

藻红蓝蛋白裂合异构酶 E 基因突变体的构建、表达与酶活性检测

马 聪 周 明 张富铁 赵开弘

(华中科技大学环境科学与工程学院 武汉 430074)

摘要:通过诱变分别得到 PecE 的 N 端、C 端和中间位置缺失突变的一系列突变基因的编码产物,测定了这 5 种缺失蛋白质的酶活性的大小。实验结果显示:来自层理鞭枝藻(*M. laminosus*, UTEX 1931)的 PecE[简称 PecE(UTEX 1931)]与来自层理鞭枝藻(*M. laminosus*, PCC 7603)的 PecE[简称 PecE(PCC 7603)]有 81% 的同源性。PecE(UTEX 1931)/PecF(PCC 7603)的酶催化活性与 PecE(PCC 7603)/PecF(PCC 7603)的酶催化活性相当。PecE(UTEX 1931)的 N 端缺失 22 个氨基酸的蛋白质显示出了约 20% 的催化活性;而 N 端缺失 36 个氨基酸、56 个氨基酸的蛋白质, C 端缺失 23 个氨基酸的蛋白质和 PecE(PCC 7603)中间缺失 27 个氨基酸的蛋白质均丧失活性,结果对酶的结构以及对酶活性的影响提供了重要信息。

关键词:藻胆蛋白;裂合异构酶;重组

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)06-0614-05

在层理鞭枝藻中,PEC(藻红蓝蛋白, phycoerythrocyanin)操纵子 E、F 基因编码的裂合异构酶 PecE、PecF 是 PEC 的 α 亚基(简称 α -PEC)生物合成的裂合异构酶。PecE/PecF 催化 PCB(藻蓝胆素, phycocyanobilin)异构为 PVB(藻紫胆素, phycoviolobilin),并与 α -PEC 脱辅基蛋白的 Cys-84 残基以硫醚键共价连接,从而生成具有天然活性的 α -PEC^[2,3]。研究 PecE/PecF 的结构及其在催化反应中的连接异构机制,在揭示藻类的起源进化和光合作用机理方面有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 大肠杆菌株 TG1、BL21 (DE3) 由本室保存。克隆载体 pBluescript SK(+) 为 Stratagene 公司产品,表达载体 pET30a 购自 Novagen 公司, DNA 回收试剂盒为 CLONTECH 公司产品,限制性内切酶和 Taq 酶、T4 DNA 连接酶、IPTG、X-gal 为 SABC 产品。亲和层析介质购自 Amersham Pharmacia 公司。色素 PCB 由德国慕尼黑大学 Hugo Scheer 教授惠赠。引物由中国科学院上海生物化学研究所合成。基因片段由中国科学院上海植物生理研究所用荧光测序试剂盒进行核苷酸序列分析。光谱用 Lambda 25 型

紫外可见光谱仪(Perkin Elmer)测定。

1.2 基因片断的 PCR 扩增 以 pBlr pecE 为模板,扩增条件为:预变性 95℃, 300s; 然后按 95℃, 60s; 50℃, 90s; 72℃, 90s 循环 30 次;最后 72℃延伸 30s。

引物 1: 5'-TA CCC GGG ACT GCT GCT TGT TGT GCT-3'

引物 2: 5'-CG CTC GAG TTA AAG TTG AAT TAA TAA ATC GTC AA-3'

引物 3: 5'-AG CCC GGG CGC ATT CCA TCA GGA GGC-3'

引物 4: 5'-TCT CCC GGG AAA CAT CAA GTG CAA GCA GGT-3'

引物 5: 5'-GTA CCC GGG GAA GAT AAT CAA ATT CGT TAT-3'

引物 6: 5'-GCG CTC GAG TTA GTT ATC TAA TAA GGC TTC CAA AAT-3'

1.3 分子克隆与序列测定 按文献[4]操作,经 PCR 扩增得到的基因片段经 Sma I、Xho I 酶切后,与同样双酶切的克隆载体 pBluescript 连接,转化大肠杆菌 TG1,用含有 IPTG 和 X-gal 的氨苄青霉素平板筛选,挑取白色菌落。根据质粒大小和酶切检验初步鉴定阳性重组子。重组质粒经 Sma I、Xho I 酶切后得到的外

