

· 综 述 ·

KaiB 调控蓝藻生物钟振荡的分子机制

杨丽婷 综述, 刘 森 审校

[摘要] 蓝藻 PCC7942 的基因簇 KaiABC 编码的 KaiA、KaiB 及 KaiC 蛋白对单细胞蓝藻的生物节律非常重要。蓝藻翻译后生物钟是受一系列生物化学反应控制的, 其中包括磷酸化反应、ATP 水解、单体的交换以及各种分子构象的变化, 从而维持了生物振荡的准确与精密。本文对近些年来 KaiB 在翻译后振荡体系中参与 Kai 蛋白的相互作用而共同调节生物振荡, 对 ATP 酶的影响及诱导 KaiC 单体的交换等一系列过程进行了综述, 并介绍了 KaiB 与信号输出蛋白 SasA 的竞争关系, 这对揭示体外生物钟的工作机制有着非常重要的意义。

[关键词] KaiB 蛋白; 磷酸化循环反应; 单体的交换; ATP 酶活性; SasA

[中图分类号] Q6, Q7 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.01.021

生物节律现象广泛存在于生物界, 而且越来越多的研究报道显示: 无论是原核单细胞有机体、高等动植物还是人类的许多生理代谢活动都是在生物钟控制下进行的。蓝藻是已知的具有昼夜节律生物钟的最简单模式生物, 为阐明昼夜节律的基本分子机制带来很大便利, 其 KaiA、KaiB 及 KaiC 三种核心蛋白维持的生物振荡, 不依赖于 DNA 转录水平与 RNA 翻译水平调控的转录/翻译负反馈回路 (Transcriptional/Translational Feedback Loop, TTFL), 称为翻译后振荡 (Post-Translational Oscillation, PTO)^[1]。更为重要的是, KaiA/KaiB/KaiC 体系是目前唯一能在体外重组的、翻译后振荡的生物钟体系, 并且生物钟所具有的自我维持性、周期性及温度补偿性都可以由 KaiA、KaiB、KaiC 及 ATP 在试管条件下重现^[2]。因此, 该体系对于体外研究蛋白质相互作用网络模式具有重要意义, 对理解昼夜节律振荡器的形成机制也具有重要价值。本文对近些年来 KaiB 在振荡体系中参与 Kai 蛋白的相互作用而共同调节生物振荡, KaiB 对 ATP 酶的影响及诱导 KaiC 单体的交换等一系列过程进行了综述, 并介绍了 KaiB 与信号输出蛋白 SasA 的竞争关系, 这对揭示体外生物钟的工作机制有着非常重要的意义。

1 KaiABC 生物节律简介

蓝藻生物钟基因是一个由 KaiA、KaiB 及 KaiC 基因组成的基因簇 KaiABC, 其中 KaiA 单独转录, KaiB、KaiC 共同转录, 它们的表达产物 KaiA、KaiB 及 KaiC 蛋白共同组成生物钟的中央振荡器, 产生昼夜节律的计时机制。具体表现有: 基因簇转录水平呈高低的节律性变化, KaiC 蛋白磷酸化水平高低的节律性变化。在转录水平, KaiA 蛋白会增加 KaiB 与 KaiC 的转录, 同时其产物 KaiC 蛋白会抑制 KaiA 基因的表达, 一旦 KaiA 基因的表达受抑制, KaiA 蛋白量会下降, KaiB 与 KaiC 的转录效率也随之下降, 即 KaiB 与 KaiC 的转录水平呈现出节律性。在蛋白水平, 核心蛋白 KaiC 同时具有自激酶 (Autokinase) 和自磷酸酶 (Autophosphatase) 的活性, 自激酶活性的存在, 使 KaiC 能够在自身亚基间相互磷酸化; 而自磷酸酶活性则使磷酸化的 KaiC 能够自动去磷酸化, 这两种酶活性的存在使 KaiC 发生磷酸化-去磷酸化周期性变化具备了可能性^[3]。KaiA 蛋白通过促进 KaiC 蛋白的磷酸化与抑制 KaiC 蛋白的去磷酸化, 提高 KaiC 的磷酸化水平, 而 KaiB 是 KaiC 磷酸化的负调控因子, 能降低由 KaiA 增强的 KaiC 的磷酸化水平, 使 KaiC 自身去磷酸化, 在 KaiA 与 KaiB 的共同作用下, KaiC 从整体上表现出磷酸化和去磷酸化的周期性振荡^[4]。

