

层理鞭枝藻藻红蓝蛋白操纵子 F 基因的克隆和表达

郑 敏¹ 答 亮¹ 邓明刚¹ 秦艺¹ 周 明² 赵开弘²

(1. 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072; 2. 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要: 以层理鞭枝藻总 DNA 为模板, 用 PCR 技术扩增得到藻红蓝蛋白操纵子 F 基因 (*pecF*), 然后克隆于质粒 pBluescript sk(+)。将 *pecF* 基因克隆于表达载体 pGEMD, 所形成重组质粒 pGEMD-*pecF* 在 *E. coli* BL21(DE3) 中获得 10% 外源表达蛋白并形成包涵体。这个表达产物的分子量为 22.5kDa, 与按 DNA 序列预测的蛋白分子量一致。经藻红蓝蛋白 α -亚基的重组实验证明, 该 *pecF* 基因编码的表达产物 PecF 与藻红蓝蛋白操纵子 E 基因 (*pecE*) 的表达产物 PecE 共同存在时, 具有藻红蓝蛋白裂合酶活性。

关键词: 藻红蓝蛋白操纵子 F 基因; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: Q753 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)02-0168-007

蓝藻、红藻和隐藻的藻胆体 (Phycobilisome, PbS) 中存在的藻胆蛋白 (Phycobiliproteins) 与藻胆色素 (Phycobilins) 共价结合^[1], 从而具有特定的光谱性质, 在光合作用能量传递过程中起重要作用^[2]。Fairchild 等人的研究^[3]表明藻蓝蛋白 (Cpc) 操纵子中 *cp cE* 和 *cp cF* 基因编码的蛋白 CpcE 和 CpcF 催化其 α -亚基脱辅基蛋白与藻蓝胆素 (PCB) 的结合反应及其逆反应。初步预测 PecE 和 PecF 类似于 CpcE 和 CpcF, 催化藻红蓝蛋白 α -亚基的辅基色素 (藻紫胆素 PVB) 的异构化及其与藻红蓝蛋白 α -亚基脱辅基蛋白 (PecA) 共价偶联。因此, 研究 PecE 和 PecF 在 α -PEC 脱辅基蛋白与辅基色素结合的机制中的生物化学作用, 对于揭示藻类光合作用色素蛋白的生物合成和光合作用能量传递机理具有重要意义。同时 α -PEC 具有高效可逆光致变色的性质^[4,5], 为了开发具有这种性质蛋白质材料, 需要人工设计 α -PEC。PecF 是 α -PEC 体外重组所必需的一种工具酶。为此本文为进行 α -PEC 的体外重组而外源表达 PecF, 实验证明表达的 PecF 与同样制备的 PecE 基因的蛋白产物 PecE 共同存在时具有 α -PEC 裂合酶活性。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 菌株 TG1、BL21(DE3)、克隆载体 pBluescript 为本实验室保存, 表达

收稿日期: 2000-07-04; 修订日期: 2001-08-30

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 39770175)资助项目; 武汉市晨光计划(编号: 965001037-21)资助项目

作者简介: 郑敏(1975—), 女, 湖南省桃源县人; 武汉大学生命科学学院 98 级硕士研究生

通讯作者: 赵开弘

载体 pGEMD 由武汉大学生命科学学院马辉文教授赠送, 蛋白酶 K 为 Merck 公司产品, NucleoTrap DNA Purification Kits and Accessories 纯化 DNA 试剂盒为美国 Clontech 公司产品, 限制性内切酶 Sma I、Xho I、Pvu II, Taq 酶、T4DNA 连接酶、IPTG、X-gal 均为 SABC 公司产品。引物 P₁、P₂ 由中国科学院上海生物化学研究所合成, 其核苷酸序列如下:

P₁: 5'-AAC CCG GGA TCG CAG CTC GCT TTA CA-3'

P₂: 5'-GGC TCG AGT TAG CAG GCG GGA ATT TG-3'

1. 2 层理鞭枝藻总 DNA 的提取 层理鞭枝藻总 DNA 由德国慕尼黑大学植物学院 Hugo Scheer 教授赠送。提取方法按文献[6]操作。

1. 3 pecF 基因的 PCR 扩增 以藻总 DNA 为模板, P₁、P₂ 为引物, 按如下条件进行 PCR 扩增: 预变性 94℃, 300s; 然后按 94℃, 60s; 45℃, 90s; 72℃, 90s 循环 30 次; 最后 72℃ 延伸 300s。

