analysis of the effects of pH on the  $\alpha$ -helix structures of BmAK by  $\theta_{222}$ .

结构的影响较为困难,但这并非意味着 pH 值的改变不会影响  $\beta$  折叠链和无规则卷曲结构。本文以 222 nm 处的椭圆度值  $\theta_{222}$  来表征 BmAK 的  $\alpha$  螺旋结构,以  $\theta_{222}$  对不同的 pH 作图,从而反映 pH 对 BmAK 蛋白  $\alpha$  螺旋结构的影响(图 6C)。结果显示, $\theta_{222}$  在 pH 5–10 的缓冲溶液中变化不大,表明在 pH 5–10 的缓冲溶液中,BmAK 蛋白的  $\alpha$  螺旋结构含量相对稳定,基本不受 pH 变化的影响。当 pH<5 时,随着 pH 的下降, $\theta_{222}$  值升高,指示 BmAK 蛋白的  $\alpha$  螺旋结构受 pH 影响,逐渐减少;当 pH>10 时,随着 pH 的升高, $\theta_{222}$  值快速升高,表明在碱性条件下,进一步升高溶液 pH,诱导了 BmAK 蛋白的  $\alpha$  螺旋结构迅速减少。

## 2.7 最适反应温度和热稳定性

在不同的温度下分别检测 BmAK 活性,从而测定其最适反应温度,结果如图 7A 所示。结果显示,大约 30 °C 时 BmAK 的活性最高。当温度低于 30 °C 时,随着温度的升高,BmAK 的活性快速升高,表明温度促进了 BmAK 催化反应的进行;当温度高于 30 °C 时,随着温度的升高,BmAK 的活性逐渐下降,直至 80 °C 时活性降低至最高活性的约 5% 左右。升高温度一方面可以加速 BmAK 催化反应的进行,另一方面也可能引起 BmAK 构象发生变化从而导致活性丧失。从 30 °C 升高温度到 80 °C 的过程中,高温导致的失活效应要比其促进效应显著,从而导致了 BmAK 催化活性的下降。因此,BmAK 的最适反应温度约为 30 °C。

将 BmAK 在不同的温度下孵育 10 min,然后在最适温度下检测其活性,从而分析 BmAK 的热稳定性,结果如图 7B 所示。25 °C 时 BmAK 的活性最高,其次是 20 °C 和 30 °C,分别约为

最高活性的 99.52% 和 98.96%。15 °C 时 BmAK 的活性约为最高活性的 98.32%,5 °C 时 BmAK 的活性约为最高活性的 87.94%,35 °C 和 40 °C 时 BmAK 的活性约为最高活性的 95%。当温度升高到 50 °C 时,BmAK 的活性迅速降至其最高活性的 70% 左右。在 5–25 °C 温度范围内,BmAK 蛋白的结构相对稳定,逐渐升高温度可以促进 BmAK 催化反应的进行,因此在 25 °C 时 BmAK 的活性达到最大值;当温度超过 25 °C 时,进一步升高温度会引起 BmAK 的结构变化,从而导致其活性下降。总体来看,在 15–30 °C 的范围内,BmAK 的活性变化不大,表明其结构在此温度区间相对稳定。

## 2.8 最适反应 pH 和 pH 稳定性

在不同 pH 的溶液中分别检测 BmAK 的活性,从而测定 BmAK 的最适反应 pH,结果如图 8A 所示。pH 7.5 时,BmAK 的活性最高;pH 6.5 时,其活性仅为最高活性的约 25%。随着 pH 值逐渐从 6.5 升高到 7.5,BmAK 的活性逐渐升高;当进一步升高 pH 到 8.0 时,BmAK 的活性降至最高活性的约 65%。这些结果表明,BmAK 的最适反应 pH 为 7.5。

将 BmAK 在不同 pH 的缓冲溶液中孵育 10 min,然后在 pH 7.5 和 30 °C 下分别检测其活性,从而分析 BmAK 在不同 pH 下的稳定性,结果如图 8B 所示。在 pH 7.0,BmAK 具有最高的活性;pH 6.0 时其活性约为最高活性的 30%;随着 pH 从 7.0 升高到 8.0,BmAK 的活性快速下降至其最高活性的约 50%,进一步增加 pH 到 11.0,BmAK 的活性持续下降至其最高活性的约 15%。这些结果表明,pH 对 BmAK 的结构具有一定的影响。在 pH 7.0 左右,BmAK 的结构相对稳定。

