

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

宋 波 朱菁萍 周 明 赵开弘

(华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要: 为研究藻蓝蛋白(PC)和藻红蓝蛋白(PEC) β 亚基(分别简称为 β -PC、 β -PEC)生物合成、结构与功能的关系,用 Mega primer PCR 定点突变技术设计 β -PC、 β -PEC 中与藻蓝胆素连接的第二个半胱氨酸的定点突变蛋白质 β -PC (C155I)和 β -PEC(C155I)。将相应的基因片段亚克隆于表达载体 pET 30a,并转化大肠杆菌 BL21(DE3)。经 IPTG 诱导后, β -PC(C155I)和 β -PEC(C155I)在大肠杆菌中均得到了高效表达。 β -PC(C155I)和 β -PEC(C155I)与藻蓝胆素的重组结果表明两个突变体的结构基本没发生改变,有利于对 β -PC 和 β -PEC 的生物合成进行进一步研究。

关键词: 藻蓝蛋白 β 亚基;藻红蓝蛋白 β 亚基;定点突变;体外重组

中图分类号: Q753 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2004)04-0344-05

藻胆蛋白(Phycobiliprotein)是存在于蓝藻、红藻和隐藻中的光合作用捕光色素蛋白质,它们是由藻胆色素与相应脱辅基蛋白半胱氨酸的巯基以硫醚键共价结合而形成。根据其吸收光谱特征,藻胆蛋白可分为四类: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)^[1]。PC 和 PEC 的 β 亚基(分别简称为 β -PC 和 β -PEC)中 Cys-84、Cys-155 分别以硫醚键与一个藻蓝胆素(PCB)相连。由于在吸收光谱中 β -PC 和 β -PEC 的 PCB 吸收峰较宽,两个 PCB 的吸收波长又相近,故在吸收光谱上这两个吸收峰重叠,只表现出一个宽峰,无法从光谱直接读出两个 PCB 各自的吸收波长^[2-5]。同时,由于它们共价连接两个相同的 PCB,对 β -PC 和 β -PEC 光谱解析和生物合成的研究,比单色素藻胆蛋白复杂,目前其生物合成的研究还未见成功报道。

利用定点突变技术构建突变体是研究蛋白质结构与功能相互关系的一个重要手段。本实验分别对 β -PC 和 β -PEC 构建了两个连接 PCB 的半胱氨酸突变体 β -PC(C155I)、 β -PEC(C155I),这样得到了只在 84 位有一个半胱氨酸能与 PCB 共价结合的两个脱辅基藻胆蛋白。通过体外重组实验,可以对 β -PC、 β -

PEC 与 PCB 的重组进行深入研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 克隆载体 pBluescript SK(+) 为 Stratagene 公司产品,表达载体 pET 30a 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、*Eco*R、*V*、*Xba*I 为 MBI 公司产品,*Taq* 酶为 Biostar 公司产品,IPTG 为 SABC 产品,亲和层析介质购自 Amersham Pharmacia 公司。*E. coli* TG1、*E. coli* BL21(DE3) 由本室保存。质粒 pET 30aPecB、pET 30aPcB 由本室构建和保存。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 引物设计与合成 为构建 β -PC(C155I)、 β -PEC(C155I)两个突变体,根据已知的层理鞭枝藻(PCC 7603)的 pcB 和 pecB 序列,设计了六条引物:

P1: 5'-TAACCCGGGCATACGATGTATTACCAAG-3'

P2: 5'-GGCCTCGAGAGTAAATTTAAGCAACTGCAG-3'

P3: 5'-ACCAAAGGTGATATCAGTGCCTTAATCTCAG-3'

P4: 5'-ATACCCGGGATGCTTGATGCTTTTCCAG-3'

P5: 5'-ACTCTCGAGCGCCTTTGACTGCATTAAGG-3'

P6: 5'-GGCATTACCAAAGGTGATATCAGTCAATTAA-3'

