

## 高效液相色谱-荧光检测法测定敬钊毒素-I 的磷脂膜结合活性

曾雄智<sup>1</sup>, 皮建辉<sup>1,2</sup>, 梁宋平<sup>1</sup>

(1. 湖南师范大学 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081;  
2. 怀化学院生物工程系, 湖南 怀化 418008)

**摘要** :敬钊毒素-I (JZTX-I)是一种能够抑制心肌钠通道失活的新型蜘蛛神经毒素,该文结合高效液相色谱与色氨酸荧光测定技术研究了JZTX-I的磷脂膜结合活性。脂质体共沉淀实验表明,JZTX-I具有不依赖于带负电荷磷脂组成的生物膜结合活性。当加入由酸性或中性磷脂构成的脂质体后,JZTX-I能够分别产生6.4和4.7 nm的蓝移以及7.4和8.0 nm的红移激发漂移,显示JZTX-I能够插入磷脂膜,同时该分子疏水表面的色氨酸残基处于一个运动受限的界面区域。荧光淬灭实验进一步证实,与脂质体结合能够减少该毒素分子表面色氨酸残基的溶剂暴露。该研究结果为阐明JZTX-I的离子通道门控调节机制提供了新的信息。

**关键词** :高效液相色谱;荧光谱;单层小脂质体;敬钊毒素-I

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2007)06-0825-05 栏目类别 :研究论文

## Determination of Jingzhaotoxin-I Phospholipid Membrane-Binding Activities by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

ZENG Xiongzhi<sup>1</sup>, PI Jianhui<sup>1,2</sup>, LIANG Songping<sup>1</sup>

(1. The Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. Department of Bioengineering, Huaihua College, Huaihua 418008, China)

**Abstract** :Jingzhaotoxin-I (JZTX-I), a 33-residue polypeptide with three disulfide bonds, was a novel spider neurotoxin preferentially inhibiting cardiac sodium channel inactivation. Its activities of phospholipid membrane-binding were studied by a combination of reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) and fluorescence spectroscopy. Small unilamellar vesicles binding assays showed that the partitioning of JZTX-I into lipid bilayer did not require negatively charged phospholipids. Further, JZTX-I also exhibited a blue shift of 6.4 nm or 4.7 nm as well as red-edge excitation shift of 7.4 nm or 8.0 nm in the presence of 75% 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE)/25% 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)](sodium salt)(POPG) or 100% 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) vesicles respectively, suggesting that some tryptophan residues on the hydrophobic surface of the toxin were located within a motion restricted membrane interfacial region. Fluorescence quenching experiments suggested that some tryptophan residues of JZTX-I were positioned within the membrane and protected from aqueous quenching agents. These findings should provide further insight into the molecular mechanism of the channel gating of JZTX-I.

**Key words** : high performance liquid chromatography (HPLC); fluorescence spectroscopy; small unilamellar vesicles; Jingzhaotoxin-I (JZTX-I)

动作电位是可兴奋性细胞或组织进行信号传导的主要方式,其产生和爆发的机制涉及离子通道的开放与关闭。电压门控钠离子通道广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物的中枢以及外周神经系统、骨骼

肌等兴奋性细胞中,控制着动作电位的去极化相,它的活动直接决定了动作电位是否产生与爆发<sup>[1]</sup>。电压门控钠离子通道多为异源多亚基的跨膜糖蛋白,相对分子质量为260~280,通常由一个形成孔

收稿日期 2007-04-17

第一作者:曾雄智,男,博士,E-mail xiongzhi@yaho.com.cn.

通讯联系人:梁宋平,男,教授,博士生导师,Tel (0731)8872556,Fax (0731)8861304,E-mail liangsp@hunnu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金重大项目资助(No.39990600).

