

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00353

层理鞭枝藻藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白β亚基 Cys-155 的藻胆色素共价偶联

张娟¹ 周可澄¹ 夏坤¹ 周明²

(1. 华中科技大学环境科学与工程学院, 武汉 430074; 2. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 层理鞭枝藻(*Mastigocladus laminosus* PCC7603)藻蓝蛋白β-CPC 和藻红蓝蛋白β-PEC 中均存在 2 个藻胆色素结合位点(Cys-84 和 Cys-155), 可与藻胆素(简称 PCB)发生共价偶联反应, 已有研究证实编码基因为 *alr0617* 的裂合酶 *CpcS1* 是催化 Cys-84 与 PCB 共价偶联的裂合酶。在研究 Cys-155 与 PCB 共价偶联的过程中, 通过 BLAST 软件同源性对比分析后, 筛选出 4 个基因: *cpcT1*, *cpcT2*, *cpcS1*, *cpcS*, 其中基因 *cpcT1* 和 *cpcS2*, 利用分子克隆的技术, 根据实验需要转到载体 pCDFDuet 上, 通过 DNA 电泳和蛋白质电泳挑选出正确的克隆。此 4 个基因对应的质粒与在大肠杆菌内生成 PCB 必需的质粒 pACYCDuet-ho1-pcyA, 以及质粒 pET-cpcB(C84S)或 pET-pecB(C84A), 共同转入大肠杆菌 BL21(DE3)内, 进行体内重组, 得到各重组蛋白, 经过亲和层析柱提纯并透析, 过滤掉金属离子, 纯化透析后的蛋白经过活性比较、蛋白质电泳以及锌染色、蛋白质变性等试验以及荧光和紫外吸收光谱等鉴定, 通过与相应文献中 PCB 光谱的比对, 确定编码基因为 *all5339* 的裂合酶 *CpcT1* 能高效地催化 Cys-155 与 PCB 共价偶联, 而其余 3 个基因不能起到催化作用。由此, 能催化脱辅基蛋白 β-CPC 和 β-PEC 的两个位点共价偶联 PCB 的裂合酶均被发现。实验对于研究藻胆蛋白的生物合成、光合作用捕光机理以及藻胆体的组装等有重要的意义。

关键词: 藻蓝蛋白β-CPC; 藻红蓝蛋白β-PEC; 裂合酶 CpcT1; 体内重组

中图分类号: Q344⁺.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)02-0353-08

藻胆蛋白是蓝藻中的捕光蛋白, 是一类结构相似的色素蛋白, 由藻胆色素(Phycobilin)与其相应的脱辅基蛋白中保守性半胱氨酸的巯基以硫醚键共价结合而成。大多数藻胆色素的正确偶联都需要结合位点专一和对色素的构象有选择性的裂合酶来催化完成。根据其吸收光谱特征, 藻胆蛋白可分为四类^[1]: 藻红蛋白(简称 PE)、藻红蓝蛋白(简称 PEC)、藻蓝蛋白(简称 PC)、别藻蓝蛋白(简称 APC)。在层理鞭枝藻(*Mastigocladus laminosus* PCC7603)藻蓝蛋白 β 亚基(简称 β-CPC)和藻红蓝蛋白 β 亚基(简称 β-PEC)中, 均有两个色素结合位点共价偶联藻胆素(PCB)^[2], 分别是 Cys-84 和 Cys-155。研究已经证实, Cys-84 在裂合酶 *CpcS1* 的催化下, 可与 PCB 正确偶

联, 显示出正确的光谱特性^[3]。而 Cys-155 在一定的条件下能与 PCB 自发偶联, 但形成产物效率低^[4,5]。

为了找出催化 Cys-155 与 PCB 偶联的裂合酶, 通过 BLAST 软件同源性分析, 从鱼腥藻(*Anabaena* PCC7120)中筛选出编码基因为 *alr0617* 的 *cpcS1*、编码基因为 *all5339* 的 *cpcT1*、编码基因为 *alr0647* 的 *cpcT2*、编码基因为 *all5292* 的 *cpcS2* 这 4 个基因, 通过体内重组等试验来研究它们催化藻胆色素在 Cys-155 位点共价偶联的活性。

体内重组试验中脱辅基蛋白以层理鞭枝藻为试验对象, 已经构建出质粒 pET-cpcB(C84S)和 pET-pecB(C84A), 使 Cys-84 突变后丧失色素结合能力^[6]。质粒 pACYCDuet-ho1-pcyA 上的基因和裂合酶则来

收稿日期: 2008-10-16; 修订日期: 2009-08-12

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20060487018); 国家自然科学基金(30670489); 国家自然科学基金(30870519)
资助