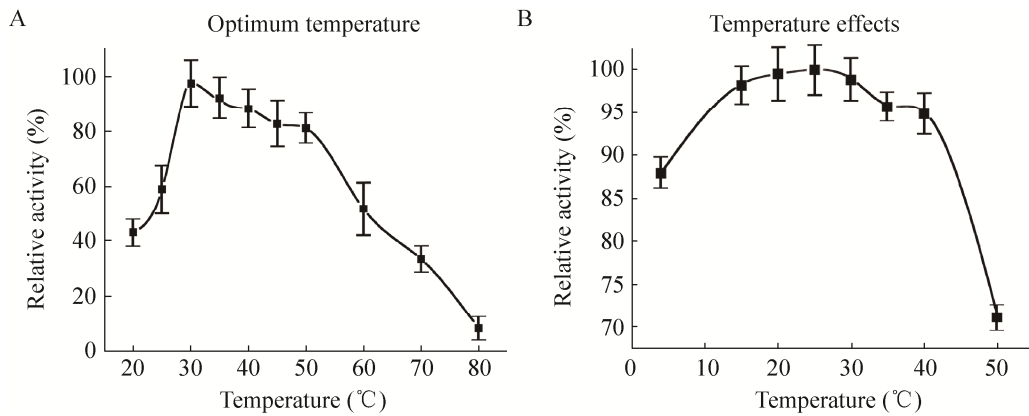


图 7 最适反应温度和热稳定性分析 (A: BmAK 的最适反应温度分析; B: BmAK 的热稳定性分析)

Fig. 7 Analysis of the optimum temperature and thermostability. (A) Analysis of the optimum temperature of BmAK. (B) Analysis of the thermostability of BmAK.

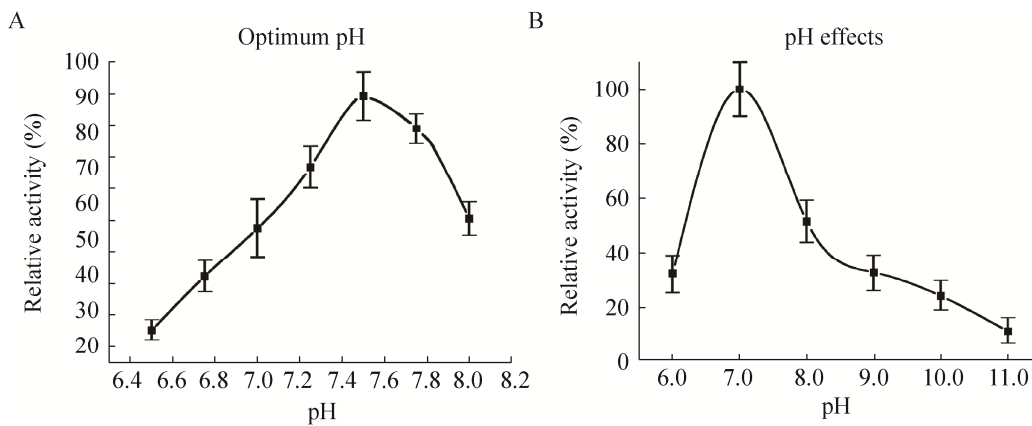


图 8 最适反应 pH 和 pH 稳定性分析 (A: BmAK 的最适反应 pH 分析; B: BmAK 的 pH 稳定性分析)

Fig. 8 Analysis of the optimum pH and pH stability. (A) Analysis of the optimum pH of BmAK. (B) Analysis of the pH stability of BmAK.

