

鱼腥藻 PCC7120 藻红蓝蛋白操纵子 A、E 和 F 基因的克隆、表达和活性分析

孙亚楠¹ 武 栋² 周 明¹ 赵开弘¹

(华中科技大学, 1. 环境科学与工程学院; 2. 生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要: 通过 PCR 技术从鱼腥藻 PCC7120 总 DNA 中扩增藻红蓝蛋白 A 基因(*pecA*)、E 基因(*pecE*)、F 基因(*pecF*), 将 *pecA*、*pecE*、*pecF* 分别克隆于 pBluescript, 然后将 *pecA*、*pecE*、*pecF* 基因分别插入表达载体 pET30a 进行高效表达。*pecA* 表达产物藻红蓝蛋白 α 亚基脱辅基蛋白 PecA 与藻蓝胆素 PCB 在 *pecE*/*pecF* 表达产物裂合异构酶 PecE/ PecF 催化下进行体外重组, 产物经提纯后, 用紫外可见吸收光谱和荧光光谱检测, 结果表明生成的色素藻胆蛋白具有藻红蓝蛋白 α 亚基所特有的光谱性质和可逆光致变色性质。

关键词: 藻红蓝蛋白 α 亚基; 裂合异构酶; 基因克隆; 基因表达; 体外重组

中图分类号: Q753 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3207(2004)03-0275-04

藻胆蛋白是藻类光合作用捕光复和物的功能组分, 所以研究藻胆蛋白生物合成对认识光合作用的形成和机理非常重要。通常 PEC 被认为在活藻体内(*in vivo*) 只起到吸收和传递光能的作用, 分离提纯的 α -PEC 则具有独特的高效可逆光致变色性质^[1-3], 这种特性表现在其吸收光谱在受到特定波长的光照射之后发生可逆互变。在本工作中, 为了进一步分析 PecA、PecE、PecF 结构与功能的关系, 根据 Cai 等人报道的鱼腥藻(*Anabaena* PCC 7120) DNA 序列^[4], 选择了含有藻红蓝蛋白的鱼腥藻, 通过相关基因的克隆表达, 然后体外合成得到具有天然活性的 α -PEC, 从而为进一步研究其可逆光致变色机制, 并根据胆素蛋白结构与功能的关系开发出具有实用性的胆素蛋白分子信息功能材料打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 鱼腥藻(*Anabaena* PCC 7120) 购自中国科学院淡水藻种库 (FACHB), 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、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 Sma I、Xho I、EcoR V 为 MBI 公司产品, Taq

酶为 Biostar 公司产品, 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。基因片段由上海博亚生物技术有限公司用荧光测序试剂盒进行核苷酸序列分析。光谱用 Perkin Elmer Lambda 25 型紫外可见光谱仪和日立 F-4500 型荧光光谱仪测定。

1.2 基因片段的 PCR 扩增 以鱼腥藻 PCC 7120 总 DNA 为模板, 扩增条件为: 预变性 94℃, 300s, 然后按 94℃, 60s; 48℃, 90s; 72℃, 90s; 循环 30 次, 最后 72℃ 延伸 300s。

引物 1: 5'-TT CCC GGG AGT ATG AAA ACA CCT TTG A-3'

引物 2: 5'-TTT CTC GAG CCC ACA AGC TTT GTC TTA ACT-3'

引物 3: 5'-AAA CCC GGG ATG ACT GCT GAA CCA ATT-3'

引物 4: 5'-CCC CTC GAG CAG TTA TGA GTT TTA AAG TTG-3'

引物 5: 5'-AAA CCC GGG ATG AAT CAA GCT TCA TTG-3'

收稿日期: 2003-03-20, 修订日期: 2003-04-12

基金项目: 国家自然科学基金(30270326 和 90201001) 资助

作者简介: 孙亚楠 (1979-), 女, 湖北襄樊市人, 硕士研究生

通讯作者: 赵开弘, Tel: 86 27 87541634; Fax: 86 27 87541634; E-mail: khzhao@163.com

引物 6: 5'-AAT CTC GAG GCT CTC TGT TCC CTA
ACT CAA-3'

