

突变对嗜热古菌蛋白[P62A] Ssh10b 主链构象影响的核磁共振研究

罗 叔^{1,2}, 方显扬¹, 邓志威², 王金凤¹

(1. 中国科学院生物物理研究所, 分子生物学研究中心, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101;

2. 北京师范大学分析测试中心, 北京 100875)

摘要 嗜热古菌蛋白 Ssh10b 突变体[P62A]Ssh10b 具有良好的热稳定性. [P62A]Ssh10b 的结构测定结果显示, 其 $\alpha 2$ 螺旋上残基 K48 和 D51 之间形成了一对盐键, 而且, 突变 D51 将影响蛋白的热稳定性. 为了探索 D51 的突变对蛋白热稳定性的影响, 构建了突变体[D51N/P62A]Ssh10b 的质粒, 并获得了高纯度的¹⁵N 和¹³C 双标记[D51N/P62A]Ssh10b. 通过对异核三共振 NMR 实验数据的解析, 完成了对[D51N/P62A]Ssh10b 的主链共振近乎完全的指认. 比较突变以及未突变蛋白质的主链¹H^N和¹⁵N 化学位移, 在[P62A]Ssh10b 的结构基础上进行分析发现, D51N 突变显著地影响了 $\alpha 2$ 螺旋骨架构象, 并进一步影响到古菌 L_{β2α} loop 区域、β4 的 N 端区域、L_{β3β4} loop 的 C 端区域以及 β3 与 L_{β3β4} loop 的交界区域. 结果表明, 由于 D51N 突变破坏了 $\alpha 2$ 螺旋上 K48 和 D51 之间的盐键, 影响了[D51N/P62A]Ssh10b 的 $\alpha 2$ 螺旋构象, 并影响到蛋白的其它相关部位的局部构象, 说明 [P62A]Ssh10b 的高热稳定性可能与其溶液构象密切相关. 为进一步运用 NMR 研究 [D51N/P62A]Ssh10b 分子结构特性与耐热机制间的关系奠定了基础.

关键词 D51N 突变; [D51N/P62A]Ssh10b; 核磁共振; 主链指认; 化学位移比较

中图分类号 O657.2; Q501

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)03-0546-05

Ssh10b 蛋白是 Sac10b 嗜热古菌 DNA 结合蛋白家族中的一员, 分离自芝田硫化叶菌^[1,2]. Sac10b 蛋白家族是最早发现的在古菌中广泛存在的小分子量 DNA 结合蛋白, 推测其在古菌中具有重要的生理意义^[1]. 研究表明, Ssh10b 在芝田硫化叶菌中与 RNA 专一性结合, 在体外即可与 RNA 或 DNA 结合^[2,3]. Ssh10b 与 DNA 的作用具有温度依赖性^[2], 并具有较高的热稳定性^[2,4].

Ssh10b 为一个多构象双体蛋白质, 其 P62A 突变体(即[P62A]Ssh10b)是一个单构象双体蛋白质. 与 Ssh10b 相类似, [P62A]Ssh10b 能与 DNA 作用并具有很高的热稳定性^[5]. NMR 实验确定, [P62A]Ssh10b 的三维溶液结构(PDB ID: 1Y9X)是由两个对称单体组成. 每一个单体的 β-片层上以及 α-螺旋上有盐键形成.

有报道认为, 蛋白质中离子对的静电相互作用对蛋白质的热稳定性具有重要意义^[6-9]. [P62A]Ssh10b 结构的测定结果显示, 其 $\alpha 2$ 螺旋上残基 K48 和 D51 之间形成了一对盐键, 而且, 突变 D51 将影响蛋白的热稳定性. 为了从分子结构上研究 D51 突变影响 [P62A]Ssh10b 热稳定性的分子机制, 我们构建了[P62A]Ssh10b 的 D51N 突变体[D51N/P62A]Ssh10b, 并对其进行了相关的 NMR 实验, 完成了[D51N/P62A]Ssh10b 蛋白质的主链¹H^N和¹⁵N 共振的化学位移指认. 对两个蛋白质的¹H^N和¹⁵N 化学位移进行了比较和分析, 得出了 D51N 突变可能导致 [D51N/P62A]Ssh10b 的局部构象变化的结论.