作者简介: 张娟(1981—), 女, 湖北随州人; 博士研究生; 主要从事藻蓝蛋白生物合成研究。E-mail: zhj198100@163.com

通讯作者: 周明, Tel: 86-27-87284301; E-mail: khzhao@163.com

自鱼腥藻。鱼腥藻和层理鞭枝藻不仅基因和氨基酸序列同源性较高,而且具有相似的藻胆体结构。试验显示,在裂合酶 CpcT1 存在的情况下,通过体内重组方式能得到色素蛋白;而在不加入任何催化酶,或者分别加入 CpcS1、CpcS2、CpcT2,都只有约 1% 的色素蛋白生成。这些结果均表明:裂合酶 CpcT1 有很明显的催化 PCB 与 β -CPC 和 β -PEC 的 Cys-155 共价偶联的作用。藻胆蛋白是藻类光合作用捕光复合物的功能组分^[7],对其生物合成的了解,将促进对光合作用捕光系统的形成和机理的认识。藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白的 β 亚基与 PCB 的体内重组研究,有助于研究藻胆蛋白的生物合成以及藻胆体的组装。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌菌株 TG1、BL21(DE3)为本实验室保存,克隆载体 pBluescriptSK(+)为 Stratagene 公司产品,表达载体 pACYCDuet-1、pCDFDuet-1、pET30a(+)、pETDuet-1 均购自 Novagen 公司。重组质粒 pACYCDuet-ho1-pcyA、pET-cpcB(C84S)、pET-peb(C84A)、pCDFDuet-cpcS1、pCDFDuet-cpcT2、pETDuet-cpeS2 为本实验室构建保存。DNA 回收试剂盒、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 Sma I、Xho I、EcoRV、Bgl II 为 MBI 公司产品, Taq 酶为 Biostar 公司产品, IPTG 是 SABC 产品,亲和层析介质购自 Amersham Pharmacia 公司。

1.2 重组质粒的克隆与构建

以鱼腥藻(*Anabaena* PCC7120)为模板,克隆出 cpcT1 基因片段,并将片段转到 pCDFDuet 载体上,从而保证大肠杆菌体内重组体系质粒间复制子和抗生素都保持协调。

引物 1: 5'-GAG CCC GGG ATG ACT CAC TCT
ACA GAC ATA G-3'

引物 2: 5'-CAG CTC GAG ACC TTA CTC GGC
ACT TAT TTT G-3'

引物由中国科学院上海生物化学研究所合成,通过 PCR 技术扩增目的片段并用 DNA 回收试剂盒对 DNA 片段进行回收。扩增的目的片段经 Sma I、Xho I 双酶消化后克隆到载体 pBluescriptKS(+)中,获取质粒 pBlue-cpcT1。质粒 pBlue-cpcT1 经 EcoRV、Xho I 双酶消化后克隆到 pET30a(+)载体上,获取亚克隆质粒 pET-cpcT1。然后将该亚克隆质粒用 Bgl II、

Xho I 双酶消化后克隆到 pCDFDuet 载体上,转化至大肠杆菌 BL21(DE3),用含链霉素的平板进行筛选。从平板上挑取的单克隆经过 DNA 酶切检测、蛋白质电泳检测、测序等来鉴定阳性单克隆。

为了与载体 pET30a 的复制子相容,需要将裂合酶 CpcS2 的基因片段从 pETDuet 载体上转到 pCDFDuet 载体上。本试验以 pETDuet-cpcS2 为模板,用限制性内切酶 EcoRV、Xho I 消化后,将目标片段转到 pCDFDuet 载体上。挑取的质粒同样要进行酶切检测和蛋白质电泳检测。

1.3 藻蓝蛋白 β -CPC 的 Cys-155 多质粒体内重组表达及破碎提纯

将各种质粒组合转化新鲜制备的大肠杆菌感受态细胞,并用含有相应抗生素的平板筛选。各种质粒组合体系见下:

- . pET30a-cpcB(C84S)、pCDFDuet-cpcT1、pACYCDuet-ho1-pcyA
- . pET30a-cpcB(C84S)、pCDFDuet-cpcT2、pACYCDuet-ho1-pcyA
- . pET30a-cpcB(C84S)、pCDFDuet-cpcS1、pACYCDuet-ho1-pcyA
- . pET30a-cpcB(C84S)、pCDFDuet-cpcS2、pACYCDuet-ho1-pcyA
- . pET30a-cpcB(C84S)、pACYCDuet-ho1-pcyA

其中重组体系 是作为阴性对照实验,与重组体系 I - 进行比较,分析无酶情况下 PCB 与 β -CPC 的 Cys-155 偶联的活性。

相应的表达菌在 LB 培养基 37℃ 培养至 A_{600} 约为 0.5,冰浴 30—60min,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,20℃ 低温过夜诱导后离心收集细胞,二次蒸馏水洗两次,-20℃ 保存。

表达载体 pET30a 中第一个克隆位点 T7 启动子下游均有 6 个组氨酸的密码子,由此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 端带有 6 个组氨酸,可采用亲和层析法提纯。表达载体 pCDFDuet-1 中第二个克隆位点则由于没有此结构,所表达的蛋白将在亲和层析法提纯过程中被洗脱掉。在以上重组体系中,脱辅基蛋白所在的载体设计为带组氨酸标记,而裂合酶的载体则不带组氨酸标记,从而有利于重组后,共价偶联了藻胆色素的藻胆蛋白的分离提纯。