Kai 蛋白与其他生物钟蛋白没有相似性, 只要破坏这三种蛋白中的任何一种就将会使生物节律紊乱, 而 KaiC 蛋白的生物化学性质是了解生物钟特性的关键。KaiC 蛋白的功能形式是由六个单体聚合而成的同源六聚体, 每个单体有两个亚基, 即 N

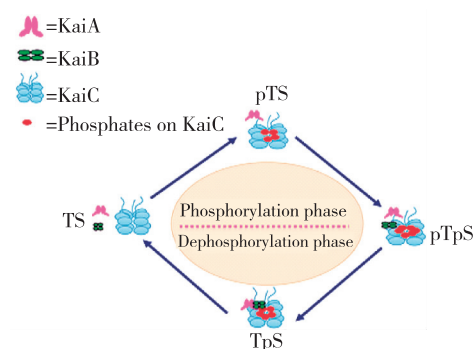
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21103098)

作者单位: 443002 湖北宜昌, 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 三峡大学医学院

通讯作者: 刘 森, E-mail: senliu.ctgu@gmail.com

引用格式: 杨丽婷, 刘 森. KaiB 调控蓝藻生物钟振荡的分子机制 [J]. 东南国防医药, 2016, 18(1): 68-72.

端的 CI 亚基与 C 端的 CII 亚基,每个 CII 亚基有 431 位的丝氨酸(S431)残基和 432 位的苏氨酸(T432)残基两个磷酸化位点。因此,每个 KaiC 单体就有四种可能的磷酸化状态,分别呈现出不同的功能。具体的表现为 KaiC 磷酸化/去磷酸化循环的四个步骤:a. T432 的磷酸化;b. S431 的磷酸化;c. T432 的去磷酸化;d. S431 的去磷酸化(图 1)。这 2 个磷酸化位点的磷酸化和去磷酸化严格按照上面的顺序进行,形成一个精密的时间记录元件,单向记录时间的流逝^[5]。



磷酸化时相,在 KaiA 的作用下,处于低磷酸化状态的 KaiC (TS) 先 T432 的磷酸化(pTS),然后 S431 的磷酸化(pTpS);去磷酸化时相,在 KaiA 与 KaiB 共同作用下,处于高磷酸化状态的 KaiC (pTpS) 先 T432 的去磷酸化(TpS),然后 S431 的去磷酸化, KaiC 回到低磷酸化状态(TS),一个循环结束,新的循环开始

图 1 KaiC 的磷酸化/去磷酸化循环

2 Kai 蛋白的结合位点

目前已经证实 KaiA 有两个结合位点,在磷酸化时相与去磷酸化时相分别与 KaiCII 的 A-Loop 结构域^[6]和 KaiB^[7]相互作用。KaiA 二聚体对低磷酸化的 KaiC 的亲和力高于处于高磷酸化状态的 KaiC^[8],当 KaiC 的 CII 亚基处于低磷酸化状态时, KaiA 通过结合 C 端的 A-loop (488-497 位),增强 KaiC 的自激酶的活性同时减弱磷酸酶的活性,加速其向高磷酸化状态的转变,从而促进 KaiC 磷酸化反应。而 KaiB 则选择性的结合到处于高磷酸化状态的 KaiC 上,通过抑制 KaiA 的活性,从而使 KaiC 在磷酸酶的优势活性下,向低磷酸化状态转变^[9]。定向标记的电子自旋共振分析表明 KaiA-KaiB 有瞬间的相互作用。电子自旋磁共振显示 KaiA 的 C 端与 KaiB 相互作用,而 KaiA 的 N 端对 KaiA-KaiB 的相互作用不是必需的。进一步研究显示, KaiA 缺失 1-179 位就不能与 KaiB 相互作用^[6],所以 KaiA 连接 N 端与 C 端的连接区域(147-170 位),对 KaiA-KaiB 的相互作用非常重要。进一步研究显示 KaiC 的 N

