

# 小鼠 *Fyn* 及其多种突变体的载体构建和蛋白生物活性预测分析

安磊, 黄映雪, 胡新德, 张伟, 闫宇华, 陈树林, 赵善廷\*

(西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 旨在构建小鼠 *Fyn* 及其多种突变体真核表达载体, 预测突变后的蛋白质二级结构和功能改变。克隆小鼠大脑皮质的 *Fyn* 基因, 构建克隆质粒 pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup>, 经测序验证后, 以 pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup> 为模板, 针对不同突变位点设计引物, 构建不同突变体克隆质粒并验证, 将 *Fyn* 不同的突变体克隆至真核表达载体 pCAG-MCS, 构建真核表达载体 pCAG-MCS-*Fyn*<sup>\*\*</sup>, 将表达载体转染细胞进行检测, 并对其进行生物信息学分析。测序结果显示 pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup> 核苷酸序列正确率 100%, 突变体完全达到预期设计; pCAG-MCS-*Fyn*<sup>\*\*</sup> 转染细胞后 *Fyn*<sup>\*\*</sup> 表达量明显升高 ( $P < 0.01$ )。结果表明, *Fyn* 突变体蛋白质的二级结构与野型相比有很大改变, 可能影响其生物活性。

**关键词:** *Fyn*; 载体构建; 突变体; 生物活性

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)04-0635-07

## Construction of Vectors with Mouse *Fyn* and Its Different Mutants and Functional Prediction Analysis of Their Protein Products

AN Lei, HUANG Ying-xue, HU Xin-de, ZHANG Wei, YAN Yu-hua,

CHEN Shu-lin, ZHAO Shan-ting\*

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Eukaryotic expression vectors of mouse *Fyn* and its different mutants were constructed. Structural and functional changes of their protein products were predicted. *Fyn* cDNA from mouse cerebral cortex was cloned and subcloned into pMD18-T. Validated pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup> was used as template to construct clone plasmids of different mutants using different primers. The validated *Fyn*<sup>wt</sup> and its different mutants were cloned into pCAG-MCS to get the eukaryotic expression vector pCAG-MCS-*Fyn*<sup>\*\*</sup>. Characteristics of their bioinformatics were analyzed. The complete sequence showed that the cDNA sequence of *Fyn*<sup>wt</sup> is identical with that in GenBank. The fragments of *Fyn* mutants have fully acquired as expectation. The relative expression level of multiple *Fyn* in cell rised obviously ( $P < 0.01$ ). Bioinformatics analysis showed that the secondary structure of protein products of *Fyn* mutants changed remarkably by comparison with that of *Fyn*<sup>wt</sup>, which may influence the bioactivity of *Fyn*.

**Key words:** *Fyn*; vector construction; mutant; bioactivity

*Fyn* 蛋白通过各种受体, 参与体内众多信号转导途径, 被认为是参与神经元迁移的因子之一, 对肺鳞状细胞癌<sup>[1]</sup> 以及阿尔茨海默疾病 (Alzheimer's

disease, AD) 引起的突触缺失和神经毒性有着一定的影响<sup>[2]</sup>, 在学习记忆的过程中也发挥重要作用。因此研究 *Fyn* 的不同构型对细胞和机体功能的影

收稿日期: 2012-09-03

基金项目: 西北农林科技大学人才引进专项基金(Z111021101); 国家高技术研究发展计划(863 计划) (2011AA10A208)