1.3 分子克隆与序列测定 按文献[5]操作, 经 PCR 扩增得到的基因片断经过 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。根据 PCR 和酶切检验初步鉴定阳性重组子。重组质粒经 Sma I、Xho I 酶切后得到的外源片段与经 EcoR V、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。所得的基因片断由上海博亚生物技术有限公司用荧光测序进行核苷酸序列分析。

1.4 蛋白质表达与 SDS-PAGE 检测 含外源片断的表达载体以 BL21(DE3) 为宿主菌进行表达。表达菌 20℃ 培养至 OD₆₀₀ < 0.5, 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 (9:1), 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[5]。

1.5 蛋白质纯化 含各种表达质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) 分别在 1L 含 30μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 20℃ 培养至 OD₆₀₀ < 0.5, 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, 细胞重悬于 0.5mol/L NaCl、20mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.2) 中, 超声 30min, 离心, 上清液用镍螯合层析柱纯化^[1]。得到的蛋白质浓度约 5—6mg/mL (Bradford 法测定)。

1.6 体外重组 取实验 1.5 所得纯化蛋白质直接用于体外重组实验, 重组体系见文献[6]。

1.7 光谱测定活性 用紫外可见吸收光谱, 荧光光谱分别检测重组的色素蛋白质。色素蛋白质可逆光化学性质的测定, 按文献[7]介绍的方法操作。

1.8 色素蛋白锌电泳 样品测完光谱后用三氯乙酸沉淀, 三氯乙酸终浓度为 10%。离心, 沉淀用丙酮洗涤两次, 以后操作步骤同 SDS-PAGE 电泳。电泳完后, 取出电泳胶, 用 10mmol/L 醋酸锌溶液浸泡 4h, 紫外灯下照相^[2]。最后用考马斯亮蓝染色过夜。

2 结果

2.1 *pecA*、*pecE*、*pecF* 基因的 PCR 扩增、克隆和重组质粒的鉴定

根据 Cai 等人报道的鱼腥藻 PCC 7120 总 DNA 序列设计引物, 引物 1 和引物 2 用来扩增 *pecA* 基

因, 引物 3 和引物 4 用来扩增 *pecE* 基因, 引物 5 和引物 6 用来扩增 *pecF* 基因。在设计引物的 5' 端分别引入了 Xho I、Sma I 识别位点以及 2—3 个保护碱基, 分别 PCR 扩增出 524bp、792bp、552bp 的基因片断 (图 1a)。琼脂糖凝胶电泳后用 DNA 回收试剂盒回收这些 DNA 片段, 所回收的 PCR 产物, 经 Sma I、Xho I 双酶切, 然后与同样酶切的 pBluescript 载体连接, 分别构成重组质粒 pBlur *pecA*、pBlur *pecE*、pBlur *pecF*。用这些重组质粒分别转化 TG1 感受态细胞, 根据质粒大小初步鉴定阳性重组子, 并用 PCR 方法及限制性内切酶酶切图谱分析作进一步鉴定 (图 1b), 琼脂糖凝胶浓度为 1.2%。通过测序, 证明所得的 *pecA*、*pecE*、*pecF* 序列与报道序列一致, 分别为 489bp、762bp、522bp。

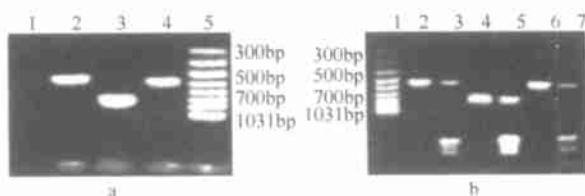


图 1 aPCR 产物的琼脂糖凝胶电泳谱图

1. 阴性对照: 2. *pecA* 的 PCR 产物; 3. *pecE* 的 PCR 产物; 4. *pecF* 的 PCR 产物; 5. DNA 标准分子量; b 重组质粒 PCR 与用 Sma I、Xho I 酶切消化检测的琼脂糖凝胶电泳谱图

1. DNA 标准分子量; 2. pBlur *pecA* PCR 检测; 3. pBlur *pecA* 酶切; 4. pBlur *pecE* PCR 检测; 5. pBlur *pecE* 酶切; 6. pBlur *pecF* PCR 检测; 7. pBlur *pecF* 酶切