端能够增强 Δ NKaiA-KaiB (Δ NKaiA 为 KaiA 缺失 1-135 位)的相互作用^[10]。

KaiB 的主要作用是结合磷酸化状态的 KaiC,阻止 KaiA 与 KaiC 的相互作用,从而促进 KaiC 向去磷酸化状态转变,但 KaiB 与 KaiC 相互作用区域迄今尚不明确。电镜、小角散射实验表明 KaiB 是和 KaiC 的 CII 亚基结合的,那么 KaiB 最可能是通过结合在 KaiC 的 CII 亚基端,直接占据 KaiA 的结合位点,或形成空间位阻,来影响 KaiA 与 KaiC 的结合; Villarreal 等^[11]的研究,较好地支持 KaiB-KaiC 相互作用发生在 CII 端的 ATP 沟槽。Chang 等^[12]利用 NMR 实验表明 KaiB 和 KaiC 反应发生在 CI 亚基由一些非极性氨基酸及带负电的氨基酸残基组成的 B-loop (116-123 位),但具体的作用区域目前还不明确,且存在争议。一般情况下, KaiB 是不能结合到 KaiC 的 CI 亚基上的,因为这个结合位点是隐藏的。但是当 CI 亚基和 CII 亚基之间有堆积力的作用,使 CI 亚基构象发生变化,暴露出 KaiB 结合位点时, KaiB 才能结合上去^[12]。这说明 KaiB 也有可能结合在 CI 亚基来调节 KaiC 的磷酸化程度。

综上所述, KaiB 可能结合在 KaiC 的 CI 亚基和 CII 亚基。如果 KaiB 结合在 CII 亚基上则主要可能是通过直接影响 CII 亚基的表面静电势 (electrostatic surface potential, ESP) 调节 KaiC 的运行,也有可能是阻碍 KaiA 与 KaiC 的结合位点来调节 KaiC 的振荡,还有可能是调节 ATP 与 KaiC 的反应来调节 KaiABC 的正常运行。如果 KaiB 结合在 CI 亚基上,则可能是从 KaiC 的结构稳定性方面来间接调节 KaiABC 反应。虽然 KaiB 与 KaiC 的具体结合位点存在争议,但是 KaiB 的结合都可以占领或影响 KaiA 与 KaiC 的结合,来实现使 KaiC 从高磷酸化状态向低磷酸化状态的转变^[13]。

3 KaiB 结合 KaiC 时的聚合形式

KaiB 是三种蛋白中最小的一个,结构类似于硫氧还蛋白折叠的二聚体或四聚体,单体由 102 个氨基酸组成。KaiB 蛋白会发生自身相互作用而形成二聚体、四聚体甚至多聚体。最近的研究发现,生物钟蛋白 KaiB 不具有自激酶活性,但可以与 KaiC 直接发生相互作用而参与生物钟的调控,并且 KaiB 的不同的聚合形式之间的平衡和转化,对核心振荡器的节律性有影响^[14]。那么, KaiB 究竟以何种形式与 KaiC 结合的呢?

基于以前的研究我们认为 KaiB 是以稳定的同源四聚体存在,但它的四聚体不能与 KaiA 或 KaiC

相互作用,只有当聚合物解聚后才有此功能。KaiA 就是通过加速 KaiB 四聚体的解离,从而促进 KaiB 与 KaiC 的结合。同样的方法,KaiC 促进 KaiB 与 KaiA 的相互作用。已经有研究显示,KaiB 是以二聚体的形式结合到 CII 亚基上的,KaiB 二聚体与 CII 亚基的顶端相互作用形成三层夹心的结构^[15]。Heck 等用质谱的手段发现在与 KaiC 的结合过程中,KaiB 的单体、二聚体、四聚体等形式都有参与,他们指出 KaiB 单体是和 KaiC 发生反应的基本单位,而且不排除 KaiB 能和 KaiC 的 CI 亚基、CII 亚基都发生反应^[16]。因此,KaiB 的单体、二聚体和四聚体形式的动态变化,可能与 KaiC 的磷酸化振荡息息相关。而 KaiB 的尾端可能通过影响单体-二聚体-四聚体的平衡而影响其聚合状态,然而只有二聚体与 KaiC 发生相互作用,不同时期可能 KaiB 有不同的聚合体形式和 KaiC 发生相互作用^[17]。我们通过构建不同的共价连接寡聚体的策略,研究了 KaiA 和 KaiB 蛋白的共价二聚体的功能,初步发现共价连接的蛋白对 KaiC 的振荡现象产生了很大影响,反映出寡聚体间动态转变对该振荡体系正常功能的重要性。相信对 KaiA/KaiB/KaiC 核心振荡体系的分子机制的进一步阐明,将有助于我们对蛋白质相互作用网络、生物振荡器以及高等生物昼夜节律现象等的深入理解。