收稿日期: 2002-07-22; 修订日期: 2002-09-30

基金资助: 国家自然科学基金(3970175); 湖北省科技攻关项目(207000331)资助

作者简介: 马 聪(1979-), 男, 山东省济宁市人, 硕士

通讯作者: 周明 Tel: 86 27 87541634; Fax: 86 27 87541634; E-mail: hustmc@sohu.com

源片段与经 *EcoRV*、*Xho I* 酶切的表达载体 pET30a 连接, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 用含有卡那霉素的平板筛选。根据质粒大小和 IPTG 诱导表达的外源融合蛋白的分子量进一步鉴定阳性重组子。所得的基因片段由中国科学院上海植物生理研究所用荧光测序试剂盒进行核苷酸序列分析。

1.4 蛋白质表达与 SDS-PAGE 检测 含外源片段的表达载体以 BL21(DE3) 为宿主菌进行表达。表达菌 37℃ 培养至 $OD_{600} = 0.5-0.7$, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 诱导 6h 后, 取 1mL 菌液离心, 加入上样缓冲液和巯基乙醇(α 1), 沸水浴 5min, 用 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 分析。方法见文献[4]

1.5 蛋白质纯化 由表达载体 pET 构建的重组质粒在大肠杆菌中诱导表达得到的外源融合蛋白 N 端都带有 6 个组氨酸的亲亲和标记, 简称 Histag, 故可采用金属螯合亲和层析法提纯。含各种表达质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) 分别在 1L 含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37℃ 培养至 $OD_{600} = 0.5-0.7$, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 诱导 6h 后, 离心收集细胞, 二次蒸馏水洗两次, -20℃ 保存。将冻存的细胞重悬于 0.5mol/L NaCl、20mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2) 中, 超声 30min, 离心, 上清液用镍螯合层析柱纯化。柱平衡缓冲液为 0.5mol/L NaCl、20mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2), 洗脱液为 100mmol/L EDTA、0.5mol/L NaCl、20mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2)。得到的收集液体积约 4mL, 蛋白质浓度约 3—4mg/mL (Bradford 法测定)。将收集液对 0.5mol/L NaCl、50mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2) 透析三次, 以除去 Ni^{2+} , 得到的蛋白质可直接用于重组。

1.6 体外重组 重组体系中, 加入 0.5mol/L NaCl、50mmol/L 磷酸钾缓冲液、1mol/L Tris·HCl、脱辅基藻胆蛋白、PecE/PecF/PCB 以及其他必要的辅助因子: β -巯基乙醇、 Mn^{2+} 等, 二次蒸馏水补齐至反应总体积为 1.0mL。其中 Tris·HCl、NaCl、磷酸钾终浓度分别为 100mmol/L、166mmol/L、16mmol/L, 溶液 pH = 7.0—7.5。37℃ 暗处反应 3h 后, 离心。

1.7 光谱测定活性 用紫外可见光谱检测重组的色素蛋白质。紫外可见光谱扫描范围 300—800nm, 扫描速度 960nm/min, 狭缝宽度 1.0nm。色素蛋白质可逆光化学性质的测定, 按文献[6]介绍的方法操作。

2 结果与讨论

2.1 基因的 PCR 扩增, 克隆和重组质粒的鉴定

2.1.1 基因缺失的设计 从 PecE(UTEX 1931) 基因 N 端 22 位氨基酸, 36 位氨基酸, 56 位氨基酸部位和 C 端 23 位氨基酸部位开始分别设计缺失, 分别表示为 PecEn22、PecEn36、PecEn56、PecEc23。使缺失部位尽量不在 α -螺旋密集部位, 目的是使缺失后蛋白质的空间结构尽量避免大的改变, 有利于保持最大程度上的酶活性。

PecE(PCC 7603) 基因中间有 2 个 *HindIII* 酶切位点, 相隔 81 个碱基, 缺失这 81 个碱基后不影响基因阅读框架, 这对于设计中间缺失提供了很好的条件。以下中间缺失表示为 PecEm27。

2.1.2 N 端缺失和 C 端缺失 PecE(UTEX 1931) 基因片段的 PCR 扩增 引物 2 和引物 3 用来扩增 PecE 基因 N 端缺失 56 个氨基酸的基因片段, 引物 2 和引物 4 用来扩增 PecE 基因 N 端缺失 36 个氨基酸的基因片段, 引物 2 和引物 5 用来扩增 PecE 基因 N 端缺失 22 个氨基酸的基因片段, 引物 1 和引物 6 用来扩增 PecE 基因 C 端缺失 23 个氨基酸的基因片段。