Fig. 1 a Agarose gel electrophoresis of PCR product; 1. negative control of PCR; 2. PCR product of *pecA*; 3. PCR product of *pecE*; 4. PCR product of *pecF*; 5. DNA marker; b Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids examined by PCR and digested by Sma I, Xho I; 1. DNA marker; 2. pBlur *pecA* examined by PCR; 3. pBlur *pecA* digested by Sma I, Xho I; 4. pBlur *pecE* examined by PCR; 5. pBlur *pecE* digested by Sma I, Xho I; 6. pBlur *pecF* examined by PCR; 7. pBlur *pecF* digested by Sma I, Xho I

2.2 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 EcoR V、Xho I 酶切的表达载体 pET30a 连接, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 为了减少包涵体的形成, 选择低温表达。在 20℃、1mmol/L IPTG 诱导条件下, 震荡培养 6h。菌体通过 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 检测到了目的蛋白的表达, 如图 2 所示。结果表明: pET-*pecA*、pET-*pecE*、pET-*pecF* 转化菌经 IPTG 诱导后出现了十分明显的外源蛋白质表达带, PecA、PecE、PecF 蛋白质分子量大小分别为 23kD、33kD、24kD, 与预测分子量吻合。

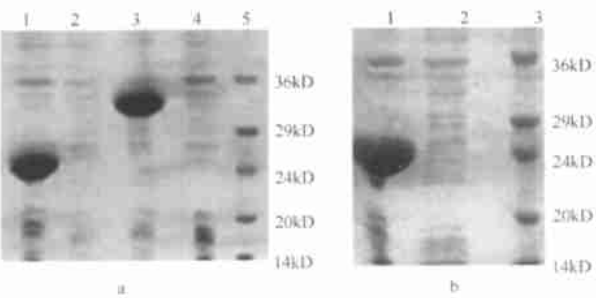


图2 *paeA*、*paeE*、*paeF* 基因表达产物的 SDS PAGE a: 1. *paeA* 诱导表达产物; 2. *paeA* 未诱导表达产物; 3. *paeE* 诱导表达产物; 4. *paeE* 未诱导表达产物; 5. 蛋白质标准分子量 b: 1. *pecF* 诱导表达产物; 2. *pecF* 未诱导表达产物; 3. 蛋白质标准分子量

Fig. 2 SDS PAGE of the overexpressed *paeA*、*paeE*、*paeF* a: 1. *paeA* induced with IPTG; 2. *paeA* not induced with IPTG; 3. *paeE* induced with IPTG; 4. *paeE* not induced with IPTG; 5. Protein molecular weight marker, b: 1. *pecF* induced with IPTG; 2. *pecF* not induced with IPTG; 3. Protein molecular weight marker

2.3 光谱分析

藻红蓝α亚基脱辅基蛋白在裂合异构酶 PecE/PecF 催化下与色素 PCB 重组, 经过 500nm 单色光照射 5min, 得到的色素蛋白质最大吸收光谱为570nm, 当用

570nm 单色光照射 5min, 得到最大吸收光谱为 500nm。可逆光致变色性质与以前报道^[7]的藻红蓝α亚基相同, 表明所得可逆光致变色现象是由鱼腥藻藻红蓝α亚基所致。荧光光谱检测产物为单一吸收峰, 其荧光在 580nm 左右(图 3), 荧光与以前报道^[7]的藻红蓝α亚基相似。由光谱可知α-PEC 的吸收峰在 500 ~570nm 间发生位移, 活性高达 91% 以上。总之, 根据鱼腥藻藻红蓝α亚基光谱性质可知, 所表达的 PecA、PecE/F 为鱼腥藻藻红蓝蛋白α亚基 PecA、裂合异构酶 PecE/F。

2.4 色素蛋白锌电泳

由于色素可与 Zn²⁺ 形成螯合物, 该螯合物在一定波长光激发下发射荧光。通过分别作脱辅基蛋白 PecA, 重组蛋白的锌电泳, 可以发现, 在紫外光照射下, 锌电泳中重组蛋白发出橘色荧光, 而脱辅基蛋白处没有。相对应的 SDS-PAGE 电泳, 表明有脱辅基蛋白 PecA 存在(图 4)。这说明在重组过程中脱辅基蛋白与色素在裂合异构酶的作用下共价连接成功, 并得到色素蛋白。