收稿日期: 2002-12-23; 修订日期: 2003-02-17

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

作者简介: 宋 波(1978-), 男, 湖北宜昌市人, 硕士

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

其中引物 1、2、3 用于构建突变体 β -PC(C155I) 的基因序列 pcB(C155I), 引物 4、5、6 用于构建突变体 β -PEC(C155I) 的基因序列 pecB(C155I)。引物由中国科学院上海生物化学研究所合成。

1.3 突变体的克隆和表达载体的构建 利用 Mega primer PCR 法, 扩增出 pcB(C155I)、pecB(C155I) 两个突变体的基因片段^[6]。该基因片段经过 *Sma* I 与 *Xho* I 酶切后, 与同样双酶切的克隆载体 pBluescript sK(+) 连接, 转化到 *E. coli* TG I, 用含有氨苄青霉素的平板筛选。根据质粒大小、酶切图谱和 PCR 检验初步鉴定阳性重组子。重组质粒经 *Sma* I 与 *Xho* I 酶切后得到的外源片段与经 *EcoR* V, 与 *Xho* I 酶切的表达载体 pET30a 连接, 转化到 *E. coli* BL21(DE3), 用含有卡那霉素的平板筛选。根据质粒大小、酶切和 PCR 检验, 以及 IPTG 诱导表达的外源融合蛋白 N 端都带有 6 个组氨酸, 进一步鉴定阳性重组子。所得的突变体基因片段由上海博亚生物技术有限公司进行核苷酸序列测定。

1.4 突变体的表达与纯化 表达载体 pET 30a 中 T7 启动子下游有 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 端都带有 6 个组氨酸, 故可采用亲和层析法提纯。含各种表达质粒的 *E. coli* BL21 分别在 1L 含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ = 0.4—0.7, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 诱导 5h 后, 离心收集细胞, 二次蒸馏水洗两次, -20 $^{\circ}$ C 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 10min, 离心得到上清^[7, 8]。

1.5 体外重组 取实验 1.4 所得上清直接用于以下体外重组实验, 反应体系总体积 0.6mL。体系 I 中加入 β -PC(C155I) 上清和 PCB; 体系 II 为没有突变的 β -PC 亚基与色素 PCB 的直接反应, 用作对照。体系 III 中加入 β -PEC(C155I) 上清和 PCB; 体系 IV 为没有突变的 β -PEC 亚基与色素 PCB 的直接反应。37 $^{\circ}$ C 暗处反应 3h 后, 离心, 取上清, 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 1mol/L 咪唑、0.5mol/L NaCl、20mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.2)。最后测定光谱^[9]。

1.6 光谱测定 天然藻胆蛋白作为捕光蛋白, 可吸收一定波长的光。通过光谱检测已纯化的色素蛋白质, 由其光谱特征可判断重组产物的结构与光学活

性^[10]。紫外可见光谱扫描范围 300—800nm, 扫描速度 960nm/min, 狭缝宽度 1.0nm。荧光光谱扫描速度 1200nm/min, 狭缝宽度 5.0nm/5.0nm。

1.7 色素蛋白质变性实验 为进一步确定重组产物中色素的种类, 采用酸性尿素(8mol/L, pH = 2)条件使其变性, 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^[11, 12]。

2 结果

2.1 突变体的构建和鉴定

构建突变体基因 pcB(C155I) 时, 为便于检测, 在突变引物 P₃ 中将 Cys 的密码子(TGC)置换为 Ile 密码子(ATC)的同时, 做了以下无义突变: GCC $\rightarrow$ GCG, TTG $\rightarrow$ TTA, 由此在引物 P₃ 中引入了一个 *EcoR* V 的酶切位点。两次 PCR 应分别得到约 90bp、530bp 的片段。质粒 pBlur pcB(C155I) 以酶切和 PCR 检测。用 *Sma* I、*Xho* I 消化质粒 pBlur pcB(C155I), 应得到约 530bp 的片段; 用 *Sma* I、*EcoR* V 消化质粒 bBlur pcB(C155I), 应得到的片段大小约为 460bp。质粒 pET-pcB(C155I) 以酶切和 PCR 检测。用 *Xba* I、*Xho* I 消化质粒 pET-pcB(C155I), 应得到约 700bp 的片段; 用 *EcoR* V、*Xba* I 消化质粒 pET-pcB(C155I), 应得到的片段大小约为 630(bp) (图 1)。电泳结果与预期符合。突变体基因 pecB(C155I) 的构建与以上方法类似, 电泳结果也相似(图 2)。通过测序, 证明所得突变体与预期完全一致。