作者简介: 安磊(1984-), 男, 河南许昌人, 博士研究生, 主要从事分子神经生物学研究, E-mail: anlei1344@163.com

\* 通信作者: 赵善廷, 博导, 教授, E-mail: zhaoshanting@nwsuaf.edu.cn

响可以为阐明神经元迁移的分子机制以及疾病的预防、药物的研制提供一定的参考和思路。

Fyn 的分子结构从 N 端到 C 端依次是 SH3 结构域、SH2 结构域和蛋白激酶结构域(TyrKc)。通过折叠动力学分析,即使是普通电子密度也会产生显著的蛋白折叠动力学效应。Fyn 的 SH3 结构域包含 5 个互变的氨基酸,其互变优化的表面形成电子互作的多样性。其结构稳定性是因为在折叠区有 1 个八倍体折叠域,而其单个氨基酸的电子互作则使结构更趋稳定<sup>[3]</sup>,这和通常所理解的折叠稳定性不同,这说明,和折叠态相比,过渡态的电子互作不明显。TyrKc 起着酪氨酸激酶及蛋白质磷酸化作用,在绝大多数的细胞活动中扮演着关键的角色,是一种介导蛋白激酶磷酸化蛋白和钙调蛋白的可逆性区域。Fyn 与某些转录因子的转录调控有密切的关系,这些转录因子是不同的信号途径的重要组分,研究表明大脑中的 Fyn 在体外能引起 Dab1 的 Y185、Y198/200 和 Y232 位点磷酸化<sup>[4]</sup>,同时这种磷酸化修饰表现出组织器官的差异性,譬如在肝脏中,Dab1 被 Fyn 磷酸化的位点仅发生在 Y185 和 Y197。

基因定点突变可通过重叠延伸 PCR、普通质粒 PCR、TALEN 技术等方法对目的 DNA 引入所需突变位点,包括碱基的添加、删除、点突变等,可以同时突变一个或多个位点。定点突变能迅速、高效地改变 DNA 所表达的目的蛋白的性状及表征。本研究从小鼠大脑皮质中克隆 Fyn 基因,构建不同突变体(表 1)的真核表达载体 pCAG-MCS-Fyn\*\* 并转染 CHO 细胞,探讨小鼠不同 Fyn 构型的二级结构以及氨基酸活性,为进一步研究 Fyn 在细胞骨架重排和神经元迁移的作用及分子机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

内切酶 EcoRI、Sal I、T4 DNA 连接酶、质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购自 Promega 公司;pMD18-T、SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II Kit 和 MutanBEST Kit 购自 TaKaRa 公司;CHO 细胞系、pCAG-MCS 和 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细菌为本实验室保存;引物合成及测序由南京金斯瑞生物技术有限公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠大脑皮质扩增 Fyn 基因 根据 NC-

BI 上公布的小鼠 Fyn 基因序列(GenBank Accession NM\_001122893.1),使用 Primer5.0 软件设计 1 对特异性引物(表 2),PCR 扩增片段为 1 614 bp,覆盖 Fyn 编码区。

表 1 Fyn 的不同突变型

Table 1 The Fyn mutants

名称 Name	说明 Description
Fyn <sup>wt</sup>	小鼠 Fyn 基因
Fyn <sup>2</sup>	G2A 突变,检测豆蔻酰化位点
Fyn <sup>3</sup>	C3S 突变,检测棕榈酰化位点
Fyn <sup>7</sup>	K7A 突变,检测甲基化位点
Fyn <sup>7/9</sup>	K7A 和 K9A 双突变,检测甲基化位点
Fyn <sup>SH3</sup>	P134L 突变,灭活 SH3 区
Fyn <sup>SH2</sup>	R176A 突变,灭活 SH2 区
Fyn <sup>SH2/SH3</sup>	R176A/P134L 双突变,灭活 SH2、SH3 区
Fyn <sup>259</sup>	基因缺失,不含蛋白激酶区,包含前 259 个氨基酸
Fyn <sup>DN</sup>	K299A 突变,激酶致死性突变
Fyn <sup>390</sup>	D390A 突变,检测酪氨酸蛋白激酶位点
Fyn <sup>CA</sup>	Y531F 突变,持续性激活突变

### 1.2.2 克隆质粒 pMD18-T-Fyn<sup>wt</sup> 的构建与鉴定

PCR 产物用 DNA 凝胶回收试剂盒回收,将回收产物与 pMD18-T 载体连接,并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑选阳性克隆经 PCR 和酶切鉴定,命名为 pMD18-T-Fyn<sup>wt</sup>,送金斯瑞生物技术有限公司测序。

### 1.2.3 突变体 pMD18-T-Fyn\*\* 的构建与鉴定

以测序正确的克隆质粒 pMD18-T-Fyn<sup>wt</sup> 作为模板,设计点突变引物(表 2),通过 PCR 定点突变的方法进行突变程序(其中 pMD18-T-Fyn<sup>SH2/SH3</sup> 双突变选择 pMD18-T-Fyn<sup>SH2</sup> 作为模板,以 pMD18-T-Fyn<sup>SH3</sup> 的引物进行点突变),PCR 反应参数:94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 5 min,循环 30 次,对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶回收;产物继续 Blunting Kination 反应,反应条件:DNA 片段 17  $\mu$ L,10  $\times$  Blunting kination Buffer 2  $\mu$ L,Enzyme Mix 1  $\mu$ L,37 °C 10 min,70 °C 10 min;取 5  $\mu$ L 上一步反应液和 ligation Solution I 16 °C 混合 1 h;连接产物经氯化钙法转化入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细菌,转化的菌液涂布于含 100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 卡那霉素的 LB 平板上培养,挑取单克隆摇菌,将获得的阳性克隆质粒(命名为 pMD18-T-Fyn\*\*)送金斯瑞生物技术有限公司测序。