在设计引物的 5' 端分别引入了 *XhoI*、*SmaI* 识别序列以及 2—3 个保护碱基, PCR 扩增出 606bp、666bp、708bp 和 705bp 的基因片段(图 1a), 琼脂糖凝胶电泳后用 DNA 回收试剂盒回收。然后将片段克隆到 pBlusHpt 中, *XhoI*、*SmaI* 双酶切检测, 得到的酶切图谱(图 1b)符合设计结果。

2.1.3 中间缺失 PecE(PCC 7603) 基因片段的获得 pBlurpecE 质粒中 pecE 上有 2 个 *HindIII* 酶切位点, 相距 81bp, 用 *HindIII* 酶酶切 4h 以上, 然后琼脂糖凝胶电泳。DNA 回收试剂盒回收酶切后大片段, 利用 T4 DNA 连接酶连接, 得到中间缺失 81bp 的重组质粒 pBlurpecEm, *XhoI*、*SmaI* 双酶切检测, 得到的基因片段大小为 726bp, 酶切图谱见(图 1b), 符合设计结果。

2.2 序列分析

阳性重组质粒 pBlurpecE 缺失基因片段经序列分析, 结果显示: 实验得到的缺失突变体的基因序列与预先设计相吻合。

2.3 重组质粒在大肠杆菌中的表达

重组质粒经 *Sma I*、*Xho I* 酶切后得到的外源片段与经 *EcoRV*、*Xho I* 酶切的表达载体 pET30a 连接, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 进行 SDS-PAGE 分析(图 2)。结果表明: pET-pecEn, pET-pecEm 和 pET-pecEc 转化菌经 IPTG 诱导后出现了十分明显的外源蛋白质表达带, PecEn22、PecEn36、PecEn56、PecEm27、PecEc23 蛋白质分子量大小分别为 30kD、29kD、27kD、31kD、30kD, 与预测分子量吻合。

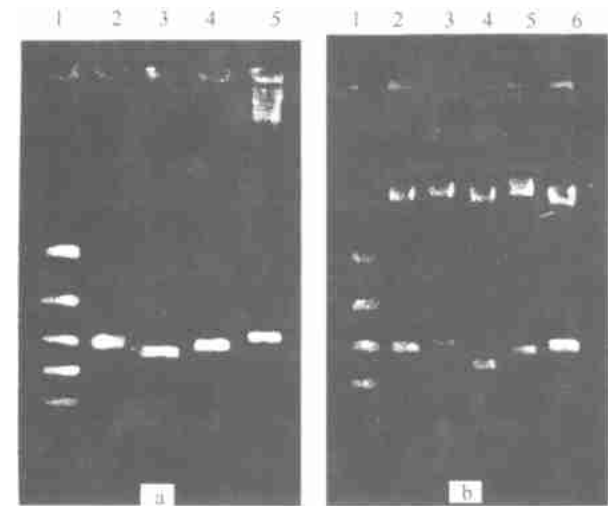


图1 a: PCR产物电泳图 1 DNA分子量从上到下为: 1543bp、994bp、695bp、515bp、377bp; 2 *pecEc23*; 3 *pecEn56*; 4 *pecEn36*; 5 *pecEn22*; b: 重组质粒用酶 *Sma*I、*Xho*I 消化后的琼脂糖凝胶电泳谱图 1 DNA分子量从上到下为: 1543bp、994bp、695bp、515bp、377bp; 2 *pBlr pecEc23*; 3 *pBlr pecEm27*; 4 *pBlr pecEn56*; 5 *pBlr pecEn36*; 6 *pBlr pecEn22*

Fig. 1 a: Agarose gel electrophoresis of PCR product; 1 DNA marker from the top to the bottom: 1543bp、994bp、695bp、515bp、377bp; 2 *pecEc23*; 3 *pecEn56*; 4 *pecEn36*; 5 *pecEc23*; b: Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids digested by *Sma*I、*Xho*I; 1 DNA marker from the top to the bottom: 1543bp、994bp、695bp、515bp、377bp; 2 *pBlr pecEc23*; 3 *pBlr pecEm27*; 4 *pBlr pecEn56*; 5 *pBlr pecEn36*; 6 *pBlr pecEn22*

2.4 光谱分析

在一定波长的光激发下, α -PEC 中辅基色素 PVB 的双键发生可逆的顺反异构, 从而使 α -PEC 的吸收峰在 500—570nm 间发生位移, 活性高达 90% 以上。因此, 根据该可逆光致变色性质可判段 α -PEC

