

東海大學生命科學系碩士論文

辨認 KcsA 鉀通道內側入口處
支鏈指向孔洞之胺基酸

Identification of pore-facing residues at the
internal entrance of KcsA potassium channel

研究生：葉松翰

Yeh, Song-han

指導教授：陳仁祥

Chen, Ren-Shiang, Ph.D.

中華民國 107 年 07 月 12 日

東海大學生命科學系
碩士論文學位考試審定書

生命科學系碩士班研究生 葉松翰 君所撰寫之論文

(中文)

辨認 KcsA 鉀通道內側入口處支鏈指向孔洞之胺基酸

(英文)

Identification of pore-facing residues at the internal entrance
of KcsA potassium channel

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

林玉霞

(簽名)

委員

胡念仁

陳仁祥

中華民國 107 年 7 月 12 日

致謝辭

在完成嚴謹的碩士論文後，有個可以自由寫作的空間，感激不盡。

三年了，終於完成我的碩士論文。在攻讀碩士期間，感謝給予我諸多協助與鼓勵的家人、師長、同儕和友人們，使我得以順利完成碩士學位。

感恩我的家人，總是作為強力後盾支持著我，讓我能夠專心研讀碩士班。感謝指導教授陳仁祥老師，教導我在實驗以及學術上的知識，提供資源幫助我進行碩士論文的研究。若是我有不懂的時候，向仁祥老師請教時，他也會不厭其煩的再三解釋，直到我清楚明白。謝謝系上教授平時的指導，特別是林玉雯老師和蔡玉真老師，當我遇到兩位老師，她們都會主動關心我的研究狀況。每當我有分生技術上的疑問時，蔡老師實驗室中的芷瑄學姊也會耐心教導我實驗技術的細節和注意事項。

再者，我要謝謝已畢業的彥明學長，時常幫助我釐清實驗研究上的盲點，以及該注意的細節等等，使得實驗研究得以順利進行。芝禮、映柔、佳儀、漢翔、仁龍、家豪、虹儀、佩君、思琪、佳妮……等等眾多學弟妹們，平日的相處和團隊合作，讓我在繁忙的實驗生活中調解了苦悶。

在東海生科系的教授和同學們的協助與鼓勵之外，更要感謝與我們實驗室合作的教授們，特別是中興大學生化所胡念仁教授及其實驗室研究生，冠賢、振權、紹恩、曉慈等人，在我進行蛋白質純化和製備脂質體等技術上給予許多幫助。

此外，感謝伯鋒、書弘、偉安、思巧、育佑、馨方、純頰等許多好友們，當我陷入困難和低潮時，給我鼓勵和建言，促使我繼續堅持下去。

在攻讀碩士時，我感覺好比遊玩闖關遊戲，擔任主角召集其他夥伴合作，一同冒險、解任務。有時遇到困難、有時遭逢危機、有時強迫追加任務目標，這些難題需要團隊成員之間的默契和堅持，方能順利擊倒最後的大魔王。然而，在現實中人人皆是主角，人生中有著許許多多的關卡，每個人互相合作、彼此學習，完成了任務目標，再往下個目標邁進。即使受到挫折，不要氣餒；獲得了成就，也不要高傲，仍會出現新的目標、新的機會、新的挑戰，等待著我們一一去克服。

松翰 謹誌

2018 年 7 月

目錄

中文摘要	3
英文摘要	5
前言	7
材料與方法	
2-1. 製備 KcsA 通道突變 DNA	12
2-2. 蛋白質純化.....	16
2-3. 脂質體(proteoliposome)製備.....	18
2-4. 脂雙層記錄術(planar lipid bilayer technique).....	20
結果	
3-1. KcsA 通道質體長度與序列之確認	23
3-2. KcsA 通道蛋白之純化和脂質體之膠體電泳	23
3-3. KcsA 突變通道之單通道電流與導電度	24
討論	
4-1. KcsA 突變通道之單通道導電度	27
4-2. pH 值對通道入口處負電荷之影響	28
4-3. A111Q 支鏈之體積效應.....	29
4-4. KcsA 通道蛋白純化及脂質體製備	29
4-5. 未來研究工作.....	31

參考文獻	34
表目與圖目	38
附表與附圖	39
附錄	56
個人資料	57

摘要

鉀離子通道的電流大致上決定了細胞膜的靜止電位。在鉀離子通道中，負責篩選鉀離子進出的結構稱作選擇性過濾器(selective filter)，其中GYG序列在所有鉀通道的演化中極度保守。雖然已知的鉀通道(MthK、KvAP、Kv1.2和KcsA)選擇性過濾器具有幾乎一致的結構，但是鉀通道的導電度卻有相當大的差異。最近的研究顯示BK通道在其孔洞內側入口處的兩個帶負電的胺基酸(E321和E324)能夠吸引鉀離子並有效提升該處的鉀離子濃度，因而提高穿過BK通道之電流。同樣地，當KcsA通道內側入口處的A108突變為帶負電的 aspartate 時，KcsA的導電度也會顯著提高。Furini 等人在2007年運用 Poission-Nernst-Planck (PNP)理論模型模擬KcsA A108E、T112E的點突變，獲得導電度會上升的結論。然而Furini等人的預測結果，以及KcsA通道中相對於BK通道E324之位點是A111或T112仍未經實驗所證實。本研究中，我們在KcsA通道內側入口處進行A108E、A111E和T112E之負電荷點突變，並以脂雙層記錄術(planar lipid bilayer technique)記錄不同膜電位下的單通道電流大小。我們觀察到A108E會導致通道導電度上升，此結果與先前文獻結果相符。此外，在細胞內溶液為pH 4和pH 5時，我們記錄到KcsA A111E的導電度高於控制組，而T112E的導電度與控制組相似，這暗示了A111(而非T112)之支鏈指向通道孔洞，幫助吸引鉀離子。我們的結果顯示BK通道於內側入口處

的 E321 和 E324 在 KcsA 通道上相對應之位置為 A108 和 A111。根據本研究之結果，我們可以在此二位點上放置不同體積大小之胺基酸支鏈，進一步探討改變內側入口大小對鉀離子通道導電度之影響。

Abstract

The efflux of potassium ions (K^+) essentially determines resting membrane potentials in virtually all cells. The selective filter of potassium channels, with its GYG sequence being extremely conserved during evolution, allows the K^+ to pass the membrane. Although the selective filter structure is almost identical in all crystallized potassium channels (such as MthK, KvAP, Kv1.2, and KcsA), the conductance of these channels vary widely. Recent researches showed that the two negatively charged amino acids (E321 and E324) at the internal pore entrance of BK channels attract potassium ions, leading to increased potassium concentration at the pore entrance and elevated channel conductance. Similarly, when the A108 at the internal entrance of KcsA channel is mutated to aspartate, the conductance of KcsA channel was significantly increased. Furini and colleagues (2007) suggested that A108E and T112E mutations in KcsA channel can increase channel conductance in their simulation with the Poisson-Nernst-Planck (PNP) theory. However, Furini and colleagues' prediction, as well as whether the corresponding position to BK channel's E324 in KcsA channel is A111 or T112, have not been experimentally confirmed. In this study, we created mutant KcsA channels by introducing negative charges at the A108, A111 and T112 positions, followed by recording their single channel currents at various membrane potentials with the planar lipid bilayer technique. The A108E mutation caused increased channel conductance over the control channel, consistent with results in the literature. Furthermore, the channels with A111E, but not T112E, displayed increased conductance in both intracellular pH 4 and pH 5, indicating that the carboxyl group of the A111E side-chain is pointing to the channel pore and helps attracting K^+ ions. Our results indicated that the

A108/A111 positions in the KcsA channel correspond to the E321/E324 positions in the BK channel. Based on these results, we can introduce side-chains of various size to further investigate the influence of changing the dimension of internal entrance on the conductance of potassium channels.

一、前言

生物脂雙層膜上的離子通道蛋白能夠允許特定的離子進出細胞或胞器，而通過離子通道的電流能夠調節神經元、肌肉和內分泌細胞中許多重要的生理作用(Hille, 2001)。由於離子通道的功能障礙導致許多動物和人類的疾病，因此離子通道的重要性越來越受到重視(Nimigean et al., 2003; Kim and Nimigean, 2016)。在已知的離子通道中，鉀離子通道存在於幾乎所有生物的細胞膜上。在可興奮細胞中，鉀通道負責產生由鈉或鈣離子通道興奮產生的膜電位之後的再極化(Nimigean et al., 2003; Kim and Nimigean, 2016)。因此，鉀離子通道在許多不同類型的細胞中扮演著影響膜電位的重要角色。

鉀離子通道的選擇性過濾器(selective filter)位於通道孔洞中央，負責篩選鉀離子進出細胞膜。大多數鉀離子通道的選擇性過濾器由 TVGYG 序列所組成，其中 GYG 序列在所有鉀通道的演化中是極度保守(Doyle et al., 1998; Zhou, 2001; Kim and Nimigean, 2016)。以 KcsA 通道為例，此通道是由相同的四個子單元組成，每個子單元具有兩個穿膜區段，稱為 TM1 和 TM2 (圖一)。KcsA 通道的選擇性過濾器中，threonine⁷⁵ 的支鏈氧原子與 threonine⁷⁵ 至 glycine⁷⁹ 的主鏈氧原子形成四個主要的鉀離子結合位點(S1、S2、S3、S4)及外部結合位點(S0) (Doyle et al., 1998; Furini et al., 2006;

Domene and Furini, 2009)。此結構形成一個通透路徑，而每個鉀離子(半徑 1.33 Å)在其中可以與周圍多達八個氧原子相互作用。另一方面，直徑較小的離子，例如鈉離子(半徑 0.95 Å)和鋰離子因為體積太小而不能與鉀通道選擇性過濾器中結合位點的八個氧原子同時結合，導致不能有效地穿越鉀離子通道。由於鉀離子通道選擇性過濾器的結構，使得鉀離子通道允許鉀離子通過的滲透率(permeability)比鈉離子來得高($P_K/P_{Na} > 1000$) (Hille, 2001)。

由 X-ray 繞射的晶體結構(X-ray crystallography)來觀察，目前已知幾種類型的鉀離子通道中，其選擇性過濾器的結構幾乎是相同的(Doyle et al., 1998; Jiang et al., 2002a; Jiang et al., 2003; Kuo et al., 2003; Long et al., 2005)。然而，不同鉀離子通道之間的導電度卻具有相當大的差別(Hille, 2001)，其範圍從約 3 pS 至 300 pS。因此，鉀通道導電度差異如此大很可能是由通道孔洞其他部分造成的，例如：開口外部、內部腔室以及入口處內側之結構，皆有可能影響離子通過之速率。

BK 通道是導電度最大的鉀離子通道(200-300 pS)，其通道的開口外部具有帶負電荷的 aspartate²⁹²。Haug 等人發現若是以 D292N 的點突變中和該點位之電荷，通道的導電度下降約 40% (Haug et al., 2004)。但是，大多數具有較小導電度的鉀離子通道，在同源位置也具有相同的 aspartate。因此，通道開口外部的負電荷無法完全解釋 BK 通道有較大導電度的原因，

況且 BK 通道和其他離子通道的導電度有 20 至 100 倍的差異。

另外，在 KcsA 通道的選擇性過濾器下方之內部腔室(inner cavity)，其寬度約有 10 Å，意味著 KcsA 通道的內部腔室可能屬於低電阻的通路 (Doyle et al., 1998)。在其他兩種鉀通道蛋白 KvAP 和 MthK 的結構上，內部腔室的尺寸稍大一些(Jiang et al., 2002a; Jiang et al., 2003)。由於內部腔室是鉀離子通道中電阻最低的部分，因此若是去改變各個鉀通道的內部腔室之結構，可能僅是些微影響該通道的導電度而已。而 Furini 和其團隊透過模型計算發現，若是忽略不計 KcsA 通道孔洞內側的主鏈之電荷，會導致通道的導電度增加近 30% (Furini et al., 2007)。因此，內部腔室可能不是影響通道導電度的主因。

KcsA 通道的內側(靠近細胞質一側)入口的第二穿膜區(TM2)構成了門閥(gate)，用來控制通道的開啟和關閉(Liu et al., 1997; Doyle et al., 1998; del Camino and Yellen, 2001; Jiang et al., 2003)。並且，因為內側入口的大小、電荷和靜電作用皆可能造成通道導電度的不同。BK 通道內側入口處有兩個面向孔洞的 glutamate (E321 和 E324)。Brelidze 等人發現將這兩個位點突變為電中性(E321N 和 E324N)和帶正電(E321K/E324K)的胺基酸，會導致通道導電度下降。他們更進一步研究發現，當提高細胞內側的鉀離子濃度時，不論此二位點是帶負電、正電或是電中性的胺基酸，通道的導電度

皆是相似的(Brelidze et al., 2003)。他們推測這樣的效應，是由於帶負電的 glutamate，在接近生理條件下透過靜電效應吸引鉀離子進入通道的內部腔室，增加其濃度和穿過通道之擴散速率所導致。