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Sequence of PCR primers

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物长度/bp Product length	退火温度/°C T <sub>m</sub>
<i>Fyn</i> <sup>wt</sup>	F:CGGAATTCATGGGCTGTGTGCAA R:ACGCGTCGACTCACAGGTTTTACCG	1 614	56
<i>Fyn</i> <sup>2</sup>	F:CGGAATTCATG <u>GCCTGTGTGCAATGTAAG</u> R:ACGCGTCGACTCACAGGTTTTACCG	1 614	56
<i>Fyn</i> <sup>3</sup>	F:CGGAATTCATGGGC <u>TCTGTGCAATGTAAG</u> R:ACGCGTCGACTCACAGGTTTTACCG	1 614	56
<i>Fyn</i> <sup>7</sup>	F:CGGAATTCATGGGCTGTGTGCAATGT <u>GCGGATAAAGAAGCAGCG</u> R:ACGCGTCGACTCACAGGTTTTACCG	1 614	56
<i>Fyn</i> <sup>7/9</sup>	F:CGGAATTCATGGGCTGTGTGCAATGT <u>GCGGAT</u> <u>GCAGAAGCAGCG</u> R:ACGCGTCGACTCACAGGTTTTACCG	1 614	56
<i>Fyn</i> <sup>SH3</sup>	F:CTTATC <u>GCCGAGAGCGAAACC</u> R:AAAGGTACCTCTTGGGTTTC	4 300	55
<i>Fyn</i> <sup>SH2</sup>	F:TACATT <u>CTCAGCAATTACG</u> R:ACCAGTTTCCCCGGTTGTC	4 300	55
<i>Fyn</i> <sup>259</sup>	F:CGGAATTCATGGGCTGTGTGCAA R:ACGCGTCGACTCATTGACAGACAGATCG	780	54
<i>Fyn</i> <sup>390</sup>	F:CACAGA <u>GCTCTGCGATCAGCAAAC</u> R:GATATAATTCATGCGCTCGAT	4 300	55
<i>Fyn</i> <sup>DN</sup>	F:GCCATA <u>GCGACCCCTAAGCC</u> R:TACTTTTGTATTTCCATTCC	4 300	55
<i>Fyn</i> <sup>CA</sup>	F:CGGAATTCATGGGCTGTGTGCAA R:ACGCGTCGACTCACAGGTTTTACCGGGCTG <u>AAACTGGGGCTCT</u>	1 614	56
<i>Fyn</i> frag- ment	F: CACAGACCCACCCCTCA R: CCGTCCGTGCTTCATAGT	200	60
<i>βactin</i>	F:TCCCTGGAGAAGAGCTACGA R:AGCACTGTGTTGGCGTACAG	194	60
<i>GAPDH</i>	F:AGCGAGACCCCACTAACA R:ATGAGCCCTTCCACAATG	289	55

下划线为突变位点, *Fyn*<sup>\*\*</sup> 表示 *Fyn* 不同构型, 上标数字或字母含义见表 1, 下同

The mutants were Underlined and *Fyn*<sup>\*\*</sup> means different type, the explanation of number and letter was seen the Table 1. The same as below

1.2.4 真核表达载体的构建与鉴定 将测序正确的 12 个阳性重组克隆质粒 pMD18-T-*Fyn*<sup>\*\*</sup> 经

*EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后克隆入 pCAG-MCS, 构建真核表达载体 pCAG-MCS-*Fyn*<sup>\*\*</sup>。将重组质粒转

染 CHO 细胞。试验分为 B 组(空白对照组)、C 组(转染空质粒)和 F 组(转染重组质粒)。分别以 B、C、F 组细胞的 mRNA 为模板,RT-PCR 得到的 cDNA 并克隆 *Fyn* 基因,分析 *Fyn* 的不同突变体在细胞内的表达。