向冻存的细胞中加入预冷的重组缓冲溶液(20 mmol/L KPP, 500 mmol/L NaCl, pH 7.2)重悬细胞,冰

浴中超声 5min, 4℃条件下离心 15min, 分别获得上清液和沉淀。重组蛋白上清液采用镍离子螯合层析柱纯化。提纯产物用透析液(50 mmol/L KPP, 500 mmol/L NaCl, pH7.2)透析 3 次, 以去除咪唑, 便于后续试验。

1.4 光谱测定活性

重组蛋白的上清液和提纯透析液分别测荧光光谱和吸收光谱, 吸收光谱用 Perkin Elmer Lambda 25 型紫外可见光谱仪, 紫外可见光谱扫描范围 300—800 nm, 扫描速度 960 nm/min, 狹缝宽度 1.0 nm。荧光光谱测定采用 LS-45 型荧光光谱仪(Perkin- Elmer), 光谱扫描速度 1200 nm/min, 狹缝宽度 10.0 nm。光谱检测的温度为室温 25℃, 检测物的浓度预先测量并使之相同。

1.5 色素蛋白质变性实验

为了确定重组产物中色素的种类和性质, 采用酸性脲(8 mol/L, pH=2)使其变性, 紫外可见光谱检测变性后的色素蛋白质。这时蛋白质与色素间的作用很弱, 色素基本呈游离时的结构状态, 色素蛋白质的吸收光谱与游离色素的吸收光谱很相似, 因此从吸收峰最大值可以判断色素的种类和性质。

1.6 SDS-PAGE 检测与色素蛋白锌电泳

将提纯得到的蛋白取 100 μL 加入三氯乙酸至终浓度为 10%, 离心, 沉淀用丙酮洗涤 3 次, 加入 1×上样缓冲液和巯基乙醇(9 : 1), 100℃煮沸 5min, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。电泳完成后, 电泳胶室温下经 1.5 mol/L 醋酸锌溶液浸泡 15min^[8], 通过 Kodak Gel Logic 200 数码凝胶成像系统检测, 扫描, 然后浸泡在 100 mL 染色液中, 开始染色后脱色并扫描。

1.7 藻红蓝蛋白 β-PEC 的 Cys-155 多质粒重组及活性研究

重组体系同 1.2, 以 pET30a-pecB(C84A)取代 1.2 中的 pET30a-cpcB(C84S), 其余不变。从重组体系 I 到重组体系 V, 得到的重组蛋白, 按照上述 1.3、1.4、1.5、1.6 等的步骤进行活性研究。

2 结 果

2.1 重组质粒的酶切检测和蛋白质检测

引物 1 和引物 2 扩增得到的片段, 克隆到 pBlue-cpcT1, 然后将质粒双切转入 pET30a(+)后得到的亚克隆质粒 pET-cpcT1, 通过北京奥科生物技

术有限公司测序分析, 片段的测序结果与实际序列完全一致。再经一系列载体切换后得到重组质粒 pCDFDuet-cpcT1, 该重组质粒的克隆过程(图 1)。

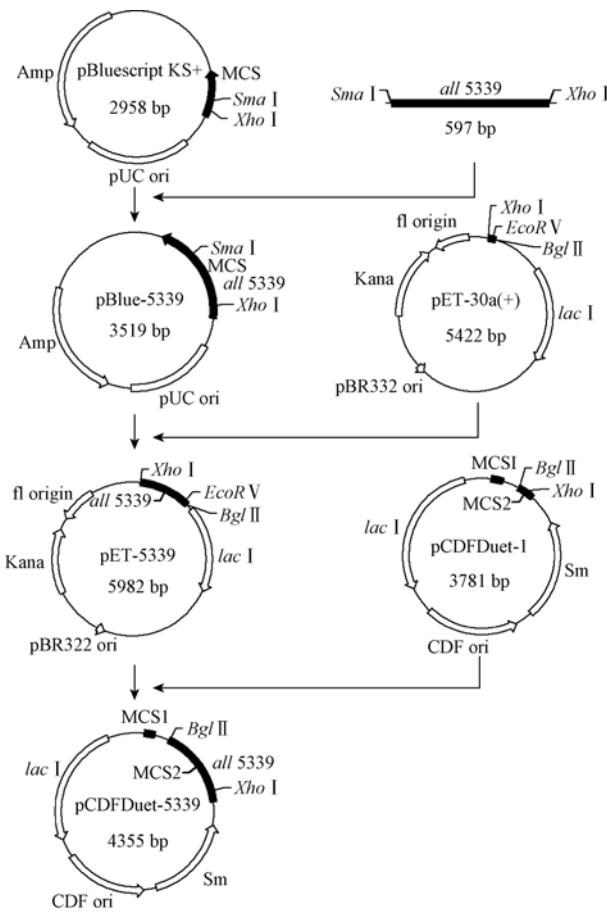


图 1 基因 cpcT1 克隆载体 pBlue-cpcT1 和表达载体 pCDFDuet-cpcT1 的构建

Fig.1 The construction of cpcT1 gene cloning vector pBlue-cpcT1 and expression vector pCDFDuet-cpcT1