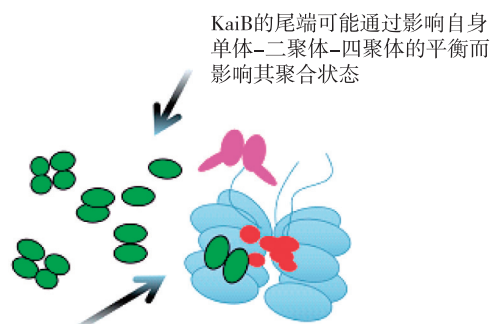
4 KaiB 影响 ATP 酶的活性及诱导 KaiC 单体的交换

除了 KaiC 的磷酸循环,ATP 的结合也是蓝藻生物计时机制的一个重要的生物过程。ATP 的主要功能是为该体系提供能量、维持 KaiC 的六聚体功能状态以及为 KaiC 的磷酸化提供磷酸基团参与 KaiC 的磷酸化振荡。而 KaiB 通过影响 ATP 的结合而间接的影响到该体系的能量供给及 KaiC 功能六聚体的形成,从而阻碍 KaiC 的磷酸化循环的正常运行。

此外,KaiC 是一个特殊的 ATP 酶,并且这种 ATP 酶的活性也呈现节律性与温度补偿效应,而且这种活性似乎还决定着 KaiA/KaiB/KaiC 振荡体系周期的长短:活性越高,周期越短;活性越低,周期越长^[18]。KaiC 上的 ATP 酶的活性主要受 KaiB 与 KaiA 调控,与 KaiC 所处的磷酸化状态无关^[19]。KaiC 的 ATP 酶和磷酸酶的活性是相互交融的。由于 CI 亚基结构的特殊性,只有 ATP 酶活性,且较稳定。如果 KaiB 与 CI 亚基结合则会影响 CI 亚基上的 ATP 酶活性,从而影响 KaiC 的磷酸化振荡^[10]。此外,KaiB 可能通过结合到 KaiC 的 CII 亚

基 ATP 结合槽上,影响 ATP 的结合,从而来调节 KaiC 磷酸化振荡。当 KaiC 达到一定的磷酸化程度后,其 CII 亚基的激酶活性由于 KaiB 对 ATP 结合槽的影响而转向为 ATP 合成酶活性和 ATP 水解酶活性,从而进入去磷酸化相位^[20]。因此,从一定意义上可以说,KaiB 是 KaiABC 磷酸化振荡体系的核心调节元件,该调控受到 ATP 结合比例的影响。

另外,KaiB 通过影响 ATP 的结合诱导 KaiC 单体的交换。很多实验都证实在 KaiC 的磷酸化循环过程中,KaiC 六聚体与单体及另外的 KaiC 六聚体会发生亚基的交换,即 KaiC 六聚体存在不断的解聚与再聚合过程^[5]。研究表明,任何状态的 KaiC 单体都可以和六聚体的 KaiC 中的单体发生交换,从而改变六聚体 KaiC 的磷酸化水平^[21],这对维持较高的振荡振幅是非常重要的。KaiC 的 CII 结构域 ESP 在处于低磷酸化状态时是带正电的,在转向高磷酸化状态时分子表面就会累积负电荷;KaiB 的 C 末端富含酸性氨基酸,而 ATP 是该区域中唯一一个与 KaiB 尾巴带有相同电性的分子。因此,KaiB 很有可能定向的与 KaiC 相互作用而将其聚合体分离为单体及干扰 ATP 的结合。如果 KaiB 将它的尾巴插入到 KaiC 的两个亚基之间,ATP 的结合位点就会被破坏,从而减弱亚基之间的相互作用,最终导致亚基的分离甚至是促成他们之间的交换^[22]。因此,KaiB 除了抑制 KaiA 的功能,还可能用它带负电荷的 C 末端减弱 KaiCII 亚基的相互作用及减弱 ATP 酶的活性甚至是替换 ATP。KaiC 的 CI 亚基与 CII 亚基以及这两个亚基的相互作用,对这种酶活性的转变起关键作用^[23]。综上所述,KaiB 可以通过影响 ATP 的结合、影响 ATP 酶的活性及诱导 KaiC 单体的交换而间接的调控 KaiC 的磷酸化振荡(图 2)。



