

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20520110153726

UDC _____

廈門大學

博 士 学 位 论 文

核糖体蛋白 RpsA 的分子机制和结构研究

**Molecular mechanisim and structural studies of
ribosomal protein S1**

杨娟娟

指导教师姓名: 林东海 教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2014 年 11 月 26 日

论文答辩时间: 2014 年 12 月 10 日

学位授予日期: 2014 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 12 月

Ph.D. Dissertation
(September 2011- July 2014)

**Molecular mechanism and structural studies of
ribosomal protein S1**

Ph.D. Candidate: Juanjuan Yang

Supervisor: Prof. Donghai Lin

Department of Chemistry Biology

Xiamen University

December, 2014

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

| | |
|--|-----|
| 摘要 | I |
| Abstract | III |
| 缩略语表 | V |
| 第一章 绪论 | 1 |
| 1.1 吡嗪酰胺：使用 50 年的抗结核病一线药物 | 1 |
| 1.2 PZA 靶向反式翻译过程核糖体蛋白 RpsA 的研究[28] | 4 |
| 1.2.1 反式翻译(<i>trans</i> -translation)过程 | 5 |
| 1.2.2 核糖体蛋白 RpsA | 6 |
| 1.3 生物大分子 X 射线晶体学技术 | 7 |
| 1.3.1 X 射线晶体学的基本过程 | 8 |
| 1.3.1.1 X 射线晶体学解析蛋白质结构的流程 | 8 |
| 1.3.1.2 蛋白质结晶 | 9 |
| 1.3.1.2.1 蛋白质结晶的原理 | 9 |
| 1.3.1.2.2 蛋白质结晶的方法 | 10 |
| 1.3.1.2.3 影响蛋白质结晶的主要因素 | 10 |
| 1.3.2 衍射数据的收集和处理 | 11 |
| 1.3.3 X 射线晶体学原理 | 12 |
| 1.3.4 相位的解析 | 14 |
| 1.3.4.1 多波长和单波长反常散射法(MAD/SAD) | 14 |
| 1.3.4.2 分子置换法 | 15 |
| 1.3.5 模型构建和结构修正 | 16 |
| 1.4 本论文研究的目的和意义 | 17 |
| 参考文献 | 18 |
| 第二章 材料与方法 | 24 |
| 2.1 实验材料 | 24 |
| 2.1.1 本论文使用的载体及菌株 | 24 |
| 2.1.2 主要试剂与耗材 | 24 |
| 2.1.3 本论文使用的主要仪器 | 25 |
| 2.1.4 蛋白质结晶条件筛选试剂盒 | 27 |