重组质粒 pCDFDuet-cpcT1 用双酶 Bgl II、Xho I 消化后, 得到的片段理论大小为 623 bp, DNA 琼脂糖凝胶电泳结果与预期符合(图 2)。

而片段 cpcS2 经内切酶 EcoRV、Xho I 双切转到 pCDFDuet 载体上后(具体转载体过程见图 3), 挑取的质粒经同样的双酶消化, 得到的片段理论大小为 548 bp, 琼脂糖凝胶电泳结果也与预期符合(图 2)。

pCDFDuet-cpcT1 和 pCDFDuet-cpcS2 以大肠杆菌 BL21 为宿主菌进行表达。菌种在 37℃、1 mmol /L IPTG 的诱导条件下, 振荡培养 5h。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(图 4)。

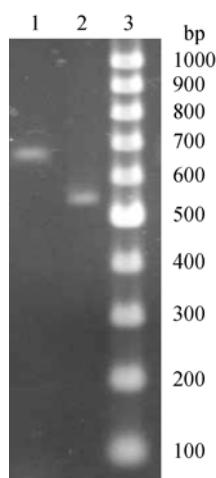


图 2 pCDFDuet-cpcT1 和 pCDFDuet-cpcS2 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of *cpcT1* and *cpcS2*
1. pCDFDuet-*cpcT1* 双切片段; 2. pCDFDuet-*cpcS2* 双切片段;
3. DNA 分子量标准
1. pCDFDuet-*cpcT1* digested by *Bgl* II and *Xho* I ; 2. DNA ladder;
3. pCDFDuet-*cpcS2* digested by *Eco* RV and *Xho* I

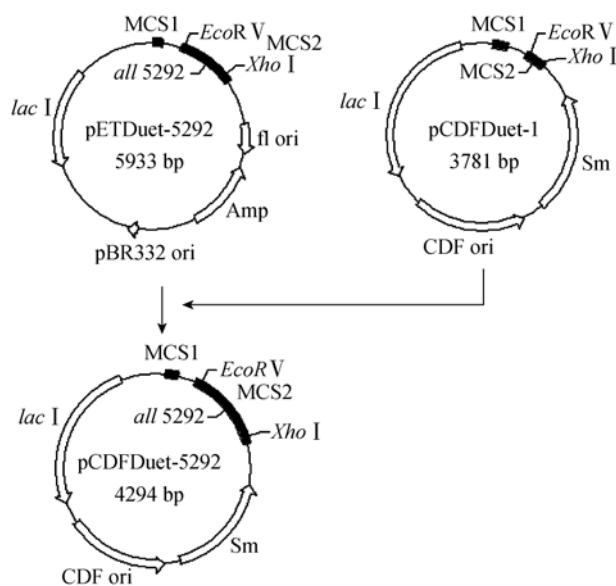


图 3 基因 *cpcS2* 重组质粒 pCDFDuet-*cpcS2* 的构建
Fig. 3 The construction of expression vector pCDFDuet-*cpcS2* of *cpcS2* gene

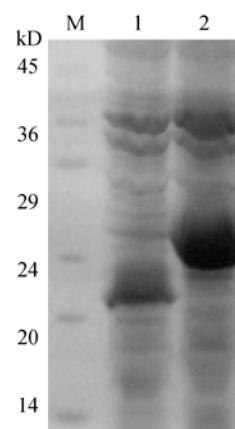


图 4 pCDFDuet-*cpcT1* 和 pCDFDuet-*cpcS2* 表达产物的 SDS-PAGE 谱图

Fig. 4 SDS-PAGE of pCDFDuet-*cpcT1* and pCDFDuet-*cpcS2* Expression in *E. coli*
M. 蛋白质分子量标准; 1. pCDFDuet-*cpcS2* 表达产物; 2. pCDFDuet-*cpcT1* 表达产物
M. Protein Marker; 1. Protein from pCDFDuet-*cpcS2* expressed in *E. coli*; 2. Protein from pCDFDuet-*cpcT1* expressed in *E. coli*

2.2 各重组体系的活性对比

分别取重组体系 I - 的表达后的重组细胞, 超声离心, 取适量的超声上清测其荧光光谱(荧光强度较大的色素蛋白稀释至最大特征吸收峰低于 0.1 后测)。在相同条件下计算 5 种组合的荧光相对比值。下面数据显示上清液(20 mmol/L KPP, 500 mmol/L NaCl, pH 7.2)的光谱结果(表 1、2)。