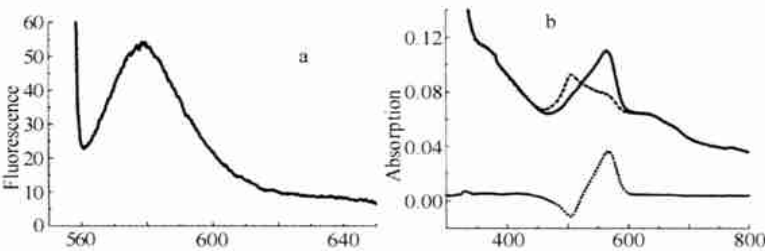


图3 脱辅基蛋白 PecA 在裂合异构酶 PecE/ PecF 的催化下与藻蓝胆素 PCB 体外重组生成产物的吸收光谱 a. 荧光光谱; b. 500nm 光照(实线), 570nm 光照(虚线)的吸收光谱和(500—570nm) 差减光谱(点线)

Fig. 3 Absorption spectra of reconstituted products of PecA with PCB catalyzed with PecE/ PecF a. fluorescence emission spectrum of reconstituted product (excitation wavelength 550nm); b. absorption spectra after irradiation with 500nm light (solid line), after subsequent irradiation with 570nm light (dash line) and difference absorption of 500nm irradiation minus 570nm irradiation (dot line)

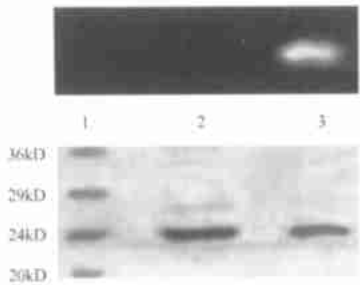


图4 PecA 脱辅基蛋白和重组产物锌染色(上), 考马斯亮蓝染色(下) SDS- PAGE 电泳

1. 蛋白质标准分子量; 2. PecA 脱辅基蛋白; 3. 重组产物

Fig. 4 SDS PAGE of Apo αPEC (PecA) and reconstituted αPEC stained for the chromophore with zinc acetate (top) and for protein with Coomassie blue (bottom)

1. Protein molecular weight marker; 2. purified His tag PecA; 3. purified reconstitution product of His tag PecA with Pb plus His tag PecE/ His tag PecF

在以前的工作中已经通过体外合成出了层理鞭枝藻藻红蓝蛋白α亚基脱辅基蛋白和裂合异构酶 PecE/F^[7, 8], 并重组得到具有天然活性的藻红蓝蛋白α亚基。为了进一步验证这一性质在蓝藻中的普遍性, 选取了同样具有藻红蓝蛋白的鱼腥藻, 通过对比可知鱼腥藻藻红蓝蛋白α亚基脱辅基蛋白和裂合异构酶 PecE/F 也表现了同样的性质, 进一步印证了藻红蓝蛋白的可逆光致变色性质。

同藻红蓝蛋白α亚基(简称αPEC)一样具有可逆光致变色性质的蛋白质还有植物光敏色素、视紫红质。随着材料科学、信息科学、微电子科学、薄膜技术和激光技术的发展, 人们尝试着把这类生物分子材料应用于光电探测、人工神经网络、视觉模拟系统、非线性光学材料、光学信息储存与处理等方面。与植物光敏色

素(约124kD)细菌视紫红质(约26kD)相比, α -PEC分子量小(18kD)而结构简单,在研究可逆光致变色的动态过程和设计光控分子器件等方面具有优势。

参考文献:

- [1] 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
- [2] Storf M, Parbel A, Meyer M, *et al.* Chromophore attachment to biliproteins: specificity of PecE/ PecF, a lyase isomerase for the photoactive β -Cys α 84 phycoviolobilin chromophore of phycoerythrocyanin[J]. *Biochemistry*, 2001, **40**: 12444—12456
- [3] Zheng M, Da L, Deng M G, *et al.* Cloning and overexpressing of phycoerythrocyanin operon F gene of *Mastigocladus Laminosus* in *Escherichia coli* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica* 2002, **26**(2): 168—174. [郑敏, 答亮, 邓明刚, 等. 层理鞭枝藻藻红蓝蛋白 F 基因的克隆和表达. 水生生物学报, 2002, **26**(2): 168—174]
- [4] Cai Y A, Murphy J T, Wedemayer G J, *et al.* Recombinant phycobiliproteins. Recombinant G-phycocyanins equipped with affinity tags, oligomerization, and biospecific recognition domains [J]. *Anal Biochem*, 2001, **290**(2): 186—204
- [5] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001
- [6] Zhao K H, Wu D, Wang L, *et al.* Characterization of phycoviolobilin phycoerythrocyanin α 84 cysteinylase (isomerizing) from *Mastigocladus laminosus*[J]. *Eur J Biochem*, 2002, **269**: 4542—4550.
- [7] Sheng S B, Zhang F T, Deng M G, *et al.* Cloning and overexpressing of phycoerythrocyanin operon E gene of *Mastigocladus Laminosus* in *Escherichia coli* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(4): 427—430. [盛树斌, 张富铁, 邓明刚, 等. 层理鞭枝藻藻红蓝蛋白 E 基因的克隆和表达. 水生生物学报, 2001, **25**(4): 427—430.]
- [8] Ma C, Zhou M, Zhang F T, *et al.* Cloning, Expressing and Activities Study of *Mastigocladus laminosus* PecE Mutated Genes[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(6): 614—618. [马聪, 周明, 张富铁, 等. 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. 水生生物学报, 2003, **27**(6): 614—618.]

CLONING EXPRESSION AND ACTIVITY ANALYSIS OF A, E, F GENES OF ANABAENA PCC 7120 PEC OPERON

SUN Yan¹, WU Dong², ZHOU Ming¹ and ZHAO Kai¹ Hong¹

(Huazhong University of Science and Technology. 1. College of Environmental Science and Engineering;

2. College of Life Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract: Phycobiliproteins are brilliantly coloured, intensely fluorescent chromoproteins, which consist of apoproteins and covalently bound linear tetrapyrroles (phycobilins) as prosthetic groups. Phycoerythrocyanin (PEC) is an integral component of the phycobilisome (Pbsome) in several species of cyanobacteria. However, unlike other biliproteins, isolated PEC shows a pronounced reversible photochemistry, which is related to the α subunit (α -PEC).

In this study, the genes *pecA*, *pecE*, and *pecF* from *Anabaena* PCC 7120 were cloned with vector pBluescript, yielding plasmids pBlur*pecA*, pBlur*pecE* and pBlur*pecF*, respectively. All constructions were verified by sequencing. These genes were subcloned into vector pET30a using the EcoRV and Xho I restriction sites. pBlur*PecA*, pBlur*PecE* and pBlur*PecF* were cleaved with SmaI and Xho I, and the released genes were ligated to the large pET30a fragment. The *E. coli* [strain BL21(DE3)] cells containing recombinant pET30a were grown in Luria-Bertani medium at 20 °C, and harvested 6h after induction with isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG). His-tagged PecA, E and F were purified separately by metal ion chelating affinity chromatography on chelating sepharose charged with Ni²⁺. The reconstitution system consists of PCB, His₆-PecA, His₆-PecE, His₆-PecF, and 2-mercaptoethanol. Incubating over night at room temperature, the product of reconstruction investigated by UV-vis absorption and fluorescence spectrophotometry appeared an absorption at 565nm, which is the absorption maximum of integral α -PEC containing the PVB-chromophore. After irradiation at 570 nm, the band at 565 nm decreased, and a new absorption band arose at 505 nm.

Some previous experiments showed that the α -PEC synthase consists of two proteins, PecE and PecF, in *Mastigocladus laminosus*. Under catalysis of the over-expressed PecE and PecF, PCB can be converted to PVB, and bound covalently to apo- α -PEC to give native α -PEC. The classical phototransformation of α -PEC involves the reversible shift of the visible absorption maximum from 570 to 505nm, which has been attributed to the Z, E-isomerization at the 15, 16 double bond of phycoviolobilin (PVB) chromophore. The same behavior identifies the PecE and PecF in *Anabaena* PCC 7120 carry out the same function and the resulting chromoprotein unequivocally is α -PEC

Key words: α -subunit of phycoerythrocyanin; Lyase isomerase; Gene clone; Gene overexpression; Reconstitution