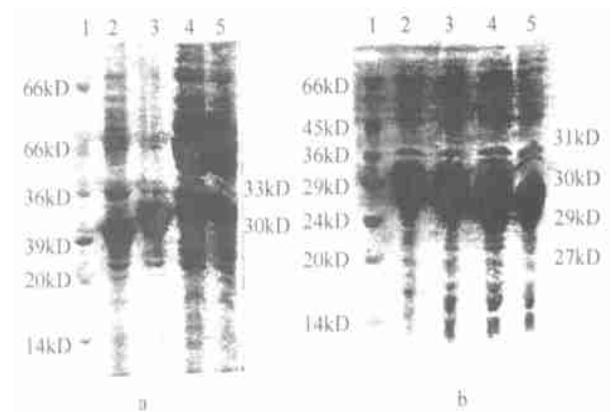


图2 *PecEn22*、*PecEm27*、*PecEc23*、*PecEn36*、*PecEn56* 基因表达产物的 SDS-PAGE a: 1 蛋白质标准分子量; 2 *PecEn22* 诱导表达产物; 3 *PecE* 诱导表达产物; 4 *PecEn22* 未诱导表达产物; 5 表达载体 *pET* 诱导表达产物; b: 1 蛋白质标准分子量; 2 *PecEm27* 诱导表达产物; 3 *PecEc23* 诱导表达产物; 4 *PecEn36* 诱导表达产物; 5 *PecEm27* 诱导表达产物

Fig. 2 SDS-PAGE of the overexpressed *PecEn22*、*PecEm27*、*PecEc23*、*PecEn36*、*PecEn56* a: 1 Protein molecular weight marker, 2 *PecEn22* induced with IPTG; 3 *PecE* induced with IPTG; 4 *PecEn22* not induced with IPTG; 5 *pET* induced with IPTG; b: 1 Protein molecular weight marker; 2 *PecEm27* induced with IPTG; 3 *PecEc23* induced with IPTG; 4 *PecEn36* induced with IPTG; 5 *PecEn56* induced with IPTG

重组是否成功。

层理鞭枝藻藻红蓝蛋白裂合异构酶 *PecE*/*PecF* 酶催化 PCB 异构为 PVB, 并与 α -PEC 脱辅基蛋白的 Cys 84 残基以硫醚键共价连接, 从而生成具有天然活性的 α -PEC, 其最大吸收峰在 570nm 处(图 3a)。

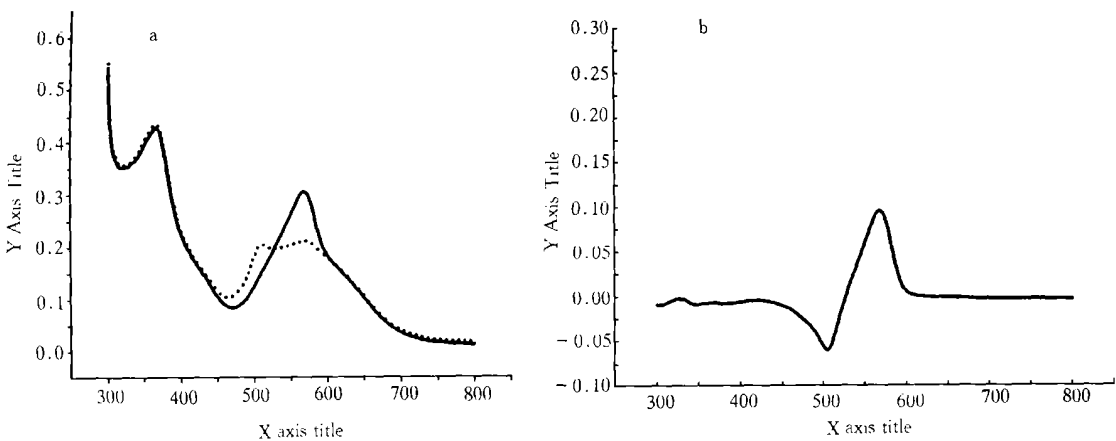


图3 体外 *PecE*(PCC 7603)/*PecF*(PCC 7603) 与 PCB 重组生成产物的吸收光谱。a: 500nm 光照(实线)和 570nm 光照(虚线)的吸收光谱 b: (500nm—570nm) 差减光谱

Fig. 3 Absorption spectra of reconstituted products of PCB after catalytical reaction with *PecE*/*PecF* a: Absorption spectra after irradiation with 500nm light (solid line) and after subsequent irradiation with 570nm light (broken line) b: Difference absorption of 500nm irradiation minus 570nm irradiation

