

研究简报

层理鞭枝藻藻红蓝蛋白 E 基因片段的克隆与表达

盛树斌 张富铁 邓明刚 秦艺 周 明 赵开弘

(华中科技大学生命科学学院, 武汉 430074)

CLONING AND EXPRESSING PHYCOERYTHROCYANIN E GENE OF
MASTIGOCLADUS LAMINOSUS IN ESCHERICHIA COLI

SHENG Shu-bin, ZHANG Fu-tie, DENG Ming-gang,

QIN Yi-min, ZHOU Min and ZHAO Kai-hong

(College of Life Sciences, Huazhong university of Science and Technology, Wuhan 430074)

关键词: 藻红蓝蛋白; *pecE* 基因; 基因克隆; 基因表达

Key words: phycoerythrocyanin; *pecE* gene; gene clone; gene expression

中图分类号: S949.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2001)04-0427-04

藻胆蛋白(Phycobiliprotein)是存在于蓝藻、红藻和隐藻中的一类捕光色素蛋白,可分为藻红蛋白(简称 PE),藻蓝蛋白(简称 PC),别藻蓝蛋白(简称 APC)和藻红蓝蛋白(简称 PEC)。藻胆蛋白连有发色团辅基色素—藻胆色素(Phycobilins),藻胆色素分四类:藻蓝胆素(简称 PCB),藻红胆素(简称 PEB),藻尿胆素(简称 PUB)和藻紫胆素(简称 PVB)^[1]。

藻胆蛋白是研究光合作用光能传递的理想材料。其中, α -PEC 具有高效的可逆光致变色性质^[2],它不仅是研究光受体的极佳材料,而且作为蛋白质功能材料也有广泛的应用前景。国外关于藻胆蛋白的研究已取得了许多进展:Zuber 等人对层理鞭枝藻 APC、PC 和 PEC 的 α 、 β 亚基的分析比较表明^[3],亚基间序列的同源性在 21% - 67% 之间,位于多肽链中部的 Cys-84 保守残基是发色基结合的主要位点。Craig 等人的研究^[4]表明 PC 操纵子中两个基因所编码的蛋白质 CpcE 和 CpcF 在 PC 与藻蓝胆素(PCB)的结合过程中起酶促作用。但是关于 α -PEC 脱辅基蛋白与色素的结合机制尚未见报道,因此进一步研究 α -PEC 结构以及 α -PEC 脱辅基蛋白与色素结合的机制在揭示藻类的起源进化和光合作用机理方面有重大意义。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 层理鞭枝藻藻种由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB)提供,菌株 T G1、BL21(DE3)、克隆载体 pBluescript 为本室保存,表达载体 pGEMD 由武汉大学生命科学院马辉文教授赠送,蛋白酶 K 为 Merck 公司产品,Geneclean II DNA 纯化试剂盒为 BIO 公司产品,限制性内

收稿日期: 2000-03-17; 修订日期: 2000-05-25

基金项目: 武汉市晨光计划; 国家自然科学基金 34580002 与 39770175 资助

作者简介: 盛树斌(1974-),男,湖北省武汉市人; 硕士; 赵开弘同志为通讯联系人

切酶 *Sma* I、*Xho* I、*Pvu* II 均为 Promega 公司产品, *Taq* 酶、*T*₄DNA 连接酶、IPTG、X- gal 为 SABC 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' - TA CCC GGG ACT GCT GCT TGT TGT GCT - 3'
P₂: 5' - CG CTC GAG TTA AAG TTG AAT TAA TAA ATC GTC AA- 3'

1.2 层理鞭枝藻总 DNA 的提取 将 10g 藻用裂解液 (50mmol/L Tris, 50mmol/L NaCl, 5mmol/L EDTA, 10% 蔗糖, 0.5% SDS, pH8.5) 洗涤、离心, 然后用液氮研磨成粉, 悬浮于 25ml 裂解液, 加入蛋白酶 K 至终浓度为 100μg/mL, 37℃ 保温 2h, 再用等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25◇24◇1, 体积比) 抽提数次, 水相加 2 倍体积无水乙醇, 离心后得到藻总 DNA。