| 2.2 常用试剂配制 | 27 |
| 2.2.1 琼脂糖电泳试剂 | 27 |
| 2.2.2 SDS-PAGE 蛋白质电泳试剂 | 28 |
| 2.2.3 细菌培养及蛋白质的表达纯化相关试剂 | 29 |
| 2.2.4 感受态细胞制备相关试剂 | 29 |
| 2.2.5 蛋白质纯化相关试剂 | 30 |
| 2.2.6 考查蛋白稳定性及均一性的各类缓冲液的配制 | 30 |
| 2.3 实验方法 | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.1 大肠杆菌感受态的制备..... | 32 |
| 2.3.2 重组质粒的转化..... | 33 |
| 2.3.3 重组质粒的小量提取..... | 33 |
| 2.3.4 靶标蛋白 RpsA 重组质粒的构建 | 34 |
| 2.3.4.1 引物的设计..... | 35 |
| 2.3.4.2 目的基因的克隆与表达载体的构建..... | 36 |
| 2.3.4.3 构建的表达载体的阳性克隆的鉴定..... | 39 |
| 2.3.5 靶标蛋白 MtRpsA 的表达..... | 39 |
| 2.3.5.1 靶标蛋白 MtRpsA 的小量表达..... | 39 |
| 2.3.5.2 靶标蛋白 MtRpsA 的大量表达..... | 40 |
| 2.3.6 靶标蛋白 MtRpsA 的纯化..... | 41 |
| 2.3.6.1 亲和层析 Ni 柱纯化靶标蛋白 MtRpsA..... | 41 |
| 2.3.6.2 阴离子交换层析 Ni 柱初步纯化靶标蛋白 MtRpsA..... | 41 |
| 2.3.6.3 凝胶过滤层析纯化靶标蛋白 MtRpsA..... | 42 |
| 2.3.7 适合靶标蛋白 MtRpsA 缓冲液的选择..... | 43 |
| 2.3.7.1 靶标蛋白 MtRpsA 的稳定性鉴定..... | 43 |
| 2.3.7.2 用圆二色谱技术测定蛋白质的二级结构..... | 44 |
| 2.3.7.3 动态光散射技术测定蛋白质的聚集状态..... | 44 |
| 2.3.8 靶标蛋白 MtRpsA 结晶条件筛选..... | 46 |
| 2.3.8.1 蛋白质样品及结晶条件的准备..... | 46 |
| 2.3.8.2 利用座滴法进行蛋白质结晶条件的初步筛选..... | 46 |
| 2.3.8.3 利用悬滴法进行蛋白质结晶条件的优化..... | 47 |
| 2.3.9 蛋白质晶体衍射数据的收集及解析..... | 47 |
| 2.3.9.1 防冻液的筛选..... | 48 |
| 2.3.9.2 晶体分辨率的筛选、衍射数据的收集与处理..... | 48 |
| 2.3.10 本论文使用的其他实验技术..... | 49 |
| 2.3.10.1 MALDI-TOF-MS 技术 | 49 |
| 2.3.10.2 等温滴定量热 (ITC) 技术..... | 49 |
| 2.3.10.3 EMSA 实验[5, 6]..... | 50 |
| 2.3.10.4 EGS 交联实验..... | 51 |
| 2.3.10.5 SeMet 标记蛋白质样品的制备[7] | 51 |
| 2.3.10.6 NMR 实验 | 52 |
| 参考文献 | 54 |