KaiB通过ATP间接调控KaiC的磷酸化振荡:

- 1)KaiB结合到KaiC的CI亚基,影响CI亚基上的ATP酶活性;
- 2)KaiB结合到KaiC的CII亚基ATP结合槽,影响ATP的结合;
- 3)KaiB破坏KaiC上ATP的结合位点,诱导KaiC单体的交换。

图2 KaiB 调控 KaiC 的磷酸化振荡

5 KaiB 与 SasA 竞争 KaiCII 同一结合位点

信号输出蛋白 SasA, 是组氨酸激酶感受器, 最初的研究表明 SasA 与 KaiC 有相互作用, 并且该作用发生在 SasA 的 N 端结构域 (1-97 位), 进一步的研究又发现他们的相互作用也是有节律性的。SasA-KaiC 复合物的 SAXS 和 EM 的综合结果显示, 两个 SasA 的 N 端结合在 KaiCII 上 KaiB 的结合位点上, 并且对之后 KaiC 的磷酸化状态敏感。非变性 PAGE 胶显示: SasA 与 KaiB 都不结合 KaiCI; SasA 与 KaiB 两种蛋白竞争性的结合到 KaiCII 结构域上; SasA 结合 KaiC 比 KaiB 结合 KaiC 更紧密。简言之就是 SasA 与 KaiB 竞争性的结合到 KaiCII 结构域上, 这个结论就可以很好的解释在 KaiB 的活性被抑制的时候, SasA 可以替代 KaiB 与 KaiC 发生相互作用^[24]。综上所述, SasA^[25] 与 KaiB^[12] 都结合到 KaiCII 结构域上, 并且 KaiB 与 SasA 竞争同一结合位点 B-Loop。

N-SasA 与 KaiB 有很大一段相似序列, 它可以与 KaiC 直接相互作用。进一步研究表明 SasA 与 KaiB 有许多相似的特性, 其中包括 ESP, 但是 N-SasA 水溶液的核磁 (NMR) 图显示 N-SasA 与 KaiB 有很重要的不同点。SasA 与 KaiB 的一个显著的不同就是 SasA 单体就可以感知 KaiC 的磷酸化状态, 但目前没有充足的证据证明 KaiB 也是以单体的形式结合到 KaiC 上的。另外, SasA 与 KaiB 的 C 末端尾巴有很大的不同, KaiB 的 C 末端显著性的特征是富含酸性残基的氨基酸, 而 SasA 的 C 末端作为二聚体的连接子没有这一特征^[22]。KaiB 只能结合到 S431 残基磷酸化状态的 KaiC 上^[26], 而 SasA 能够结合任何磷酸化状态的 KaiC^[27], 但是 KaiB 能替换处于任何磷酸化状态的 KaiC 上结合的 SasA^[14]。KaiC 的 N 端直接与 SasA 相互作用接受时间信号, 并促进 SasA 的磷酸化循环然后将磷酸基团转移给转录因子 RpaA, RpaA 磷酸化而被激活^[28]。在主观黑暗条件下, KaiB-KaiC 复合物激活 CikA, 从而诱导 RpaA 的去磷酸化而被抑制^[29]。因此, KaiB-KaiC 结合的节律可以通过调控随后对 RpaA 具有相反作用的 SasA 与 CikA 而调控生物钟信号的输出。

6 结 语

生物钟是生物适应环境周期性变化的一种内在机制, 具有调控代谢、生理稳态、睡眠及衰老等重要的生理功能, 生物钟的紊乱会严重影响健康或生存。近年来, 陆续有研究证明了生物节律紊乱与皮