1.3 *pecE* 基因片段的 PCR 扩增 以藻总 DNA 为模板, P₁、P₂ 为引物, 按如下条件进行扩增: 预变性 95℃, 30s; 然后按 95℃, 60s; 50℃, 90s; 72℃, 90s 循环 30 次; 最后 72℃ 延伸 300s。

1.4 *pecE* 基因片段的分子克隆与序列测定 分子克隆按文献[5]操作。所得的 *pecE* 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。

1.5 *pecE* 基因片段的表达及 SDS- PAGE 检测 以 BL21 (DE3) 为宿主菌, 将 *pecE* 基因片段插入表达载体 pGEMD, 得到的表达菌株按 studier^[6] 的方法加入 IPTG 诱导 4h, 离心收集大肠杆菌细胞, 悬浮于 SDS- PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 5min, 用 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行 SDS- PAGE 分析^[5]。

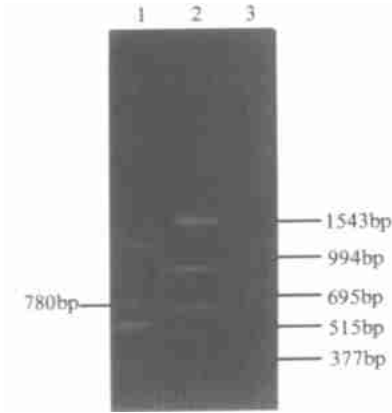


图 1 PCR 产物电泳图谱

Fig. 1 Agarose electrophoresis of PCR product

1. PCR 产物(以藻总 DNA 为模板)
- PCR product
2. DNA 标准分子量
- DNA marker
3. 阴性对照(未加模板)
- Negative control

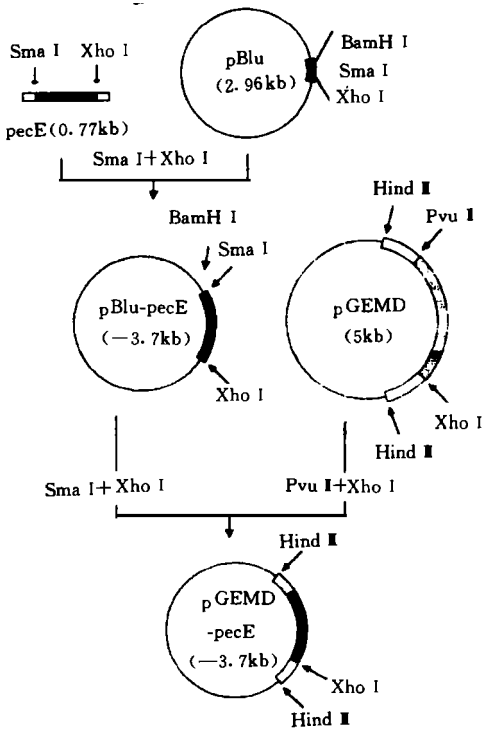


图 2 pBlu- *pecE* 和 pGEMD- *pecE* 的构建

Fig. 2 Construction of pBlu- *pecE* and pGEMED- *pecE*

2 结果和讨论

2.1 *pecE* 基因片段的 PCR 扩增

根据 Ebelen 等人报道的 *pecE* 序列^[7]设计引物 P₁、P₂, 在引物的 5' 端分别引入了 *Xho*I、*Sma*I 识别

序列和两个保护碱基, 由于 P₁、P₂ 的 GC 含量相差较大, 为使两个引物的 T_m 值相近, P₂ 设计得比 P₁ 长。PCR 扩增产物有四条带, 其中有我们所需要的扩增片段(大小为 780bps) (图 1), 电泳后用 Geneclean II DNA 纯化试剂盒从胶上回收该片段。

2.2 pecE 基因的克隆与重组质粒的鉴定

从凝胶上回收的 PCR 产物, 经 Xho I 、SmaI 双酶切, 然后与同样酶切的 pBluescript 载体连接, 构成重组质粒 pBlue- pecE(图 2)。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 方法及限制性酶切图谱分析作进一步鉴定。