### 1.2.5 RT-qPCR 检测 *Fyn*<sup>\*\*</sup> 表达量的变化

RT-qPCR 反应采用 15  $\mu$ L 体系,包括:SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 7.5  $\mu$ L、水 3.5  $\mu$ L、上下游引物各 0.5  $\mu$ L(10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)、模板 3  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环反应,利用伯乐公司的 CFX96 进行检测。以  $\beta$ -actin 为内参基因,2 <sup>$\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算各基因表达的相对差异倍数, $\Delta\Delta$ Ct = (Ct<sub>目标基因</sub> - Ct <sub>$\beta$ -actin</sub>)<sub>试验组</sub> - (Ct<sub>目标基因</sub> - Ct <sub>$\beta$ -actin</sub>)<sub>对照组</sub>。试验结果用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,试验数据以 SPSS Statistics 18.0 软件 One-way ANOVA 进行分析与显著性检验,并用 Duncan 法

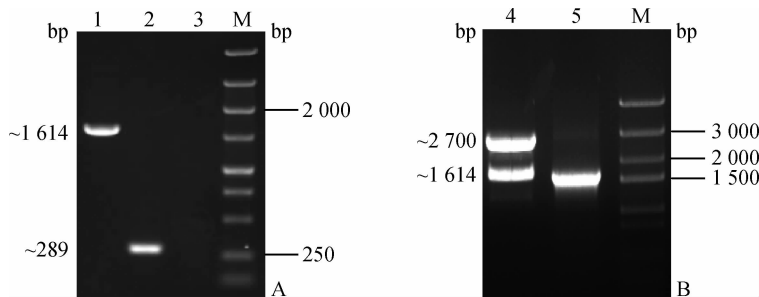
进行多重比较, $P < 0.05$  表示差异显著, $P < 0.01$  表示差异极显著。

1.2.6 *Fyn* 野型与突变体的生物信息分析 将突变体的氨基酸序列使用 Lasergene 软件进行蛋白质的二级结构分析,以 *Fyn* 野型为参比对照,分别采用 Chou Fasman 法和 Garnier Robson 法预测蛋白质的二级结构,Emini 法预测蛋白质的表面可能性。

## 2 结果

### 2.1 质粒 pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup> 的构建与鉴定

以 RT-PCR 得到的 cDNA 为模板,PCR 结果可见 *GAPDH* 和 *Fyn* 的产物(图 1A),构建 *Fyn* 克隆载体 pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup>,PCR 和酶切鉴定(图 1B),测序结果正确率为 100%。



A. *GAPDH* 和 *Fyn* PCR 产物; B. pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup> 克隆鉴定; 1. RT-PCR 脑 *Fyn* 产物; 2. *GAPDH* RT-PCR 产物; 3. 空白对照; 4. pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup> 酶切产物; 5. pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup> PCR 产物; M. DNA 相对分子质量标准

Fig. A. Agarose gel electrophoresis of *GAPDH* and *Fyn*; Fig. B. Clone and identification of pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup>; 1. PCR products of *Fyn* from brain; 2. PCR products of *GAPDH*; 3. The blank as control; 4. Appraisal of pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup> restriction enzyme digestions; 5. PCR products of pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup>; M. DNA marker

### 图 1 pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup> 克隆载体构建

Fig. 1 The construction of clone plasmid pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup>

### 2.2 突变质粒 pMD18-T-*Fyn*<sup>\*\*</sup> 的构建与鉴定

以 pMD18-T-*Fyn*<sup>wt</sup> 为模板,突变引物 PCR 扩增后的产物见图 2A。pMD18-T-*Fyn*<sup>\*\*</sup> 经 *Eco*R I 与 *Sal* I 双酶切电泳见图 2B。测序证明 pMD18-T-*Fyn*<sup>\*\*</sup> 中插入的小鼠 *Fyn* 基因完全符合试验设计。