1 实验部分

1.1 [D51N/P62A]Ssh10b 蛋白的表达和纯化

[D51N/P62A]Ssh10b 质粒由本实验室构建. BL21 感受态细胞购自 TIANGEN 公司. 蛋白的表达和

收稿日期: 2007-06-05.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30270301)资助.

联系人简介: 王金凤, 女, 研究员, 主要从事大分子核磁共振研究. E-mail: jfw@sun5.ibp.ac.cn

纯化过程与已报道的 [P62A] Ssh10b 蛋白的表达和纯化过程相同^[5].

1.2 NMR 实验

在 500 μL 水溶液样品体系中, 含有体积分数为 10% 的 D_2O , 20 mmol/L 氘代乙酸/乙酸钠 ($\text{pH} = 4.8$), 20 mmol/L KCl, 50 $\mu\text{mol/L}$ NaN_3 , 20 $\mu\text{mol/L}$ DSS (2,2-二甲基-2-硅戊烷-5-磺酸), $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 双标记的 [D51N/P62A] Ssh10b 蛋白 (纯度 > 95%) 浓度约为 1.4 mmol/L.

在配备有超低温三共振梯度探头的 Bruker DMX600 核磁共振谱仪上收集 [D51N/P62A] Ssh10b 的二维 ^1H - ^{15}N HSQC 谱, 并收集 [D51N/P62A] Ssh10b 的 3D ^1H - ^{15}N - ^{13}C HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCOC, HNCA 和 HBHA(CO)NH 数据. 所有实验温度均为 310 K. NMR 谱图的处理方法与文献[5]的报道相同.

2 结果与讨论

2.1 [D51N/P62A] Ssh10b 的主链指认

主链指认是确定二维 ^1H - ^{15}N HSQC 谱上的所有共振峰的归属及每一共振峰所属的氨基酸及其残基位置, 并由此得出每一氨基酸残基的 $^1\text{H}^\alpha$ 和 ^{15}N 化学位移. 为了归属主链共振峰, 利用 HNCACB/CBCA(CO)NH 实验建立残基序列连接, 完成和蛋白质序列的比对以及大部分残基的指认, 得到对应残基的 $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, $^1\text{H}^\alpha$ 和 ^{15}N 化学位移. 利用 HNCA 实验指认少量重叠的谱峰. $^{13}\text{C}'$ 的化学位移从 HNCOC 实验中获取. 脯氨酸残基由于没有 $^1\text{H}^\alpha$, 因此在二维 ^1H - ^{15}N HSQC 谱中没有共振峰, 其 $^{13}\text{C}^\alpha$ 和 $^{13}\text{C}^\beta$ 的化学位移只能由 HNCACB/CBCA(CO)NH 谱中其最后一位残基的共振峰来确定. 在完成主链指认后, 根据 HBHA(CO)NH 谱图, 扩展指认各氨基酸残基相应的 $^1\text{H}^\alpha$ 共振峰, 得到 $^1\text{H}^\alpha$ 的化学位移.

主链指认结果标注在图 1 所示的二维 ^1H - ^{15}N HSQC 谱中. 从图 1 可以看到, [D51N/P62A] Ssh10b 的谱峰在酰胺区分散良好, 这显示突变体具有良好的结构. 在谱图中, 除了 T7 和 S9 多于一套峰外, 其它谱峰都只出现一个峰. 谱图右上方未指认的谱峰均为氨基酸残基侧链的共振峰. 由于本文主要关注突变对蛋白质骨架构象的影响, 所以没有对侧链的这些信号做出指认.