第三章 小分子药物吡嗪酸(POA)靶向 RpsA(the ribosomal protein

S1)的结构生物学研究 55

3.1 引言 55

3.2 实验结果与分析 56

3.2.1 MtRpsA1/28a 蛋白表达纯化与结晶条件初步筛选..... 56

3.2.1.1 MtRpsA1/28a 蛋白亲和层析纯化、凝胶过滤纯化及结晶条件初步筛选..... 56

3.2.1.2 MtRpsA1/28a 蛋白纯化方法的优化与聚集状态的分析..... 58

3.2.2 重新构建载体的表达、纯化及结晶条件筛选..... 59

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.2.2.1 | 新表达载体的构建..... | 59 |
| 3.2.2.2 | 新构建载体的预表达..... | 61 |
| 3.2.2.3 | 新构建载体的大量表达与纯化..... | 62 |
| 3.2.3 | MtRpsA8/28a 蛋白大量表达、纯化与结晶条件初步筛选..... | 62 |
| 3.2.3.1 | MtRpsA8/28a 蛋白 Ni 柱的亲和层析纯化..... | 62 |
| 3.2.3.2 | 目的蛋白 MtRpsA8/28a 强阴离子交换层析纯化..... | 63 |
| 3.2.3.3 | 考察目的蛋白 MtRpsA8/28a 的稳定性和聚集状态分析..... | 64 |
| 3.2.3.4 | 目的蛋白 MtRpsA8/28a 凝胶过滤层析纯化..... | 65 |
| 3.2.3.5 | 目的蛋白 MtRpsA8/28a 结晶条件筛选..... | 65 |
| 3.2.4 | MtRpsA 蛋白的 S1-domain 生物学功能分析..... | 66 |
| 3.2.5 | MtRpsA ^{CTD} 蛋白载体构建、表达纯化及结晶条件初筛..... | 68 |
| 3.2.5.1 | MtRpsA ^{CTD} 蛋白克隆与载体构建..... | 68 |
| 3.2.5.2 | MtRpsA ^{CTD} 蛋白重组质粒的预表达..... | 69 |
| 3.2.5.3 | MtRpsA ^{CTD} 蛋白大量表达、纯化与结晶条件初筛..... | 70 |
| 3.2.5.3.1 | MtRpsA ^{CTD} 蛋白大量表达和亲和层析纯化..... | 70 |
| 3.2.5.3.2 | MtRpsA ^{CTD} 蛋白阴离子交换层析纯化..... | 71 |
| 3.2.5.3.3 | 考察 MtRpsA ^{CTD} 蛋白稳定性和聚集状态均一性..... | 71 |
| 3.2.5.3.4 | 目的蛋白 MtRpsA ^{CTD} 凝胶过滤层析纯化..... | 72 |
| 3.2.5.3.5 | 目的蛋白 MtRpsA ^{CTD} 的 EGS 交联实验和质谱分子量测定实验..... | 74 |
| 3.2.5.3.6 | 目的蛋白 MtRpsA ^{CTD} 结晶条件初筛..... | 74 |
| 3.2.6 | 衍射用的目的蛋白 MtRpsA ^{CTD} 晶体的获得..... | 77 |
| 3.2.6.1 | 目的蛋白 MtRpsA ^{CTD} 晶体生长条件优化..... | 77 |
| 3.2.6.2 | 目的蛋白 MtRpsA ^{CTD} 晶体防冻剂的筛选和优化..... | 78 |
| 3.2.6.3 | 衍射用的 SeMet-MtRpsA ^{CTD} 蛋白晶体的获得..... | 78 |
| 3.2.6.4 | 衍射用的 MtRpsA ^{CTD} -POA 晶体的获得..... | 79 |
| 3.2.7 | MtRpsA ^{CTD} 和 MtRpsA ^{CTD} -POA 蛋白晶体衍射数据的收集与结构解析..... | 82 |
| 3.2.8 | MtRpsA ^{CTD} 蛋白与 MtRpsA ^{CTD} -POA 复合物的晶体结构分析..... | 84 |
| 3.2.8.1 | 目的蛋白 MtRpsA ^{CTD} 的晶体结构..... | 85 |
| 3.2.8.2 | MtRpsA ^{CTD} -POA 复合物晶体结构显示非对称单位的两个分子几乎具有相同构象..... | 86 |
| 3.2.8.3 | MtRpsA ^{CTD} -POA 复合物晶体结构显示 POA 的结合对 S1-domain 构象的影响..... | 86 |
| 3.2.8.4 | MtRpsA ^{CTD} -POA 复合物晶体结构上 POA 的结合位点..... | 87 |