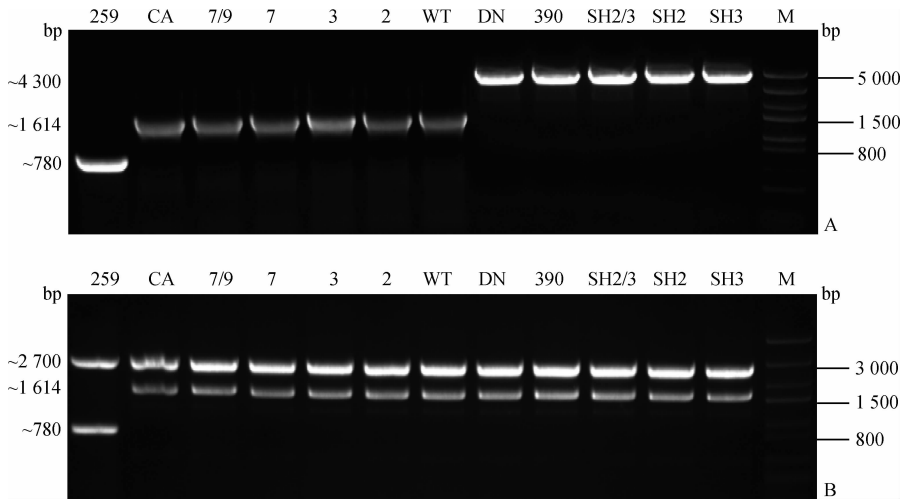
### 2.3 重组质粒 pCAG-MCS-*Fyn*<sup>\*\*</sup> 的构建与鉴定

将构建的克隆质粒 pMD18-T-*Fyn*<sup>\*\*</sup> 采用 *Eco*R I 与 *Sal* I 双酶切,回收片段并克隆入真核载体 pCAG-MCS,构建 *Fyn* 不同构型的真核表达载体 pCAG-MCS-*Fyn*<sup>\*\*</sup>,并通过 PCR 和酶切验证,结果完全符合预期设计,*Fyn* 正确插入目的载体(图 3);将重组质粒转染 CHO 细胞后,RT-qPCR 检测

结果显示(图 4),*Fyn* 不同突变体在 mRNA 水平上较 B、C 组表达量明显增高( $P < 0.01$ ),这说明 *Fyn*<sup>\*\*</sup> 的重组质粒在 mRNA 水平得到了表达。

### 2.4 *Fyn* 野型与突变体的生物信息分析

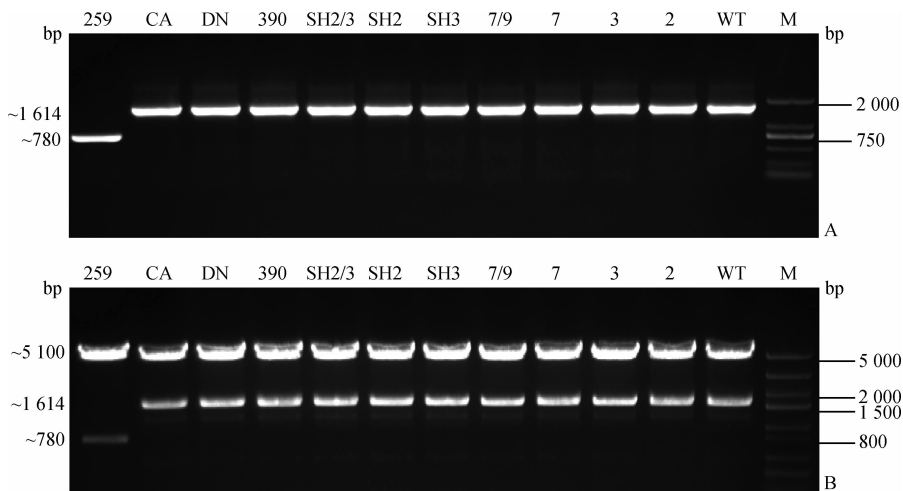
使用分析软件 Lasergene 对野型 *Fyn* 和不同突变体进行氨基酸二级结构分析比对,发现突变位点的表面可能性(Surface probability Plot)明显改变,螺旋区、折叠区、转角区在突变后与野型明显差异;和 *Fyn* 野型比较,突变体表面可能性发生了明显的改变,有些突变体通过预测分析可能产生性质的改变,这可能对蛋白质的二级结构有较大的影响(图 5)。