在二维 ^1H - ^{15}N HSQC 谱中, 残基 V38 与 R86 的共振峰重叠, R44 与 R71 的共振峰重叠, N51 与 R59 的共振峰重叠. 另外, S47, I55, V72 和 G73 残基未能得到指认, 这可能是突变后其信号变弱的缘故. 各原子核指认率分别为 $^1\text{H}^\alpha$ 94.5%, ^{15}N 91.6%, $^{13}\text{C}'$ 91.7%, $^{13}\text{C}^\alpha$ 97.9%, $^{13}\text{C}^\beta$ 97.8%, $^1\text{H}^\alpha$ 91.2%. 可以看到, 所列主链原子核指认率均超过 91%, 其中 $^{13}\text{C}^\alpha$ 和 $^{13}\text{C}^\beta$ 的指认率接近 98%, 主链指认近乎完全.

2.2 综合化学位移指数

化学位移指数 (CSI)^[10] 是利用化学位移确定二级结构的简便而有效的方法. 结合 $^1\text{H}^\alpha$ 和 $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$ 化学位移得到的综合化学位移指数预测蛋白质二级结构的正确率超过 92%.

[P62A] Ssh10b 的溶液结构已经确定, 其 $^1\text{H}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$ 已有报道. 为了更好地比较 [D51N/P62A] Ssh10b 和 [P62A] Ssh10b 二级结构的差异, 用软件 CSI (www.bionmr.ualberta.ca/bds/software/csi/latest/csi.html) 计算了 [P62A] Ssh10b 的综合化学位移指数 (CSI), 数据来源为本实验室对 [P62A] Ssh10b 的共振峰指认 (BMRB 登陆号为 6019). 与 [P62A] Ssh10b 类似, 通过 CSI 软件计算了 [D51N/P62A]

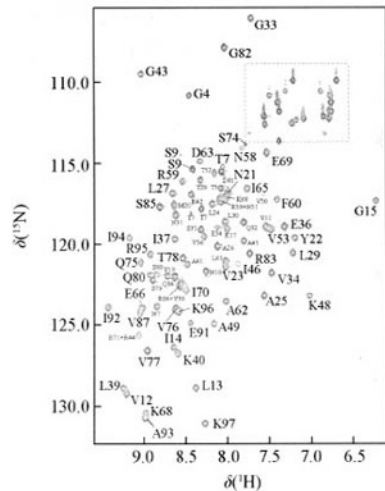


Fig. 1 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of [D51N/P62A] Ssh10b at 310 K

Backbone amide group assignments are indicated with the residue number and amino acid code.

Ssh10b 综合化学位移指数, 二者结果如图 2 所示.

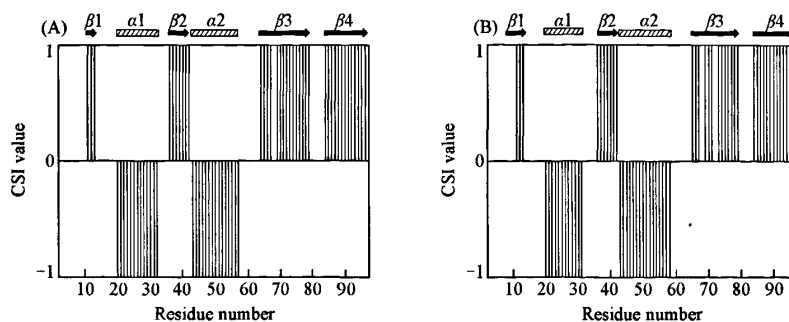


Fig. 2 Chemical shift index (CSI) for [P62A]Ssh10b (A) and [D51N/P62A]Ssh10b (B). Secondary structural elements predicted by CSI values are labeled at the top of the figures.