而不经过 PecE/PecF 酶催化的直接重组中,PCB 不能转变为 PVB, 不能得到具有天然活性的 α -PEC, 其最大吸收峰在 585nm 处。

通过比较 PecE(UTEX 1931) 和 PecE(PCC 7603) 的氨基酸序列发现, 两者的同源性高达 81%, 通过重组实验发现 PecE(UTEX 1931)/PecF(PCC 7603) 催化 α -PEC 重组的活性与 PecE(PCC 7603)/PecF(PCC 7603) 催化 α -PEC 重组的活性相当。这就为进一步设计缺失 PecE(UTEX 1931) 来与 PecF(PCC 7603) 进行催化反应做好了理论准备。

PecE 各缺失蛋白质经过纯化并与 PecF、PecA 亚基和色素 PCB 重组, 通过 α 亚基的光致可逆变色性质研究各缺失蛋白的酶活性。在 PecEn22(UTEX 1931)/PecF(PCC 7603) 酶催化下, 重组反应生成具有可逆光致变色性质的 α -PEC, 其活性相当于 PecE(PCC 7603)/PecF(PCC 7603) 催化活性的 20% (表 1), 在 PecEn36(UTEX 1931)/PecF(PCC 7603)、PecEn56(UTEX 1931)/PecF(PCC 7603)、PecEc23(UTEX 1931)/PecF(PCC 7603) 和 PecEm27(PCC 7603)/PecF(PCC 7603) 酶催化下, 重组反应没有生成具有可逆光致变色性质的 α -PEC。

表 1 PecE 及其各缺失蛋白质重组活性的比较
Tab 1 Comparison of the enzymatic activity of PecE and its mutants

蛋白质	重组活性
PecE(PCC 7603)	100%
PecE(UTEX 1931)	80%
PecEn27(PCC 7603)	0
PecEn56(UTEX 1931)	0
PecEn36(UTEX 1931)	0
PecEn22(UTEX 1931)	20%
PecEn23(UTEX 1931)	0

注: 酶活性分析条件: PecA+ PecE/ PecF+ PCB 避光 37℃温浴 3h。

实验结果表明当层理鞭枝藻藻红蓝蛋白裂合异构酶 PecE 的 N 端缺失 22 个氨基酸后, 没有影响到该酶的活性中心, 导致活性降低的原因推测是因为其缺失诱变后导致了酶三维空间结构的微弱改变, 从而使活性降低。而在 N 端缺失 36 个氨基酸和 56 个氨基酸、在中间缺失 27 个氨基酸以及在 C 端缺失 23 个氨基酸均不同程度的改变了 PecE 的三维蛋白质空间结构, 并且可能触及到了酶的活性中心, 导致酶活性的丧失。

蛋白质的三维立体结构以及其合成时的肽段走

向是和周围的环境相互制约, 相互协作而完成的, 裂合异构酶 PecE/ PecF 必须一起作用才能导致产生具有天然活性的 α -PEC, 在体内 PecE 和 PecF 可能相互缠绕, 构成特殊的空间立体结构来作用于酶反应底物。在体外, PecE、PecF 均是单独克隆表达, 而将单独克隆表达的酶蛋白混合用于重组, 仍可以得到很高的活性, 这是因为 PecE 和 PecF 在体外重组过程中两者之间在空间结构上的相互作用。对 PecE 的缺失诱变即使没有影响到酶的活性中心, 但是由于酶自身的空间结构改变导致无法和 PecF 缠绕形成空间完美构型, 也会导致无法发挥其催化效应。

在 PCB 异构为 PVB 的每一步, 酶的有关氨基酸残基都起着重要作用。可通过对酶分子定点诱变, 对其机理进行详细研究, 一方面确定哪些残基起作用, 另一方面有可能分离得到 PCB 异构为 PVB 过程中的中间产物。裂合异构酶 PecE 中存在着的对蛋白质结构比较重要的氨基酸比如半胱氨酸, 因此可以通过本实验中得到的一些结论设计基因定点突变, 进一步从分子水平来洞察酶的蛋白质结构和空间作用位点, 为进一步进行酶的结晶和 X-射线晶体衍射打下基础并提供一些可以利用的数据。

参考文献:

[1] Glazer A N. Light harvesting by phycobilisomes [J]. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 1985, **14**: 47

[2] Zhao K H, Deng M G, Zheng M, *et al.* Novel activity of a phycobiliprotein lyase: both the attachment of phycocyanobilin and the isomerization to phycoviolobilin are catalyzed by the proteins PecE and PecF encoded by the phycoerythrocyanin [J]. *FEBS Letters*, 2000, **469**: 9—13