肤病、心血管疾病及癌症等疾病的发生发展存在着密切关系。生物钟研究以同时考察时间和空间四维尺度的方式来研究生命现象的节律性动态变化, 可以更为准确地揭示生命现象的规律及内在机制。蓝藻生物钟体系是目前已知最简单的生物钟体系, 但机制又非常复杂, 虽然经过近 30 年的研究, 仅就 KaiB 仍有诸多未解决的问题: KaiB 与 KaiC 的具体结合部位, 结合形式, 结合状态等都存在一些争议, 有些观点甚至截然相反。KaiB 与 KaiC 的相互作用对磷酸化时相转向去磷酸化时相有非常重要的意义, 但是目前其中的机制研究仍不清楚。对 Kai 复合物的研究显示, KaiB 存在单体、二聚体及四聚体, 但是 KaiB 的结合模式, 相互作用的化学计量以及确切的结合表面仍存在诸多疑点。对于这些问题的解决, 有待更多的实验数据的出现。通过对这些生物机制深入、系统的研究, 为人们更好的适应生存环境提供了科学合理的指导, 同时也为相关疾病的研究奠定了理论基础。

【参考文献】

- [1] Teng SW, Mukherji S, Moffitt JR, et al. Robust circadian oscillations in growing cyanobacteria require transcriptional feedback[J]. Science, 2013, 340(6133): 737-740.
- [2] Nakajima M, Imai K, Ito H, et al. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro[J]. Science, 2005, 308(5720): 414-415.
- [3] Iwasaki H, Williams SB, Kitayama Y, et al. A KaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria[J]. Cell, 2000, 101(2): 223-233.
- [4] 陈为群, 刘松, 刘森. 蓝藻生物钟核心振荡器的分子机制研究进展[J]. 生物物理学报, 2013, 29(11): 801-810.
- [5] Ito H, Kageyama H, Mutsuda M, et al. Autonomous synchronization of the circadian KaiC phosphorylation rhythm[J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(11): 1084-1088.
- [6] Kim YI, Dong G, Carruthers CW, et al. The day/night switch in KaiC, a central oscillator component of the circadian clock of cyanobacteria[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2008, 105(35): 12825-12830.
- [7] Phong C, Markson JS, Wilhoite CM, et al. Robust and tunable circadian rhythms from differentially sensitive catalytic domains[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2013, 110(3): 1124-1129.
- [8] Ma L, Ranganathan R. Quantifying the rhythm of KaiB-C interaction for in vitro cyanobacterial circadian clock[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42581.
- [9] Nishiwaki T, Satomi Y, Kitayama Y, et al. A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria[J]. EMBO J, 2007, 26(17): 4029-4037.
- [10] Tseng R, Chang YG, Bravo I, et al. Cooperative KaiA-KaiB-KaiC interactions affect KaiB/SasA competition in the circadian clock of cyanobacteria[J]. J Mol Biol, 2014, 426(2): 389-402.
- [11] Villarreal SA, Pattanayek R, Williams DR, et al. CryoEM and