道结构的  $\alpha$  亚基和几个小的  $\beta$  辅助亚基组成<sup>[2]</sup>, 含有二型功能域即中央孔域和电压敏感域。中央孔域由跨膜片段 S5-S6 环绕而成, 负责离子的选择性通透, 而电压敏感域由跨膜片段 S1-S4 构成, 通过改变通道构象来响应细胞膜电势的变化。有毒动物如蜘蛛、蝎、蜜蜂、海葵等能够产生各种各样的选择性抑制电压门控离子通道的多肽与蛋白质类神经毒素。其中孔道阻塞毒素如芋螺毒素 G IIIA 通过阻塞离子电导孔的胞外门廊来阻断离子的流动<sup>[3]</sup>, 而与之对应的电压门控调节毒素则是通过结合到离子通道的电压敏感域上来改变离子通道的门控<sup>[4,5]</sup>。目前有几个研究得比较清楚的毒素分子, 实验证实它们都是水溶性的而且能够结合到离子通道暴露在水溶液中的外表面上。例如 Anthopleurin B 是由 49 个氨基酸残基组成的肽类毒素, 能够结合到心肌钠通道第 4 个结构域中跨膜片段 S3-S4 的细胞外连接环上, 从而延缓钠离子通道的失活<sup>[6]</sup>。近来几个令人特别感兴趣的研究显示有几种电压门控调节毒素具有很强的磷脂膜结合活性, 一些学者认为这些毒素有可能是通过插入磷脂膜来接近包埋在脂双层中的通道结合位点的<sup>[7-9]</sup>。这些研究结果与基于古细菌 KvAP 钾通道晶体结构的电压敏感元件结构模型相吻合。例如 hanatoxin 是一种捕鸟蜘蛛毒素, 它通过与电压敏感域中的 S3b 和 S4 跨膜片段作用来抑制 Kv2.1 钾通道。该毒素与磷脂膜的相互作用实验显示 hanatoxin 能够与 Kv2.1 钾通道的电压敏感元件形成非常强且稳定的复合物, 当插入磷脂膜内的时候, hanatoxin 分子处于磷脂膜的界面区域, 而且 hanatoxin 分子上第 30 位的色氨酸残基距离磷脂双层中心约 0.85 nm。这些实验结果可以解释为 hanatoxin 是通过插入磷脂膜接近电压敏感域上的靶位点来调节离子通道的门控的<sup>[10]</sup>。然而, 通过磷脂膜接近电压敏感元件抑制是否是电压门控调节毒素的普遍作用机制还有待更多的实验证明。

敬钊毒素-I (Jingzhaotoxin-I, 简称 JZTX-I) 是从我国特有的珍稀蜘蛛敬钊缨毛蛛 (*Chilobrachys jingzhao*) 毒液中纯化的一种肽类神经毒素, 由 33 个氨基酸残基组成, 是一种典型的抑制剂肽氨基酸结构模体分子。膜片钳电生理实验显示, JZTX-I 是一种电压门控钠通道毒素, 能抑制棉铃虫幼虫神经元细胞和大鼠心肌细胞钠通道的快速失活, 作用方式类似于类  $\alpha$ -蝎毒素, 推测其作用位点很可能是钠通道位点 3, 在器官水平上能显著增加脊椎动物心脏收缩的强度与跳动的速度, 具有开发成强心剂药物的应用前景<sup>[11]</sup>。本论文采用脂质体共沉淀与色谱鉴定技术以及固有色氨酸荧光蓝移、红移激发漂移和

荧光淬灭实验, 研究敬钊毒素-I 与磷脂膜的结合活性, 并相互印证, 为更好地阐明敬钊毒素-I 的作用机制提供了新的信息。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺 (POPE)、棕榈酰油酰磷脂酰甘油 (POPG)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC) 为 Avanti Polar Lipids 公司产品;  $\beta$ -羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、色氨酸购于 Sigma 公司; 乙腈为色谱纯试剂; 其他试剂均为国产分析纯。敬钊毒素-I 和海南毒素-III 从蜘蛛粗毒中分离纯化得到。