2.2 突变体在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达和鉴定

在 37 $^{\circ}$ C、1mmol/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, 如图 3 所示。

2.3 光谱分析

在体系 I 中, β -PC(C155I) 上清和 PCB 直接重组, 得到的色素蛋白质最大吸收光谱为 635nm。荧光光谱检测发现产物为单一吸收峰, 其荧光在 655nm 左右。体系 III 中, β -PEC(C155I) 上清和 PCB 直接重组, 最大吸收峰位于 635nm 处; 荧光发射光谱和激发光谱检测发现, 产物为单一吸收峰, 表明为单一组分。变性实验显示, 在体系 I 和体系 III 中色素最大吸收峰均在 660nm 处, 表明所连色素为 PCB。

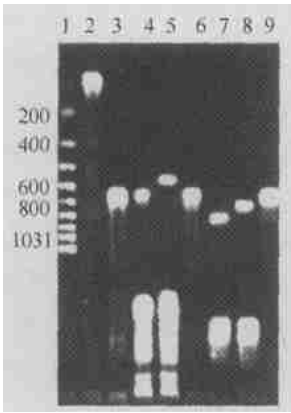


图 1 pcB(C155I) 的琼脂糖凝胶电泳谱图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of pcB(C155I)

1 DNA 分子量标准, DNA ladder; 2 一次 PCR 产物, First PCR; 3 二次 PCR 产物, Second PCR; 4 经 *Sma* I、*Xho* I 消化的质粒 pBlur pcB(C155I), pBlur pcB(C155I) digested by *Sma* I、*Xho* I; 5 经 *Sma* I、*EcoR* V 消化的质粒 pBlur pcB(C155I), pBlur pcB(C155I) digested by *Sma* I、*EcoR* V; 6 PCR 检测质粒 pBlur pcB(C155I), PCR from pBlur pcB(C155I); 7 经 *Xba* I、*Xho* I 消化后的质粒 pEF pcB(C155I), pEF pcB(C155I), digested by *Xba* I、*Xho* I; 8 经 *EcoR* V、*Xba* I 消化后的质粒 pEF pcB(C155I), pEF pcB(C155I) digested by *EcoR* V、*Xba* I; 9 PCR 检测质粒 pEF pcB(C155I), PCR from pEF pcB(C155I)

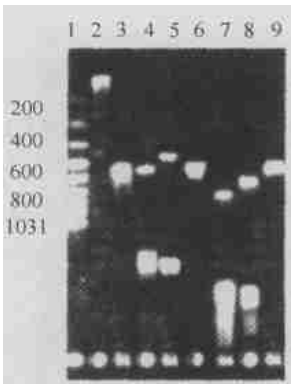


图 2 pecB(C155I) 的琼脂糖凝胶电泳谱图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of pecB(C155I)

1 DNA 分子量标准, DNA ladder; 2 一次 PCR 产物, First PCR; 3 二次 PCR 产物, Second PCR; 4 经 *Sma* I、*Xho* I 消化的质粒 pBlur pecB(C155I), pBlur pecB(C155I) digested by *Sma* I、*Xho* I; 5 经 *Sma* I、*EcoR* V 消化的质粒 pBlur pecB(C155I), pBlur pecB(C155I) digested by *Sma* I、*EcoR* V; 6 PCR 检测质粒 pBlur pecB(C155I), PCR from pBlur pecB(C155I); 7 经 *Xba* I、*Xho* I 消化后的质粒 pEF pecB(C155I), pEF pecB(C155I) digested by *Xba* I、*Xho* I; 8 经 *EcoR* V、*Xba* I 消化后的质粒 pEF pecB(C155I), pEF pecB(C155I) digested by *EcoR* V、*Xba* I; 9 PCR 检测质粒 pEF pecB(C155I), PCR from pEF pecB(C155I)