在導電度較大的 BK 通道上，藉由改變特定胺基酸位點(E321 和 E324)所帶的電荷，會影響到通道的導電度。BK 通道在+100 mV 的單通道導電度約為 250-300 pS (Brelidze et al., 2003; Geng et al., 2011)，而 KcsA 的單通道導電度則約為 80-100 pS (Nimigean and Miller, 2002; Nimigean et al., 2003)。將 KcsA 和 BK 通道做序列比對(圖二)，可見到 BK 通道中 E321 位置在 KcsA 通道上的同源位點為 A108。當 KcsA 通道的 A108 突變成帶負電的 A108D 時，因透過負電吸引鉀離子而增加 KcsA 的導電度，在+100 mV 膜電位下導電度可達約 230 pS，而在電中性突變(A108N)處理中則沒有明顯導電度的改變(Nimigean et al., 2003)。然而，這電荷改變的實驗並未在 T112 位點上進行測試(此位點可能對應於 BK 通道上的 E324)。

另一方面，Furini 和其團隊透過 Poisson-Nernst-Planck (PNP) 理論的模型，推估 KcsA A108 和 T112 位點加入負電荷的影響。在 A108E 和 T112E 的突變處理中，負電荷吸引鉀離子而增加導電度的效果，根據不同的通道模型可增加 46%至 114%之間(Furini et al., 2007)。但是，這些理論估計數值與實際觀察到的單通道電流增加幅度並不相符(Nimigean et al.,

2003)。這也意味著理論預測和實驗數據之間具有差異，且缺乏合適的理論架構來解釋離子穿越鉀離子通道之原理。

本研究使用了 KcsA 通道作為實驗材料。KcsA 通道是一種在鏈黴菌 (*Streptomyces lividans*) 上發現，對氫離子濃度敏感的鉀離子通道 (Thompson et al., 2008)。當氫離子濃度高 (pH 值低) 時，通道傾向於開啟。由於 KcsA 通道是最早被結晶的離子通道之一，對於其結構和功能有較為豐富的文獻研究，同時其導電度也相對大到可以進行單通道電流測定，因此本研究選擇以 KcsA 通道作為實驗的材料。

BK 通道 E321 和 E324 的支鏈在內側入口處指向孔洞中央 (Brelidze et al., 2003)，然而我們並不完全知道 KcsA 通道中相應的位點。在比對 KcsA、MthK 和 mSlol (mouse BK channel) 序列時，雖然 MthK 的兩個負電胺基酸對應到 KcsA 上為 A108 和 T112，但在 mSlol 的兩個帶負電位點間有一個序列缺失 (gap)，因此對應到 KcsA 上的同源位點也可能是 A108 和 A111 (圖二)。本研究中，我們在 KcsA 通道內側入口處製造 A108E、A111E 和 T112E 的點突變，改變支鏈的電荷，再使用脂雙層記錄術 (planar lipid bilayer technique)，以電生理方法記錄不同膜電位下的單通道電流大小並計算導電度。綜合上述，本研究之主要目的在於決定 KcsA 通道中最靠近內側入口處胺基酸支鏈面對通道孔洞之位點，究竟是 A111 或 T112。

二、材料與方法

KcsA 通道在開啟一段時間後，會進入一段不活化時期(inactivation)。前人的研究發現當 KcsA 的 glutamates⁷¹ 突變為 alanine 時，可以抑制通道進入不活化期，且其導電度和原 KcsA 通道相似(Cordero-Morales et al., 2006)。為了實驗記錄上的方便，本研究使用帶有 E71A 突變的 KcsA 通道作為控制組，且所有後續製造的通道皆帶有 E71A 的突變位點。

2-1. 製備 KcsA 通道突變 DNA

本研究中所使用的 KcsA E71A 通道置於 pQE-60 載體中，由 Cornell University 的 Crina Nimigean 教授所提供。研究中使用兩種方法在通道的 DNA 中產生突變的位點，第一種方法包含兩階段 PCR (polymerase chain reaction)之步驟，第二種方法則運用了 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit 這個商業套組。製造點突變之核酸引子由明欣生物科技股份有限公司合成。

2-1-1. 以兩階段 PCR 製造 KcsA 之突變位點

兩階段 PCR 方法中使用了四種不同的核酸引子(圖三)。其中，放大全段 KcsA 序列之兩種引子以 5F 和 6R 代號表示，具有點突變位點之引子以 1F 和 2R 代號表示(表一)。於第一階段 PCR 中，由 KcsA E71A 的 DNA 作為模板，依引子分成二個組別，第一組為 5F+2R、第二組為 1F+6R。藉由

PCR 過程，製造出帶有特定位點的突變 DNA 片段；第二階段是以第一次 PCR 之產物混合作為模板，使用放大全段 KcsA 序列之引子(5F+6R)，將具有特定位點突變的 DNA 片段延長至全段 KcsA 序列，即製作出具有點突變之 KcsA DNA。接著使用接合酶將此片段接入 pGEM-T 載體(Promega, Madison, WI)中，再使用 *Escherichia coli* (品系：XL-1-Blue)作為勝任細胞 (competent cell)，以基因電轉移(gene electrotransfer)的方式，將帶有點突變之 DNA 轉殖到菌中。隨後加入 1 ml LB 培養液(含有 2.5% LB 粉末)，以 180 rpm 的搖晃轉速培養 1 小時(recover)，再進行塗盤培養。

2-1-2. 塗盤培養

塗盤前先以 14550 rcf 進行離心 1 分鐘，將 1 ml 菌液濃縮至 250 μ l。將菌液塗於含有 20% IPTG (80 μ l)和 2% X-Gal (80 μ l)之 agar plate 表面 (agar plate 含有 2.5% LB 粉末、2% agar 及 1000 μ g/ μ l ampicillin 抗生素)，置於 37 °C 培養箱中培養 16-18 小時進行藍白篩操作。由於插入的 DNA 片段將破壞 pGEM-T 載體原有的 lac Z 基因，導致 X-Gal 無法轉變成藍色產物。藉由篩選乳白色的單一菌落(含有插入的 KcsA 通道基因)，於 2 ml LB 培養液(含有 2.5% LB 粉末和 1000 μ g/ μ l ampicillin)中，以 180 rpm 的搖晃轉速培養 16-18 小時，使用 1 ml 進行質體萃取(參見 2-1-3)，另 1 ml 可用於塗盤後送定序(參見 2-1-4)。

2-1-3. 質體萃取

取出 1 ml 培養完畢的菌液，以 14550 rcf 離心 1 分鐘，去除上清液後，加入 100 μ l solution I，將 pellet 回溶至均勻白色混濁狀，再加入 200 μ l solution II，以輕巧的力道將離心小管倒置混勻，使液體成濃稠狀，靜置 2 分鐘後加入 150 μ l solution III，同樣以輕巧的力道倒置混勻，直到白色固體不再增加，再靜置 2 分鐘。加入 100 μ l chloroform-IAA 混合液 (chloroform : IAA = 24 : 1) 後，以 14550 rcf 離心 15 分鐘，使其分層。取出上清液，置於新的離心小管內，加入上清液體積 2 倍的 100% 酒精，搖晃混勻後，於 -20 °C 靜置 30 分鐘，以酒精沉澱的方式析出 plasmid DNA。而後，於 4 °C 中離心 15 分鐘，使 DNA 沉澱。移除上清液，加入 1 ml 70% 酒精，再以 14550 rcf 離心 5 分鐘，重複 1-2 次以去除鹽類和雜質。最後，倒除上清液，於 42 °C 乾浴槽中烘乾 DNA (約莫 10 分鐘)。烘乾後，以高溫滅菌處理過的 40 μ l ddH₂O 回溶 plasmid DNA，並加入 2 μ l RNase (10 μ g/ μ l) 除去 RNA，之後保存於 -20 °C 冰櫃中。

2-1-4. 確認 plasmid DNA 之長度

將萃取出來的 plasmid DNA，使用 EcoRI 和 HindIII 二種限制內切酶進行切割，以確認其 DNA 的長度。單一酵素處理使用 EcoRI，雙酵素處理使用 EcoRI 和 HindIII，酵素反應 1.5 小時。接著，用 2% agarose gel 膠體電泳確認各處理之 DNA 片段大小。以單一限制內切酶處理之 pGEM-T-

KcsA 質體應為 3513 bp，雙酵素處理之 insert DNA 應為 654 bp、pGEM-T 質體應為 2859 bp。確認 DNA 片段大小後，使用接種環沾取剩餘之 1 ml 菌液(參見 2-1-2)以四區畫線法塗盤(streaking)進行連續稀釋，接著送至明欣生物科技有限公司做定序確認。

2-1-5. 將 KcsA 突變 DNA 與 pQE-60 接合

經定序確認序列無誤後，再次用 EcoRI 和 HindIII 酵素將 insert DNA 切下，再用 DNA 接合酶將 insert DNA 接入已切除其中 insert DNA 之 pQE-60 載體中。用基因電轉移的方式(參見 2-1-1)將質體轉殖到 XL-1-Blue 中，以同樣的步驟放大質體 DNA 並進行萃取(但 pQE-60 無法進行藍白篩)。然後再度使用 EcoRI 和 HindIII 做酵素處理，用膠體電泳確認單一限制內切酶處理之 pQE-60-KcsA DNA 片段大小為 3905 bp，而雙酵素處理之 insert DNA 片段大小為 654 bp、pQE-60 質體為 3251 bp。確認 DNA 片段大小後，一樣將菌液以四區法塗盤(參見 2-1-4)，送至明欣生物科技有限公司做定序確認。經定序確認無誤之 plasmid DNA 保存於-20 °C，待後續蛋白純化步驟之使用。

2-1-6. 以商業套組製造 KcsA 之突變位點

第二種製作突變 DNA 的方法，是使用 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis 套組(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)，將具有

點突變位點之引子(表一)和作為模板的 pQE-60-KcsA E71A 的 plasmid DNA，藉 PCR 反應製作出具有 KcsA 點突變之質體(圖四)。加入 DpnI 限制內切酶去除模板 DNA 之後，再使用 *Escherichia coli* (品系：DH5 α)作為載體，以 heat-shock 方法(參見 2-1-7)，將質體轉殖到 DH5 α 之中。

2-1-7. 以 heat-shock 進行質體轉殖

將 2 μ l 的 KcsA plasmid DNA 加入 50 μ l 的 DH5 α 菌液中，於冰上放置 30 分鐘後，再以 42 °C 乾浴處理 30 秒，再放回冰上靜置 2 分鐘。隨後加入 1 ml LB 培養液，以 180 rpm 之轉速培養 1 小時(recover)，接著用與上述相同方法進行質體 DNA 放大跟萃取(參見 2-1-2 至 2-1-3)。最後以限制內切酶和膠體電泳確認 plasmid DNA 之片段大小，再經定序做序列確認(參見 2-1-4)。

2-2. 蛋白質純化

蛋白質純化工作係於國立中興大學生物化學研究所胡念仁教授指導下，由其實驗團隊協助進行。

2-2-1. KcsA 通道之 DNA 轉殖

將 KcsA 突變通道之 plasmid DNA 以 heat-shock 操作(參見 2-1-7)，轉殖至勝任細胞(*Escherichia coli*，品系：JM83)中，再以具有 ampicillin 之 LB agar plate 菌盤，於 37 °C 培養箱中培養 16-18 小時。

2-2-2. 細菌培養

從已培養的菌盤中，使用滅菌後的微量吸管尖端(tip)選取單一菌落至 50 ml LB (含 ampicillin)培養 16-18 小時，取出 20 ml 菌液加入 1 L LB 中 (含 ampicillin)，總共培養 2 L。以 220 rpm 轉速於 37°C 培養至 OD 1.0 後，加入 1 ml 的 1 M IPTG (最終濃度 1 mM)，誘導 JM83 表達 KcsA 通道蛋白。3 小時後以 6500 rpm 之轉速離心 10 分鐘，將細菌沉澱。收集細菌之 pellet，以 buffer (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM KCl) 回溶，冰於 -80 °C 冰櫃中保存。

2-2-3. 破菌

從 -80 °C 冰櫃拿出菌液並解凍後，加入 protease inhibitor (2 g/ml leupeptin, 3 g/ml pepstatin 及 0.17 mg/ml PMSF)、微量 DNase、MgCl₂ (依 sample 體積調整濃度為 1 mM)。以超音波震盪器，設定為：on 10 秒、off 20 秒，重覆此步驟 15 次(總時間設定 2 分 30 秒)。再加入 DM (n-decyl-β-D-maltopyranoside; Anatrace, Maumee, OH) 至 2.41% (50 nM)，於 4 °C 下攪拌 2 小時，接著進行超高速離心(43000 rpm) 1 小時後，收集上清液 (supernatant)。

2-2-4. 通道蛋白純化

先以 50 ml buffer DM (20 mM Tris pH7.5, 100 mM KCl, 5 mM DM) 清洗

Nickel-NTA 管柱，將收集的上清液和 Nickel-NTA 於 4 °C 下攪拌 2 小時後，再將 Nickel-NTA 與上清液之混合物倒回管柱中。小分子與雜質會通過管柱，KcsA 通道蛋白會與 Nickel-NTA 結合而留在管柱之中。在接下來的每一個步驟，皆會收集 10 μ l 的溶液，在蛋白純化步驟完畢後進行 SDS 膠體電泳，檢視 KcsA 通道蛋白之含量。接著於 4 °C 下，依序將 20 mM、50 mM、300 mM imidazole buffer 加入管柱中，與 KcsA 通道蛋白競爭 Nickel-NTA。在加入 300 mM imidazole buffer 後，KcsA 通道蛋白會由管柱流出，在略過前 5 ml 過濾液之後，收集接下來的 60 ml 溶液。再經由 Vivaspin turbo 15 ml/30 kDa (Sartorius, Goettingen, Germany) 離心濃縮後，以 Superdex-200 (GE Healthcare) 膠體過濾管柱純化，測量溶液中蛋白質吸光值(OD280)，收取波峰附近的溶液(圖七)，藉以分離 KcsA 通道蛋白。最後以 NanoVue (GE Healthcare) 測得 KcsA 蛋白濃度，保存於 -80°C 冰櫃中。