2.3 序列分析

阳性重组质粒 pBlue- pecE 经序列分析, 其中 pecE 序列(图 3) 与文献[7, 8] 报道的 pecE 序列在氨基酸水平上有很高的同源性。

ATG GAG CAA AAC CCG CAG TCA CAG GGG ACT GCT GCT TGT TGT GCT GAA CCC ATT CTT TCA AAA GAA
GCA GCG ATC GCA GCA CTA AAG AGC GAA GAT AAT CAA ATT CGT TAT TAC GCT GCT TGG TGG TTG GGA
AAA CAT CAA GTG CAA GCA GGT TGT ACA GCA TTG TGT GAA GCC CTG TTT GAT GAG CGC TAT CGC ATT
CCA TCA GGA GGC TAT CCC CTA CGT CGT CAA GCT GCA CGT GCT TT AGGA CAATTA AAG AAT CCA CAA
GCA GTA CCA GCG TTA ATT GCT GCA CTT GCA TGT GAT GAT GAT CTG CAC CTG CGG GAA GCA GTT ATT
CAA GCT TTA GCA GCG ATT GGC GAC CAG CGG GCT GTT GAG CCG TTG CTG AAA CTG CTA CAA TCT CAT
CAA GAG CAA CCA CTA GAA GCC TTG ATA GAA GCG CTA GCG ACT TTA CAA GTA TGG TCT GCT CGT CCC
CAA ATA GAA CCC TTT CTC AAT CAC GCT TCC GAG CGA GTA CAA TGT GCT GCG GCA CGG TAT TTG TTT
ATT TTA ACC CAA GAA CCC CAG TAC ATA GAA CGT ATT ATT AAT AAT TTG AAT CAT GAC AAT ATG TAT
TTG CGC TGG GCA GCC ATA TTT GAT TTG GGA GCC GTT GGT CAT CGT CAA GCA ATA AAT GCG ATT TTA
GCT GCT CGG CTT CCT AAC AGT TTA AAG TTA TTA AAT TTG AAA CGC ATT TTG GAA GCC TTA TTA GAT
AAC GAA CGA GCT GAT CAG GAA ACA ACT CAG TTA ATT TTT CAG GCA ATT GAC GAT TTA TTA ATT CAA
CTT TAA

图 3 pecE 核苷酸序列

Fig. 3 Sequence of pecE

1. GTAAC	CAEPI	LSKEA	AIAAL	KSEDN	QIRYY	AAWWL	GKHQV	QAGCT	ALCEA	LFDER	YRIPS	GGYPL
2. MTAAC	CAQPI	LSPEA	AIAAL	AGEDN	QIRYY	AAWWL	GKHQV	QAGCA	ALCEA	LFDER	YRIPS	GGYPL
3. VT - - -	-AEPI	LSPET	AIAAL	SGEDN	QIRYY	AAWWL	GKHNV	QAGFT	ALCVA	LFDER	YRIPS	GGYPL
1. RRQAA	RALGQ	LKNPQ	AVPAL	IAALA	CDDDL	HLREA	VIQAL	AAIGD	QRAVE	PLLKL	LQSHQ	QQPLE
2. RRQAA	RALGQ	LKNPQ	AVPAL	IAALA	CEEDL	GLREA	VIQAL	AMIGD	RRAVH	PLVQL	LOSQQ	PQPYE
3. RRQAA	RALGL	LKNPQ	AVPAL	IAALE	CDEDL	RLREA	VICSL	AAIGD	KRAVT	PLLNL	LQSSQ	AQPYE
1. ALIEA	LATLQ	VWSAR	PQIEP	FLNHA	SERVQ	CAAAR	YLFIL	TQEPQ	YIERI	INNLN	HDNMY	LRWAA
2. ALIEA	LATLQ	VWSAR	PQIEP	FLYHS	SERVQ	CAAAR	YLYLL	TKQPQ	YLERI	VQNLN	HDNMY	LRWAA
3. ALIEA	LATLQ	VWSAR	PQIEP	FLQHY	SERVQ	CAAAR	YMYLL	TQESE	YIERI	VKNLN	HDNMY	LRWAA
1. IFDLG	AVGHR	QAINA	ILAAR	VPNSL	KLLNL	KRILE	ALLDN	ER - - -	- - - -	- - - -	A DQETT	QLTFQ
2. IFDLA	ALGHR	QAVDA	ILAAK	VPNSL	KLLNL	KRILE	TLLDG	DRSQL	NNGEF	CQNQS	DRETI	ELLFQ
3. VFDLG	AVAHQ	QAVQA	ILTAQ	VPNSL	KLLNL	KRILE	AMLNN	NSVNH	EKAA -	- - - -	- - - -	-LLFG
1. AIDDL	LIQL*											
2. AIDDL	LIQL*											
3. AIDDL	LIQL*											