### 3 讨论

精氨酸激酶是无脊椎动物体内一类重要的磷酸原激酶,在能量代谢、贮藏和利用方面发挥关键的调控作用。AK 在不同的组织中均有表达,但在能量需求较高的组织中表达尤其显著<sup>[10-14,31-32]</sup>。昆虫是自然界种类和数量最多的无脊椎动物,具有重要的经济和科学研究价值。AK 是参与昆虫能量代谢的关键酶。除参与昆虫肌肉

能量供应,AK 还与昆虫的发育、繁殖、运动、免疫和抗性等有关。当前,AK 的研究主要集中在贝类、虾、螃蟹、海参等动物和锥体虫、线虫等寄生虫。昆虫 AK 的研究主要围绕其 cDNA 序列特征<sup>[10]</sup>、时空表达特征<sup>[9-10,12-14,21-29,31]</sup>、生长发育调控<sup>[11]</sup>、免疫应答<sup>[4,8,15]</sup>和环境适应<sup>[33]</sup>等问题,关于其分子结构和酶学性质则很少涉及<sup>[24,34-35]</sup>。

本研究从 5 龄 3 天家蚕后部丝腺组织中克隆获得了 *BmAK* ORF 序列, 分析了 *BmAK* 基因的染色体定位、基因组 DNA 结构、mRNA 结构及其蛋白二级和三级结构。*BmAK* 包含两个保守的结构域, ATP-胍基磷酸转移酶 N 末端结构域和 ATP-胍基磷酸转移酶结构域, 其中 N 末端结构域由 6 段短  $\alpha$  螺旋结构组成, ATP-胍基磷酸转移酶结构域由多股  $\alpha$  螺旋结构包裹的  $\beta$  片层结构组成。*BmAK* 具有精氨酸激酶共有的活性中心序列 CPTNLGT 及关键的 D61 和 R192 残基<sup>[36-37]</sup>, 与其他昆虫 AK 的氨基酸序列高度相似, 与脊椎动物肌酸激酶的序列也具有较高的同源性, 暗示了它们在体内可能对能量代谢具有相似的调控功能。

原核表达分析显示, *BmAK* 主要在上清中以可溶性蛋白的形式表达, 暗示了其可能折叠形成了正确的空间结构。酶分子折叠形成正确的空间构象对于其催化活性至关重要。酶学活性检测显示重组表达的 *BmAK* 具有良好的催化活性。凝胶过滤层析分析揭示了重组表达的 *BmAK* 在溶液中以单体结构的形式存在, 这与大多数昆虫 AK 的结构一致<sup>[38]</sup>。圆二色光谱分析表明, *BmAK* 蛋白包含有  $\alpha$  螺旋结构, 证实了之前生物信息学预测的结果, 同时也表明重组表达的 *BmAK* 可以折叠形成正确的空间构象。*BmAK* 酶活的最适温度为 30 °C, 最适 pH 为 7.5, 这与家蚕最适饲育温度 22–28 °C 基本一致。在 15–30 °C 范围内, *BmAK* 的活性变化不大 (图 7B), 表明在此温度区间 *BmAK* 的结构相对稳定; 同时, 作为家蚕体内与能量代谢相关的关键酶, *BmAK* 的酶学活性可能不会影响家蚕在 15–30 °C 范围内的生命活动。对比 pH 对 *BmAK* 二级结构 (图 6B) 和酶学活性 (图 8B)

的影响, 可以发现在 pH 5–10 范围内 *BmAK* 的二级结构并没有发生显著的改变, 但 *BmAK* 的酶学活性则改变了很多, 表明在酶分子的结构发生明显改变之前, 其活性中心的构象已经发生了显著的变化, 这与邹承鲁先生之前提出的著名论断“酶活性部位构象变化发生在整体构象变化之前”一致<sup>[39]</sup>。

根据蛋白分子量和结构, 精氨酸激酶一般被分为 3 类: 单亚基、双亚基和四亚基<sup>[22]</sup>。昆虫 AK 多属于单亚基精氨酸激酶, 海参 AK 属于双亚基精氨酸激酶。海参 AK 的 N 末端序列和 W218、W208 残基对其结构稳定性和酶学活性具有至关重要的作用<sup>[40]</sup>。金属离子对 AK 的催化反应非常关键, 不同的离子种类对不同物种的 AK 作用机制也不相同。 $Mn^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  对蝗虫 AK<sup>[16]</sup> 和龙虾 AK<sup>[41]</sup> 的酶活具有激活效应, 而  $Zn^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  则对蝗虫 AK 的酶活具有抑制作用<sup>[16]</sup>。 $Mn^{2+}$  和  $Cu^{2+}$  可以完全抑制凡纳滨对虾 AK 的酶活。这些发现表明尽管精氨酸激酶在进化过程中氨基酸序列高度保守, 但不同的生活环境可能也对不同物种来源的 AK 蛋白结构和酶学活性产生一定的影响。