| 3.2.8.5 | MtRpsA ^{CTD} -POA 复合物晶体结构的 POA 结合位点验证..... | 89 |
| 3.2.8.6 | 反式翻译过程中 PZA 作用的分子机制..... | 92 |
| 3.2.8.7 | 全长 MtRpsA 三维结构的模拟..... | 93 |
| 3.2.9 | 讨论..... | 94 |
| 参考文献 | | 98 |
| 第四章 | 核糖体蛋白 RpsA PZA 耐药性的结构生物学研究..... | 100 |
| 4.1 | 引言..... | 100 |
| 4.2 | 实验结果与分析..... | 101 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.1 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白生物学功能分析..... | 101 |
| 4.2.2 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白与 MsRpsA ^{CTD} 蛋白载体构建、表达纯化及结晶条件初筛..... | 103 |
| 4.2.2.1 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白与 MsRpsA ^{CTD} 蛋白的 DNA 克隆与载体构建..... | 103 |
| 4.2.2.2 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白与 MsRpsA ^{CTD} 蛋白重组质粒的预表达..... | 105 |
| 4.2.2.3 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白大量表达、纯化与结晶条件初筛..... | 106 |
| 4.2.2.3.1 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白亲和层析纯化..... | 106 |
| 4.2.2.3.2 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白阴离子交换层析纯化..... | 107 |
| 4.2.2.3.3 考察 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白稳定性和聚集状态均一性..... | 107 |
| 4.2.2.3.4 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白凝胶过滤层析纯化..... | 109 |
| 4.2.2.3.5 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白结晶条件初筛..... | 111 |
| 4.2.3 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白衍射用晶体的获得..... | 115 |
| 4.2.4 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白晶体防冻剂的筛选及优化..... | 117 |
| 4.2.5 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白晶体衍射数据的收集和结构解析..... | 118 |
| 4.2.6 目的蛋白 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 和 MsRpsA ^{CTD} 晶体结构分析..... | 120 |
| 4.2.6.1 目的蛋白 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 和 MsRpsA ^{CTD} 的晶体结构..... | 120 |
| 4.2.6.2 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白与 MtRpsA ^{CTD} 蛋白结合 POA 的氨基酸侧链构象比较..... | 121 |
| 4.2.6.3 MtRpsA Δ A438 ^{CTD} 蛋白和 MsRpsA ^{CTD} 蛋白与 MtRpsA ^{CTD} 蛋白表面电势差异..... | 122 |
| 4.2.7 讨论..... | 123 |
| 参考文献 | 127 |
| 第五章 全文总结 | 129 |
| 在学期间发表论文 | 131 |
| 致谢 | 132 |