1. 4 pecF 基因的分子克隆与限制性内切酶物理图谱检测及序列测定 分子克隆按文献[6]操作。pecF 的物理图谱的检测, 对重组质粒 pBluescript-pecF 用 Sma I 和 Xho I 双酶切, 而对于 pGEMD-pecF 用 HindIII, Pvu II, Nhe I, Pst II 单酶切, 用 HindIII 和 Xho I 双酶切, 用琼脂糖电泳检测得到的酶切 DNA 片段。所得的 pecF 基因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. 5 pecF 基因的表达及 SDS-PAGE 检测 重组质粒 pGEMD-pecF 转化到宿主菌 BL21 (DE3) 中, 得到的表达菌株按 Studier^[7]的方法加入 IPTG 诱导 5h 后, 离心收集大肠杆菌细胞, 5mL 培养物分为两份。其中一份悬浮于 1mL TE (10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶液中, 用超声波仪破碎细胞, 然后 10 000r/min 离心, 沉淀和上清分别溶于 SDS-PAGE 上样缓冲液; 另一份细胞则直接溶于 SDS-PAGE 上样缓冲液, 用 5% 的浓缩胶和 15% 的分离胶进行 SDS-PAGE 分析^[6]。

1. 6 α-PEC 的体外重组 从层理鞭枝藻中提取藻胆色素 PCB^[8], 保存在 DMSO 中, PCB 浓度为 1mmol/L。将转化了 pGEMD-pecF 的大肠杆菌 BL21(DE3) 洗净, 离心, 再用 Tris 缓冲液(50mmol/L, pH6.5) 悬浮菌体, 30min 超声波破细胞, 8000r/min 离心 15min, 取上清, 该上清液中含有溶解的 PecF 蛋白。用相同的方法制备 PecA, PecE 上清液。分别取含有 PecA, PecE, PecF 的上清液各 1mL 和 30μL 的 5mol/L 的巯基乙醇, 与 30μL 的 PCB 母液混合, 使 DMSO 在混合液中的终浓度为 1%, 藻胆色素 PCB 在重组混合物体系中的终浓度为 10μmol/L, 在暗中反应 4h。离心混合反应体系, 除去沉淀后, 检测上清的紫外可见吸收光谱和差示光谱。

2 结果和讨论

2. 1 pecF 基因的 PCR 扩增

根据 Ebelein 等人报道的 pecF 序列^[9]设计引物 P₁、P₂, 在引物的 5' 端分别引入了 Xho I 和 Sma I 识别序列和两个保护碱基, 在 PCR 反应中, 退火温度为 45℃, 与正常的退火温度相比, 该温度偏低, 但在该条件下扩增特异性好, 扩增片段的大小为 640bp 左右(图 1), 与预计的吻合。

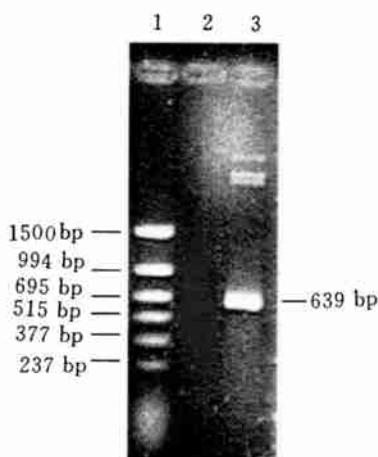


图 1 *pecF* 的 PCR 扩增

Fig. 1 Agarose electrophoresis of PCR product

1. PCR marker;
2. 阴性对照 negative control;
3. 扩增的 *pecF* 片段 PCR product

2.2 *pecF* 基因的克隆与重组质粒的鉴定

用 NucleoTrap DNA Purification Kits And Accessories 试剂盒从凝胶上回收 PCR 产物, 经 Xho I、Sma I 双酶切, 然后与同样酶切的 pBluescript 载体连接, 构成重组质粒 pBlu-*pecF* (图 2)。用 pBlu-*pecF* 转化 TG1 感受态细胞, 用含有 IPTG 和 X-gal 的青霉素平板筛选重组体, 挑取白色菌落, 根据质粒大小初步鉴定阳性重组子, 并使用 PCR 方法及限制性片段图谱分析作进一步鉴定。重组质粒用 Xho I 和 Sma I 双酶切得到 640bp 的插入片段, 与预计的大小一致(结果未显示)。

2.3 序列分析

阳性重组质粒 pBlu-*pecF* 经序列分析, 知其中 *pecF* 序列(图 3)与文献[9]报道的 *pecF* 序列在核苷酸水平和氨基酸水平上完全一致(图 4)。