[P62A]Ssh10b 的 NMR 三维溶液结构有如下二级结构单元: 两段 α -螺旋; 螺旋 $\alpha 1$ (残基 19 ~ 31) 和螺旋 $\alpha 2$ (残基 45 ~ 58); 4 条 β -折叠股为 $\beta 1$ (残基 10 ~ 13), $\beta 2$ (残基 36 ~ 42), $\beta 3$ (残基 66 ~ 73), $\beta 4$ (残基 89 ~ 95). 由图 2 所示的 CSI 预测的二级结构可以看到, CSI 对 [P62A]Ssh10b 预测给出: 残基 11 ~ 13 形成 $\beta 1$, 残基 20 ~ 32 形成 $\alpha 1$ 螺旋, 残基 36 ~ 42 形成 $\beta 2$, 残基 43 ~ 57 形成 $\alpha 2$ 螺旋, 残基 64 ~ 79 形成 $\beta 3$ (其中残基 68 虽然预测为无规, 但是由于其前后均为规则 β -折叠股, 它自身不太可能单独无规, 故也计算入 $\beta 3$), 残基 84 ~ 96 形成 $\beta 4$. 由此可见, CSI 所预测的 [P62A]Ssh10b 的二级结构与 NMR 实验测定的实际二级结构基本吻合.

[D51N/P62A]Ssh10b 与 [P62A]Ssh10b 的 CSI 图基本一致, 表明 [D51N/P62A]Ssh10b 在溶液中可以形成两段 α -螺旋和四段 β -折叠股, 其中 $\beta 1$ 对应残基 11 ~ 13, $\alpha 1$ 螺旋对应残基 20 ~ 31, $\beta 2$ 对应残基 36 ~ 42, $\alpha 2$ 螺旋对应残基 43 ~ 58, $\beta 3$ 对应残基 65 ~ 79 (K68 预测为无规, V72 未指认所以缺失其 CSI, 由于两个残基前后都是规则的 β -折叠股, 所以将这两个残基归入 $\beta 3$), $\beta 4$ 对应残基 84 ~ 96. 在 [D51N/P62A]Ssh10b 和 [P62A]Ssh10b 的预测二级结构中, 其中定义 $\beta 1$, $\beta 2$ 和 $\beta 4$ 的残基完全一样, 其微小差别在于前者 $\alpha 1$ 螺旋片段比后者在 C 端少 1 个残基, $\alpha 2$ 螺旋片段比后者在 C 端多 1 个残基, $\beta 3$ 片段比后者在 N 端少 1 个残基. 可见, D51N 突变并未对 [P62A]Ssh10b 蛋白的整体结构造成太大影响. 因此, 可以认为, [P62A]Ssh10b 溶液的三维结构近似代表了 [D51N/P62A]Ssh10b 溶液的三维结构.

2.3 [D51N/P62A]Ssh10b 与 [P62A]Ssh10b 化学位移比较

与 [P62A]Ssh10b 的化学位移相比较, [D51N/P62A]Ssh10b 主链 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 的化学位移变化可以直接反映 D51N 突变对蛋白质骨架构象的影响. [D51N/P62A]Ssh10b 与 [P62A]Ssh10b 主链 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 化学位移对比如图 3 所示. 图 3 中用实心三角符号表示脯氨酸残基 P6, P8 和 P18. 未获指认的是 S47, I55, V72, G73 以及突变位点 51 位残基. [P62A]Ssh10b 的 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 化学位移数据为同等实验条件下指认所得.