### 1.2 脂质体的制备

将一定量溶于氯仿中的磷脂 POPE (10 mg/mL) 与 POPG (10 mg/mL) 按 3:1 涡旋混匀, 用氮气吹干后低温真空冻干过夜, 冻干的磷脂薄膜用正戊烷洗涤、混匀、氮气吹干, 然后悬浮在缓冲溶液 (10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L KCl, pH 7.0) 中, 涡旋混匀。单层小脂质体采用宁波新芝科器研究所生产的超声波细胞粉碎机冰水浴超声至溶液呈透明状即可。超声碎屑使用 Eppendorf 台式离心机离心去除。用磷脂 POPC 制备单层小脂质体的缓冲溶液为 10 mmol/L HEPES, 50 mmol/L KCl (pH 7.0), 磷脂的浓度根据冻干磷脂的重量计算<sup>[12]</sup>。

### 1.3 脂质体共沉淀实验

磷脂膜活性肽与单层小脂质体结合后, 通过超速离心共同沉淀后, 对上清液进行高效液相色谱 (HPLC) 检测, 可以了解活性多肽与磷脂膜的相互作用以及作用的强弱。取 JZTX-I、蝎毒素 BMK M1 和海南毒素-III (HNTX-III) ( $17 \mu\text{mol/L}$  终浓度) 与含量约为 9 mg/mL 的单层小脂质体涡旋振荡混匀后, 于室温孵育 30 min 再进行超离心分离。采用 Beckman SW55 转头, 于 45 000 r/min, 离心 130 min。上清液通过 Waters 公司 Alliance 2690 HPLC 分析系统鉴定毒素肽的残留量。色谱柱为 Phenomenex C18 柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 4  $\mu\text{m}$ ), JZTX-I 的洗脱梯度为 0 ~ 45 min, 体积分数为 20% ~ 35% 乙腈水溶液 (含 0.1% 三氟乙酸 (TFA)); 流速 1.0 mL/min。分别收集洗脱峰, 并利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 测定相对分子质量。

### 1.4 荧光测定

JZTX-I 与磷脂膜的结合作用可通过测定毒素分子中色氨酸残基固有的荧光强度变化来得到。荧光分光光度计为日立 F-4500, 激发波长 291 nm, 发射波长 373 nm, 激发光与发射光窄缝宽 5 nm, 激发偏光镜置于 90°, 而发射偏光镜置于 0°, 光电倍增管

电压为 700 V,比色皿为 3 mm × 3 mm 石英比色皿,发射光谱收集范围为 300 ~ 500 nm,增量为 1 nm。JZTX-I 和色氨酸的浓度分别为 10 μmol/L 和 35 μmol/L,原始数据运用色氨酸参考谱与差减空白脂质体散射谱进行校正。由于脂质体的散射作用是导致荧光强度衰减的主要原因,因此活性多肽荧光强度需要用非结合的色氨酸荧光强度进行校正。校正因子是在相同条件下,从每一个浓度的色氨酸滴定实验计算得到的。其计算公式为<sup>[13]</sup>:

$$I_{\text{peptide}}^{\text{corrected}}([L]) = I_{\text{peptide}}([L]) \frac{I_{\text{Trp}}^{\text{buffer}}}{I_{\text{Trp}}([L])}$$

其中  $I$  表示荧光强度  $[L]$  表示色氨酸的浓度。

#### 1.4.1 蓝移与红移激发漂移分析

蓝移实验是通过在 JZTX-I 溶液中不加或添加脂质体后进行荧光分析实现的,激发波长为 290 nm,发射光谱收集范围为 310 ~ 500 nm;红移激发漂移实验是在 270 nm 至 310 nm 范围内改变激发波长,然后采集在 10 μmol/L JZTX-I 中不加或加入 1.0 mmol/L 75% POPE/25% POPG 或 100% POPC 单层小脂质体后的荧光发射谱。为了简化红移激发漂移的实验结果,可以采用校正谱的最大发射波长对激发波长作图<sup>[14]</sup>。

#### 1.4.2 丙烯酰胺荧光淬灭实验

色氨酸荧光淬灭实验采用滴加 0.4 mol/L 的丙

烯酰胺到混合比例为 1:100 的活性多肽与单层小脂质体混合物(10 μmol/L JZTX-I 与 1 000 μmol/L 脂质体)中进行。根据 Stern-Volmer 方程<sup>[15]</sup>:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q]$$