2-3. 脂質體(proteoliposome)製備

2-3-1. 製備 POPE-POPG 之脂質混合溶液

於抽風櫃中將 POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylethanolamine, 25 mg/mL) 和 POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylglycerol, 25 mg/mL) (Avanti, Alabaster, AL)，以 3 : 1 比例混合後，分裝入數個乾淨的 4 ml 玻璃瓶中，用 parafilm 將玻璃瓶封口，保存於 -80°C 冰櫃中。

2-3-2. 脂質體之製備

從-80°C冰櫃中取出一脂質混合溶液分裝管，於抽風櫃中吸取 200 μ l 脂質混合液(3.75 mg POPE, 1.25 mg POPG)，置入一乾淨的 1.5 ml 離心小管(A)中，以氮氣吹乾至管中脂質顏色轉白後，加入 0.5 ml equilibration buffer (100 mM KCl、20 mM Tris、200 mM Surcose，pH 7.5)。使用超音波震盪器，探針伸進小管(A)中，設定為：on 30 秒、off 30 秒，重複 2 次。震盪完畢後，拿一個新的離心小管(B)加入 0.01 g CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; Anatrace, Maumee, OH)，再將小管(A)中的 0.5 ml 溶液加入到小管(B)緩慢地混合均勻(CHAPS 最終濃度為 34 mM)。接著從-80°C冰櫃中拿出已純化的 KcsA 通道蛋白，依蛋白濃度加入適當之體積，最終蛋白濃度為 1-1.5 μ g/ μ l，並置於室溫 25-30 分鐘。然後，使用 Mini Trap G25 gravity 管柱(GE Healthcare)純化脂質體。先用 equilibration buffer (8 ml)清洗管柱後，將小管(B)中的蛋白-脂質混合液加入管柱中，流去過濾液。接著加入 1 ml equilibration buffer 後，開始以 100 μ l 為一管分次收集過濾液，約可收 7 管。從 7 管中各取微量體積經 SDS 膠體電泳及銀染(silver staining)，確認脂質體中蛋白分子量大小後，再將此 7 母管溶液，各分裝出 2 子管(共有 21 管脂質體溶液)，保存於-80°C冰櫃中。

2-4. 脂雙層記錄術(planar lipid bilayer technique)

2-4-1. 脂質混合液製備

從-80°C冰櫃中拿取一脂質混合溶液分裝管(參見 2-3-1)，於抽風櫃中取出 40 μ l 脂質混合溶液，置入一乾淨 1 ml 玻璃瓶中以氮氣吹乾，約 5 分鐘內可見瓶中脂質的顏色轉白。再加入 37.5 μ l decane 和 12.5 μ l hexane (Sigma, St. Louis, MO)到玻璃瓶內，配成 50 μ l 混合液(lipid concentration : 26 mM/ml)，旋蓋後用石蠟紙封口後以桌上型震盪器(vortex)混勻。再拿一個離心小管，取 1 ml decane，作為清洗畫筆之使用。

2-4-2. 儀器架設

先以 2-10%的 Decon90 無磷清潔劑(Decon Laboratories, East Sussex, UK)於超音波洗淨機中清洗記錄小杯(Delrin chamber and cuvette)5 分鐘，再用 ddH₂O 和 75%酒精去除泡沫，用氮氣吹乾。然後，取 2 μ l 脂質混合液(參見 2-4-1)，塗於小杯中央洞口(aperture)周圍，再用氮氣吹乾(約 2 分鐘)。接著，將記錄小杯組合，在洞口兩側分別加入記錄溶液並置入已鍍上 AgCl 之銀電極和鹽橋(含有 3% agarose 及 3M KCl)。

2-4-3. 上膜

在電壓箝制(voltage clamp)模式下，將 BC-535 放大器(Warner Instruments, Hamden, CT)於通路狀態下電流歸零。畫筆以 75%酒精和

decane 清洗後，沾取脂質混合液(參見 2-4-1)，輕點於小杯中央洞口上。使用 micropipette 緩慢升降液面高度，協助脂雙層膜於洞口形成(此時膜電流約為 ± 2 pA 之內，若電流達到 ± 166 pA 以上，代表膜尚未形成)。接著，切換至 cap test 模式測量膜電容(capacitance)值。如果電容低於 40 pF，則再以水位升降方式調整膜的大小和厚度至數值介於 40-60 pF 之間(Giri et al., 2012)，則可加入脂質體進行通道電流記錄。

2-4-4. 通道蛋白之電流記錄

從-80 度冰櫃中拿出一管已分裝的脂質體(參見 2-3-2)，於室溫解凍後，用超音波震盪 1 分鐘，取 2 μ l 脂質體加入 cis 小杯(定義為加入脂質體那一側)中。利用磁石於 cis 小杯中攪拌 2-10 分鐘等待脂質體與脂雙層膜融合後，以 Clampex 10.6 (Molecular Devices, San Jose, CA)在不同電壓下記錄單一通道之電流訊號。訊號以 20 kHz 的採樣頻率透過 Digidata 1550A (Molecular Devices)介面擷取，BC-535 的低通濾波(4 pole Bessel)置於 1 kHz，外加 LPF-8 濾波器(8 pole Bessel)置於 700-1000 Hz 之間。

記錄時 cis 小杯之溶液為 1 ml pH 7.0 buffer (90 mM KCl, 10 mM KOH, 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))。由於 KcsA 通道之開關受到氫離子濃度調控(Thompson et al., 2008)，因此 trans 小杯(定義為未加入脂質體那一側)中置入 1 ml pH 4.0 buffer (90 mM KCl, 10 mM KOH, 10 mM

succinate (Avantor, Center Valley, PA)) 或 pH 5.0 buffer (75 mM KCl, 25 mM KOH, 10 mM succinate)。

2-4-5. 電流訊號數據分析

數據分析以 Clampfit 10.6 (Molecular Devices) 進行。多餘之雜訊視情況使用 Notch filter (Center frequency: 60 Hz / -3dB, width: 10 Hz) 或 Lowpass filter (Bessel Cutoff frequency: 700 Hz) 去除。使用游標標記一段包含通道開啟及關閉的區段，以 histogram 分析其數值分佈，再用高斯函數(Gaussian, numbers of term(n): 2) 逼近其曲線，取兩個高峰之差值為通道電流大小，將其除以記錄之電壓，則可得到該通道之電導度。分析完之數據以 Excel 進行統計，並以 Veusz 軟體繪圖。

三、結果

3-1. KcsA 通道質體長度與序列之確認

藉由兩階段 PCR 方式產生的 KcsA E71A/A108E、E71A/A111N、E71A/T112E 和 E71A/T112N 質體，以及使用商業套組產生的 KcsA E71A/A111E、E71A/A111Q 和 E71A/T112E 質體，皆經由 agarose 膠體電泳確認質體之片段大小。圖五中可見帶有 E71A/A111Q 點突變的 pQE-60 質體全長為 3905 bp，經過雙酵素切割後的 pQE-60 質體片段為 3251 bp，而 insert DNA 片段為 654 bp。質體長度確認後，送至廠商定序，再將定序結果以 BioEdit 軟體和預期結果比對。再以 E71A/A111Q 為例，圖六中可見第 445-447 之核苷酸位置已成功地由 GCC 置換為 CAG (紅色方框)。確認定序結果正確無誤後才進行蛋白純化之步驟。

3-2. KcsA 通道蛋白之純化和脂質體之膠體電泳

進行通道蛋白純化之後，測得溶液中蛋白質吸光值(OD280)的波峰。以 E71A/A111Q 為例，圖七中可見，吸收峰值出現於所收集溶液的第 10.5-14 ml 之間。將這部分液體收集為一管，使用 NanoVue 測得 KcsA 通道蛋白濃度，一般約在 1 mg/ml 上下。此外，蛋白純化過程各個步驟(參見 2-2-4)所收集的溶液，經由 SDS 膠體電泳可以確認各階段溶液中 KcsA 通道蛋白的濃度。圖八中可見，KcsA E71A/A111Q 通道蛋白主要出現在略高

於 48 kDa 之位置(lane 8)。KcsA 通道蛋白所在的位置略低於預期四聚體 (tetramer)之分子量(約為 60 kDa)，其可能原因請詳見討論 4-4。

純化後之蛋白再混入脂質混合溶液中，置備成蛋白脂質體(參見 2-3)。以 E71A 通道為例，圖九之 SDS 膠體電泳中可見所收集的七管分液皆含有純化後的 E71A 通道蛋白，經銀染之後出現於約 50 kDa 之位置。

KcsA E71A/A111N 和 E71A/T112N 這兩個質體並未進行蛋白質純化及電流記錄，其原因請詳見討論 4-4。

3-3. KcsA 突變通道之單通道電流與導電度

3-3-1. KcsA 突變通道單通道電流之比較

圖十中可見到+100 mV 膜電壓下帶有不同點突變之 KcsA 單通道電流紀錄。圖十 A 顯示 E71A 通道(控制組)之電流大小約為 7.7 pA，與文獻值近似(Nimigean et al., 2003)。從三個不同的通道紀錄中可見，即使在相同的紀錄條件下，通道開啟的機率和頻率也有許多變化。在+100 mV 膜電壓下，KcsA 通道有時會進入低度開啟的狀態，有時開啟時間和關閉時間相近，有時幾乎持續開啟而中間只有短暫關閉，此情形與 Chakrapani 等人報告的結果相符(Chakrapani et al., 2007)。圖十 B 可見當在 A108 位點加入負電荷(E71A/A108E)時，其單通道電流約為 12 pA 左右，明顯大於控制組。但是在 T112 位點加入負電荷(E71A/T112E)時，其單通道電流約為 6

pA，並未大於控制組。相對地，在 A111 位點加入負電荷(E71A/A111E)時，其單通道電流約為 9 pA。上述結果暗示並非 T112，而是 A111 位點之支鏈如同 A108 位點一般指向通道孔洞中央。為了說明 A111 之效果是由電荷而非支鏈大小所造成，我們亦製造了與 glutamate 支鏈長度相同且為電中性的 E71A/A111Q 通道。結果顯示 E71A/A111Q 之單通道電流與 E71A(控制組)或 E71A/T112E 通道約略相等(圖十)。

由於 glutamate 支鏈之 pKa 約為 4.0，在 pH 5.0 之環境中支鏈解離程度將增加(更接近帶 1 個負電荷)，此時帶負電胺基酸吸引鉀離子進入內部腔室，提高導電度的效果將更加明顯。如同我們預期(圖十 C)，E71A/A111E 於 pH 5.0 中之單通道電流變得更大(約為 19 pA)，而 E71A/T112E 通道則沒有改變(約為 6 pA)。

3-3-2. KcsA 突變通道導電度之比較

將各個 KcsA 突變通道於 pH 4.0 測得的單通道電流訊號，畫出電流-電壓曲線圖(I-V curve)，從斜率可知其導電度(導電度=電流/電壓)。在圖十一中明顯可見 E71A/A108E 和 E71A/A111E 之導電度比 E71A 來得大，且 E71A/A111Q 和 E71A/T112E 之導電度小於或等於 E71A。

當比較各個 KcsA 突變通道於+100 mV 之導電度(表二)時，在 pH 4.0 溶液中，E71A 為 77.39 ± 0.59 pS (n=3)；E71A/A108E 為 119.09 ± 13.86 pS

(n=4)；E71A/T112E 為 48.60 ± 3.09 pS (n=3)；E71A/A111E 為 88.99 pS (n=1)；E71A/A111Q 為 42.13 pS (n=1)。在 pH 5.0 溶液中，E71A/A111E 之導電度為 188.13 pS (n=1)；E71A/T112E 為 58.52 pS (n=1)。

綜合上節與本節之結果，E71A/A108E 和 E71A/A111E 之導電度皆大於 E71A，而 E71A/A111Q 和 E71A/T112E 之導電度小於或等於 E71A，顯示 KcsA 通道內側入口處支鏈面對孔洞中央之胺基酸位點應為 A108E 及 A111E。

四、討論

4-1. KcsA 突變通道之單通道導電度

由於 aspartate 和 glutamate 支鏈之 pKa 分別約為 3.9 與 4.1，因此在 pH 4.0 溶液中，aspartate 和 glutamate 的支鏈解離程度皆約為 50%。

Nimigean 等人發現 A108D 點突變在 +100 mV 和 pH 4.0 之條件下，可增加 KcsA 通道導電度近 40%；而在 +100 mV 和 pH 6.0 之條件下，可增加 KcsA 通道導電度近 200% (Fig. 2D, Nimigean et al., 2003)。而我們的結果顯示 A108E 之支鏈在未完全解離 (pH 4.0) 的情況下，亦可增加通道導電度 54% ($119.09/77.39 \approx 154\%$ ，表二與圖十 A)，此結果與 Nimigean 等人之報告近似。