本实验室已经证实, 在含有 *cpcB* (C84S)或 *pecB* (C84A)、*ho1*、*pcyA* 等基因片段的质粒组合转入 BL21(DE3)后表达蛋白, 通过收细胞超声, 离心取上清通过 Bradford 法^[9]测定蛋白质的浓度, 浓度差别不大, 且脱辅基蛋白在总蛋白中所占比例几乎相同^[10]。分析在同样条件下以 580 nm 处激发荧光所测得的荧光光谱可以得出, 只有在裂合酶 CpcT1 参与催化的条件下 Cys-155 位才具有很强的结合 PCB 的能力。

表 1 β -CPC (C84S) 在各种催化组合下的活性比较(580 nm 激发)
Tab. 1 Compare of lyase activity of β -CPC (C84S)

重组体系 Reconstitution	裂合酶 Lyase	荧光峰值(上清) Data of the Fluorescence	活性百分比 ¹ Activity percent (%)	峰值位置 The right site of the wavelength
CpcT1		1544.1±49.4	100	627
CpcT2		27.7±5.0	1.8±0.3	627
CpcS1		27.5±1.0	1.8±0.1	627
CpcS2		15.8±0.2	1.0±0.0	627
None		13.9±0.1	0.9±0.0	627

注: 1. 活性百分比为各种体内重组体系组合荧光峰值的平均值/重组体系 荧光峰值的平均值; 下同

Note: 1. Activity percent: The average fluorescence data of every reconstitution / The average fluorescence data of reconstitution ;
The same as follows

表 2 β -PEC(C84A)在各种催化组合下的活性比较(580 nm 激发)Tab.2 Compare of lyase activity of β -PEC (C84A)

重组体系 Reconstitution	裂合酶 Lyase	荧光峰值(上清) Data of the Fluorescence	活性百分比 Activity percent (%)	峰值位置 The right site of the wavelength
	CpcT1	1175.4±73.6	100	625
	CpcT2	5.5±0.0	0.5±0.0	625
	CpcS1	3.6±0.0	0.3±0.0	625
	CpcS2	6.1±0.1	0.5±0.0	625
	None	6.4±0.0	0.6±0.0	625