本研究克隆了家蚕 *BmAK* 基因, 并成功获得了可溶的、具有酶学活性的 *BmAK* 蛋白, 对其蛋白结构和酶学性质开展了初步的研究, 为深入研究其活性位点构象、关键氨基酸残基、激活剂和抑制剂等建立了基础。AK 是无脊椎动物包括鳞翅目昆虫特有的能量代谢相关的关键酶。多数的农林害虫属于鳞翅目昆虫。家蚕是鳞翅目昆虫研究的模式动物。因此, 深入研究 *BmAK* 的结构和酶学性质, 有助于揭示 AK 在鳞翅目昆虫体内的生理功能和调控机制, 从而在此基础上筛选 AK 酶活性抑制剂, 开发以 AK

为害虫防控分子靶标的绿色环保的新型杀虫剂。

## REFERENCES

- [1] Ellington WR. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 289–325.
- [2] Smith E, Morrison JF. Kinetic studies on the arginine kinase reaction. *J Biol Chem*, 1969, 244(15): 4224–4234.
- [3] Hird FJR. The importance of arginine in evolution. *Comp Biochem Physiol B*, 1986, 85(2): 285–288.
- [4] Kang LQ, Shi HF, Liu XY, et al. Arginine kinase is highly expressed in a resistant strain of silkworm (*Bombyx mori*, Lepidoptera): implication of its role in resistance to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Comp Biochem Physiol B*, 2011, 158(3): 230–234.
- [5] Liu Z, Xia L, Wu Y, et al. Identification and characterization of an arginine kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Int Arch Allergy Immunol*, 2009, 150(1): 8–14.
- [6] Pereira CA. Arginine kinase: a potential pharmacological target in trypanosomiasis. *Infect Disord Drug Targets*, 2014, 14(1): 30–36.
- [7] Qin LG, Xia HC, Shi HF, et al. Comparative proteomic analysis reveals that caspase-1 and serine protease may be involved in silkworm resistance to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Proteomics*, 2012, 75(12): 3630–3638.
- [8] Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, et al. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008, 38(12): 1087–1110.
- [9] Zhao J, Cheng TT, Huang LN, et al. Expression profile of arginine kinase from *Helicoverpa armigera*. *J Agric Biotech*, 2016, 24(3): 397–405 (in Chinese).  
赵洁, 程婷婷, 黄丽娜, 等. 棉铃虫精氨酸激酶(AK)的表达规律. *农业生物技术学报*, 2016, 24(3): 397–405.
- [10] Wang HB, Xu YS. cDNA cloning, genomic structure and expression of arginine kinase gene from *Bombyx mori* (L.). *Sci Agric Sin*, 2006, 39(11): 2354–2361 (in Chinese).  
王华兵, 徐豫松. 家蚕精氨酸激酶基因的克隆、基因结构与表达分析. *中国农业科学*, 2006, 39(11): 2354–2361.
- [11] Bao B, Xu WH. Identification of gene expression changes associated with the initiation of diapause in the brain of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *BMC Genomics*, 2011, 12: 224.
- [12] Zhang YC, An SH, Li WZ, et al. Cloning and mRNA expression analysis of arginine kinase gene from *Helicoverpa assulta* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol Sin*, 2011, 54(7): 754–761 (in Chinese).  
张元臣, 安世恒, 李为争, 等. 烟夜蛾精氨酸激酶基因的克隆及 mRNA 表达分析. *昆虫学报*, 2011, 54(7): 754–761.
- [13] Strong SJ, Ellington WR. Isolation and sequence analysis of the gene for arginine kinase from the chelicerate arthropod, *Limulus polyphemus*: insights into catalytically important residues. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1246(2): 197–200.
- [14] Kucharski R, Maleszka R. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey-bee, *Apis mellifera*. *Gene*, 1998, 211(2): 343–349.
- [15] Chen JJ, Xia LX, Liu ZG, et al. Cloning, expression and purification of allergen arginine kinase from *Periplaneta americana* and its allergic activity. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2008, 26(5): 356–360 (in Chinese).  
陈家杰, 夏立新, 刘志刚, 等. 美洲大蠊精氨酸激酶基因的克隆、表达及变应原活性测定. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2008, 26(5): 356–360.
- [16] Zhu WJ. Modification and inhibition of arginine kinase from Locust [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2008 (in Chinese).  
朱雯静. 蝗虫精氨酸激酶的活性中心及其抑制剂研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- [17] Yao CL, Wang ZY, Xiang JH. Structure and function of arginine kinase in crustacean. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2008, 24(3): 203–208 (in