我們的結果也顯示 A111E 的支鏈在 pH 4.0 溶液中，吸引鉀離子進入中央腔室進而提高通道導電度之效果僅約為 15% ($88.99/77.39 \approx 115\%$ ，表二與圖十 B)。為了加強負電荷在此位點之效果，我們使用了 pH 5.0 記錄溶液。由圖十 C 中可見，A111E 點突變在此條件下更接近完全解離狀態，並可將通道導電度增加約 200% ($188.13/58.52 \approx 321\%$ ，參見表二)。如此結果顯示 A111E 之支鏈在 KcsA 通道最靠近內側入口處，與 A108E 或 A108D 相同，具有吸引鉀離子進入中央腔室之能力。

此外，我們的結果也顯示無論在 pH 4.0 或 pH 5.0 之條件下，T112E 點

突變的通道導電度皆無明顯改變(表二與圖十)。如此結果意謂著 T112E 的支鏈在通道孔洞中可能指向通道蛋白內部，而非面向孔洞，因此並無吸引鉀離子進入內部腔室的能力。綜合以上討論，我們的結果顯示在 KcsA 通道內側入口處除了 A108 之外，支鏈指向孔洞口的另一位點應為 A111，而非 T112。換句話說，KcsA 通道內側入口處支鏈面向孔洞中央的兩個胺基酸位點應為 A108 和 A111，而此二位點才是與 BK 通道中 E321 和 E324 (Brelidze et al., 2003)相對應之同源位點。

4-2. pH 值對通道入口處負電荷之影響

由於 glutamate 支鏈之 pKa 為 4.1，因此在 pH 4.0 溶液中，在 glutamate 的支鏈之氫離子並不會完全解離。若是再提高 pH 值，使用 pH 5.5 或 pH 6 的溶液(trans 小杯中)進行電流記錄，我們預期 A108E 和 A111E 所帶負電荷之效果會更加明顯，而增加通道之導電度。但由於 KcsA 通道之門閥開啟是由氫離子所調控(Thompson et al., 2008)，提高溶液的 pH 值，亦會減少通道的開啟機率。惟在前人研究文獻中，Thompson 等人發現結合 H25R/E71A/E118A/E120A 等突變能使通道在接近中性甚至 pH 9 之鹼性溶液中持續開啟，並且與 KcsA E71A (control)通道在 pH 4 中所產生的電流大小相似(Thompson et al., 2008)。因此，若後續欲在更高的 pH 值中記錄單通道電流，應以含有 H25R/E71A/E118A/E120A 等突變之通道作為控制組和通道突變的模板以幫助實驗進行。

4-3. A111Q 支鏈之體積效應

本研究中使用 A111Q 作為 A111E 突變處理的 negative control，而 A111Q 的單通道電流不但無明顯上升，反而呈現略微下降的趨勢(表二與圖十 B)。從過去的文獻中，Geng 和其團隊曾發現 BK 通道中內側入口處面對中央孔洞位點(第 321 和 324 位點)之非極性胺基酸支鏈的體積越大，將使通道入口更為狹窄，而降低通道導電度(Geng et al., 2011)。在我們 A111E 及 A111Q 的實驗中，alanine 支鏈體積為 28.5 \AA^3 ，glutamate 支鏈體積為 78.3 \AA^3 ，而 glutamine 支鏈體積為 83.8 \AA^3 ，因此我們推測 A111Q 的單通道電流略微下降，可能與此體積效應有關。

4-4. KcsA 通道蛋白純化及脂質體製備

我們使用通道蛋白純化各步驟所收集的溶液進行 SDS 膠體電泳，由圖八中第 4 欄可見，未與 Nickel-NTA 結合之 KcsA 通道蛋白濃度遠大於其他溶液，這表示有許多 KcsA 通道蛋白未和 Nickel-NTA 結合而流失。因此，未來進行類似實驗時，應提高 Nickel-NTA 的劑量，或是增加 KcsA 通道蛋白與 Nickel-NTA 混合的時間，藉以提高純化蛋白之效率。

圖八中可見，KcsA 通道蛋白出現於約 50 kDa 之位置，略低於四聚體(tetramer)之預期分子量(約為 68 kDa)。由於 KcsA 通道為穿膜蛋白，其結構中具有許多的疏水性胺基酸。在 SDS 膠體電泳中，帶較多疏水性胺基

酸的膜蛋白可以結合較多的 SDS (十二烷基硫酸鈉)，因此在電泳中移動的速度較快，以致於 KcsA 通道蛋白所在之位置略低於預期位置。此觀察與 Thompson 等人發現 KcsA 通道蛋白出現於 50-60 kDa 之位置的結果相似 (Thompson et al., 2008)。

Nimigean 等人於 KcsA A108D 點突變設計了 A108N 作為控制組 (Nimigean et al., 2003)。由於 asparagine 支鏈較短，比 glutamate 少一個碳原子，而與 glutamate 支鏈之碳原子數目相等且結構相近的中性胺基酸應為 glutamine。因此針對 A111E 點突變，我們設計了 A111Q 點突變作為控制組(圖十)。雖然我們也製造了 A111N 點突變，但並未進行蛋白純化與電流記錄。

另外，我們將 KcsA E71A/T112N 質體轉殖入 JM83 勝任細胞之後，在 1 L LB 培養液中的生長狀況不佳，培養的菌液無法達到 OD 1.0。重複兩次後仍未找出其原因。由於 asparagine 支鏈之長度與 glutamate 不同，因此 T112N 並非 T112E 最佳之控制組。再加上 T112E 之負電荷並未增加通道導電度(圖十與十一)，綜合上述兩個原因，我們決定不再嘗試 KcsA E71A/T112N 通道之蛋白純化和電流記錄。

4-5. 未來研究工作

4-5-1. 點突變位置

本研究中，在 alanine¹¹¹ 位點進行了負電荷處理(A111E)和電中性處理(A111Q)，然而在 threonine¹¹² 位點上只進行負電荷處理(T112E)。因為 T112E 突變未造成通道導電度上升(參見 4-1)，顯示 T112 並非影響通道導電度之關鍵位點，因此我們並未規畫後續進行 T112Q 或 T112N 點突變。

另一方面，BK 通道入口處之 E321 及 E324 會影響通道導電度，而本研究也發現 KcsA 通道中同源位點的 A108E 和 A111E 突變能夠增加 KcsA 通道的導電度。因此，後續的研究應可於 KcsA E71A/A108E/A111E 通道中進行，藉由相同的實驗方法記錄其單通道電流，並與目前的實驗數據相互對照。我們預期同時引入 A108E/A111E 兩個負電荷之效果會比單獨用 A108E 或 A111E 更為明顯，即吸引鉀離子進入內部腔室的效果會更強。

4-5-2. 體積效應

從結果來看，本研究已找出在 KcsA 通道上影響其導電度的兩個關鍵位點(由 MthK 和 mSlol 序列比較和對應而來)，且前人研究文獻中將導電度較大的 BK 通道上此兩個位點的負電荷突變為電中性與正電荷，導致 BK 通道的導電度(~250 pS)下降(Brelidze et al., 2003)至接近 KcsA 通道之範圍(~80 pS)。反之，Nimigean 等人(Nimigean et al., 2003)與我們之結果(圖

十與十一)顯示，KcsA 內側入口處之單點突變可使通道導電度上升至 BK 通道之範圍。以上結果顯示，此兩位點的負電荷在鉀離子通道的功能上，扮演著極為重要的角色。然而，許多其它的鉀通道(例如：Kv、Shaker)在通道內側入口處與 KcsA 一樣為電中性，且擁有幾乎一致的選擇性過濾性結構，但其導電度(3-30 pS)卻遠小於 KcsA 通道，這代表除了通道內側入口處的電荷之外，仍有其它影響通道導電度的因素。

Geng 和其團隊曾在 BK 通道中探討過通道入口處支鏈的體積效應 (Geng et al., 2011)。參考他們的做法，我們預計在 KcsA 通道上 A108 和 A111 這兩個位點進行不同大小之非極性胺基酸突變，計畫進行 valine (V)、leucine (L)、isoleucine (I)、phenylalanine (F)、tyrosine (Y)、tryptophan (W)和 glycine (G)等七種突變處理，記錄各個突變的單通道電流。由於 KcsA 通道已有許多明確的 X-ray 晶體結構可供參考，因此在 A108 和 A111 這兩個位點上所產生的體積效應，將更能連結到 KcsA 通道三維結構上明確的改變。同時，這一系列的實驗結果也可以用來建立一個架構於真實生物結構的量化模型。

Nimigean 團隊與我們的結果顯示，A108 或 A111 位點上的負電荷能夠實際增加 KcsA 通道導電度近 200% (參見 4-1)，這與 Furini 和其團隊使用簡單 PNP 模型估算出的 20-112% (Furini et al., 2007)有巨大的差距，也

表示現今的理論模型仍有待修正。因此本研究及後續的實驗工作將有助於發展基於物理學之 PNP 理論模型，使之更貼近生物實驗數據。

五、參考文獻

- Boda, D., M. Valisko, B. Eisenberg, W. Nonner, D. Henderson, and D. Gillespie. 2007. Combined effect of pore radius and protein dielectric coefficient on the selectivity of a calcium channel. *Physical review letters*. 98:168102.
- Boda, D., M. Valisko, D. Henderson, B. Eisenberg, D. Gillespie, and W. Nonner. 2009. Ionic selectivity in L-type calcium channels by electrostatics and hard-core repulsion. *The Journal of general physiology*. 133:497-509.
- Brelidze, T.I., and K.L. Magleby. 2005. Probing the geometry of the inner vestibule of BK channels with sugars. *The Journal of general physiology*. 126:105-121.
- Brelidze, T.I., X. Niu, and K.L. Magleby. 2003. A ring of eight conserved negatively charged amino acids doubles the conductance of BK channels and prevents inward rectification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:9017-9022.
- Chakrapani, S., J. F. Cordero-Morales, and E. Perozo. 2007. A quantitative description of KcsA gating II: Single-channel currents. *The Journal of General Physiology*. 130(5):479-496.
- Chen, T.Y., and C. Miller. 1996. Nonequilibrium gating and voltage dependence of the ClC-0 Cl-channel. *The Journal of general physiology*. 108:237-250.
- Cordero-Morales, J.F., L.G. Cuello, Y. Zhao, V. Jogini, D.M. Cortes, B. Roux, and E. Perozo. 2006. Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nature structural & molecular biology*. 13:311-318.
- Cuello, L.G., J.G. Romero, D.M. Cortes, and E. Perozo. 1998. pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K⁺ channel. *Biochemistry*. 37:3229-3236.
- del Camino, D., and G. Yellen. 2001. Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K(+) channel. *Neuron*. 32:649-656.
- Domene, C., and S. Furini. 2009. Dynamics, energetics, and selectivity of the low-K⁺ KcsA channel structure. *Journal of molecular biology*. 389:637-645.

- Doyle, D.A., J. Morais Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, and R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 280:69-77.
- Furini, S., F. Zerbetto, and S. Cavalcanti. 2006. Application of the Poisson-Nernst-Planck theory with space-dependent diffusion coefficients to KcsA. *Biophysical journal*. 91:3162-3169.
- Furini, S., F. Zerbetto, and S. Cavalcanti. 2007. Role of the intracellular cavity in potassium channel conductivity. *The journal of physical chemistry. B*. 111:13993-14000.
- Geng, Y., X. Niu, and K.L. Magleby. 2011. Low resistance, large dimension entrance to the inner cavity of BK channels determined by changing side-chain volume. *The Journal of general physiology*. 137:533-548.
- Giri, J., J.M. Tang, C. Wirth, C.M. Peneff, and R. Eisenberg. 2012. Single-channel measurements of an N-acetylneuraminic acid-inducible outer membrane channel in *Escherichia coli*. *European Biophysics Journal*. 41:259-271.
- Haug, T., D. Sigg, S. Ciani, L. Toro, E. Stefani, and R. Olcese. 2004. Regulation of K⁺ flow by a ring of negative charges in the outer pore of BKCa channels. Part I: Aspartate 292 modulates K⁺ conduction by external surface charge effect. *The Journal of general physiology*. 124:173-184.
- Heginbotham, L., M. LeMasurier, L. Kolmakova-Partensky, and C. Miller. 1999. Single streptomyces lividans K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *The Journal of general physiology*. 114:551-560.
- Heginbotham, L., E. Odessey, and C. Miller. 1997. Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K⁺ channel. *Biochemistry*. 36:10335-10342.
- Hille, B. 2001. *Ion channels of excitable membranes*. 3rd ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 01375.
- Horn, G., T.L., T.C. Lin, C. Liu, and B. Eisenberg. 2012. PNP equations with steric effects: a model of ion flow through channels. *The journal of physical chemistry. B*. 116:11422-11441.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B.T. Chait, and R. MacKinnon. 2002a. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*. 417:515-522.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B.T. Chait, and R. MacKinnon. 2002b. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*. 417:523-

526.

- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B.T. Chait, and R. MacKinnon. 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*. 423:33-41.
- Kim, D.M., and C.M. Nimigean. 2016. Voltage-Gated Potassium Channels: A Structural Examination of Selectivity and Gating. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 8.
- Kuo, A., J.M. Gulbis, J.F. Antcliff, T. Rahman, E.D. Lowe, J. Zimmer, J. Cuthbertson, F.M. Ashcroft, T. Ezaki, and D.A. Doyle. 2003. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science*. 300:1922-1926.
- Kuo, M.M., Y. Saimi, C. Kung, and S. Choe. 2007. Patch clamp and phenotypic analyses of a prokaryotic cyclic nucleotide-gated K⁺ channel using *Escherichia coli* as a host. *The Journal of biological chemistry*. 282:24294-24301.
- Liu, J.L., and B. Eisenberg. 2014. Analytical models of calcium binding in a calcium channel. *The Journal of chemical physics*. 141:075102.
- Liu, Y., M. Holmgren, M.E. Jurman, and G. Yellen. 1997. Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron*. 19:175-184.
- Long, S.B., E.B. Campbell, and R. Mackinnon. 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*. 309:897-903.
- Martinac, B., P.R. Rohde, C.G. Cranfield, and T. Nomura. 2013. Patch clamp electrophysiology for the study of bacterial ion channels in giant spheroplasts of *E. coli*. In *Methods Mol Biol*. Humana Press, Totowa, NJ. 966:367-380.
- Nimigean, C.M., J.S. Chappie, and C. Miller. 2003. Electrostatic tuning of ion conductance in potassium channels. *Biochemistry*. 42:9263-9268.
- Nimigean, C.M., and C. Miller. 2002. Na⁺ block and permeation in a K⁺ channel of known structure. *The Journal of general physiology*. 120:323-335.
- Nonner, W., and B. Eisenberg. 1998. Ion permeation and glutamate residues linked by Poisson-Nernst-Planck theory in L-type calcium channels. *Biophysical journal*. 75:1287-1305.
- Santos, J.S., A. Lundby, C. Zazueta, and M. Montal. 2006. Molecular template for a voltage sensor in a novel K⁺ channel. I. Identification and functional characterization of KvLm, a voltage-gated K⁺ channel from *Listeria monocytogenes*. *The Journal of general physiology*.

128:283-292.

- Thompson, A.N., D.J. Posson, P.V. Parsa, and C.M. Nimigean. 2008. Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:6900-6905.
- Uysal, S., L.G. Cuello, D.M. Cortes, S. Koide, A.A. Kossiakoff, and E. Perozo. 2011. Mechanism of activation gating in the full-length KcsA K⁺ channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:11896-11899.
- Zhou, M., J.H. Morais-Cabral, S. Mann, and R. MacKinnon. 2001. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature*. 411, 657–661.

表目與圖目

表一、pQE-60-KcsA 引子列表	39
表二、不同 KcsA 突變通道於+100 mV 下之導電度.....	41
圖一、KcsA 通道結構示意圖.....	42
圖二、KcsA、MthK 和 mSlol 序列及結構之比較.....	43
圖三、兩階段 PCR 突變通道序列之步驟	44
圖四、運用 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit 製作 KcsA 突變通道之序列	46
圖五、KcsA DNA 轉殖與質體放大	48
圖六、定序結果與序列比對	49
圖七、蛋白質純化膠體層析法	50
圖八、KcsA E71A/A111Q 製備過程各溶液之膠體電泳	52
圖九、KcsA E71A 蛋白脂質體之膠體電泳	53
圖十、KcsA 突變通道之單通道電流.....	54
圖十一、具代表性之 KcsA 單通道電流-電壓曲線(I-V curve)圖.....	55

附表與附圖

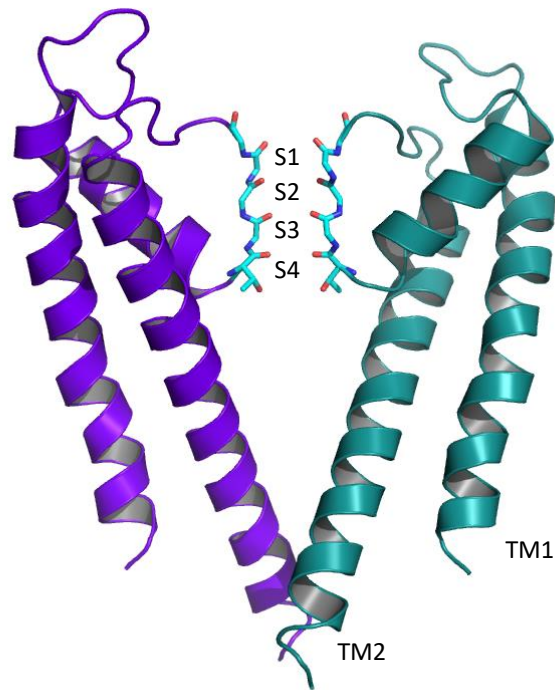
表一、pQE-60-KcsA 引子列表。此表為用以放大 KcsA 通道並產生突變之引子序列，引子名稱中 F 代表 forward，R 代表 reverse。pQE60_KcsA_vector_5F 和 pQE60_KcsA_vector_6R 分別與 KcsA 序列的 5'端及 3'端位置互補；其餘引子在特定位點產生突變。以 pQE60_KcsA_A108E_1F 為例，此引子可將 alanine¹⁰⁸ 突變為 glutamate。序列中突變的位點以底線標示，產生鹼基改變之位置以紅色標示。

引子名稱	序列 5' → 3'
pQE60_KcsA_vector_5F	GTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTA (36 bp, Tm: 65.8°C)
pQE60_KcsA_vector_6R	GCGGCAACCGAGCGTTCTGAACAA (24 bp, Tm: 67.6°C)
pQE60_KcsA_A108E_1F	TTCGGTCTGGTGACCG <u>GAG</u> GCGCTGGCCACCT (31 bp, Tm: 78.6°C)
pQE60_KcsA_A108E_2R	AGGTGGCCAGCGC <u>CTC</u> GGTCACCAGACCGAA (31 bp, Tm: 78.6°C)
pQE60_KcsA_A111E_1F	CGCCGCGCTGG <u>GAG</u> ACCTGGTTCGTCGGCCGG (31 bp, Tm: 83.8°C)
pQE60_KcsA_A111E_2R	CCG GCCGACGAACCAGGT <u>CTC</u> CAGCGCGGCG (31 bp, Tm: 83.8°C)
pQE60_KcsA_A111N_1F	CGCCGCGCTG <u>AAC</u> ACCTGGTTCGTCGGCCGG (31 bp, Tm: 84.5°C)
pQE60_KcsA_A111N_2R	CCG GCCGACGAACCAGGT <u>GTT</u> CAGCGCGGCG (31 bp, Tm: 84.5°C)
pQE60_KcsA_A111Q_1F	TGACCGCCGCGCTG <u>CAG</u> ACCTGGTTCGTCGG (31 bp, Tm: 89°C)
pQE60_KcsA_A111Q_2R	CCGACGAACCAGGT <u>CTG</u> CAGCGCGGCGGTCA (31 bp, Tm: 89°C)
pQE60_KcsA_T112E_1F	CCGCGCTGGCC <u>GAG</u> TGGTTCGTCGGCCGGGA (31 bp, Tm: 83.2°C)
pQE60_KcsA_T112E_2R	TCCCGGCCGACGAACCA <u>CTC</u> GGCCAGCGCGG (31 bp, Tm: 83.2°C)
pQE60_KcsA_T112N_1F	CCGCGCTGGCC <u>AACT</u> TGGTTCGTCGGCCGGGA (31 bp, Tm: 84.5°C)
pQE60_KcsA_T112N_2R	TCCCGGCCGACGAACCAG <u>GTT</u> GGCCAGCGCGG (31 bp, Tm: 84.5°C)

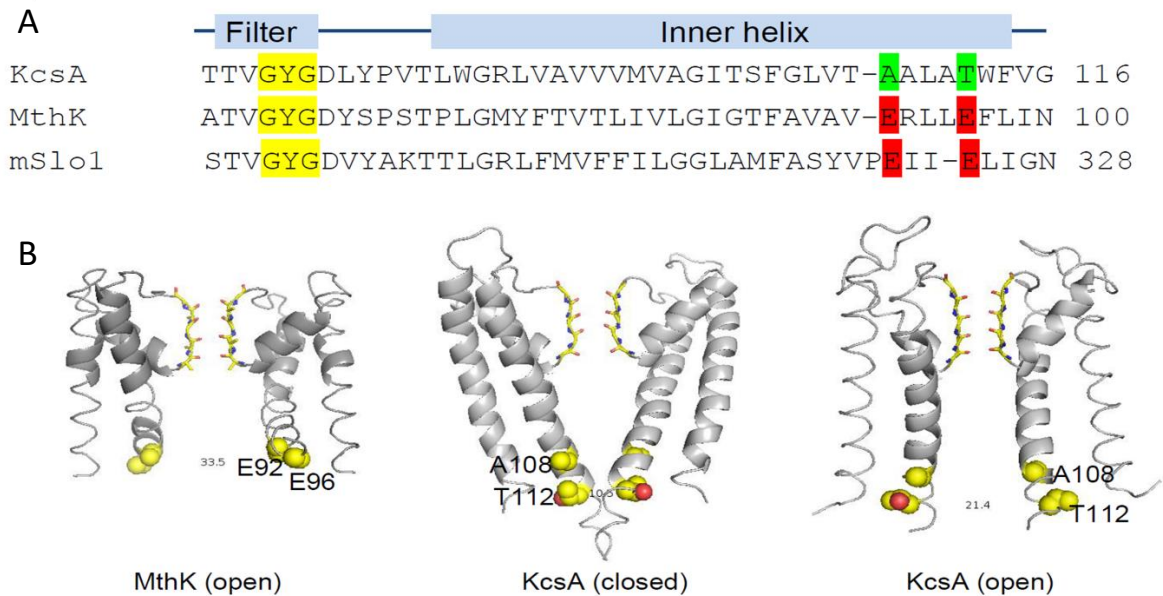
表二、不同 KcsA 突變通道於+100 mV 下之導電度。此表列出不同 KcsA 突變通道在+100mV 所測量到的單通道導電度。n 值代表成功記錄到電流的通道數目。在 pH 4.0 中，E71A/A108E 和 E71A/A111E 之平均導電度相較於 E71A (control) 來得高，E71A/A111Q 和 E71A/T112E 之平均導電度則略小於 E71A；在 pH 5.0 中，E71A/A111E 之平均導電度增加，然而 E71A/T112E 之平均導電度並無顯著上升。k 值為在不同電壓及不同通道中所記錄到的資料筆數。

KcsA 突變蛋白	pH	導電度(pS)	n 值	k 值
E71A (control)	4	77.39 ±0.59	3	18
E71A/A108E	4	119.09 ±13.86	4	7
E71A/A111E	4	88.99	1	4
E71A/A111Q	4	42.13*	1	1
E71A/T112E	4	48.60 ±3.09	3	5
E71A/A111E	5	188.13	1	3
E71A/T112E	5	58.52	1	3