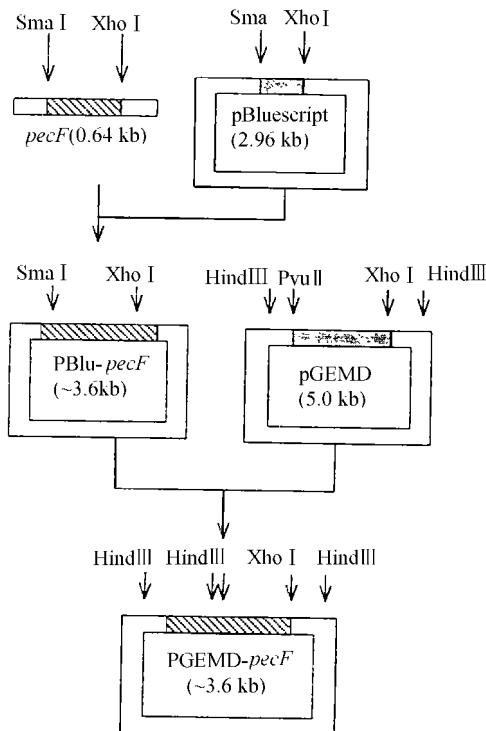


图 2 重组质粒 pBlu-*pecF* 和 pGEMD-*pecF* 的构建

Fig. 2 Construction of pBlu-*pecF* and pGEMD-*pecF*

a ATGATCGCAGCTCGCTTACAAATAGCAAGCAACTTATTTACAATTAAACTGCGCTTGTCAACCCGCAAGAT
b AACCGGGG —————

a CGCCTTGTGCCATTGCTGCTATCTCTGATAGTGAAGACTACGGAAGTGGCACTAATTCTGCCTTGCTGCAACTTTAAG
b —————

a TCGCCATCACCATCATTCCTCCGTGGCTACTGCTGCTGTTGAAGTTTAGTCAAGCTAGCACCTGGCTCGTAGAACCAC
b —————

a TGCTTGCAGCTTTCGCTCTTGTAGCGATCAGGGTTTCCAAGCTTGGATTATTCAAGCTTACGGATGATGATTGGTGTGATGCT
b —————

a AAAGCATTGATTGCTAGCAGAAGTTGTCGGTACGGAAAGTTGCTGCCATCACTGTCAAGGTAATGTCCGCGCATTGCCG
b —————

a ACCGGCACTGGAAAATAGGCAGTACTGTCAAAGATAGGGAAAGTTACTGACCGCGCTATAGAAAAGCTGCATTGGCGC
b —————

a TGGTGAECTCCCAAGATTGGGATTGCGTTACGCCGTGAGTTTCTTGCAAGGAAATTGCCACACCGCAGGCGCATGCT
b —————

a GTTTGTCTGCAGCTGTAGCTGGCAATCGGATTGGTTGTGCATCGCAATGAAAAAGCCTAGAACAAATTCACCGC
b —————

a CTGCTGA
b —————A—CTCGAGGG

图 3 *p ecF* 核苷酸序列与文献[9]中序列的比较

Fig. 3 Comparison of *p ecF* sequence

a. 文献报道的序列; b. pBlu-*p ecF* 的序列;