式中  $[Q]$  是丙烯酰胺的浓度,  $F_0$  和  $F$  是多肽毒素和加入丙烯酰胺后的荧光强度,  $K_{sv}$  是淬灭常数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 脂质体共沉淀实验

当单层小脂质体(用 75% POPE/25% POPG 或 100% POPC 制备)与含有 JZTX-I 的缓冲溶液混合后,通过超速离心发现上清液中几乎不含有 JZTX-I (见图 1-a),这证明 JZTX-I 具有较强的磷脂膜结合活性;同时,实验证明 JZTX-I 也能够与中性磷脂膜共沉淀,表明它与磷脂膜的结合不依赖带负电荷的磷脂。作为对照实验,当东亚钳蝎钠通道位点 3 毒素 BMK M1<sup>[16]</sup>与单层小脂质体混合后进行超速离心,发现不论加入用酸性磷脂(75% POPE/25% POPG)制备的脂质体还是用中性磷脂(100% POPC)制备的脂质体,均能在超速离心的上清液中发现几乎等量的蝎毒肽 BMK M1 (见图 1-b),表明 BMK M1 没有磷脂膜结合活性。国际知名学者 Smith 等<sup>[9]</sup>也曾报道过蝎毒钠通道位点 3 毒素没有

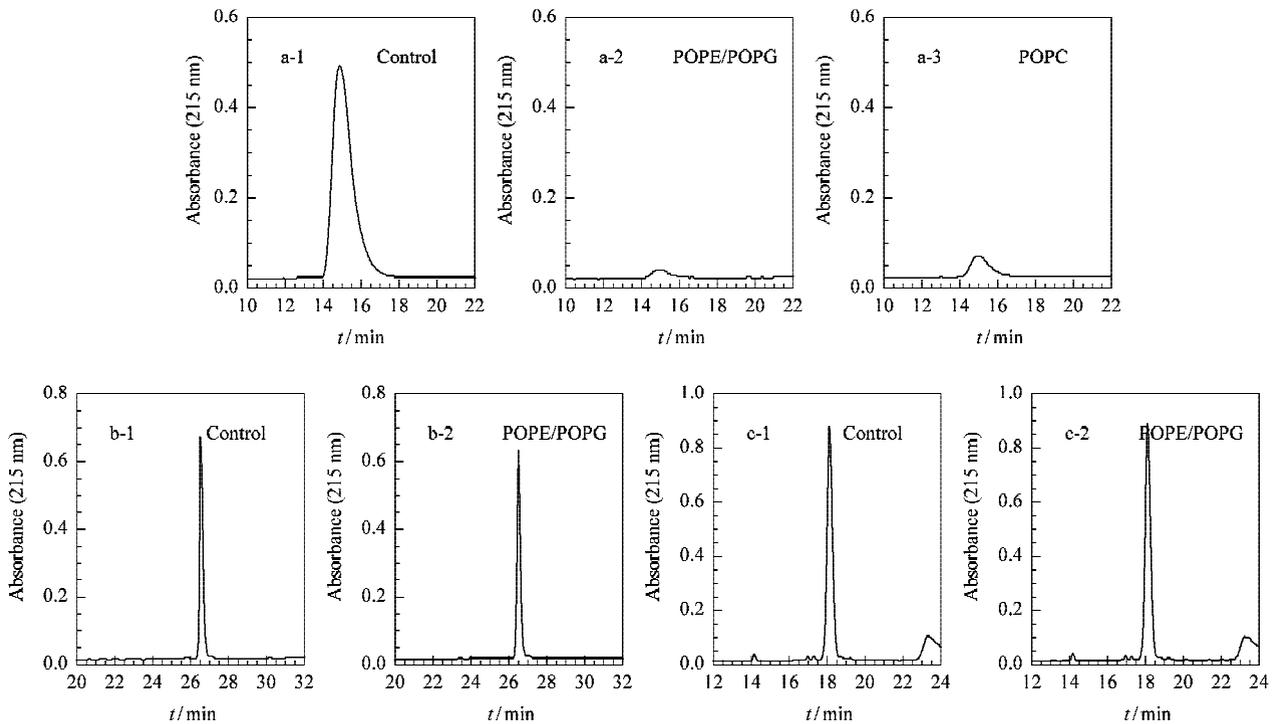


图 1 (a) JZTX-I、(b) 蝎毒素 BMK M1 和 (c) 海南毒素-III 与磷脂膜结合实验的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of (a) JZTX-I, (b) BMK M1 and (c) Hainantoxin-III binding to lipid membranes