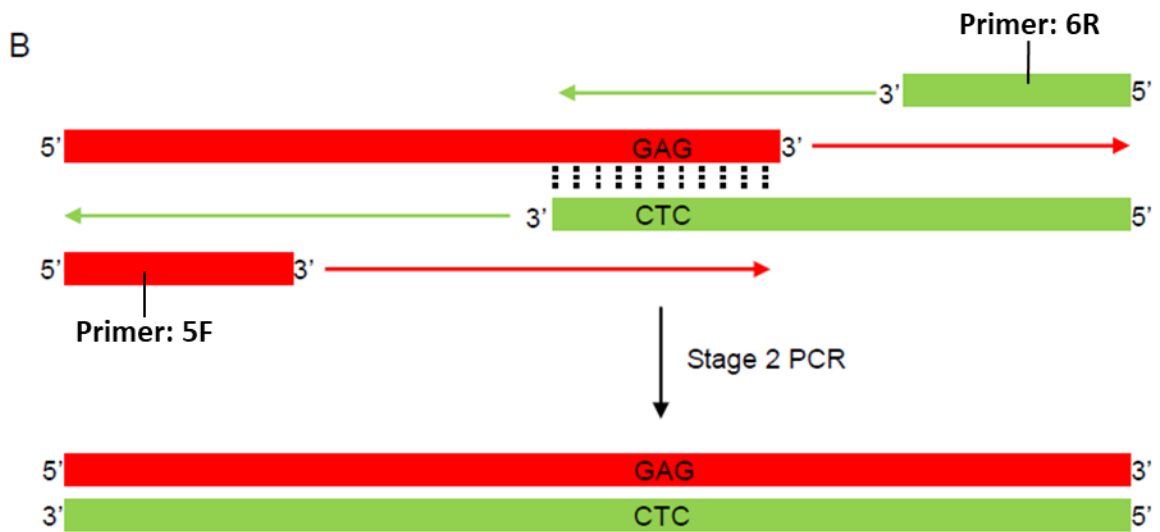
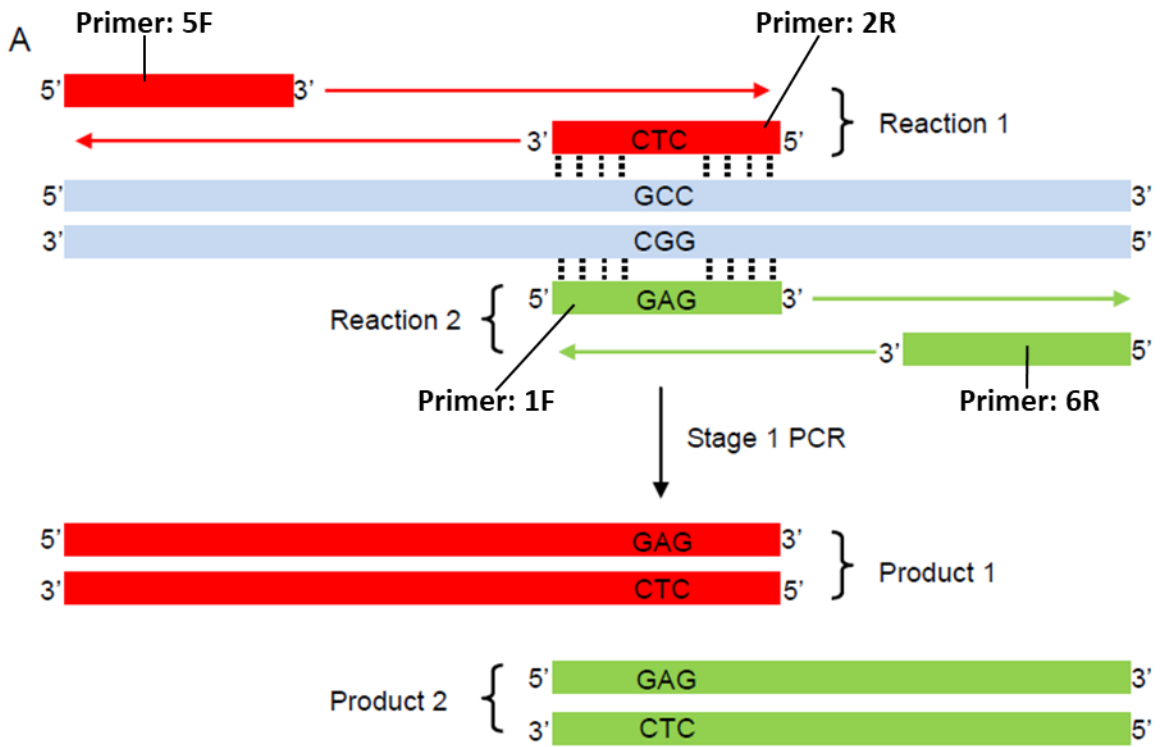
*同一通道於不同時間多次測量(n=39)之平均值為 42.08 ±3.55 pS。



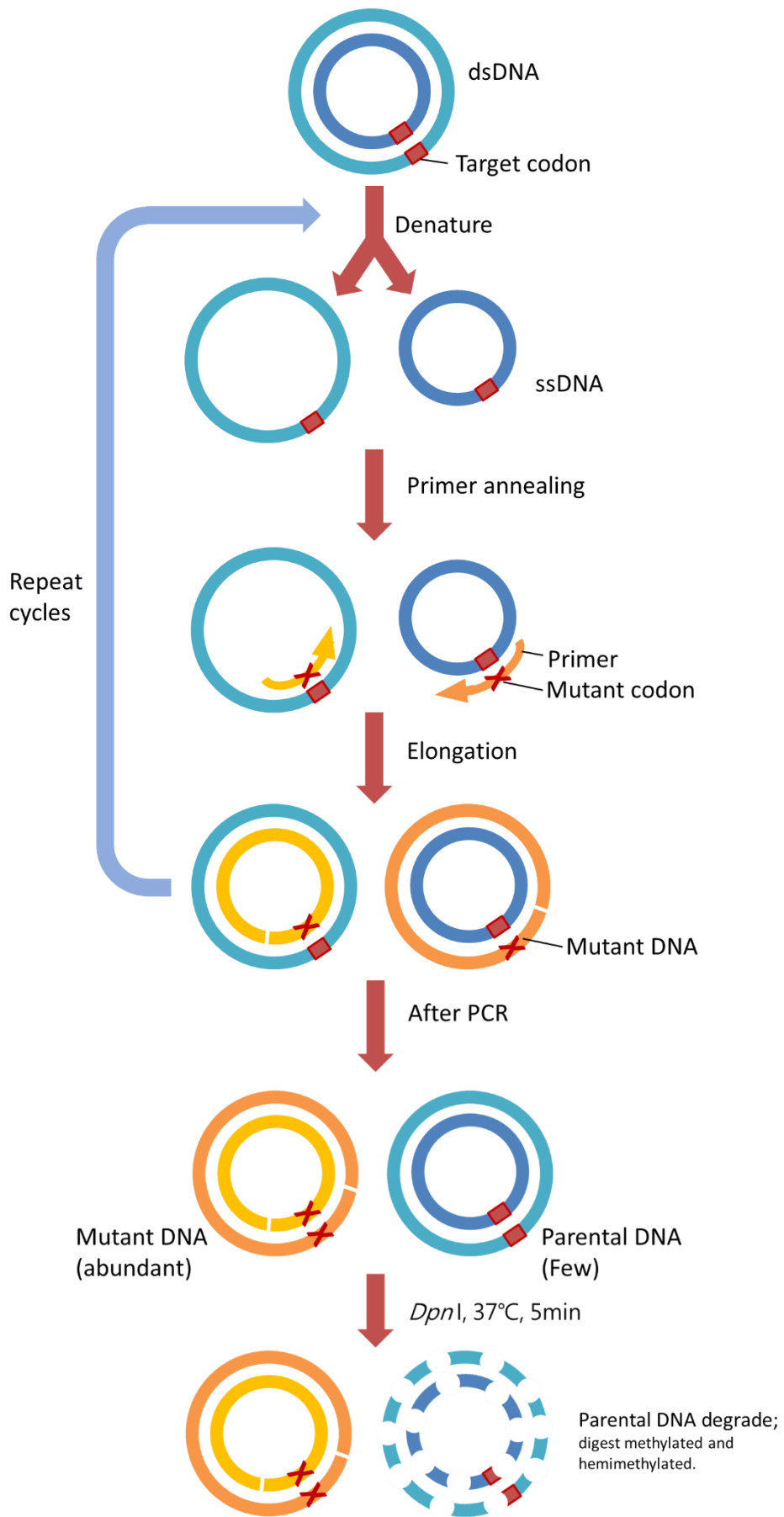
圖一、KcsA 通道結構示意圖。KcsA 為一種鉀離子通道膜蛋白，由相同的四個子單元組成(為求清晰，上圖僅顯示出兩個子單元)，一個子單元具有兩個穿膜區段，稱為 TM1 和 TM2，中央孔洞有篩選鉀離子的選擇性過濾器(selective filter)，其胺基酸之主鏈與支鏈構成四個結合位點(從下至上為 S1、S2、S3 和 S4)，負責與鉀離子結合並形成離子穿越通道之路徑。通道蛋白的上方為細胞外側，下方為細胞內側，而四個子單元的 TM2 構成了通道的門閥(gate)，用來控制通道的開啟和關閉。此示意圖的 KcsA 通道為關閉狀態(pdb ID: 1J95, Zhou, 2001)。本圖由陳仁祥教授提供。



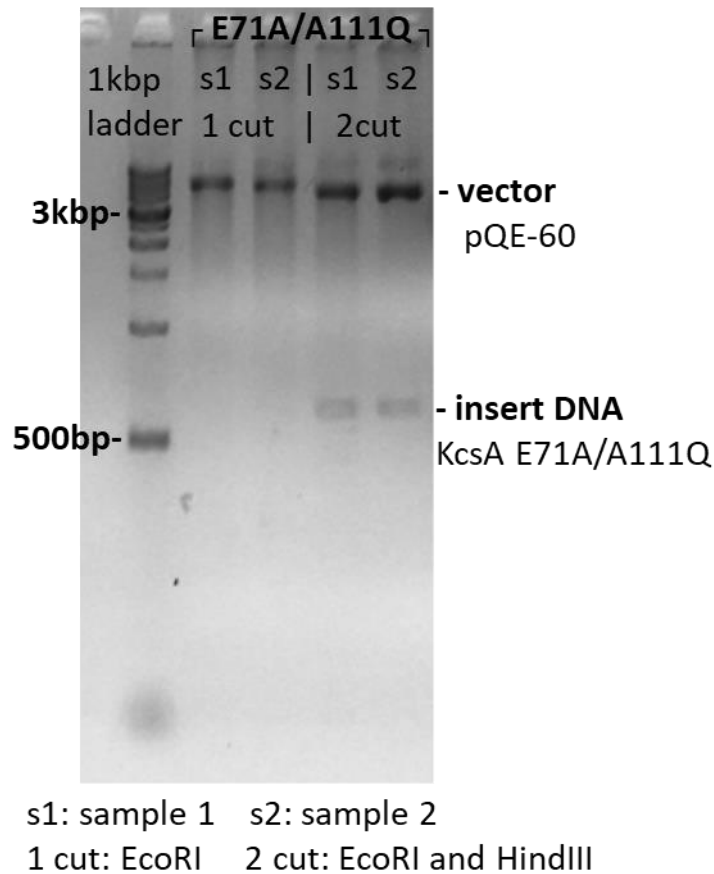
圖二、KcsA、MthK 和 mSlo1 序列及結構之比較。(A) 鉀離子通道之選擇性過濾器的序列大多為 TVGYG，且 GYG 為所有鉀離子通道所共有，在演化過程中非常保守(Doyle et al., 1998)。MthK 和 mSlo1 通道相對於 KcsA 通道屬於導電度較大之鉀離子通道，其可能原因為形成孔洞壁之穿膜區(inner helix)靠內側入口處帶負電的胺基酸能夠吸引鉀離子進入通道內部腔室，提高其通道導電度。(B) MthK 之 inner helix 上具有兩個帶負電胺基酸，分別為 E92 與 E96 (與 mSlo1 通道的 E321 與 E324 同源)。且將 KcsA 和 mSlo1 進行序列比對，推估 mSlo1 中的 E321 位置對應到 KcsA 通道上的 A108，E324 對應到 T112。比對 mSlo1 與 MthK 序列可知，mSlo1 序列上兩個負電胺基酸位點間有一個間隙(gap)，於是 mSlo1 E324 對應至 KcsA 序列之位點可能為 A111 或 T112。MthK (pdb ID: 1LNQ)及 KcsA 通道 (closed pdb ID: 1BL8; oped pdb ID: 3PJS)之結構以 PyMol 軟體呈現。本圖由陳仁祥教授提供。



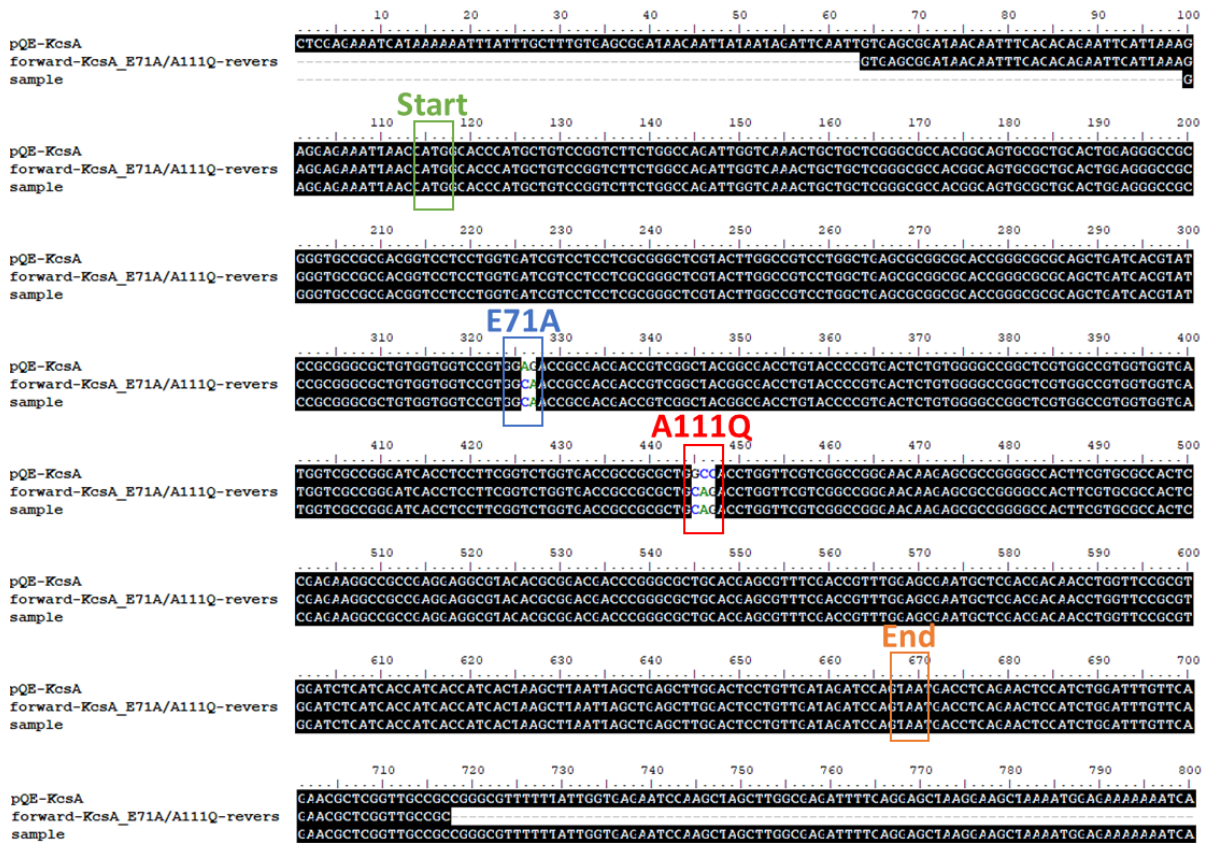
圖三、兩階段 PCR 突變通道序列之步驟。以 A108E 點突變為例，運用兩階段 PCR 之操作。(A) 第一階段是係以放大全段 KcsA 序列之引子以及具有點突變位點之引子(表一)，以 pQE-60-KcsA E71A 之 plasmid DNA 作為模板，分別進行反應 1 與反應 2 (reaction 1 和 2)，製作出帶有特定位點的突變 DNA 片段(product 1 和 2)。(B) 第二階段即是使用第一次 PCR 之產物作為模板，和放大全段 KcsA 序列之引子，將具有特定位點突變的 DNA 片段延長至全段 KcsA 序列，即可製作出具有點突變(GCC→GAG，A→E)之 KcsA 通道序列。本圖由陳仁祥教授提供之原圖修改而成。