图 4 pecE 基因推译的氨基酸序列的比较

1. pGEMD- pecE 推译的氨基酸序列
2. 文献[7] 报道基因推译的氨基酸序列
3. 文献[8] 报道基因推译的氨基酸序列- - - - 缺失序列

Fig. 4 Amino- acid sequence deduced from DNA sequence of pecE,

1. the pecE in pGEMED- pecE; 2. the pecE in Muenchen M. Laminosus [reference 7];
3. the pecE in Anabaena sp. PCC7120 [reference 8]; - - - - the gaps.

2.4 表达质粒 pGEMD- pecE 的构建及在大肠杆菌中的表达

表达载体 pGEMD 上依次有 HindIII、Pvu II、XhoI 和 Hind III 酶切位点, 它们之间相隔 260bp、1560bp

和 310bp。将 pBlu- pecE 用 SmaI 和 XhoI 进行双酶切, 用 Genedean II 试剂盒从凝胶上回收 pecE 片段, 然后与以 Pvu II 和 XhoI 双酶切的 pGEMD 连接, 构建成表达质粒 pGEMD- pecE(图 2), 转化 TG1。重组质粒用 Hind III 单酶切得到 90bp、560bp、730bp 片段(结果未显示), 与预计大小相符。将鉴定的重组质粒转化 BL21(DE3), 按文献[5] 提取总蛋白、进行 SDS- PAGE 分析(图 5)。结果表明, pGEMD- pecE 转化菌经 IPTG 诱导后出现了一条十分明显的分子量为 30×10^3 的蛋白质带, 而未诱导的 pGEMD- pecE 转化菌和诱导的 BL21(DE3) 受体菌均没有此蛋白质带。这证明 pGEMD- pecE 转化菌经 IPTG 诱导后高效表达了一个分子量为 30×10^3 的外源蛋白, 而该外源蛋白的分子量与引入的外源基因表达产物的预测分子量吻合。本文首次在大肠杆菌中表达了层理鞭枝藻的 pecE 基因, 为进一步研究 α - PEC 脱辅基蛋白与藻胆色素连接机制打下了基础。

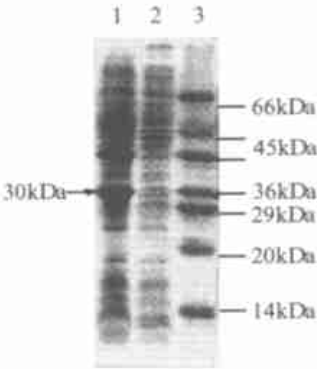


图 5 pecE 基因表达产物的 SDS- PAGE
Fig. 5 SDS- PAGE of the overexpressed protein

1. BL21(DE3)/pecE 诱导 BL21(DE3)/pecE induced with IPTG; 2. BL21(DE3)/pecE 未诱导
BL21(DE3)/pecE not induced; 3. 蛋白质标准分子量 Protein molecular weight marker

参考文献:

[1] Glazer A. N. Light harvesting by phycobilisome [J]. *Ann Rev Biophys Biophys Chem*, 1985, **14**: 47
[2] 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
[3] Zuber H. Molecular Biology of the Photosynthetic apparatus (Stem back K E ed.) [M]. *Cold Spring Harbour Laboratory*, 1985. 233
[4] Fairchild C D, Zhao J, Zhou J J, et al. Phycocyanin α subunit phycocyanobilin lyase [J] *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 7017
[5] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual (second edition)* [M]. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989
[6] Studier F W, Moffatt P A. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels [J]. *J Mol Biol*, 1986, **189**: 113
[7] Ebelein M, Kufer W. Genes encoding both subunits of phycoerythrocyanin, a lightharvesting biliprotein from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*, Gene, 1990, **94**: 133—136, Gene Bank 序号: M 75599
[8] Ronald V. Swanson, Probert De Lorimier and Alexander N. Glazer Genes Encoding the Phycobilisome Rod Substructure Are Clustered on the *A.nabaena* Chromosome: Characterization of the Phycoerythrocyanin Operon, *Journal of Bacteriology* **174**: 5488 Gene Bank 序号: M 80357