- molecular dynamics of the circadian KaiB-KaiC complex indicates that KaiB monomers interact with KaiC and block ATP binding clefts[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(18): 3311-3324.
- [12] Chang YG, Tseng R, Kuo NW, et al. Rhythmic ring-ring stacking drives the circadian oscillator clockwise[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2012, 109(42): 16847-16851.
- [13] Iwasaki H, Nishiwaki T, Kitayama Y, et al. KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15788-15793.
- [14] Murakami R, Mutoh R, Iwase R, et al. The roles of the dimeric and tetrameric structures of the clock protein KaiB in the generation of circadian oscillations in cyanobacteria[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(35): 29506-29515.
- [15] Pattanayek R, Williams DR, Pattanayek S, et al. Structural model of the circadian clock KaiB-KaiC complex and mechanism for modulation of KaiC phosphorylation[J]. *EMBO J*, 2008, 27(12): 1767-1778.
- [16] Snijder J, Burnley RJ, Wiegand A, et al. Insight into cyanobacterial circadian timing from structural details of the KaiB-KaiC interaction[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2014, 111(4): 1379-1384.
- [17] 刘松, 刘森. 蓝藻生物钟核心振荡器的 kaiB-kaiC 相互作用的机制[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 42(3): 1-8.
- [18] Murakami R, Miyake A, Iwase R. ATPase activity and its temperature compensation of the cyanobacterial clock protein KaiC[J]. *Genes Cells*, 2008, 13(4): 387-395.
- [19] Terauchi K, Kitayama Y, Nishiwaki T, et al. ATPase activity of KaiC determines the basic timing for circadian clock of cyanobacteria[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2007, 104(41): 16377-16381.
- [20] Mutoh R, Nishimura A, Yasui S, et al. The ATP-mediated regulation of KaiB-KaiC interaction in the cyanobacterial circadian clock[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80200.
- [21] Yoda M, Eguchi K, Terada TP, et al. Monomer-shuffling and allosteric transition in KaiC circadian oscillation[J]. *PLoS One*, 2007, 2(5): e408.
- [22] Pattanayek R, Williams DR, Rossi G, et al. Combined SAXS/EM based models of the *S. elongatus* post-translational circadian oscillator and its interactions with the output His-kinase SasA[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23697.
- [23] Egli M, Mori T, Pattanayek R, et al. Dephosphorylation of the core clock protein KaiC in the cyanobacterial KaiABC circadian oscillator proceeds via an ATP synthase mechanism[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(8): 1547-1558.
- [24] Kageyama H, Kondo T, Iwasaki H. Circadian formation of clock protein complexes by KaiA, KaiB, KaiC, and SasA in cyanobacteria[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(4): 2388-2395.
- [25] Chang YG, Kuo NW, Tseng R, et al. Flexibility of the C-terminal, or CII, ring of KaiC governs the rhythm of the circadian clock of cyanobacteria[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2011, 108(35): 14431-14436.
- [26] Rust MJ, Markson JS, Lane WS, et al. Ordered phosphorylation governs oscillation of a three-protein circadian clock[J]. *Science*, 2007, 318(5851): 809-812.
- [27] Valencia S, Bitou K, Ishii K, et al. Phase-dependent generation and transmission of time information by the KaiABC circadian clock oscillator through SasA-KaiC interaction in cyanobacteria[J]. *Genes Cells*, 2012, 17(5): 398-419.
- [28] Takai N, Nakajima M, Oyama T, et al. A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2006, 103(32): 12109-12114.
- [29] Gutu A, O'Shea EK. Two antagonistic clock-regulated histidine kinases time the activation of circadian gene expression[J]. *Mol Cell*, 2013, 50(2): 288-294.

(收稿日期:2015-11-08;修回日期:2015-12-08)

(本文编辑:张仲书)

(上接第 55 页)

- [3] Hebert PC, Wells G., Blajchman MA, et al. A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. Transfusion requirements in critical care investigators, canadian critical care trials group[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340:409-417.
- [4] 刘德行, 张秋英, 张帆, 等. 改良限制性输血策略指导急诊围术期红细胞输注初探[J]. *中国输血杂志*, 2015, 28(9): 1106-1109.
- [5] Takei T, Amin NA, Schmid G, et al. Progress in global blood safety for HIV[J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2009, 52(2): 127-131.
- [6] Mona Seyed, Attaran Zohreh, Sharifi SM, et al. Prevalence of hepatitis B and hepatitis D coinfection in asymptomatic blood donors in Iran[J]. *APMIS*, 2014, 122(3): 243-247.
- [7] 田蜜, 李永军, 杨娇娇, 等. 限制性输血与开放性输血策略对髋关节置换术老年患者预后的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2014, 30(5): 441-443.
- [8] 廖刃, 刘进. 围手术期血液管理: 由限制性输血走向个体化输血[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(7): 481-482.
- [9] 苏国同. 临床输血发展与未来[J]. *东南国防医药*, 2007, 9(5): 396-397.
- [10] 涂源泉. 产科限制性输血策略的临床研究[A]. 2014 中国输血协会第七届输血大会论文集[C]. 2014.
- [11] 林淑媛, 卢昆林. 大量输血方案在妇产科大出血患者中的应用[J]. *东南国防医药*, 2014, 16(5): 531-532.
- [12] 田学东, 季晓风. 双侧同期人工膝关节表面置换围术期的血液管理[J]. *中华关节外科杂志*, 2013, 7(6): 860-862.
- [13] 中华人民共和国卫生部. 临床输血技术规范[M]. 附件三: 手术及创伤输血指南, 2000-06-02.

(收稿日期:2015-10-30;修回日期:2015-11-23)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)