CONTENTS

| | |
|---|-----|
| Abstract(Chinese) | I |
| Abstract(English) | III |
| List of abbreviation | V |
| Charpter 1 Introduction | 1 |
| 1.1 Pyrazinamide: A frontline drug used for tuberculosis 50 years | 1 |
| 1.2 PZA targeting the ribosomal protein S1 of mycobacterium tuberculosis under the trans-translation[28] | 4 |
| 1.2.1 trans-translation..... | 5 |
| 1.2.2 the ribosomal protein S1: RpsA..... | 6 |
| 1.3 Introduction of biomacromolecular X-ray crystallography | 7 |
| 1.3.1 Main process of X-ray crystallography | 8 |
| 1.3.1.1 Procedure for X-ray crystallography | 8 |
| 1.3.1.2 Protein crystallization | 9 |
| 1.3.1.2.1 Principle of crystallization..... | 9 |
| 1.3.1.2.2 Protein crystallization methods..... | 10 |
| 1.3.1.2.3 Factors affect the protein crystallization..... | 10 |
| 1.3.2 Fraction date collection and processing..... | 11 |
| 1.3.3 Principles of X-ray crystallography..... | 12 |
| 1.3.4 Phase caculation..... | 14 |
| 1.3.4.1 Multi-/single wavelength anomalous diffraction (MAD/SAD).. | 14 |
| 1.3.4.2 Molecular replacement..... | 15 |
| 1.3.5 Modeling and refinement..... | 16 |
| 1.4 Purpose and significance of the research | 17 |
| Reference | 18 |
| Charpter 2 Materials and methods | 24 |
| 2.1 Materials | 24 |
| 2.1.1 Strains and vectors | 24 |
| 2.1.2 Main reagents and supplies | 24 |
| 2.1.3 Main instruments | 25 |
| 2.1.4 Screening kit for crystallization | 27 |
| 2.2 Main buffers and reagents preparation | 27 |
| 2.2.1 Buffers for garose gel electrophoresis | 27 |
| 2.2.2 Buffers for SDS-PAGE | 28 |
| 2.2.3 Reagents of bacteria fermentation and protein expression | 29 |
| 2.2.4 Reagents for competent cells preparation..... | 29 |
| 2.2.5 Buffers for protein purification..... | 30 |
| 2.2.6 Buffers for protein stability test and homology test..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 2.3 Methods | 32 |
| 2.3.1 Competent cell preparation..... | 32 |
| 2.3.2 Transformation..... | 33 |
| 2.3.3 Plasmides extraction..... | 33 |
| 2.3.4 Plasmides construction..... | 34 |
| 2.3.4.1 Primer design..... | 35 |
| 2.3.4.2 Gen clone and plasmides construction..... | 36 |
| 2.3.4.3 Identify positive clone..... | 39 |
| 2.3.5 The protein of MtRpsA expression..... | 39 |
| 2.3.5.1 Pre-expression..... | 39 |
| 2.3.5.2 Large-scale expression..... | 40 |
| 2.3.6 Protein purification..... | 41 |
| 2.3.6.1 Affinity chromatography..... | 41 |
| 2.3.6.2 Ion Exchange chromatography..... | 41 |
| 2.3.6.3 Gel filtration chromatography..... | 42 |
| 2.3.7 Buffer optimization..... | 43 |
| 2.3.7.1 Protein stability test..... | 43 |
| 2.3.7.2 The second structure determined by CD..... | 44 |
| 2.3.7.3 The protein homology determined by Dynamic Light Scattering..... | 44 |
| 2.3.8 Crystallization screening..... | 46 |
| 2.3.8.1 Protein preparation..... | 46 |
| 2.3.8.2 Siting drop method..... | 46 |
| 2.3.8.3 Hanging drop method..... | 47 |
| 2.3.9 Diffraction data collection and processing..... | 47 |
| 2.3.9.1 Screening Cryo protection..... | 48 |
| 2.3.9.2 Crystal resolution screening、 data collection and processing..... | 48 |
| 2.3.10 Other techniques..... | 49 |
| 2.3.10.1 MALDI-TOF-MS..... | 49 |
| 2.3.10.2 ITC..... | 49 |
| 2.3.10.3 EMSA [5, 6]..... | 50 |
| 2.3.10.4 EGS cross-linking..... | 51 |
| 2.3.10.5 Preparation sample of SeMet-labeled protein [7]..... | 51 |
| 2.3.10.6 NMR..... | 52 |
| Reference | 54 |