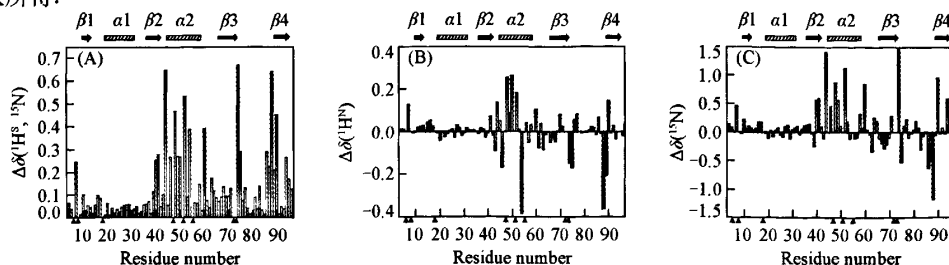


Fig. 3 Differences in weighted chemical shift $\delta(^1\text{H}^{\text{N}}, ^{15}\text{N})$ (A), $\delta^1\text{H}^{\text{N}}$ (B), and $\delta^{15}\text{N}$ (C) of [D51N/P62A]Ssh10b from those of [P62A]Ssh10b

The unassigned residues and prolines are indicated by \blacktriangle . Secondary structural elements are labeled at the top of the figure.

加权化学位移差 (Weighted Chemical Shift Difference) 计算公式^[11]为:

$$\Delta\delta(^1\text{H}^{\text{N}}, ^{15}\text{N}) = [\Delta\delta(^1\text{H}^{\text{N}})^2 + 0.2 \times \Delta\delta(^{15}\text{N})^2]^{1/2}$$

其中 $\Delta\delta(^1\text{H}^{\text{N}})$ 为对应残基酰胺氢化学位移差, $\Delta\delta(^{15}\text{N})$ 为对应残基酰胺氮化学位移差值。同时, 也做了二者的 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 化学位移差值图。

加权化学位移差可以综合反映出主链 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 的变化, 所得结果可以较准确地反映蛋白质骨架构象的变化^[12,13]。图 3(A) 中, 加权化学位移差大于 0.3 的残基有 R44, K48, T52, E54, F60, S74, S88, I90。单独考察 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 的变化则可以提供更丰富的信息。仔细分析图 3(B) 和 (C) 可以看到, $^1\text{H}^{\text{N}}$ 化学位移差大于 0.2 的残基有: K48, V50, E54, S88, T89。 ^{15}N 化学位移差大于 0.75 的残基有 R44, K48, T52, F60, S74, S88, I90。这些残基的主链 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和/或 ^{15}N 变化都相当显著。

为了方便讨论, 结合 [P62A] Ssh10b 的二级结构, 将以上变化显著的残基进行归类。处于 $\alpha 2$ 螺旋的残基有 K48, V50, T52, E54。残基 F60 位于连接螺旋 $\alpha 2$ 与 $\beta 3$ 的 Loop 区, 且处于接近螺旋 $\alpha 2$ 的 C 末端。残基 R44 位于连接 $\beta 2$ 和 $\alpha 2$ 的接头区 (Hinge)。残基 S74 和 S88 分别位于 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ 之间的 Loop 区的 N 端和 C 端。残基 T89 和 I90 则位于 $\beta 4$ 。这些残基在 [P62A] Ssh10b 的结构图 (图 4) 中已用箭头标出。

在 [P62A] Ssh10b 的结构中, $\alpha 2$ 螺旋上的残基 D51 与 K48 形成盐键。D51 突变为 N51 后, 由于天冬酰胺不带有负电荷, 无法再形成盐键, 破坏了原来存在的 K48—D51 盐键, 引起 K48 化学位移发生明显变化。突变后, K48 的加权化学位移差约 0.46, 其主链 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 位移变化均显著。

D51N 突变不仅影响了 K48 的 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 的化学位移, 还显著影响了处在 $\alpha 2$ 螺旋的一系列残基的主链 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 化学位移, 如残基 V50, T52, E54。处于 $\alpha 2$ 螺旋 C 末端附近的 F60 主链 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 化学位移也发生了明显变化, 加权化学位移差接近 0.4。此外, 残基 I46, A49, V50 的加权化学位移差也较大, 超过了 0.25。这表明, D51N 突变使得所在的 $\alpha 2$ 螺旋主链构象较之 [P62A] Ssh10b 发生了较明显的变化, 这可能是由于 K48 和 D51 盐键的破坏导致螺旋 $\alpha 2$ 趋于松散, 从而使得处于 $\alpha 2$ 螺旋骨架的残基的 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 化学位移普遍发生较大的变化。