- Chinese).
- 姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 甲壳动物精氨酸激酶的结构与功能. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(3): 203–208.
- [18] Yao CL, Ji PF, Kong P, et al. Preparation of polyclonal antibody and analysis of tissue specific expression of arginine kinase protein in *Litopenaeus vannamei*. J Fish Chin, 2009, 33(6): 1026–1030 (in Chinese).
- 姚翠鸾, 冀培丰, 孔鹏, 等. 凡纳滨对虾精氨酸激酶的多克隆抗体制备及组织特异性表达分析. 水产学报, 2009, 33(6): 1026–1030.
- [19] Kang LQ, Shi HF, Wang N, et al. Cloning, purification and characterization of recombinant silkworm arginine kinase expressed in *Escherichia coli*. Afr J Biotechnol, 2011, 10(36): 7026–7033.
- [20] Su XF. The Expression and regulation of L-arginine kinase in *Helicoverpa Armigera*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agriculture Sciences, 2011 (in Chinese).
- 苏晓峰. 精氨酸激酶在棉铃虫中的表达及调控研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [21] Zhao YY, Wu WF, Wang XD, et al. Protein expression of arginine kinase and Real-time PCR analysis. J Shihezi Univ, 2013, 31(1): 6–9 (in Chinese).
- 赵伊英, 武万峰, 汪小东, 等. 精氨酸激酶基因的蛋白表达及实时荧光定量分析. 石河子大学学报, 2013, 31(1): 6–9.
- [22] Liu TT, Wang XC. Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  on Arginine kinase: activity changes, conformational changes, and aggregation. Mar Sci, 2011, 35(1): 17–21 (in Chinese).
- 刘陶陶, 王希成. 铜离子对海参精氨酸激酶活力与结构的影响. 海洋科学, 2011, 35(1): 17–21.
- [23] Ruan WW, Shen Y, Cao MJ, et al. Cloning and expression of arginine kinase from Mud Crab (*Scylla serrata*). J Jimei Univ: Nat Sci, 2011, 16(5): 346–351 (in Chinese).
- 阮韦伟, 沈苑, 曹敏杰, 等. 锯缘青蟹精氨酸激酶基因的克隆与表达. 集美大学学报: 自然科学版, 2011, 16(5): 346–351.
- [24] Ma CX, Zhang ZC, Li XR, et al. Arginine kinase in *Haemonchus contortus*: cloning, expression and catalytic properties. J Nanjing Agric Univ, 2014, 37(3): 100–106 (in Chinese).
- 马春晓, 张振超, 李祥瑞, 等. 捻转血矛线虫精氨酸激酶基因的克隆与表达及酶活性分析. 南京农业大学学报, 2014, 37(3): 100–106.
- [25] Kumar S, Stecher G, Tamura K. Mega7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [26] Wang YJ, Liu LN, Gao CY, et al. Cloning, expression and characterization of silk gland factor SGF-1 of *Bombyx mori*. Sci Sericult, 2016, 42(2): 219–227 (in Chinese).
- 王叶菁, 刘莉娜, 高春雁, 等. 家蚕丝腺因子 sgf-1 的基因克隆及序列结构和表达特征与亚细胞定位. 蚕业科学, 2016, 42(2): 219–227.
- [27] He HW, Wei SG, Wang YJ, et al. Soluble expression, purification and structural analysis of the bHLH transcription factor Bmsage of *Bombyx mori*. Chin J Biotech, 2016, 32(10): 1395–1407 (in Chinese).
- 何华伟, 位曙光, 王叶菁, 等. 家蚕 bHLH 转录因子 Bmsage 可溶性表达、纯化与结构分析. 生物工程学报, 2016, 32(10): 1395–1407.
- [28] Zhao P, Wang YJ, Wei SG, et al. Interaction of bHLH transcription factor bmdimm and bmchip in *Bombyx mori*. Sci Agric Sin, 2016, 49(10): 2027–2038 (in Chinese).
- 赵朋, 王叶菁, 位曙光, 等. 家蚕 bHLH 转录因子 Bmdimm 与 Bmchip 的相互作用. 中国农业科学, 2016, 49(10): 2027–2038.
- [29] Yu Z, Pan J, Zhou HM. A direct continuous pH-spectrophotometric assay for arginine kinase activity. Protein Pept Lett, 2002, 9(6): 545–552.
- [30] Wang HB, Xu YS. cDNA cloning, genomic structure and expression of arginine kinase gene from *Bombyx mori*. Advanced seminar of sericulture biotechnology and silkworm disease control, selected proceedings of the symposium in silkworm physiology, pathology and biotechnology, 2006, 2354–2361 (in Chinese).
- 王华兵, 徐豫松. 家蚕精氨酸激酶基因的克隆、基因结构与表达分析. “蚕业生物技术与家蚕病害控