2.3 色素蛋白吸收和荧光光谱分析

通过吸收光谱和荧光光谱检测各体内重组体系得到的色素蛋白,由其光谱特征可判断重组产物的

光学活性,以及偶联色素的种类等。重组体系 和 同时取提纯透析后的蛋白测荧光和紫外光谱, 得到的对比图谱(图 5)。

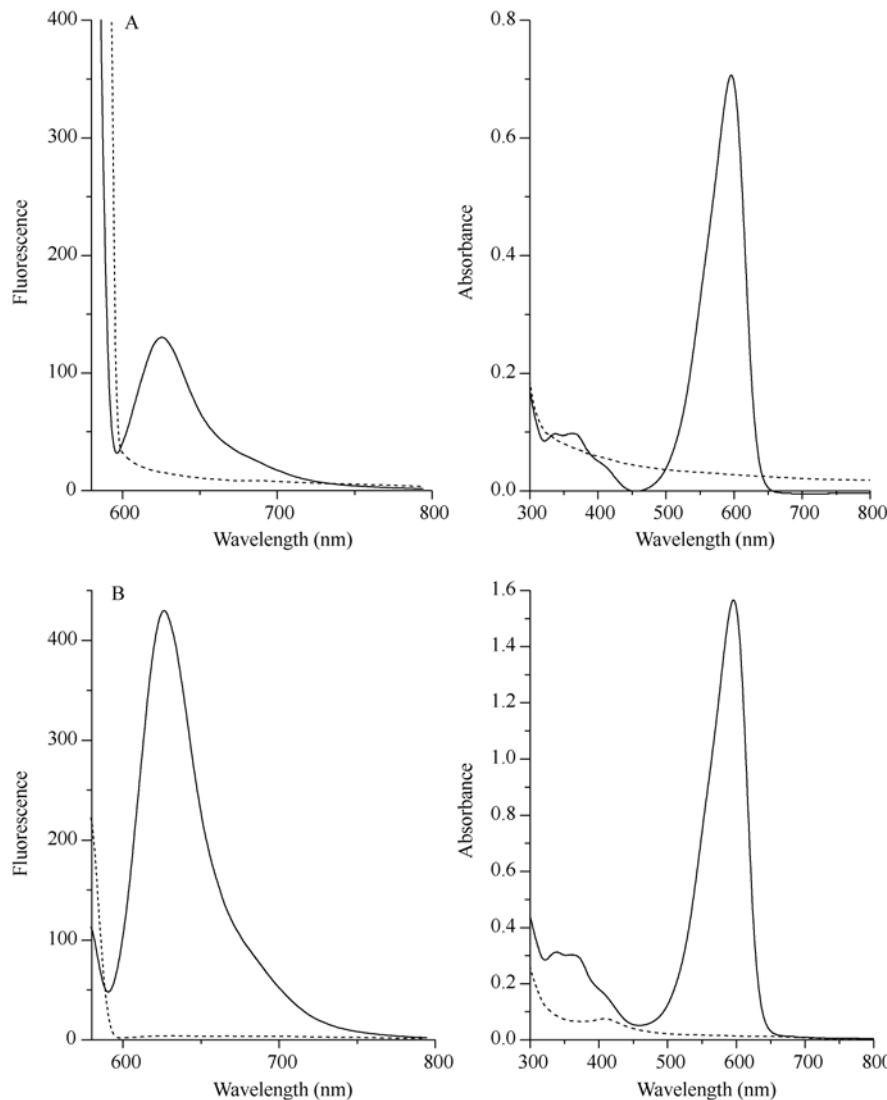


图 5 重组体系 和 产物的吸收光谱和荧光光谱

Fig. 5 Fluorescence and absorption spectra of reconstitution and

A. CpcB (C84S)的重组体系 和 产物的吸收光谱和荧光光谱 (稀释后); B. PecB(C84A)重组体系 和 产物的吸收光谱和荧光光谱 (稀释后); 实线: 重组体系 产物的荧光光谱(稀释后)和吸收光谱; 虚线: 重组体系 产物的荧光光谱和吸收光谱

A. Fluorescence(diluted) and Absorption spectra of reconstitution and with CpcB(C84S); B. Fluorescence (diluted) and Absorption spectra of reconstitution and with PecB(C84A); Solid line: Fluorescence(diluted) and Absorption spectra of reconstitution ; Broken line: fluorescence and Absorption spectra of reconstitution

分析图 5 可以得出以下结论: 在裂合酶 CpeT1 存在时, 重组体系 : pET-cpcB (C84S)、pCDFDuet-cpcT1、pACYCDuet-hol1-pcyA 的最大吸收波长在 596 nm, 最大荧光波长在 627 nm; 重组体系 ': pET-pecB (C84A)、pCDFDuet-cpcT1、pACYCDuet-hol1-pcyA 最大吸收波长在 596 nm, 最大荧光波长在 625 nm。

从图 1 中吸收光谱和荧光光谱的对比可以看出, 重组体系 由于没有裂合酶的催化, 重组活性很低, 裂合酶 CpcT1 催化 β -CPC 和 β -PEC 中第 155 位 Cys 与 PCB 结合的能力远远强于其自催化的能力。编码为 *all5339* 基因 *cpcT1* 为催化 β -CPC 和 β -PEC 中的 Cys-155 与 PCB 的共价偶联的裂合酶^[11]。

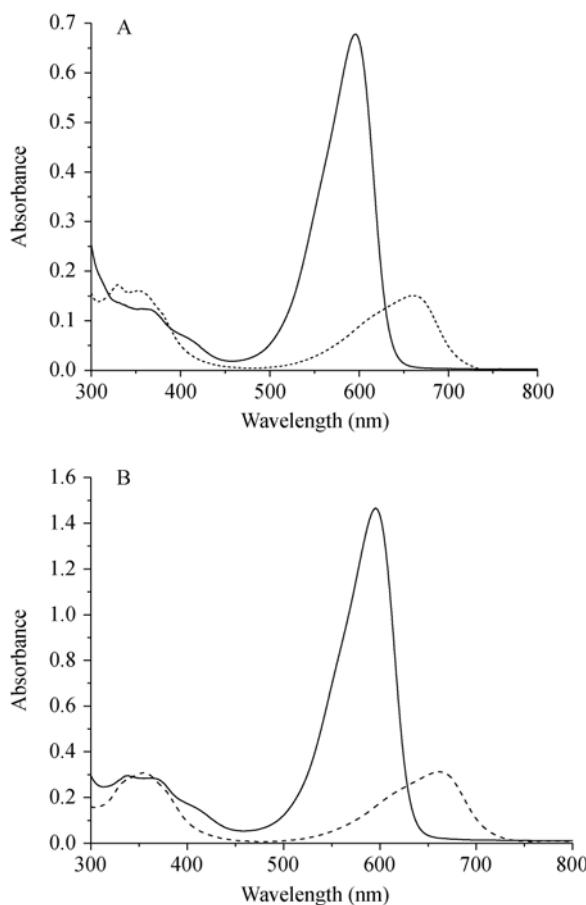


图 6 色素蛋白酸性脲变性吸收光谱

Fig. 6 Absorption spectrum of chromoprotein after denaturation by urea in the presence of hydrochloric acid

A. PCB-CpcB (C84S)酸性脲变性吸收光谱(pH=2); B. PCB-PecB (C84A)酸性脲变性吸收光谱(pH=2); 实线: 变性前紫外吸收光谱; 虚线: 变性后紫外吸收光谱

A. Absorption spectra of PCB-CpcB (C84S)(pH=2); B. Absorption spectra of PCB-PecB (C84A)(pH=2); Solid line: absorption spectrum of reconstituted product before denaturation by urea in the presence of hydrochloric acid; Broken line: absorption spectrum of reconstituted product after denaturation by urea in the presence of hydrochloric acid