[3] Storf M, Parbel A, Meyer M, *et al.* Chromophore attachment to biliproteins: specificity of PecE/ PecF, a lyase isomerase for the photoactive 3'-Cys α 84 phycoviolobilin chromophore of phycoerythrocyanin [J]. *Biochemistry*, 2000, **40**: 12444—12456

[4] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual (second edition) [M]. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989

[5] Zhao K H, Scheer H. Type I and type II reversible photochemistry of phycoerythrocyanin α -subunit from *Mastigocladus laminosus* both involve Z, E isomerization of phycoviolobilin chromophore and are controlled by sulfhydryls in apoprotein [J]. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995, 1228: 244

[6] Arciero D M, Bryant D A, Glazer A N. In vitro attachment of bilins to apophycocyanin. *J. Biol. Chem.* 1988, **263**: 18343—18349

CLONING, EXPRESSING AND ACTIVITIES STUDY OF *MASTIGOCLADUS LAMINOSUS*
PECE MUTATED GENES

MA Cong, ZHOU Ming, ZHANG FuTie and ZHAO KaiHong

(College of Environmental Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract: Phycoerythrocyanin(PEC) is an integral compent of the Phycobilisomes(PBS) . Unlike other phycobiliproteins, isolated PEC shows a remarkable photochemistry. It is photoreversibly photochromic, and the reactivity has been related to the unusual chromophore —PVB bound to Cys 84 on the subunit via a thioether linkage. For PVB, the problem has recently been clarified by the identificatin of a new enzymatic activity of the two lyase subunits (PecE, PecF) , which genes are located in the *pec*-operon downstream from the structural(*pecB*, *A*) and linker genes(*pecC*) .

PecE and PecF, the product of two phycoerythrocyanin lyase genes(*pecE* and *pecF*) of *Mastigocladus laminosus*(*fischerella*) , catalyze two reactions: (1) the regiospecific addition of phycocyanobilin (PCB) to Cys 84 of the phycoerythrocyaninr subunit (PecA) , and (2) the isomerization of the PCB to the phycoviolobilin (PVB)-chromophore. In the present study, we have used deletion and mutagenesis to produce a seires of mutated forms of PecE.

The mutated PecE (PecEn22, PecEn36, PecEn56; PecEc23, PecEm27)which means losing 22, 36, 56 amino acid in N-end; 23, amino acid in G end; and 27 amino acid in middle, were got with molecular design.

First, the PCR products were purified and digested with *Sma*I and *Xho*I, then recombined with pBluescript vector and transformed into the *E. coli* TG1 strain. The mutated fragments were inserted into pBluescript vector and were confirmed with sequencing. Meanwhile the mutated fragments were subcloned into another expression vector pET30. After induction of IPTG, the mutated recombinants of PecE and the PecF are highly expressed in *E. Cdi* BL21.

In vitro, when we combined the mutated PecE and PecF with PCB and PecA together, we got a series of spectra characterizing the enzymatic reconstitutions. Compared to the highly reversible photochemistry of the natural α -PEC, the variations in relative reconstitution activity were confirmed.

Incubation of PecE, PecF with PCB resulted in an absorption increase at 570 nm which has the characteristic absorption properties, the same as the native α -PEC. The absorption blue-shifted to 500nm after irradiation with 570nm light, and the remarkable different absorption were measured and used to denote the native abilities.

Compared to PecE between UTEX1931 and PCC7603, we can find that they displayed high homology (81%) in level of amino acid. Based on this reason, the enzymatic activities were measured and PecE(UTEX1931) exhibited 80% activity compared to PecE(PCC7603) which exhibited 100% activity.

The mutated PecE (UTEX 1931)which lost 36, 56 amino acid in N-end , 23 amino acid in G end lost the enzymatic activities, which means that there must exist the important residue in these lost amino acid. The mutated PecE(PCC 7603) which lost 27 amino acid in the middle lost the enzymatic activity, which means that the lost of these 27 amino acid had destroyed the original structure of PecE inevitably. However, the mutated PecE (UTEX 1931)which lost 22 amino acid in N-end had enzymatic activity of 20% . We can conclude that maybe the lost of 1—22 amino acid had not destroyed the structure as a whole, but induced the change on local structure.

The results provide the important information on active center and space structure of enzyme PecE, and the relationship between the structure and enzymatic activity of this enzyme was arisen from the results.

Key words: PecE; PecF; PCB; PVB; *Mastigocladus laminosus*; Reconstitution