————相同的碱基序列

a MIAARFTNSKQLISQLNCALSPADALCAIAAISDSETTEVAVISALLQLLSRHHHSSVATAAVEVLVKLAPASVEPLLA
b —————AF

a RSCSDQGFQAWIQLALAMIGDAKAFDLLAEVVGTEVANHCQGNVRRIAARGLGKIGSTVKDREVTDRAIEKLHWALVTPQDW
b —————

a GLRYAAVVLQEIATPQAHAVLSAAVAGESDWVVRSRMKKALEQIPAC*
b —————*

图 4 *p ecF* 基因推译的氨基酸序列的比较

Fig. 4 Amino-acid sequence deduced from DNA sequence of *p ecF*

a. 文献报道的序列 the reported; b. pGEMD-*p ecF* 推译的氨基酸序列, —————相同的氨基酸序列

2.4 表达质粒 pGEMD-*pecF* 的构建及其物理图谱的分析

表达载体 pGEMD 上依次有 HindIII、PvuII、Xho I 和 HindIII 酶切位点, 它们之间相隔 260bp、1560bp 和 310bp。将 pBlu-*pecF* 用 Sma I 和 Xho I 进行双酶切, 用 Nucleo-Trap DNA Purification kits and Accessories 试剂盒从凝胶上回收 *pecF* 片段, 然后与以 PvuII 和 Xho I 双酶切的 pGEMD 连接, 构建成表达质粒 pGEMD-*pecF*(图 2), 转化 TG1。阳性重组质粒 pGEMD-*pecF* 经限制性内切酶作用对其物理图谱进行分析: pGEMD-*pecF* 上有四个 HindIII 位点, 其中外源片段上的两个位点之间只有 15 个碱基(图 2)。以 HindIII 酶切可以见到三条带, Xho I 位点在外源片段之上, 用 HindIII 与 Xho I 双切得到四条带。重组质粒用 HindIII 单酶切得到 0.6kb、0.5kb 两个小片段, 用 HindIII 和 XhoI 双切得到 0.5kb 和两个分别为 0.35kb 和 0.25kb 的小片段。酶切检测的结果与预计的片段大小一致。证明所得到的外源片段的物理图谱与已经测序的层理鞭枝藻的藻红蓝蛋白 *pecF* 基因的物理图谱吻合(图 5)。

2.5 表达质粒 pGEMD-*pecF* 在大肠杆菌中的表达

将鉴定的重组质粒 pGEMD-*pecF* 转化 BL21(DE3), 按文献[6] 提取总蛋白, 进行 SDS-PAGE 分析(图 6)结果表明: 包含有 pGEMD-*pecF* 的转化菌经 IPTG 诱导后表达了一个分子量为 22.5kDa 的蛋白质, 而未诱导的含有 pGEMD-*pecF* 的转化菌和诱导的 BL21(DE3)受体菌均无此蛋白质。这证明 pGEMD-*pecF* 转化菌经 IPTG 诱导后表达了一个外源蛋白, 经检测其分子量为 22.5kDa, 与引入的外源基因表达产物的预测分子量吻合。SDS-PAGE 分析表明表达蛋白分布在细胞提取物的沉淀中, 说明表达产物是以包涵体的形式存在。

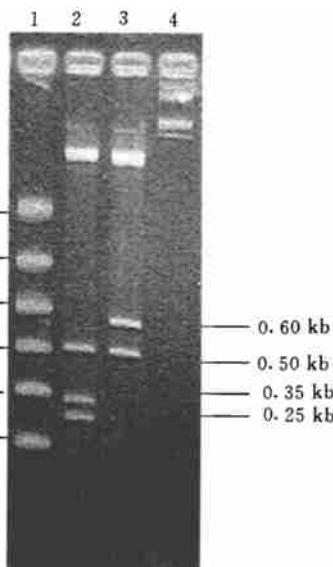


图 5 pGEMD-*pecF* 的部分限制性内切酶的物理图谱

Fig. 5 the agarose electrophoresis of the endonuclease-digested pGEMD-*pecF*

1. DNA 分子 Marker DNA marker; 2. Xho I 和 HindIII 对 pGEMD-*pecF* 酶切; 3. HindIII 对 pGEMD-*pecF* 酶切; 4. 没有酶切的 pGEMD-*pecF* 作为对照

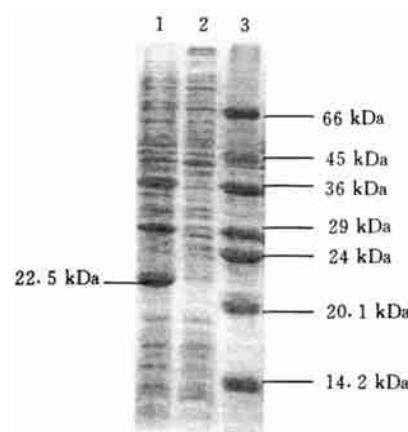


图 6 *pecF* 外源表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 6 SDS-PAGE of the overexpressed protein PecF

1. IPTG 诱导表达的 *pecF* BL21(DE3) / pGEMD-*pecF* induced with IPTG; 2. 没 IPTG 存在时的表达 BL21(DE3) / pGEMD-*pecF* not induced; 3. Protein Marker. Protein molecular weight marker