对产生的藻蓝色蛋白, 进一步进行色素蛋白酸性脲变性试验。紫外可见光谱检测变性后的色素蛋白, 其吸收光谱(图 6), 色素蛋白 PCB-CpcB(C84S)和 PCB-PecB(C84A)变性后的最大吸收波长均在 660 nm 左右, 原来 596 nm 处的最大吸收峰消失, 可以判断共价偶联的是色素 PCB。

2.4 色素蛋白 SDS-PAGE 电泳与锌电泳鉴定

通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 醋酸锌染色和考马斯亮蓝 R-250 染色, 检测到了目的蛋白的表达。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。通过重组蛋白锌电泳的试验, 可以发现, 在 280 nm 紫外光照射下, 锌电泳中重组蛋白发出荧光, 这证明在体内重组过程中能得到色素蛋白(图 7)。

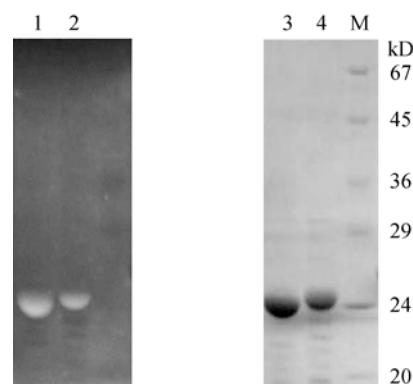


图 7 产物 PCB-CpcB(C84S)和 PCB-PecB(C84A)锌染色和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE of reconstituted PCB-CpcB(C84S) and PCB-PecB(C84A) stained for the chromophore with zinc acetate and for protein with Coomassie blue

1. PCB-PecB(C84A)锌染色电泳图; 2. PCB-CpcB(C84S)锌染色电泳图; 3. PCB-PecB(C84A)SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图; 4. PCB-CpcB(C84S)SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图; M. 蛋白质标准分子量

1. SDS-PAGE of reconstituted PCB-PecB(C84A) stained for the chromophore with zinc acetate ; 2. SDS-PAGE of reconstituted PCB-CpcB(C84S) stained for the chromophore with zinc acetate ; 3.

SDS-PAGE of reconstituted PCB-PecB(C84A) stained for protein with Coomassie blue; 4. SDS-PAGE of reconstituted PCB-CpcB (C84S) stained for protein with Coomassie blue; M. Protein molecular weight marker

3 讨 论

藻胆蛋白作为一类新型的荧光探针被广泛应用, 目前使用较多的是藻红蛋白和藻蓝蛋白。藻红蓝蛋白含有藻红胆素和藻蓝胆素, 由于色素在蛋白质内适当的空间排列和取向, 使得藻红胆素向藻蓝胆素能量转移的效率接近 100%, 因此对于荧光双标记及多色标记十分有利, 通过基因工程手段获得具有

这种特性的蛋白质是十分有意义的。本文经过文献资料分析和同源性比对,设计试验挑取了4个同源性较高的基因,并分别进行体内重组实验,用于挑选出能正确催化该藻胆蛋白偶联PCB的裂合酶。

重组体系I中质粒组合转化大肠杆菌BL21(DE3)成功后,产生大量的色素蛋白产物。对产物进行的光谱测定,具有很高的吸收和荧光特定峰值;蛋白质电泳锌染色后能在紫外光下发出橙红色荧光,证明偶联色素成功;其后的蛋白质酸性脲变性试验,验证了所连色素为PCB。所有结果证实,裂合酶CpcT1具有很强的催化 β -CPC和 β -PEC中第155位Cys与PCB结合的能力。对于重组体系I中质粒组合转化大肠杆菌BL21(DE3)成功后,仅有少量色素蛋白产物的生成,可以估测在生物体内Cys-155与PCB能进行一定的自催化偶联反应并能形成天然产物,但其能力十分有限。从重组体系I、II、III结果可知,有CpcS1、CpcS2、CpcT2参与同没有酶参与的重组体系I具有相似的特性;相对于CpcT1,活性百分比也与自催化产物相近。由此可以证实酶CpcS1、CpcS2、CpcT2并不能催化 β -CPC和 β -PEC中第155位Cys与PCB的结合。

此外,也有文献报道,在不同的藻种中,相同的脱辅基蛋白的色素结合位点,如螺旋藻脱辅基藻蓝蛋白 β 亚基的153位,从集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC6803)中找到的编码为slr1649的基因cpcT可以催化该位点与PCB偶联^[12]。基因slr1649与本文中基因all5339是不同藻种的相同功能的基因片段,从而更加验证了本试验的结果。

参考文献:

- [1] Zhao K H, Hong Q, Siebzehnruedl S, et al. Phycoerythrocyanin: A photoreceptor pigment with two faces [J]. *Frontiers of Photobiol*, 1993, **1021**: 31—36
- [2] Reuter W, Nicker R. Molecular Assembly of the phycobilisomes from the *Cyanobacteria magstigocladus laminosus* [J]. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 1993, **18**: 51—66
- [3] Zhao K H, Su P, Li J, et al. Chromophore attachment to phycobiliprotein β -Subunits. Phycocyanobilin: cysteine- β 84 phycobiliprotein lyase activity of CpeS-like protein from *Anabaena* sp.PCC7120 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(14): 8573—8581
- [4] Zhao K H, Zhu J P, Song B, et al. Nonenzymatic chromophore attachment in biliproteins: conformational control by the detergent triton X-100 [J]. *Biochim Biophys. Acta*, 2004, **1657**: 131—145
- [5] Li M, Wu D, Zhou M, et al. The expression of PceE/F of phycocyanin operon and the study of lyase PceE/F activity of *Mastigocladus laminosus* [J]. *J Huazhong University of Sci and Tech*, 2004, **32**(2): 77—79 (Ch) [李梅, 武栋, 周明, 等. 藻蓝蛋白裂合酶基因的表达与酶活性研究. 华中科技大学学报(自然科学版), 2004, **32**(2): 77—79]
- [6] Song B, Zhu J P, Zhou M, et al. Site-directed mutation of the β -subunit of phycocyanin and phycoerythrocyanin and the study of reconstitution *in vitro* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(4): 344—347 [宋波, 朱菁萍, 周明. 藻蓝蛋白和藻红蓝蛋白 β 亚基半胱氨酸的定点突变及体外重组研究. 水生生物学报, 2004, **28**(4): 344—347]
- [7] Glazer A N. Light harvesting by phycobilisomes, *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* [J]. 1985, **14**: 47—77
- [8] Shim C M, Yang J Y, Kang S S, et al. Chromophore-apoprotein interactions in *Synechocystis* sp. PCC6803 phytochrome Cph1 [J]. *Biochemistry*, 2000, **39**: 6349—6356
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248—254
- [10] Zhao K H, Su P, Tu M, et al. Phycobilin: cysteine-84 biliprotein lyase, a near-universal lyase for cysteine-84-binding sites in *Cyanobacterial phycobiliproteins* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, **104**: 14300—14305
- [11] Talarico. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. *Sci Mar*, 1996, **60**(Suppl.1): 205—222
- [12] Guan X Y, Qin S, Zhang W J, et al. Recombinant expression of a fluorescent β -phycoerythrocyanin in *Escherichia coli* [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, **38**(4): 605—608 [关翔宇, 秦松, 张伟杰, 等. 光学活性藻蓝蛋白 β 亚基的体内重组. 中国海洋大学学报, 2008, **38**(4): 605—608]

PHYCOBILIN COVALENT COUPLED TO β SUBUNIT CYS-155 OF PHYCOCYANIN AND PHYCOERYTHROCYANIN FROM *MASTIGOCLADUS LAMINOSUS* PCC 7603

ZHANG Juan¹, ZHOU Ke-Cheng¹, XIA Kun¹ and ZHOU Ming²

(1. Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074; 2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Phycobiliproteins, as a homologous family of light-harvesting proteins present in cyanobacteria, red algae and cryptophytes, are the function composition of light-harvesting complexes in the algae photosynthesis. The phycobiliprotein biosynthesis is the phycobilin addition to the apophycobiliproteins. So far, the correct attachments of most chromophores are catalyzed by lyases, of which only few have been characterized *in vivo*. In *Mastigocladus laminosus* PCC7603, phycocyanin and phycoerythrocyanin have two subunits, the coupling sites of phycobilin addition to the apophycobiliprotein of β subunits are Cys-84 and Cys-155. The protein CpcS1 encoded by gene *alr0617* was proved to be the lyase of Cys-84. To search the lyase of Cys-155, four genes were filtrated by BLAST comparison. They were *cpcT1*, *cpcT2*, *cpcS1* and *cpcS2*, in which genes *cpcT1* and *cpcS2* had to be transformed to the vector pCDFDuet for the experiments need by molecular cloning technique, and the correct clones could be selected by agarose gel electrophoresis and SDS-PAGE. The entire pathway of a fluorescent β subunit was synthesized from combinational expression of four genes in three compatible pACYCDuet-*hol*-*pcyA*, pET30a-*cpcB* (C84S) or pET30a-*pecB* (C84A) and one of the filtrated four genes in *E. coli*, in LB culture medium at 20°C for 12h. After mechanical disruption, the reconstitution protein were purified by metal chelating affinity chromatography, and dialysed in buffer overnight to leach the medical irons. At last, they were confirmed by lyase activity comparisons, SDS-PAGE, chromoprotein denaturation, absorbance and fluorescence spectrum. As a result, compared to the related literatures of PCB spectrum, the protein CpcT1 encoded by gene *all5339* was the lyase of Cys-155. At the same time, it proved that the other three genes have no effects to the Cys-155. Up to now, the two lyases which could catalyze the coupled reaction of the apophycobiliprotein's two sites of β subunits and PCB were all found. This result will be signally for researching the phycobiliprotein biosynthesis, light-harvesting principle in photosynthesis, assembling phycobilisome and so on.

Key words: β -CPC; β -PEC; Lyase CpcT1; Reconstitution *in vivo*