A. pMD18-T-Fyn<sup>wt</sup> 及 pMD18-T-Fyn<sup>\*\*</sup> 点突变 PCR 产物; B. pMD18-T-Fyn<sup>wt</sup> 及 pMD18-T-Fyn<sup>\*\*</sup> 双酶切鉴定  
 Fig. A. PCR products of pMD18-T-Fyn<sup>wt</sup> and pMD18-T-Fyn<sup>\*\*</sup> were analyzed by agarose gel electrophoresis; Fig. B. Restriction enzyme digestions products of pMD18-T-Fyn<sup>wt</sup> and pMD18-T-Fyn<sup>\*\*</sup>

图 2 pMD18-T-Fyn<sup>wt</sup> 和 pMD18-T-Fyn<sup>\*\*</sup> 不同构型的克隆鉴定

Fig. 2 Clone and identification of pMD18-T-Fyn<sup>wt</sup> and pMD18-T-Fyn<sup>\*\*</sup>



A. pCAG-MCS-Fyn<sup>\*\*</sup> PCR 产物鉴定; B. pCAG-MCS-Fyn<sup>\*\*</sup> 双酶切鉴定  
 Fig. A. PCR products of pCAG-MCS-Fyn<sup>\*\*</sup> were analyzed by agarose gel electrophoresis; Fig. B. Restriction enzyme digestions products of pCAG-MCS-Fyn<sup>\*\*</sup>

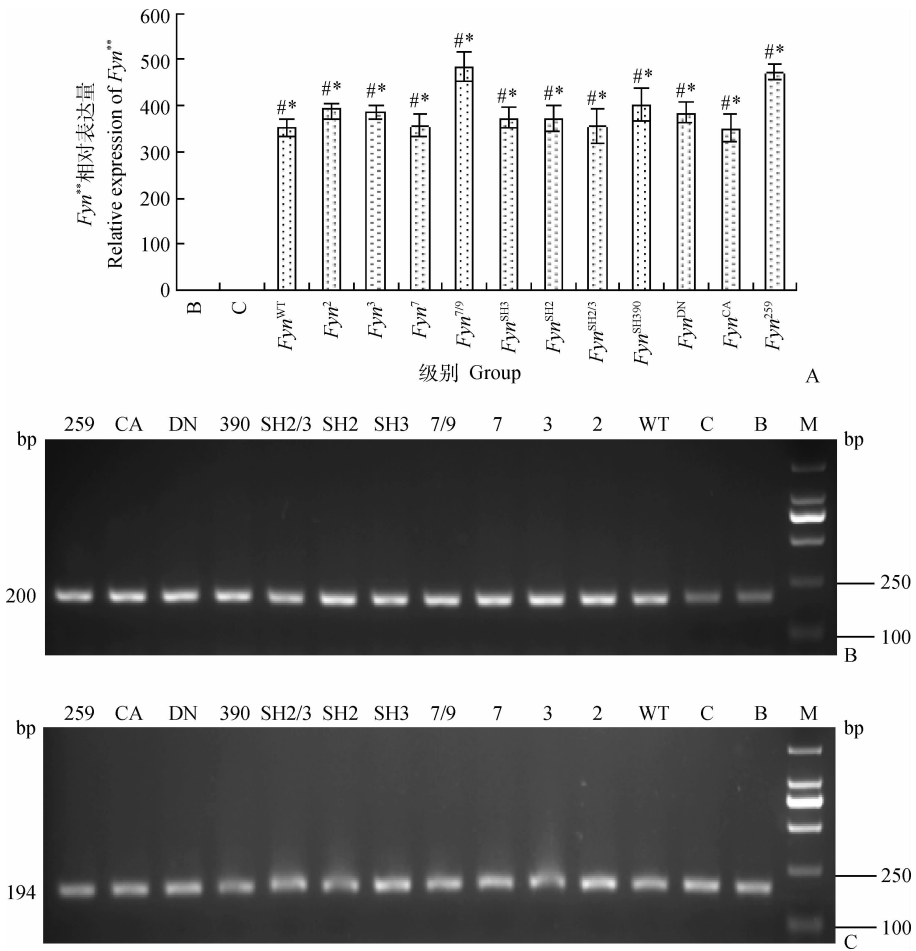
图 3 pCAG-MCS-Fyn<sup>\*\*</sup> 克隆鉴定

Fig. 3 Clone and identification of pCAG-MCS-Fyn<sup>\*\*</sup>

### 3 讨论

通过对 *Fyn* 蛋白功能数据分析,结果显示其第 1—7 位氨基酸是同价蛋白修饰位点;第 277—299 位氨基酸推断是蛋白激酶 ATP 结合区;第 386—398 位氨基酸推测是酪氨酸蛋白激酶特定活化区,一般认为是第 390 位氨基酸;第 524—537 位氨基酸被认为是负调控区。SH3 结构域通过疏水性氨基