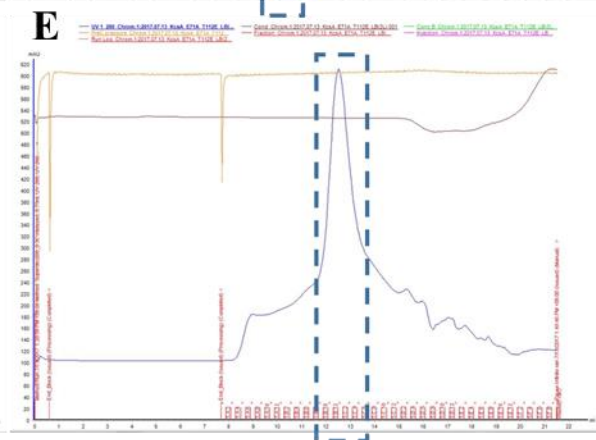
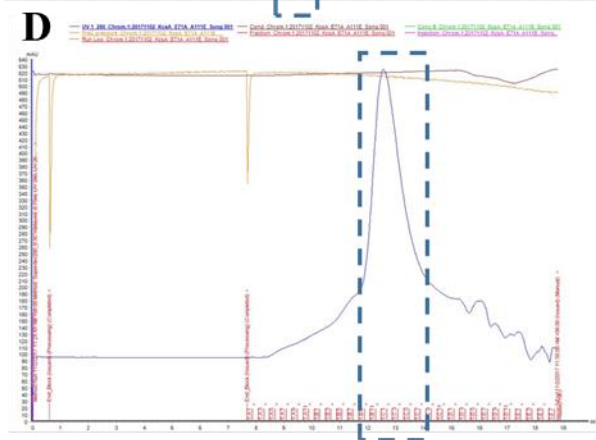
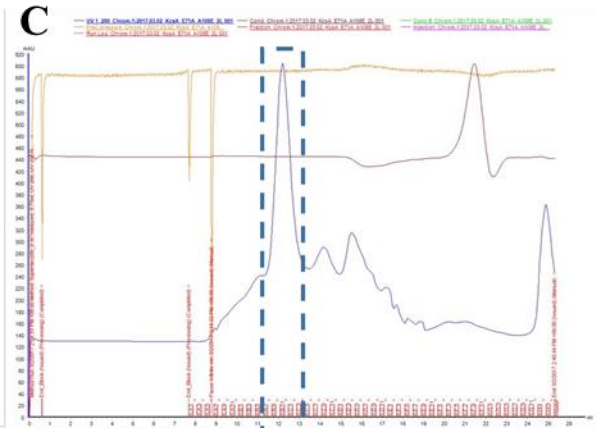
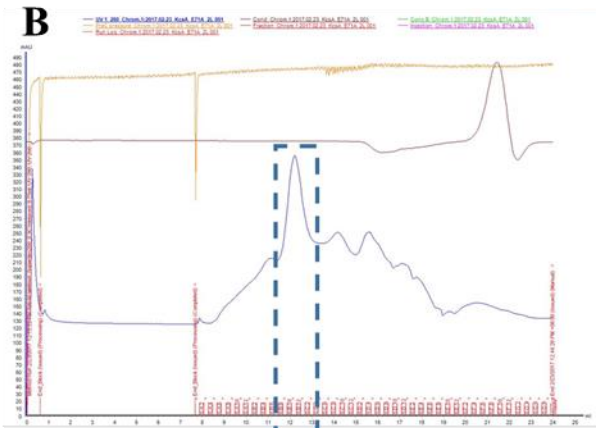
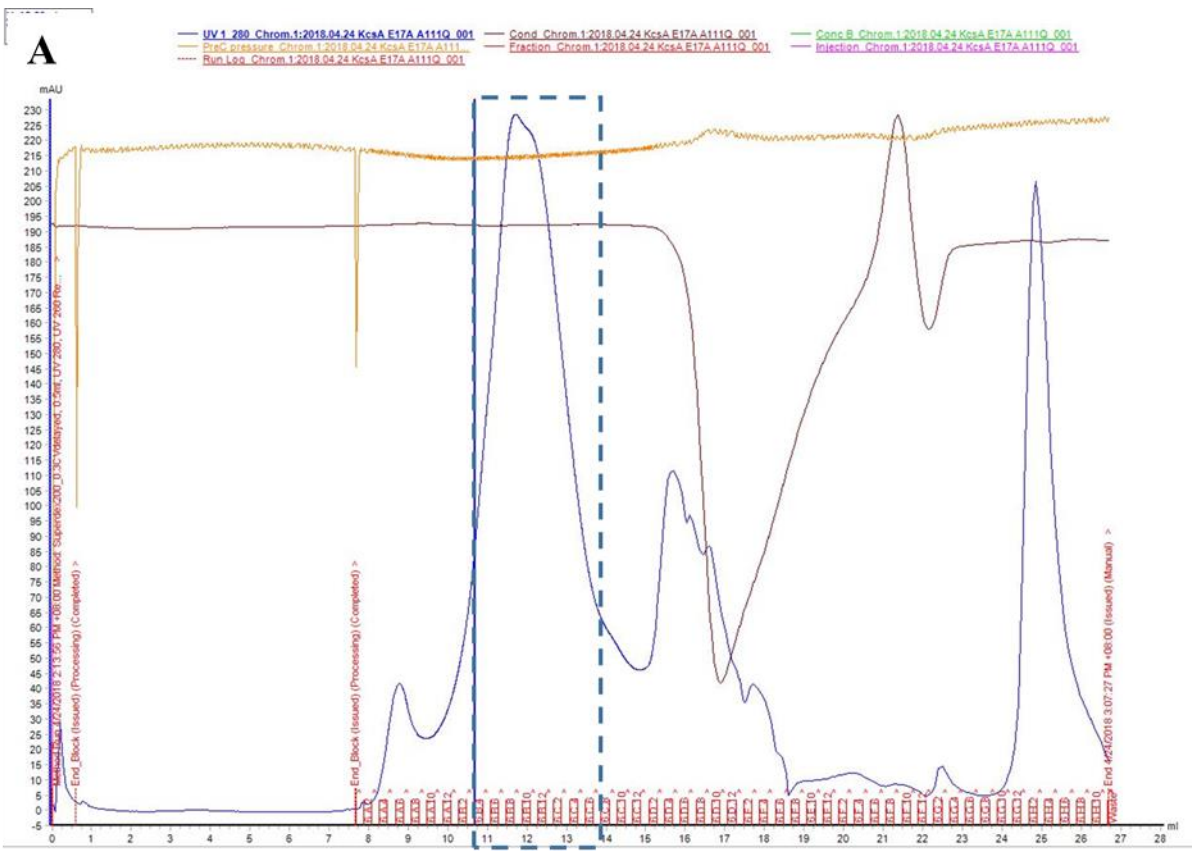
圖四、運用 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit 製作 KcsA 突變通道之序列。作為模板的 pQE-60-KcsA E71A 質體 DNA 以淺藍色和藍色圓圈表示，紅色矩形代表欲突變之位點，黃色及橘色箭頭代表引子，紅色交叉代表引子上的突變位點。在 PCR 過程中，DNA 序列於高溫(95 °C) 中解開(denature)雙股結構。在 annealing 步驟中，具有突變位點之引子和模板 DNA 因互補結合。在 elongation 步驟中，藉由聚合酶將引子延長。反覆進行 denature、annealing 和 elongation 步驟 18 次，製作且放大具有點突變之 KcsA 全段 DNA。PCR 反應完畢後，於產物中加入 DpnI 限制內切酶，以降解具有甲基化之 DNA 序列，藉以去除模板 DNA 序列，最終產物中僅存具點突變之 KcsA 序列。



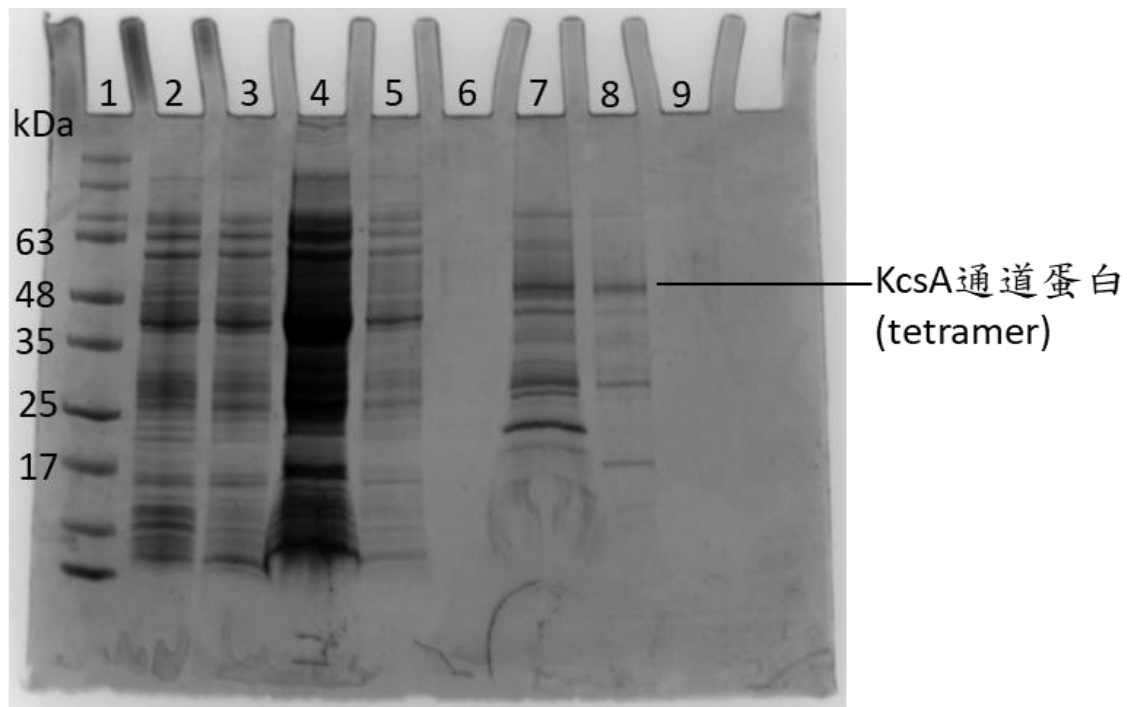
圖五、KcsA DNA 轉殖與質體放大。將 PCR 產物轉殖至 *Escherichia coli* (品系：XL-1-Blue 或 DH5 α) 中放大質體，萃取 plasmid DNA 並以酵素切割和膠體電泳確認其 DNA 之長度。單以 EcoRI (1 cut) 切割後，pQE-60-KcsA DNA 長度應為 3905 bp，同時以 EcoRI 及 HindIII (2 cut) 切割後，insert 長度應為 654 bp、質體長度應為 3251 bp。此圖以 KcsA E71A/A111Q 為例，單一酵素切割產生之片段出現於 3 kbp 與 4 kbp 之間；雙酵素切割產生之片段，insert 出現在大於 500 bp 位置，質體出現在略高於 3 kbp 且低於單一酵素切割之位置，結果符合預期。