a. JZTX-I in the supernatant (a-1) in the absence of lipid membranes or (a-2) after addition of 75% POPE/25% POPG vesicles or (a-3) 100% POPC vesicles. b. BMK M1 in the supernatant (b-1) in the absence of lipid membranes or (b-2) after mixing with 75% POPE/25% POPG vesicles. c. Hainantoxin-III in the supernatant (c-1) in the absence of lipid membranes or (c-2) after mixing with 75% POPE/25% POPG vesicles.

磷脂膜结合活性,而位点 4 毒素有。荧光测定实验显示类  $\alpha$ -毒素 BMK M1 与脂质体之间的确没有相互作用,但它的作用位点是在钠通道膜外的位点 3 上。海南毒素-III 是一个与敬钊毒素-I 分子大小相似的河豚毒素敏感型钠通道抑制剂,其作用位点可能是钠通道位点 1,通过孔道阻塞的方式抑制钠电流<sup>[17]</sup>。脂质体共沉淀实验证实海南毒素-III 分子与磷脂膜没有任何结合活性(图 1-c),研究结果与国际著名学者 Lee 和 MacKinnon<sup>[7]</sup>有关孔道阻塞毒素 AgTx2 没有磷脂膜结合活性的报道相吻合。

### 2.2 荧光测定

我们利用色氨酸的固有荧光来研究 JZTX-I 与磷脂膜的结合特性。JZTX-I 含有 3 个色氨酸残基,根据 JZTX-I 的核磁共振结构研究,发现它们均处于分子的表面。当单层小脂质体(75% POPE/25% POPG 或 100% POPC)加入到 JZTX-I 溶液中并混匀后,由于色氨酸残基由溶液转入到一个疏水环境中而导致 JZTX-I 的荧光谱出现 6.4 nm 或 4.7 nm 的蓝移而且荧光强度大大增加(图 2-a, b)。图 2-c 显示当溶液中的游离两性色氨酸加入脂质体后,荧光谱几乎没有改变。因为色氨酸分子本身并不能穿透磷脂膜,它必须由折叠蛋白质携带才能进入磷脂膜。作为对照实验,在钠通道位点 3 毒素 BMK M1

溶液中加入由磷脂 75% POPE/25% POPG 或是 100% POPC 制备的脂质体,其荧光谱既没有蓝移,也没有出现荧光增强的现象。可以推测钠通道位点 3 毒素 BMK M1 未能进入脂双层。图 3 是 JZTX-I 的相对荧光强度随脂质体浓度的变化曲线。实验显示 JZTX-I 的相对荧光强度在酸性磷脂中比在中性磷脂中更易达到稳定。

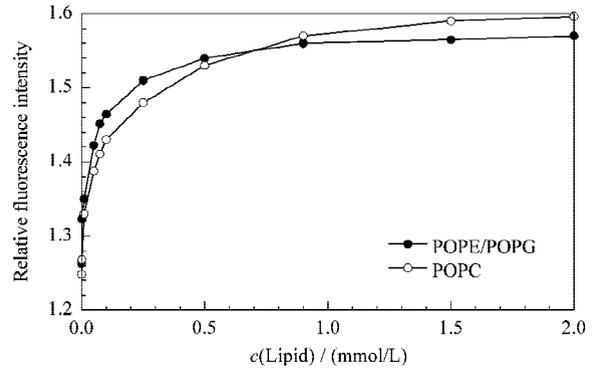


图 3 JZTX-I 与磷脂膜的结合曲线

Fig. 3 Membrane-partitioning curve of JZTX-I

Relative fluorescence intensity is plotted against average lipid concentration ( $n = 3$ ). Relative fluorescence intensity equals to the rate of the fluorescence intensity of the peptide in the presence and absence of 75% POPE/25% POPG and 100% POPC vesicles with different lipid concentrations.