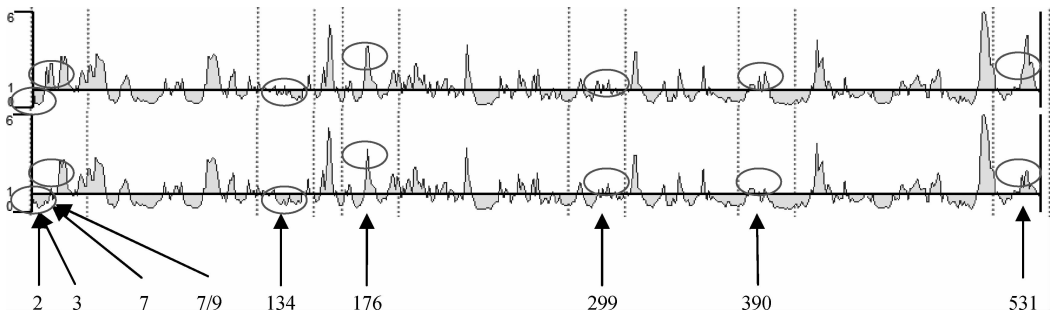
酸和脯氨酸与靶蛋白结合而决定了 2 种不同的构型;SH2 结构域包含约 100 个氨基酸,通过 2 种表面袋状结构结合磷酸化的酪氨酸,其特征性是与磷酸化的酪氨酸有显著差异的残基,这是 SH2 仅有的特征结构。酪氨酸激酶区在细胞活化中起重要作用,本区域是介导蛋白激酶及其磷酸化可逆过程的关键部位。



A. RT-qPCR 检测 *Fyn\** 相对表达量(以  $\beta actin$  为内参,见表 2),“\*”表示 F 组与 B 组差异极显著( $P < 0.01$ ),“#”表示 F 组与 C 组差异极显著( $P < 0.01$ );B. RT-qPCR 检测 *Fyn\** 超表达电泳图;C. RT-qPCR 检测  $\beta actin$  电泳图

图 4 pCAG-MCS-*Fyn\** 转染细胞后 RT-qPCR 检测分析

Fig. 4 Identification and analysis of overexpression of pCAG-MCS-*Fyn\** by RT-qPCR



上图为 *Fyn* 野型分析,下图为 *Fyn* 突变体分析,圆圈和数字表示突变前后表面可能性的改变

The figure 5 shows the difference between wildtype *Fyn* (up) and mutant *Fyn*(down), circles and digit represent the change of Surface Probability Plot between wildtype and mutants

图 5 *Fyn* 及其点突变位点分析

Fig. 5 Analysis of mutant sites between wildtype and mutants

*Fyn* 可以引起 Tau(微管相关蛋白)的酪氨酸磷酸化。大量的研究表明,*Fyn* 在突触可塑性、学习记忆方面扮演着重要的角色,*Fyn* 对贝塔淀粉样斑(Amyloid beta, A $\beta$ )的产生以及调控 A $\beta$  引起的突触功能障碍有着一定的影响,*Fyn* 可以增加淀粉样前体蛋白非致病性剪切,以消除阿尔茨海默病的发生<sup>[5]</sup>。在疾病早期,*Fyn* 的缺失造成 A $\beta$  的增加,并导致 Tau 磷酸化的缺乏,降低学习能力。此外,在大脑皮层的发育过程中,PI3K 的活化受到 Reelin 信号的引导,Src 激酶可以调控 PI3K 亚基 p85 $\alpha$  与 Dab1 相互作用,维持大脑发育的正常<sup>[6]</sup>。*Fyn* 也涉及到磷脂活化物质(Sphingosylphosphorylcholine, SPC)引起的肌动蛋白细胞骨架重排,通过 *Fyn*-RhoA-Rock(Ras homolog gene family, member A, RhoA; Rho kinase, Rock)信号通路可以控制纤维细胞纤维状伪足的形成,抑制 *Fyn* 活化或干扰其药理作用会导致 RhoA 和被 RhoA 激活的 Rock 均被抑制表达;相反,Rock 抑制因子一旦解除,即会形成丝状伪足。WAVE/WASP、ERK、FAK、Cas、Crk、CDC42、Rac、SOCS、Limk 以及 Dock 家族等相关因子共同参与了细胞迁移的信号通路过程<sup>[7-8]</sup>,此外,L. Arnaud 等<sup>[9]</sup>相继发现,Reelin 通过 Src 家族成员的 *Fyn* 和 Src 诱使 Dab1 发生磷酸化。同时,磷酸化的 Dab1 又反过来使 Src 发生酪氨酸激酶的活化,这种作用是相互的<sup>[10-11]</sup>,体现出 Dab1 与 *Fyn* 作用的双能性。