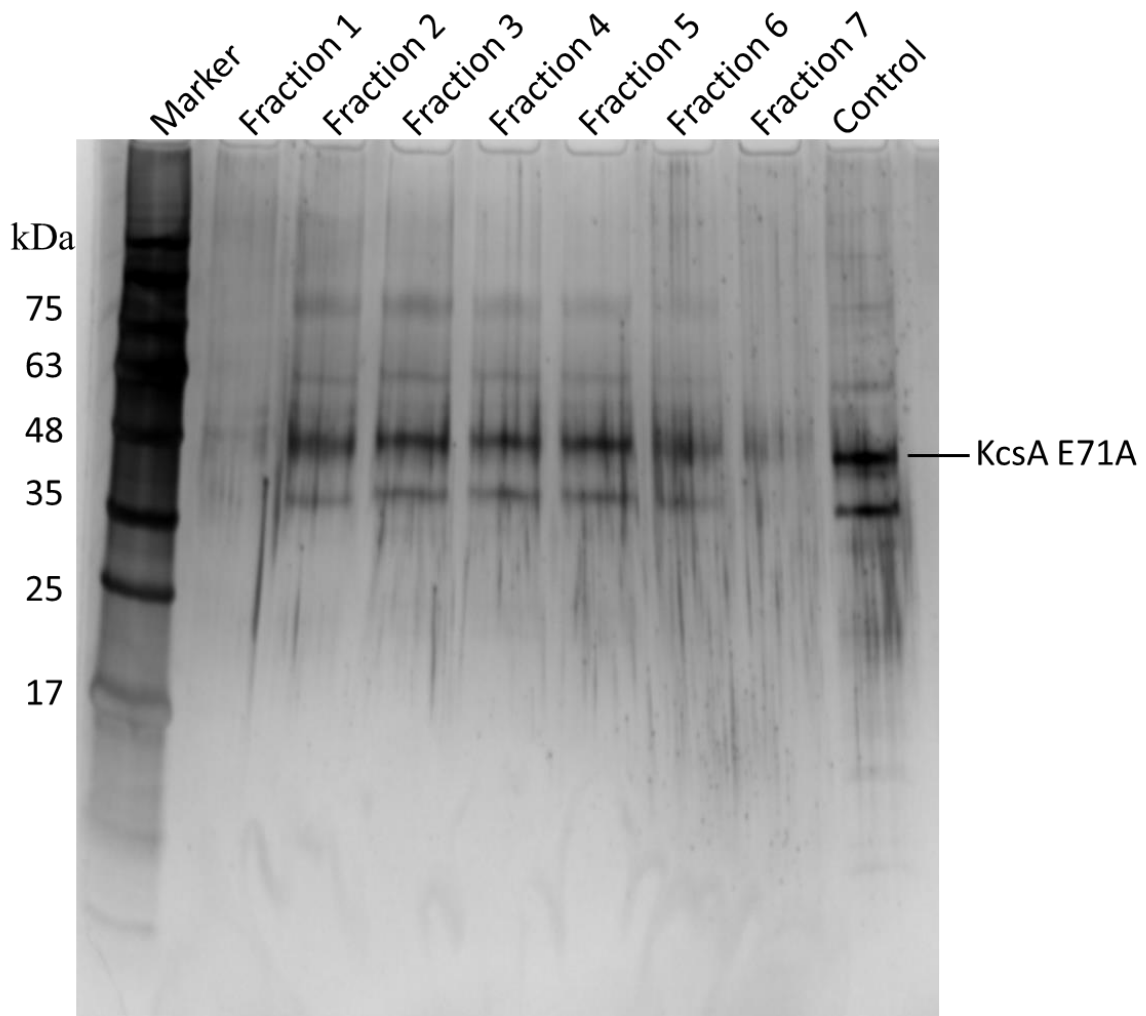
圖六、定序結果與序列比對。以 KcsA_E71A/A111Q 為例，此圖中第一條為 pQE-60-KcsA 之序列、第二條為包含 forward 和 reverse 引子之 KcsA_E71A/A111Q 序列、第三條為 E71A/A111Q 定序之結果。綠色方框為 KcsA 序列啟始密碼子(ATG)，橘色方框為 KcsA 序列終止密碼子(TAA)；藍色方框處為 E71A 之位置，紅色方框處為 A111 之位置。比較第二與第三條序列，可見 GCC 已突變為 CAG，代表成功製作出 KcsA E71A/A111Q 之突變 DNA 序列。



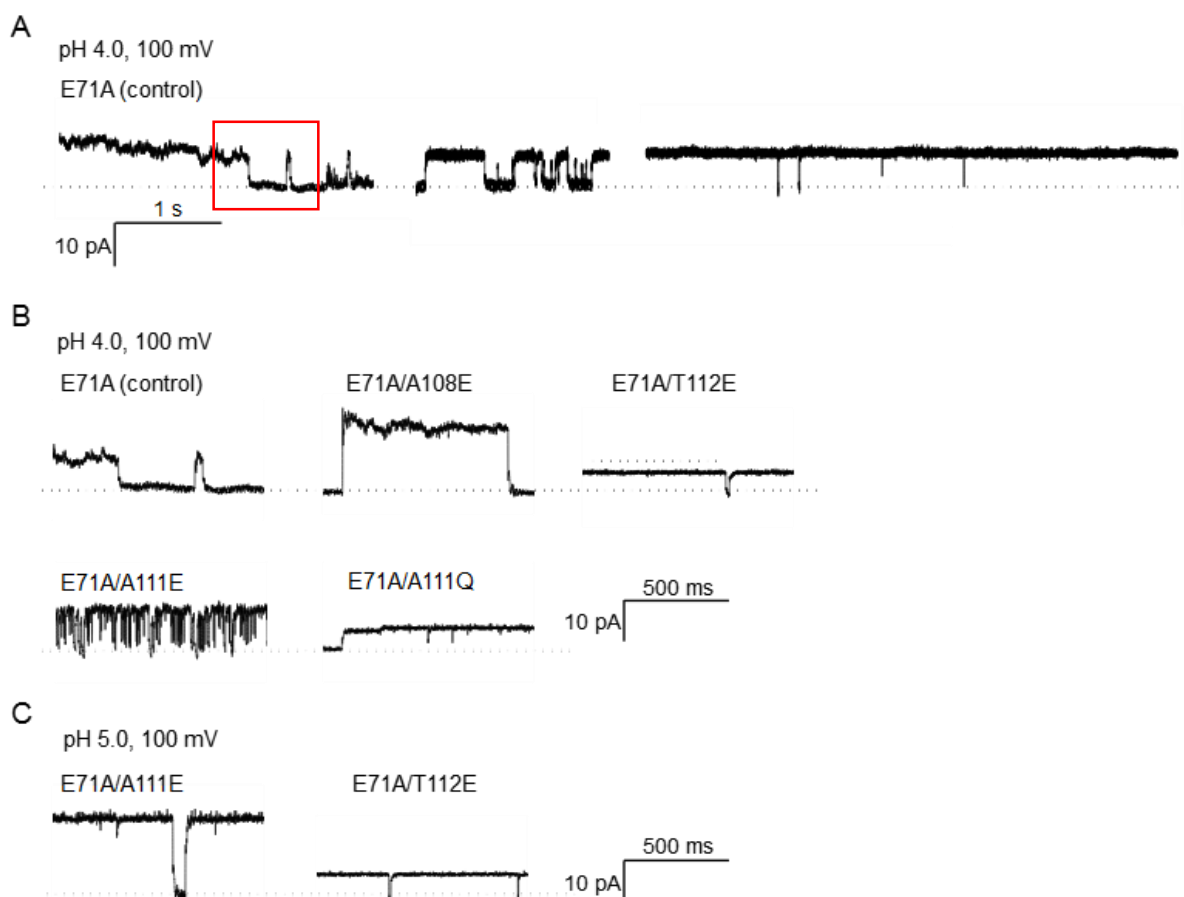
圖七、蛋白質純化膠體層析法。經由蛋白質純化層析儀依通過時間之快慢，將蛋白溶液分至 96 孔盤中，並測得各區段之蛋白質吸光值，圖中以藍線表示。最初之高峰對應 KcsA 通道蛋白大量出現之位置；圖中藍色虛線方框，對應於 96 孔盤中相應溶液之收集位置。(A) E71A/A111Q 之膠體層析結果。(B) E71A (control)之膠體層析結果。(C) E71A/A108E 之膠體層析結果。(D) E71A/A111E 之膠體層析結果。(E) E71A/T112E 之膠體層析結果。



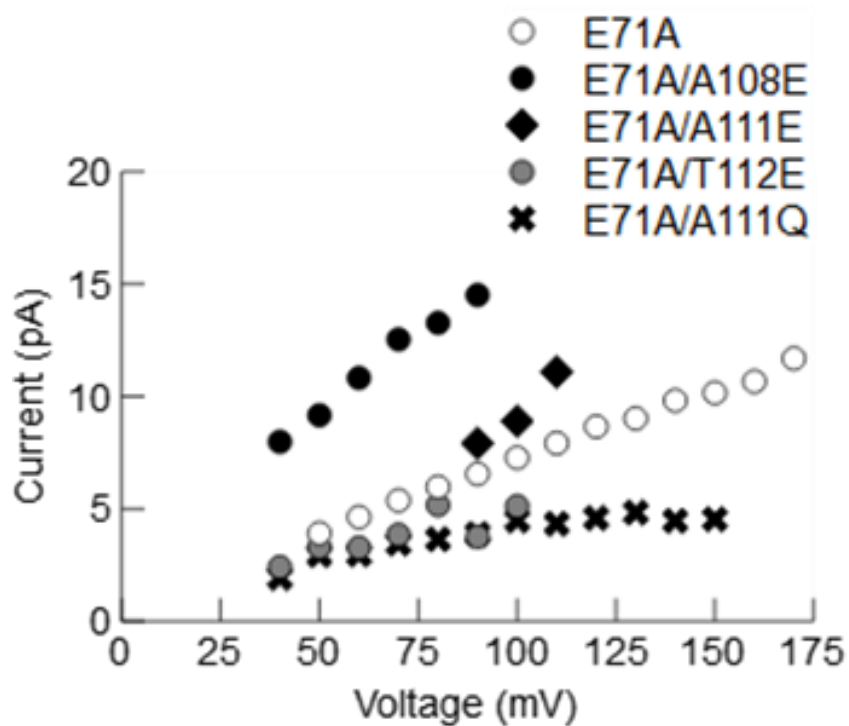
圖八、KcsA E71A/A111Q 製備過程各溶液之膠體電泳。KcsA 通道蛋白之單一子單元(monomer)約莫為 17 kDa、四聚體(tetramer)約為 60 kDa。此膠圖為製備 E71A/A111Q 過程之各階段溶液：(1) marker 2 μ l、(2) 破菌混合液 2 μ l、(3) 破菌離心後上清液 2 μ l、(4) flow through (FT) 10 μ l、(5) wash 1 (20 mM imidazole) 10 μ l、(6) wash 2 (50 mM imidazole) 10 μ l、(7) 第一次濃縮液(加入 300 mM imidazole 產生之 elute solution 經 Vivaspin turbo15 ml/30 kDa 離心濃縮後) 2 μ l、(8) 第一次濃縮液經第二次濃縮後 2 μ l、(9) 經第二次濃縮後 FT 2 μ l。經由電泳分析比較純化蛋白之效率，在 (4) flow through 中，蛋白濃度大於其他溶液，代表 Nickel-NTA 與蛋白結合的步驟中，有許多蛋白未和 Nickel-NTA 結合而流失。



圖九、KcsA E71A 蛋白脂質體之膠體電泳。此膠圖為 KcsA E71A 蛋白脂質體之七個分管溶液，進行 SDS 膠體電泳及銀染。圖中可見七個分管溶液皆含有 E71A 通道之蛋白脂質體，其中第二至六管中含量較第一與七管高，且蛋白出現在約為 50 kDa 之位置。



圖十、KcsA 突變通道之單通道電流。(A) 在 pH 4、+100 mV 中，三個不同的 KcsA E71A (control) 通道之單通道電流，可見通道開啟之頻率有數種狀況：低度開啟、開啟與關閉時間相近、長時間開啟而僅有短暫關閉等情況。紅框處放大後即為下方 B 圖中 E71A 電流記錄之區段。(B) 在 pH 4、+100 mV 中，各個 KcsA 突變通道之單通道電流比較。E71A/A108E 和 E71A/A111E 與 E71A 相比電流較大，且 E71A/A111Q 和 E71A/T112E 的電流則無增加。(C) 於 pH 5.0、+100 mV 中，E71A/A111E 的電流比在 pH 4.0 時更大，而 E71A/T112E 的電流無變化。



圖十一、具代表性之 KcsA 單通道電流-電壓曲線(I-V curve)圖。於細胞內側(trans 小杯)記錄溶液 pH 為 4.0，圖中橫軸為電壓，縱軸為電流，斜率代表其通道導電度，空心圓圈為 E71A、黑色圓形為 E71A/A108E、黑色菱形為 E71A/A111E、灰色圓形為 E71A/T112E、黑色交叉為 E71A/A111Q，各點為 KcsA 通道代表性之數值。E71A/A108E 和 E71A/A111E 之斜率皆比 E71A 更大，E71A/A111Q 和 E71A/T112E 則沒有增加。此一結果代表在 KcsA 通道上，影響通道導電度之兩個關鍵位點應該為 A108 和 A111，而非 T112。

附錄一、本研究所產生之 KcsA 突變通道

KcsA 突變通道	質體定序	脂質體	電流記錄
E71A (control)	V	V	V
E71A/A108E	V	V	V
E71A/A111E	V	V	V
E71A/A111N	V		
E71A/A111Q	V	V	V
E71A/T112E	V	V	V
E71A/T112N	V		

*已完成之項目以 V 標示。