- 制”高级研讨班、“家蚕生理、病理和生物技术”学术研讨会论文选集, 2006, 2354–2361.
- [31] Wang YE, Esbensen P, Bentley D. Arginine kinase expression and localization in growth cone migration. *J Neurosci*, 1998, 18(3): 987–998.
- [32] Yao CL, Ji PF, Kong P, et al. Arginine kinase from *litopenaeus vannamei*: cloning, expression and catalytic properties. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(3): 553–558.
- [33] Miranda MR, Canepa GE, Bouvier LA, et al. *Trypanosoma cruzi*: oxidative stress induces arginine kinase expression. *Exp Parasitol*, 2006, 114(4): 341–344.
- [34] Zhang YC, An SH, Yuan GH. Advances in research on arginine kinase in insects. *Chin Bull Entomol*, 2013, 50(2): 533–538 (in Chinese).  
张元臣, 安世恒, 原国辉. 昆虫精氨酸激酶的研究进展. *应用昆虫学报*, 2013, 50(2): 533–538.
- [35] Huang LN, Liu N, Zhao J, et al. The research prospect of arginine kinase. *Life Sci Res*, 2015, 19(5): 452–456 (in Chinese).  
黄丽娜, 刘宁, 赵洁, 等. 精氨酸激酶研究进展. *生命科学研究*, 2015, 19(5): 452–456.
- [36] Takeuchi M, Mizuta C, Uda K, et al. Unique evolution of bivalvia arginine kinases. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(1): 110–117.
- [37] Fujimoto N, Tanaka K, Suzuki T. Amino acid residues 62 and 193 play the key role in regulating the synergism of substrate binding in oyster arginine kinase. *FEBS Lett*, 2005, 579(7): 1688–1692.
- [38] Brown AE, France RM, Grossman SH. Purification and characterization of arginine kinase from the american cockroach (*Periplaneta americana*). *Arch Insect Biochem Physiol*, 2004, 56(2): 51–60.
- [39] Tsou CL. Conformational flexibility of enzyme active sites. *Science*, 1993, 262(5132): 380–381.
- [40] Guo Q, Zhao F, Guo SY, et al. The tryptophane residues of dimeric arginine kinase: roles of trp-208 and trp-218 in active site and conformation stability. *Biochimie*, 2004, 86(6): 379–386.
- [41] Zhou Q, Wu CG, Dong B, et al. Proteomic analysis of acute responses to copper sulfate stress in larvae of the brine shrimp, *Artemia sinica*. *Chin J Oceanol Limnol*, 2010, 28(2): 224–232.

(本文责编 郝丽芳)