2.6 表达产物在 α -PEC 体外重组中生物活性

用 *E. coli* 表达的蛋白 PecF 与本实验室同样制备的 PecA 和 PecE 及藻蓝胆素(PCB)混合, 反应 4h 后测定该反应混合物的可见光谱, 发现形成了 565nm 吸收峰, 它等同于天然 α -PEC 中偶联在脱辅基蛋白上的辅基色素 PVB 呈顺式构型时的光谱吸收最大值。该样品用 570nm 光照 3min 后测光谱, 最大吸收值在 505nm。同样的条件下, PVB 呈顺式构型的天然 α -PEC 会转化到 PVB 呈反式的 α -PEC, 最大吸收值即在 505nm 处。体外重组体系中形成的产物的可逆光化学与天然 α -PEC 的完全吻合, 进一步证明这个重组实验生成了天然的 α -PEC(图 7)。在对照实验中, PecE 或者 PecF 单独存在时都不能形成 α -PEC。以上结果说明外源表达的 PecF 具有和天然 PecF 一样的生物活性, 与 PecE 共同作用能够体外催化 PCB 异构化为 PVB, 并催化 PVB 和脱辅基蛋白 PecA 共价偶联。PecF 经过纯化后, 形成许多沉淀, 影响该酶的催化活性。超声破细胞后离心取上清, PecF 处于溶解状态, 有利于重组成功。

完整的 PEC 是某些蓝绿藻集光藻胆体的功能成分。纯的 PEC 和其 α -亚基(α -PEC)具有可逆光致变色的性质。为了人工设计 α -PEC, 需要得到能够在体外催化色素与脱辅基蛋白共价偶联的裂合酶。外源表达成功该裂合酶为以 α -PEC 为核心开发藻胆蛋白高效可逆光致变色蛋白质分子材料打下坚实的基础。

参考文献:

- [1] Glazer A N. Light harvesting by phycobilisomes, Ann. Rev[J]. *Biophys. Biophys. Chem.*, 1985, **14**: 47
- [2] Zuber H. Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus (Stemhak K E. Ed) [M]. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory press*, 1985, 233
- [3] Fairchild C D, Zhao J, Zhou J J, et al. Phycocyanin α -subunit phycocyanobilin layse Proc[J]. *Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**: 7017
- [4] Zhao K H, Scheer H. Type and type reversible photochemistry of phycocerythrocyanin α -subunit from Mastigocladus Laminosus both involve Z, E isomerization of phycoviolobilin chromophore and are controlled by sulphydryls in apoprotein [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995, **1228**: 244
- [5] Zhao K H, Rainer Haessner, Edmund Cmiel, Hugo Scheer, Type I reversible photochemistry of phycocerythrocyanin involves Z/E-isomerization of α -84 phycoviolobilin chromophore [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995, **1228**: 235
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning A laboratory manual (second. ed.)[M]. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989
- [7] Studier F W, Moffatt P A. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels [J]. *J. Mol. Biol.*, 1986, **189**: 113

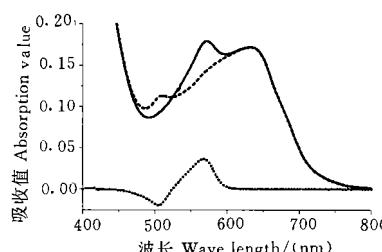


图 7 α -PEC 体外重组后测可见光光谱和重组产物的可逆光化学的吸收差示光谱

Fig. 7 Absorption spectra of reconstituted

α -PEC. Solid line

- 500nm 照射 3min 后测得的光谱 After irradiation with 500nm light; The dash line;
- - - 570nm 照射 3min 后测得的光谱 After irradiation with 570nm light; The dot line;
- ... 以上两个光谱结果的差示光谱 Difference spectrum of the two absorption spectra

- [8] O Carra, P. and O hEocha, C. Bilins released from algae and bilinproteins by methanolic extraction. [J]. *Phytochemistry* 5, 1966, 993
- [9] Ebelein M, Kufer W. Genes encoding both subunits of phycoerythrocyanin, a light-harvesting biliprotein from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* [J]. *Gene*, 1990, 94: 133

CLONING AND OVEREXPRESSING OF PHYCOERYTHROCYANIN OPERON F-GENE OF *MASTIGOCLADUS LAMINOSUS* IN *ESCHERICHIA COLI*

ZHENG Min¹, DA Liang¹, DENG Ming-gang¹, QING Yi-min¹,
ZHOU Ming² and ZHAO Kai-hong²

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072; College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract: By PCR method, apo-phycoerythrocyanin operon F-gene (*pecF*) of *Mastigocladus laminosus* was amplified from its genomic DNA, and then cloned in pBlue-script. The *pecF* gene was subcloned into the expression vector pGEMD, and then transformed into *E. coli* BL21 (DE3). After induction, a new protein of molecular weight 22.5kDa existing in inclusion body was overexpressed. The expression product was confirmed to possess phycoerythrocyanin lyase activity.

Key words: Phycoerythrocyanin operon F-gene; Gene clone; Gene overexpression