从图 3(A) 可以看到, 残基 R44 的 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 有很显著变化, 加权化学位移差接近 0.65。在 [P62A] Ssh10b 中, 残基 G43 和 R44 处于连接 $\beta 2$ 和 $\alpha 2$ 的铰链状 Loop 区 (hinge $L_{\beta 2\alpha 2}$) 中, 残基 R44 紧邻 $\alpha 2$ 的 N 端。很显然, 这是由于 $\alpha 2$ 螺旋构象的调整影响了 $L_{\beta 2\alpha 2}$ 的构象, 从而使残基 R44 的 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 的化学位移发生变化。在 $L_{\beta 2\alpha 2}$ 中, 残基 G43 与 S88 的主链间形成了跨区域氢键 G43 $^1\text{H}^{\text{N}}$ —S88 C=O, 相对固定了 $L_{\beta 2\alpha 2}$ 和 $L_{\beta 3\beta 4}$ ($\beta 3$ 和 $\beta 4$ 之间的 Loop 区) 之间的空间位置。因此, $L_{\beta 2\alpha 2}$ 的构象调整可通过 G43 和 S88 之间的氢键传递到残基 S88 及其邻近残基。从图 3(A) 可以看到, 残基 S88 的变化很可观, 加权化学位移差接近 0.65。值得注意的是, G43 的加权化学位移差并不大。

在 $L_{\beta 3\beta 4}$ 中, 不仅 S88 的主链化学位移变化大, 与其邻近的 I90 变化也很显著, 加权化学位移变化为 0.45。R86, V87, T89 的加权化学位移也都超过了 0.2。表明 $\beta 4$ N 端与 $L_{\beta 3\beta 4}$ C 端之间区域 (R86, V87, S88, T89, I90) 的主链构象也受到了影响。残基 Q75 和 V87 的 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 C=O 之间在 $L_{\beta 3\beta 4}$ 中形成了两对弱的跨链氢键。由于 V87 所在区域主链受到了影响, Q75 也受到了影响, 加权化学位移变化近 0.3。影响更为明显的是 Q74 邻近的 S74, 加权化学位移差在所有残基中是最大的, 达到了 0.67。

综上所述, 与 [P62A] Ssh10b 相比, D51N 突变破坏了原来存在的 K48—D51 盐键, 使得 [D51N/P62A] Ssh10b 中的 $\alpha 2$ 螺旋的构象发生了变化, 这引发了蛋白质结构中其它部分的构象调整, 改变了如残基 G43 与 S88 之间, Q75 和 V87 之间氢键等作用力, 从而引发 $L_{\beta 2\alpha 2}$, $\beta 4$ N 端与 $L_{\beta 3\beta 4}$ C 端之间区域以

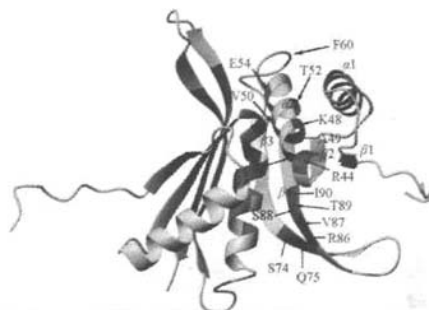


Fig. 4 Ribbon representation of the [P62A] Ssh10b structure

Arrows indicate the sites of residues showing large chemical shift changes.

及 $\beta 3$ 与 $L_{\beta 3\beta 4}$ 的交界区域的残基主链 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 和 ^{15}N 化学位移较之D51N突变前发生明显变化. 而在[P62A]Ssh10b结构中, 这些是较稳定的结构区域. 因此, 突变造成的蛋白质局部构象上的变化, 可能对[D51N/P62A]Ssh10b的热稳定性造成影响(本实验室近期对[D51N/P62A]Ssh10b的热稳定性研究已观测到此影响).