本研究构建了可以用于活体电击转染的重组真核表达载体 pCAG-MCS-*Fyn*\*, 将其转染细胞后(细胞图未显示),*Fyn* 突变体基因在细胞内的 mRNA 表达量明显升高;使用 Laser gene 软件分析突变构型,结果显示,对于特定氨基酸残基在特定结构内部的可能性(Garnier Robson 法),突变体 176、299、390、531 对阿尔法螺旋(Alpha Regions)影响较明显,突变体 134、299 对贝塔折叠(Beta Regions)则有明显改变,在贝塔转角(Turn Regions),突变体 531、399、176、134 对其影响变化明显,在无规卷曲(Coil Regions)只有 399 和 134 对其区域有明显改变;然而不同的是,从氨基酸残基晶体结构预测发现(Chou Fasman 法),突变体 7、7/9、176 对阿尔法螺旋(Alpha Regions)改变明显,2、3、176 突变体可以影响贝塔折叠(Beta Regions),而 7、7/9、531 可明显改变贝塔转角(Turn Regions)的结构(以上结果未图示),通过表明可能性分析,各种突变体均较野型发生了较为明显的改变(图 5)。

通过研究不同位点 *Fyn* 的结构和功能可以很好地解释能与其发生相互作用的蛋白分子,以及在其信号通路中的相互作用机制,而这些突变体又可以为深入研究 *Fyn* 不同构型对细胞迁移以及细胞运动奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 李 鑫,齐 宇,张明智,等. Src 家族酪氨酸激酶 *Fyn* 在肺鳞状细胞癌组织中的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究,2010,37(7):799-801.
- [2] YANG K, BELROSE J, TREPANIER C H, et al. *Fyn*, a potential target for Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 27(2):243-252.
- [3] ZARRINE-AFSAR A, ZHANG Z, SCHWEIKER K L, et al. Kinetic consequences of native state optimization of surface-exposed electrostatic interactions in the *Fyn* SH3 domain[J]. *Proteins*, 2012, 80 (3):858-870.
- [4] LONG H, BOCK H H, LEI T, et al. Identification of alternatively spliced Dab1 and *Fyn* isoforms in pig [J]. *BMC Neurosci*, 2011, 17(12):1-14.
- [5] MINAMI S S, CLIFFORD T G, HOE H S, et al. *Fyn* knock-down increases A $\beta$ , decreases phospho-tau, and worsens spatial learning in 3 $\times$ Tg-AD mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(4):825. e15-24.
- [6] XU D, KISHI H, KAWAMICHI H, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces stress fiber formation via activation of *Fyn*-RhoA-ROCK signaling pathway in fibroblasts[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(1): 282-289.
- [7] RIDLEY A J, SCHWARTZ M A, BURRIDGE K, et al. Cell Migration: Integrating signals from front to back[J]. *Science*, 2003, 302(5651):1704-1709.
- [8] KERJAN G, GLEESON J G. A missed exit: Reelin sets in motion Dab1 polyubiquitination to put the break on neuronal migration[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(22):2850-2854.
- [9] ARNAUD L, BALLIF B A, FÖRSTER E, et al. *Fyn* tyrosine kinase is a critical regulator of disabled-1 during brain development[J]. *Curr Biol*, 2003, 13(1):9-17.
- [10] FENG L, ALLEN N S, SIMO S, et al. Cullin 5 regulates Dab1 protein levels and neuron positioning during cortical development[J]. *Genes Dev*, 2007, 21 (21):2717-2730.
- [11] FENG L, COOPER J A. DUAL Functions of Dab1 during Brain Development[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(2):324-332.