Chapter 3 Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of

Mycobacterium tuberculosis by pyrazinamide..... 55

| | |
|--|----|
| 3.1 Introduction | 55 |
| 3.2 Results and analysis | 56 |
| MtRpsA1/28a purification and crystallization screening..... | 56 |
| 3.2.1.1 MtRpsA1/28a affinity purification, ion exchange, gel filtration and crystallization screening..... | 56 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1.2 MtRpsA1/28a purification and homogeneity analysis..... | 58 |
| 3.2.2 New clone constructions, expression and crystallization | 59 |
| 3.2.2.1 New clone constructions | 59 |
| 3.2.2.2 Pre-expression..... | 61 |
| 3.2.2.3 Expression and purification | 62 |
| 3.2.3 MtRpsA8/28a expression, purification and crystallization..... | 62 |
| 3.2.3.1 Affinity chromatography of MtRpsA8/28a..... | 62 |
| 3.2.3.2 Ion chromatography of MtRpsA8/28a | 63 |
| 3.2.3.3 The homogeneity and stability study of MtRpsA8/28a | 64 |
| 3.2.3.4 Gel filtration chromatography of MtRpsA8/28a..... | 65 |
| 3.2.3.5 Crystallization screening of MtRpsA8/28a..... | 65 |
| 3.2.4 Analysis function of S1-domain of MtRpsA | 66 |
| 3.2.5 Clone constructions, expression and crystallization of MtRpsA ^{CTD} | 68 |
| 3.2.5.1 Clone constructions..... | 68 |
| 3.2.5.2 Pre-expression..... | 69 |
| 3.2.5.3 Large-scale expression, purification and crystallization screening | 70 |
| 3.2.5.3.1 Affinity chromatography of MtRpsA ^{CTD} | 70 |
| 3.2.5.3.2 Ion chromatography of MtRpsA ^{CTD} | 71 |
| 3.2.5.3.3 The homogeneity and stability study of MtRpsA ^{CTD} | 71 |
| 3.2.5.3.4 Gel chromatography of MtRpsA ^{CTD} | 72 |
| 3.2.5.3.5 EGS cross-linking and MALDI-TOF MS experiments of MtRpsA ^{CTD} | 74 |
| 3.2.5.3.6 Crystal preparation of MtRpsA ^{CTD} | 74 |
| 3.2.6 Diffracted MtRpsA ^{CTD} crystal preparation | 77 |
| 3.2.6.1 Diffracted MtRpsA ^{CTD} crystal preparation | 77 |
| 3.2.6.2 Cryo protectant screening and optimization of MtRpsA ^{CTD} | 78 |
| 3.2.6.3 Diffracted SeMet-MtRpsA ^{CTD} crystal preparation..... | 78 |
| 3.2.6.4 Diffracted MtRpsA ^{CTD} -POA crystal preparation | 79 |
| 3.2.7 Data collection and structure determination of MtRpsA ^{CTD} and MtRpsA ^{CTD} -POA | 82 |
| 3.2.8 The structure of MtRpsA ^{CTD} and MtRpsA ^{CTD} -POA..... | 84 |
| 3.2.8.1 The structure of MtRpsA ^{CTD} | 85 |
| 3.2.8.2 The two molecules of MtRpsA ^{CTD} -POA are slightly different in a asymmetric unit..... | 86 |
| 3.2.8.3 Influences on S1-domain of MtRpsA ^{CTD} on binding POA..... | 86 |
| 3.2.8.4 The binding sites of POA on MtRpsA ^{CTD} | 87 |
| 3.2.8.5 Confirming the binding sites of POA on MtRpsA ^{CTD} | 89 |
| 3.2.8.6 The molecular mechanism of POA in trans-translation..... | 92 |
| 3.2.8.7 Structure modelling of MtRpsA..... | 93 |
| 3.2.9 Discussion | 94 |
| Reference | 98 |

Chapter 4 Structural study of PZA-resistance of the ribosomal protein

| | |
|---|-----|
| S1 | 100 |
| 4.1 Introduction | 100 |
| 4.2 Results and analysis | 101 |
| 4.2.1 Function analysis of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 101 |
| 4.2.2 Clone constructions, expression and crystallization of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 103 |
| 4.2.2.1 Clone constructions of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 103 |
| 4.2.2.2 Pre-expression..... | 105 |
| 4.2.2.3 Expression, purification and crystallization of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 106 |
| 4.2.2.3.1 Affinity chromatography of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 106 |
| 4.2.2.3.2 Ion chromatography of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 107 |
| 4.2.2.3.3 The homogeneity and stability study of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 107 |
| 4.2.2.3.4 Gel filtration chromatography of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 109 |
| 4.2.2.3.5 Crystal screening of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 111 |
| 4.2.3 Diffracted MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} crystal preparation | 115 |
| 4.2.4 Cryo protectant screening and optimization of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 117 |
| 4.2.5 Data collection and structure determination of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 118 |
| 4.2.6 Crystal structure analysis of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 120 |
| 4.2.6.1 The crystal structure of MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} | 120 |
| 4.2.6.2 Structural comparison of MtRpsA ^{CTD} with MtRpsA Δ A438 ^{CTD} and MsRpsA ^{CTD} at the POA binding sites | 121 |
| 4.2.6.3 Distinct changes in the electrostatic surface potentials in the POA binding sites | 122 |
| 4.2.7 Discussion..... | 123 |
| Reference | 127 |
| Chapter 5 Summary | 129 |
| Publications | 131 |
| Acknowledgement | 132 |

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