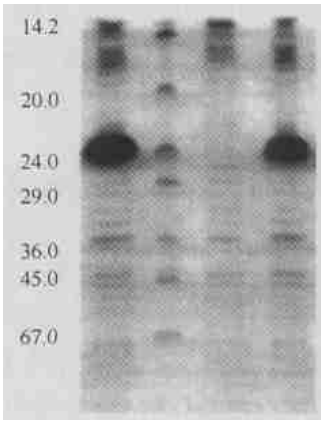


图 3 pcB(C155I)、pecB(C155I) 基因表达产物的 SDS PAGE 谱图

Fig. 3 SDS PAGE of protein from pcB(C155I) and pecB(C155I) 1 pcB(C155I) 诱导表达产物, protein from pcB(C155I); 2. 蛋白质分子量标准, Protein molecular weight standard; 3. 表达载体 pET 诱导表达产物, pET induced with IPTG; 4. pcB(C155I) 诱导表达产物, Protein from pcB(C155I)

3 讨论

GorIV 分析显示, 藻蓝蛋白 β 亚基(β -PC) Cys-155 位于由 ANDPNGITKGDC 十二个氨基酸组成的无规则卷曲的 C 末端。在突变体 β -PC(C155I) 中, Ile-155 脱离无规则卷曲, 而位于 α 螺旋的 N 末端; 其他二级结构无变化。藻红蓝蛋白 β 亚基(β -PEC) 同突变体 β -PEC(C155I) 比较, 变化也是如此。Cys 和 Ile 均为脂肪族氨基酸, 将 Cys 残基替换为 Ile 残基后, 由于 Ile 是含一氨基一羧基的中性氨基酸, 对蛋白质的结构影响很小。因此, 得到的突变体的结构应基本不变。比较体系 I 和 II、体系 II 和 IV, 可以发现吸收峰峰形基本相同, 两个突变体与原 β 亚基具有相似的高级结构, 只是由于色素蛋白质复合物中色素构象的不同, 造成最大吸收峰位置的不同。

由于藻胆蛋白内的能量传递, 在一定波长光的照射下, Cys-155 连接的 PCB 所吸收的能量以荧光的形式发射出来, 并被 Cys-84 所连 PCB 吸收, 因此由荧光发射光谱只能得到 Cys-84 所连 PCB 的荧光发射波长。在体系 I 和 II、体系 II 和 IV 的荧光发射光谱峰值相同, 均在 650nm 左右。

在天然构象的色素蛋白质复合物中, 与 β -PC 的 Cys-84 结合的 PCB 最大吸收峰理论上在 622—624nm 左右^[6]; 与 β -PEC 的 Cys-84 结合的 PCB 最大吸收峰在 604nm 左右^[7]。体系 I、体系 III 中, 色素蛋白质复合产物的最大吸收峰在 635 nm 左右, 证明所

连的色素均为非天然构象。在诱导表达的过程中, β -PC 和 β -PEC 是以包涵体形式存在于大肠杆菌细胞内,在超声过程中,蛋白质可能不是处于正确的折叠状态;重组体系中,可能缺少某些必要的组分,造成脱辅基藻胆蛋白与色素非天然结合的原因。因此,有必要在这些方面作进一步研究。

参考文献:

- [1] Foerstendorf H, Parbel A, Scheer H, *et al.* E isomerization of the α -84 phycoviolobilin chromophore of phycoerythrocyanin from *Mastigocladus laminosus* investigated by Fourier transform infrared difference spectroscopy [J]. *FEBS Letters*, 1997, **402**: 173—176
- [2] MacColl Robert, Eisele Leslie E, Manone Jennifer, Fluorescence polarization studies on four biliproteins and a bilin model for phycoerythrin [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **1412**: 230—239
- [3] Zhao K H, Deng M G, Zheng Min, 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 operon [J]. *FEBS Letters*, 2000, **469**: 9—13
- [4] MacColl Robert, Cyanobacterial Phycobilisomes [J]. *Journal of Structural Biology*, 1998, **124**: 311—334
- [5] Zhang J M, Zhao J Q, Jiang L J, Studies on the energy transfer among the rod-core complex from phycobilisome of *Anabaena variabilis* by time resolved fluorescence emission and anisotropy spectra [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, **1320**: 285—296
- [6] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology* [M]. John Wiley & Sons, Inc, 1995, 268—271
- [7] Andrey A, Demidov and Mamoru Mimuro, Deconvolution of G-Phycocyanin β -84 and β -155 Chromophore Absorption and Fluorescence Spectra of *Cyanobacterium Mastigocladus laminosus* [J]. *Biophysical Journal*, 1995, **68**: 1500—1506
- [8] Axel Parbel, Zhao K H, Jacques Breton, *et al.* Chromophore assignment in phycoerythrocyanin from *Mastigocladus laminosus* [J]. *Photosynthesis research*, 1997, **54**: 25—34
- [9] Duering M, Huber R, Bode W, *et al.* Refined three dimensional structure of phycoerythrocyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* at 2.7Å [J]. *J. Mol Biol*, 1990, **211**(3): 633—644
- [10] 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 基因片段的克隆和表达. 水生生物学报, 2001, **25**(4): 427—430]
- [11] 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]
- [12] 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 基因片段的克隆和表达. 水生生物学报, 2002, **26**(2): 168—174]

SITE-DIRECTED MUTATION OF THE β -SUBUNIT OF PHYCOCYANIN AND
PHYCOERYTHROCYANIN AND THE STUDY OF RECONSTITUTION IN VITRO

SONG Bo, ZHU Jing-Ping, ZHOU Ming and ZHAO Kai-Hong

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

Abstract: To study the structure-function relationships of the β subunit of phycocyanin (β -PC) and phycoerythrocyanin (β -PEC), site-directed mutation was used to generate two mutants, β -PC (C155I) and β -PEC (C155I). The six primers were designed, of which primer P₁, P₂ and P₃ were used to generate mutant β -PC (C155I), primer P₄, P₅ and P₆ were used to generate β -PEC (C155I). Both of primer P₃ and P₆ contained a restriction site *EcoR* V, so we can pick out the cysteine mutants from the reconstructed plasmids. 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. It was confirmed that the genes were inserted into pBluescript vector by the restriction enzyme double digestion with *Sma* I and *Xho* I, *Sma* I and *EcoR* V, PCR and sequencing. The genes of the two cysteine mutants were purified after the *Sma* I / *Xho* I double digestion of the reconstructed plasmids, and then inserted into expression vector pET 30a, finally transformed into *E. coli* BL21 (DE3). In the transformed BL21 (DE3) strains, 24kD protein were overexpressed, respectively. The overexpressed proteins were directly used to reconstitution with pigment PCB in vitro. The purified reconstituted products were determined with absorption spectra and fluorescence spectra, showing that they were similar to the β -PC and β -PEC in spectrum characteristics. It was analysed by GOR IV, showing that there was no other change happened in the secondary structure of β -PC and its mutant, except that Cys 155 of β -PC was situated at the C-terminal of random coil of ANDPN2GITKGDC amino acid residues, whereas at N2terminal of alpha helix of ISALISEVASYFDRA in β -PC (C155I). And the similar situation happened to β -PEC and its mutant. So the structure of the two mutants was similar to the wild-type proteins.

Key words: β -subunit of phycocyanin; β -subunit of phycoerythrocyanin; Site-directed mutation; Reconstitution