参 考 文 献

- [1] Forterre P., Confalonieri F., Knapp S. . Mol. Microbiol. [J], 1999, 32(3): 669—670
- [2] Xue H., Guo R., Wen Y., *et al.* . J. Bacteriol. [J], 2000, 182(14): 3929—3933
- [3] Guo R., Xue H., Huang L. . Mol. Microbiol. [J], 2003, 50(5): 1605—1615
- [4] Xu S., Qin S., Pan X. M. . Biochem. J. [J], 2004, 382: 433—440
- [5] Cui Q., Tong Y. F., Xue H., *et al.* . J. Biol. Chem. [J], 2003, 278(51): 51015—51022
- [6] Karshikoff A., Ladenstein R. . Trends Biochem. Sci. [J], 2001, 26(9): 550—556
- [7] Vetricani C., Maeder D. L., Tolliday N., *et al.* . Biophysics [J], 1998, 95(21): 12300—12305
- [8] Missimer J. H., Steinmetz M. O., Baron R., *et al.* . Protein Sci. [J], 2007, 16: 1349—1359
- [9] Gribenko A. V., Makhatadze G. I. . J. Mol. Biol. [J], 2007, 366(3): 842—856
- [10] Wishart D. S., Sykes B. D. . J. Biomol. NMR [J], 1994, 4: 171—180
- [11] Laurent V., Michael J. O., Ivan T., *et al.* . EMBO J. [J], 2006, 25: 5138—5149
- [12] Pellicchia M., Sebbel P., Hermans U., *et al.* . Nature Struct. Biol. [J], 1999, 6(4): 336—339
- [13] Grzesiek S., Stahl S. J., Wingfield P. T., *et al.* . Biochemistry [J], 1996, 35(32): 10256—10261

NMR Study of Influences of D51N Mutation on Backbone Conformation of Hyperthermophilic Archaeal [P62A]Ssh10b

LUO Quan^{1,2}, FANG Xian-Yang¹, DENG Zhi-Wei², WANG Jin-Feng^{1*}

(1. National Laboratory of Biomacromolecules, Research Center of Molecular Biology, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2. Analysis and Testing Center, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract The P62A mutant hyperthermophilic archaeal protein Ssh10b, [P62A]Ssh10b, is highly thermostable. The structure determination shows that a salt-bridge K48—D51 is formed in helix $\alpha 2$, and mutation of D51 can influence the thermostability of protein. In order to understand the effect of mutation on the stability of protein, we constructed the D51N-mutant [P62A]Ssh10b plasmid, and obtained the ^{15}N and ^{13}C double-labeled [D51N/P62A]Ssh10b protein with a high purity. The experimental data of triple-resonance NMR experiments provided nearly complete backbone resonance assignments. Comparing the main chain $^1\text{H}^{\text{N}}$ and ^{15}N chemical shifts for [P62A]Ssh10b with its mutant variant and analyzing the chemical shift differences on the basis of [P62A]Ssh10b structure, it was found that D51N mutation influenced the backbone conformation of helix $\alpha 2$. The further effect was observed in the structural region consisting of Loop $L_{\beta 2\alpha 2}$, the N-terminal of strand $\beta 4$, and the C-terminal of loop $L_{\beta 3\beta 4}$, and in the region around loop $L_{\beta 3\beta 4}$ as well. This revealed that D51N mutation disrupted the salt bridge of K48—D51 on helix $\alpha 2$ and influenced not only the backbone conformation of helix $\alpha 2$ but also the local conformations of other structural regions in the protein. Therefore, the high thermostability of [P62A]Ssh10b may be correlated closely to its tertiary conformation.

Keywords D51N mutant; [D51N/P62A]Ssh10b; NMR; Backbone resonance assignment; Chemical shift comparison

(Ed.: H, J, Z)