为了进一步研究 JZTX-I 与磷脂膜的相互作用,我们应用了红移激发漂移分析。图 4-a 显示了 JZTX-I 分子固有荧光最大发射波长与激发波长的变化曲线。当加入由 75% POPE/25% POPG 制备的脂质体时, JZTX-I 的最大发射波长从 364.4 nm 变成 371.8 nm,相当于产生了 7.4 nm 的红移激发漂移。而加入由 100% POPC 制备的中性脂质体时, JZTX-I 的最大发射波长从 365.2 nm 变成 373.2 nm,相当于产生了 8.0 nm 的红移激发漂移。红移激发漂移实验结果显示,当有磷脂膜存在时, JZTX-I 分子上的色氨酸残基处于一个运动限制的环境中。因为丙烯酰胺分子具有不易插入磷脂膜的优点,所以可以使用水溶性的荧光淬灭剂丙烯酰胺检测磷脂膜有效屏蔽 JZTX-I 分子上色氨酸残基的荧光淬灭能力。丙烯酰胺淬灭色氨酸荧光的 Stern-Volmer 图是在 JZTX-I 与脂质体混合体系中构建的(图 4-b)。伴随着丙烯酰胺的加入, JZTX-I 的荧光强度以浓度依赖的方式进行衰减。丙烯酰胺对 JZTX-I 荧光的淬灭曲线呈良好的直线关系,而荧光的淬灭程度在加入 100% POPC 的脂质体时比加入 75% POPE/25% POPG 脂质体时更大。这些实验结果显示 JZTX-I 与脂质体的相互作用伴随着毒素分子疏水表面上的色氨酸残基在水溶液中的暴露减少,同时也说明 JZTX-I 与磷脂膜的结合不依赖带负电荷的磷脂。

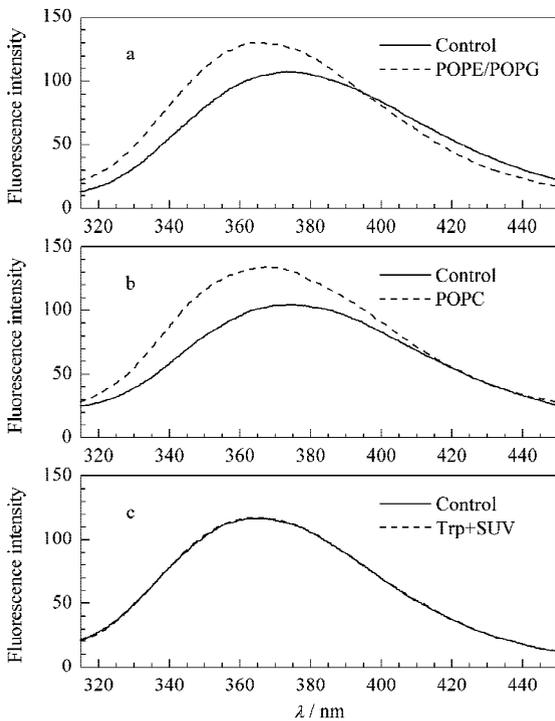


图 2 JZTX-I 与脂质体相互作用的荧光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra of JZTX-I interacting with vesicles

a, b. Spectra of JZTX-I in the presence and absence of (a) 75% POPE/25% POPG and (b) 100% POPC vesicles, respectively. c. Spectra of free tryptophan in the presence and absence of 75% POPE/25% POPG vesicles.

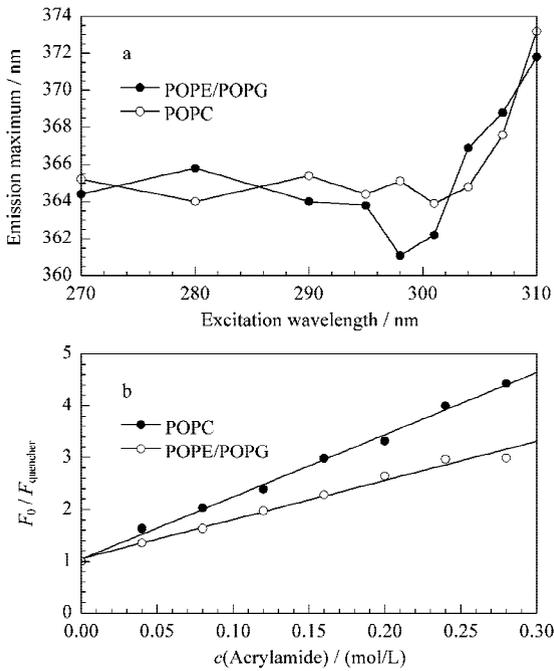


图 4 JZTX-I 与磷脂膜的相互作用

Fig. 4 Interaction between JZTX-I and phospholipid membranes

a. Red-edge excitation shift analysis of JZTX-I in the presence of 100% POPC or 75% POPE/25% POPG vesicles.

b. Stern-Volmer plots for the quenching of tryptophan fluorescence of JZTX-I by an aqueous quencher, acrylamide, in the presence of 100% POPC or 75% POPE/25% POPG membranes.

## 2.3 讨论

JZTX-I 是一个疏水性非常强的 33 肽毒素, 富含非极性氨基酸残基, 而极性氨基酸残基只含有 3 个碱性残基( Lys ), 1 个酸性残基 Glu 和 1 个中性丝氨酸残基。鉴于 JZTX-I 的强疏水性和较强的磷脂膜结合活性, 推测 JZTX-I 的作用机制可能与目前报道的钠通道位点 3 毒素不同。众所周知, 钠通道受体位点 3 是一段由 13 ~ 15 个氨基酸残基构成的短肽, 位于钠通道蛋白质  $\alpha$  亚基第四结构域 S3 与 S4 跨膜螺旋的细胞外连接环上, 当毒素结合于此位点时, 能够阻止  $D_{IV}$ -S4 电压敏感元件的移动, 从而去除通道激活和失活之间的相互耦联。通道决定簇显示 3 个带电荷的氨基酸残基( Glu<sup>1613</sup>, Glu<sup>1616</sup> 和 Lys<sup>1617</sup> )特别是 Glu<sup>1613</sup> 在结合毒素肽上起关键作用。研究发现许多  $\alpha$ -蝎毒素与钠通道蛋白的共价结合位点是在  $\alpha$  亚基第四重复区连接 S3 和 S4 的膜外环区, 而钠通道位点 3 的分布区域最初也正是利用这些毒素来加以确证的。Goudet 等<sup>[16]</sup>和 Sun<sup>[18]</sup>等证明  $\alpha$ -蝎毒素 BMK M1 分子中极为保守的芳香族氨基酸对影响钠通道功能也至关重要。Szeto 等<sup>[19]</sup>曾经报道, 澳洲漏斗网蛛钠通道毒素  $\delta$ -ACTX-Hv1a 分子上 3 个氨基酸残基 Lys<sup>3</sup>, Arg<sup>5</sup> 和 Asp<sup>15</sup> 是作用于受体位点 3 的关键残基。而进一步的序列分析也

显示, 神经元河豚毒素敏感型钠通道上的氨基酸残基 Glu<sup>1613</sup> 和 Lys<sup>1617</sup> 在心肌钠通道亚型上也是高度保守的( Asp<sup>1612</sup> 和 Lys<sup>1616</sup> )。综合磷脂膜结合实验与以前报道过的电生理实验结果推测 JZTX-I 分子有可能是通过其分子表面的疏水性氨基酸残基插入磷脂膜将毒素分子锚定在细胞膜上, 同时利用该分子表面上带电荷的氨基酸残基如 Lys<sup>8</sup>、Glu<sup>11</sup>、Lys<sup>13</sup> 和 Lys<sup>23</sup>, 与心肌钠通道位点 3 上的 Asp<sup>1612</sup> 和 Lys<sup>1616</sup> 等残基作用, 通过抑制钠通道电压敏感元件 S4 的跨膜移动, 从而延缓钠通道的失活, 这可以通过设计进一步的实验加以证实。如可以将心肌钠通道上的氨基酸残基 Asp<sup>1612</sup> 和 Lys<sup>1616</sup> 突变成 Ala, 并在爪蟾卵母细胞上表达这两个离子通道的突变体, 通过电生理实验可以确认心肌钠通道上的 Asp<sup>1612</sup> 和 Lys<sup>1616</sup> 是否是 JZTX-I 的作用位点, 为进一步从分子水平上阐明 JZTX-I 作用于心肌钠离子通道的门控调节机制提供科学依据。

## 参考文献:

- [ 1 ] Vais H, Williamson M S, Goodson S J, Devonshire A L, Warmke J W, Usherwood P N R, Cohen C J. *J Gen Physiol*, 2000, 115 : 305
- [ 2 ] Catterall W A. *Neuron*, 2000, 26 : 13
- [ 3 ] Cummins T R, Aglieco F, Dib-Hajj S D. *Mol Pharmacol*, 2002, 61 : 1 192
- [ 4 ] Middleton R E, Warren V A, Kraus R L, Hwang J C, Liu C J, Dai G, Brochu R M, Kohler M G, Gao Y D, Garsky V M, et al. *Biochemistry*, 2002, 41 : 14 734
- [ 5 ] Takahashi H, Kim J I, Min H J, Sato K, Swartz K J, Shimada I. *J Mol Biol*, 2000, 297 : 771
- [ 6 ] Benzinger G R, Kyle J W, Blumenthal K M, Hanck D A. *J Biol Chem*, 1998, 273 : 80
- [ 7 ] Lee S Y, MacKinnon R. *Nature*, 2004, 430 : 232
- [ 8 ] Suchyna T M, Tape S E, Koeppe R E, Andersen O S, Sachs F, Gottlieb P A. *Nature*, 2004, 430 : 235
- [ 9 ] Smith J J, Alphy S, Seibert A L, Blumenthal K M. *J Biol Chem*, 2005, 280 : 11 127
- [ 10 ] Phillips L R, Milescu M, Li-Smerin Y Y, Mindell J A, Kim J I, Swartz K J. *Nature*, 2005, 436 : 857
- [ 11 ] Xiao Y C, Tang J Z, Hu W J, Xie J Y, Maertens C, Tytgat J, Liang S P. *J Biol Chem*, 2005, 280( 13 ) : 12 069
- [ 12 ] Wieprecht T, Apostolov O, Seelig J. *Biophys Chem*, 2000, 85 : 187
- [ 13 ] Ladokhin A S, Jayasinghe S, White S H. *Anal Biochem*, 2000, 285 : 235
- [ 14 ] Falls L A, Furie B C, Jacobs M, Furie B, Rigby A C. *J Biol Chem*, 2001, 276 : 23 895
- [ 15 ] Jung H J, Lee J Y, Kim S H, Eu Y J, Shin S Y, Milescu M, Swartz K J, Kim J I. *Biochemistry*, 2005, 44 : 6 015
- [ 16 ] Goudet C, Huys I, Clynen E, Schoofs L, Wang D C, Waelkens E, Tytgat J. *FEBS Letters*, 2001, 495 : 61
- [ 17 ] Xiao Y C, Liang S P. *Eur J Pharmacol*, 2003, 477 : 1
- [ 18 ] Sun Y M, Bosmans F, Zhu R H, Goudet C, Xiong Y M, Tytgat J, Wang D C. *J Biol Chem*, 2003, 278( 26 ) : 24 125
- [ 19 ] Szeto T H, Birinyi-Strachan L C, Smith R, Connor M, Christie M J, King G F, Nicholson G M. *FEBS Lett*, 2000, 470 : 293